

SOMMAIRE

Abréviations.....	i
Glossaire	ii
Liste des figures	iii
Liste des tableaux.....	v
I - Introduction.....	1
II - Généralités	3
II - 1 L'organisation « <i>Durrell Wildlife Conservation Trust</i> ».....	3
II - 2 Les tortues terrestres endémiques de madagascar	3
II - 3 Caractéristiques des agents pathogènes associés aux tortues.....	4
II - 3 - 1 <i>Herpesvirus</i>	4
II - 3 - 1 - 1 Classification.....	4
II - 3 - 1 - 2 Structure des <i>Herpesvirus</i>	5
II - 3 - 1 - 3 Réplication virale des <i>Alphaherpesvirinae</i>	7
II - 3 - 2 <i>Mycoplasma</i>	7
II - 3 - 2 - 1 Classification.....	7
II - 3 - 2 - 2 Structure	8
II - 3 - 3 Tropisme cellulaire et transmission d' <i>Herpesvirus</i> et de <i>Mycoplasma</i>	9
II - 3 - 4 Signes cliniques de l'infection d' <i>Herpesvirus</i> et de <i>Mycoplasma</i>	9
II - 3 - 5 Maladies causées par <i>Herpesvirus</i> et <i>Mycoplasma</i>	9
II - 3 - 6 Immunité des tortues face aux agents pathogènes	10

III - Matériels et méthodes.....	10
III - 1 Matériels.....	10
III - 1 - 1 Contrôles positifs d'ADN d' <i>Herpesvirus</i> et de <i>Mycoplasma</i>	10
III - 1 - 2 Échantillons de lavage nasal de tortues	10
III - 2 Méthodes.....	11
III - 2 - 1 Élution d'ADN de <i>Chelonid Herpesvirus</i> et de <i>Mycoplasma agassizii</i> fixés sur papier buvard.....	11
III - 2 - 1 - 1 Principe.....	11
III - 2 - 1 - 2 Mode opératoire.....	11
III - 2 - 2 Analyse moléculaire par <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	13
III - 2 - 2 - 1 Principe général de la PCR.....	13
III - 2 - 2 - 2 Optimisation de la PCR pour la détection d' <i>Herpesvirus</i>	15
III - 2 - 2 - 3 Optimisation de la PCR pour la détection de <i>Mycoplasma</i>	19
III - 2 - 3 Extraction d'ADN à partir des échantillons de lavage nasal de tortues.....	20
III - 2 - 3 - 1 Extraction d'ADN sans purification à partir de quatre échantillons.....	20
III - 2 - 3 - 2 Extraction d'ADN avec purification à partir de quatre échantillons.....	21
III - 2 - 4 Analyse de la présence du gène de la β - actine (gène de ménage) dans les extraits d'ADN.....	24
III - 2 - 5 Analyse de la présence d' <i>Herpesvirus</i> et de <i>Mycoplasma</i> dans les extraits d'ADN	25
III - 2 - 6 Dosage de l'ADN dans les extraits obtenus	25
III - 2 - 7 Électrophorèse sur gel d'agarose.....	25

III - 2 - 8 Séquençage des produits d'amplification	26
IV - Résultats et interprétations	27
IV - 1 Optimisation de techniques moléculaires.....	27
IV - 1 - 1 Concentration d'ADN dans les contrôles positifs d' <i>Herpesvirus</i> et de <i>Mycoplasma</i>	27
IV - 1 - 2 Mise au point des PCR pour la détection d' <i>Herpesvirus</i> et de <i>Mycoplasma</i>	28
IV - 1 - 2 - 1 Détection d' <i>Herpesvirus</i>	28
IV - 1 - 2 - 2 Détection de <i>Mycoplasma</i>	31
IV - 1 - 3 Optimisation de l'extraction d'ADN des échantillons de lavage nasal de tortues.....	32
IV - 1 - 4 Détection des gènes de ménage de tortues dans quatre extraits d'ADN purifiés et non purifiés.....	33
IV - 1 - 5 Résultats du séquençage des produits d'amplification	34
IV - 1 - 5 - 1 Confirmation de la détection du gène de <i>Testudinid Herpesvirus</i> après séquençage	34
IV - 1 - 5 - 2 Confirmation de la détection du gène de <i>Mycoplasma agassizii</i> après séquençage	34
IV - 1 - 5 - 3 Confirmation de la détection du gène de la β - actine après séquençage	35
IV - 2 Analyse des échantillons de lavage nasal de tortues à partir des techniques optimisées	36
IV - 2 - 1 Extraction et purification d'ADN à partir des échantillons de lavage nasal de tortues	37
IV - 2 - 2 Recherche du gène de la β - actine (gène de ménage) dans les extraits d'ADN purifiés de tortues	37

IV - 2 - 3 Recherche du gène de l'ADN polymérase d' <i>Herpesvirus</i> (région conservée) dans les extraits d'ADN purifiés de tortues	38
IV - 2 - 4 Recherche du gène 12S rRNA de <i>Mycoplasma</i> dans les extraits d'ADN purifiés de tortues	39
V - Discussion	40
VI - Conclusion et perspectives	44
Bibliographie	45
Annexes	I
Annexe 1 : Projets de conservation de l'ONG « <i>Durrell Wildlife Conservation Trust</i> » sur la faune et la flore à Madagascar.	I
Annexe 2 : Distribution géographique de tortues terrestres endémiques de Madagascar.....	I
Annexe 3 : Images et classification de tortues terrestres endémiques de Madagascar.....	II
Annexe 4 : Matériels et réactifs utilisés pendant les manipulations.	III
Annexe 5 : Schéma de la réaction d'amplification par <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).	IV
Annexe 6 : Séquences des amorces utilisées pendant les réactions d'amplification.	V
Annexe 7 : Détails de la concentration d'ADN des contrôles positifs (éluats de chaque papier buvard et solution d'ADN) d' <i>Herpesvirus</i> et de <i>Mycoplasma</i>	VI
Annexe 8 : Tableau récapitulatif des résultats d'analyse moléculaire des extraits d'ADN de tortues.	VII
Résumé	XVII
Abstract	XVIII

ABRÉVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messager

C - : contrôle négatif

C + : contrôle positif

dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate

DWCT : *Durrell Wildlife Conservation Trust*

h : heure(s)

Ig : immunoglobuline

IR_L : *Internal Reiterated Long*

IR_S : *Internal Reiterated Short*

min : minute(s)

ONG : Organisation Non - Gouvernementale

pb : paire(s) de bases

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PM : poids moléculaire

s : seconde(s)

TAE : Tris Acétate EDTA

TeHV3 : *Testudinid Herpesvirus type 3*

TR_L : *Terminal Reiterated Long*

TR_S : *Terminal Reiterated Short*

U_L : *Unique Long*

U_S : *Unique Short*

UV : Ultraviolet

GLOSSAIRE

Amorce : oligonucléotide composé de 17 à 30 bases nucléotidiques.

Anorexie : manque d'appétit.

Cachexie : affaiblissement profond de l'organisme lié à une dénutrition très importante.

Catalyseur : un élément ou un réactif qui favorise ou accélère une réaction.

Conjonctivite : inflammation de la conjonctive qui est la couche transparente des cellules couvrant toute la surface de l'œil.

Émaciation : état d'amaigrissement extrême observé chez un individu.

Feuilles caduques : feuilles non persistantes mais tombant chaque année.

Gène de ménage : gène exprimé dans tous les types cellulaires et dont les produits assurent les fonctions indispensables à la survie des cellules.

Glossite : inflammation de la langue qui est largement dépapillée.

Léthargie : état pathologique de sommeil profond et prolongé.

Mollicute : bactérie de petite taille et sans paroi cellulaire.

Œsophagite : inflammation de l'œsophage.

