



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/> 27298

To cite this version:

Renvier, Amandine . *Évaluation de la contamination des tortues vertes (Chelonia Mydas) par le virus de la fibropapillomatose dans les eaux côtières de la Martinique*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2020, 117 p.

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

EVALUATION DE LA CONTAMINATION DES TORTUES VERTES (*CHELONIA MYDAS*) PAR LE VIRUS DE LA FIBROPAPILLOMATOSE DANS LES EAUX COTIERES DE LA MARTINIQUE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

RENVIER Amandine
Née le 29/08/1994 à MONTPELLIER (34)

Directeur de thèse : M. Guillaume LE LOC'H

JURY

PRESIDENT :
M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. Guillaume LE LOC'H
M. Stéphane BERTAGNOLI

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

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

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie - 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**, (Emérite) - *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- 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**, *Zootecnie*
- 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*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et Économie de la santé animale*

PROFESSEURS CERTIFIÉS DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

MAÎTRES DE CONFÉRENCES HORS CLASSE

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

- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
 M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
 M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
 M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
 Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
 M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
 Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
 Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
 Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
 M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
 M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
 Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie- Bactériologie-Pathologie infectieuse*
 Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*
 Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
 M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
 M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
 Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
 Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
 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. **LHERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*
 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*
 Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
 M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*
 Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

CHARGES D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **BOLON Pierrick**, *Production et pathologie aviaire*
 M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
 Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*
 Mme **TOUSSAIN Marion**, *Pathologie des équidés*

ENSEIGNANT DE PREMIERE ANNEE COMMUNE AUX ETUDES VETERINAIRES

- Mme **GAUCHARD Cécile**, *Biologie-écologie-santé*

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

REMERCIEMENTS

À Monsieur le Professeur Christophe Pasquier

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

Virologie et bactériologie

Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.
Veuillez trouver ici le témoignage de notre profond respect.

À Monsieur le Docteur Guillaume Le Loc'h

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Médecine zoologique et de la faune sauvage

Pour avoir accepté de diriger ces travaux,
Sincères remerciements pour votre accompagnement tout au long de sa réalisation, votre gentillesse, votre disponibilité et vos conseils.
Toute ma gratitude et mon estime.

À Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli

Professeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse

Virologie et infectiologie

Pour m'avoir fait l'honneur d'être assesseur de cette thèse.
Hommages respectueux.

À Monsieur Benjamin de Montgolfier

Directeur du bureau d'études AQUASEARCH

Pour m'avoir confié la réalisation de ce sujet de thèse. Sincères remerciements pour m'avoir épaulée, soutenue et encadrée pour ce beau projet.
Toute ma reconnaissance et mon respect.

À toute l'équipe d'AQUASEARCH (M. Safi, A. Feunteun, N. Duporge, N. Vachon)

Pour votre aide dans la récolte des données de terrain et leur traitement. Merci pour votre soutien et votre efficacité.

Toute mon amitié.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX.....	7
LISTE DES ANNEXES.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
INTRODUCTION.....	11
PREMIERE PARTIE : ETAT DES CONNAISSANCES SUR LA FIBROPAPILLOMATOSE DES TORTUES VERTES	12
A. GENERALITES SUR LA FIBROPAPILLOMATOSE.....	12
1. <i>Agent étiologique</i>	12
2. <i>Espèces cibles de la fibropapillomatose</i>	13
B. ÉPIDEMIOLOGIE	14
1. <i>Mode de contamination et transmission</i>	14
2. <i>Facteurs de prédisposition</i>	15
a. Cofacteurs environnementaux	15
b. Cofacteurs internes.....	16
3. <i>Répartition géographique et expansion de la maladie</i>	16
C. LA FIBROPAPILLOMATOSE : ASPECTS CLINIQUES ET LESIONNELS	18
1. <i>Lésions</i>	18
2. <i>Caractéristiques biochimiques et hématologiques</i>	23
3. <i>Diagnostic différentiel</i>	24
4. <i>Évolutions possibles : régression, stabilisation, aggravation</i>	25
5. <i>Thérapeutique</i>	28
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODE	30
A. LES EAUX COTIERES DE LA MARTINIQUE : CARACTERISTIQUES DU SECTEUR ETUDIE	30
1. <i>Le choix de la Martinique</i>	30
2. <i>Choix des sites d'étude et période d'échantillonnage</i>	31
a. Sites de suivi photographique	32
b. Sites de prélèvement pour PCR.....	34
B. METHODE DE PRELEVEMENT ET DE DETECTION DE LA FIBROPAPILLOMATOSE CHEZ LES TORTUES VERTES	34
1. <i>La photo-identification</i>	34
a. Principe et intérêt de la photo-identification dans la mise en évidence de la FP.....	34

b.	Déroulement des prospections	35
c.	Traitement des photographies.....	38
d.	Cartographie et tracé GPS	41
2.	<i>Prélèvement d'échantillon pour analyses moléculaires</i>	42
a.	Objectifs et autorisations	42
b.	Mode de prélèvement des échantillons, transport et conservation.....	43
c.	Extraction ADN à partir des cartes FTA®.....	45
d.	Diagnostic de la FP par PCR.....	45
e.	Séquençage partiel.....	47
3.	<i>Analyses statistiques</i>	47
a.	Méthode de Capture-Marquage-Recapture.....	47
b.	Caractérisation du type de population par Close-Test	48
c.	Modèle d'estimation de la taille de la population – Méthode de Schnabel.....	48
i.	Méthode de Schumacher-Eschmeyer	49
TROISIEME PARTIE : RESULTATS		51
A.	EFFORT D'ECHANTILLONNAGE.....	51
B.	ETUDE DE LA FP PAR PHOTO-IDENTIFICATION EN SECTEUR NORD CARAÏBE.....	52
1.	<i>Caractérisation de la population</i>	52
a.	Anse Latouche et Turin	52
b.	Plage du Coin au Carbet.....	55
c.	Bellefontaine	57
2.	<i>Prévalence de la FP</i>	59
a.	Anse Latouche et Turin	59
b.	Plage du Coin au Carbet.....	59
c.	Bellefontaine	59
3.	<i>Corrélation entre taille des tortues et taille des tumeurs externes</i>	60
a.	Plage du Coin au Carbet	60
b.	Bellefontaine.....	60
4.	<i>Localisation des tumeurs externes</i>	60
a.	Plage du Coin au Carbet	60
b.	Bellefontaine.....	62
C.	ÉTUDE DE LA FP PAR PHOTO IDENTIFICATION EN SECTEUR CENTRE CARAÏBE	62
1.	<i>Estimation de la taille de la population</i>	63
2.	<i>Prévalence de la FP</i>	65
3.	<i>Corrélation taille des tortues et taille des tumeurs externes</i>	65
4.	<i>Localisation des tumeurs externes</i>	66
D.	ÉTUDE DE LA FP PAR PHOTO IDENTIFICATION EN SECTEUR SUD CARAÏBE.....	67
1.	<i>Estimation de la taille de la population</i>	67
a.	Anse Dufour et Noire.....	67
b.	Grande Anse.....	69

c. Bourg des Anses d'Arlets	72
2. <i>Prévalence de la FP</i>	74
a. Anse Dufour - Noire et Grande Anse.....	74
b. Bourg des Anses d'Arlets.....	74
3. <i>Corrélation taille des tortues et gravité de la FP</i>	74
4. <i>Localisation des tumeurs externes</i>	75
E. OBSERVATION DE REGRESSION, D'AGGRAVATION OU DE NOUVELLE CONTAMINATION	76
1. <i>Régression de tumeurs</i>	76
2. <i>Aggravations et nouvelles contaminations</i>	77
F. BILAN : LA FP CHEZ LES TORTUES VERTES SUR LA COTE CARAÏBE DE LA MARTINIQUE.....	78
G. RESULTATS DES ANALYSE PCR ET SEQUENÇAGE ADN	80
1. <i>Diagnostic de la FP à l'aide de la PCR</i>	80
a. Effort d'échantillonnage.....	80
b. Résultat PCR et migration sur gel.....	80
2. <i>Séquençage partiel de l'ADN</i>	83
QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION.....	86
A. DISCUSSION SUR L'ETUDE MENEES.....	86
1. <i>Méthodologie</i>	86
a. Photo-identification comme méthode d'évaluation de la prévalence de la FP	86
b. PCR à partir de cartes FTA®.....	88
2. <i>Paramètre pouvant influencer la prévalence et la gravité de la FP en Martinique</i>	90
a. Qualité de l'eau.....	90
b. Pression anthropique	93
3. <i>Régression spontanée de la FP</i>	94
4. <i>Phylogénie et transmission inter-espèces</i>	95
B. IMPLICATION EN TERME DE CONSERVATION, ACTIONS A VENIR.....	96
a. Gestion et protection de l'environnement direct des tortues marines	96
b. Sensibilisation de la population	97
c. Le rôle du vétérinaire	98
CONCLUSION.....	99
BIBLIOGRAPHIE.....	100
ANNEXES.....	113

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle de vie des tortues marines (Lanyon et al. 1989).....	14
Figure 2 : Répartition géographique des cas rapportés de fibropapillomatose dans le monde.	17
Figure 3 : Analyse phylogénétique de Chelonid Alphaherpesvirus 5 (Chaves et al. 2017).....	18
Figure 4 : Nageoire antérieure droite d'une tortue verte (<i>Chelonia mydas</i>) atteinte de FP d'après Formia et al. 2007.....	19
Figure 5 : Tête d'une tortue présentant des masses tumorales bilatérales autour des yeux (forme oculaire de la fibropapillomatose) d'après Banks 2006.....	19
Figure 6 : Plastrons et nageoires postérieures sévèrement affectées par la FP(Jones et al. 2016).....	20
Figure 7 : Exemple de fibropapillomatose généralisée d'après Flint et al. 2009.....	20
Figure 8 : Poumons d'une tortue verte juvénile (<i>Chelonia mydas</i>) atteints de fibropapillomatose, d'après Herbst et al. 1994.....	21
Figure 9 : Image radiographique de fibropapillomatose viscérale d'après Banks 2006.....	21
Figure 10 : Coupe histologique de peau saine d'une tortue verte d'après Herbst LH et al. 1994.	22
Figure 11 : Aspect histologique d'une lésion de fibropapillomatose de tortue marine d'après Herbst LH et al. 1994.....	23
Figure 12 : Aspect histologique de lésions de fibropapillomatose de tortue marine d'après Herbst et al. 1994.....	23
Figure 13 : Œil présentant des séquelles de FP d'après Bennett et al. 2001.....	27
Figure 14 : Lésion conjonctivale de FP en voie d'aggravation d'après Bennett et al. 2001.	27
Figure 15 : Lésion conjonctivale de FP en voie de régression d'après Bennett et al. 2001.....	28
Figure 16 : Images chirurgie à l'aide d'un laser à diode.	29
Figure 17 : Illustration de l'efficacité du laser à diode.	29
Figure 18 : Carte représentant les sites prospectés entre janvier et fin juillet 2020, sélectionnés d'après Liebart 2019	33
Figure 19 : Exemple de transect effectué lors d'une sortie au bourg des Anses d'Arlet dans le sens Nord-Sud.....	36
Figure 20 : Exemple de transect effectué pour deux Anses proches géographiquement	37
Figure 21 : Exemple de nomenclature d'une photographie après traitement.....	38
Figure 22 : Détermination des points clés de la zone à identifier, exemple sur un profil droit d'une tête de <i>Chelonia mydas</i>	39
Figure 23 : Exemple de traitement d'une photographie de profil droit d'une tortue CM012 prise à Anse Dufour le 19/05/2020 dans le logiciel I3S.....	40
Figure 24 : Comparaison des points clés pour deux images appartenant au même individu.....	41
Figure 25 : Exemple de visualisation du tracé effectué lors de la sortie au Bourg des Anses d'Arlet le 13/03/2020	42
Figure 26 : Schéma d'une vue dorsale de <i>Chelonia mydas</i> montrant les points clés permettant l'estimation de la taille de la dossière.	44

Figure 27 : Exemple de tumeurs prélevées dans le cadre du RETOM	44
Figure 28 : Carte de la Martinique représentant le secteur nord Caraïbe	52
Figure 29 : Carte topographique de l'Anse Turin et Latouche.....	53
Figure 30 : Graphique CMR pour l'ensemble Anse Latouche-Turin.....	54
Figure 31 : Graphique représentant les différentes classes de taille de tortues présentes à Anse Latouche - Turin au cours de l'étude.	54
Figure 32 : Carte topographique de la Plage du Coin au Carbet.....	55
Figure 33 : Graphique CMR pour la Plage du Coin au Carbet.....	56
Figure 34 : Graphique représentant les différentes classes de taille de tortues observées à la plage du Coin au Carbet au cours de l'étude	56
Figure 35 : Carte topographie de Bellefontaine.....	57
Figure 36 : Graphique représentant les différentes tailles de longueur de carapaces observées au cours de l'étude (2 sorties uniquement) à Bellefontaine.....	58
Figure 37 : Taille de la tortue en fonction de la taille des tumeurs externes pour la plage du Coin au Carbet.	60
Figure 38 : Position des tumeurs externes pour la plage du Coin au Carbet.....	61
Figure 39 : Photographie de la tête profil gauche de CM261 montrant deux tumeurs fibropapillomateuses oculaires.	61
Figure 40 : Photographie corps entier de la tortue CM261.....	62
Figure 41 : Carte de la Martinique représentant le secteur Centre Caraïbe	63
Figure 42 : Carte topographique des Anses Madame et Collat.....	63
Figure 43 : Graphique CMR pour l'ensemble Anse Madame - Collat.....	64
Figure 44 : Graphique représentant les différentes classes de taille de tortues présentes à Anse Madame Collat au cours de l'étude	65
Figure 45 : Graphique présentant la taille des tortues en fonction de la taille des tumeurs à Anse Madame Collat.....	66
Figure 46 : Graphique présentant les localisations des tumeurs externes observées au cours de l'étude à Anse Madame Collat.....	66
Figure 48 : Carte topographique du site Anse Dufour – Noire.....	68
Figure 49 : Graphique CMR pour l'ensemble Anse Dufour Noire.....	68
Figure 50 : Graphique représentant les différentes classes de taille de tortues observées à Anse Dufour Noire au cours de l'étude.	69
Figure 51 : Carte topographique de Grande Anse.....	70
Figure 52 : Graphique CMR pour Grande Anse.....	71
Figure 53 : Graphique représentant les différentes tailles de tortues présentes à Grande Anse au cours de l'étude.....	71
Figure 54 : Carte topographique du Bourg des Anses d'Arlet.....	72
Figure 55 : Graphique CMR pour le bourg des Anses d'Arlet.....	73
Figure 56 : Graphique représentant les différentes classes de taille de tortues présentes au Bourg des Anses d'Arlet au cours de l'étude.....	73

Figure 57 : Graphique présentant la taille des tortues en fonction de la taille des tumeurs au Bourg des Anses d'Arlet au cours de l'étude.	75
Figure 58 : Graphique présentant les différentes localisations de tumeurs externes observées au cours de l'étude au Bourg des Anses d'Arlets	75
Figure 59 : Photographies présentant l'évolution de la FP chez la tortue CM120_Aqua entre 2019 et 2020	77
Figure 60 : Photographies illustrant les cas de nouvelles contaminations et aggravation de la FP par rapport à 2019	78
Figure 61 : Carte bilan de l'évaluation de la contamination des tortues vertes par la FP sur la côte Caraïbe.	79
Figure 62 : Photographie du gel de migration des 17 échantillons testés par PCR nichée.	82
Figure 63 : Photographies des tumeurs prélevées chez la tortue CM2020622 au Carbet.....	82
Figure 64 : Photographie de la zone de prélèvement oculaire de la tortue CM20200622.....	83
Figure 65 : Séquence ADN de l'amplicon obtenu avec l'amorce GTHV-intF1 sur l'échantillon 17	83
Figure 66 : Premiers résultats obtenu en comparaison à la séquence ADN partielle de l'échantillon 5 par BLAST.	84
Figure 67 : Alignement de la séquence ADN partielle de l'échantillon 5 avec une séquence ADN du ChHV5 à Hawaii.....	84
Figure 68 : Alignement de la séquence ADN partielle de l'échantillon 5 avec une séquence ADN de ChHV5 du Brésil.....	85
Figure 69 : Alignement de la séquence partielle ADN de l'échantillon 5 avec une séquence ADN du ChHV5 en Floride.	85
Figure 70 : Carte représentant la qualité des eaux de baignade en mer en Martinique au cours de la période d'étude en 2020.....	91
Figure 71 : Schéma du bourg des Anses d'Arlet présentant les sources potentielles de pollution de l'eau de mer.....	92
Figure 72 : Photographies illustrant la pollution macroscopique rencontrée sur les sites étudiés	93
Figure 73 : Photographie illustrant la pression exercée par les touristes sur les tortues marines à Anse Dufour.....	94

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Détermination du score tumoral en fonction du nombre et de la taille des tumeurs.....	26
Tableau 2 : Pronostic en fonction du score tumoral.....	26
Tableau 3 : Récapitulatif des dates de sortie pour chaque plage, accompagnées de leurs caractéristiques géographiques.....	33
Tableau 4 : Amorces employées pour la PCR nichée.....	45
Tableau 5 : composition du mix de la PCR 1 avec le Kit KAPA taq PCR pour 25µL finaux	46

Tableau 6 : Composition du mix de la PCR 2 avec le kit KAPA taq PCR pour 25µL finaux.....	46
Tableau 7 : Conditions d'amplifications de la PCR 1	46
Tableau 8 : Conditions d'amplification de la PCR 2	46
Tableau 9 : Composition du gel d'agarose concentré à 1,5 %	47
Tableau 10 : Récapitulatif du traitement des photographies.....	51
Tableau 11 : Tableau regroupant les observations faites au cours des deux sorties réalisées à Bellefontaine	58
Tableau 12 : Evolutions observées concernant la FP entre 2019 et 2020.....	76
Tableau 13 : Récapitulatif des prélèvements effectués sur les tortues marines mortes dans le cadre du RETOM.....	Erreur ! Signet non défini.

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Postulats de Koch.....	113
Annexe 2 : Clé d'identification des tortues marines (d'après Réseau tortues marines Guadeloupe 2019).....	114
Annexe 3 : Autorisation de prélèvement d'échantillon de tortue marine (Arrêté préfectoral et ONCFS).....	115
Annexe 4 : Protocole d'extraction de l'ADN	116

LISTE DES ABREVIATIONS

°C : degré Celsius

µL : microlitre(s)

µm : micromètre(s)

ADN = DNA : Acide DésoxyriboNucléique = « DesoxyriboNucleic Acid »

ASAT : aspartate aminotransférase

BDD : Base de données

CMR : capture-marquage-recapture

ChHV5 : Chelonid HerpesVirus 5

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

g : gramme

GPS : Global Positioning System = système de localisation par satellite

IM : voie intramusculaire

IV : voie intraveineuse

Ig : immunoglobuline

mL : millilitre(s)

NCBI : National Center for Biotechnology Information

ng : nanogramme(s)

nm : nanomètre(s)

pb : paire de bases

FP : Fibropapillomatose

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

qPCR : PCR quantitative

SC : voie sous-cutanée

INTRODUCTION

Parmi les sept espèces de tortues marines retrouvées dans tous les océans, trois sont observables en Martinique : la Tortue verte (*Chelonia mydas*) s'alimentant sur les herbiers de phanérogames, la Tortue imbriquée (*Eretmochelys imbricata*) se nourrissant sur les récifs coralliens et qui pond sur l'ensemble des plages de la Martinique et la Tortue luth (*Dermochelys coriacea*) observée exclusivement en ponte sur les plages de la côte atlantique et méridionale (Chevalier 2005).

Depuis plusieurs années des études sont menées sur les tortues vertes en alimentation sur les herbiers de phanérogames de la côte Caraïbe en Martinique (Christianen *et al.* 2018, Bonola *et al.* 2019, Siegwalt *et al.* 2019). Ces études, portées par le CNRS-IPHC, ont mis en évidence une contamination non négligeable d'individus immatures par le virus de la fibropapillomatose (FP) (Bonola *et al.* 2019). Cette maladie, provoquée par un herpesvirus, se manifeste par le développement de tumeurs cutanées et touche principalement les tortues vertes (Williams *et al.* 1994). Les études s'intéressant à la répartition de cette maladie montrent une concentration d'individus malades dans des eaux fortement eutrophisées à échelle mondiale (Work *et al.* 2004, Ene *et al.* 2005). Il n'est donc pas exclu de faire un lien entre les activités humaines et l'expansion de cette maladie (Jones *et al.* 2016). Toutefois un manque d'informations persiste sur la prévalence et la répartition de cette maladie sur les populations de tortues marines présentes en Martinique.

Plusieurs questions sont ainsi soulevées : quelle est la répartition géographique de cette maladie sur la côte Caraïbe martiniquaise ? Quelles sont les classes de tailles des individus contaminés ? Quelle est l'évolution des symptômes ? Existe-t-il un lien entre les activités anthropiques présentes sur le littoral et les zones de contaminations ? Dans ce travail nous avons essayé de répondre à ces différentes questions grâce aux données déjà récupérées par le bureau d'études Aquasearch complétées par d'autres collectées durant cette thèse.

L'acquisition de ces connaissances est importante car il a été mis en évidence que la Martinique est une zone de croissance pour les tortues vertes peuplant l'ensemble de l'océan Atlantique (Liebart 2019). La contamination de ces tortues par la FP pourrait donc engendrer un impact global pour la survie de ces populations (Williams *et al.* 1994).

L'objectif de cette étude est de déterminer le taux de contamination par le virus de la FP de la population de tortues vertes en alimentation sur les herbiers de la côte Caraïbe en Martinique et ainsi de proposer des mesures de gestion et de préservation pour la survie de ces animaux à l'échelle de l'océan Atlantique.

PREMIERE PARTIE : ETAT DES CONNAISSANCES SUR LA FIBROPAPILLOMATOSE DES TORTUES VERTES

A. Généralités sur la fibropapillomatose

1. Agent étiologique

L'identification de l'agent causal de la FP fait l'objet de nombreux travaux et reste incomplètement élucidée. Actuellement, on considère que le principal candidat est un alphaherpesvirus 5 nommé *Chelonid alphaherpesvirus 5* ChHV5 (Alfaro-Nuñez *et al.* 2014, Chaves *et al.* 2017, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Il appartient à la famille des *Herpesviridae*, sous-famille *Alphaherpesviridae*, genre *Scutavirus* (Herbst *et al.* 2004).

Une série d'expériences de transmission a démontré trois des quatre postulats de Koch (Annexe 1), et la réplication *in vitro* du virus a été démontrée lorsque la formation de corps d'inclusions intranucléaires ChHV5-positives a été observée dans des cultures tridimensionnelles de cellules de peau de tortue verte (Page-Karjian 2019). Une association statistique toujours forte de ChHV5 avec les tumeurs FP a été confirmée par de nombreuses études ultérieures utilisant des technologies moléculaires telles que la réaction en chaîne par polymérase (PCR) et l'hybridation *in situ* (Page-Karjian 2019).

Le virus a été visualisé dans des tumeurs par microscopie électronique à transmission, et l'immunohistochimie et la PCR par transcriptase inverse ont en outre démontré que le ChHV5 est transcriptionnellement actif dans les cellules épithéliales des tumeurs FP (Page-Karjian 2019). En 2012, le premier génome complet de ChHV5 a été séquencé à partir d'une tumeur de la glotte d'une tortue verte à Hawaï (Ackermann *et al.* 2012).

La détection du virus se fait actuellement à l'aide de PCR nichées ou quantitatives sur du tissu tumoral au niveau de la peau (Lu *et al.* 2000, Lawrance *et al.* 2018). Alfaro-Nuñez *et al.* (2014) parle d'une succession de 3 PCR qui permet une détection beaucoup plus sensible du CHV5, que le protocole de PCR nichée décrit par Lu *et al.* (2000). La plupart des études de séquençage du ChHV5 reposent sur des échantillons provenant de tumeurs ou de la peau immédiatement adjacentes aux tumeurs (Ene *et al.* 2005, Patrício *et al.* 2012). La forte concentration d'ADN viral dans ces tissus simplifie le processus d'amplification, ce qui en fait des cibles attrayantes.

La mise en évidence de faux négatif reste difficile (Alfaro-Núñez *et al.* 2016). En raison des différentes cibles utilisées dans les études de séquençage et de détection du ChHV5, il y a peu d'informations concernant la variabilité génétique du ChHV5 chez les hôtes asymptomatiques, à l'exception de quelques études notables (Alfaro-Nunez *et al.* 2014, Page-Karjian *et al.* 2015). Cependant, de telles investigations sont nécessaires pour comprendre la relation entre l'infection virale et la FP, car la variabilité génétique peut expliquer pourquoi l'infection reste asymptomatique ou au contraire conduit à des développements tumoraux.

La FP est une maladie complexe pour laquelle plusieurs facteurs jouent probablement un rôle dans le développement et la progression de la tumeur, notamment l'infection à ChHV5 ainsi que les cofacteurs environnementaux, microbiens et/ou immunitaires.

Les voies de transmission pour ce virus sont encore largement inconnues. Des hypothèses de transmission mécanique par l'intermédiaire de sangsues ont été émises (Herbst *et al.* 1995).

2. Espèces cibles de la fibropapillomatose

La FP est une maladie qui a été signalée chez toutes les espèces de tortues marines: Tortue verte (*Chelonia mydas*) (Smith et Coates 1938), Tortue caouanne (*Caretta caretta*) (Harshbarger, 1991), Tortue de Kemp (*Lepidochelys kempii*) (Barragan et Sarti 1994), Tortue imbriquée (*Eretmochelys imbricata*) (D'Amato et Moraes-Neto, 2000), Tortue olivâtre (*Lepidochelys olivacea*) (Aguirre *et al.* 1999), Tortue à dos plat (*Natator depressus*) (Limpus *et al.* 1993) et Tortue luth (*Dermochelys coriacea*) (Huerta *et al.* 2002). La diagnose des différentes espèces de tortues marines est disponible en Annexe 2. La FP est surtout préoccupante pour les tortues vertes, classées espèce en danger d'extinction par l'UICN, car elle n'a atteint un statut panzootique que chez cette espèce (Williams *et al.* 1994).

Le cycle de vie général des tortues marines est complexe car elles évoluent dans différents habitats, à la fois néritique et hauturier, au cours de leur vie (Figure 1).

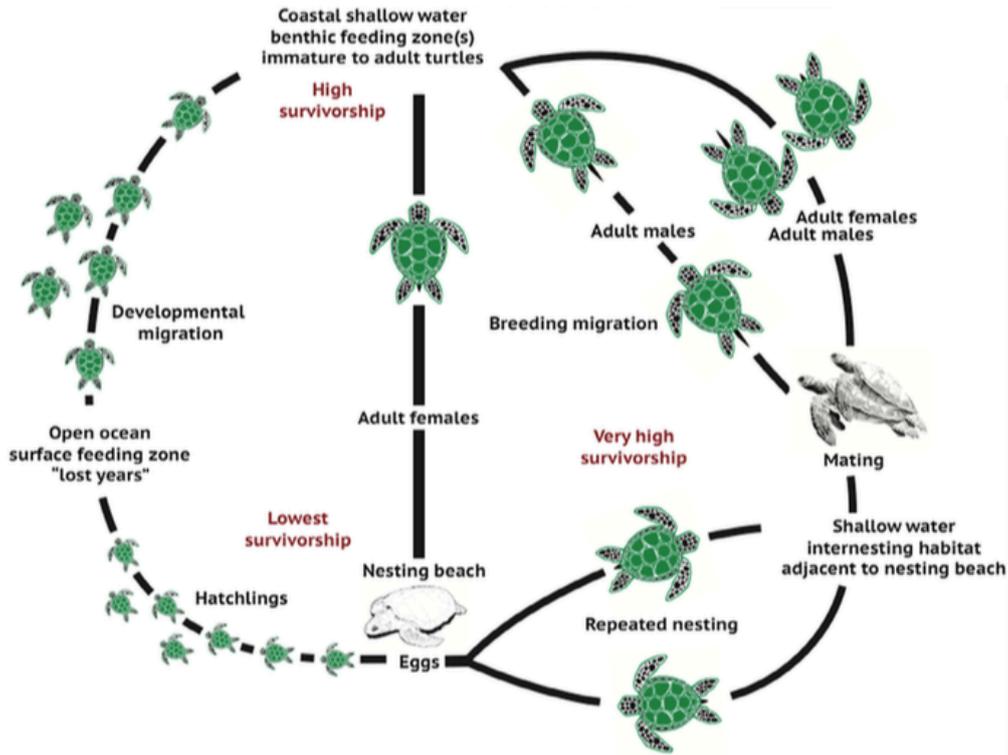


Figure 1 : Cycle de vie des tortues marines (Lanyon *et al.* 1989).

B. Épidémiologie

1. Mode de contamination et transmission

L'excrétion directe et la transmission horizontale du virus par les fluides corporels n'ont pas été démontrées (Alfaro-Nuñez *et al.* 2014) ; cependant, l'ADN de ChHV5 a été détecté dans le sang, l'urine et les écouillons cloacaux chez des tortues vertes dans les centres de réadaptation du sud-est des États-Unis (Page-Karjian *et al.* 2015). De plus, le virus a été identifié dans la salive et les sécrétions oculaires de tortues vertes avec FP au Brésil (Monezi *et al.* 2016).

Dans une étude il a été mis en évidence la possibilité de transmission par les sangsues marines de type *Ozobranchus* dans lesquelles des charges élevées d'ADN de ChHV5 ont été détectées (Greenblatt *et al.* 2005). Elles seraient alors considérées comme vecteur mécanique, mais on ne sait pas comment les sangsues acquièrent de telles charges d'autant que le constituant principal de leurs repas est le sang et qu'aucune virémie n'a jusqu'alors jamais été

mise en évidence (Lackovich *et al.* 1999, Quackenbush *et al.* 1998, Quackenbush *et al.* 2001). D'autres agents biologiques semblent être impliqués dans le portage et la propagation du ChHV5 plus particulièrement certains poissons « nettoyeurs » des carapaces : c'est le cas de *Thalassoma duperrey*, ou poisson Napoléon, chez lequel ont été détectées, en quantité importante, des séquences d'ADN du virus (Lu *et al.* 2000). Le parasitisme (externe ou interne) et la présence d'autres organismes ayant un contact étroit avec les tortues, joueraient donc un rôle non négligeable dans la transmission du virus entre les individus et/ou pourraient faciliter l'expression d'une infection latente.

La capacité des herpesvirus à être transmis entre les tortues *via* l'eau de mer contaminée existe (Curry *et al.* 2000) et dépend nettement de la faculté de l'agent à se maintenir sous forme infectieuse durant une période prolongée. Le Lung-eye-trachea disease-associated herpesvirus (LETV), seul herpesvirus des tortues marines cultivable, fut utilisé comme modèle pour l'évaluation de la persistance des alphaherpesvirus sous forme infectieuse dans de l'eau salée. Il semble que, selon la température, ces herpesvirus, et donc le virus de la FP, puissent survivre plusieurs jours sous une telle forme (Curry *et al.* 2000), rendant la transmission directe *via* une eau de mer contaminée possible et non négligeable.

Enfin, bien que la transmission interspécifique soit inhabituelle pour la plupart des alphaherpesvirus (Davison 2000), elle a été documentée pour le ChHV5 dans les régions où plusieurs espèces de tortues marines coexistent (Herbst *et al.* 2004, Ene *et al.* 2005, Patrício *et al.* 2012, Morisson *et al.* 2018).

2. Facteurs de prédisposition

a. Cofacteurs environnementaux

La FP survient généralement chez les tortues marines vivant dans les zones tropicales et subtropicales néritiques (Herbst *et al.* 1994, Adnyana *et al.* 1997, Work *et al.* 2004, Ene *et al.* 2005). De manière générale, baies et lagons fournissent des conditions physiques favorables au développement des agents infectieux. Les eaux chaudes et peu renouvelées permettent l'accumulation de contaminants naturels ou chimiques et d'agents infectieux augmentant ainsi le taux d'exposition des populations de tortues marines présentes (Herbst *et al.* 1995). L'eau étant peu profonde, la chaleur de l'eau favorise la survie des agents pathogènes (Herbst *et al.* 1995, Hirama et Ehrhart 2007).

Des études menées révèlent que la prévalence de la maladie est associée aux zones côtières, aux zones de forte densité humaine, au ruissellement agricole et/ou aux algues productrices de biotoxines (Ritchie *et al.* 2006, Jones *et al.* 2015). Ainsi les jeunes en croissance sont exposés à des facteurs de stress tels que la migration, l'adaptation à un nouvel environnement, les fortes densités de population et l'exposition à d'autres agents pathogènes. Tous ces éléments sont susceptibles de réduire l'efficacité du système immunitaire et rendre ces individus plus vulnérables aux infections (Jones *et al.* 2016).

b. Cofacteurs internes

La maladie est le plus souvent observée chez les tortues juvéniles. La FP a également été signalée chez des sub-adultes et moins fréquemment chez des adultes (Herbst *et al.* 1994, Herbst *et al.* 1995, Adnyana *et al.* 1997, Work *et al.* 2004, Ene *et al.* 2005, Patrício *et al.* 2012, Page-Karjian *et al.* 2014). Cette différence de sensibilité selon l'âge peut s'expliquer par le fait que les juvéniles affectées meurent ou au contraire développent une immunité qui les protège à l'âge adulte (Van Houtan *et al.* 2010). Aucun cas de FP n'a été signalé chez les nouveau-nés pélagiques ou les nouvelles recrues qui ont récemment élu domicile dans les habitats côtiers d'alimentation (Herbst *et al.* 1994, Jones *et al.* 2016).

Le sexe n'est pas considéré comme un facteur contributif, car aucune différence significative n'a été observée dans la prévalence entre les mâles et les femelles (Work *et al.* 2004).

3. Répartition géographique et expansion de la maladie

Aujourd'hui au cœur des questionnements scientifiques, la FP présente un problème de santé majeur pour les populations de tortues (Jones *et al.* 2016). Bien que signalée chez toutes les espèces de tortues marines, la situation de la tortue verte reste la plus préoccupante. En effet, il s'agit de la seule espèce pour laquelle l'infection a atteint le stade de panzootie (Williams *et al.* 1994). L'existence des fibropapillomes chez les tortues marines est connue depuis 1938, et à partir des années 1980, une épizootie est décrite en différents sites à travers le monde (Figure 2).

La fibropapillomatose est décrite partout à travers le monde (Aguirre 1998) : aux Caraïbes (Williams *et al.* 1994), au Brésil (Mascarenhas et Iversion 2008), sur la côte

Atlantique du Costa Rica, en Californie, sur la côte pacifique du Mexique, en Australie, en Inde, aux Philippines (Masangkay et nalo-Ochona 2002). Les principaux foyers d'épizootie décrits, et les plus étudiés, sont Hawaï (Work *et al.* 2004) et la Floride (Ene *et al.* 2005). L'observation de la maladie dans l'Atlantique Est, le long des côtes occidentales de l'Afrique, est plus récente (Formia *et al.* 2007). Dans les Antilles Françaises, aucune étude ne décrit avec précision l'état de la contamination des tortues marines par la FP.

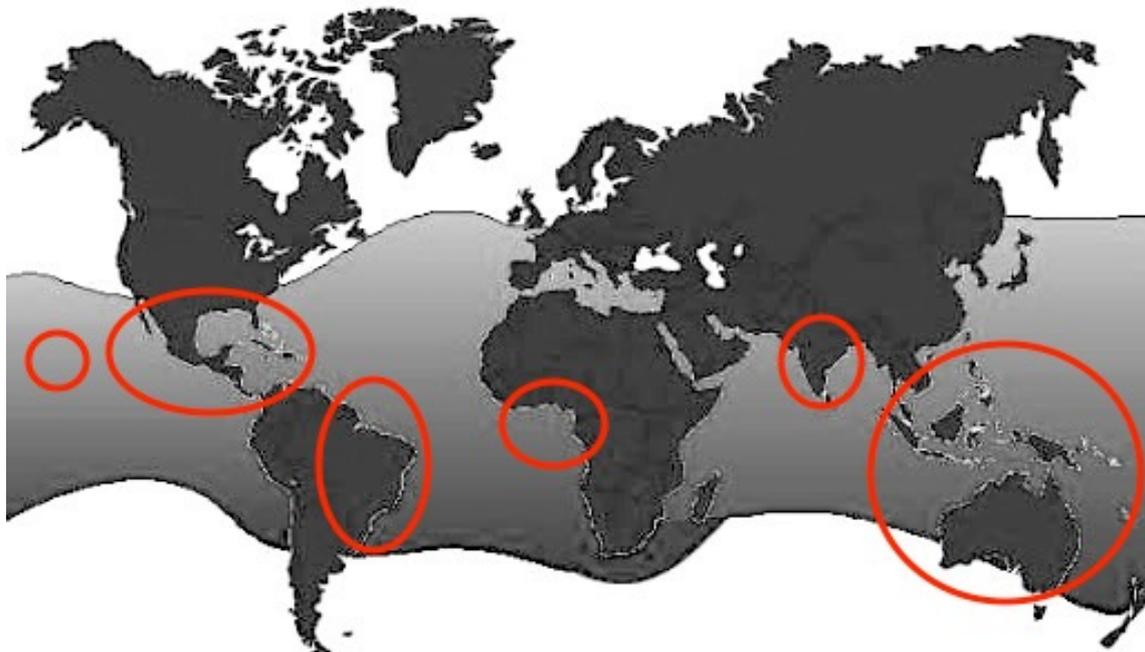


Figure 2 : Répartition géographique des cas rapportés de fibropapillomatose dans le monde.

Les cercles rouges représentent les zones géographiques où ont été observées des tortues marines atteintes de FP. La zone grisée représente l'air de vie des tortues marines. Source fond de carte : Google Image

Chaves *et al.* (2017), qui étudient la phylogénétique du virus de la FP, montrent l'existence de différents sous-groupes de ChHV5 chez les tortues marines selon la zone géographique et l'espèce (Figure 3). D'autres études ont également montré qu'il existe des modèles phylogéographiques de ChHV5 reflétant généralement les mouvements de l'hôte (Herbst *et al.* 2004, Ene *et al.* 2005, Patrício *et al.* 2012, Ariel *et al.* 2017), suggérant que le ChHV5 a subi une co-évolution spécifique à la région avec les tortues marines hôtes (Jones *et al.* 2016).