Œdème palpébral : accumulation anormale de liquide au niveau des tissus situés dans la face interne de la paupière qui provoque une difficulté à ouvrir l'œil.

Rhinite : inflammation de la muqueuse des fosses nasales.

Smire : aspect en frottis observé sur un gel d'agarose après l'électrophorèse.

Stomatite : inflammation de la muqueuse buccale.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du virion d' <i>Herpesvirus</i>	6
Figure 2 : Structure du génome d' <i>Herpesvirus</i>	6
Figure 3 : Structure du <i>Mycoplasma</i>	8
Figure 4 : Schéma récapitulatif de la méthode d'élution d'ADN à partir du papier buvard.....	12
Figure 5 : Schéma des étapes de l'extraction d'ADN sans purification.....	21
Figure 6 : Schéma des étapes de l'extraction d'ADN avec purification.....	23
Figure 7 : Analyse sur gel d'agarose après PCR conventionnelle pour la détection du gène 12S rRNA d' <i>Herpesvirus</i> des tortues sur (A) l'ADN obtenu à partir du papier buvard et (B) l'ADN en solution.....	28
Figure 8 : Analyse sur gel d'agarose après PCR semi-nichée pour la détection du gène de l'ADN polymérase d' <i>Herpesvirus</i> des tortues sur (A) l'ADN obtenu à partir du papier buvard et (B) l'ADN en solution.	29
Figure 9 : Analyse sur gel d'agarose après PCR nichée pour la détection du gène de l'ADN polymérase de tous types d' <i>Herpesvirus</i> (A) dans l'ADN obtenu à partir du papier buvard, (B)' dans la solution d'ADN pure et (B)'' dans la solution d'ADN diluée au 10 ^{ème}	30
Figure 10 : Analyse sur gel d'agarose après PCR conventionnelle pour la détection du gène 16S rRNA de <i>Mycoplasma</i> de tortues (A) dans l'ADN obtenu à partir du papier buvard et (B) dans l'ADN en solution.	31
Figure 11 : Analyse sur gel d'agarose après PCR ciblant le gène de la β - actine sur les contrôles positifs et sur les extraits d'ADN de tortues (A) non purifiés et (B) purifiés.	33
Figure 12 : Type d'électrophorégramme obtenu après séquençage des produits de la PCR nichée pour la détection d' <i>Herpesvirus</i> avec le contrôle positif.	34

Figure 13 : Type d'électrophorégramme obtenu après séquençage des produits de la PCR conventionnelle pour la détection de <i>Mycoplasma</i> avec le contrôle positif.	35
Figure 14 : Type d'électrophorégramme obtenu après séquençage des produits de la PCR conventionnelle pour la détection du gène de ménage dans les trois extraits d'ADN de tortues.	35
Figure 15 : Exemple de gel d'agarose obtenu après l'analyse des 275 extraits d'ADN de tortues avec PCR conventionnelle ciblant le gène de la β - actine.....	38
Figure 16 : Exemple de gel d'agarose obtenu après l'analyse des 275 extraits d'ADN de tortues avec la PCR nichée ciblant la région conservée du gène de l'ADN polymérase d' <i>Herpesvirus</i>	38
Figure 17 : Type de gel obtenu après l'analyse des 275 extraits d'ADN de tortues avec la PCR conventionnelle ciblant le gène 12S rRNA de <i>Mycoplasma</i>	39

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des <i>Herpesvirus</i> identifiés chez les tortues terrestres.	5
Tableau 2 : Classification de <i>Mycoplasma</i> identifiés chez les tortues terrestres.	8
Tableau 3 : PCR utilisées pour la détection d' <i>Herpesvirus</i> chez les tortues.....	15
Tableau 4 : Protocole (A) et profil thermique (B) de la PCR conventionnelle ciblant le gène 12S rRNA d' <i>Herpesvirus</i> chez les tortues.	16
Tableau 5 : Protocole (A) et profil thermique (B) de la PCR semi-nichée ciblant le gène de l'ADN polymérase d' <i>Herpesvirus</i> chez les tortues.	17
Tableau 6 : Protocole (A) et profil thermique (B) de la PCR nichée ciblant une région conservée du gène de l'ADN polymérase de tous <i>Herpesvirus</i> ..	18
Tableau 7 : Protocole (A) et profil thermique (B) de la PCR conventionnelle du gène 16S rRNA de <i>Mycoplasma</i> chez les tortues.....	19
Tableau 8 : Protocole (A) et profil thermique (B) de la PCR conventionnelle ciblant le gène de la β - actine chez les tortues.....	24
Tableau 9 : Valeurs de concentration d'ADN élué à partir de papier buvard et d'ADN en solution d' <i>Herpesvirus</i> et de <i>Mycoplasma</i>	27
Tableau 10 : Concentrations d'ADN de quatre extraits (A) non purifiés et (B) purifiés.....	32
Tableau 11 : Résumé des résultats des analyses de 275 échantillons de lavage nasal de tortues.	36
Tableau 12 : Concentrations d'ADN dans tous les extraits d'ADN de tortues testées.	37

I - INTRODUCTION

Madagascar est une île couverte de richesses naturelles, de faune et de flore diversifiées incluant plus de 250 espèces de reptiles dont 90 % sont endémiques. Cinq espèces de tortues terrestres sont présentes à Madagascar dont quatre sont endémiques. Ces espèces sont menacées et sont en voie de disparition (Caccone *et al.*, 1999). À part l'exportation qui défavorise leurs conditions de vie, les tortues sont exposées au stress environnemental, à la sécheresse, à la prédatation et la destruction de leur habitat. De plus, la population de tortues est souvent atteinte d'épidémie de maladie respiratoire. Il s'agit des grands facteurs de déclin des tortues terrestres dans le monde (Brown *et al.*, 1994 ; Soares *et al.*, 2004). De ce fait, des programmes de recherche sont mises en place pour la protection et la conservation de ces espèces menacées.

Plusieurs études ont montré que les maladies graves observées chez les tortues terrestres, marines et lacustres sont dues à des agents infectieux. En particulier, la présence d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma* chez ces tortues en sont les principales causes (Brown *et al.*, 1999 ; Soares *et al.*, 2004 ; Dickinson *et al.*, 2005 ; Salinas *et al.*, 2011). Ces agents touchent surtout les tortues appartenant à la famille des *Testudinidae*. Une co-infection d'*Herpesvirus* avec la bactérie du genre *Mycoplasma* est souvent observée chez les tortues (Soares *et al.*, 2004). Ces deux agents pathogènes causent des infections et une maladie sévère appelée « *Upper Respiratory Tract Disease* » (URTD). Cette maladie touche surtout les tortues terrestres (Brown *et al.*, 1994 ; Salinas *et al.*, 2011).

Le diagnostic de ces agents infectieux peut se faire à partir d'une analyse moléculaire (Soares *et al.*, 2004), d'une culture cellulaire (Jacobson *et al.*, 2014) ou d'un test sérologique (Braun *et al.*, 2014). La *Polymerase Chain Reaction* (PCR) et la technique d'isolement sont les techniques utilisées pour mettre en évidence ces agents pathogènes (Marschang *et al.*, 2006) ; la sérologie est souvent réalisée pour la détection indirecte de la présence d'anticorps contre *Herpesvirus* et *Mycoplasma* chez les tortues (Origgi *et al.*, 2001; Wendland *et al.*, 2007). Différentes études ont montré que la technique moléculaire telle que la PCR est la meilleure méthode de détection d'une présence récente ou en faible concentration d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma* (Soares *et al.*, 2004 ; Dickinson *et al.*, 2005 ; duPre *et al.*, 2011). Ainsi,

la surveillance sanitaire des tortues doit tenir compte de la détection de ces deux agents pathogènes chez ces tortues. En cas de présence de résultat positif, la mise en quarantaine des tortues touchées par *Herpesvirus* et *Mycoplasma* est recommandée. Jusqu'à présent, aucun traitement n'est disponible pour l'élimination de ces deux agents pathogènes, seuls les symptômes peuvent être traités (Soares *et al.*, 2004).