Figure 3 : Analyse phylogénétique de Chelonid Alphaherpesvirus 5 (Chaves *et al.* 2017).

Les abréviations utilisées incluent la tortue olivâtre (OR), la tortue verte (G), la tortue caouanne et la tortue verte (LOG / G), le Brésil (BRA), le Costa Rica (CRC), le Mexique (MEX), le Nicaragua (NIC), les États-Unis d'Amérique (USA).

Une étude récente basée sur la séquence moléculaire des souches a fourni une phylogéographie globale du ChHV5 qui a révélé quatre clades distincts : Pacifique oriental, Atlantique occidentale / Caraïbes orientales, Pacifique sud-ouest et Atlantique (Patricio *et al.* 2012). À un niveau plus régional, il existe au moins quatre variants connus de ChHV5 en Floride et chaque variant peut différer en prévalence selon le site. Ces variants, appelées A, B, C et D, ont été observés chez des espèces de tortues marines sympatriques, indiquant une forte influence géographique sur la prévalence du ChHV5 (Ene *et al.* 2005). Un variant hawaïen qui diffère des quatre identifiés en Floride a également été identifié (Herbst *et al.* 2004). Des souches de ChHV5 identifiées chez une tortue verte et une tortue caouanne de la baie de Moreton près de Brisbane, en Australie, appartiennent toutes les deux au clade du Pacifique du Midwest dans lequel on retrouve les souches hawaïennes (Quackenbush *et al.* 1998).

C. La fibropapillomatose : aspects cliniques et lésionnels

1. Lésions

L'expression de la FP est majoritairement cutanée et oculaire et se fait sous forme de masses tumorales bénignes prolifératives en forme de « chou-fleur », simples ou multiples (Figures 4 et 5). Le diagnostic repose avant tout sur l'observation macroscopique de ces

lésions. La taille des lésions peut varier de 0,1 cm à 30 cm de diamètre et elles touchent préférentiellement les tissus mous, notamment les yeux, le cou, les nageoires, les régions axillaire, inguinale et cloacale (Jacobson *et al.* 1991).



Figure 4 : Nageoire antérieure droite d'une tortue verte (*Chelonia mydas*) atteinte de FP d'après Formia *et al.* 2007.

Présence de lésions de FP d'aspect exubérant sous forme de chou-fleur (flèches noires) et de sangsues (flèche blanche), de couleur blanchâtre, noirâtre et rosâtre.



Figure 5 : Tête d'une tortue présentant des masses tumorales bilatérales autour des yeux (forme oculaire de la fibropapillomatose) d'après Banks 2006.

Les tumeurs oculaires sont particulièrement dangereuses car elles peuvent causer la cécité empêchant ainsi les tortues de s'alimenter correctement et entraînant donc leur mort.

D'autres localisations sont moins fréquentes comme le plastron (Figure 6) et la dossière, ainsi que les zones de suture. L'atteinte peut également être généralisée (Figure 7).



Figure 6 : Plastrons et nageoires postérieures sévèrement affectées par la FP (Jones *et al.* 2016).



Figure 7 : Exemple de fibropapillomatose généralisée d'après Flint *et al.* 2009.

Masses verruqueuses, multiples et disséminées sur tout le corps.

Les fibropapillomes internes, moins fréquents, sont souvent les plus dévastateurs puisqu'ils se localisent sur les organes vitaux comme les poumons (Figure 8), les reins, le

tube digestif ou le cœur. Les techniques de radiographique ou endoscopiques permettent de les visualiser (Figure 9).

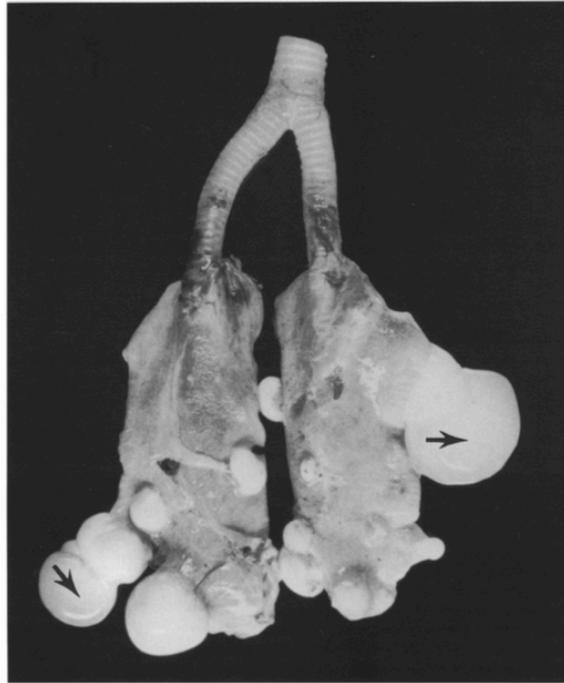


Figure 8 : Poumons d'une tortue verte juvénile (*Chelonia mydas*) atteints de fibropapillomatose, d'après Herbst *et al.* 1994.

Multiples nodules de 0,2 à 5cm visibles sur les deux poumons, bien délimités, de consistance ferme et de couleur blanchâtre ou gélatineux et transparents.



Figure 9 : Image radiographique de fibropapillomatose viscérale d'après Banks 2006.

La figure 10 rappelle la structure d'une peau saine de tortue marine. L'aspect histologique d'une tumeur de FP est caractérisé par une masse issue de la prolifération de cellules épidermiques et dermiques, avec quelquefois la formation de projections papillomateuses (Figure 11). Les cellules épithéliales de l'épiderme présentent une hyperkératose et une acanthose associées à une dégénérescence ballonisante. Des zones de vacuolisation cytoplasmique associées ou non à des inclusions éosinophiliques intranucléaires sont observables dans la couche granulaire et la couche basale (Figure 12). Il peut y avoir également des zones de nécrose focale dans la couche basale avec formation de fissures entre l'épiderme et le derme. Dans certains cas, il y a formation de globes cornés par accumulation de kératine (Brito *et al.* 2004). D'autres lésions secondaires telles que des hémorragies, la présence de fibrine et des suppurations sont parfois associées à la présence des tumeurs ; elles traduisent des complications.

L'examen histochimique révèle des quantités variables de fibres de collagène et de substance d'aspect myxoïdes dans le stroma. Les lésions débutantes ont plus de fibroblastes tandis que les lésions plus anciennes ont plus de collagène.

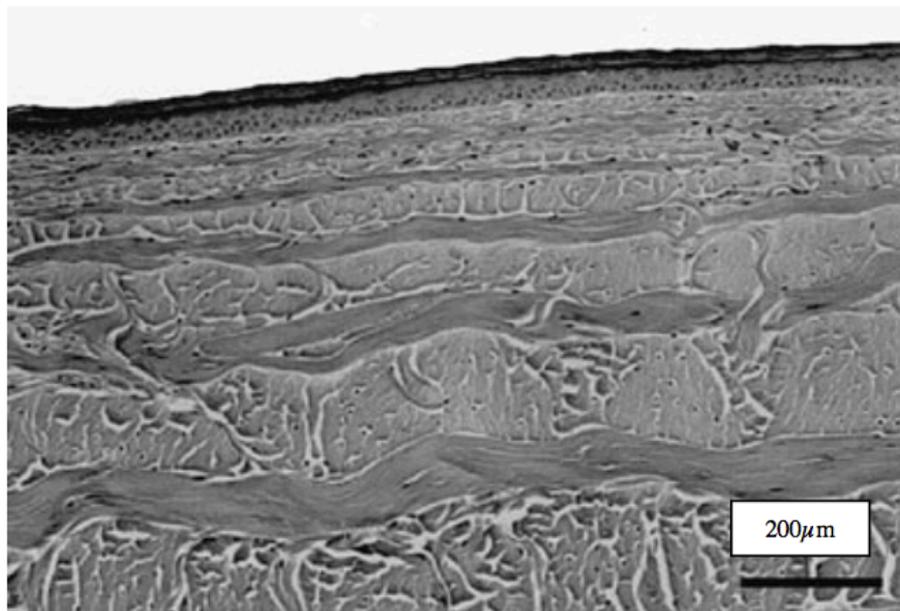


Figure 10 : Coupe histologique de peau saine d'une tortue verte d'après Herbst LH *et al.* 1994.

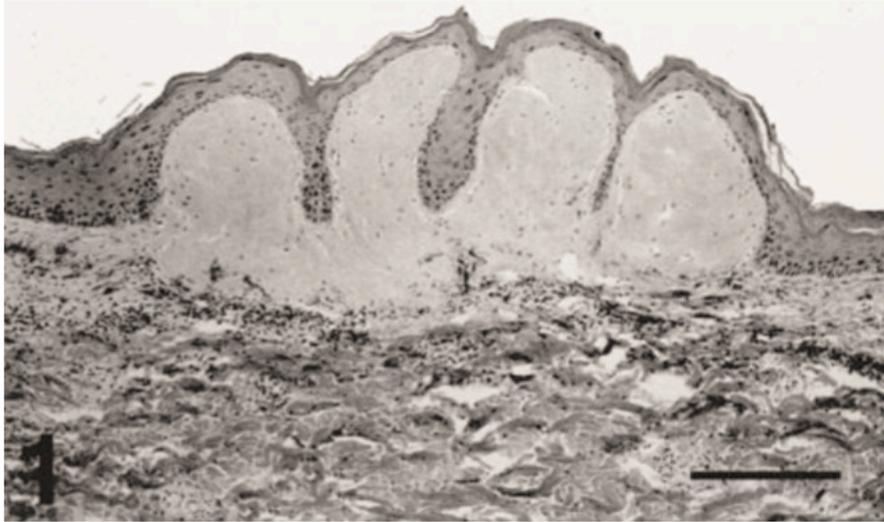


Figure 11 : Aspect histologique d'une lésion de fibropapillomatose de tortue marine d'après Herbst LH *et al.* 1994.

Proliférations épithéliales épidermiques soutenues par un stroma conjonctif et formant des projections papillaires.

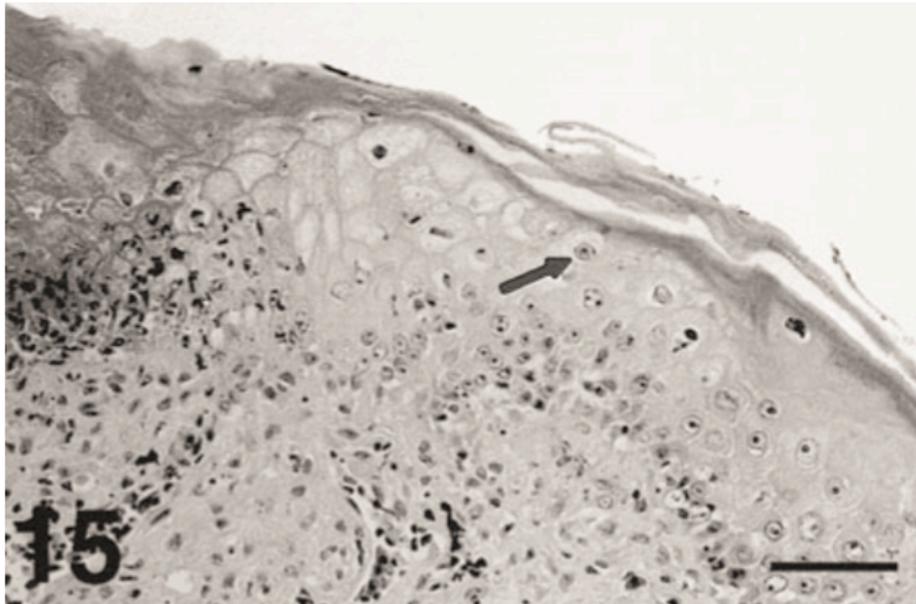


Figure 12 : Aspect histologique de lésions de fibropapillomatose de tortue marine d'après Herbst *et al.* 1994.

Présence de cellules ballonnantes et d'inclusions éosinophiliques intranucléaires.

2. Caractéristiques biochimiques et hématologiques

D'après l'étude de Lutz *et al.* 2001, les tortues affectées par la FP ont leurs paramètres hématologiques, biochimiques, immunologiques et sérologiques modifiés. Ils peuvent aider à orienter le diagnostic mais ne peuvent en aucun cas être utilisés seuls (Aguirre *et al.* 2000).

Dans le cas d'une tortue atteinte par la FP, on peut observer des paramètres sanguins

témoignant de la chronicité et de la sévérité de la maladie (Adnyana *et al.* 1997, Aguirre *et al.* 1995, Work et Balazs 1999, Aguirre *et al.* 2000, Lutz *et al.* 2001, Work *et al.* 2001, Foley *et al.* 2005) :

- Immunosuppression associée à un stress chronique : hétérophilie, lymphopénie et éosinopénie
- Hyperazotémie
- Anémie non régénérative modérée
- Désordres électrolytiques : hypocalcémie, et hyposidérémie
- Valeurs diminuées de glucose, des activités PAL et ASAT
- Valeurs basses en cholestérol et triglycérides
- Diminution des valeurs des protéines totales, d'alpha globulines (1 et 2), de gamma globulines

Ces valeurs orientent vers un état possible d'immunosuppression qui est conforté par les résultats des tests lymphoprolifératifs. En effet, les lymphocytes des tortues malades présentent un indice de stimulation plus faible que celui des tortues saines. Ainsi, l'immunosuppression semble donc être un pré-requis pour la manifestation de la FP (Aguirre *et al.* 2000, Flint *et al.* 2010). Le profil hémato-biochimique semble être le reflet de la sévérité et de la chronicité de la maladie. Des études tentent d'établir des valeurs hématologiques et biochimiques de références pour chaque espèce de tortues marines, permettant ainsi d'évaluer le statut sanitaire ou de donner un pronostic (Flint *et al.* 2010, Flint *et al.* 2019, Pagano *et al.* 2019, De Mello *et al.* 2020)

Il existe un test ELISA développé par Herbst *et al.* (2008) utilisant la glycoprotéine H (gH) du virus de la fibropapillomatose pour détecter les anticorps spécifiques 7s chez la tortue. La séropositivité a été détectée sur des prélèvements de tortues présentant des manifestations de tumeurs, et certains animaux infectés, sans tumeurs manifestes, étaient séropositifs. Ces tests restent néanmoins peu utilisés en dehors des laboratoires spécialisés et des universités.

3. Diagnostic différentiel

Sur le terrain, le diagnostic de la fibropapillomatose se base sur les données épidémiologiques et anatomo-cliniques. Ce diagnostic semble aisé, surtout pour des personnes

ayant une certaine expérience de la faune marine. Cependant, la fibropapillomatose peut être confondue avec d'autres affections d'origine infectieuse ou parasitaire, telles que :

- Des lésions cutanées suppurées sous forme d'abcès : le processus inflammatoire suppuré est prédominant. La prolifération épithéliale et la kératinisation exubérantes caractéristique de la fibropapillomatose ne sont pas observées. L'analyse bactériologique du matériel suppuré permet de révéler la présence des bactéries responsables.

- Les stomatites ulcéreuses : ici le processus nécrotique et inflammatoire prédomine avec la formation d'ulcères et de granulomes de localisation buccale ou péri-buccale.

- Les mycobactérioses sont caractérisées par la présence de lésions cutanées et/ou viscérales granulomateuses prolifératives. L'analyse bactériologique et l'examen histologique permettent d'identifier l'affection.

- Des affections parasitaires ou mycosiques d'aspect granulomateux et pseudo-tumorales : les analyses parasitologiques et histologiques permettent de mettre en évidence les agents étiologiques (parasites, champignons).

4. Évolutions possibles : régression, stabilisation, aggravation

La fibropapillomatose est une cause de mortalité importante chez les tortues marines, mais une stabilisation, voire une régression plus ou moins importante des lésions est possible (Balazs *et al.* 2000, Bennett *et al.* 2000, Work *et al.* 2004). Pour autant, l'aggravation reste l'évolution la plus fréquente (Flint *et al.* 2009). Il semble que seule les tortues adultes puissent présenter une guérison. En général, le nombre et la taille des lésions augmentent, portant atteinte à la locomotion, l'alimentation ou la respiration des individus atteints et entraînent ainsi leur mort.

Certains auteurs ont développé un système de notation des tumeurs en fonction de leur taille et de leur localisation. Le système de Balazs *et al.* (1999) comprend la classification suivante : 0 = absence de tumeur externe, 1 = rares tumeurs, 2 = quelques tumeurs, 3 = beaucoup de tumeurs (Tableau 1)

Cette méthode est aujourd'hui considérée comme un indicateur fiable de l'évolution de la maladie (Tableau 2). Dans l'étude de Balazs, toutes les lésions ayant rétrogradé jusqu'à devenir invisible à l'œil nu étaient de taille inférieure à 5cm de diamètre.

Tableau 1 : Détermination du score tumoral en fonction du nombre et de la taille des tumeurs

	Score tumoral			
	0	1	2	3
Taille des tumeurs				
A : <1cm	0	1-5	>5	>5
B : 1-4cm	0	1-5	>5	>5
C : >4-10cm	0	0	1-3	>4
D : >10cm	0	0	0	>1

Tableau 2 : Pronostic en fonction du score tumoral

Grade 0	-
Grade 1	Forte chance de régression
Grade 2	Quelques chances d'amélioration
Grade 3	Très peu de chance d'amélioration ni de stabilisation, immunodépression, développement secondaire d'infections bactériennes systémiques.

Lorsqu'elle régresse, une lésion cutanée ou interne de FP ne laisse pas de traces visibles. Au contraire, une tortue gardera toujours des séquelles d'une lésion oculaire de FP, même guérie. De ce fait, si l'examen oculaire est tout à fait normal, on peut supposer que la tortue n'a jamais eu la maladie puisque la lésion oculaire fait invariablement partie du tableau clinique d'une tortue fibropapillomateuse (Bennett *et al.* 2001)

Il existe ainsi plusieurs cas interprétables :

- **Aucune tumeur visible au niveau cutané et oculaire, examen des yeux normal :** la tortue n'a probablement jamais eu la maladie
- **Présence de tumeurs corporelle, aucune masse oculaire, examen des yeux présentant des cicatrices de lésions :** il y a de fortes chances qu'il s'agisse d'une fibropapillomatose en régression, avec très probablement des séquelles au niveau de l'œil (Figure 13).
- **Présence de tumeur(s) oculaire(s) :** une lésion de couleur blanchâtre/rosâtre, verruqueuse signifie que l'animal est en phase d'aggravation, tandis qu'une lésion de couleur noire/grise et lisse est plutôt en voie de régression (Figure 14 et 15).



Figure 13 : Œil présentant des séquelles de FP d'après Bennett et al. 2001.
Décoloration blanchâtre et aspect lissé de la conjonctive postérieure cicatrisée.



Figure 14 : Lésion conjonctivale de FP en voie d'aggravation d'après Bennett et al. 2001.

Lésion de couleur rosâtre/blanchâtre en forme de « chou-fleur ».



Figure 15 : Lésion conjonctivale de FP en voie de régression d'après Bennett et al. 2001.

Lésion de couleur grisâtre/noirâtre d'aspect lisse.

5. Thérapeutique

L'exérèse précoce des masses cutanées complétée par des traitements de soutien semble être une bonne alternative thérapeutique (Lackovich *et al.* 1999). Dans le cas de lésion de petite taille et avec une marge d'exérèse large, le risque de récurrence dans les deux mois est nul et la guérison est quasiment complète. Ainsi, une chirurgie précoce dès l'apparition des premières lésions cutanées sera bénéfique, voire localement curative si l'animal est suivi régulièrement. Pour les lésions oculaires, la méthode est la même sauf dans le cas où la cornée est atteinte : l'infiltration est souvent profonde et l'acte chirurgical est délicat tout en ne garantissant pas un effet curatif total.

La découverte des lésions internes étant la plupart du temps fortuite lors de l'autopsie et les méthodes de diagnostic étant limitées à l'endoscopie ou l'imagerie, aucun traitement ne semble possible avant l'apparition d'une défaillance organique.

De récentes études (Parra Sellera *et al.* 2019, Donnelly *et al.* 2019) ont démontré que le traitement au laser à diode est prometteur comme option de traitement pour la FP cutanée chez les tortues vertes. Cette technique s'utilise en complément de la chirurgie ou même en traitement de substitution évitant ainsi une anesthésie générale (Figure 16 et 17). Le taux de récurrence est significativement plus faible après un an qu'avec une chirurgie simple, et on note l'absence d'infections secondaires et d'effets indésirables avec une récupération rapide en

post-traitement. Cette technique ne peut pas être utilisée sur les tumeurs oculaires car elle pourrait causer des dommages oculaires possibles par des effets photothermiques.

En outre, ces études montrent que la FP partage des similitudes en ce qui concerne des facteurs génomiques et des vulnérabilités thérapeutiques avec les cancers humains. Ceci signifierait que la FP pourrait être traitée avec des thérapies anticancéreuses humaines (Duffy *et al.* 2018).

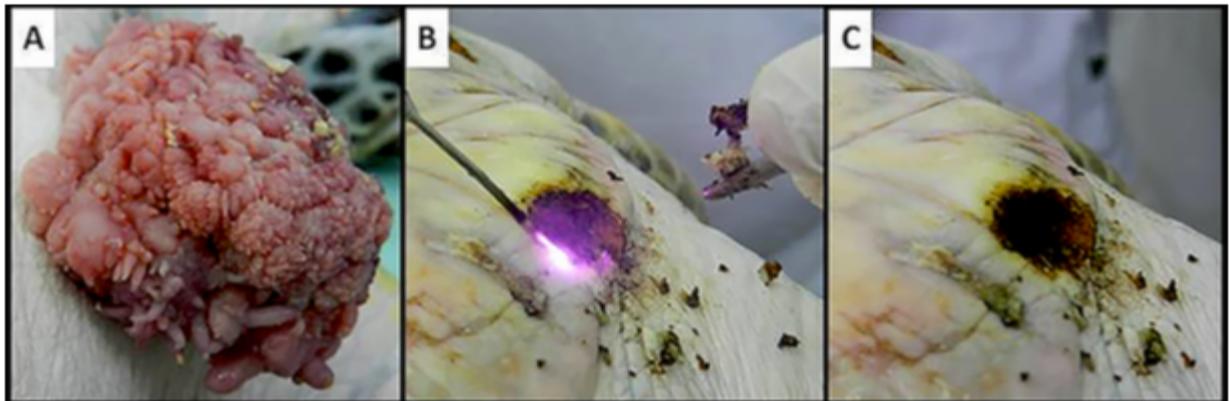


Figure 16 : Images chirurgie à l'aide d'un laser à diode.

Tumeur non pigmentée classée C selon Work *et al.* 2004 avant la chirurgie (A) ; Chirurgie au laser à diode (B) ; Tissu adjacent carbonisé après résection tumorale (C). D'après Sellera *et al.* 2019.

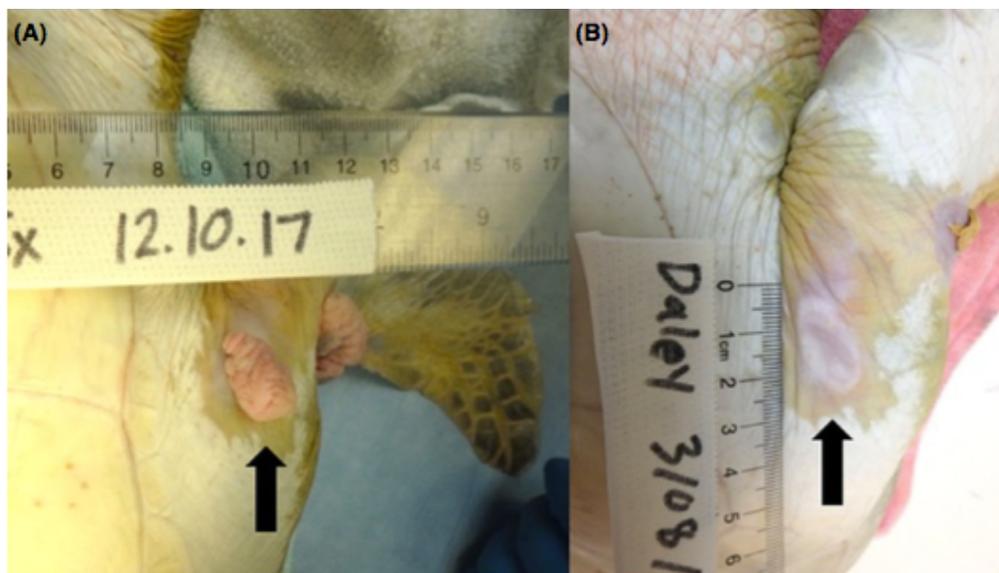


Figure 17 : Illustration de l'efficacité du laser à diode.

Le fibropapillome ciblé dans l'aisselle droite de la tortue verte (A) à la date du premier traitement, lorsque la tumeur mesurait $1,7 \times 1,2 \times 0,6$ cm, avec un volume de $1,28$ cm³, et (B) 3 mois plus tard, quand seulement du tissu cicatriciel était visible. D'après Donnelly *et al.* 2019

DEUXIEME PARTIE : MATÉRIEL ET MÉTHODE

A. Les eaux côtières de la Martinique : caractéristiques du secteur étudié

1. Le choix de la Martinique

Ile de l'archipel des Petites Antilles, la Martinique est riche d'un écosystème marin dense et varié qu'il faut préserver. L'île est bordée à l'Est par l'océan Atlantique et à l'Ouest par la mer des Caraïbes. Le Nord de l'île est volcanique et humide tandis que le sud est moins accidenté et ensoleillé. Le climat est tropical humide divisé en deux saisons : la saison sèche de décembre à mai et la saison des pluies de juin à novembre (Sermage 2006).

Cinq des sept espèces de tortues marines fréquentent les eaux de la Martinique : la Tortue verte (*Chelonia mydas*), la Tortue imbriquée (*Eretmochelys imbricata*), la Tortue luth (*Dermochelys coriacea*), la Tortue caouanne (*Caretta caretta*) et la Tortue olivâtre (*Lepidochelys olivacea*) (Chevalier 2005). La Martinique est un site d'importance primordiale pour ces espèces car elle constitue une aire d'alimentation, ainsi qu'un lieu de ponte. La Tortue imbriquée et la Tortue verte s'alimentent sur les côtes de la Martinique tandis que la Tortue luth ne s'alimente pas sur les côtes, étant une espèce pélagique. Les tortues caouannes et olivâtres se rencontrent au large. La population de tortues vertes est majoritairement jeune, entre 15 et 20 ans d'âge (Chambault *et al.* 2018). Une étude récente a confirmé que ces dernières seraient issues de nids provenant de plusieurs plages des Caraïbes et de l'Atlantique, majoritairement du Suriname, de la Guyane française et des plages du Sud du Brésil. Des analyses génétiques ont démontré le lien de parenté entre les femelles pondeuses sur ces sites et les juvéniles de Martinique (Chambault *et al.* 2018). La Martinique est un site d'alimentation transitoire utilisé par les jeunes tortues pour atteindre leur maturité sexuelle (Liebart 2019).

La Martinique est caractérisée par une forte activité touristique tournée vers le milieu marin. La présence de ces espèces emblématiques n'a pas laissé les touristes indifférents et une augmentation du nombre de nageurs autour des tortues a été constatée ces dernières années, ainsi que le développement de prestations commerciales proposant l'observation de ces animaux sur leur site d'alimentation (*Turtle-watching*). Il en résulte ainsi une pression anthropique en très forte augmentation (Safi *et al.* 2018).

Depuis quelques années, diverses études mettent en évidence la présence de facteurs polluants nocifs pour la faune et la flore marine en Martinique (Saffache 2001). Quelques zones sont concernées par différents polluants d'origine agricole, particulièrement des produits phytosanitaires d'utilisation non ou peu raisonnée (Saffache 2007). La pollution industrielle demeure présente également avec les déchets rejetés par les distilleries ou d'autres secteurs d'activité (Saffache 2007). La pollution urbaine reste un des facteurs polluants majeurs avec l'urbanisation croissante de la ville et s'explique par un réseau de collecte des eaux usées insuffisant notamment au niveau de la Baie de Fort de France. Les déchets de ces différents secteurs sont déversés dans la mer, dégradant ainsi la qualité des eaux (Saffache 2001, 2007). En 2019, le bilan de la qualité des eaux de baignade en Martinique indique que 98% (au lieu de 100% en 2018) des zones de baignade en Martinique sont conformes aux exigences européennes de qualité (Martinique ARS santé 2019).

Aucune étude scientifique n'a pour l'instant recensé la prévalence de la FP chez les tortues marines présente dans cette zone, bien qu'elle ait été observée à plusieurs reprises chez la Tortue verte en Martinique et dans la mer des Caraïbes (Liebart 2019). Ainsi, l'objectif de notre étude est d'estimer la prévalence de FP dans les eaux côtières de la Martinique, de mettre en évidence des facteurs prédisposant au développement de la maladie et d'essayer de comprendre l'origine des virus détectés.

2. Choix des sites d'étude et période d'échantillonnage

La zone d'étude est définie le long de la côte Ouest de la Martinique. En effet, compte tenu des conditions météorologiques et environnementales, la récolte de données sur le littoral Atlantique s'est avérée trop complexe. La présence de sargasses en quantités importantes (DEAL Martinique 2018, Larade & Pinel-Féréol 2019), les côtes plus escarpées, les courants forts, l'exposition des plages aux vents et à la houle nécessiteraient un équipement et une organisation hors de portée. En revanche, les sorties sur la côte Ouest sont réalisées dans des conditions favorables de mer calme et d'eaux claires. La récolte des données s'effectue de mars à fin juillet 2020.

La prévalence de la FP est établie par photo-identification des populations de tortues marines rencontrées sur les sites sélectionnés (Polovina 2004, Guimarães *et al.* 2013, Carpentier *et al.* 2016, Liebart 2016). Cette méthode permet d'identifier l'individu photographié et d'observer les éventuelles lésions caractéristiques de FP externe (Banks 2006,

Formia *et al.* 2007, Jones *et al.* 2016). Ces données viennent s'ajouter aux premières observations réalisées de janvier à août 2019 (Liebart 2019), et devraient permettre la mise en évidence d'éventuelle régression ou progression de FP. Une analyse moléculaire du matériel viral issu de biopsies cutanées prélevées sur quelques tumeurs vient compléter l'étude.

a. Sites de suivi photographique

Des études sur les fonds marins côtiers de la Martinique, les sites d'alimentation, et sur les premières observations de la FP chez les tortues vertes ont permis de sélectionner plusieurs sites de suivi photographique (Figure 18 ; Legrand 2009, Liebart 2019). Les plages étudiées sont choisies pour la présence avérée de tortues marines.

Chaque site se caractérise par une anse de taille variable. Les données sont ainsi récoltées respectivement du Nord au Sud sur : Anse Latouche et Anse Turin, plage du Coin au Carbet, plage de Bellefontaine, Anse Collat et Anse Madame, Anse Noire et Anse Dufour, Grande Anse, Plage du Bourg des Anses d'Arlet. Les caractéristiques de chaque anse sont définies ci-dessous (Tableau 3). Pour chaque plage, il est effectué au minimum quatre sorties, espacées par des intervalles de temps variables allant de quelques jours à quelques mois. Les journées d'échantillonnage sont adaptées en fonction des conditions météorologiques parfois défavorables (ravinement, vent violent, fortes précipitations). Les tortues vertes présentant un pic d'alimentation en début et milieu de matinée, ainsi qu'en début d'après-midi (Bjorndal 1980), les sorties sur chaque site sont effectuées le matin et l'après-midi. Chaque prospection a duré entre trois et quatre heures, en tenant compte de la baisse de luminosité en fin de journée à 17h.

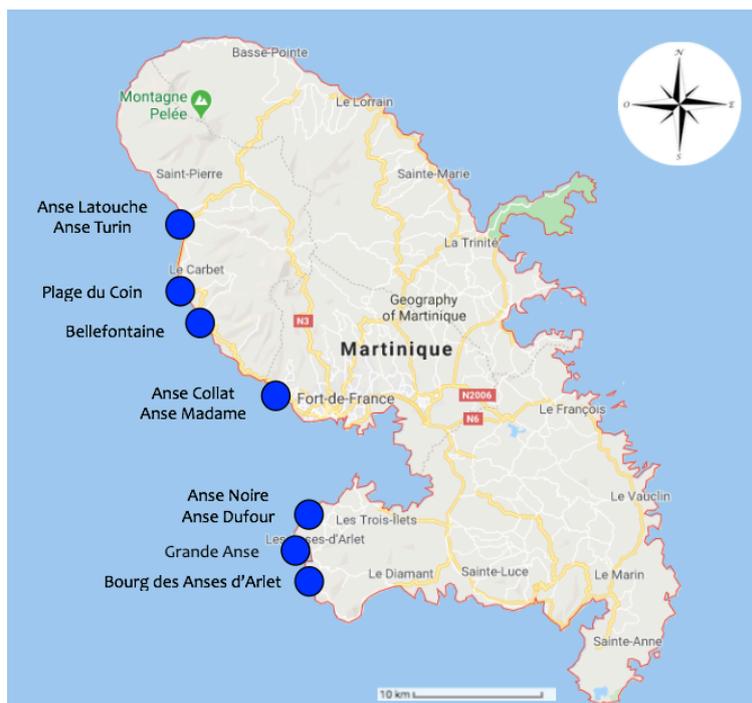


Figure 18 : Carte représentant les sites prospectés entre janvier et fin juillet 2020, sélectionnés d'après Liebart 2019

Les sessions d'observation et de prises de photographies se déroulent du mois de mars au mois de juillet 2020. Les dates de chaque sortie sont résumées ci-dessous (Tableau 3).

Tableau 3 : Récapitulatif des dates de sortie pour chaque plage, accompagnées de leurs caractéristiques géographiques

Anse	Sortie 1	Sortie 2	Sortie 3	Sortie 4	Longueur (m)	Largeur (m)	Superficie (m ²)
Anse Latouche	05/02/2020	05/03/2020	26/05/2020	10/07/2020	212	246	51 452
Entre Anse Turin et Anse Latouche	05/02/2020	05/03/2020	26/05/2020	10/07/2020	186	94	19 072
Anse Turin	05/02/2020	05/03/2020	26/05/2020	10/07/2020	851	271	244 844
Plage du Coin	03/02/2020	03/03/2020	01/06/2020	25/06/2020	1 147	87	102 270
Bellefontaine	16/06/2020	30/06/2020	-	-	252	110	26 321
Anse Collat	31/01/2020	07/02/2020	06/03/2020	16/06/2020	175	140	98 124
Entre Anse Collat et Anse Madame	31/01/2020	07/02/2020	06/03/2020	16/06/2020	170	100	17 037
Anse Madame	31/01/2020	07/02/2020	06/03/2020	16/06/2020	530	198	31 263
Anse Noire	19/05/2020	24/05/2020	01/07/2020	13/07/2020	168	239	38 520
Anse Dufour	19/05/2020	24/05/2020	01/07/2020	13/07/2020	229	220	50 040
Grande Anse	29/01/2020	10/02/2020	09/03/2020	23/04/2020	1 117	770	749 412
Bourg des Anses d'Arlet	27/01/2020	17/02/2020	20/02/2020	13/03/2020	723	363	240 381

b. Sites de prélèvement pour PCR

L'évaluation de la contamination des tortues vertes par la FP avec la méthode de photo-identification est complétée par une analyse PCR d'échantillons prélevés sur des tumeurs et tissus sains (Ariel *et al.* 2017). L'objectif initial est d'effectuer des prélèvements sur des animaux vivants au cours d'une campagne de capture sur des sites le long de la côte Caraïbe. Cependant, pour des raisons administratives et logistiques le projet est repoussé dans le temps.

Pour compléter les données de la présente étude et s'affranchir des contraintes précédemment évoquées, les prélèvements de tissus sont effectués sur des tortues vertes retrouvées mortes dans le cadre du Réseau tortue Marine échouage (RETOM). La localisation géographique des tortues prélevées est dépendante des appels pour intervention.

B. Méthode de prélèvement et de détection de la fibropapillomatose chez les tortues vertes

1. La photo-identification

a. Principe et intérêt de la photo-identification dans la mise en évidence de la FP

Initialement, les méthodes de suivi de populations s'effectuaient par marquage physique après la capture des animaux (Polovina 2004). Diverses techniques telles que la pose de bagues, de balises GPS, l'utilisation de peinture sur la carapace sont utilisées mais provoquent un stress non négligeable aux individus, induisent la possibilité d'infections ou de séquelles physiques, et nécessitent de mettre en place une logistique matérielle et humaine conséquente. Le matériel placé sur la tortue peut également se perdre ou le marquage s'effacer avec le temps.

De nouvelles techniques plus adaptées au respect des animaux ont vu le jour, avec une meilleure fiabilité dans le temps. La photo-identification est une méthode de Capture-Marquage-Recapture « virtuelle » peu invasive utilisant la photographie pour identifier les individus grâce à des marques (écailles, taches colorées, etc.) présentes physiologiquement sur un endroit du corps. Son efficacité a été prouvée chez plusieurs espèces, notamment de cétacés (Würsig & Jefferson 1990, Urian *et al.* 2014), de pinnipèdes (Bertulli *et al.* 2015) ou

encore de tortues marines (Schofield *et al.* 2008, Jean *et al.* 2010). Chez ces dernières, les écailles situées sur chacun de leur profil de tête définissent des motifs uniques, propres à chaque individu et stables dans le temps. Il est donc possible de différencier chaque tortue au sein d'une population grâce au pattern d'écailles qui lui est propre (Carpentier *et al.* 2016). Concernant la mise en évidence de la FP, cette méthode permettrait également de visualiser et d'effectuer le suivi au long terme des tumeurs externes visibles en comparant le stade de FP d'une même tortue d'une année sur l'autre (Guimarães *et al.* 2013).

b. Déroulement des prospections

Chaque prospection s'effectue par deux ou trois plongeurs afin d'assurer un cadre de sécurité suffisant pour les apnées pratiquées à répétition. Une bouée de signalisation préserve les plongeurs d'éventuels chocs avec les bateaux de passage. L'équipement est composé de palmes, masques et tubas, et les photographies sont réalisées avec un appareil Sony® Rx 100 IV placé dans un caisson étanche Ikelite®. Des photographies de 21 Mégaoctets permettent de garder une distance de quelques mètres avec la tortue et ne pas la déranger. Un GPS Garmin® eTrex10 est utilisé pour suivre la trajectoire des transects et localiser les tortues photographiées.