La présente étude a été réalisée grâce à une collaboration de l'Unité de Virologie de l'Institut Pasteur de Madagascar avec l'organisation « *Durrell Wildlife Conservation Trust* » (DWCT). Cette étude a pour objectif principal de mettre au point des techniques moléculaires permettant de détecter des *Herpesvirus* et *Mycoplasma* chez les tortues terrestres endémiques de Madagascar. Les techniques mises au point ont été ensuite validées et utilisées pour analyser des échantillons de lavage nasal de tortues. Ces échantillons proviennent d'individus de tortues protégés par DWCT. En effet, des tortues terrestres endémiques capturées ont été récupérées à l'aéroport par DWCT lors d'une tentative d'exportation illégale. Ces tortues capturées ont été ensuite mises en quarantaine dans les sites de protection de l'organisation. Actuellement, DWCT veut libérer ces tortues récupérées. Avant la libération de ces tortues dans leur habitat naturel, une analyse moléculaire d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma* doit être effectuée chez ces tortues récupérées.

Ce rapport d'étude se subdivise en deux parties : des généralités sur les tortues terrestres de Madagascar, sur « *Durrell Wildlife Conservation Trust* », ainsi que sur les agents pathogènes causant des maladies chez les tortues sont développés dans la première partie ; la deuxième partie se focalise sur l'étude expérimentale, les résultats et la discussion.

II - GÉNÉRALITÉS

II - 1 L'ORGANISATION « *DURRELL WILDLIFE CONSERVATION TRUST* »

DWCT est une Organisation Non-Gouvernementale (ONG) fondée en 1959 à Jersey, Channel Islands par un naturaliste britannique Gerald DURRELL. Cette ONG a pour mission de conserver la faune et la flore endémiques et de protéger les habitats des espèces menacées ou en voie de disparition dans le monde. Cette organisation s'est installée à Madagascar en 1986 pour la protection des espèces endémiques présentes dans l'île et en voie de disparition. Les tortues terrestres endémiques de Madagascar sont parmi les espèces protégées (Annexe 1).

II - 2 LES TORTUES TERRESTRES ENDÉMIQUES DE MADAGASCAR

Les tortues terrestres endémiques de Madagascar proviennent des zones côtières de l'île : *Astrochelys radiata* se trouve dans la partie Sud ; *Astrochelys yniphora*, principalement, dans la savane de la partie Nord-Ouest ; *Pyxis arachnoides* dans la partie Sud-Ouest et *Pyxis planicauda* dans la zone sèche et dans les forêts tropicales à feuilles caduques de la partie Ouest (Caccone *et al.*, 1999) (Annexe 2).

Cinq espèces de tortues terrestres appartenant à la famille des *Testudinidae* sont présentes à Madagascar dont quatre sont endémiques telles que : *Astrochelys radiata*, *Astrochelys yniphora*, *Pyxis arachnoides* et *Pyxis planicauda* ; *Kinixys belliana* étant originaire d'Afrique a été introduite à Madagascar (Gandar *et al.*, 2015). Ces reptiles sont parmi les espèces les plus protégées sur l'île (Annexe 3).

Ces tortues endémiques sont classées parmi les espèces rares et menacées (Caccone *et al.*, 1999). En effet, la plupart des habitants, surtout dans la partie Sud de Madagascar, font de ces tortues une source de nourriture à cause de la famine. De plus, ces tortues terrestres endémiques sont exposées à des exportations illégales (Orozco-terWengel *et al.*, 2013). Le trafic illicite des tortues terrestres

endémiques de Madagascar vers l'extérieur domine l'actualité des exportations illégales.

Face à ces problèmes, des programmes de protection de tortues terrestres et endémiques sont installés pour une sensibilisation de la population locale et une lutte contre le trafic illicite. Ainsi, l'ONG DWCT œuvre pour la protection de ces tortues capturées.

II - 3 CARACTÉRISTIQUES DES AGENTS PATHOGÈNES ASSOCIÉS AUX TORTUES

II - 3 - 1 *Herpesvirus*

II - 3 - 1 - 1 Classification

Le virus du genre *Herpesvirus* appartient à l'ordre des *Herpesvirales* et à la famille des *Herpesviridae*. La famille des *Herpesviridae* est subdivisée en trois sous-familles : *Alphaherpesvirinae*, *Bétaherpesvirinae* et *Gammaherpesvirinae*.

En général, le nom d'espèces du genre *Herpesvirus* retrouvés chez différentes espèces hôtes est désigné soit à partir de leur hôte (*Testudinid Herpesvirus* : *Herpesvirus* trouvé chez les Testudines), soit de la pathologie cellulaire engendrée (*Cytomegalovirus* impliquant les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules glandulaires), ou soit en portant le nom de la personne qui a découvert le virus (*Epstein-Barr virus* : virus découvert par Epstein en 1964) (Roizman, 1982).

Les espèces du genre *Herpesvirus* identifiées chez les tortues terrestres appartiennent à l'ordre des *Herpesvirales*, à la famille des *Herpesviridae* et à la sous-famille des *Alphaherpesvirinae* (Murakami *et al.*, 2001) (Tableau 1).

Chelonivirus, *Testudinid Herpesvirus*, *Terrapene Herpesvirus* et *Tortoise Herpesvirus* sont les espèces d'*Herpesvirus* retrouvées chez les tortues terrestres (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>). Des études précédentes ont montré que les espèces d'*Herpesvirus* trouvés chez les tortues sont propres à chaque espèce (Johnson *et al.*, 2005 ; Marschang *et al.*, 2006). Cependant,

Testudinid Herpesvirus type 3 (TeHV3) est l'espèce d'*Herpesvirus* qui peut toucher plusieurs espèces de tortues (Gandar *et al.*, 2015).

Tableau 1 : Classification des *Herpesvirus* identifiés chez les tortues terrestres.

(Source : https://viralzone.expasy.org/176?outline=all_by_species)

Ordre	: <i>Herpesvirales</i>
Famille	: <i>Herpesviridae</i>
Sous-famille	: <i>Alphaherpesvirinae</i>
genre	: <i>Herpesvirus</i>
	: <i>Tortoise Herpesvirus</i>
	Espèces
	<i>Chelonivirus</i>
	<i>Testudinid Herpesvirus</i>
	<i>Terrapene Herpesvirus</i>

II - 3 - 1 - 2 Structure des *Herpesvirus*

Herpesvirus est un virus enveloppé, constitué d'ADN double brin et linéaire avec 120 à 180 kb de nucléotides. Le virion se présente sous une forme sphérique de 120 à 200 nm et comporte de quatre parties (Figure 1) :

- **enveloppe** entourant le tégument.
- **tégument** entourant la capside : il est constitué de matériels globulaires asymétriques.
- **capside** (100 - 110 nm) icosaédrique avec 5 capsomères sur chaque bord, contenant 150 capsomères hexamériques et 12 capsomères pentamériques.
- **core** du virus dans lequel l'ADN est localisé (Figure 2) (<https://viralzone.expasy.org/176>).

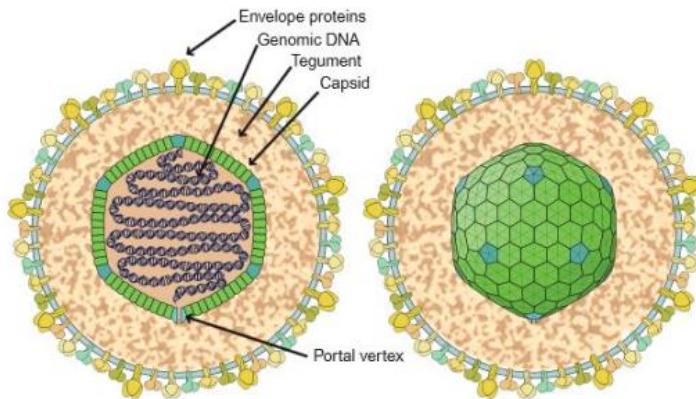


Figure 1 : Structure du virion d'*Herpesvirus*.