Chaque site est prospecté en effectuant des transects, en alternant sens Nord-Sud et Sud-Nord pour éviter tout biais expérimental. Les visites sont alternées entre le matin et l'après-midi. Le tracé est défini comme présenté sur la Figure 19. Des études montrent que les individus sub-adultes et adultes s'alimentent dans des zones situées autour de 5 mètres de profondeur (Reisser 2013, Siegwalt *et al.* 2019) ; les transects sont donc réalisés dans des eaux allant de 2 à 10 mètres de profondeur pour maximiser les chances de rencontre.



Figure 19 : Exemple de transect effectué lors d'une sortie au bourg des Anses d'Arlet dans le sens Nord-Sud

Pour certaines anses proches géographiquement, il est choisi d'effectuer les transects en une seule et même sortie. Le passage d'une anse à l'autre peut s'effectuer par la mer en peu de temps, les plongeurs longeant la côte dans l'eau pour maximiser les chances de rencontre avec les individus. Cette méthode est appliquée pour : Anse Dufour et Anse Noire, Anse Collat et Anse Madame, et Anse Latouche et Anse Turin (Figure 20).



Figure 20 : Exemple de transect effectué pour deux Anses proches géographiquement

La prospection consiste à palmer avec des gestes lents pour limiter le bruit en surface. Lors d'une rencontre avec un individu, la prise de photographies est d'abord effectuée à distance sans plonger et en restant à l'arrière de l'animal. Deux plongées, une à droite, l'autre à gauche sont réalisées pour prendre chaque côté de la tortue, l'approche s'effectuant toujours par l'arrière. L'objectif est d'avoir un profil gauche et droit de la tête de la tortue car les deux profils étant différents, cela augmente les chances de reconnaissance de l'individu. Une distance d'un à deux mètre(s) est toujours respectée pour limiter le stress de l'animal. La comparaison des photographies lors du traitement des données permet ainsi d'identifier chaque individu et de déterminer leur taux de recapture.

Des informations supplémentaires sont notées lors de chaque sortie : heure de début, heure de fin, pour chaque tortue l'heure de rencontre, la taille approximative de la carapace, la profondeur de l'animal, la présence de lésions de FP et leur grade, et autres informations comme d'éventuels dépôts de résine ou coquillages, des impacts sur la carapace, la présence de rémoras, la sociabilité etc.

c. Traitement des photographies

Les séries de photographie sont traitées après chaque sortie de la manière suivante : les photos sont triées par individus, retouchées et recadrées au niveau des profils droit et gauche, renommées de manière à pouvoir retracer l'origine dans la base de données avant d'être traitée dans le logiciel I3SP. La nomenclature comprend la date de la sortie, le lieu, l'espèce photographiée (par exemple *Chelonia mydas*), la partie recadrée (tête droite ou gauche) et le nom original du cliché (Figure 21).

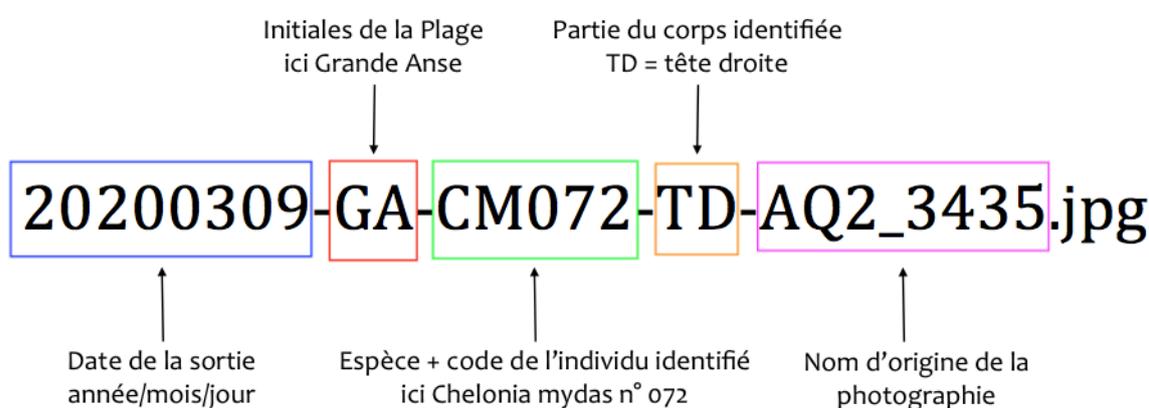


Figure 21 : Exemple de nomenclature d'une photographie après traitement.

Il s'agit ici d'une photo de tête droite de *Chelonia mydas* photographiée le 09/03/2020 à Grande Anse identifiée en tant qu'individu n°072 dans la base de données I3S Pattern.

Les profils droit et gauche de chaque tortue sont traités à l'aide du logiciel I3S Pattern (Interactive Individual Identification System – Pattern version 4.0 ; Calmanovici 2018). En premier lieu l'opérateur définit la région à étudier sur l'individu, puis les points clés et les contours des motifs à analyser. Ces derniers constituent des marques naturelles qui sont spécifiques à chaque individus (écailles, tâches, etc.) et que le logiciel utilise pour l'identification. Un algorithme d'extraction automatique des points de références permet ensuite de générer pour chaque image une empreinte unique.

La Figure 22 illustre la procédure détaillée : après ouverture de la photo recadrée dans le logiciel I3S Pattern, l'utilisateur entre dans un premier temps les caractéristiques de la région à étudier (exemple : tête droite de *Chelonia mydas*). Il définit ensuite trois points de référence : coin inférieur caudal de l'œil, coin supérieur caudal de l'œil, coin externe inférieur de la mandibule. Ces points de référence sont nécessaires pour pouvoir corriger les

différences d'angle de vue, de rotation et de mise à l'échelle pour chaque cliché. L'opérateur définit ensuite le contour de la zone d'intérêt. Le logiciel établit ainsi un ensemble de points clés ayant chacun une taille et une localisation propre, qui sont représentées par un cercle de diamètre variable. Ces données permettent d'attribuer un code unique à chaque individu.

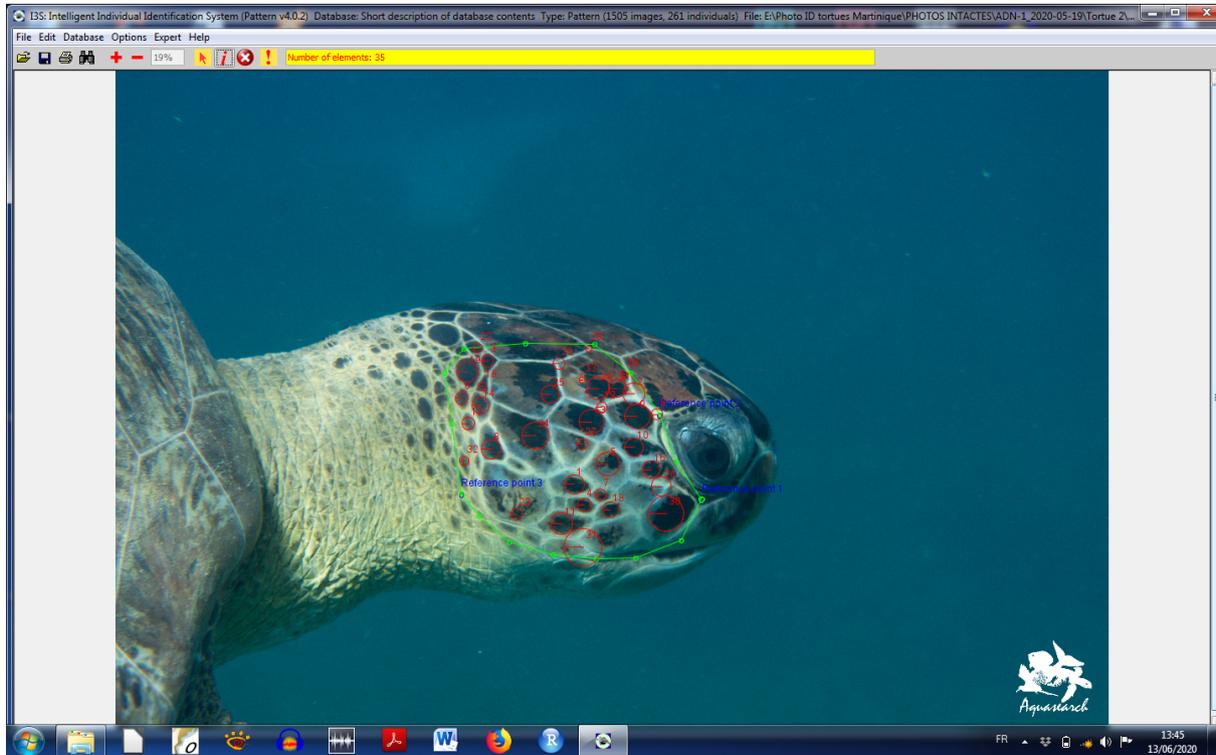


Figure 22 : Détermination des points clés de la zone à identifier, exemple sur un profil droit d'une tête de *Chelonia mydas*.

En bleu les trois points de référence ; en vert le contour de la zone d'étude ; en rouge les points clés définis par l'algorithme de I3S Pattern définissant une empreinte unique pour cet individu. Source : Aquasearch 2020

Le logiciel permet ensuite de mettre en correspondance le modèle de point clés de l'individu avec les modèles de tous les animaux connus de la base de données I3S. Des similitudes sur la taille des points clés et leur localisation sont recherchées. Différents individus de la base de données sont proposés comme étant des profils correspondant à notre recherche. La première proposition du logiciel correspond à l'image ayant l'empreinte la plus proche de l'image en cours de traitement (Figure 23).

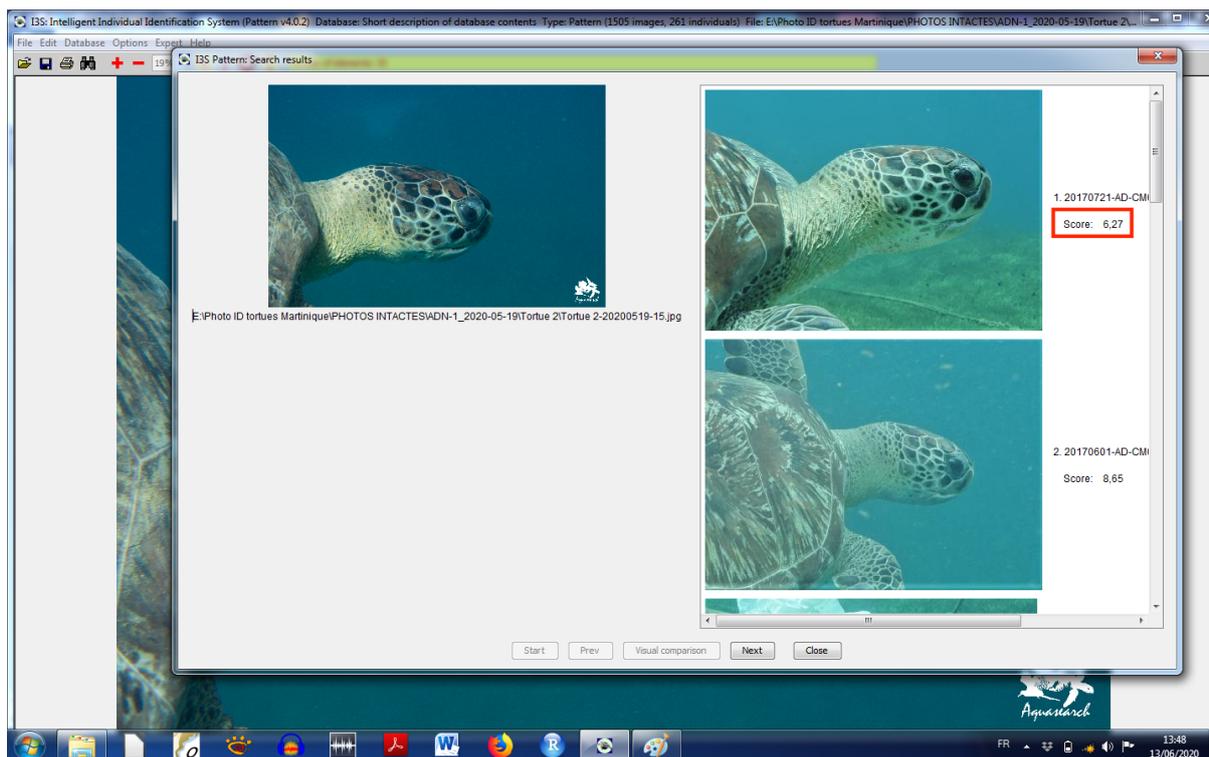


Figure 23 : Exemple de traitement d'une photographie de profil droit d'une tortue CM012 prise à Anse Dufour le 19/05/2020 dans le logiciel I3S.

À gauche la tortue à identifier, à droite les propositions de correspondances déterminées par I3S parmi les photographies stockées dans la base de données I3S. La 1^{ère} photographie proposée à droite présente un score de 6,27 soit inférieur à 10 ; la correspondance est donc très forte. Ces deux tortues sont donc un seul et même individu. Sources : Aquasearch 2020

La Figure 24 illustre les points clés de deux tortues comparées dans le logiciel I3SP. Les cercles rouge et bleu appartiennent respectivement à la tortue en cours de traitement et à celle de la base de données I3S ayant l'empreinte la plus proche. Les lignes vertes symbolisent les paires de points clés établies par le logiciel lorsqu'ils semblent similaires. Le classement des images s'effectue en fonction de la somme des distances entre chaque paire de point clés (lignes vertes), divisée par le carré du nombre de paires de point clés. La différence de taille des écailles est également prise en compte dans le score final (diamètre du cercle). La tortue considérée comme la plus proche de l'individu testé est celle avec le score le plus faible.

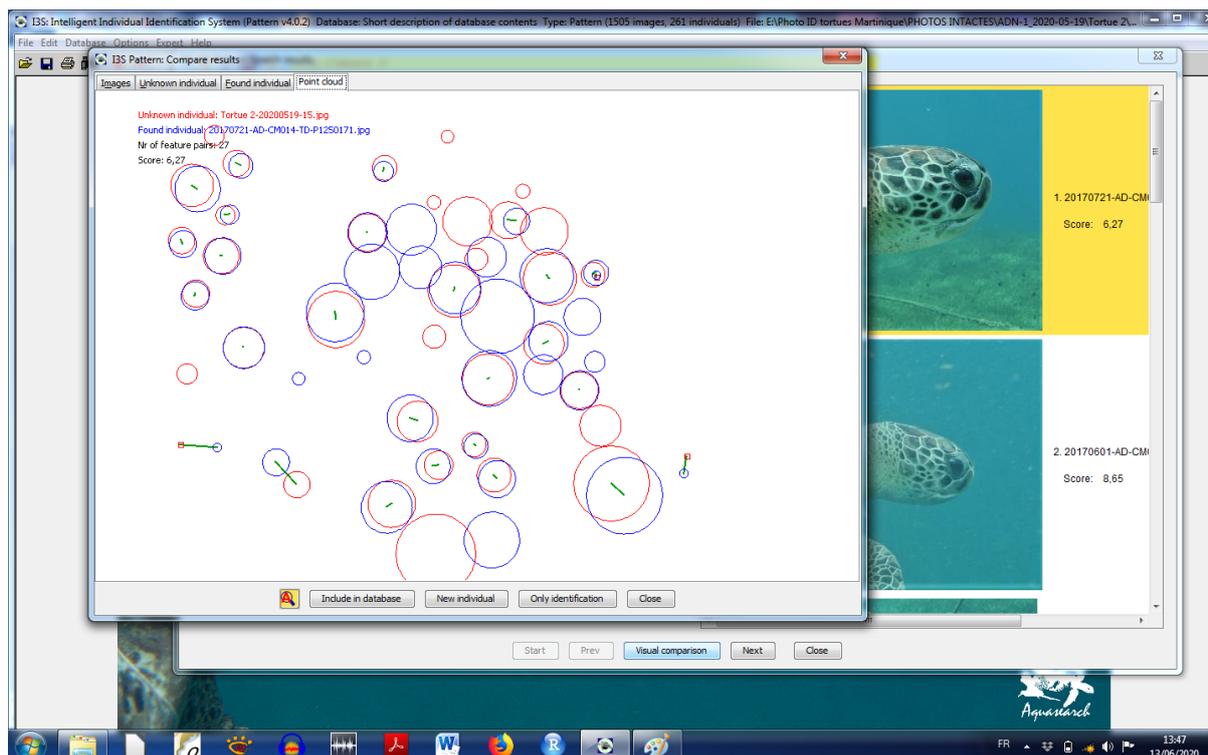


Figure 24 : Comparaison des points clés pour deux images appartenant au même individu.

L'image en cours de traitement (en rouge) présente une empreinte quasi identique à l'image de la base de données pour un certain individu (en bleu) ; un score faible de 6,27 confirme cette hypothèse. Source : Aquasearch 2020.

Les données récoltées sur I3SP sont placées dans une base de données centrale sous forme de fichier Excel. Celui-ci comporte des informations sur la date de la sortie, l'année, le nom d'origine de la photo traitée, le lieu (Martinique pour toutes), le nom de l'anse, la visibilité dans l'eau, l'espèce de la tortue (CM pour *Chelonia mydas*), la profondeur à laquelle elle a été vue, la partie du corps identifiée et l'orientation (tête droite ou gauche), la taille de la carapace (estimation de la longueur courbe de la carapace en cm), la présence ou non de lésion de FP et son grade (de zéro à trois), le numéro de l'individu, le nom du dossier I3S contenant l'ensemble des images répertoriées pour cet individu. D'autres informations telles que la socialité, la présence d'impacts sur la carapace, de coquillages ou de rémoras sont notées.

d. Cartographie et tracé GPS

Le logiciel QGIS® est utilisé pour vérifier la qualité des transects, la surface couverte lors de la sortie et la localisation de chaque tortue photographiée. Après insertion des données

GPS dans le logiciel et affichage du tracé des transects effectués, on place sur la carte les points correspondants à chaque tortue photographiée (Figure 25).

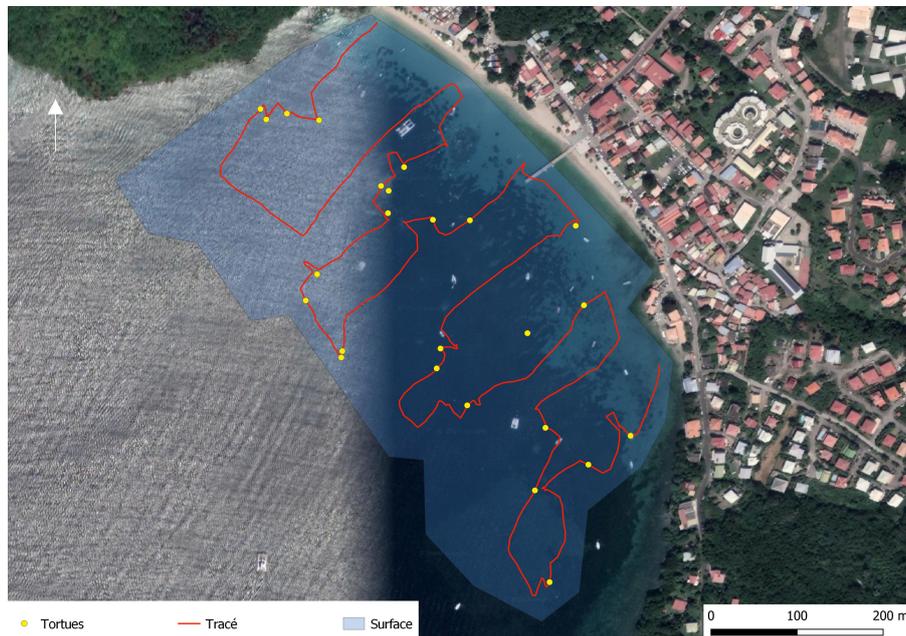


Figure 25 : Exemple de visualisation du tracé effectué lors de la sortie au Bourg des Anses d'Arlet le 13/03/2020

Les points jaunes représentent les tortues photographiées, le tracé effectué par les plongeurs est en rouge. Sources : Aquasearch 2020.

2. Prélèvement d'échantillon pour analyses moléculaires

a. Objectifs et autorisations

L'aspect visuel caractéristique des lésions de FP nous permet de donner un diagnostic avec une forte suspicion (Smith & Coates 1938, Baboulin 2008). Cependant, une étude plus approfondie des prélèvements par analyses PCR permet de confirmer l'étiologie des lésions observées, qui est la méthode de choix pour diagnostiquer avec précision la FP (Quackenbush *et al.* 1998 et 2001, Page-Karjian *et al.* 2012, Alfaro-Nuñez *et al.* 2014, Ariel *et al.* 2017). La cible primaire du virus de la FP étant la peau (Page-Karjian *et al.* 2012), les prélèvements sont des biopsies cutanées prélevées à l'aide de kit biopsie Punch® sur les tumeurs et sur peau saine. Les échantillons sont ensuite tamponnés délicatement sur des cartes FTA®, papier buvard permettant la conservation d'ADN et ARN viral à température ambiante (Ospina *et al.* 2019). Les cartes FTA® sont envoyées pour être analysées dans un laboratoire spécialisé afin de réaliser PCR et séquençage partiel.

Dans le cadre de ce travail de thèse, les autorisations de prélèvements sur tortues vivantes non échouées n'ont pas été obtenues à temps et par conséquent les prélèvements analysés ont été ceux réalisés dans le cadre du Réseau Échouage Tortue Marine (RETOM), qui est un réseau d'acteurs volontaires formés par l'équipe d'animation du Plan National d'Action et habilité par arrêté préfectoral pour intervenir sur les tortues blessées, mortes ou en détresse (Annexe 3).

b. Mode de prélèvement des échantillons, transport et conservation

Ainsi, dans notre étude, seules les tortues retrouvées mortes sont prélevées. Pour chaque tortue on réalise une photographie des deux profils de la tortue, une photo d'ensemble de la tortue en vue de dessus, et une photo de l'éventuelle tumeur. On note également le grade de FP, la longueur et la largeur de la dossière (Figure 26), la présence de coquillage et d'algues, la cause de la mort si connue, et la présence d'autres lésions éventuelles. On réalise enfin une biopsie au niveau de la tumeur cutanée (Figure 27) et une au niveau de la peau saine. Si la tortue ne présente aucune lésion de FP on biopsie une partie de peau saine uniquement. La biopsie est ensuite délicatement tamponnée sur la carte FTA®. Le tissu est ensuite placé dans un tube Eppendorf contenant du formol.

Une fois la totalité des échantillons récoltés, les cartes FTA® sont envoyées par lettre recommandée au laboratoire de virologie de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse pour y être traitées.

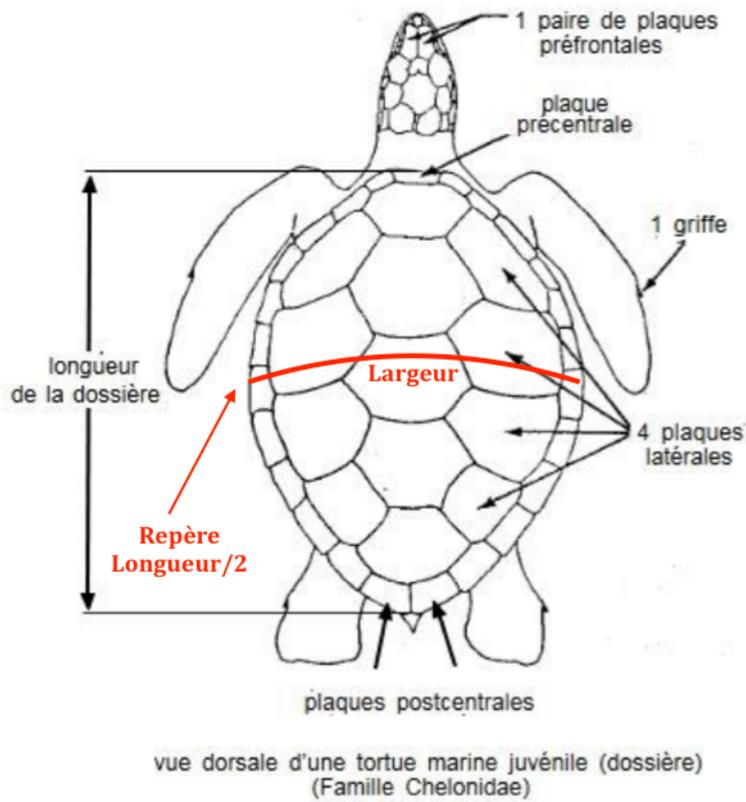


Figure 26 : Schéma d'une vue dorsale de *Chelonia mydas* montrant les points clés permettant l'estimation de la taille de la dossière.

D'après R. Marquez & Bauchot 1987.



Figure 27 : Exemple de tumeurs prélevées dans le cadre du RETOM.

Intervention du 22/06/2020 au Carbet, Martinique. Source : Aquasearch 2020.

c. Extraction ADN à partir des cartes FTA®

Les cartes FTA® sont découpées en carré de 1 cm² et mises à suspendre dans 300 µL de tampon TE sous agitation pendant 5 heures à 4°C dans des tubes Eppendorf étiquetés. L'ADN génomique de chaque échantillon est extrait à partir de 200 µL prélevés à la fin de l'étape précédente. L'extraction est faite à l'aide du kit EZ-10 Spin Column Blood & Tissue Genomic DNA Mini-preps Kit® (Bio Basic) selon les recommandations du fabricant en utilisant le protocole dédié aux cultures cellulaires. Aux 17 échantillons, s'est ajouté un témoin d'extraction négatif, de l'eau (noté « T -»). Les produits d'extraction sont conservés au congélateur à - 20°C.

d. Diagnostic de la FP par PCR

La méthode utilisée est une PCR qui cible une séquence de 206 pb du gène codant pour l'ADN polymérase du ChHV5 et qui a démontré son efficacité sur la mise en évidence de la présence du virus de la FP à partir de tumeur fibropapillomateuse (Lu *et al.* 2000). Cette PCR étant nichée, deux PCR sont effectuées successivement, l'échantillon employé pour la deuxième étant le produit d'amplification de la première. Les séquences des amorces sont détaillées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Amorces employées pour la PCR nichée

	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce
PCR 1	GTHV_extF1	Sens : 5'-AGCATCATCCAGGCCACAAATCT-3'
	GTHV_extR1	Anti-sens : 5'-CGGCCAGTTCGGCGCGTTCGACCA-3'
PCR 2	GTHV_intF1	Sens : 5'-CTGCTGACCGACTGGCTGGC-3'
	GTHV_intR1	Anti-sens : 5'-AGCATGTCGCGCCCTACGGTGGTGAC-3'

Le kit KAPA Taq PCR® est utilisé pour la réaction de PCR. La composition des mix des deux PCR est rapportée respectivement dans les Tableaux 5 et 6.

Tableau 5 : composition du mix de la PCR 1 avec le Kit KAPA taq PCR 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 GTHV_extF1 10 μ M	1
Amorce GTHV_extR1 10 μ M	1
Eau	16,9
5 U/ μ L KAPA Taq DNA Polymerase	0,1
ADN (échantillon)	3

Tableau 6 : Composition du mix de la PCR 2 avec le kit KAPA taq PCR 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 GTHV_intF1 10 μ M	1
Amorce GTHV_intR1 10 μ M	1
Eau	16,9
5 U/ μ L KAPA Taq DNA Polymerase	0,1
ADN (échantillon)	3

Pour les 2 PCR successives, les conditions d'amplifications suivantes sont appliquées (Tableau 7 et 8) :

Tableau 7 : Conditions d'amplifications de la PCR 1

Température	Temps	Nombre de cycles
95°C	3 min	X 1
95°C	30 s	X 45
58°C	30 s	
72°C	1 min	
72°C	1 min	X 1

Tableau 8 : Conditions d'amplification de la PCR 2

Température	Temps	Nombre de cycles
95°C	3 min	X 1
95°C	30 s	X 45
61°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	1 min	X 1

Les produits des diverses amplifications sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 %. La composition du gel est présentée dans le Tableau 9. Le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse avec une tension entre les électrodes de 90 volts pendant une

heure. Les résultats sont mis en évidence par l'exposition des gels à des rayonnements ultraviolets.

Tableau 9 : Composition du gel d'agarose concentré à 1,5 %

Réactif	Quantité
Tampon de migration TBE 0,5X	100 mL
Poudre d'agarose	1,5 g
SYBR® Safe (agent intercalant)	4 µL

e. Séquençage partiel

Le séquençage partiel effectué ici constitue un travail préliminaire ayant pour objectif à terme d'établir une analyse phylogénétique du virus ChHV5 rencontré dans les eaux côtières de la Martinique. Une étude plus complète est en cours à partir de prélèvements qui seront effectués prochainement sur des tortues vivantes, au cours de campagnes de capture sur différents sites répartis le long de la côte Caraïbe et Atlantique.

Pour l'échantillon 5 positif en PCR, l'ADN de l'amplicon est extrait en utilisant le kit QIAGEN® QIAquick® DNA Gel Extraction selon les recommandations du fabricant (Annexe 4), et séquençé par méthode Sanger dans un laboratoire prestataire.

3. Analyses statistiques

Différentes méthodes d'analyse statistique permettent d'estimer si la population observée est représentative de la population globale des tortues vertes de la Martinique. Cela permet ensuite d'établir la prévalence de la FP dans cette population.

a. Méthode de Capture-Marquage-Recapture

La méthode Capture-Marquage-Recapture (CMR) a pour but l'identification d'un individu issu d'une population donnée par l'intermédiaire d'un ensemble de marques visibles et naturellement présentes (Musseau 2016). Chez l'objet de notre étude, les tortues marines, ce sont les écailles des profils de têtes (forme et répartition) qui sont spécifiques de chaque individu (Giraudou 2015, Domeau 2017). L'histoire de capture de chacune des tortues

observées est réalisée au cours des différentes sorties sur les sites. Celle-ci consiste à traduire chaque rencontre ou non avec l'individu dans un langage binaire reporté dans un tableau Excel (Musseau 2016). L'hypothèse de départ est que tous les individus ne sont pas rencontrés à chaque occasion de capture. La probabilité de détection de l'individu à chaque session est estimée à partir de modèles qui utilisent l'histoire de capture. Ainsi, le nombre de tortues dans la population totale est établi à partir des individus vus, et en déterminant ceux non observés mais bien présents (Musseau 2016).

b. Caractérisation du type de population par Close-Test

La première étape dans l'estimation de la population totale de tortues marines d'un site donné est de déterminer si celle-ci est ouverte ou fermée. Une population ouverte est caractérisée par une taille et une composition variable en fonction des migrations et immigrations, naissances et décès. Au contraire, une population fermée n'est pas concernée par ces recrutements ou pertes d'individus et garde un effectif stable au cours de la période d'étude (Musseau 2016, Domeau 2017). Après avoir déterminé les migrations éventuelles des tortues entre les Anses, les histoires de capture de chaque individu ont été analysées à l'aide du logiciel Close Test. La population est considérée comme fermée si l'hypothèse « H_0 = population fermée » est acceptée, avec une valeur p supérieure à 0,05 (Test de Stanley & Burnham ; Stanley et Richards 2005). Si H_0 est rejetée la population est considérée comme ouverte (Musseau 2016, Domeau 2017). Dans l'étude réalisée, deux méthodes ont été retenues (Koller *et al.* 1996, Peinado *et al.* 2011).

c. Modèle d'estimation de la taille de la population – Méthode de Schnabel

La méthode de Schnabel est utilisée lorsque plus de deux séries de captures sont effectuées : un premier échantillon est capturé, marqué et relâché puis dans chaque session de capture suivante on dénombre les individus déjà marqués et les nouveaux (Koller *et al.* 1996, Peinado *et al.* 2011). Elle est utilisée lorsque la population est fermée et comprend plus de 9 individus différents identifiés sur la période d'étude.

L'estimation de la population se définit par :

$$N = \frac{\Sigma(C_t M_t)}{\Sigma R_t}$$

N = Nombre d'individus estimé pour l'anse

Mt = Nombre total d'animaux marqués dans la population juste avant la t ème visite du site.

Ct = Nombre total d'individus capturés lors de la visite t

Rt = Nombre d'individus précédemment marqués (recaptures) capturés lors de la visite t (le reste des individus capturés lors de la visite t doit recevoir une nouvelle marque).

La variance d'échantillonnage est calculée comme suit :

$$Var\left(\frac{1}{N}\right) = \frac{\Sigma(R_t)}{(\Sigma(C_t M_t))^2}$$

i. Méthode de Schumacher-Eschmeyer

Le modèle de Schumacher-Eschmeyer est une méthode d'estimation de la population totale qui utilise les mêmes variables que Schnabel, mais est préférée à cette dernière qui tend à sous-estimer la population (Peinado *et al.* 2011). Les conditions d'application sont les mêmes que celles de Schnabel avec un paramètre supplémentaire à prendre en compte : le nombre de recaptures doit augmenter au cours du temps (Koller *et al.* 1996).

$$N = \frac{\sum_{t=1}^s C_t M_t^2}{\sum_{t=1}^s R_t M_t}$$

N = nombre d'individus estimé pour l'anse

Mt = Nombre total d'animaux marqués dans la population juste avant la t ème visite du site.

Ct = Nombre total d'individus capturés lors de la visite t

Rt = Nombre d'individus précédemment marqués (recaptures) capturés lors de la visite t (le reste des individus capturés lors de la visite t doit recevoir une nouvelle marque)

S = nombre total de séries de captures

La variance se calcule de la même manière que pour la méthode de Schnabel.

TROISIEME PARTIE : RESULTATS

A. Effort d'échantillonnage

Une surface totale de 6 622 302 m² est parcourue à la nage au cours de l'étude. En effet, l'ensemble des sites étudiés représente une superficie de 1 668 736 m² et chaque plage a été visitée quatre fois, à l'exception de Bellefontaine qui a été prospectée deux fois car un phénomène de pollution a entraîné l'interdiction de baignade sur cette plage. La superficie est déterminée à l'aide du logiciel QGIS®. La durée de temps passé dans l'eau à chaque sortie est de 3 heures en moyenne, pouvant aller jusqu'à 4 heures pour les plus grandes anses comme Grande Anse et la plage du Coin au Carbet. Le nombre total d'heure de prospection est :

$$((5 \text{ plages} \times 3h) + (2 \text{ plages} \times 4h)) \times 4 = \mathbf{92 \text{ heures}}$$

Au cours de l'étude, **4 202** photographies sont prises, tout site confondu. Un total de **909 images** est utilisé pour la photo-identification sachant qu'il faut environ **30 minutes** pour traiter la photo et effectuer l'identification, soit un temps de travail de **454 heures** de travail. Un total de **216** tortues est observé au cours de la période d'étude (individus photographiés ou non) et **139** tortues différentes sont identifiées dans la base de données I3S Pattern (Tableau 10). À la fin de l'étude, la base de données de photo-identification des tortues depuis le début des travaux de recherche de Aquasearch (2015) compte **4 848 photos** et **270 individus différents identifiés** sur la Martinique.

Tableau 10 : Récapitulatif du traitement des photographies

Nombre de photos prises en 2020		4 202
Nombre de photos traitées en 2020		909
Nombre de photos dans la BDD i3SP à la fin de l'étude		4 848
Nombre total de tortues différentes vues en 2020	Photographiées	139
	Non photographiées	77

B. Etude de la FP par photo-identification en secteur nord Caraïbe

Trois anses sont prospectées sur la façade nord Caraïbe (Figure 28). Chacune des anses est explorée à quatre reprises sauf pour Bellefontaine. En effet, un arrêté préfectoral d'interdiction de baignade a été donné en raison de la rupture d'une canalisation d'eau usée. Seules deux sorties à Bellefontaine ont pu être réalisées.

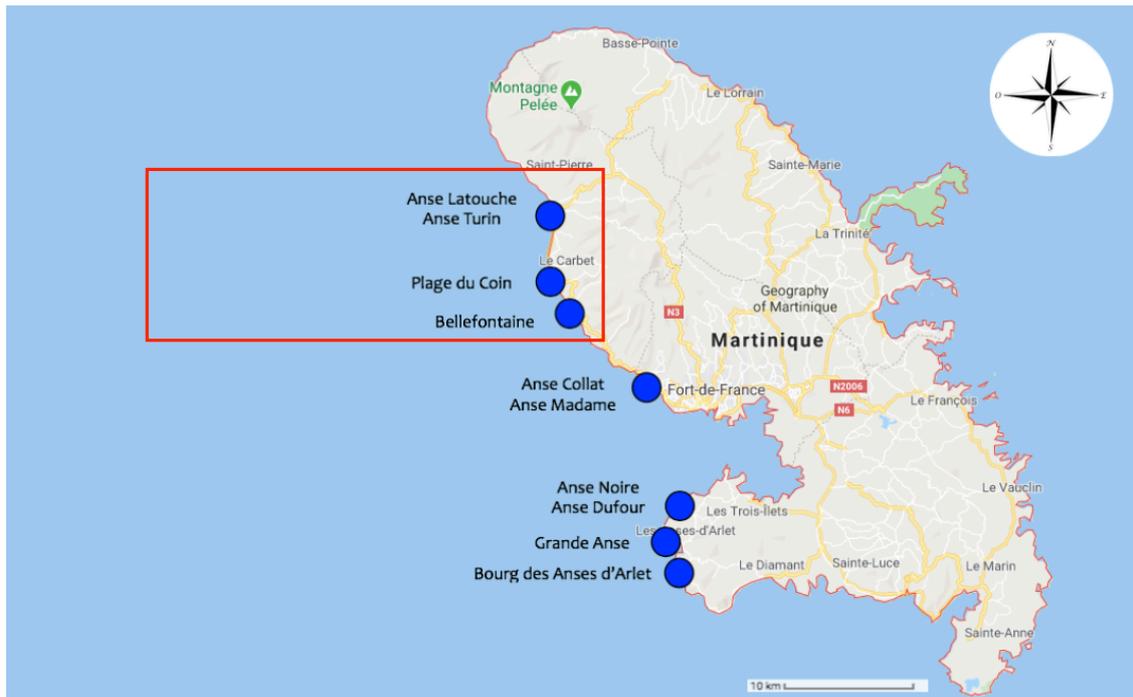


Figure 28 : Carte de la Martinique représentant le secteur nord Caraïbe

1. Caractérisation de la population

a. Anse Latouche et Turin

Les plages de l'Anse Turin et Anse Latouche sont séparées par une bande de terre étroite (Figure 29). La séparation entre les deux sites est considérée comme négligeable.

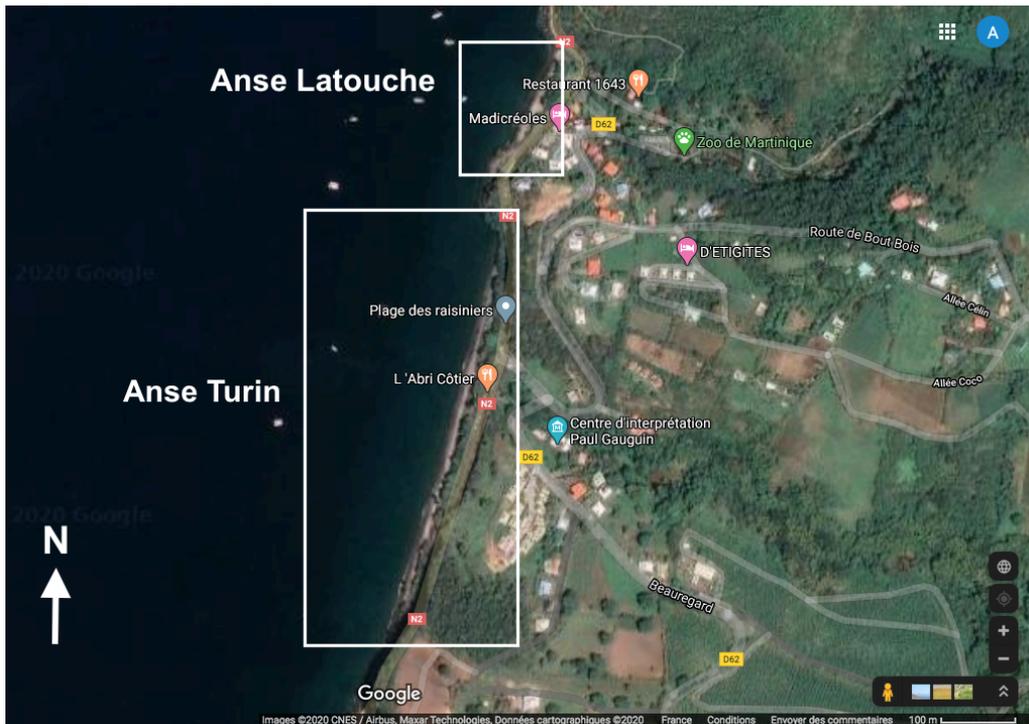


Figure 29 : Carte topographique de l’Anse Turin et Latouche.

Plages encadrées en blanc. Source : Google Maps 2020.

Des échanges d’individus sont constatés entre les deux anses, mais pas avec les autres sites. Il est ainsi considéré que la population de tortues des anses Turin et Latouche constitue un même ensemble. L’analyse sur le logiciel Close-Test indique que la population Anse Latouche-Turin est **fermée** sur la période étudiée. Sur l’ensemble des sorties, **15 tortues différentes** sont observées, dont 4 non identifiées (photographie trop floue ou non photographiées).

Ainsi la population de tortues vertes de l’ensemble Anse Latouche – Turin est estimée à **29 individus** (Figure 30) avec un IC95% de 19 à 41 tortues (calculés selon la distribution de Poisson, Sahai *et al.* 1993).

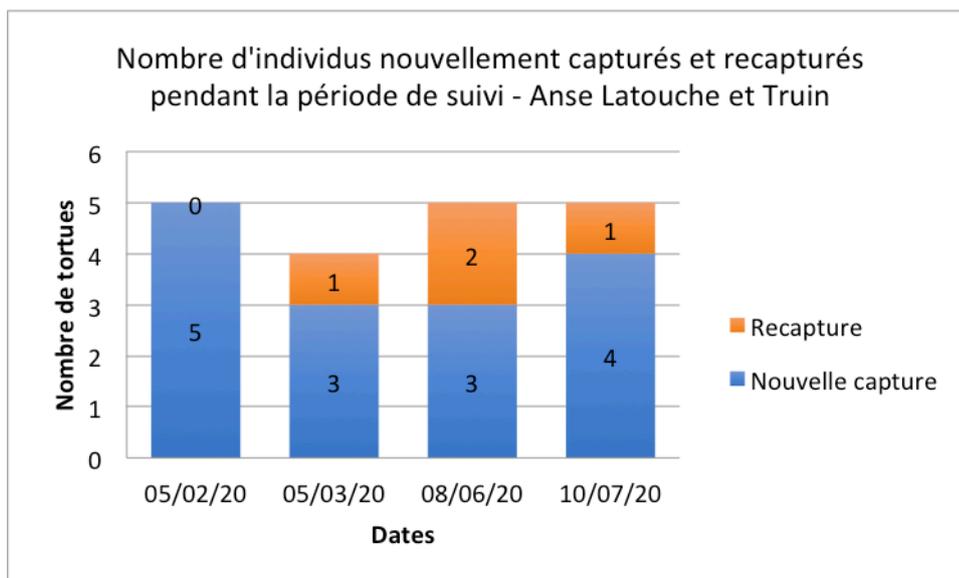


Figure 30 : Graphique CMR pour l'ensemble Anse Latouche-Turin.

Graphique définissant le nombre d'individus nouvellement identifiés et le nombre de recaptures au cours de la période de suivi, comprenant également les tortues non photographiées et non identifiées. En bleu le nombre de tortues nouvellement capturées et en orange le nombre de tortues recapturées pour chaque sortie.

Les différentes classes de taille de tortues observées sont présentées dans la Figure 31. On note une prédominance de tortues juvéniles de taille inférieure à 60cm voir inférieure à 40cm de longueur de carapace.

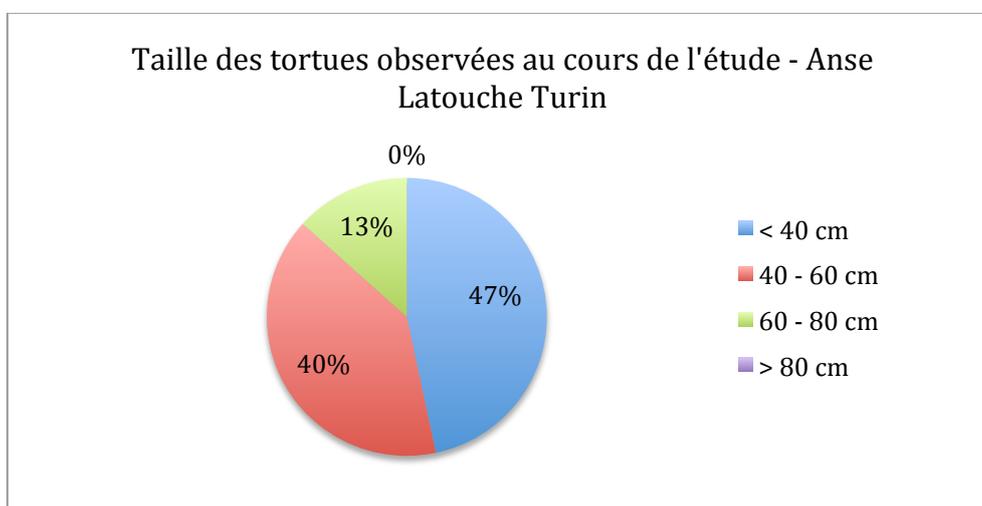


Figure 31 : Graphique représentant les différentes classes de taille de tortues présentes à Anse Latouche - Turin au cours de l'étude.

Graphique comprenant également les tortues non identifiées ou photographiées. En bleu les tortues de taille de carapace < 40cm, en rouge entre 40-60 cm, en vert entre 60-80 cm, et en violet > 80 cm.

b. Plage du Coin au Carbet

La plage du coin au Carbet est caractérisée par des conditions d'échantillonnage souvent difficiles et une grande distance à parcourir avec une plage de 1 147 m de long (Figure 32). En effet lors de plusieurs sorties nous constatons un fort courant entrainant vers le sud et/ou une mauvaise visibilité due à la présence de sédiments en suspension dans l'eau. La population de tortue de l'anse est considérée comme **fermée** suite au calcul sur le logiciel Close-Test et aucune tortue identifiée sur cette plage n'est retrouvée ailleurs au cours de l'étude. Sur l'ensemble des sorties, **23 tortues différentes** sont observées dont 8 non identifiées (photographie trop floue ou non photographiées).



Figure 32 : Carte topographique de la Plage du Coin au Carbet.

Plage encadrée en blanc. Source : Google Maps 2020.

Le nombre de recaptures n'augmente pas au cours du temps (Figure 33). La population estimée de la plage du Coin est de **52 individus** [39-70].

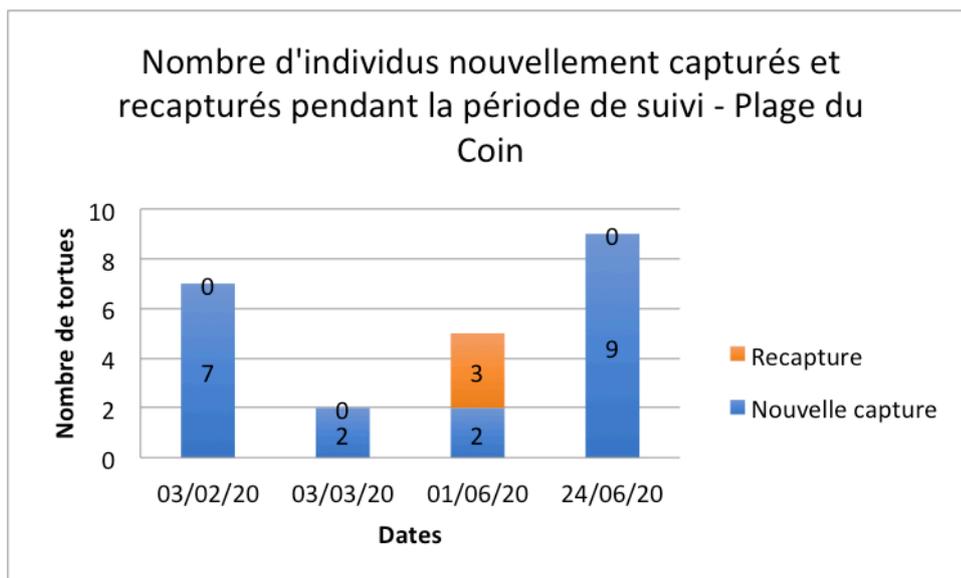


Figure 33 : Graphique CMR pour la Plage du Coin au Carbet.

Graphique définissant le nombre d'individus nouvellement identifiés et le nombre de recaptures au cours de la période de suivi, comprenant également les tortues non photographiées et non identifiées. En bleu le nombre de tortues nouvellement capturées et en orange le nombre de tortues recapturées pour chaque sortie.

Les tailles de tortues observées sont majoritairement autour de 40-60 cm de longueur de carapace (Figure 34). On note une absence totale d'observation de tortues de taille inférieure à 40 cm.

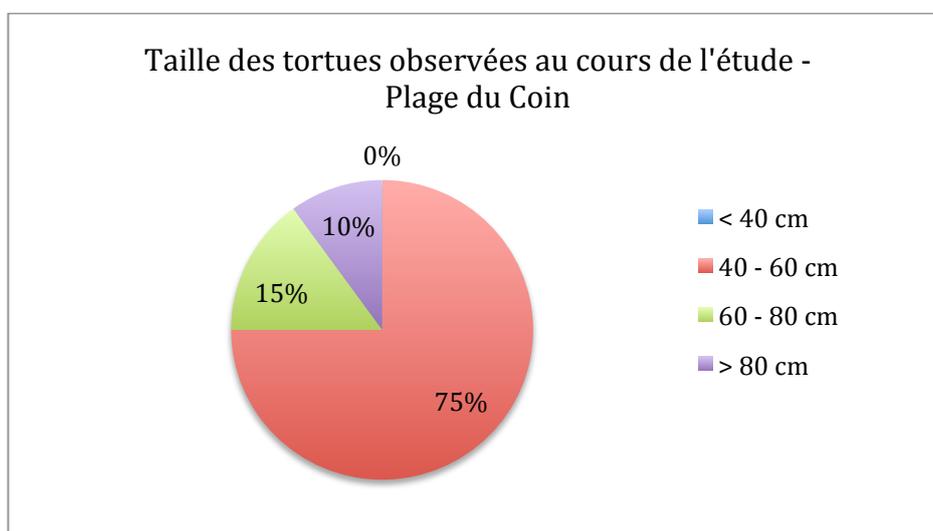


Figure 34 : Graphique représentant les différentes classes de taille de tortues observées à la plage du Coin au Carbet au cours de l'étude

Graphique comprenant également les tortues non identifiées ou photographiées. En bleu les tortues de taille de carapace < 40cm, en rouge entre 40-60 cm, en vert entre 60-80 cm, et en violet > 80 cm.

c. Bellefontaine

Bellefontaine est une petite plage de 252 m de long entourée d'un village de pêcheur. À proximité se situe la centrale thermique d'EDF (Eau et Electricité de France. Figure 35).



Figure 35 : Carte topographique de Bellefontaine.

Plage encadrée en blanc. Centrale thermique d'EDF entourée en rouge. Sources : Google Maps 2020.

Comme expliqué précédemment, seules deux sorties sont réalisées à Bellefontaine. De plus, les tortues observées se sont révélées être extrêmement farouches, rendant impossible l'identification à partir des photographies, voire même la possibilité de prendre une photographie. Bellefontaine est le seul site de l'étude où l'on rencontre ces difficultés à un tel degré. Le Tableau 11 regroupe les différentes observations sur ce site au cours des deux sorties : **huit tortues différentes** sont vues mais aucune n'est identifiée (photo floue ou absence de photographie). Aucune estimation de la taille de la population n'est possible.

Tableau 11 : Tableau regroupant les observations faites au cours des deux sorties réalisées à Bellefontaine

Date de la sortie	Espèce	Taille (cm)	Stade de FP
10/06/2020	<i>Chelonia mydas</i>	40-60	0
	<i>Chelonia mydas</i>	60-80	0
	<i>Chelonia mydas</i>	> 80	0
	<i>Chelonia mydas</i>	> 80	Stade 1 : 1 tumeur de taille 2-3 cm à la base de la nageoire antérieure gauche
	<i>Chelonia mydas</i>	60-80	Stade 3 : 2 tumeurs de plus de 10 cm de diamètre situées à la base de la nageoire antérieure droite et du cou
30/06/2020	<i>Chelonia mydas</i>	< 40	Inconnu
	<i>Chelonia mydas</i>	40-60	Inconnu
	<i>Chelonia mydas</i>	40-60	Inconnu

La Figure 36 montre les tailles de longueur de carapaces observées au cours des deux sorties à Bellefontaine. On note une répartition assez équilibrée entre les quatre classes de taille. Les observations restent relativement peu fiables étant donné la fuite instantanée et systématique des individus, et le nombre faible de sortie.



Figure 36 : Graphique représentant les différentes tailles de longueur de carapaces observées au cours de l'étude (2 sorties uniquement) à Bellefontaine.

En bleu les tortues de taille de carapace < 40cm, en rouge entre 40-60 cm, en vert entre 60-80 cm, et en violet > 80 cm.

2. Prévalence de la FP

a. Anse Latouche et Turin

Aucune tortue n'est observée avec des lésions de FP au cours des quatre sorties à Anse Latouche et Turin. Le pourcentage de tortues malades est donc considéré comme nul pour ce site.

b. Plage du Coin au Carbet

Sur les 4 sorties cumulées réalisées à la plage du Coin, un total de 23 tortues différentes est observé dont 9 tortues avec des signes de FP externe. Étant donné que la population totale de cette plage est estimée à 52 tortues la prévalence de la maladie est la suivante :

$$\frac{52 \times 9}{23} = 13,56 \text{ soit une } \textbf{prévalence de la maladie 26\%}$$

c. Bellefontaine

Étant donné l'impossibilité d'identifier les tortues sur ce site tant les tortues sont farouches, nous ne pouvons pas estimer avec fiabilité une prévalence de la FP à Bellefontaine. Néanmoins d'après les quelques observations faites en 2020 et celles réalisées par Liebart (2019) nous pouvons affirmer que la FP est présente sur cette plage. Sur les huit tortues vues et non identifiées sur les deux sorties réalisées, deux semblaient atteintes de FP. Nous observons notamment une tortue verte de 60-80 cm de longueur de carapace avec un stade de FP gradée à trois (deux tumeurs de 10 cm au niveau du cou et à la base de la nageoire antérieure droite).

3. Corrélation entre taille des tortues et taille des tumeurs externes

a. Plage du Coin au Carbet

La Figure 37 présente les observations au cours de l'étude concernant la taille des tortues en fonction de la taille des tumeurs externes visibles. On note que la taille de tumeur observée la plus fréquente est 1-4 cm et que la classe de tortue la plus concernée est celle de 40-60 cm de longueur de carapace.

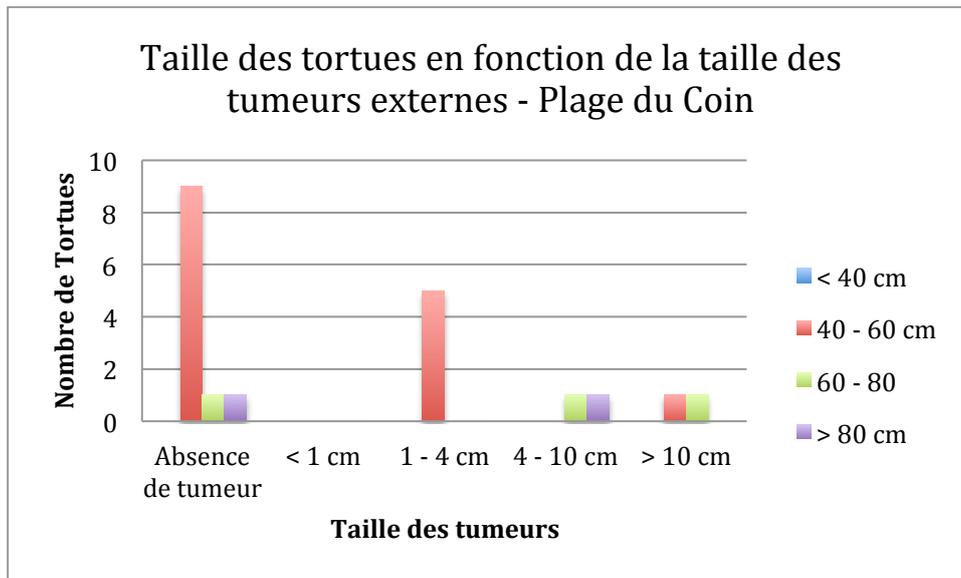


Figure 37 : Taille de la tortue en fonction de la taille des tumeurs externes pour la plage du Coin au Carbet.

En bleu les tortues de taille de carapace < 40cm, en rouge entre 40-60 cm, en vert entre 60-80 cm, et en violet > 80 cm.

b. Bellefontaine

Les données recueillies pour cette plage ne permettent pas d'étudier cette corrélation.

4. Localisation des tumeurs externes

a. Plage du Coin au Carbet

Les tortues atteintes de FP observées lors des sorties sur la plage du Coin au Carbet montrent une répartition éparse des tumeurs, avec une prédominance de tumeurs sur le cou et nageoires postérieures (Figure 38).

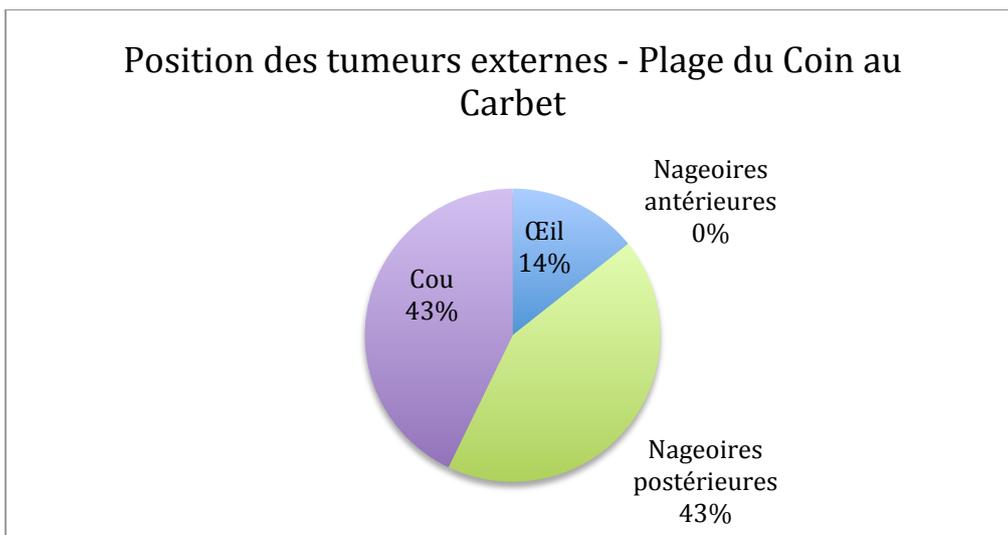


Figure 38 : Position des tumeurs externes pour la plage du Coin au Carbet.

Au cours de la sortie du 25 juin 2020 à la plage du Coin, nous observons une jeune tortue de moins de 40 cm de longueur de carapace particulièrement atteinte par la FP, nommée CM261 dans la base de données (Figures 39 et 40). Chez elle, la FP est gradée au maximum, soit 3, et on note la présence de tumeurs en régression (couleur uniforme blanche et une surface régulière) et en aggravation (aspect bourgeonnant et couleurs rouge-noir-blanc). Elle paraît débilitee avec une absence de réaction aux stimuli extérieurs, une position maintenue à profondeur intermédiaire et une immobilité non observées jusqu'alors.



Figure 39 : Photographie de la tête profil gauche de CM261 montrant deux tumeurs fibropapillomateuses oculaires.

Sur l'oeil gauche une tumeur en voie d'aggravation (et sur l'oeil droit en voie de régression (surface lisse et couleur blanche uniforme). Sources : Aquasearch 2020



Figure 40 : Photographie corps entier de la tortue CM261.

L'image montre une tumeur oculaire et une tumeur au niveau de la nageoire postérieure droite particulièrement volumineuse (cercles blanc). Sources : Aquasearch 2020

b. Bellefontaine

Sur les quelques observations réalisées (tableau 12), les tumeurs sont notées au niveau du cou et des nageoires antérieures gauche et droite.

C. Étude de la FP par photo identification en secteur centre Caraïbe

Le secteur centre Caraïbe est représenté par l'unique couple de plages Anse Madame et Anse Collat (Figure 41). Chacune des anses est visitée à quatre reprises au cours de la période d'étude.

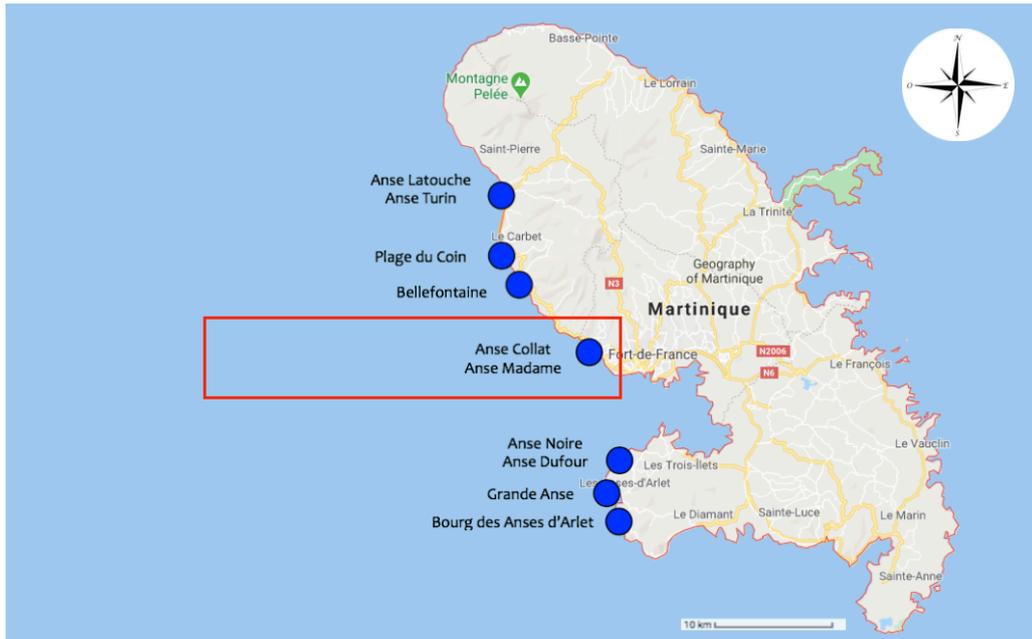


Figure 41 : Carte de la Martinique représentant le secteur Centre Caraïbe

1. Estimation de la taille de la population

Anse Madame et Anse Collat s'étendent sur des longueurs similaires mesurant respectivement 170 et 175 mètres de long (Figure 42). Elles sont séparées par une zone côtière rocheuse s'étendant sur une distance de 530 mètres de long.



Figure 42 : Carte topographique des Anses Madame et Collat.

Plages encadrées en blanc. Sources : Google Maps 2020.

Des échanges d'individus sont observés entre les deux plages, mais pas avec le reste des sites étudiés. On considère donc l'ensemble Anse Madame-Collat. Le logiciel Close-Test permet d'affirmer que la population de cet ensemble est **fermée**. Sur les 4 sorties réalisées, **19 tortues différentes** sont observées, dont sept non identifiées. Le nombre de recaptures n'augmente pas au cours du temps (Figure 43).

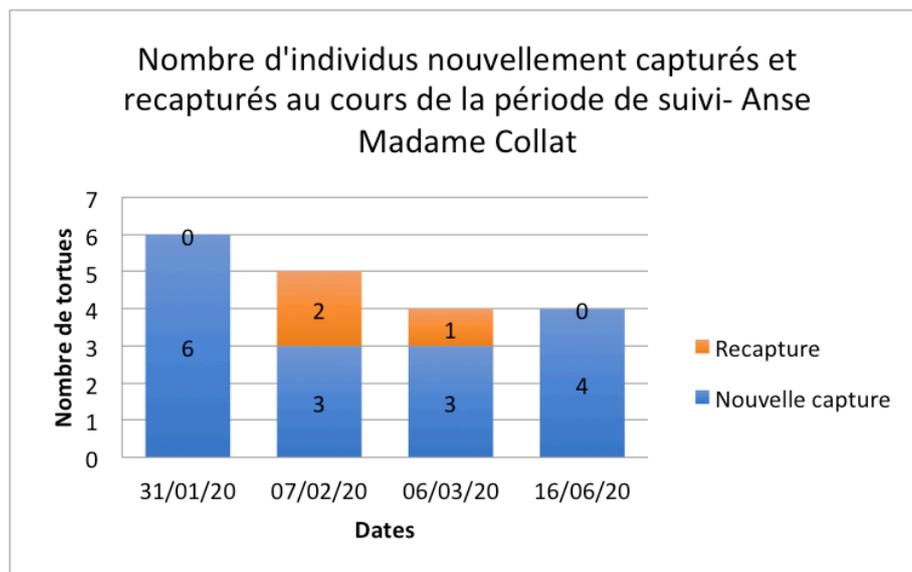


Figure 43 : Graphique CMR pour l'ensemble Anse Madame - Collat

Graphique définissant le nombre d'individus nouvellement identifiés et le nombre de recaptures au cours de la période de suivi, comprenant également les tortues non photographiées ou non identifiées. En bleu le nombre de tortues nouvellement capturées et en orange le nombre de tortues recapturées pour chaque sortie.

La population de tortues vertes de l'ensemble Anse Madame –Collat est estimée à **38 individus** [27-52].

On note une répartition équitable entre les classes de taille au sein de la population observée, avec une absence totale de tortue de taille supérieure à 80 cm (Figure 44).

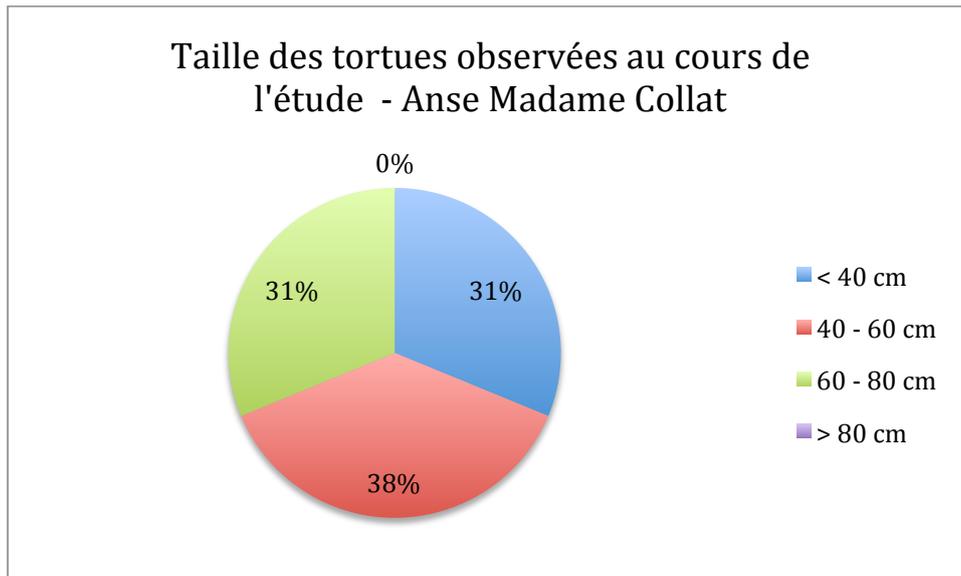


Figure 44 : Graphique représentant les différentes classes de taille de tortues présentes à Anse Madame Collat au cours de l'étude.

Graphique comprenant également les tortues non identifiées ou photographiées). En bleu les tortues de taille de carapace < 40cm, en rouge entre 40-60 cm, en vert entre 60-80 cm, et en violet > 80 cm.

2. Prévalence de la FP

Sur les 4 sorties réalisées à Anse Madame – Collat, 19 tortues différentes sont vues dont 4 tortues avec des signes de FP externe. Étant donné que la population totale de cette plage est estimée à 38 tortues la prévalence de la maladie est la suivante :

$$\frac{38 \times 4}{19} = 8 \text{ soit une } \textit{prévalence de la maladie de 21\%}$$

3. Corrélation taille des tortues et taille des tumeurs externes

Les classes de tailles les plus concernées par la présence de tumeurs externes sont les tortues de 40-60 cm et 60-80 cm de longueur de carapace (Figure 45). La taille des tumeurs reste comprise entre 1 et 10 cm de diamètre.

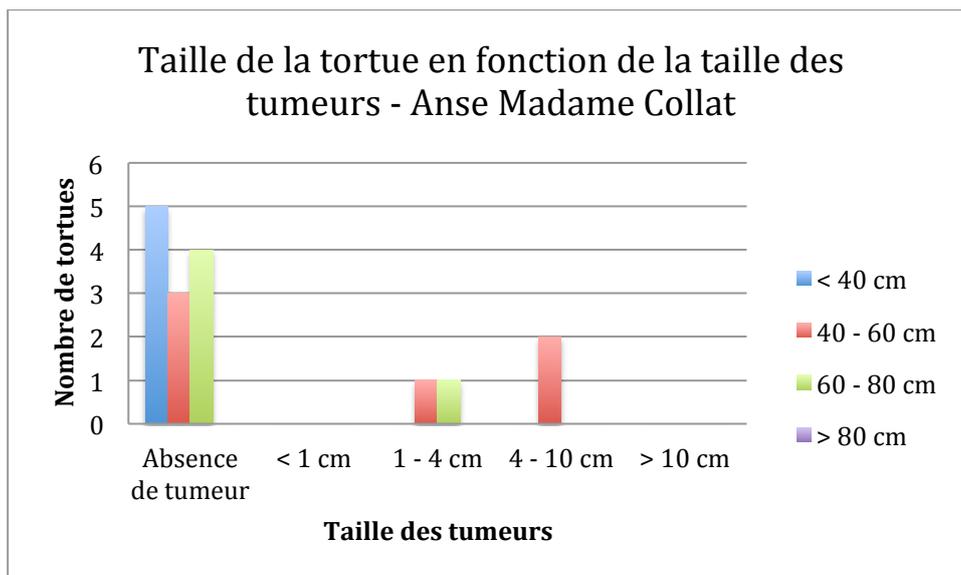


Figure 45 : Graphique présentant la taille des tortues en fonction de la taille des tumeurs à Anse Madame Collat.

En bleu les tortues de taille de carapace < 40cm, en rouge entre 40-60 cm, en vert entre 60-80 cm, et en violet > 80 cm.

4. Localisation des tumeurs externes

On observe une répartition assez homogène de la localisation des tumeurs externes avec une prédominance de tumeurs sur la nageoire antérieure gauche (Figure 46).

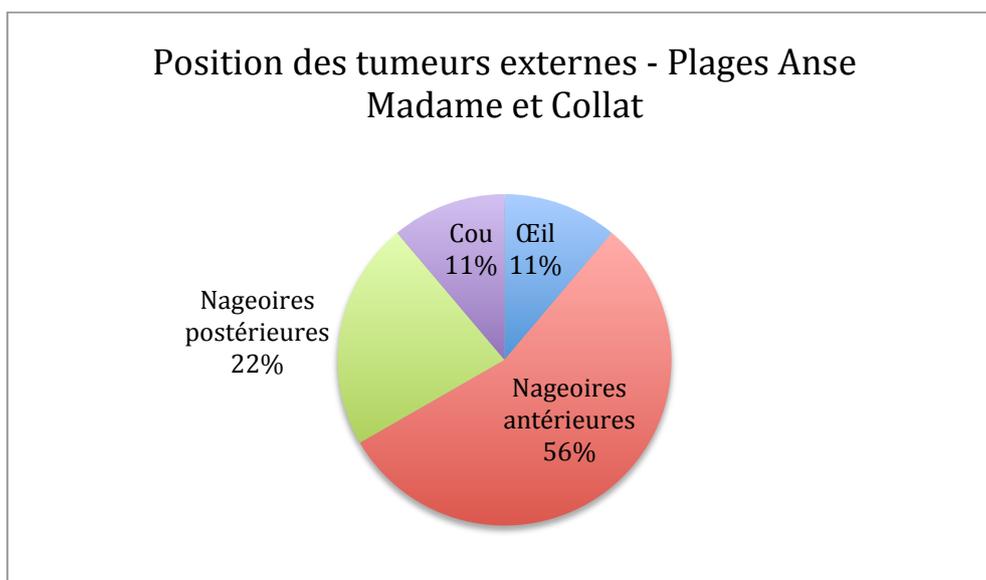


Figure 46 : Graphique présentant les localisations des tumeurs externes observées au cours de l'étude à Anse Madame Collat

D. Étude de la FP par photo identification en secteur sud Caraïbe

Le secteur sud Caraïbe est composé de quatre anses : Anse Dufour et Anse Noire, Grande Anse et le Bourg des Anses d'Arlets (Figure 47). Chacune des anses sont visitées à quatre reprises au cours de l'étude.

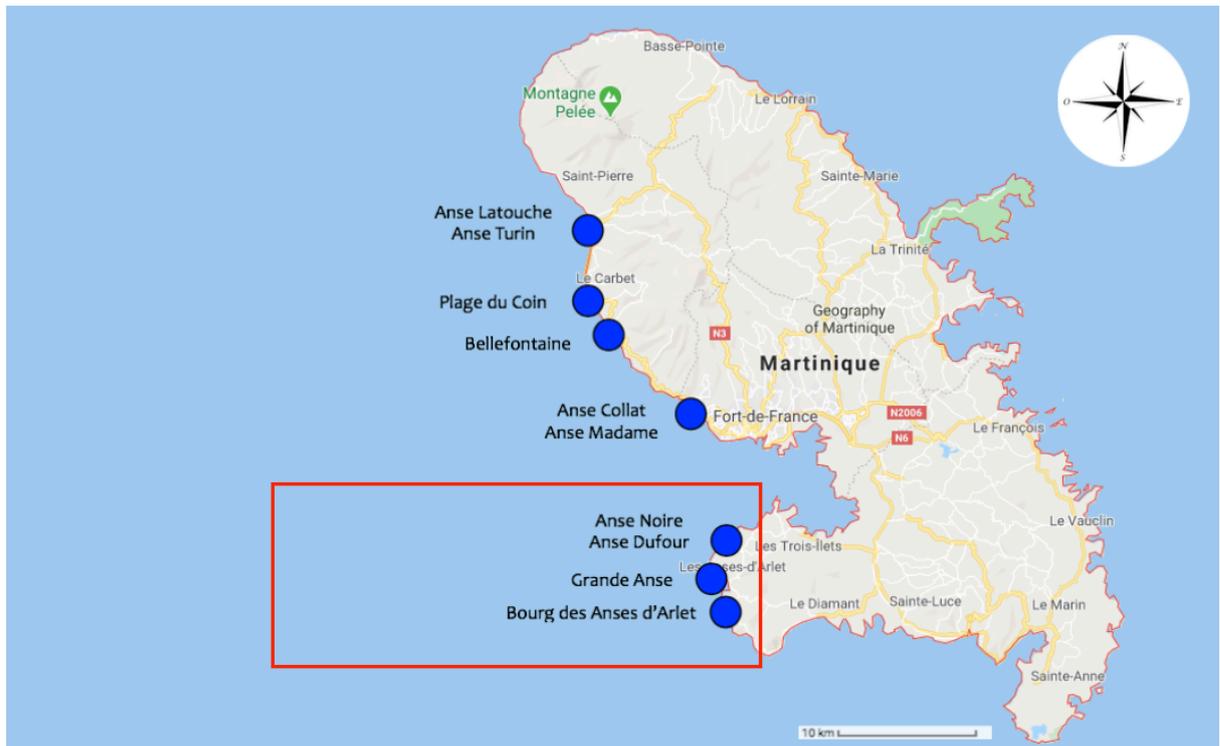


Figure 47 : Carte de la Martinique représentant le secteur sud Caraïbe

1. Estimation de la taille de la population

a. Anse Dufour et Noire

Anse Noire et Anse Dufour sont séparées par une étroite bande de terre rocheuse formée par une coulée de lave issue de l'ancien centre volcanique composé des Mornes Réduit et Yoyo (Figure 48). Ces deux sites représentent une aire de petite taille (Tableau 3). Des échanges d'individus sont constatés entre l'anse Dufour et l'Anse Noire au cours des quatre sorties. Aucun de ces individus n'est vu sur d'autres plages. Le logiciel Close-Test nous permet d'affirmer que la population de l'ensemble Anse Dufour-Noire est **fermée**.