(Source : <http://viralzone.expasy.org>)

Le génome des *Herpesvirus* est constitué de séquences unique longue et de séquences unique courte. Les séquences répétées sont présentes dans la partie interne du génome séparant les séquences uniques longue et courte et sur l'extrémité du génome (Figure 2).



- U_L (*Unique Long*) : séquence unique longue
- U_S (*Unique Short*) : séquence unique courte
- TR_L (*Terminal Reiterated Long*) : séquence répétée dans la partie terminale de la séquence longue
- TR_S (*Terminal Reiterated Short*) : séquence répétée dans la partie terminale de la séquence courte
- IR_L (*Internal Reiterated Long*) : séquence répétée à l'intérieur de la séquence
- IR_S (*Internal Reiterated Short*) : séquence répétée à l'intérieur de la séquence

Figure 2 : Structure du génome d'*Herpesvirus*.

(Source : <http://viralzone.expasy.org>)

II - 3 - 1 - 3 Réplication virale des *Alphaherpesvirinae*

La réplication virale des *Alphaherpesvirinae* se déroule comme suit :

- *Adsorption du virus au récepteur de l'hôte* : les glycoprotéines virales se fixent sur le récepteur de la cellule de l'hôte pour ensuite amorcer un phénomène d'endocytose.
- *Fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire* : la capsidé du virion est libérée dans le cytoplasme de la cellule de l'hôte.
- *Réplication virale* : l'ADN viral libéré se réplique dans le noyau de la cellule infectée. L'ADN viral est ensuite transcrit en ARN messager (ARNm), l'ARNm transcrit est transféré dans le cytoplasme puis traduit en protéines. La réplication virale dans la cellule de l'hôte est favorisée par les éléments de la cellule.
- *Maturation* : après l'assemblage des particules dans le noyau, la capsidé et l'enveloppe du virus se forment, respectivement, à partir de la membrane nucléaire et de la membrane plasmique de la cellule lors du bourgeonnement (<https://viralzone.expasy.org/15>).

II - 3 - 2 *Mycoplasma*

II - 3 - 2 - 1 Classification

Mycoplasma est une bactérie appartenant à la division des *Tenericutes*, à la classe des *Mollicutes*, à l'ordre *Mycoplasmales*, à la famille des *Mycoplasmataceae*, au genre *Mycoplasma* (Tableau 2). *Mycoplasma agassizii* et *Mycoplasma testudinis* ont été les premières espèces de *Mycoplasma* identifiées et étudiées chez les tortues, cette dernière étant non pathogène (Brown *et al.*, 1995). *Mycoplasma agassizii* a été isolé dans les choanes d'une espèce de tortue, *Xerobates agassizii*, atteinte d'une maladie respiratoire (Brown *et al.*, 1994). Cette espèce de *Mycoplasma* a été identifiée responsable de la maladie respiratoire grave chez les tortues (Brown *et al.*, 1999 ; Brown *et al.*, 2001 ; Germano *et al.*, 2014 ; Jacobson *et al.*, 2014). Une autre espèce, *Mycoplasma testudineum*, a été identifiée plus tardivement comme responsable de maladies respiratoires (Brown *et al.*, 2004).

Tableau 2 : Classification de *Mycoplasma* identifiés chez les tortues terrestres.

(Source : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=33922>)

Règne	: <i>Bacteria</i>
Division	: <i>Tenericutes</i>
Classe	: <i>Mollicutes</i>
Ordre	: <i>Mycoplasmatales</i>
Famille	: <i>Mycoplasmataceae</i>
Genre	: <i>Mycoplasma</i>
	: <i>agassizii</i>
Espèces	<i>testudinis</i> <i>testudineum</i>

II - 3 - 2 - 2 Structure

Mycoplasma est une bactérie de petite taille, sans paroi cellulaire ayant un diamètre de 0,2 à 0,3 µm et un ADN double hélice et circulaire. Il a un aspect typique en œuf sur plat au microscope optique. Il est introduit dans la classe des *Mollicutes* du fait de l'absence de paroi cellulaire (Figure 3).

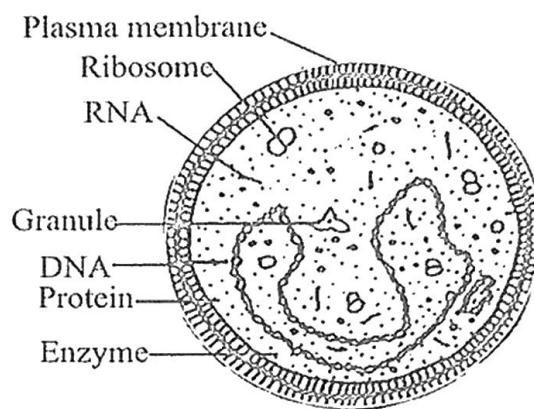


Figure 3 : Structure du *Mycoplasma*

(Source: <http://notestrip11biology2.weebly.com>)

II - 3 - 3 Tropisme cellulaire et transmission d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma*

Les tortues infectées par *Herpesvirus* et *Mycoplasma* peuvent être porteuses de ces agents pathogènes pendant plusieurs années sans présenter de signes cliniques (Dickinson *et al.*, 2005).

Herpesvirus et *Mycoplasma* infectent les cellules des muqueuses buccales, nasales et bronchiques et les cellules de l'épithélium. Ces agents pathogènes sont transmis par contact direct par la salive, les sécrétions nasales et le mucus. Ces agents pathogènes peuvent parfois être transmis par les fèces. Le combat des individus mâles et l'accouplement favorisent la transmission intraspécifique (entre-espèce) de ces agents (Soares *et al.*, 2004).

II - 3 - 4 Signes cliniques de l'infection d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma*

L'apparition des signes cliniques associés à l'infection par *Herpesvirus* et par *Mycoplasma* chez les tortues dépend de plusieurs facteurs, notamment, des espèces touchées, de la saison de l'infection, et de l'environnement des tortues (Gandar *et al.*, 2015). Le symptôme principal de l'infection de ces agents est l'écoulement nasal abondant. Des infections buccales et oculaires, une rhinite, une œsophagite, une glossite, une conjonctivite, un œdème palpébral, une trachéite, une pharyngite, une encéphalite, ou une hépatite peuvent aussi se présenter (Hervás *et al.*, 2002 ; Dickinson *et al.*, 2005 ; Salinas *et al.*, 2011 ; Gandar *et al.*, 2015).

Mycoplasma agassizii entraîne, particulièrement, des infections nasales et une dégénérescence des cellules épithéliales des tortues (Brown *et al.*, 1995).

II - 3 - 5 Maladies causées par *Herpesvirus* et *Mycoplasma*

L'*Upper Respiratory Tract Disease* (URTD) ou maladie de la voie respiratoire supérieure est la cause majeure du déclin de la population des tortues dans le monde (Brown *et al.*, 1994 ; Salinas *et al.*, 2011). Cette maladie respiratoire est due à la présence des espèces d'*Herpesvirus* et/ou de l'espèce bactérienne,

Mycoplasma agassizii, dans les muqueuses du tractus respiratoire des tortues (Johnson *et al.*, 2005 ; Jacobson *et al.*, 2014).

L'évolution de la maladie peut provoquer des maladies graves telles que l'anorexie, la cachexie, la léthargie, l'émaciation et l'atteinte du système nerveux comme la tête circulante et inclinée (Johnson *et al.*, 2005). Les stades avancés de ces maladies entraînent la mort des espèces (Gandar *et al.*, 2015).