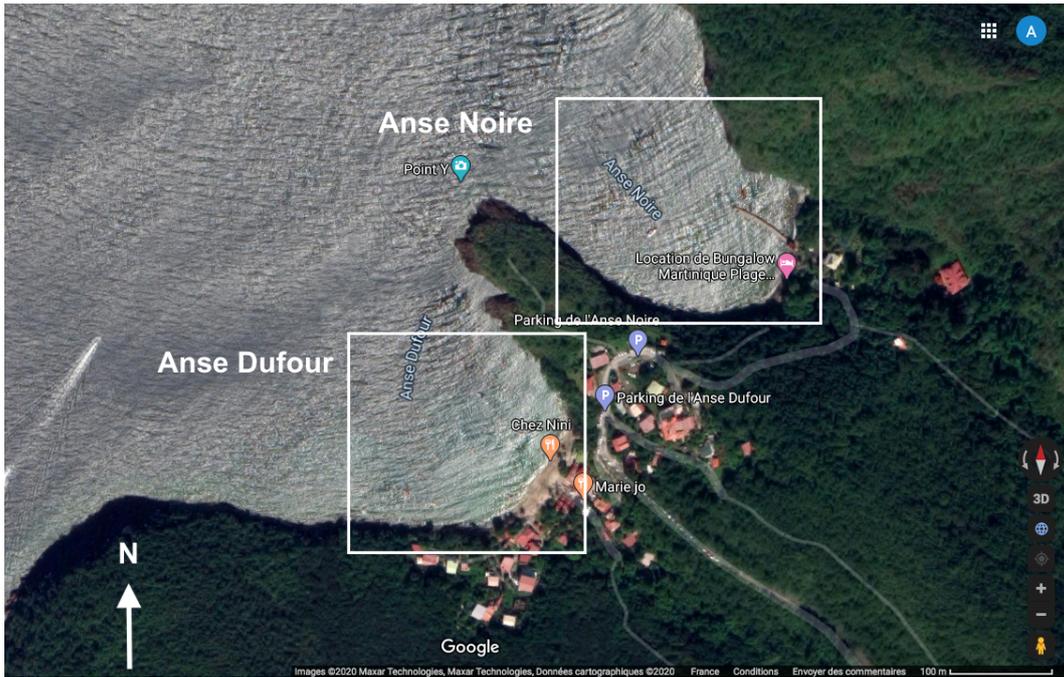


Figure 48 : Carte topographique du site Anse Dufour – Noire.

Plages encadrées en Blanc. Source : Google Maps 2020.

Sur la période d'étude, **20 tortues différentes** sont observées dont 2 non identifiées. Le nombre de recaptures n'augmente pas au cours du temps (Figure 49).

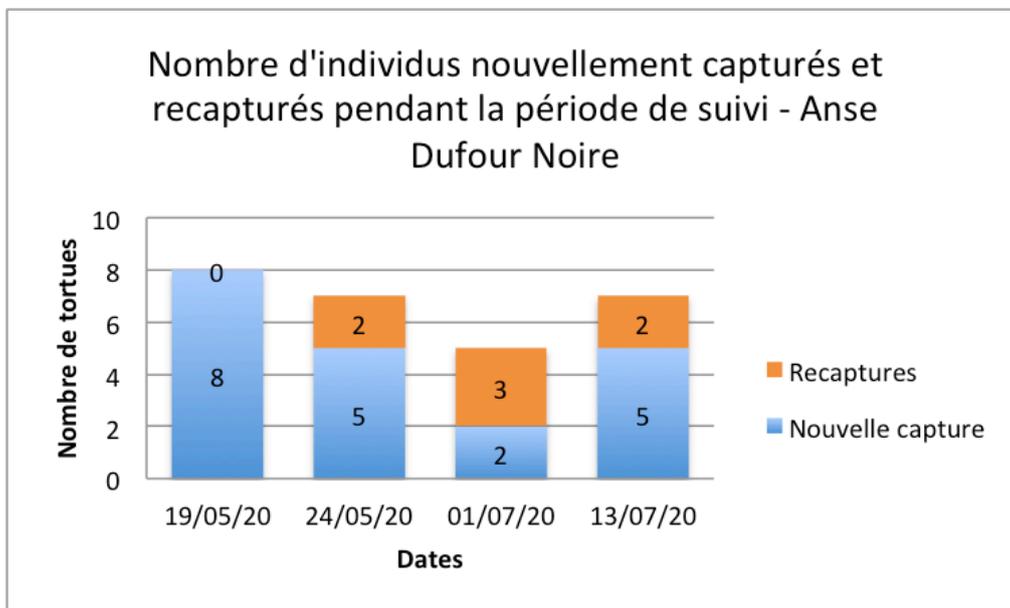


Figure 49 : Graphique CMR pour l'ensemble Anse Dufour Noire.

Graphique définissant le nombre d'individus nouvellement identifiés (bleu) et le nombre de recaptures au cours de l'étude (orange), comprenant également les tortues non photographiées et non identifiées.

La population de tortues vertes de l'ensemble Anse Dufour-Noire est estimée à **32 individus** [22- 45].

On observe une plus grande proportion de tortues de longueur de carapace supérieure à 80cm et une plus faible quantité de tortues de taille inférieure à 40cm que dans les secteurs nord et centre Caraïbe (Figure 50).

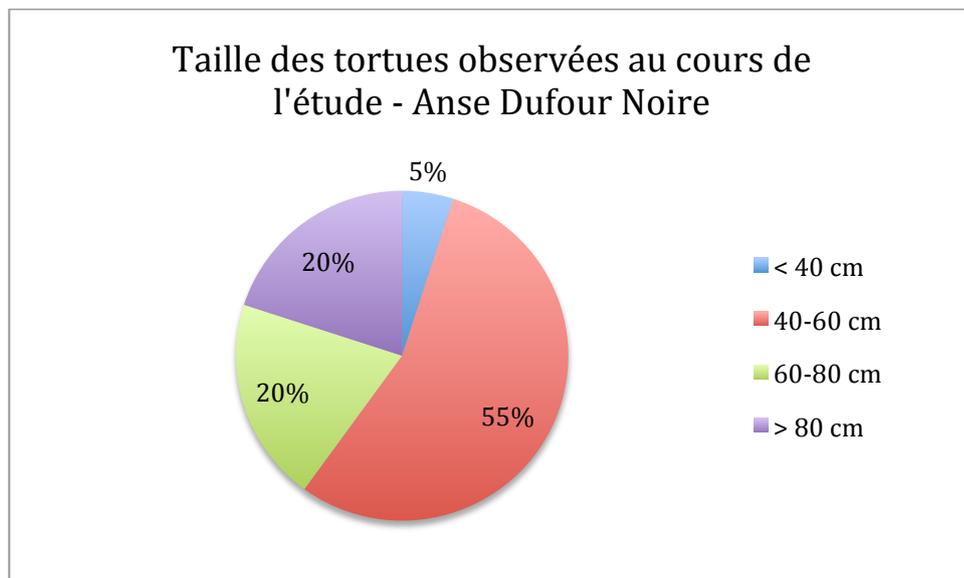


Figure 50 : Graphique représentant les différentes classes de taille de tortues observées à Anse Dufour Noire au cours de l'étude.

Graphique comprenant les tortues non identifiées ou photographiées). En bleu les tortues de taille de carapace < 40cm, en rouge entre 40-60 cm, en vert entre 60-80 cm, et en violet > 80 cm.

b. Grande Anse

La plage de Grande Anse est caractérisée par une grande aire (Tableau 3, Figure 51). Parcourir cette plage selon le protocole prend entre 5 et 6h. Le nombre de tortues rencontrées à chaque sortie est grand par rapport aux autres sites de l'étude. Seules trois sorties sont exploitées pour Grande Anse. En effet la dernière sortie compte de trop nombreuses photos floues et beaucoup de tortues vues ne sont pas identifiées correctement.

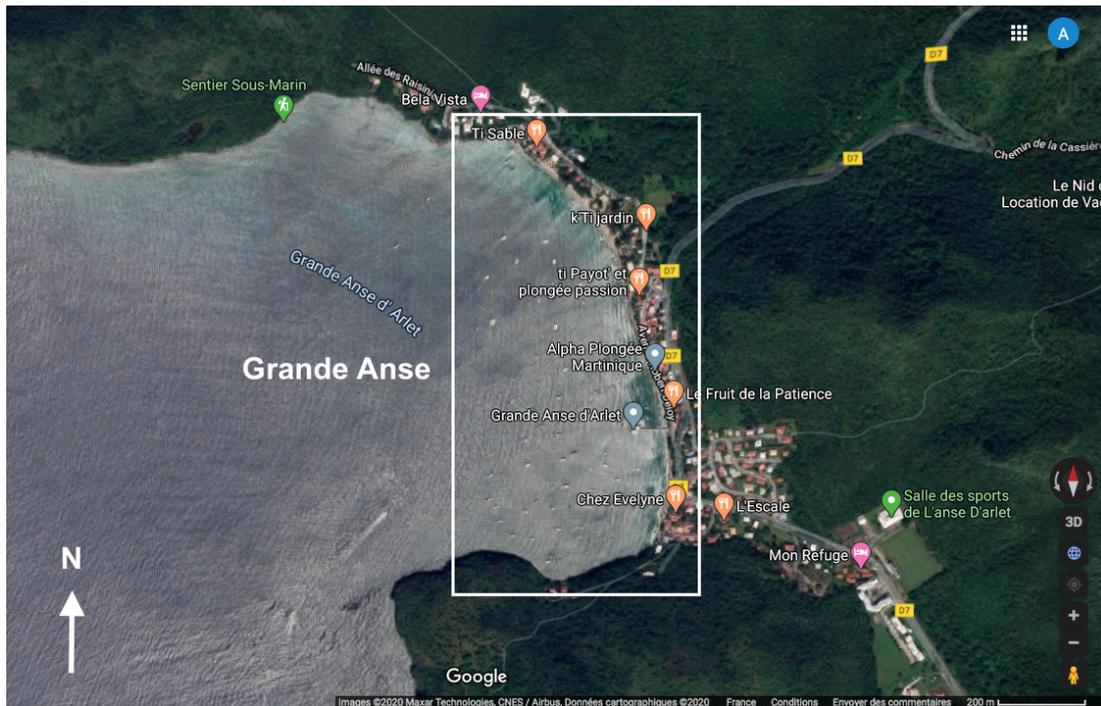


Figure 51 : Carte topographique de Grande Anse.

Plage encadrée en blanc. Source Google Maps 2020.

Les tortues identifiées à Grande Anse ne sont pas retrouvées sur d'autres sites, on considère donc que Grande Anse constitue une population à part entière. Au cours de la période de suivi, **65 individus** sont observés, dont 23 non identifiées. Les résultats de Close-Test montrent que la population est **fermée**. On constate une augmentation de recaptures au cours des sorties (Figure 52).

La population de tortues vertes de Grande Anse est estimée à **155 individus** [131-181].

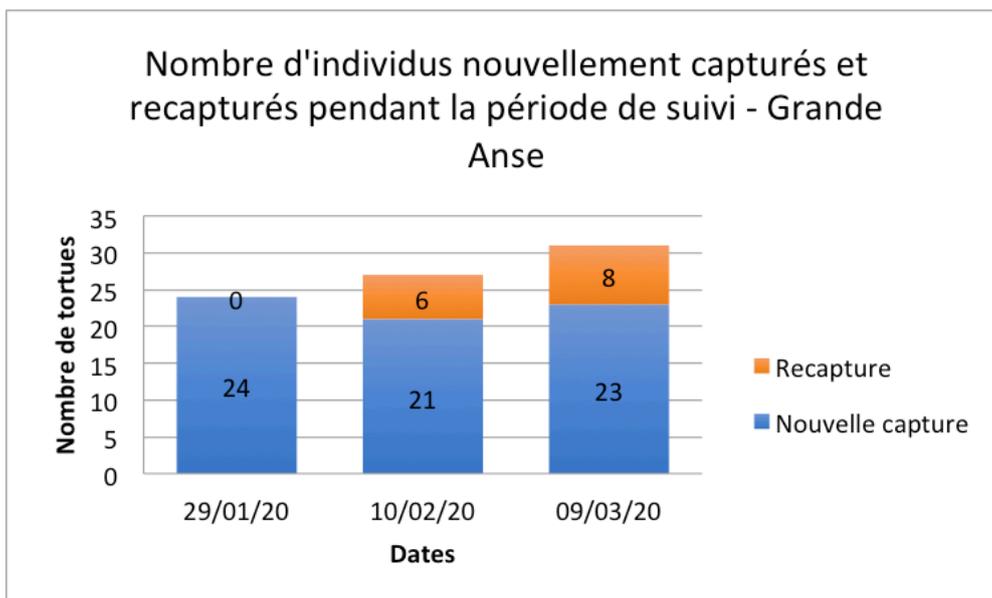


Figure 52 : Graphique CMR pour Grande Anse.

Graphique définissant le nombre d'individus nouvellement identifiés (bleu) et le nombre de recaptures (orange) au cours de l'étude (tortues non identifiées comprises).

Ici encore on note une présence importante de tortues de taille supérieure à 80 cm de longueur de carapace, comparé au secteur nord et centre Caraïbe (Figure 53). Au contraire le pourcentage de tortues de taille inférieure à 40 cm de longueur de carapace tend à diminuer.

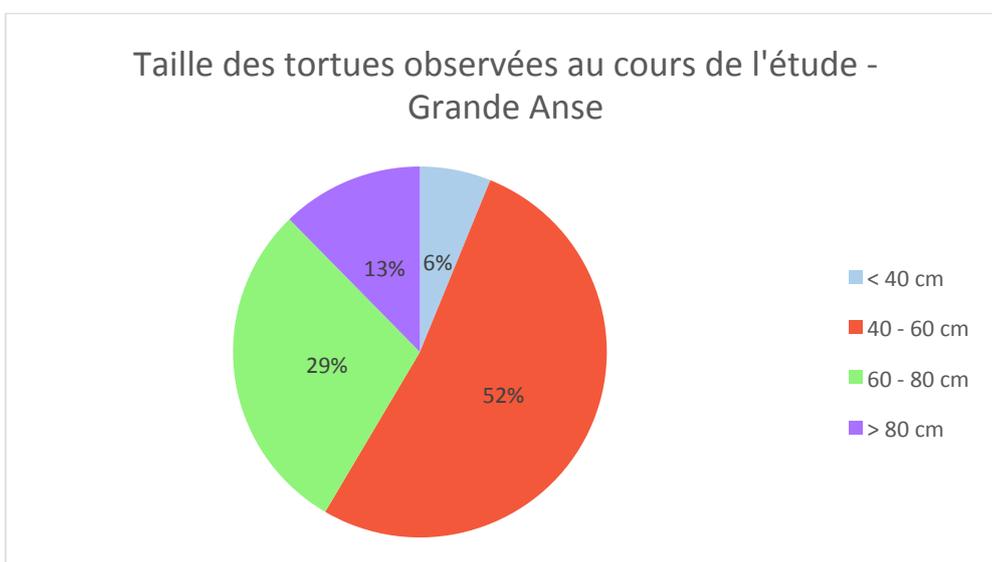


Figure 53 : Graphique représentant les différentes tailles de tortues présentes à Grande Anse au cours de l'étude.

Tortues non identifiées comprises. En bleu les tortues de taille de carapace < 40cm, en rouge entre 40-60 cm, en vert entre 60-80 cm, et en violet > 80 cm.

c. Bourg des Anses d'Arlets

La plage du Bourg des Anses d'Arlet est entourée par le village du même nom (Figure 54). C'est une zone très prisée par les touristes. Le logiciel Close-Test indique que la population de tortue de cette plage est **fermée**. Aucune tortue identifiée sur ce site n'est retrouvée ailleurs. Sur les 4 sorties réalisées, **67 tortues différentes** sont identifiées, dont 26 non identifiées.



Figure 54 : Carte topographique du Bourg des Anses d'Arlet.

Plage encadrée en blanc. Source : Google Maps 2020.

Le nombre de recaptures n'augmente pas au cours du temps (Figure 55). La population estimée de tortue du Bourg des Anses d'Arlet est de **132 individus** [111,157].

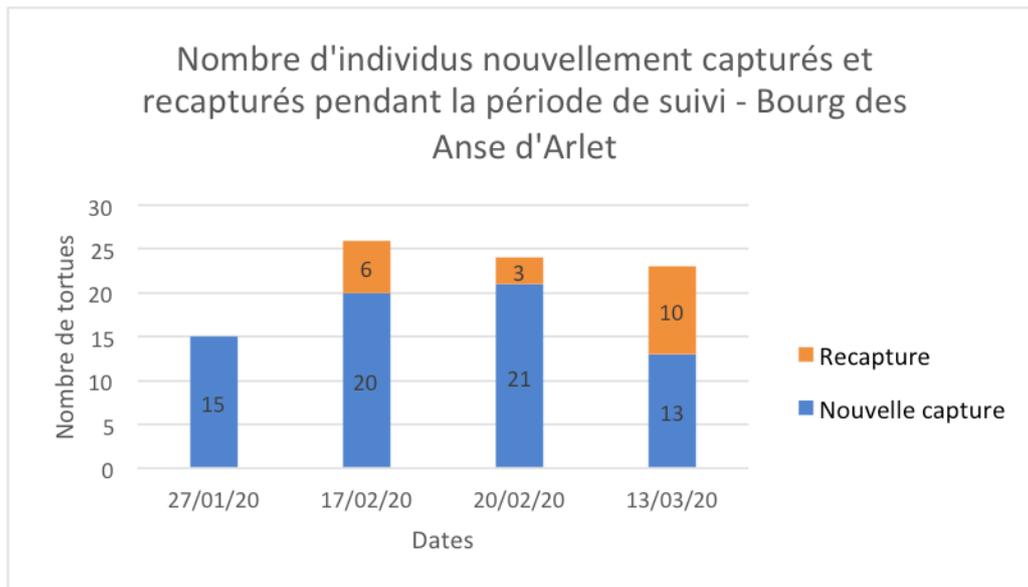


Figure 55 : Graphique CMR pour le bourg des Anses d'Arlet.

Graphique définissant le nombre d'individus nouvellement identifiés (bleu) et le nombre de recaptures (orange) au cours de la période d'étude, comprenant également els tortues non identifiées.

Comme précédemment, on observe une plus grande proportion de tortues comprises entre 60 cm et 80 cm de longueur de carapace (Figure 56). Le pourcentage de tortues inférieures à 40 cm de longueur reste faible.

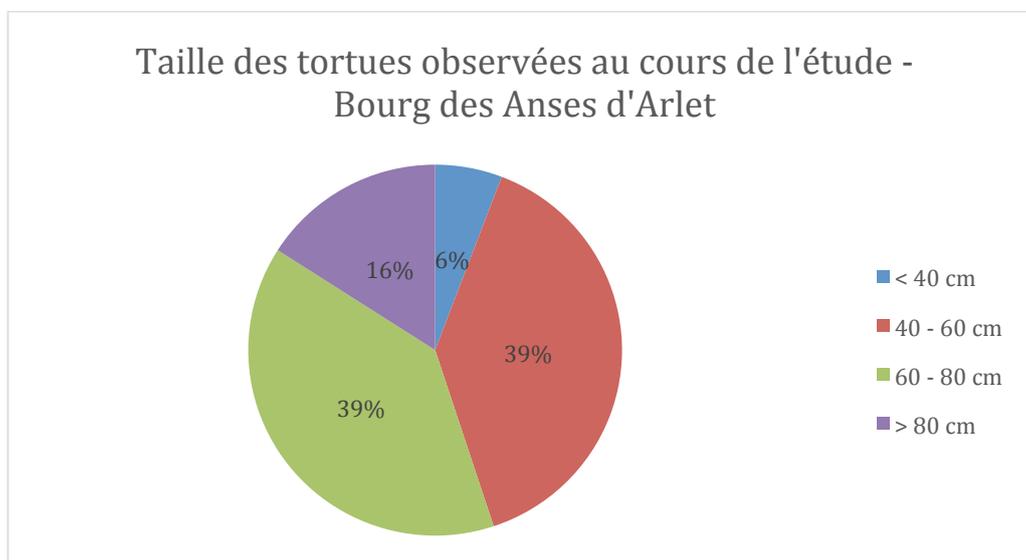


Figure 56 : Graphique représentant les différentes classes de taille de tortues présentes au Bourg des Anses d'Arlet au cours de l'étude.

Graphique comprenant également les tortues non identifiées). En bleu les tortues de taille de carapace < 40cm, en rouge entre 40-60 cm, en vert entre 60-80 cm, et en violet > 80 cm.

2. Prévalence de la FP

a. Anse Dufour - Noire et Grande Anse

Aucune tortue observée au cours des quatre sorties ne présente des signes de FP pour ces deux sites. La prévalence est donc considérée comme nulle au sein de ces deux populations de tortues vertes.

b. Bourg des Anses d'Arlets

Sur les 4 sorties cumulées réalisées au bourg des Anses d'Arlet, 67 tortues différentes sont vues dont 51 tortues avec des signes de FP externe. Étant donné que la population totale de cette plage est estimée à 132 tortues la prévalence de la maladie est la suivante :

$$\frac{132 \times 51}{67} = 100,47 \text{ soit une } \textit{prévalence de la maladie de 76\%}$$

3. Corrélation taille des tortues et gravité de la FP

Pour le Bourg des Anses d'Arlet, seule plage du secteur sud Caraïbe avec une prévalence non nulle de la FP, les tailles de tortues concernées par la présence de tumeurs externes sont comprises entre 40 et 80 cm (Figure 57). Les deux classes extrêmes ne sont pas concernées par la FP externe. Les tumeurs de tailles inférieures à 1 cm sont plus représentées que dans le secteur nord et centre.

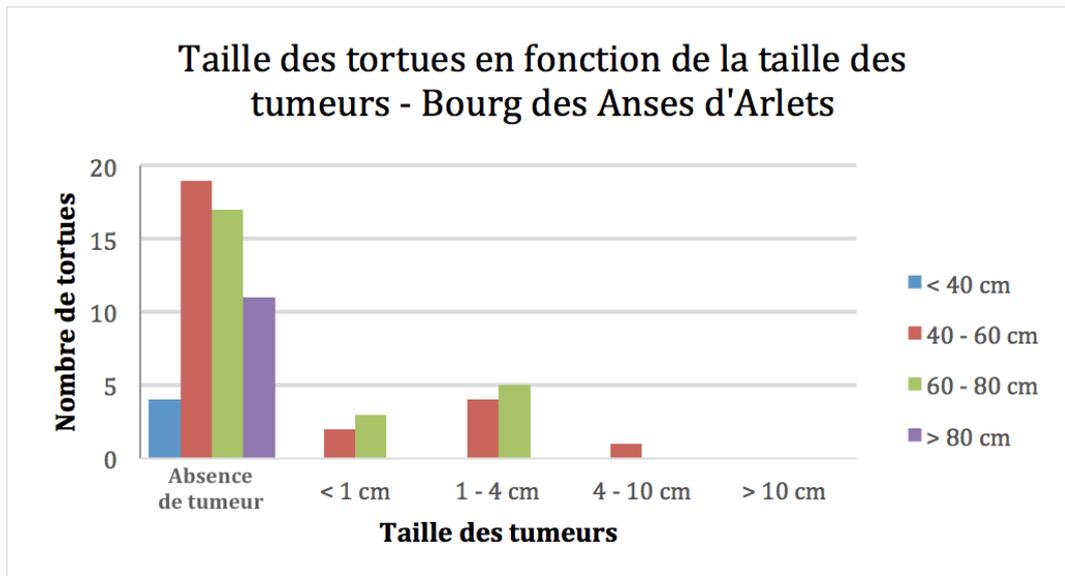


Figure 57 : Graphique présentant la taille des tortues en fonction de la taille des tumeurs au Bourg des Anses d'Arlet au cours de l'étude.

En bleu les tortues de taille de carapace < 40cm, en rouge entre 40-60 cm, en vert entre 60-80 cm, et en violet > 80 cm.

4. Localisation des tumeurs externes

Au Bourg des Anses d'Arlet, les tortues observées présentent des tumeurs localisées majoritairement au niveau des yeux (Figure 58). Le cou reste un endroit privilégié d'apparition de tumeur. Les nageoires postérieures sont les moins représentées.

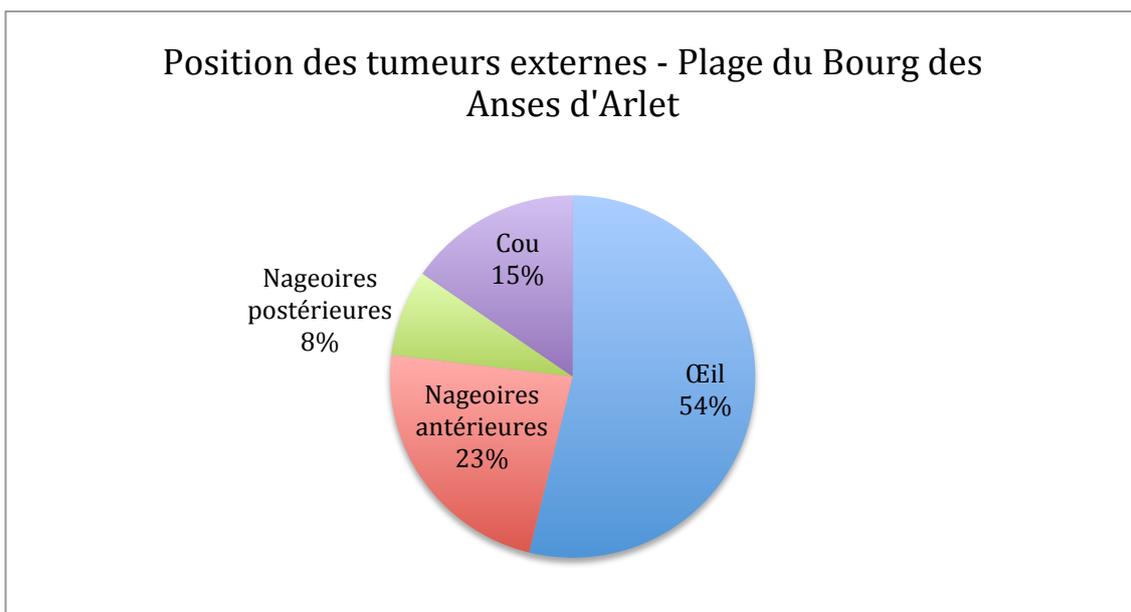


Figure 58 : Graphique présentant les différentes localisations de tumeurs externes observées au cours de l'étude au Bourg des Anses d'Arlets

E. Observation de régression, d'aggravation ou de nouvelle contamination

L'étude présente, menée en 2020, est comparée à celle de Liebart (2019) qui a permis d'établir un premier aperçu de la présence de FP au sein de la population de tortues vertes dans les eaux côtières de la Martinique. En comparant les observations des deux années (Tableau 12), effectuées entre mars et août, nous pouvons noter la présence éventuelle de régression de tumeurs, ou au contraire de nouvelles contaminations ou aggravations de la maladie sur les individus déjà identifiés en 2019. En 2019, bien que l'objectif n'était pas l'étude de la FP, un total de 18 tortues avec lésions a été observé contre 29 en 2020. Le taux de régression parmi les tortues atteintes de FP en 2019 et recapturées en 2020 est de 28%. On note également que 28% montrent des signes d'aggravation des lésions et 43% présentent une évolution stable de la maladie. L'incidence de la FP parmi les tortues saines en 2019 recapturées en 2020 est de 10%.

Tableau 12 : Evolutions observées concernant la FP entre 2019 et 2020

Nombre total de tortues recapturées en 2020 par rapport à 2019	47
Nombre de tortues atteintes de FP en 2019 recapturées en 2020	7
Nombre de nouvelles contaminations parmi les tortues recapturées	4
Nombre de régression parmi les tortues recapturées	2
Nombre d'aggravation parmi les tortues recapturées	2
Nombre d'évolution stable parmi les tortues recapturées	3

1. Régression de tumeurs

Par rapport à l'étude de 2019 (Liebart 2019), **deux tortues** présentent des signes notables de régression de la maladie : diminution de la taille et du nombre de tumeurs, aspect blanc et lisse des tumeurs. Un exemple marquant est illustré Figure 59, avec la tortue CM120_Aqua photographiée le 23/04/2019 à Anse Madame-Collat qui présente de multiples tumeurs de tailles allant jusqu'à plus de 10 cm. La photographie prise sur le même site le 06/03/2020 montre que plusieurs tumeurs ne sont plus visibles au niveau des yeux, et que la tumeur au niveau du cou a diminué en taille. Cette dernière présente un aspect lisse et une couleur homogène blanchâtre. On note que les deux régressions de tumeurs sont observées sur les plages du Bourg des Anses d'Arlet et à Anse Madame-Collat.

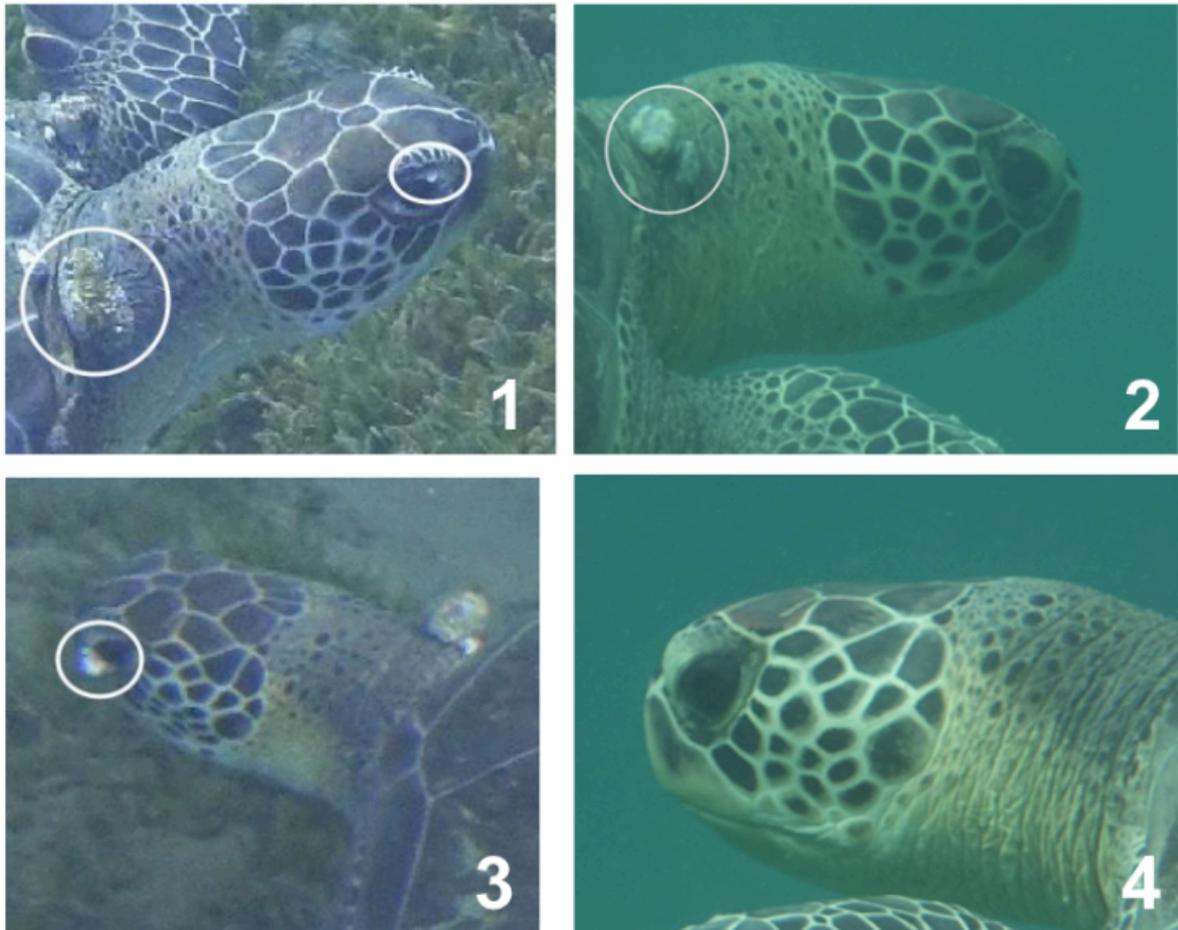


Figure 59 : Photographies présentant l'évolution de la FP chez la tortue CM120_Aqua entre 2019 et 2020

(1) photographie du 23/04/2019 du profil droit où l'on observe une tumeur oculaire de taille inférieure à 1 cm et une tumeur sur le cou de taille supérieure à 10 cm de diamètre d'aspect en « chou fleur » de couleur rosâtre blanchâtre (entourées en blanc) ; (2) photographie du 06/03/2020 du profil droit où l'on note la diminution de la taille de la tumeur du cou et un aspect lisse et blanc, ainsi que l'absence de tumeur oculaire ; (3) photographie du 23/04/2019 où l'on observe une tumeur oculaire bourgeonnante sur le profil gauche ; (4) photographie du 06/03/2019 du profil gauche sans tumeur visible. Sources : Aquasearch 2020.

2. Aggravations et nouvelles contaminations

Au contraire, des cas de nouvelles contaminations ou aggravations de la maladie sont observés entre 2019 et 2020 : **six tortues** présentent des signes nouveaux de tumeurs externes de FP par rapport à 2019. Des exemples sont visibles en Figure 60 avec les tortues CM152_Marguerite et CM142_Lucas : une tumeur oculaire de taille variable est apparue sur chacune d'entre elles entre 2019 et 2020. On note que toutes les nouvelles contaminations et aggravations de FP sont observées sur la plage du Bourg des Anses d'Arlet.

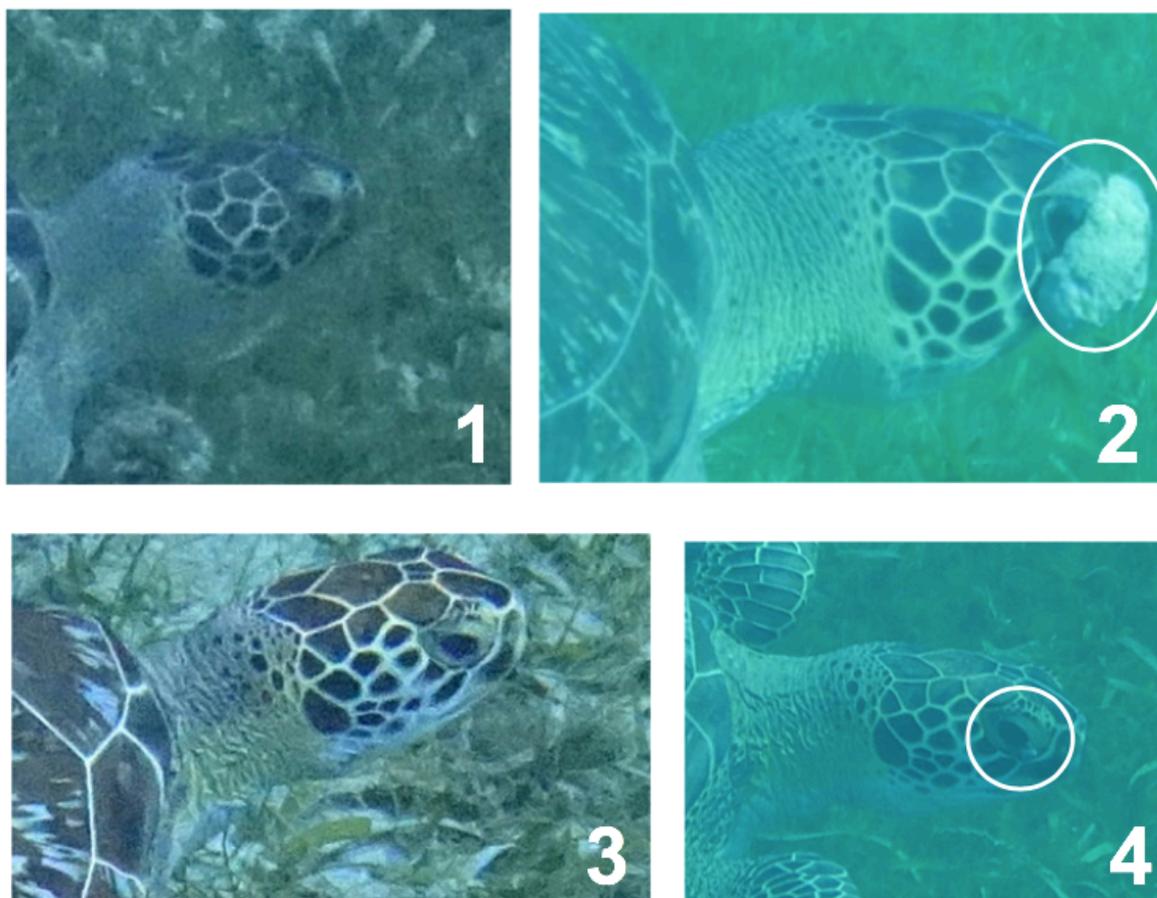


Figure 60 : Photographies illustrant les cas de nouvelles contaminations et aggravation de la FP par rapport à 2019

(1) photographie profil droit de CM152_Margerite datant du 13/05/2019 sans aucune tumeur visible au Bourg des Anses d'Arlet ; (2) photographie profil droit de CM152_Margerite datant du 13/03/2020 montrant une tumeur oculaire de taille supérieure à 10 cm au Bourg des Anses d'Arlet, dans le cercle blanc; (3) photographie profil droit de CM142_Lucas datant du 08/05/2019 sans aucune tumeur visible au Bourg des Anses d'Arlet ; (4) photographie profil droit de CM142_Lucas datant du 17/02/2020 montrant une tumeur oculaire d'environ 1 cm de diamètre, dans le cercle blanc. Sources : Aquasearch 2020.

F. Bilan : La FP chez les tortues vertes sur la côte Caraïbe de la Martinique

Au cours de l'étude, un total de **29 tortues** est vu avec des signes de FP externe parmi les 216 individus observés. Sur la Figure 61, on peut voir la prévalence de la FP sur chaque site de la côte Caraïbe de la Martinique. Pour la plage du coin et Anse Collat – Madame la prévalence de la maladie est d'environ 25%. En secteur sud Caraïbe, la plage du Bourg des Anses d'Arlet se démarque par une prévalence atteignant les 76%. Au contraire, les sites Anse Latouche – Turin, Anse Noire- Dufour et Grande Anse présentent une prévalence nulle de la FP. L'étude met en évidence un cas de régression contre un cas d'aggravation à Anse Madame-Collat, et 1 cas de régression contre 5 cas d'aggravation au Bourg des Anses d'Arlet (Figure 61).

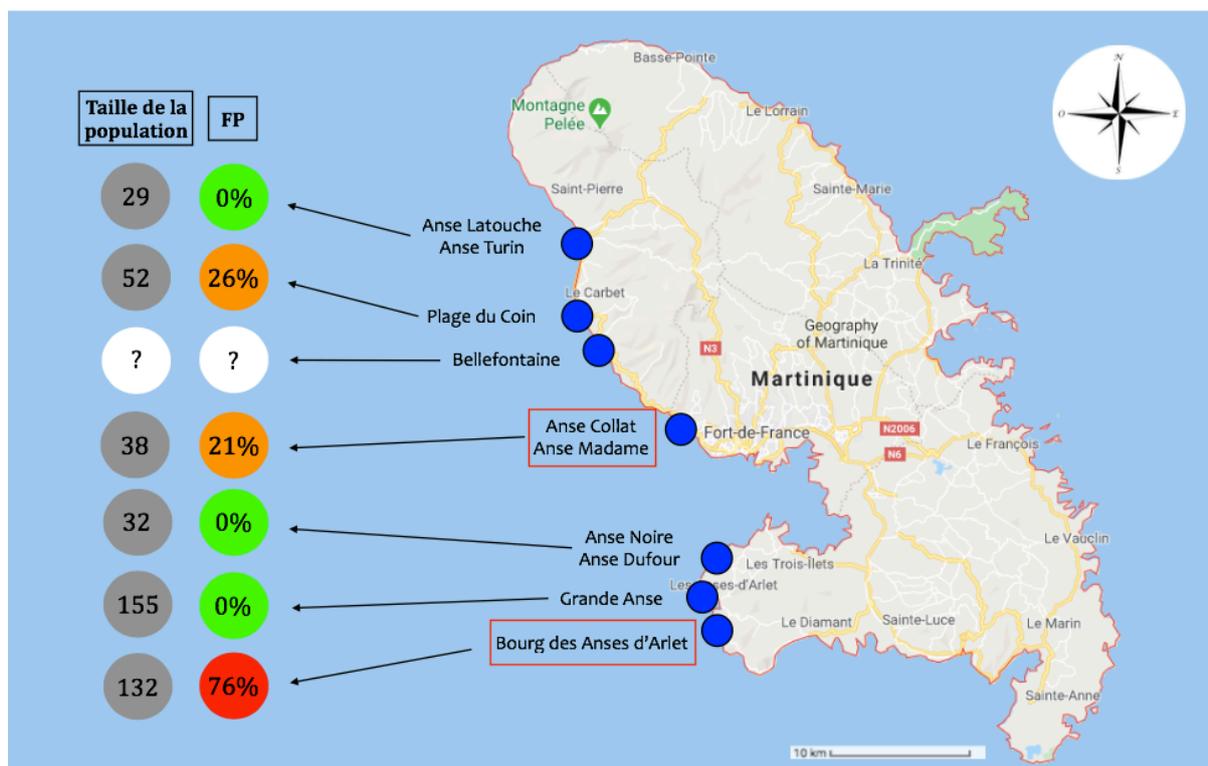


Figure 61 : Carte bilan de l'évaluation de la contamination des tortues vertes par la FP sur la côte Caraïbe.

En gris la taille de la population estimée pour chaque site, soit 29 [19-41] pour Anse Latouche Turin, 52 [39-70] pour la Plage du Coin, 38 [27,52] pour Anse Madame-Collat, 32 [22,45] pour Anse Dufour-Noire, 155 [131,181] pour Grande Anse et 132 [111,157] pour le Bourg des Anses d'Arlets. En vert les sites avec une prévalence nulle de FP, en orange les sites avec une prévalence inférieure à 50%, en rouge les sites avec une prévalence supérieure à 50%. L'absence de données exploitables pour Bellefontaine est symbolisée par un point d'interrogation. Les sites encadrés en rouge sont concernés par des cas de régression ou aggravation/nouvelle contamination.

On remarque que les populations de tortue du nord sont plus jeunes que les populations du sud. En effet les tortues de tailles supérieures à 80 cm sont absentes du site Anse Latouche – Turin et en faible proportion sur les plages du Carbet, Bellefontaine et Anse Madame-Collat. En secteur sud et notamment au Bourg des Anses d'Arlet la tendance semble s'inverser avec une prédominance des tailles de carapace comprises entre 60-80 cm et supérieure à 80 cm.

Les tailles de tortues les plus concernées par des lésions de FP externe sont comprises entre 40-80 cm. Très peu d'observations de FP ont été faite sur les tortues de taille inférieure à 40 cm et supérieure à 80 cm.

Enfin la localisation préférentielle des tumeurs semble être à l'avant du corps, au niveau du cou, des yeux et des nageoires antérieures.

G. Résultats des analyse PCR et séquençage ADN

1. Diagnostic de la FP à l'aide de la PCR

a. Effort d'échantillonnage

Un total de **17 échantillons** est testé par PCR nichée (Lu *et al.* 2000) comprenant huit échantillons issus de tumeurs, six échantillons de tissus sains de tortues présentant des tumeurs sur le corps, et trois échantillons de tissus sains de tortues visiblement saines. La récolte est faite aléatoirement en fonction des appels RETOM et de la disponibilité en carte FTA®. Ainsi certains échantillons datent de 2018 et d'autres de 2020 (Tableau 13).

b. Résultat PCR et migration sur gel

Les échantillons testés par PCR sont présentés dans le Tableau 13. Parmi les prélèvements de tumeur, les numéros 4, 5 et 6 sont issus d'un cadavre en état frais et 2, 8, 10, 12 et 14 de cadavres en décomposition avancée. Pour les échantillons de tissu sain sur tortues avec lésions de FP, seul l'échantillon 3 est issu d'un cadavre frais et 1, 7, 9, 11 et 13 de cadavres en décomposition avancée. Enfin, pour la catégorie des tissus sains de tortues visiblement saines, les trois échantillons 15, 16 et 17 viennent d'un cadavre frais ou en début de décomposition.

En l'absence de témoins positifs, un travail préliminaire nous amène à réaliser des PCR sur quelques lésions macroscopiquement très fortement évocatrices de FP et séquencer les produits de PCR afin de s'assurer que les séquences amplifiées appartiennent bien à un ChHV5. À partir de ces résultats, un témoin positif a pu être inclus pour les PCR suivantes.

À l'issue de la migration des produits de PCR, l'exposition aux rayons ultraviolets des gels permet d'identifier les échantillons positifs (Figure 62). Sur huit lésions de FP, deux sont positives à la PCR, les numéros 5 et 6. Sur six échantillons de tissus sains provenant de tortues avec lésions externes de FP, aucun n'est positif à la PCR. Enfin, sur trois échantillons de tissus sains issus de tortues sans lésions de FP externe, aucun n'est positif à la PCR

Tableau 13 : Récapitulatif des prélèvements effectués sur les tortues marines mortes dans le cadre du RETOM.

CM : *Chelonia mydas*, CC : *Caretta caretta*, L : longueur, 1 : largeur, TS : tissu sain, FP : tissu tumoral avec FP. En bleu tissu sain de tortue avec lésions externes de FP, en rouge tissu suspecté tumoral, en vert tissu sain de tortue sans lésions externes de FP.

Nom	Espèce	Taille (cm)	Cause de la mort	Stade de décomposition	Date	Lieux	Stade FP	Localisation des tumeurs	Prélèvements effectués sur FTA®
CM-20200326	CM	L : 82,5 l : 75,8	Indéterminée	Avancée	26/03/2020	Diamant	2	Nageoires antérieures, cou	TS : échantillon 1 FP : échantillon 2
CM-20200622	CM	L : 46 l : 41	Stade avancé de FP	Animal frais	22/06/2020	Carbet	3	Œil (?), épaule, région cloacale	TS : échantillon 3 FP œil : échantillon 4 FP épaule : échantillon 5 FP cloacale : échantillon 6
CM-20181024	CM	L : 50 l : 38	Prise dans un filet de pêche	Avancée	24/10/2018	Anse Latouche	3	Nageoires antérieures	TS : échantillon 7 FP : échantillon 8
CM-20200407	CM	L : 76 l : 67,8	Indéterminée	Avancée	07/04/2020	Diamant	?	?	TS : échantillon 9 FP : échantillon 10
CM01-20200721	CM	L : 87,5 l : 78,3	Indéterminée	Avancée	21/07/21	Vauclin	2	Cou et épaule	TS : échantillon 11 FP : échantillon 12
CC-20181029	CC	L : 70 l : 66,5	Indéterminée	Avancée	29/10/2018	Anse Grosse Roche	?	cou	TS : échantillon 13 FP : échantillon 14
CM1-20200124	CM	L : 29 l : 23,5	Prise dans un filet de pêche	Animal frais	24/01/2020	Le Marin	0	Aucun	TS : échantillon 15
CM2-20200124	CM	L : 34,5 l : 30,9	Prise dans un filet de pêche	Animal frais	24/01 /2020	Le Marin	0	Aucun	TS : échantillon 16
CM-20200527	CM	L : 32,4 l : 29	Indéterminée	Début	27/05/2020	Diamant	0	Aucun	TS : échantillon 17

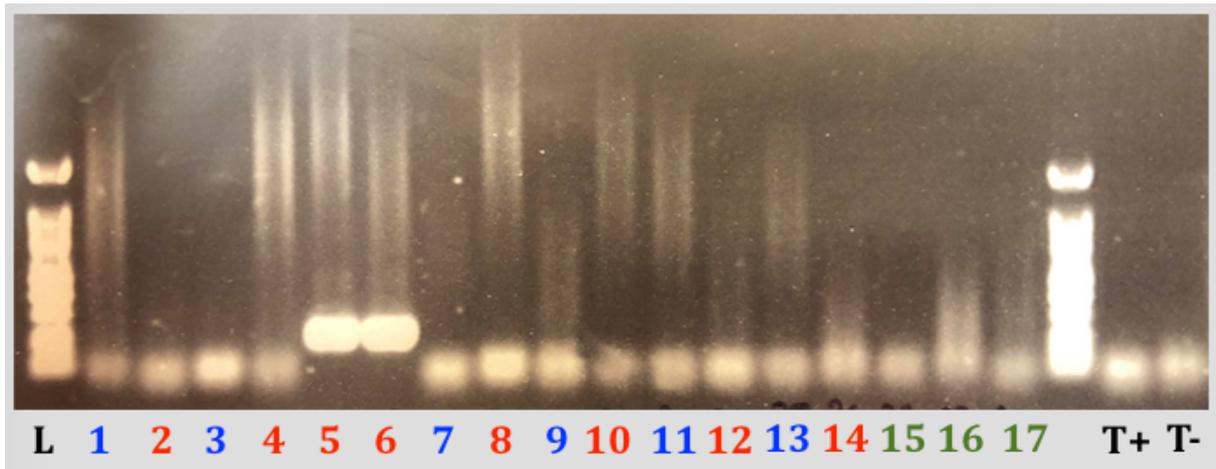


Figure 62 : Photographie du gel de migration des 17 échantillons testés par PCR nichée.

En rouge les prélèvements de lésions suspectées FP, en bleu les prélèvements de tissus sains de tortues avec lésions externes de FP, en vert les prélèvements de tissus sains de tortues sans lésions externes de FP. L : échelle 100 paires de base, T+ : témoin positif, T- : témoin négatif.

Malgré un défaut d'amplification du témoin positif, les bandes pour les échantillons 5 et 6 sont aux tailles attendues. Ces prélèvements sont issus respectivement d'une tumeur suspectée fibropapillomateuse au niveau de l'épaule et la région cloacale de la tortue verte observée le 22/06/2020 au Carbet (Figure 63). On note que la zone prélevée sur la même tortue en région oculaire (échantillon 4, Figure 64) ne montre pas un résultat similaire. Elle ne présente en effet pas l'aspect caractéristique d'une tumeur de FP, masse verruqueuse en forme de « chou-fleur ».



Figure 63 : Photographies des tumeurs prélevées chez la tortue CM2020622 au Carbet.

(1) tumeur cloacale (2) tumeur à l'épaule entourée en blanc. Source : Aquasearch 2020.



Figure 64 : Photographie de la zone de prélèvement oculaire de la tortue CM20200622.

Zone de prélèvement entourée en blanc. Source : Aquasearch 2020.

2. Séquençage partiel de l'ADN

La séquence ADN obtenue pour l'échantillon 5 est présentée en Figure 65. Pour rappel, l'échantillon 5 correspond à du tissu tumoral au niveau de l'épaule de la tortue verte prélevée le 22/06/2020 au Carbet (Tableau 4).

```
5'- GCGCATCGATGAACCGCACCGAGCGACCAACGCTTGCTTTGGACAAGCAGCAGCTGGCCATCAAG  
CTGACGTGCAATTCGGTTTACGGGTTTACGGCGTGGCCACCGGATTCTACCTTGTCTGGAGGTGG  
CGGCCACGGTCACCACCGTAGGGCGCGACATGCAT - 3'
```

Figure 65 : Séquence ADN de l'amplicon obtenu avec l'amorce GTHV-intF1 sur l'échantillon 5

La séquence nucléotidique obtenue est comparée à celles de la banque de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) grâce à l'outil Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) et identifiée comme séquences de Chelonid alphaherpesvirus 5, avec une identité de 95,48 % à 98,81% avec les séquences publiées les plus proches (Figure 66).

select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results			
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Chelonid alphaherpesvirus 5 strain C. MYDAS UN1 KIDNEY LESION BRASIL DNA polymerase UL30 gene, partial cds	302	302	98%	4e-78	98.81%	MH101749.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fibropapilloma-associated turtle herpesvirus isolate HV-10 DNA polymerase (pol) gene, partial cds	302	302	98%	4e-78	98.81%	KP724840.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fibropapilloma-associated turtle herpesvirus isolate HV-12 DNA polymerase (pol) gene, partial cds	302	302	98%	4e-78	98.81%	KP724836.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Hawaiian green turtle herpesvirus thymidine kinase (UL23), membrane-associated protein (UL24), minor capsid protein (UL25), capsid maturat	302	302	98%	4e-78	98.81%	AF035003.3
<input checked="" type="checkbox"/>	Chelonid herpesvirus 5, partial genome	302	302	98%	4e-78	98.81%	HQ878327.2
<input checked="" type="checkbox"/>	Chelonid herpesvirus 5 isolate 03210BA DNA polymerase gene, partial cds	302	302	98%	4e-78	98.81%	JN938588.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fibropapilloma-associated turtle herpesvirus DNA polymerase gene, partial cds	302	302	98%	4e-78	98.81%	AY395516.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fibropapilloma-associated turtle herpesvirus unique long region containing UL9-UL30 genes, genomic sequence	302	302	98%	4e-78	98.81%	AY644454.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fibropapilloma-associated turtle herpesvirus strain HA variant polymerase (UL30) gene, partial cds	302	302	98%	4e-78	98.81%	AY646893.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Fibropapilloma-associated turtle herpesvirus strain FL var A polymerase (UL30) gene, partial cds	302	302	98%	4e-78	98.81%	AY646888.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Green turtle herpesvirus polymerase gene, complete cds	302	302	98%	4e-78	98.81%	AF239684.2
<input checked="" type="checkbox"/>	Chelonid herpesvirus 5 DNA polymerase gene, partial cds	302	302	98%	4e-78	98.81%	AF299110.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Chelonid herpesvirus 5 DNA polymerase gene, partial cds	302	302	98%	4e-78	98.81%	AF299108.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Chelonid herpesvirus 5 DNA polymerase gene, partial cds	302	302	98%	4e-78	98.81%	AF299107.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Florida green turtle herpesvirus DNA polymerase (pol) gene, partial cds	302	302	98%	4e-78	98.81%	AF035004.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Chelonid alphaherpesvirus 5 DNA polymerase (UL30) gene, partial cds	296	296	98%	2e-76	98.21%	MN563740.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Chelonid alphaherpesvirus 5 strain DC1 DNA polymerase gene, partial cds	296	296	98%	2e-76	98.21%	MK357710.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Chelonid alphaherpesvirus 5 strain CM87092-93 DNA polymerase gene, partial cds	296	296	98%	2e-76	98.21%	MH144348.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Chelonid alphaherpesvirus 5 strain C. MYDAS FN1 FIBROPAPILOMA FERNANDO DE NORONHA-PE BRASIL DNA polymerase UL30 gene	296	296	98%	2e-76	98.21%	MH101748.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Chelonid alphaherpesvirus 5 strain C. MYDAS UBA64 FIBROPAPILOMA SAO PAULO BRASIL DNA polymerase UL30 gene, partial cds	296	296	98%	2e-76	98.21%	MH101744.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Chelonia mydas herpesvirus isolate UEL4 DNA polymerase gene, partial cds	296	296	98%	2e-76	98.21%	KU048042.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Chelonia mvdas herpesvirus isolate UEL2 DNA polymerase gene, partial cds	296	296	98%	2e-76	98.21%	KU048040.1

Figure 66 : Premiers résultats obtenu en comparaison à la séquence ADN partielle de l'échantillon 5 par BLAST.

Source : consulté le 12/08/20 à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>

Parmi les séquences les plus proches de la séquence de l'échantillon 5, on retrouve des séquences identifiées à Hawaï (Figure 67, Quackenbush *et al.* 1998), au Brésil (Figure 68) et en Floride (Figure 69).

On note également des similitudes de séquence à 98,06% avec un ChHV5 de tortue olivâtre, et des similitudes à 95,31% avec un ChHV5 de tortue Caouanne.

Hawaiian green turtle herpesvirus thymidine kinase (UL23), membrane-associated protein (UL24), minor capsid protein (UL25), capsid maturation protease (UL26), virion scaffolding protein (UL26.5), virion membrane glycoprotein B (gB), DNA cleavage/packaging protein (UL28), single-stranded DNA-binding protein (UL29), DNA polymerase catalytic subunit (pol), nuclear phosphoprotein (UL31), DNA cleavage/packaging (UL32), DNA cleavage/packaging protein (UL33), membrane-associated phosphoprotein (UL34), and basic phosphorylated capsid protein (UL35) genes, complete cds; and very large tegument protein (UL36) gene, partial cds

Sequence ID: [AF035003.3](#) Length: 22947 Number of Matches: 1

Range 1: 15928 to 16095 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
302 bits(157)	4e-78	166/168(99%)	2/168(1%)	Plus/Plus
Query 1		GCGCATCGATG--AACCGCACCGAGCGACCAACGCTTGCTTTTGGACAAGCAGCAGCTGG		58
Sbjct 15928		GCGCATCGATGAAAACCGCACCGAGCGACCAACGCTTGCTTTTGGACAAGCAGCAGCTGG		15987
Query 59		CCATCAAGCTGACGTGCAATTCCGTTTACGGGTTTACCGCGTGGCCACCGGATTCCCTAC		118
Sbjct 15988		CCATCAAGCTGACGTGCAATTCCGTTTACGGGTTTACCGCGTGGCCACCGGATTCCCTAC		16047
Query 119		CTTGCTGGAGGTGGCGGCCACGGTCACCAACCGTAGGGCGCGACATGC		166
Sbjct 16048		CTTGCTGGAGGTGGCGGCCACGGTCACCAACCGTAGGGCGCGACATGC		16095

Figure 67 : Alignement de la séquence ADN partielle de l'échantillon 5 avec une séquence ADN du ChHV5 à Hawaï.

Source : consulté le 12/08/20 à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>

Chelonid alphaherpesvirus 5 strain C. MYDAS UBA64 FIBROPAPILOMA SAO PAULO BRASIL DNA polymerase UL30 gene, partial cds

Sequence ID: [MH101744.1](#) Length: 457 Number of Matches: 1

[See 3 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 185 to 352 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
296 bits(154)	2e-76	165/168(98%)	2/168(1%)	Plus/Plus
Query 1	GCGCATCGATG--AACCGCACCGAGCGACCAACGCTTGCTTTTGGACAAGCAGCAGCTGG	58		
Sbjct 185	GCGCATCGATGAAAACCGCACCGAGCGACCAACGCTTGCTTTTGGACAAGCAGCAGCTGG	244		
Query 59	CCATCAAGCTGACGTGCAATTCCGTTTACGGGTTTACCGGCGTGGCCACCGGATTCCCTAC	118		
Sbjct 245	CCATCAAGCTGACGTGCAATTCCGTTTACGGGTTTACCGGCGTGGCCACCGGATTCCCTAC	304		
Query 119	CTTGTCTGGAGGTGGCGGCCACGGTCACCACCGTAGGGCGCGACATGC	166		
Sbjct 305	CTTGTCTGGAGGTGGCGGCCACGGTCACCACCGTAGGGCGCGACATGC	352		

Figure 68 : Alignement de la séquence ADN partielle de l'échantillon 5 avec une séquence ADN de ChHV5 du Brésil.

Source : consulté le 12/08/20 à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>

Florida green turtle herpesvirus DNA polymerase (pol) gene, partial cds

Sequence ID: [AF035004.1](#) Length: 483 Number of Matches: 1

[See 2 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 197 to 364 [GenBank](#) [Graphics](#)

[Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
302 bits(157)	4e-78	166/168(99%)	2/168(1%)	Plus/Plus
Query 1	GCGCATCGATG--AACCGCACCGAGCGACCAACGCTTGCTTTTGGACAAGCAGCAGCTGG	58		
Sbjct 197	GCGCATCGATGAAAACCGCACCGAGCGACCAACGCTTGCTTTTGGACAAGCAGCAGCTGG	256		
Query 59	CCATCAAGCTGACGTGCAATTCCGTTTACGGGTTTACCGGCGTGGCCACCGGATTCCCTAC	118		
Sbjct 257	CCATCAAGCTGACGTGCAATTCCGTTTACGGGTTTACCGGCGTGGCCACCGGATTCCCTAC	316		
Query 119	CTTGTCTGGAGGTGGCGGCCACGGTCACCACCGTAGGGCGCGACATGC	166		
Sbjct 317	CTTGTCTGGAGGTGGCGGCCACGGTCACCACCGTAGGGCGCGACATGC	364		

Figure 69 : Alignement de la séquence partielle ADN de l'échantillon 5 avec une séquence ADN du ChHV5 en Floride.

Source : consulté le 12/08/20 à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION

A. Discussion sur l'étude menée

1. Méthodologie

a. *Photo-identification comme méthode d'évaluation de la prévalence de la FP*

La présente étude s'intéresse à définir une estimation globale de la prévalence de la FP sur l'ensemble de l'île après avoir estimé l'abondance de la population de tortue verte. Le choix des sites a été défini pour couvrir au mieux l'ensemble du littoral susceptible de constituer un site d'alimentation, augmentant ainsi les chances d'observer un échantillon le plus représentatif possible de la population de tortues vertes (Reisser 2013, Siegwalt *et al.* 2019). Les premières observations de Liebart en 2019 permettent de supprimer certaines plages de l'étude par l'absence totale d'observation de tortues, avec notamment les sites de l'extrême nord de la Martinique et l'extrême sud. Une superficie totale de 1,6 km² répartie sur des anses présentes le long de la côte a ainsi été parcourue à quatre reprises pour cette thèse. Cependant ce travail ne s'intéresse qu'à la côte caraïbe et aucune information sur les populations de tortues vertes de la côte Atlantique n'est à ce jour connue en raison des conditions environnementales souvent complexes (présence de sargasses, courants, façades rocheuses) (DEAL Martinique 2018, Larade & Pinel-Féréol 2019). L'estimation fournie n'est donc représentative que de la façade Caraïbe mais ne permet pas une estimation fiable pour l'ensemble de la Martinique. La prise de données sur le terrain a été dépendante des conditions météorologiques et donc aléatoire. Les sorties entre deux sites ont été espacées de quelques jours à plusieurs semaines. La crise sanitaire a également imposé un arrêt des sorties de photo-identification pendant deux mois en plein cœur de la période prévue d'échantillonnage, étalée sur cinq mois de mars à juillet 2020. Ces variations de temps entre deux captures sur une période d'étude relativement courte (six mois) peuvent entraîner un biais, qui semble cependant négligeable (Lindeman 1990).

La méthode de CMR présentée dans l'étude par photo-identification est de plus en plus utilisée dans les suivis de populations de la faune marine (Schofield *et al.* 2008, Jean *et al.* 2010, Urian *et al.* 2014, Bertulli *et al.* 2015). Elle permet de s'affranchir de manipulations physiques stressantes pour la tortue tout en assurant un comptage et une différenciation des individus sur une grande surface (Bjorndal *et al.* 2000, Mancini *et al.* 2015).

Chez les tortues marines, la stabilité des écailles faciales, même au cours de la croissance de l'individu, a montré sa fiabilité dans l'application de cette méthode CMR (Carpentier *et al.* 2016). Son utilisation a été démontrée dans le cadre d'études sur différentes espèces : Tortue caouanne (Schofield *et al.* 2008), Tortue imbriquée et Tortue verte (Jean *et al.* 2010). Le logiciel de traitement de donnée I3S Pattern (Interactive Individual Identification System – Pattern version 4.0) qui complète la méthode a également prouvé son efficacité pour l'identification des tortues imbriquées et tortues vertes (Dunbar *et al.* 2014, Baeza *et al.* 2015, Calmanovici *et al.* 2018). Les photos peuvent être analysées sous divers angles et avec des contrastes variables (Baeza *et al.* 2015), mais certains facteurs environnementaux comme la densité en particules sédimentaires ou la luminosité peuvent rendre l'analyse impossible (Dunbar *et al.* 2014). De plus, comme il a été observé à Bellefontaine, les comportements de fuites montrent les limites de cette méthode lorsque la prise de photo est impossible. La visualisation et la caractérisation des tumeurs externes à partir de photographies impliquent que le plongeur doit observer la tortue sous tous les angles pour éviter les faux négatifs et doit obtenir une qualité photographique suffisante pour le traitement de données (taille, nombre et aspect des tumeurs externes). Enfin, la photo-identification ne permet pas la mise en évidence des tumeurs internes, entraînant un biais dans l'évaluation de la prévalence de la maladie. Le choix des modèles d'estimation de l'abondance de la population dans le but d'obtenir une prévalence de la FP s'est effectué en s'inspirant du travail de Liebart 2019, qui rappelle l'intérêt de l'utilisation du logiciel Close-Test et des modèles fermés de Schnabel et Schumacher-Eschmeyer (Mendonça *et al.* 1982, Bjørndal *et al.* 2000, Brooks 2005, Giraudou 2015).

Aucune étude scientifique publiée jusqu'alors n'a déjà utilisé la méthode de photo-identification pour caractériser la prévalence de la FP sur les populations sauvages de tortues marines dans leur habitat naturel. La plupart des études établissent la prévalence de la FP visuellement sur une population de tortues retrouvées échouées ou capturées accidentellement (Shaver *et al.* 2019) ou à partir de PCR réalisées avec des tissus tumoraux collectés sur les tortues atteintes par la maladie et capturées pour l'occasion (Ene *et al.* 2005, Greenblatt *et al.* 2005, Monezi *et al.* 2016, Ariel *et al.* 2017). Notre travail montre que la photo-identification est une méthode non-invasive très intéressante pour l'estimation de la prévalence de la FP dans les populations de tortues marines.

b. PCR à partir de cartes FTA®

Pour des raisons précédemment évoquées, les prélèvements de lésions de FP n'ont pas pu être faites sur des tortues libres et l'effort d'échantillonnage pour les prélèvements destinés à la PCR s'est porté sur les animaux gérés par le RETOM sur une période relativement courte. Par ailleurs, le fait de travailler à partir de cadavres a eu un impact probable sur la qualité de conservation des tissus avant dépôt sur carte FTA. Néanmoins nous avons obtenu une grande diversité d'échantillons provenant de sites répartis le long de la côte Caraïbes et de deux tortues de la côte Atlantique. Sur les neuf tortues prélevées, une tortue avec lésions externes de FP et trois tortues saines étaient dans un état frais et les autres dans un état de décomposition avancée. Bien que les alphaherpesvirus soient résistants (Roden *et al.* 1997, Yuhan *et al.* 2005), un état de décomposition avancé, l'exposition au sel marin et au soleil, le tout dans des températures tropicales pourrait expliquer l'altération de l'ADN du virus. Ce phénomène pourrait justifier le peu de résultats positifs en PCR obtenus à partir des tissus tumoraux de FP.

La réalisation d'une campagne de captures sur le site du Bourg des Anses d'Arlet est en projet pour compléter la présente étude. L'objectif est de capturer sur une journée les tortues rencontrées au court de transect, puis de les placer sur un bateau afin de les examiner, relever diverses informations et prélever des échantillons pour les PCR, le tout réalisé par une équipe préalablement formée à la manipulation des tortues et à leur bien-être. Cela permettra de récolter des échantillons frais et de tester directement les tortues identifiées comme contaminées par la FP par photo-identification. L'entreprise sera répétée dans un site situé au nord afin de diversifier les observations et d'obtenir éventuellement des séquences d'ADN virale qui pourront être comparées avec celles du sud au Bourg des Anses d'Arlet.

Les cartes FTA® (Flinders Technology Associates) ont prouvé leur efficacité dans la conservation et la détection de différent virus à ADN et ARN par PCR (Perozo *et al.* 2006, Purvis *et al.* 2006, Abdelwhab *et al.* 2011, Sakai *et al.* 2014, Cardona-Ospina *et al.* 2019). Cette technologie consiste en un papier filtre imprégné d'un mélange chimique breveté contenant des dénaturants chimiques et un capteur de radicaux libres. Le mélange chimique lyse les cellules et les organites, empêche la prolifération des bactéries et dénature les protéines. L'ADN est capturé dans la matrice et reste étroitement lié pendant que les protéines et les inhibiteurs sont lavés. Cela maintient l'ADN stable pendant le stockage à long terme à température ambiante (GE Healthcare, 2019). Cette méthode est intéressante pour plusieurs

applications, y compris la recherche sur la génétique bactérienne, car l'ADN peut être maintenu à température ambiante (Reeve *et al.* 2018). Récemment, les cartes FTA® ont été proposées comme alternative aux milieux liquides dans le dépistage du cancer du col de l'utérus pour la détection du VPH (Dong *et al.* 2017), et l'amélioration de la biosécurité a été citée comme un avantage dans le stockage et le transport d'échantillons contenant le virus de la grippe aviaire (Kraus *et al.* 2011). Dans notre étude, les cartes FTA® se sont révélées être de précieux outils, permettant ainsi la conservation et le transport aisé de matériel génétique.

Il existe plusieurs protocoles PCR utilisés comme méthode de détection du ChHV5. Alfaro-Nuñez (2014) parle dans son étude de l'utilisation de trois PCR simplex indépendantes comme de la méthode la plus sensible comparée à l'utilisation de PCR nichées précédemment décrites (Lu *et al.* 2000, Lu *et al.* 2003). Cette association de trois PCR simplex permet de détecter le virus CHV5 même à de très faibles quantités. Néanmoins, les tests effectués au cours de l'étude sur les échantillons prélevés en Martinique ne se sont pas révélés concluants. Quackenbush *et al.* (2001) utilisent également la PCR quantitative pour détecter le virus dans des tissus tumoraux ou sains issus de différentes zones géographiques. La PCR nichée reste la méthode la plus souvent utilisée dans la détection du virus ChHV5, d'où son choix d'application ici (VanDevanter *et al.* 1996, Quackenbush 1998, Lu *et al.* 2000, Lu *et al.* 2003, Page-Karjian *et al.* 2012, Chaves *et al.* 2017).

Dans notre étude, l'absence de témoin positif fonctionnel rend l'interprétation des résultats délicate. Un résultat négatif à la PCR pour un échantillon issu d'une lésion reconnue comme tumorale peut être dû à la dégradation de l'ADN suite à une mauvaise conservation du cadavre (état de décomposition avancé de la plupart des tortues prélevées, Tableau 13). Seule la tortue CM20200622 concernée par des lésions de FP était dans un état frais. Pour les échantillons de tissus sains prélevés sur une tortue avec tumeur externe (échantillons 1, 3, 7, 9, 11 et 13) un résultat négatif peut s'expliquer par l'absence du virus dans ces tissus. Le virus ne serait donc pas circulant dans l'organisme mais concentré au niveau des tumeurs, ou circulant dans l'organisme à une concentration trop faible pour être détectée par PCR. Pour les tissus sains prélevés sur une tortue sans lésions de FP externe (échantillons 15, 16 et 17), le résultat négatif peut s'expliquer par l'absence de contamination par la FP, l'absence de portage asymptomatique du virus ou une concentration de virus trop faible pour être détectée par PCR. Des erreurs sur l'identification visuelle d'une tumeur de FP sont également à prendre en compte en cas de résultat négatif à la PCR.

Le manque de temps n'a pas permis de réaliser une nouvelle extraction et une nouvelle PCR sur les 17 échantillons. La campagne de capture sur des animaux libres prévue permettra également d'améliorer ces points.

2. Paramètre pouvant influencer la prévalence et la gravité de la FP en Martinique

a. Qualité de l'eau

La persistance de polluants organiques aurait un impact négatif sur la santé des tortues marines et favoriserait le développement de la FP, bien que la corrélation entre concentrations de polluants et prévalence de FP ne soit pas linéaire (Keller *et al.* 2014). La FP est apparemment plus fréquente chez les tortues marines étudiées dans les aires d'alimentation côtières, zones souvent fortement affectées par les activités humaines (Aguirre et Lutz 2004, Ene *et al.* 2005, Chaloupka *et al.* 2009). Plusieurs polluants peuvent produire une suppression immunitaire et / ou avoir des effets cancérigènes, voire permettre une infection latente par le ChHV5, conduisant au développement de FP (Balazs 1991, Herbst et Klein, 1995). Une étude menée par Aguirre *et al.* (1994) suggère que des composés tels que les pesticides organochlorés, les biphényles polychlorés, les organophosphorés et les carbamates peuvent avoir des effets délétères sur les processus pathologiques, y compris la FP chez les tortues vertes. Da Silva *et al.* (2015) soutiennent également l'idée que la contamination par les métaux, en particulier par le cuivre, le fer et le plomb, peut jouer un rôle dans le développement de la FP chez les tortues de mer vertes à travers la génération de stress oxydatifs. Les études s'accordent pour dire que la pollution chimique peut activer des virus latents ou augmenter indirectement leur virulence (Aguirre *et al.* 1994), ainsi qu'induire une suppression immunitaire (Herbst et Klein 1995). Plus récemment, la forte prévalence de FP dans les environnements soumis à un impact humain a suggéré que certains facteurs associés à cette condition pourraient favoriser l'émergence de la maladie en augmentant la transmission du virus et / ou l'expression de la maladie par l'effet de substances qui modulent le système immunitaire et favorisent la formation de tumeurs (Patrício *et al.* 2012, Van Houtan *et al.* 2014, Work *et al.* 2014).

Le rapport sur la qualité de l'eau de baignade en mer de Martinique, fourni par l'Agence régionale de santé (ARS) et le Ministère chargé de la santé, montre des variations dans son statut en fonction de la localisation géographique (Figure 70).