II - 3 - 6 Immunité des tortues face aux agents pathogènes

La réponse immunitaire des tortues face aux agents pathogènes sont non spécifiques par l'intermédiaire des interférons, des compléments, des lysozymes et par le phénomène de phagocytose. L'immunité spécifique a été aussi mise en évidence par la production des immunoglobulines (Ig) M et G (Reme, 1980).

III - MATÉRIELS ET MÉTHODES

III - 1 MATÉRIELS

III - 1 - 1 Contrôles positifs d'ADN d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma*

Un contrôle positif est indispensable pour mettre en place une technique. La mise au point des techniques moléculaires pour détecter *Herpesvirus* et *Mycoplasma* a été réalisée en utilisant comme contrôles positifs de l'ADN fixé sur papier buvard et de l'ADN en solution de ces deux agents pathogènes.

Pour le cas d'*Herpesvirus*, de l'ADN de *Chelonid Herpesvirus* fixé sur papier buvard (10 mm de longueur et 6 mm de largeur) et une solution d'ADN de *Testudinid Herpesvirus* type 3 (TeHV3) ont été utilisés.

Pour le cas de *Mycoplasma*, les contrôles positifs utilisés ont été de l'ADN de *Mycoplasma agassizii* fixé sur deux papiers buvards (10 mm de long et 6 mm de large chacun) et une solution d'ADN de cette même espèce.

Ces contrôles positifs ont été fournis par l'ONG DWCT.

III - 1 - 2 Échantillons de lavage nasal de tortues

Les échantillons testés pendant cette étude ont été des échantillons de lavage nasal de tortues de volume entre 0,8 - 1,8 ml. Ces individus, au nombre de 275, appartiennent à l'espèce *Astrochelys yniphora* (182) et *Pyxis planicauda* (93). Ces espèces de tortues ont été mises en quarantaine dans les sites de DWCT depuis plusieurs années suite à la capture et à la tentative d'exportation illégale de ces tortues.

III - 2 MÉTHODES

III - 2 - 1 Élution d'ADN de *Chelonid Herpesvirus* et de *Mycoplasma agassizii* fixés sur papier buvard

III - 2 - 1 - 1 Principe

Cette étape consiste à récupérer l'ADN de *Chelonid Herpesvirus* et l'ADN de *Mycoplasma agassizii* fixés à partir de papiers buvards. L'ADN a été élué en utilisant un tampon d'élution contenu dans des kits commerciaux d'extraction d'ADN « QIAamp® DNA Mini kit » et « QIAamp® DNA Blood Mini kit » (QIAGEN).

III - 2 - 1 - 2 Mode opératoire

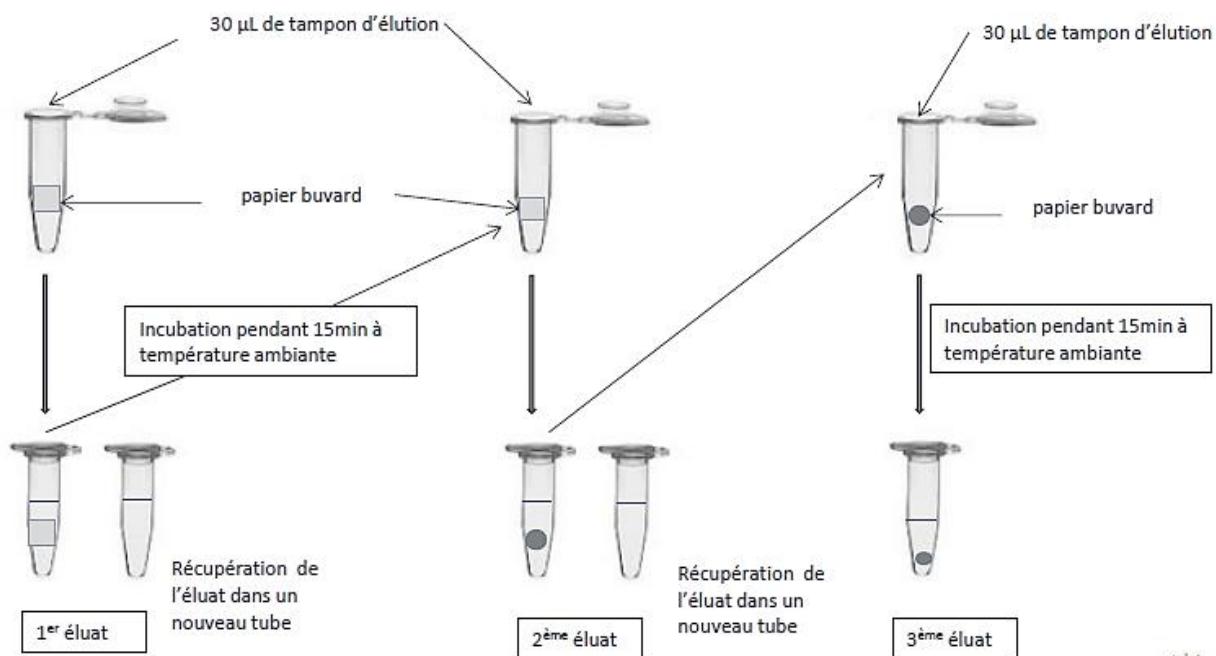
Les papiers buvards (n=1 pour *Chelonid Herpesvirus* et n=2 pour *Mycoplasma agassizii*) ont été coupés en deux parties. L'élution de l'ADN fixé sur ces papiers buvards a été faite avec deux différentes méthodes d'élution.

La première méthode a été l'élution d'ADN sur papier buvard en trois étapes consécutives et en utilisant 30 µl de tampon d'élution pour chaque étape de l'élution. Les trois éluats (produits d'élution) obtenus ont été ensuite mélangés.

Une autre méthode d'élution d'ADN à partir de papiers buvards restants a été effectuée avec 50 µl de tampon d'élution. L'élution a été faite en deux étapes successives. Contrairement à la première méthode, les deux éluats n'ont pas été mélangés.

Les deux différentes méthodes d'élution d'ADN ont été réalisées dans le but de pouvoir récupérer une quantité maximale d'ADN sur papier buvard (Figure 4). Les différentes concentrations d'ADN obtenues ont été comparées.

Première méthode d'élution d'ADN



Deuxième méthode d'élution d'ADN

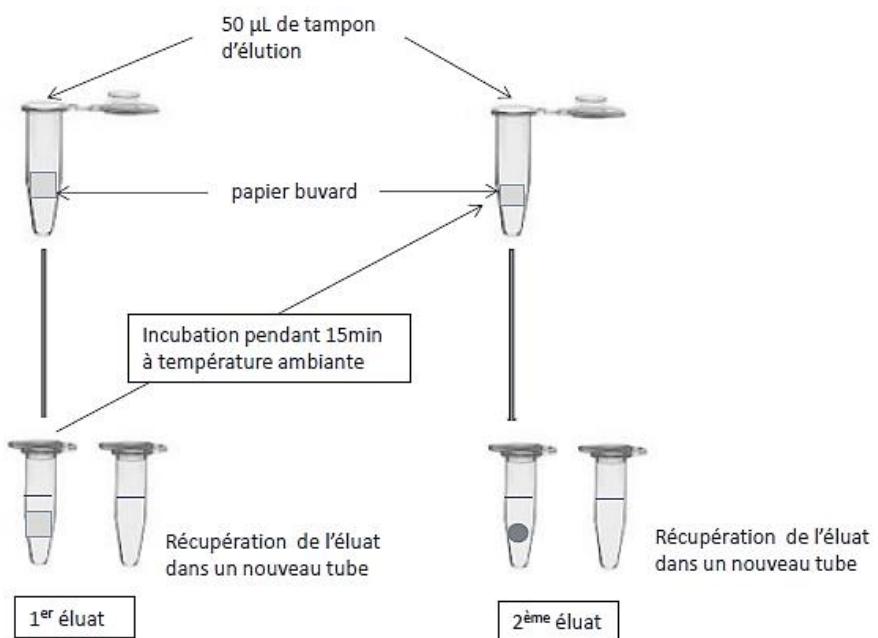


Figure 4 : Schéma récapitulatif de la méthode d'élution d'ADN à partir du papier buvard.

III - 2 - 2 Analyse moléculaire par *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

III - 2 - 2 - 1 Principe général de la PCR

La PCR permet de déterminer la présence d'une séquence d'acide nucléique d'une espèce recherchée par amplification moléculaire de cette séquence spécifique. Cette amplification est favorisée par la présence d'ADN polymérase, d'amorces et de bases complémentaires de la séquence cible.

La préparation du mélange de réaction (mix de la PCR) a été effectuée dans une salle de laboratoire dédiée. Les réactifs utilisés ont été des réactifs dans un kit « GoTaq2/dNTP mix, Custom » (PROMEGA).

Le mix de la PCR est composé de :

- **solution tampon** pour le maintien du pH du mélange réactionnel ;
- **magnésium** agissant principalement sur l'action de l'ADN polymérase, il est un co-facteur de l'enzyme. En effet, le magnésium est indispensable au bon fonctionnement de l'enzyme mais aussi à l'incorporation des précurseurs et des amorces. Le Chlorure de Magnésium ($MgCl_2$) de concentration de 1 à 4 mM est le plus souvent utilisé ;
- **amorces** fixant sur les extrémités d'une région précise de la séquence du gène cible pour l'initiation d'une synthèse d'ADN double brin ;
- **désoxyribonucléotides triphosphate** (dNTPs) qui sont des précurseurs trinucléotidiques. Après la fixation des amorces sur leur région cible du gène, les dNTPs complètent la formation d'ADN double brin sur la séquence du gène cible ;
- **Taq polymerase**, un enzyme catalysant de la synthèse de l'ADN double brin en favorisant la réaction de l'amplification d'ADN. Le volume de la *Taq polymerase* doit être entre 0,2 - 0,5 μ l : une quantité trop élevée de l'enzyme donne un bruit de fond important voire une inhibition de la réaction.

L'ADN cible a été ajouté au mélange dans une autre salle de laboratoire. Le volume d'ADN utilisé pendant la PCR a été de 5 μ l.

Le volume standard du mélange réactionnel est de 50 μ l. Ce volume a été ajusté avec de l'eau pure (H_2O).

Le **profil thermique** de l'amplification génique comporte trois étapes. Les étapes suivantes correspondent à un cycle et 25 à 40 cycles sont effectués lors d'une PCR classique ou conventionnelle :

- **dénaturation** (94 - 95°C) : l'ADN double brin se sépare. La liaison hydrogène des bases nucléotidiques est brisée à haute température ;
- **hybridation des amores** (50 - 65°C) : les amores se fixent sur les extrémités de la séquence à amplifier. La température d'hybridation doit être inférieure à la température de fusion (T_m = *melting temperature*) des amores. La température de fusion est déterminée par la formule suivante :

$$T_m = [2 \times (A + T)] + [4 \times (G + C)]$$

- T_m : température de fusion d'ADN
- A, T, G, C : bases nucléotidiques

Cette formule est valable pour les amores moins de 25 nucléotides ;

- **extension des amores** (72°C) : cette phase est favorisée par l'ADN polymérase. Les dNTPs se fixent sur les bases complémentaires de la séquence de la matrice.

Dans cette présente étude, trois types de PCR ont été effectués : la PCR conventionnelle, la PCR nichée et la PCR semi-nichée.

- **PCR classique ou conventionnelle** correspondant à la première méthode d'amplification génique décrite par Karry Mullis en 1983 et publiée en 1987 (Mullis et Falloona, 1987) ;
- **PCR nichée** effectuée en deux réactions d'amplification successives. Les amores utilisées pendant la deuxième PCR sont des amores qui ciblent une partie interne de la séquence amplifiée lors de la première PCR ;
- **PCR semi-nichée** effectuée aussi en deux réactions d'amplification successives. L'une des deux amores de la deuxième PCR est l'amorce utilisée au cours de la première. L'autre amorce cible une partie interne de la séquence déjà amplifiée lors de la première PCR.

Pour les PCR nichée et semi-nichée, la sensibilité des méthodes est augmentée.

III - 2 - 2 - 2 Optimisation de la PCR pour la détection d'*Herpesvirus*

Trois types de PCR : PCR conventionnelle, PCR semi-nichée et PCR nichée ont été effectués pour trouver la technique pertinente pour détecter des *Herpesvirus* chez les tortues à partir des contrôles positifs fournis.

Les amorces utilisées pendant la PCR conventionnelle sont des amorces spécifiques qui ciblent le gène 12S rRNA des *Herpesvirus* trouvés chez des tortues terrestres (Soares *et al.*, 2004). Pour la PCR semi-nichée, les amorces utilisées sont des amorces spécifiques ciblant le gène codant l'ADN polymérase des *Herpesvirus* trouvés chez des tortues terrestres (Murakami *et al.*, 2001). Pour le cas de la PCR nichée, les amorces utilisées sont des amorces dégénérées ayant comme cible une région conservée du gène codant l'ADN polymérase de tous *Herpesvirus* (VanDevanter *et al.*, 1999). (Tableau 3 ; Annexe 6).

Tableau 3 : PCR utilisées pour la détection d'*Herpesvirus* chez les tortues.

Type de PCR	Amorces	Région cible	Références
conventionnelle	spécifiques	12S rRNA	Soares <i>et al.</i> , 2004
semi-nichée	spécifiques	gène codant l'ADN polymérase	Murakami <i>et al.</i> , 2001
nichée	dégénérées	région conservée du gène codant l'ADN polymérase	VanDevanter <i>et al.</i> , 1999

L'ADN de *Chelonid Herpesvirus* élué sur papier buvard, la solution d'ADN pure de TeHV3 et celle diluée au 10^{ème} ont été utilisées pendant la mise au point de la technique. Les protocoles et les profils thermiques de chaque PCR sont décrits dans les Tableaux 4, 5 et 6.

Tableau 4 : Protocole (A) et profil thermique (B) de la PCR conventionnelle ciblant le gène 12S rRNA d'*Herpesvirus* chez les tortues.

4.A

Protocole		
Réactifs	Volume du mix PCR (μl)	
eau pure	21,6	
tampon du mix	5X	10,0
MgCl ₂	25 mM	4,0
dNTPs	10 mM	3,0
amorce sens	10 μM	3,0
amorce anti - sens	10 μM	3,0
Taq polymérase	5 U/μl	0,4
ADN		5,0
volume total	50,0	

4.B

Profil thermique			
Étapes	Température	Temps	Nombre de cycles
dénaturation	95°C	5 min	
dénaturation	95°C	60 s	
hybridation	37°C (1 ^{er} - 10 ^{ème}) 45°C (11 ^{ème} - 20 ^{ème}) 50°C (21 ^{ème} - 30 ^{ème}) 53°C (31 ^{ème} - 40 ^{ème})	60 s	40 cycles
élongation	72°C	60 s	
élongation finale	72°C	10 min	

Tableau 5 : Protocole (A) et profil thermique (B) de la PCR semi-nichée ciblant le gène de l'ADN polymérase d'*Herpesvirus* chez les tortues.