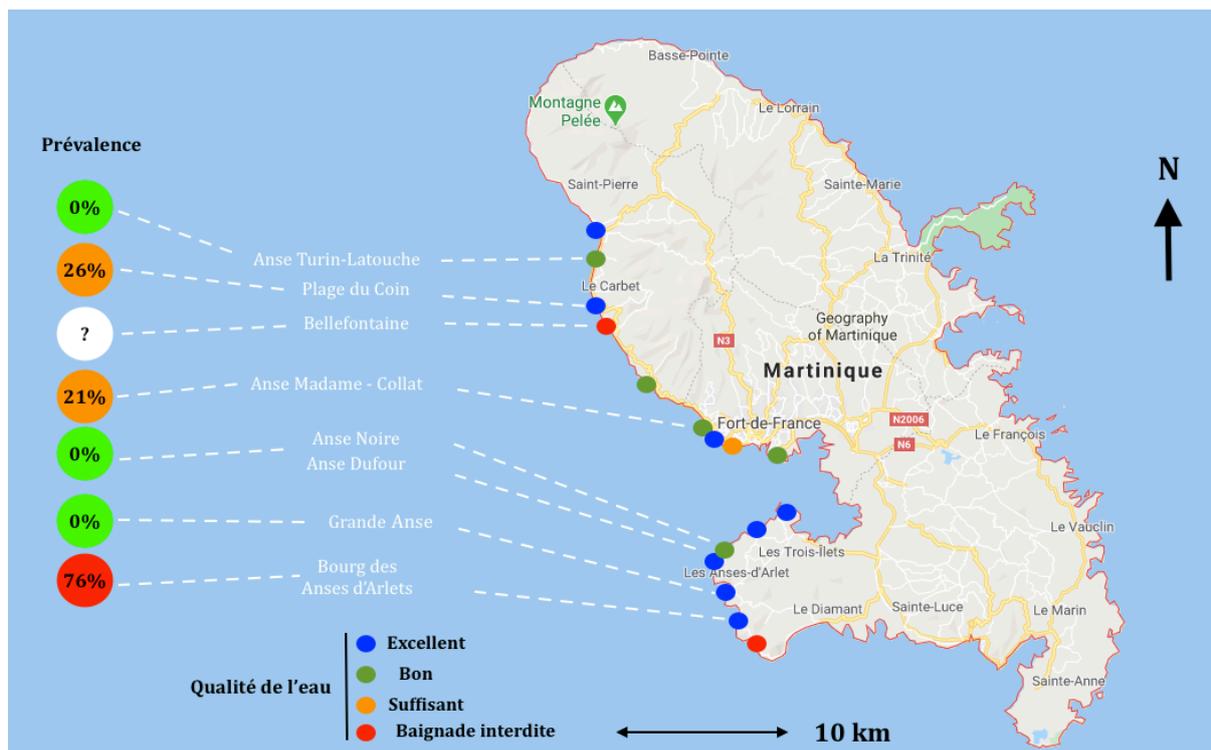


Figure 70 : Carte représentant la qualité des eaux de baignade en mer en Martinique au cours de la période d'étude en 2020.

Pour la prévalence de la FP par site : en vert les prévalences nulles, en orange les prévalences inférieures à 50%, en rouge les prévalences supérieures à 50%. Pour la qualité de l'eau : en bleu une qualité d'eau excellente, en vert une bonne qualité, en orange une qualité suffisante, en rouge une interdiction de baignade. Sources : ARS Martinique <https://www.martinique.ars.sante.fr/> et Ministère chargé de la santé 2020 <https://baignades.sante.gouv.fr/> consulté le 01/09/2020

La qualité de l'eau semble être corrélée avec l'observation de FP sur les différents sites étudiés. En effet, les sites les plus touchés par la FP sont la plage du Coin, Bellefontaine, Anse Madame Collat et le bourg des Anses d'Arlet et sont tous concernés par une plus ou moins grande dégradation du statut sanitaire de l'eau de mer. L'interdiction de baignade prononcée à Bellefontaine est liée à la présence de structures d'évacuation d'eaux usées vétustes depuis plusieurs années et leur rupture récente (ARS Martinique 2020). Les eaux usées sont ainsi directement déversées dans la baie de Bellefontaine. Pour chacun des sites, divers paramètres pouvant expliquer la dégradation de la qualité de l'eau sont à prendre en compte. Pour le bourg des Anses d'Arlet (Figure 71), le rejet des eaux usées issues de la station d'épuration, les polluants transportés par les cours d'eau se déversant dans la baie après de fortes pluies et les bateaux au mouillage sont des éléments qui pourraient expliquer la plus forte prévalence observée de FP. D'autres sites comme la plage du Coin au Carbet sont concernés par les polluants déversés dans la baie et issus des plantations de bananes ou de cannes à sucre dans les hauteurs de la baie (chlordécone, pesticides ; Multigner *et al.* 2016). Proche de la baie de Bellefontaine, la centrale thermique EDF (Figure 35) présente également

un risque de pollution maritime par d'éventuels rejets d'eau contaminée par du fioul ou autre matière combustible.

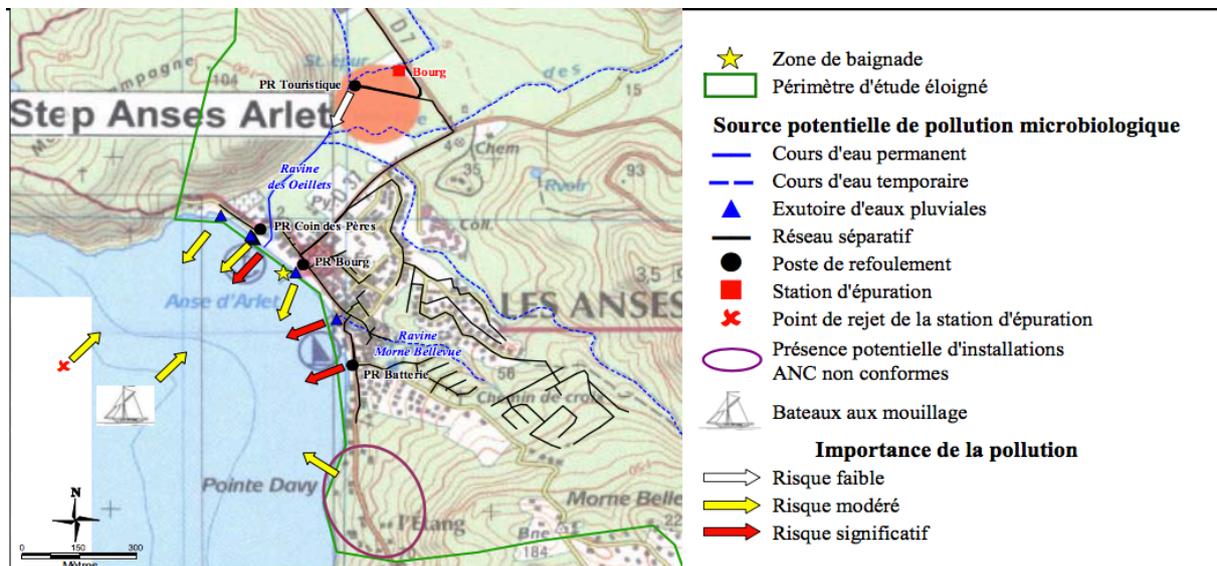


Figure 71 : Schéma du bourg des Anses d'Arlet présentant les sources potentielles de pollution de l'eau de mer.

Sources : ARS Martinique 2012 <https://www.martinique.ars.sante.fr/> consulté le 01/09/2020

L'écoulement récurrent des eaux usées et le ruissellement des eaux de pluie, associés à la croissance de l'urbanisation et de l'exploitation des alentours de la plage, provoquent une eutrophisation du milieu côtier, comme décrit Van Houtan *et al.* (2010 et 2014) à Hawaï. L'azote est un facteur limitant pour la croissance des plantes et des macro-algues. En milieu eutrophisé, où il est particulièrement abondant, les algues séquestrent préférentiellement l'azote sous forme d'arginine. À Hawaï, une algue invasive, *Hypnea musciformis* (rodophyte), séquestre des taux d'azote nettement supérieurs à ceux des autres espèces. Les études en laboratoire montrent que les infections herpétiques requièrent de l'arginine, qui est un composant des glycoprotéines présentes sur l'enveloppe externe des virus herpès (Alfaro-Nunez 2014). Ces glycoprotéines facilitent l'entrée du virus dans le noyau des cellules hôtes (Hibbard et Sandri-Goldin 1995, Klyachkin et Geraghty 2008). L'analyse des prélèvements de tissus de tortues vertes fibropapillomateuses d'Hawaï montre que les tumeurs sont notablement enrichies en glycine, proline et arginine, et appauvries en lysine (Van Houtan *et al.* 2014).

D'autres traces de pollution sont plus facilement visibles à l'œil nu, avec par exemple de nombreux déchets retrouvés au fond des baies (bouteilles en verre, cannettes métalliques,

sachets plastiques, ustensiles divers, textiles, vélos, caddies, moteurs), ou encore des restes abandonnés de matériel de pêche avec lesquels la faune marine peut se noyer (Figure 72).



Figure 72 : Photographies illustrant la pollution macroscopique rencontrée sur les sites étudiés.

(1) épave de moteur volumineux observé au cours d'une sortie à la plage du Coin le 25/06/2020. Une tortue verte s'en sert comme d'un socle pour se reposer. (2) tortue juvénile retrouvée morte au cours d'une sortie à Anse Latouche –Turin le 10/07/2020, prise dans un hameçon abandonné dans l'eau. Sources : Aquasearch 2020.

b. Pression anthropique

La Martinique est connue pour sa faune marine et le tourisme de l'île gravite autour de différentes activités en lien avec son observation, avec notamment le « Turtle-whatching ». Malgré la réglementation qui interdit l'approche de la faune sauvage, nombreuses sont les infractions (Figure 73). En haute saison, le comportement de fuite chez les tortues marines est engendré principalement par la présence de nageurs à moins de 3m de la tortue (Safi *et al.* 2018). À cela s'ajoute les nuisances sonores liées aux activités nautiques, avec l'augmentation de la circulation de bateaux (opérateurs touristiques, plaisance, déplacements en annexe des bateaux en mouillage forain). Ces deux éléments sont source de dérangement des animaux et donc de stress. Ils peuvent être des facteurs d'affaiblissement du système immunitaire favorisant l'expression et/ou la transmission de la maladie (Sposato *et al.* 2002). On observe également la multiplication des déchets plastiques et de polluants générés par les activités touristiques, commerces et restaurants de plus en plus nombreux sur les plages.



Figure 73 : Photographie illustrant la pression exercée par les touristes sur les tortues marines à Anse Dufour.

Source : Aquasearch 2018.

3. Régression spontanée de la FP

Peu de situations de régression de tumeurs sont décrites dans la littérature. Guimarães *et al.* (2013) présente deux cas de régression de la fibropapillomatose chez des spécimens de tortues marines juvéniles sur une population de 131 tortues capturées au Sud du Brésil. Le mécanisme à l'origine de la régression reste inconnu, mais pourrait être lié à l'élimination d'agent favorisant la maladie. Il a ainsi été montré que la cyanobactérie *Lyngbya majuscula* est un promoteur tumoral potentiel. Cette bactérie est associée aux habitats d'alimentation des tortues marines, en particulier *Chelonia mydas*, l'espèce la plus touchée par la maladie (Arthur *et al.* 2008). De même, il est possible que l'amélioration des conditions environnementales générales favorise la régression de la maladie (qualité de l'eau, baisse de la pression anthropique).

Dans notre étude les deux tortues concernées par la régression des lésions ont des tailles de carapaces comprises entre 60-80 cm, et Guimarães *et al.* (2013) illustre le même phénomène sur des tortues autour de 40cm de longueur de carapace. Il semble donc que la régression puisse survenir à ces deux stades de développement.

Il serait intéressant de compléter cette étude par un suivi sur plusieurs années afin de continuer d'observer d'éventuelles régressions ou aggravations de lésions en Martinique. Une

analyse histologique des tumeurs permettrait également d'affiner les caractéristiques d'une tumeur en croissance ou en régression. L'étude et la compréhension de la cinétique de ces phénomènes seraient des éléments intéressants à étudier.

4. Phylogénie et transmission inter-espèces

À ce jour, les études phylogénétiques du ChHV5 se sont concentrées sur des suites restreintes et souvent non chevauchantes d'un gène ou de petits sous-ensembles de gènes (Ene *et al.* 2005, Greenblatt *et al.* 2005), aboutissant à une image limitée de la variation génétique du virus parmi les populations mondiales. Néanmoins, de telles études ont montré que des différences de séquences existent entre les régions océanographiques. Les patrons phylogéographiques de ChHV5 reflètent généralement les mouvements de l'hôte tortue de mer (Herbst *et al.* 2004, Ene *et al.* 2005, Patrício *et al.* 2012, Ariel *et al.* 2017), suggérant que le ChHV5 a subi une co-évolution spécifique à une région avec des tortues de mer hôtes (Jones *et al.* 2016). En 2012, le premier génome complet de ChHV5 a été obtenu à partir d'une tumeur de la glotte d'une tortue verte hawaïenne (Ackermann *et al.* 2012). Dans notre étude, la séquence amplifiée est très conservée parmi les ChHV5 et sa courte taille ne permet pas une analyse phylogénétique fine. Il serait intéressant de compléter l'étude avec l'obtention de séquences plus grandes et appartenant à des régions plus variables du génome, voire d'obtenir un génome complet de virus rencontrés chez les tortues marines des eaux côtières de Martinique ; ceci afin de mettre en évidence les éventuels liens avec les virus retrouvés à Hawaï et au Brésil. L'objectif serait de comprendre l'origine de la contamination en Martinique, et savoir s'il existe un génotype particulier de la FP dans les Antilles.

Le cycle biologique complexe des tortues de mer est susceptible d'avoir des implications importantes sur la distribution régionale des souches de ChHV5 (Patrício *et al.* 2012). Après avoir passé les premières années dans des environnements océaniques, les juvéniles forment des agrégations d'individus provenant de plusieurs colonies de nidification et même de différentes espèces dans les habitats côtiers d'alimentation (Bowen et Karl 2007). Les adultes effectuent souvent des migrations sur de longues distances (des centaines à des milliers de kilomètres) vers les zones d'accouplement et les plages de nidification (Bowen et Karl 2007). Les analyses phylogéographiques impliquant des tortues de mer vertes ont confirmé qu'il y a suffisamment d'échanges entre les bassins océaniques pour empêcher l'isolement à long terme et la spéciation allopathique (Roberts, Schwartz et Karl 2004, Bourjea *et al.* 2007). Ainsi, la

Tortue Luth tolère les eaux froides et a une distribution s'étendant des tropiques au cercle polaire arctique, et ne montre aucune ségrégation géographique entre les océans Atlantique, Pacifique et Indien (Bowen et Karl 2007). D'autres espèces plus tempérées, telles que les Tortues caouannes, les Tortues Ridley et les Tortues imbriquées, sont connues pour se rassembler dans les aires d'alimentation. Il a été noté que les regroupements entre espèces au Brésil peuvent créer des opportunités de transmission inter-espèces et de co-infection par des souches virales divergentes chez différentes espèces de tortues marines ((Bowen et Karl 2007). Bien que la transmission interspécifique soit inhabituelle pour la plupart des alphaherpesvirus (Davison 2000), elle a été documentée pour le ChHV5 dans des régions où plusieurs espèces de tortues marines coexistent (Herbst *et al.* 2004, Ene *et al.* 2005, Patrício *et al.* 2012). Dans de tels scénarios, la recombinaison entre des souches divergentes peut donner naissance à de nouveaux variants dont la virulence peut différer. De cette manière, même les virus à évolution lente, comme le ChHV5 (Herbst *et al.* 2004, Morrison *et al.* 2018), peuvent se diversifier rapidement.

B. Implication en termes de conservation, actions à venir

a. Gestion et protection de l'environnement direct des tortues marines

L'évaluation de la contamination par la FP de la population de Tortue verte dans les eaux côtières de la Martinique et l'identification des facteurs prédisposant permet de mettre en lumière les points sur lesquels agir pour limiter l'impact du virus. En effet, il apparaît que la qualité de l'eau et de l'environnement direct des tortues marines joue un rôle non négligeable dans le développement de la maladie. D'après nos observations et les relevés de l'ARS, la gestion des eaux contaminées issues des stations d'épurations, des cultures et des villes n'est pas satisfaisante, et pourrait expliquer en partie la prévalence de la FP dans les zones comme Anse Madame-Collat, Plage du Coin, Bellefontaine ou encore le Bourg des Anses d'Arlet. Les contrôles réguliers de la qualité de l'eau semblent essentiels (température, teneur en azote, teneur en bactéries, fongicides, pesticides), ainsi qu'une identification précise des points sensibles et responsables de la détérioration de la qualité de l'eau. La réparation des installations défectueuses et le traitement des eaux contaminées avant rejet à la mer doivent être considérés.

De plus la création d'espaces supplémentaires protégés sur les sites d'alimentation en mer, mis en évidence par Liebart (2019), et sur les plages semble être essentiel pour limiter la pression anthropique. L'interdiction ou le contrôle des mouillages de plaisance, de pêche, et d'activité touristique dans ces zones pourraient garantir la tranquillité de la faune marine et sa préservation. La limitation de l'urbanisation des plages et la gestion des déchets (pêche, emballages plastique ou métalliques, encombrants, textiles) macroscopiques doit également être au centre de la démarche de préservation de la faune marine. Des opérations de nettoyages plus réguliers des fonds marins et des plages semblent nécessaires, étant donné la quantité de déchets observés notamment sur les sites de la plage du Coin au Carbet, Anse Madame-Collat et Bellefontaine. La limitation de nuisances sonore et lumineuses à proximité des sites d'alimentation (et de ponte) pourrait également être envisagée.

b. Sensibilisation de la population

La sensibilisation de la population est un élément essentiel à prendre en compte dans la démarche de préservation de la faune marine. Le Réseau Tortue Marine Martinique et les acteurs du Plan National d'Action (PNA) se chargent de la communication auprès du public en organisant des campagnes de sensibilisations sur les plages en caravane itinérante (<https://www.tortuesmarinesmartinique.org/> consulté le 03/09/2020). Il semble nécessaire d'insister, dans le cas précis de la FP, sur l'importance de la propreté des plages et sites d'alimentation et sur la nécessité de limiter les activités touristiques nuisibles à la tranquillité des tortues marines (nuisances sonores, lumineuses, densité trop grande de bateaux ou de personnes dans l'eau, interdiction d'approcher à plus de 3m). La mise en place de panneaux de sensibilisation à ce sujet a été observée durant la période d'étude sur la plage d'Anse Dufour. Leur généralisation sur toutes les plages semble pertinente. Des explications supplémentaires sur l'impact de la pression anthropique sur le développement de la FP pourraient être ajoutées. Des sanctions pourraient être appliquées si les mesures ne sont pas respectées par les usagers de la plage. Le public visé doit être varié : écoles, touristes, pêcheurs, habitants locaux. La création en Martinique d'un musée ou centre dédié à ces problématiques permettrait de fédérer l'ensemble des acteurs de la protection des tortues marines dans un lieu pédagogique et attractif. Le centre pourrait également héberger et promouvoir la recherche sur la conservation des tortues marines, comme le fait le centre Kélonia présent à l'île de la Réunion.

c. Le rôle du vétérinaire

En Martinique, l'OFB (Office Français de la Biodiversité), les vétérinaires locaux ainsi que l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) sont mobilisés pour assurer les soins et relâcher les animaux sur place. Cependant, le nombre de tortues marines nécessitant des soins depuis 2018 est très faible, la plupart des tortues échouées étant mortes ou agonisantes. Néanmoins, l'absence d'un centre de Soins et d'un réseau de vétérinaires organisés pose problème en cas de tortues blessées ou atteinte par la FP en Martinique (Plan National d'Action en faveur des tortues marines des Antilles Françaises 2018-2027). Certains vétérinaires acceptent toutefois de pratiquer des soins à titre gracieux. Il serait important d'impliquer davantage les vétérinaires et d'organiser un maillage sur les territoires en cas de besoin de soins et à ce titre une formation a été organisée auprès de la profession récemment. La création d'un centre de soins, éventuellement couplé à un musée et un centre de recherche, serait un puissant outil en termes de conservation. En effet les enjeux concernent la survie d'une espèce protégée et la préservation du milieu marin. Le projet pourrait permettre d'enrayer l'installation et l'éventuelle propagation de la maladie par sa gestion dans les zones de plus forte prévalence. L'expertise vétérinaire permettrait de ne pas laisser dépérir/mourir des animaux protégés et observés par un large public sensible à leur conservation et participerait à l'amélioration des connaissances concernant l'aspect clinique de la FP, les causes de sa transmission, l'expression du virus, et les possibilités de traitement.

CONCLUSION

Cette étude permet de proposer une première évaluation de la prévalence de la FP sur la côte Caraïbe de la Martinique, après estimation de l'abondance de la population de Tortues vertes. Les résultats obtenus mettent en évidence une contamination non négligeable des Tortues vertes sur la côte Caraïbe. Ces données viennent compléter et préciser les premières observations de Liebart (2019). De plus, le suivi par photo-identification s'est révélé être un outil d'estimation de l'état de santé de la population non invasif et efficace. Il ouvre ainsi une nouvelle perspective dans l'étude d'une espèce menacée dans son habitat naturel. La confirmation du diagnostic par PCR s'est avérée peu satisfaisante. Une étude plus approfondie menée par Aquasearch est prévue dans les mois à venir sur des prélèvements frais, une fois les autorisations obtenues.

La caractérisation des paramètres influençant possiblement la prévalence de la FP sur les sites étudiés encourage la mise en place de mesures pour les contrer à tous les niveaux. La participation coordonnée des autorités locales, des associations de protection et des vétérinaires semble nécessaire pour limiter l'impact et la progression de la maladie sur la population de tortues marines.

Les résultats obtenus sont issus de mesures prises sur une courte durée. Ils donnent ainsi un premier bilan sur l'état de contamination par la FP de la population de tortues vertes sur une période donnée. Cette première étude doit être complétée par des travaux sur le long terme (plusieurs années) afin de mettre en évidence les éventuelles fluctuations de prévalence au cours du temps et de comprendre les phénomènes de régression spontanée et d'aggravation des lésions de FP.

En complément, il faudrait poursuivre l'étude avec des observations sur la côte Atlantique. Il serait également pertinent de procéder au séquençage complet du génome des ChHV5 rencontrés en Martinique. A partir de ces résultats, serait lancée une étude plus détaillée sur les liens phylogéniques de ce génome avec les souches rencontrées dans les pays voisins (Floride, Brésil) pour comprendre les dynamiques de contaminations et de transmission du virus dans les Antilles.

BIBLIOGRAPHIE

ABDELWHAB, E. M., LÜSCHOW, Dörte, HARDER, Timm C., *et al.* The use of FTA® filter papers for diagnosis of avian influenza virus. *Journal of virological methods*, 2011, vol. 174, no 1-2, p. 120-122.

AGENCE RÉGIONALE DE SANTÉ (ARS) Martinique [en ligne]. Disponible sur: <https://www.martinique.ars.sante.fr/bilan-de-la-qualite-des-eaux-baignade-2019-98-des-baignades-conformes> (Page consultée le 10/03/2019).

ACKERMANN, Mathias, KORIABINE, Maxim, HARTMANN-FRITSCH, Fabienne, *et al.* The genome of chelonid herpesvirus 5 harbors atypical genes. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no 10, p. e46623.

ADNYANA, W., LADDS, P. W., et BLAIR, D. Observations of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*) in Indonesia. *Australian Veterinary Journal*, 1997, vol. 75, no 10, p. 737-742.

AGUIRRE, A. Alonso, BALAZS, George H., ZIMMERMAN, B., *et al.* Organic contaminants and trace metals in the tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) afflicted with fibropapillomas in the Hawaiian Islands. *Marine pollution bulletin*, 1994a, vol. 28, no 2, p. 109-114.

AGUIRRE, A. Alonso, BALAZS, George H., ZIMMERMAN, B., *et al.* Evaluation of Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. *Journal of Wildlife Diseases*, 1994b, vol. 30, no 1, p. 8-15.

AGUIRRE, A. Alonso, BALAZS, George H., SPRAKER, Terry R., *et al.* Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. *Physiological Zoology*, 1995, vol. 68, no 5, p. 831-854.

AGUIRRE, A. Alonso. Fibropapillomas in marine turtles: a workshop at the 18th Annual Symposium on Biology and Conservation of Sea Turtles. *Marine Turtle Newsletter*, 1998, vol. 82, no 1, p. 0-12.

AGUIRRE, A. Alonso, SPRAKER, Terry R., CHAVES, Anny, *et al.* Pathology of fibropapillomatosis in olive ridley turtles *Lepidochelys olivacea* nesting in Costa Rica. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1999, vol. 11, no 3, p. 283-289.

AGUIRRE, A. Alonso et BALAZS, G. H. Blood biochemistry values of green turtles, *Chelonia mydas*, with and without fibropapillomatosis. *Comparative Haematology International*, 2000, vol. 10, no 3, p. 132-137.

AGUIRRE, A. Alonso et LUTZ, Peter L. Marine turtles as sentinels of ecosystem health: is fibropapillomatosis an indicator?. *EcoHealth*, 2004, vol. 1, no 3, p. 275-283.

ALFARO-NÚÑEZ, Alonzo, BERTELSEN, Mads Frost, BOJESEN, Anders Miki, *et al.* Global distribution of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus among clinically healthy sea turtles. *BMC Evolutionary Biology*, 2014, vol. 14, no 1, p. 206.

ALFARO-NÚÑEZ, Alonzo et GILBERT, M. Thomas P. Validation of a sensitive PCR assay for the detection of Chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus in latent turtle infections. *Journal of virological methods*, 2014, vol. 206, p. 38-41.

ALFARO-NÚÑEZ, Alonzo, BOJESSEN, Anders Miki, BERTELSEN, Mads F., *et al.* Further evidence of Chelonid herpesvirus 5 (ChHV5) latency: high levels of ChHV5 DNA detected in clinically healthy marine turtles. *PeerJ*, 2016, vol. 4, p. e2274.

ARIEL, E., NAINU, F., JONES, K., *et al.* Phylogenetic variation of Chelonid Alpha herpesvirus 5 (ChHV5) in populations of green turtles *Chelonia mydas* along the Queensland Coast, Australia. *Journal of aquatic animal health*, 2017, vol. 29, no 3, p. 150-157.

ARTHUR, Karen, LIMPUS, Colin, BALAZS, George, *et al.* The exposure of green turtles (*Chelonia mydas*) to tumour promoting compounds produced by the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* and their potential role in the aetiology of fibropapillomatosis. *Harmful Algae*, 2008, vol. 7, no 1, p. 114-125.

BABOULIN, Stéphanie. *La fibropapillomatose chez les tortues marines: Etat actuel des connaissances*. 2008. Thèse de doctorat.

BAEZA, L., HAYES, C., WRIGHT, Marsha K., *et al.* Photo recognition for in-water identification of hawksbills in a marine protected area of Honduras. 2015.

BANKS, 2006. <http://www.turtlehospital.org/fibropapilloma.htm>. Site consulté le 31/01/2020

BALAZS, George H. et POOLEY, Samuel G. Research plan for marine turtle fibropapilloma: results of a December 1990 workshop. 1991.

BALAZS, G. H. Current status of fibropapillomas in the Hawaiian green turtle, *Chelonia mydas*. *Research plan for marine turtle fibropapilloma*, 1991, p. 47-57.

BALAZS, G. H., AGUIRRE, A. A., et MURAKAWA, S. K. K. Occurrence of oral fibropapillomas in the Hawaiian green turtle: differential disease expression. *Marine Turtle Newsletter*, 1997, vol. 76, no 1, p. 2.

BALAZS, George H., MURAKAWA, Shawn KK, ELLIS, Denise M., *et al.* Manifestation of fibropapillomatosis and rates of growth of green turtles at Kaneohe Bay in the Hawaiian Islands. In : *EIGHTEENTH INTERNATIONAL SEA TURTLE SYMPOSIUM*. 2000. p. 112.

BARRAGAN, Ana R. et SARTI, Laura. A possible case of fibropapilloma in Kemp's ridley turtle (*Lepidochelys kempii*). *Marine Turtle Newsletter*, 1994, vol. 67, no 28.

BENNETT, Peter, KEUPER-BENNETT, Ursula, et BALAZS, George H. Photographic evidence for the regression of fibropapillomas afflicting green turtles at Honokowai, Maui, in the Hawaiian Islands. In : *Proc. 19th Ann. Symp. Sea Turtle Biol Cons.* 1999. p. 37-39.

BENNETT, Peter, BEUPER-BENNETT, U., et BALAZS, George H. The eyes have it: manifestation of ocular tumors in the green turtle ohana of Honokowai, West Maui, Hawaii. In : *21st Annual Sea Turtle Symposium, Feb.* 2001. p. 24-28.

- BERTULLI, Chiara G., RASMUSSEN, Marianne H., et ROSSO, Massimiliano. An assessment of the natural marking patterns used for photo-identification of common minke whales and white-beaked dolphins in Icelandic waters. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2015, vol. 96, no 4, p. 807-819.
- BJORNDAL, K. A., BOLTEN, A. B. Proceedings of a workshop on Assessing Abundance and Trends for In-Water Sea Turtle Populations, held at the Archie Carr Center for Sea Turtle Research University of Florida, Gainesville, Florida, 24-26 March 2000. 2000.
- BONOLA, Marc, GIRONDOT, Marc, ROBIN, Jean-Patrice, *et al.* Fine scale geographic residence and annual primary production drive body condition of wild immature green turtles (*Chelonia mydas*) in Martinique Island (Lesser Antilles). *Biology open*, 2019, vol. 8, no 12.
- BOURJEA, Jerome, LAPEGUE, Sylvie, GAGNEVIN, Lionel, *et al.* Phylogeography of the green turtle, *Chelonia mydas*, in the Southwest Indian Ocean. *Molecular Ecology*, 2007, vol. 16, no 1, p. 175-186.
- BOWEN, Brian W. et KARL, S. A. Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular ecology*, 2007, vol. 16, no 23, p. 4886-4907.
- BROOKS, D. E., GINN, P. E., MILLER, T. R., *et al.* Ocular fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). *Veterinary Pathology*, 1994, vol. 31, no 3, p. 335-339.
- BROOKS, L. B. *Abundance and tidal movements of green turtle (Chelonia mydas) in BCS, Mexico*. Master of Science thesis. San Jose State University, San Jose. 2005.
- CALMANOVICI, Bruna, WAAYERS, David, REISSER, Julia, *et al.* I3S Pattern as a mark-recapture tool to identify captured and free-swimming sea turtles: an assessment. *Marine Ecology Progress Series*, 2018, vol. 589, p. 263-268.
- CARDONA-OSPINA, Jaime A., VILLALBA-MIRANDA, Manuel F., PALECHOR-OCAMPO, Leidy A., *et al.* A systematic review of FTA cards® as a tool for viral RNA preservation in fieldwork: Are they safe and effective?. *Preventive veterinary medicine*, 2019, p. 104772.
- CARPENTIER, Alice S., JEAN, Claire, BARRET, Mathieu, *et al.* Stability of facial scale patterns on green sea turtles *Chelonia mydas* over time: a validation for the use of a photo-identification method. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2016, vol. 476, p. 15-21.
- CHALOUPKA, Milani, BALAZS, George H., et WORK, Thierry M. Rise and fall over 26 years of a marine epizootic in Hawaiian green sea turtles. *Journal of Wildlife Diseases*, 2009, vol. 45, no 4, p. 1138-1142.
- CHAMBAULT, Philippine, DE THOISY, Benoît, HUGUIN, Mailis, *et al.* Connecting paths between juvenile and adult habitats in the Atlantic green turtle using genetics and satellite tracking. *Ecology and evolution*, 2018, vol. 8, no 24, p. 12790-12802.
- CHAVES, Andrea, AGUIRRE, A. Alonso, BLANCO-PENA, Kinndle, *et al.* Examining the role of transmission of chelonid alphaherpesvirus 5. *EcoHealth*, 2017, vol. 14, no 3, p. 530-541.

CHEVALIER, J. Plan de restauration des tortues marines des Antilles française. *Rapport de l'ONCFS, Direction Régionale Outre Mer*. 2005.

CHRISTIANEN, Marjolijn JA, SMULDERS, Fee OH, ENGEL, M. Sabine, *et al.* Megaherbivores may impact expansion of invasive seagrass in the Caribbean. *Journal of Ecology*, 2019, vol. 107, no 1, p. 45-57.

CURRY, Sadie S., BROWN, Daniel R., GASKIN, Jack M., *et al.* Persistent infectivity of a disease-associated herpesvirus in green turtles after exposure to seawater. *Journal of Wildlife Diseases*, 2000, vol. 36, no 4, p. 792-797.

D'AMATO, Adriana F. et MORAES-NETO, Moacyr. First documentation of fibropapillomas verified by histopathology in *Eretmochelys imbricata*. *Marine Turtle Newsletter*, 2000, vol. 89, p. 12-13.

DA CUNHA BRITO, Fábio Luiz, MAIA, Frederico Celso Lyra, DE FRANÇA, Lucila Maria O., *et al.* Fibropapillomatosis and multiple fibromas in a green turtle from the South Coast of Pernambuco State, Brazil. *Marine Turtle Newsletter*, 2004, vol. 106, no 12.

DAVISON, Andrew J. Molecular evolution of alphaherpesviruses. *Varicella zoster virus*. Cambridge University Press, Cambridge, England, 2000, p. 25-50.

DA SILVA, Cinthia Carneiro, KLEIN, Roberta Daniele, BARCAROLLI, Indianara Fernanda, *et al.* Metal contamination as a possible etiology of fibropapillomatosis in juvenile female green sea turtles *Chelonia mydas* from the southern Atlantic Ocean. *Aquatic Toxicology*, 2016, vol. 170, p. 42-51.

DEAL Martinique. Inventaire du patrimoine géologique de la Martinique : annexe 2 fiche 27 Anse Noire et Anse Dufour. 2016 [en ligne]. Disponible sur : <http://www.martinique.developpement-durable.gouv.fr/inventaire-du-patrimoine-geologique-de-la-a390.html> (consulté le 27/04/2020).

DEAL Martinique. Paysage eau biodiversité : sargasses [en ligne]. Disponible sur : <http://www.martinique.developpement-durable.gouv.fr/sargasses-a1174.html> (consulté le 27/04/2020).

DE MELLO, Daniela MD et ALVAREZ, Maria CL. Health assessment of juvenile green turtles in southern São Paulo State, Brazil: a hematologic approach. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2020, vol. 32, no 1, p. 25-35.

DOMEAU, M. *Estimation de la taille de population de grands dauphins de l'archipel de Molène pour l'année 2017*. DUT Génie Biologique : Option Génie de l'Environnement : IUT de Cergy-Pontoise : 2017.

DONNELLY K.A. ; PAPICH, M.G. ; *et al.* Plasma Bleomycin Concentrations during Electrochemotherapeutic : treatment of Fibropapillomas in Green Turtles *Chelonia mydas*, 2019. *Journal of Aquatic Animal Health* 31:186–192.

DONG, Li, LIN, Chunqing, LI, Li, *et al.* An evaluation of clinical performance of FTA cards for HPV 16/18 detection using cobas 4800 HPV Test compared to dry swab and liquid medium. *Journal of Clinical Virology*, 2017, vol. 94, p. 67-71.

DOS SANTOS, Robson Guimarães, MARTINS, Agnaldo Silva, TOREZANI, Evelise, *et al.* Relationship between fibropapillomatosis and environmental quality: a case study with *Chelonia mydas* off Brazil. *Diseases of aquatic organisms*, 2010, vol. 89, no 1, p. 87-95.

DUARTE, A., FAÍSCA, P., LOUREIRO, N. S., *et al.* First histological and virological report of fibropapilloma associated with herpesvirus in *Chelonia mydas* at Príncipe Island, West Africa. *Archives of virology*, 2012, vol. 157, no 6, p. 1155-1159.

DUFFY, David J., SCHNITZLER, Christine, KARPINSKI, Lorraine, *et al.* Sea turtle fibropapilloma tumors share genomic drivers and therapeutic vulnerabilities with human cancers. *Communications biology*, 2018, vol. 1, no 1, p. 1-13.

DUNBAR, S. G., ITO, H. E., BAHJRI, K., *et al.* Recognition of juvenile hawksbills *Eretmochelys imbricata* through face scale digitization and automated searching. *Endangered Species Research*, 2014, vol. 26, no 2, p. 137-146.

ENE, Ada, SU, Mei, LEMAIRE, Shefali, *et al.* Distribution of chelonid fibropapillomatosis-associated herpesvirus variants in Florida: molecular genetic evidence for infection of turtles following recruitment to neritic developmental habitats. *Journal of Wildlife Diseases*, 2005, vol. 41, no 3, p. 489-497.

FLINT, Mark, PATTERSON-KANE, Janet C., LIMPUS, Colin J., *et al.* Postmortem diagnostic investigation of disease in free-ranging marine turtle populations: a review of common pathologic findings and protocols. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2009, vol. 21, no 6, p. 733-759.

FLINT, M., LIMPUS, C. J., PATTERSON-KANE, J. C., *et al.* Corneal fibropapillomatosis in green sea turtles (*Chelonia mydas*) in Australia. *Journal of comparative pathology*, 2010, vol. 142, no 4, p. 341-346.

FLINT, Mark, MORTON, John M., LIMPUS, Colin J., *et al.* Development and application of biochemical and haematological reference intervals to identify unhealthy green sea turtles (*Chelonia mydas*). *The Veterinary Journal*, 2010, vol. 185, no 3, p. 299-304.

FLINT, Mark, BRAND, Anne-Fleur, BELL, Ian P., *et al.* Monitoring the health of green turtles in northern Queensland post catastrophic events. *Science of The Total Environment*, 2019, vol. 660, p. 586-592.

FOLEY, A.M., SCHROEDER, B.A., REDLOW, A.E., *et al.* Fibropapillomatosis in stranded Green turtles (*Chelonia mydas*) from the eastern United States (1980-98): Trends and associations with environmental factors. *Journal of Wildlife Diseases*. 2005. vol. 41, p.29-41

SOUNGUET, Alain Gibudi, VILLARUBIA, Armando, BALAZS, George H., *et al.* Fibropapillomatosis confirmed in *Chelonia mydas* in the Gulf of Guinea, West Africa. *Marine Turtle Newsletter*, 2007, no 116, p. 20.

GE Healthcare, 2019. FTA Cards: High-quality Media for Storage and Transport of DNA. GE Healthcare, Japan. <https://www.gelifesciences.co.jp/catalog/1454.html>.

GIRAUDOU, L. *Photo-identification des tortues vertes et son application dans l'indice d'abondance ou de fidélité aux sites d'alimentation*. Master 1 : Écologie Éthologie: Université

Jean Monnet : 2015.

GUIMARÃES, Suzana Machado, GITIRANA, Humberto Mas, WANDERLEY, Amanda Vidal, *et al.* Evidence of regression of fibropapillomas in juvenile green turtles *Chelonia mydas* caught in Niterói, southeast Brazil. *Diseases of aquatic organisms*, 2013, vol. 102, no 3, p. 243-247.

GREENBLATT, Rebecca J., WORK, Thierry M., BALAZS, George H., *et al.* The *Ozobranthus leech* is a candidate mechanical vector for the fibropapilloma-associated turtle herpesvirus found latently infecting skin tumors on Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). *Virology*, 2004, vol. 321, no 1, p. 101-110.

GREENBLATT, Rebecca J., QUACKENBUSH, Sandra L., CASEY, Rufina N., *et al.* Genomic variation of the fibropapilloma-associated marine turtle herpesvirus across seven geographic areas and three host species. *Journal of virology*, 2005, vol. 79, no 2, p. 1125-1132.

HARSHBARGER, J.C. Sea turtle fibropapilloma cases in the registry of tumors in lower animals. In: Research Plan for Marine turtle fibropapilloma: Results of a December 1990 Workshop, 1991, NOAA Technical Memorandum, USA.

HAWKES, Lucy A., BRODERICK, Annette C., GODFREY, Matthew H., *et al.* Climate change and marine turtles. *Endangered Species Research*, 2009, vol. 7, no 2, p. 137-154.

HERBST, Lawrence H. Fibropapillomatosis of marine turtles. *Annual Review of Fish Diseases*, 1994, vol. 4, p. 389-425.

HERBST, Lawrence H., JACOBSON, Elliot R., MORETTI, Rich, *et al.* Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1995, vol. 22, no 1, p. 1-12.

HERBST, Lawrence H., JACOBSON, Elliot R., MORETTI, Rich, *et al.* Experimental transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1995, vol. 22, no 1, p. 1-12.

HERBST, Lawrence H. et KLEIN, Paul A. Green turtle fibropapillomatosis: challenges to assessing the role of environmental cofactors. *Environmental Health Perspectives*, 1995, vol. 103, no suppl 4, p. 27-30.

HERBST, Lawrence Henry. The etiology and pathogenesis of green turtle fibropapillomatosis. 1997.

HERBST, Lawrence H., GREINER, Ellis C., EHRHART, Llewellyn M., *et al.* Serological association between spirorchidiasis, herpesvirus infection, and fibropapillomatosis in green turtles from Florida. *Journal of Wildlife Diseases*, 1998, vol. 34, no 3, p. 496-507.

HERBST, Lawrence H., JACOBSON, E. R., KLEIN, P. A., *et al.* Comparative pathology and pathogenesis of spontaneous and experimentally induced fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). *Veterinary Pathology*, 1999, vol. 36, no 6, p. 551-564.

HERBST, Larry, ENE, Ada, SU, Mei, *et al.* Tumor outbreaks in marine turtles are not due to recent herpesvirus mutations. *Current Biology*, 2004, vol. 14, no 17, p. R697-R699.

HIBBARD, Michele K. et SANDRI-GOLDIN, Rozanne M. Arginine-rich regions succeeding the nuclear localization region of the herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP27 are required for efficient nuclear localization and late gene expression. *Journal of Virology*, 1995, vol. 69, no 8, p. 4656-4667.

HIRAMA, Shigetomo et EHRHART, Llewellyn M. Description, prevalence and severity of green turtle fibropapillomatosis in three developmental habitats on the east coast of Florida. *Florida Scientist*, 2007, p. 435-448.

HUERTA, P., PINEDA, H., AGUIRRE, A., *et al.* First confirmed case of fibropapilloma in a leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). In : *Proceedings of the 20th annual symposium on sea turtle biology and conservation*. US Department of Commerce, NOAA Technical Memorandum NMFS-SESFC-477, 2000.

JACOBSON, Elliott R., GASKIN, Jack M., ROELKE, Melody, *et al.* Conjunctivitis, tracheitis, and pneumonia associated with herpesvirus infection in green sea turtles. *J Am Vet Med Assoc*, 1986, vol. 189, no 9, p. 1020-1023.

JACOBSON, E. R., MANSELL, J. L., SUNDBERG, J. P., *et al.* Cutaneous fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*). *Journal of comparative pathology*, 1989, vol. 101, no 1, p. 39-52.

JACOBSON, E. R., BUERGETT, C., WILLIAMS, B., *et al.* Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green turtle *Chelonia mydas*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1991, vol. 12, no 1, p. 1-6.

JEAN, C., CICCIONE, S., TALMA, E. *et al.* Photo-identification method for green and hawksbill turtles - First results from Reunion. *Indian Ocean Turtle Newsletter No. 11*, 2010. p. 8-13.

JONES, Adam G. Sea turtles: old viruses and new tricks. *Current biology*, 2004, vol. 14, no 19, p. R842-R843.

JONES, K., ARIEL, E., BURGESS, G., *et al.* A review of fibropapillomatosis in green turtles (*Chelonia mydas*). *The Veterinary Journal*, 2016, vol. 212, p. 48-57.

KELLER, Jennifer M., BALAZS, George H., NILSEN, Frances, *et al.* Investigating the potential role of persistent organic pollutants in Hawaiian green sea turtle fibropapillomatosis. *Environmental science & technology*, 2014, vol. 48, no 14, p. 7807-7816.

KLEIN, Paul A., CURRY, Sadie, BROWN, Daniel R., *et al.* Prevalence and Cultivation of a Chelonid Herpesvirus Associated with Fibropapillomas of the Green turtle, *Chelonia mydas*, and the Loggerhead Turtle, *Caretta caretta*, in Florida. 1998.

KLYACHKIN, Yuri M. et GERAGHTY, Robert J. Mutagenic analysis of herpes simplex virus type 1 glycoprotein L reveals the importance of an arginine-rich region for function. *Virology*, 2008, vol. 374, no 1, p. 23-32.

- KOLLER, N., URSENBACHER, S. Étude et estimation de Couleuvres vipérines (*Natrix maura*) et de Couleuvres tesselées (*N. tessellata*) dans le Lavaux. Travail de certificat : Zoologie et Écologie animale : Université de Lausanne, Faculté des Sciences : 1996.
- KREBS, C. J. Ecological Methodology. Harper and Row. *Publishers*, 1989, p. 654.
- KRAUS, Robert HS, VAN HOOFT, Pim, WALDENSTRÖM, Jonas, *et al.* Avian influenza surveillance with FTA cards: field methods, biosafety, and transportation issues solved. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2011, no 54, p. e2832.
- LACKOVICH, Joel K., BROWN, Daniel R., HOMER, Bruce L., *et al.* Association of herpesvirus with fibropapillomatosis of the green turtle *Chelonia mydas* and the loggerhead turtle *Caretta caretta* in Florida. *Diseases of aquatic organisms*, 1999, vol. 37, no 2, p. 89-97.
- LANYON, J. M., LIMPUS, C. J., et MARSH, H. Dugongs and turtles: grazers in the seagrass system. *Biology of Seagrasses: A treatise on the biology of seagrasses with special reference to the Australian region.*(AWD Larkum, AJ McComb and SA Shepherd eds).(Elsevier: Amsterdam, New York), 1989, p. 610-34.
- LARADE, M., PINEL-FEREOL, P. Les algues sargasses sont de retour sur la côte Atlantique [en ligne]. Disponible sur : <https://lalere.francetvinfo.fr/martinique/algues-sargasses-sont-retour-cote-atlantique-667311.html> (consulté le 27/04/2020).
- LARSEN, D. R. Natural Resources Biometrics. Mark and Recapture Methods – Jolly-Seber Method : (Multiple marking) [en ligne], 1998 , <http://oak.snr.missouri.edu/nr3110/topics/jolly.php> (consulté le 2/05/2020).
- LAWRANCE, Matthew F., MANSFIELD, Katherine L., SUTTON, Emma, *et al.* Molecular evolution of fibropapilloma-associated herpesviruses infecting juvenile green and loggerhead sea turtles. *Virology*, 2018, vol. 521, p. 190-197.
- LEGRAND, H. Base de données cartographique des fonds marins côtiers de la Martinique : Biocénoses benthiques. *OMMM*. Rapport final 2009.
- LEMONS, Garrett, LEWISON, Rebecca, KOMOROSKE, Lisa, *et al.* Trophic ecology of green sea turtles in a highly urbanized bay: insights from stable isotopes and mixing models. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2011, vol. 405, no 1-2, p. 25-32.
- LIEBART, Manon, 2019. Photo-identification des tortues vertes (*Chelonia mydas*) et son application dans l'indice d'abondance ou de fidélité aux sites d'alimentation en Martinique. Thèse de doctorat vétérinaire. Toulouse : Toulouse 3.
- LIMPUS, C. J., MILLER, J. D., PARAMENTER, C. J., *et al.* Migration of green (*Chelonia mydas*) and loggerhead (*Caretta caretta*) turtles to and from eastern Australian rookeries. *Wildlife Research*, 1992, vol. 19, no 3, p. 347-357.
- LIMPUS, Colin J. et MILLER, Jeffrey D. The occurrence of cutaneous fibropapillomas in marine turtles in Queensland. In : *Proceedings of the Australian Marine Turtle Conservation Workshop*. 1994. p. 186-188.

- LINDEMAN, P. V. Closed and open model estimates of abundance and tests of model assumptions for two populations of the turtle, *Chrysemys picta*. *Journal of Herpetology*, 1990, vol. 24, no 1, p. 78-81.
- LU, Yuanan, AGUIRRE, Alonso A., WORK, Thierry M., *et al.* Identification of a small, naked virus in tumor-like aggregates in cell lines derived from a green turtle, *Chelonia mydas*, with fibropapillomas. *Journal of virological methods*, 2000, vol. 86, no 1, p. 25-33.
- LU, Y., WANG, Y., YU, Q., *et al.* Detection of herpesviral sequences in tissues of green turtles with fibropapilloma by polymerase chain reaction. *Archives of Virology*, 2000, vol. 145, no 9, p. 1885-1893.
- LU, Yuanan, YU, Qigui, ZAMZOW, Jill P., *et al.* Detection of green turtle herpesviral sequence in saddleback wrasse *Thalassoma duperrey*: a possible mode of transmission of green turtle fibropapilloma. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2000, vol. 12, no 1, p. 58-63.
- LU, Y. A., WANG, Y., AGUIRRE, A. A., *et al.* RT-PCR detection of the expression of the polymerase gene of a novel reptilian herpesvirus in tumor tissues of green turtles with fibropapilloma. *Archives of virology*, 2003, vol. 148, no 6, p. 1155-1163.
- LUTZ, Peter L., CRAY, Carolyn, et SPOSATO, Patricia L. *Studies of the association between immunosuppression and fibropapillomatosis within three habitats of Chelonia mydas*. Honolulu Laboratory, Southwest Fisheries Science Center, National Marine Fisheries Service, NOAA, 2001.
- MANCINI, A., ELSADEK, I., MADON, B. When simple is better: comparing two sampling methods to estimate green turtles abundance at coastal feeding grounds. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 2015, vol. 465, p. 113-120.
- MANLY, B. F. J. A simulation study of Jolly's method for analysing capture-recapture data. *Biometrics*, 1971, p. 415-424.
- MANLY, B. F. J. Biometrics : obtaining Confidence Limits on Parameters of the Jolly-Seber Model for Capture-Recapture Data. *International Biometric Society*, 1984, vol. 40, no. 3, p. 749-758. 2
- MASANGKAY, J. S. and C. NALO-OCHONA. Tumors of the carapace of philippine green sea turtle. EAZWV 4th scientifica meting joint with the annual meeting of the European Wildlife Disease Association, 2002.
- MASCARENHAS, Rita et IVERSON, Peter John. Fibropapillomatosis in stranded green turtles (*Chelonia mydas*) in Paraiba State, Northeastern Brazil: evidence of a Brazilian epizootic. *Marine Turtle Newsletter*, 2008, vol. 120, p. 3-6.
- MENDONÇA, M. T. & EHRHART, L. M. Activity, population size and structure of immature *Chelonia mydas* and *Caretta caretta* in Mosquito Lagoon, Florida. *Copeia*, 1982, p. 161-167.
- MONEZI, Telma A., MEHNERT, Dolores U., DE MOURA, Elisabeth MM, *et al.* Chelonid herpesvirus 5 in secretions and tumor tissues from green turtles (*Chelonia mydas*) from Southeastern Brazil: a ten-year study. *Veterinary microbiology*, 2016, vol. 186, p. 150-156.

MORRISON, Cheryl L., IWANOWICZ, Luke, WORK, Thierry M., *et al.* Genomic evolution, recombination, and inter-strain diversity of chelonid alphaherpesvirus 5 from Florida and Hawaii green sea turtles with fibropapillomatosis. *PeerJ*, 2018, vol. 6, p. e4386.

MULTIGNER, Luc, KADHEL, Philippe, ROUGET, Florence, *et al.* Chlordecone exposure and adverse effects in French West Indies populations. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, vol. 23, no 1, p. 3-8.

MUSSEAU, R. *Tailles de populations et estimations de variations d'effectifs – Méthodes absolues*. Cours sur la dynamique des populations : Master 2 : Biosphère environnement : Université Jean Monnet : 2016.

PAGANO, M., VAZZANA, I., GENTILE, A., *et al.* Hematological and biochemical parameters in Sea turtles (*Caretta caretta*) after stranding. *Regional Studies in Marine Science*, 2019, vol. 32, p. 100832.

PAGE-KARJIAN, A., TORRES, F., ZHANG, J. *et al.* Presence of chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus in tumored and non-tumored Green turtles, as detected by polymerase chain reaction, in endemic and non-endemic aggregations, Puerto Rico. *SpringerPlus*. 2012. vol. 1, p. 1-8.

PAGE-KARJIAN, Annie, NORTON, Terry M., RITCHIE, Branson, *et al.* Quantifying chelonid herpesvirus 5 in symptomatic and asymptomatic rehabilitating green sea turtles. *Endangered Species Research*, 2015, vol. 28, no 2, p. 135-146.

PAGE-KARJIAN, A. Fibropapillomatosis in Marine Turtles. In : *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy, Volume 9*. WB Saunders, 2019. p. 398-403.

PATRÍCIO, A. R., HERBST, Lawrence H., DUARTE, A., *et al.* Global phylogeography and evolution of chelonid fibropapilloma-associated herpesvirus. *Journal of General Virology*, 2012, vol. 93, no 5, p. 1035-1045.

PEINADO, J., BOSC, V., DESTANDAU, R., *et al.* Programme de gestion d'une tortue exotique *Trachemys scripta elegans* en région Corse: « Tentative d'éradication et de sensibilisation du public aux problématiques liées aux espèces exotiques ». Deuxième année du programme: « Test de la méthode de piégeage élaborée sur le site de l'embouchure du Rizzanese (Propriano, Corse du sud) », 2011.

PEROZO, Francisco, VILLEGAS, Pedro, ESTEVEZ, Carlos, *et al.* Use of FTA® filter paper for the molecular detection of Newcastle disease virus. *Avian Pathology*, 2006, vol. 35, no 02, p. 93-98

Plan National d'Action en faveur des tortues marines des Antilles Françaises 2018-2027 [en ligne]. Disponible sur : <https://www.tortuesmarinesmartinique.org/plan-national-daction> (consulté le 05/09/2020)

POLOVINA, J., BALAZS, G., HOWELL, E. *et al.* Forage and migration habitat of loggerhead (*Caretta caretta*) and olive ridley (*Lepidochelys olivacea*) sea turtles in the central North Pacific Ocean. *Fisheries Oceanography*. 2004. vol. 13, p 36-51.

PURVIS, Linda B., VILLEGAS, Pedro, *et* PEROZO, Francisco. Evaluation of FTA® paper and phenol for storage, extraction and molecular characterization of infectious bursal disease

virus. *Journal of virological methods*, 2006, vol. 138, no 1-2, p. 66-69.

QUACKENBUSH, Sandra L., WORK, Thierry M., BALAZS, George H., *et al.* Three closely related herpesviruses are associated with fibropapillomatosis in marine turtles. *Virology*, 1998, vol. 246, no 2, p. 392-399.

QUACKENBUSH, Sandra L., CASEY, Rufina N., MURCEK, Rebecca J., *et al.* Quantitative analysis of herpesvirus sequences from normal tissue and fibropapillomas of marine turtles with real-time PCR. *Virology*, 2001, vol. 287, no 1, p. 105-111.

REISSER, J., PROIETTI, M., SAZIMA, I. *et al.* Feeding ecology of the green turtle (*Chelonia mydas*) at rocky reefs in western South Atlantic. *Marine Biology*. 2013. Volume 160, p.3169-3179.

Réseau Tortues Marines Guadeloupe. Clé d'identification [en ligne]. Disponible sur : <http://www.tortuesmarinesguadeloupe.org/les-tortues-marines/des-especes-protegees/cle-d-identification/> (consulté le 31/02/2020)

REEVE, B. W. P., MCFALL, Sally M., SONG, R., *et al.* Commercial products to preserve specimens for tuberculosis diagnosis: a systematic review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2018, vol. 22, no 7, p. 741-753.

RITCHIE, B., Chapter 24 - Virology, In SAUNDERS, W. B. *Reptile Medicine and Surgery (Second Edition)*. Saint Louis, 2006. p. 391-417.

ROBERTS, Mark A., SCHWARTZ, Tonia S., *et* KARL, Stephen A. Global population genetic structure and male-mediated gene flow in the green sea turtle (*Chelonia mydas*): analysis of microsatellite loci. *Genetics*, 2004, vol. 166, no 4, p. 1857-1870.

RODEN, Richard BS, LOWY, Douglas R., *et* SCHILLER, John T. Papillomavirus is resistant to desiccation. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, vol. 176, no 4, p. 1076-1079.

SAFI, M., REMACLE M., GOUAZE, M. *et al.* Évaluation de l'impact touristique sur le comportement des tortues vertes (*Chelonia mydas*) sur leurs sites d'alimentation en Martinique. *Rapport final DEAL Martinique, Aquasearch*. 2018.

SAFFACHE, P. Martinique et Guadeloupe: sanctuaires coralliens ou cimetières sous-marins ?. *Aménagement et Nature*, 2001.

SAFFACHE, P., MOULLET, D. Martinique et Guadeloupe: des écosystèmes côtiers en sursis. *Les littoraux volcaniques: une approche environnementale*, 2007, p. 159.

SAHAI, Hardeo *et* KHURSHID, Anwer. Confidence intervals for the mean of a Poisson distribution: a review. *Biometrical Journal*, 1993, vol. 35, no 7, p. 857-867.

SAKAI, Takeo, ISHII, Ayako, SEGAWA, Takao, *et al.* Establishing conditions for the storage and elution of rabies virus RNA using FTA® cards. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2014, p. 14-0227.

SAINT RAYMOND MOYNAT J. Les affections cutanées des reptiles. Th. Med. Vet. Paris 15è, 2008, 188p.

SCHOFIELD, G., KATSELIDIS, A., DIMOPOULOS, P. et al. Investigating the viability of photo-identification as an objective tool to study endangered sea turtle populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Elsevier, 2008. vol. 360, p.103-108.

SELLERA, Fábio Parra, DUTRA, Gustavo Henrique Pereira, NASCIMENTO, Cristiane Lassálvia, *et al.* Investigation of green turtle (*Chelonia mydas*) cutaneous fibropapillomatosis recurrence rates following diode laser surgery. *Journal of exotic pet medicine*, 2019, vol. 28, p. 180-184.

SERMAGE, C. *Suivi écologique des herbiers de la côte Sud Caraïbe de la Martinique et impact des ancrages des bateaux de plaisance*. Master 2 : Exploitation durable des écosystèmes littoraux : Université La Rochelle, 2006.

SHAVER, Donna J., WALKER, J. Shelby, et BACKOF, Thomas F. Fibropapillomatosis prevalence and distribution in green turtles *Chelonia mydas* in Texas (USA). *Diseases of Aquatic Organisms*, 2019, vol. 136, no 2, p. 175-182.

SIEGWALT, F., JEANTET, L., ARQUE, A. et al. Écologie trophique de la tortue verte dans les Antilles française. *Ifreco. Bulletin n°3 Avril 2019*. p. 12-14.

SMITH, G.M., COATES, C.W. Fibroepithelial growths of the skin in large marine turtle *Chelonia mydas*. *Zoologica*. 1938. vol. 23, p. 93-98.

SPOSATO P.L., LUTZ P.L., and CRAY C. Immunosuppression and fibropapilloma disease in wild green sea turtle populations (*Chelonia mydas*). In A. Mosier, A. Foley, and B. Brost (comps.), *Proceedings of the Twentieth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*, Orlando, Florida, 2002, p. 152-153. U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Memo. NFMS-SEFSC-477.

STACY, Brian A., WELLEHAN, James FX, FOLEY, Allen M., *et al.* Two herpesviruses associated with disease in wild Atlantic loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Veterinary Microbiology*, 2008, vol. 126, no 1-3, p. 63-73.

STANLEY, T. R., RICHARDS, J. D. Software Review: A program for testing capture - recapture data for closure. *Wildlife Society Bulletin*, 2005, vol. 33, no 2, p. 782-785.

URIAN, K., GORGONE, A., READ, A. et al. Recommendations for photo-identification methods used in capture-recapture models with cetaceans. *Marine Mammal Science*. Society for Marine Mammalogy, 2014. p.1-24.

VAN HOUTAN, Kyle S., HARGROVE, Stacy K., et BALAZS, George H. Land use, macroalgae, and a tumor-forming disease in marine turtles. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no 9.

VAN HOUTAN, Kyle S., SMITH, Celia M., DAILER, Meghan L., *et al.* Eutrophication and the dietary promotion of sea turtle tumors. *PeerJ*, 2014, vol. 2, p. e602.

WIIRSIG, B., JEFFERSON, T. Methods of photo-identification for small cetaceans. *Reports of the International Whaling Commission*. 1990. p. 42-43.

WILLIAMS, E.H., RUEDA-ALMONACID, J.V., SYBESMA, J., et al. An epizootic of cutaneous fibropapillomas in Green turtles *Chelonia mydas* of the Caribbean: Part of a panzootic ?. *Journal of Aquatic Animal Health*. 1994. vol. 6, p. 70-78.

WORK, Thierry M. et BALAZS, George H. Causes of green turtle (*Chelonia mydas*) morbidity and mortality in Hawaii. In : *Proceedings of the Seventeenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*'. (Eds SP Epperly and J. Braun.) pp. 1997. p. 308-309.

WORK, Thierry M. et BALAZS, George H. Relating tumor score to hematology in green turtles with fibropapillomatosis in Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases*, 1999, vol. 35, no 4, p. 804-807.

WORK, Thierry M., RAMEYER, Robert A., BALAZS, George H., et al. Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii. *Journal of wildlife diseases*, 2001, vol. 37, no 3, p. 574-581.

WORK, Thierry M., BALAZS, George H., WOLCOTT, Mark, et al. Bacteraemia in free-ranging Hawaiian green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis. *Diseases of aquatic organisms*, 2003, vol. 53, no 1, p. 41-46.

WORK, Thierry M., BALAZS, George H., RAMEYER, Robert A., et al. Retrospective pathology survey of green turtles *Chelonia mydas* with fibropapillomatosis in the Hawaiian Islands, 1993–2003. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004, vol. 62, no 1-2, p. 163-176.

WORK, Thierry M., DAGENAIS, Julie, BALAZS, George H., et al. In vitro biology of fibropapilloma-associated turtle herpesvirus and host cells in Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). *Journal of General Virology*, 2009, vol. 90, no 8, p. 1943-1950.

WORK, Thierry M., DAGENAIS, Julie, BALAZS, George H., et al. Dynamics of virus shedding and in situ confirmation of chelonid herpesvirus 5 in Hawaiian green turtles with fibropapillomatosis. *Veterinary Pathology*, 2015, vol. 52, no 6, p. 1195-1201.

YUAN, Huidong, FU, Fenghua, ZHUO, Jiaying, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. *Oncogene*, 2005, vol. 24, no 32, p. 5069-5078.

ANNEXES

Annexe 1 : Postulats de Koch

Les postulats de Koch sont des critères destinés à établir la relation spécifique de cause à effet liant un agent infectieux et une maladie.

A l'origine, il s'agissait d'une procédure ayant permis à Koch la découverte des agents responsables de la tuberculose et de la maladie du charbon. A partir de ce moment, cette procédure fut érigée sous forme de « postulats de Koch », postulats servant à confirmer le rôle étiologique d'un micro-organisme (bactérien, viral...) dans une maladie.

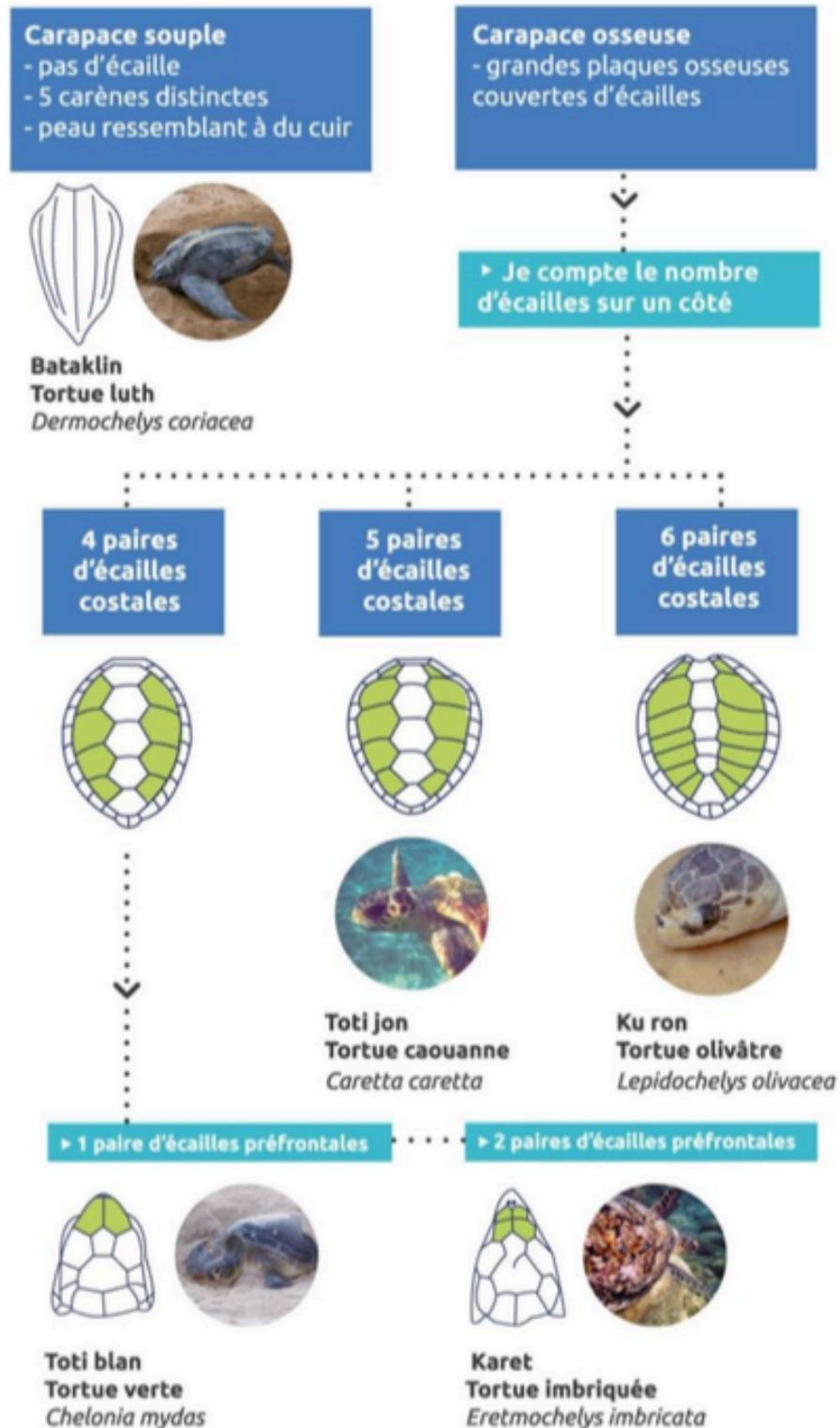
Les postulats originaux, publiés en 1884, sont les suivants :

- le micro-organisme doit être présent dans tous les organismes souffrant de la maladie, mais absent des organismes sains
- le micro-organisme doit pouvoir être isolé de l'organisme malade et cultivé en culture pure, c'est à dire in vitro;
- le micro-organisme cultivé doit entraîner l'apparition de la maladie lorsque introduit dans un organisme sain ;
- le micro-organisme doit être à nouveau isolé du nouvel organisme hôte rendu malade puis identifié comme étant identique à l'agent infectieux original.

Actuellement, ces postulats se sont « adaptés » aux nouvelles techniques moléculaires, mais la recherche d'un nouvel agent étiologique reste guidée par les principes établis par Koch. Aujourd'hui, le problème majeur reste la capacité à cultiver in vitro certains micro-organismes. De ce fait, il est admis que certains agents infectieux soient considérés comme agent causal d'une maladie bien que ne satisfaisant pas à la totalité des postulats de Koch. Concernant la fibropapillomatose des tortues marines, l'alphaherpesvirus suspecté d'être responsable de la maladie n'a jamais pu être isolé et cultivé en culture pure.

Annexe 2 : Clé d'identification des tortues marines (d'après Réseau tortues marines Guadeloupe 2019)

CLÉ D'IDENTIFICATION



Annexe 3 : Autorisation de prélèvement d'échantillon de tortue marine (Arrêté préfectoral et ONCFS)



Région

Martinique

Direction régionale

Fort-de-France, le 2 juillet 2019

78 route de Moutte

BP 578

97207 Fort-de-France

☎ : +596 (0) 596 60 70 70

☎ : +596 (0) 596 63 56 67

✉ :

caroline.cremades@onf.fr

N./Réf : N°180206/CC

Objet : Mise à jour n°1 de la Liste des accréditations 2018 dans le cadre de l'AP n°R02-2018-02-16-003

Monsieur le Directeur de la DEAL,

Dans le cadre de la mise en œuvre du PNA tortues marines des Antilles françaises, la coordination assure l'accréditation des personnes habilitées à intervenir sur les tortues marines de Martinique dans le cadre de l'AP n°R02-2018-02-16-003. Suite à la mise en place de nouvelles formations (gestion des échouages en mer), et à l'inclusion dans le réseau échouage de nouvelles personnes qualifiées, je vous propose une liste des personnes accréditées mise à jour.

Ainsi, vous trouverez en annexe la liste des personnes formées et habilitées dans le cadre des interventions sur des tortues marines en détresse et sur des échouages ainsi que la liste des personnes habilitées à effectuer des prélèvements sur des spécimens morts ou vivants dans le cadre d'une étude sur la fibropapillomatose et dans le cadre de nécropsie.

Vous remerciant de l'accueil favorable accordé à cette demande, veuillez agréer, Monsieur le Directeur, mes salutations distinguées.

Caroline CREMADES

Coordinatrice du PNA Tortues marines des Antilles françaises

Annexe 4 : Protocole d'extraction de l'ADN

1. Excise the DNA fragment from the agarose gel with a clean, sharp scalpel. Minimize the size of the gel slice by removing extra agarose.
2. Weigh the gel slice in a colorless tube. Add 3 volumes of Buffer QG to 1 volume of gel (100 mg, or approximately 100 μ l).
For example, add 300 μ l of Buffer QG to each 100 mg of gel. For >2% agarose gels, add 6 volumes of Buffer QG. The maximum amount of gel slice per QIAquick column is 400 mg; for gel slices >400 mg, use more than one QIAquick column.
3. Incubate at 50°C for 10 min or until the gel slice has completely dissolved. To help dissolve gel, mix by vortexing the tube every 2–3 min during the incubation.
IMPORTANT: Solubilize agarose completely. For >2% gels, increase incubation time.
4. After the gel slice has dissolved completely, check that the color of the mixture is yellow (similar to Buffer QG without dissolved agarose).
If the color of the mixture is orange or violet, add 10 μ l of 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn to yellow.
The adsorption of DNA to the QIAquick membrane is efficient only at pH \leq 7.5. Buffer QG contains a pH indicator that is yellow at pH \leq 7.5 and orange or violet at higher pH, allowing easy determination of the optimal pH for DNA binding.
5. Add 1 gel volume of isopropanol to the sample and mix.
For example, if the agarose gel slice is 100 mg, add 100 μ l isopropanol. This step increases the yield of DNA fragments \leq 500 bp and \geq 4 kb. For DNA fragments between 500 bp and 4 kb, addition of isopropanol has no effect on yield.
Do not centrifuge the sample at this stage.
- 6 Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.
7. To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column, and then centrifuge for 1 min. The maximum volume of the column reservoir is 800 μ l. For sample volumes >800 μ l, simply load the remainder and spin again.
8. Discard flow-through and place QIAquick column back into the same collection tube. Collection tubes are reused to reduce plastic waste.
9. Recommended: Add 0.5 ml of Buffer QG to QIAquick column and centrifuge for 1 min. This step will remove all traces of agarose. This is only required if the DNA will be used for direct sequencing, in vitro transcription or microinjection.
10. To wash, add 0.75 ml of Buffer PE into the QIAquick column and centrifuge for 1 min.
Note: If the DNA will be used for salt-sensitive applications such as blunt-end ligation and direct sequencing, let the column stand 2–5 min after addition of Buffer PE before centrifuging.
11. Discard the flow-through and centrifuge the QIAquick column for an additional 1 min at 7,900 x g (13,000 rpm).
IMPORTANT: Residual ethanol from Buffer PE will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation step.

12. Place QIAquick column into a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.

13. To elute DNA, add 50 µl of Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) or water (pH 7.0–8.5) to the center of the QIAquick membrane, and then centrifuge the column for 1 min. Alternatively, for increased DNA concentration, add 30 µl elution buffer to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge for 1 min. After the addition of Buffer EB to the QIAquick membrane, increasing the incubation time to up to 4 min can increase the yield of purified DNA.

IMPORTANT: Ensure that the elution buffer is dispensed directly onto the QIAquick membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volumes are 48 µl from 50 µl elution buffer volume and 28 µl from 30 µl. Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water, make sure that the pH value is within this range, and store DNA at –20°C because DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE buffer (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

14. If the purified DNA is to be analyzed on a gel, add 1 volume Loading Dye to 5 volumes of purified DNA. Mix the solution by pipetting it up and down before loading the gel. Loading Dye contains 3 marker dyes – bromophenol blue, xylene cyanol and orange G – that facilitate the estimation of DNA-migration distance and the optimization of the agarose gel run time. Refer to Table 2 (page 17) to identify the dyes according to migration distance and agarose gel percentage and type.

QIAquick® Spin Handbook, QIAGEN®, novembre 2018, 30-32.

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 d'**Amandine RENVIER** intitulée « **Evaluation de la contamination des tortues vertes (*Chelonia mydas*) par le virus de la fibropapillomatose dans les eaux côtières de la Martinique** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 07/10/2020
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Guillaume LE LOC'H

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



Vu :
Le Président du jury
Professeur Christophe PASQUIER

Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université Paul Sabatier
M. Jean-Marc BROTON
Le Président de l'Université Paul Sabatier,
Le Vice-Président de l'EFVU
Fabrice ALARY



Mme Amandine RENVIER
a été admis(e) sur concours en : 2015
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 09/07/2019
a validé son année d'approfondissement le : 20/02/2020
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



EVALUATION DE LA CONTAMINATION DES TORTUES VERTES (*CHELONIA MYDAS*) PAR LE VIRUS DE LA FIBROPAPILLOMATOSE DANS LES EAUX COTIERES DE LA MARTINIQUE

La fibropapillomatose (FP) est une maladie observée depuis plusieurs années chez les tortues marines dans le monde entier. Elle est provoquée par un virus, le ChHV5, de la famille des *Herpesviridae* et se manifeste par la présence de tumeurs cutanées ou internes, pouvant entraîner la mort de l'individu à terme. L'espèce la plus touchée est la Tortue verte, *Chelonia mydas*. Des premières études ont mis en évidence la présence de la FP en Martinique, toutefois un manque d'informations persiste sur la quantification et la répartition de cette maladie sur les populations de tortues marines.

Dans cette étude nous avons cherché à établir une prévalence de la FP sur sept sites de la côte Caraïbe de l'île, après avoir fait une estimation de la taille des populations. Les observations sont variables : trois sites ont une prévalence nulle, deux sites sont entre 20-30% et le Bourg des Anses d'Arlet est à 76%. Aucune prévalence n'a pu être établie à Bellefontaine à cause du comportement craintif des tortues. En comparant les données récoltées avec celles de 2019, des régressions ou aggravation de tumeurs ont pu être mises en évidence. Une étude préliminaire de quelques échantillons de tumeurs prélevés sur des tortues retrouvées mortes et testés par PCR puis séquencés montre que les tortues vertes martiniquaises sont infectées par des virus proches de virus déjà décrits. Enfin des facteurs environnementaux locaux pouvant avoir un impact sur le développement de la maladie, comme la qualité de l'eau, ont été mis en évidence et des solutions proposées.

Mots clés : fibropapillomatose, *Chelonia mydas*, ChHV5, Martinique, prévalence

EVALUATION OF THE CONTAMINATION OF GREEN TURTLES (*CHELONIA MYDAS*) BY THE FIBROPAPILLOMATOSIS VIRUS IN THE COASTAL WATERS OF MARTINIQUE

Fibropapillomatosis (FP) is a disease observed for several years in sea turtles around the world. It is caused by a virus, ChHV5, belonging to the *Herpesviridae* family and it causes development of skin and internal tumors, which can lead to the turtle's death. The most affected species is the Green turtle, *Chelonia mydas*. Initial studies have shown significant contamination in Martinique, however a lack of information remains on the quantification and distribution of this disease.

In this study we sought to establish a prevalence of FP in seven sites on the Caribbean coast of the island, after having estimated the size of the populations. Observations vary from zero prevalence in three sites, to 20-30% in two other sites, and up to 76% in Bourg des Anses d'Arlet. No prevalence could be established at Bellefontaine due to the fearful behaviour of turtles. By comparing the data collected with that of 2019, regressions or worsening of tumors could be highlighted. A preliminary study of some tumor samples taken from turtles found dead and tested by PCR and then sequenced shows that the green turtles of Martinique are infected with viruses similar to viruses already described. Finally, local environmental factors that may have an impact on the development of the disease, such as the quality of the water, have been highlighted and solutions were suggested.

Keys words : fibropapillomatosis, *Chelonia mydas*, ChHV5, Martinique, prevalence