5.A

Protocole		
Réactifs	Volume du mix PCR (μl) (1^{ère} et 2^{ème} PCR)	
eau pure		21,6
tampon du mix	5X	10,0
MgCl ₂	25 mM	4,0
dNTPs	10 mM	3,0
amorce sens	10 μM	3,0
amorce anti - sens	10 μM	3,0
Taq polymérase	5 U/μl	0,4
ADN		5,0
volume total	50,0	

5.B

Profil thermique			
Étapes	Température	Temps	Nombre de cycles
dénaturation	94°C	3 min	
dénaturation	94°C	30 s	35 cycles (1 ^{ère} PCR) 20 cycles (2 ^{ème} PCR)
hybridation	54°C	60 s	
élongation	72°C	60 s	
élongation finale	72°C	10 min	

Tableau 6 : Protocole (A) et profil thermique (B) de la PCR nichée ciblant une région conservée du gène de l'ADN polymérase de tous *Herpesvirus*.

6.A

Protocole			
Réactifs	Volume du mix PCR (μl)		
	1^{ère} PCR	2^{ème} PCR	
eau pure	18,6	21,6	
tampon du mix	5X	10,0	10,0
MgCl ₂	25 mM	4,0	4,0
dNTPs	10 mM	3,0	3,0
amorce sens (2)	10 μM	6,0 (3x2)	3,0
amorce anti - sens	10 μM	3,0	3,0
Taq polymérase	5 U/μl	0,4	0,4
ADN		5,0	5,0
volume total	50,0	50,0	

6.B

Profil thermique			
Étapes	Température	Temps	Nombre de cycles
dénaturation	94°C	5 min	
dénaturation	94°C	30 s	
hybridation	46°C	60 s	
élongation	72°C	60 s	45 cycles
élongation finale	72°C	7 min	

III - 2 - 2 - 3 Optimisation de la PCR pour la détection de *Mycoplasma*

La technique de détection de *Mycoplasma* a été adaptée à partir d'une technique publiée dans l'article de Brown *et al.*, (1995). Les paramètres de variation utilisés pendant la PCR ont été basés sur la concentration de MgCl₂ et sur l'utilisation d'ADN pure et diluée au 10^{ème} pour le cas de l'ADN en solution (Tableau 7).

Tableau 7 : Protocole (A) et profil thermique (B) de la PCR conventionnelle du gène 16S rRNA de *Mycoplasma* chez les tortues.

7.A

Réactifs	Protocole		
	Volume du mix PCR (μl)		
	1 ^{er} essai	2 ^{ème} essai	3 ^{ème} essai
eau pure	22,6	22,1	21,6
tampon du mix	5X	10,0	10,0
MgCl ₂	25 mM	3,0	3,5
dNTPs	10 mM	3,0	3,0
amorce sens	10 μM	3,0	3,0
amorce anti - sens	10 μM	3,0	3,0
Taq polymérase	5 U/μl	0,4	0,4
ADN		5,0	5,0
volume total	50,0	50,0	50,0

7.B

Profil thermique			
Étapes	Température	Temps	Nombre de cycles
dénaturation	94°C	5 min	
dénaturation	94°C	45 s	50 cycles
hybridation	55°C	60 s	
élongation	72°C	45 s	
élongation finale	72°C	10 min	

III - 2 - 3 Extraction d'ADN à partir des échantillons de lavage nasal de tortues

Cette étape consiste à récupérer les acides nucléiques dans un échantillon biologique pour une analyse moléculaire. Dans cette étude, l'ADN est l'acide nucléique à extraire dans les échantillons de lavage nasal de tortues.

Deux méthodes d'extraction d'ADN ont été réalisées sur quatre (4) échantillons : une extraction d'ADN sans purification et une extraction d'ADN avec purification. La méthode pertinente permettant d'avoir une bonne qualité et une quantité suffisante d'ADN pour les analyses moléculaires sera utilisée pour extraire l'ADN dans tous les échantillons restants.

III - 2 - 3 - 1 Extraction d'ADN sans purification à partir de quatre échantillons

- **Principe**

L'extraction d'ADN est basée sur la lyse cellulaire et la dénaturation des protéines de la cellule pour récupérer l'ADN dans la cellule. Une étape de purification d'ADN est absente pour cette méthode.

- **Mode opératoire**

Cette méthode d'extraction d'ADN a été décrite dans la publication de Brown *et al.* en 1999. Les étapes à suivre pour cette méthode d'extraction d'ADN sont les suivantes (Figure 5) :

- *Centrifugation*

Les échantillons de lavage nasal ont été centrifugés à 16000 x g pendant 60 min à 4°C pour que les cellules muqueuses soient déposées au fond du tube. Le surnageant a été aspiré en laissant 20 µl de celui-ci pour éviter l'aspiration du culot.

- *Lyse cellulaire et dénaturation des protéines*

20 µl de tampon de lyse et 4 µl de protéinase K (ou de protéase) ont été ajoutés dans le tube contenant le culot et le reste de surnageant. Le mélange a été incubé à 37°C pendant 16 heures (h) pour la lyse cellulaire et à 97°C pendant 15 min pour la dénaturation de la protéinase K (ou de la protéase). La protéinase K, la

protéase et le tampon de lyse utilisés sont ceux contenus dans les kits commerciaux de QIAGEN mentionnés ci-dessus.

La solution obtenue a été directement utilisée pour l'analyse moléculaire.

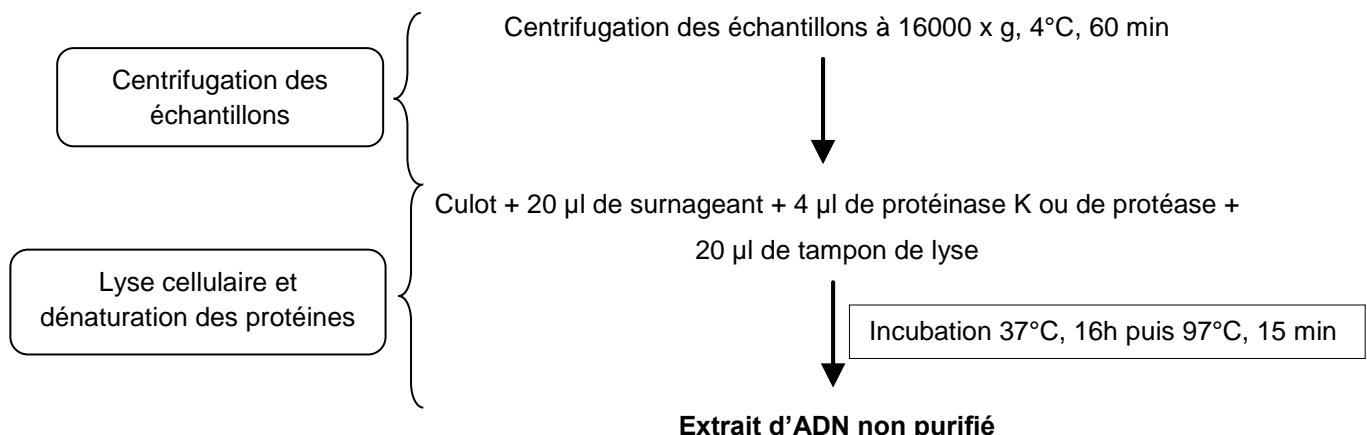


Figure 5 : Schéma des étapes de l'extraction d'ADN sans purification.

III - 2 - 3 - 2 Extraction d'ADN avec purification à partir de quatre échantillons

- **Principe**

L'extraction de l'ADN consiste sur la lyse cellulaire suivie d'une précipitation et d'une séparation d'ADN des autres molécules et des débris cellulaires par chromatographie sur colonne-filtre. Les molécules d'ADN précipitées ne passent pas entre les pores de la membrane de la colonne alors que les autres molécules et les débris cellulaires sont exclus en traversant la membrane. L'ADN est ensuite élué par de l'eau distillée ou par un tampon d'élution.

- **Mode opératoire**

L'extraction et la purification d'ADN de tortues dans les échantillons de lavage nasal ont été effectuées à partir de kits commerciaux « QIAamp® DNA Mini kit » ou « QIAamp® DNA Blood Mini kit » (QIAGEN). La différence entre ces deux kits est l'enzyme contenu ceux-ci. En effet, l'enzyme inclus dans « QIAamp® DNA Mini kit » est la protéinase K et celui dans « QIAamp® DNA Blood Mini kit » est la protéase. Le guide du kit « QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook » indique

que l'utilisation de ces deux différents enzymes pour le cas des échantillons de lavage nasal n'affecte pas le résultat obtenu après l'extraction et la purification d'ADN dans ce type d'échantillon.

L'extraction d'ADN des échantillons de lavage nasal de tortues a été faite à partir des étapes suivantes (Figure 6) :

➤ *Centrifugation*

Les échantillons ont été centrifugés à 10000 x g pendant 15 minutes (min). 200 µl de surnageant ont été laissés dans le tube avec le culot. Le reste a été aspiré.

➤ *Lyse cellulaire et dénaturation des protéines*

Après avoir bien mélangé le culot avec les 200 µl de surnageant restant de l'étape précédente, 200 µl de tampon de lyse et 20 µl de protéinase K (enzyme dans « QIAamp® DNA Mini kit ») ou de protéase (enzyme dans « QIAamp® DNA Blood Mini kit ») ont été ajoutés. Le mélange a été homogénéisé au vortex pendant 15 secondes (s) avant une incubation à 56°C pendant 10 min.

➤ *Précipitation d'ADN*

200 µl d'éthanol absolu (96 - 100 %) ont été ajoutés dans le lysat (produit de lyse). Le mélange a été agité au vortex pendant 15 s. Une courte centrifugation de 10 s est nécessaire après le mélange pour déplacer quelques gouttes de la solution se trouvant sur la paroi du tube.

➤ *Adsorption de l'ADN sur la membrane d'une colonne de silice*

Le mélange du lysat avec de l'éthanol a été introduit dans une colonne de silice. L'ADN précipité a été adsorbé sur la membrane de la colonne après une centrifugation à 6000 x g pendant 1 min. Le reste du lysat qui a traversé la membrane a été récupéré dans un tube collecteur, puis jeté.

➤ *Lavage*

Deux lavages successifs ont été effectués pour éliminer les impuretés.

500 µl de tampon de lavage 1 ont été ajoutés dans la colonne. Une centrifugation à 6000 x g pendant 1 min a été réalisée et le filtrat (produit de filtration) a été jeté. Un deuxième lavage avec 500 µl de tampon de lavage 2, suivi d'une centrifugation à 20000 x g pendant 3 min ont été réalisés. Le filtrat a été jeté.

➤ *Élution d'ADN*

100 µl de tampon d'élution ont été ajoutés dans la colonne. L'éluat a été obtenu après une incubation de 5 min à température ambiante et une centrifugation à 6000 x g pendant 1 min. L'ADN obtenu a pu être utilisé directement pour une analyse moléculaire ou conservé à - 20°C jusqu'à l'utilisation.

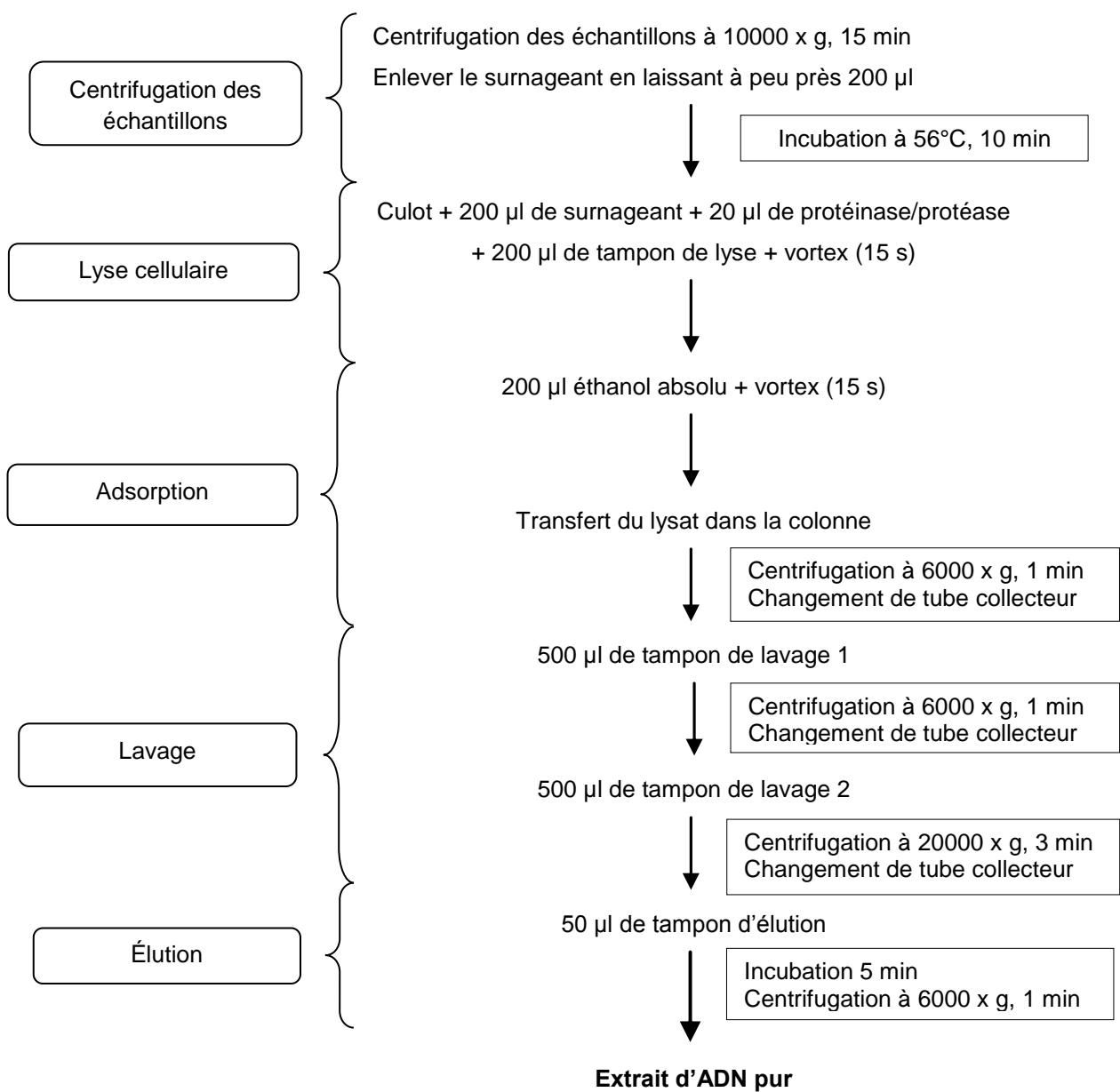


Figure 6 : Schéma des étapes de l'extraction d'ADN avec purification.

III - 2 - 4 Analyse de la présence du gène de la β - actine (gène de ménage) dans les extraits d'ADN

Une détection de gène de ménage de tortues a été effectuée sur les extraits pour confirmer la présence d'ADN des tortues dans ces extraits. Cette détection de gène de ménage permet de valider l'étape d'extraction d'ADN des échantillons et d'éviter de mauvaises interprétations dans les résultats des analyses moléculaires. Le gène de la β - actine a été le gène de ménage à rechercher dans les extraits (Rebouças *et al.*, 2013). La PCR utilisée a été choisie dans une publication de Dacheux *et al.* (2008) (Tableau 8).

Tableau 8 : Protocole (A) et profil thermique (B) de la PCR conventionnelle ciblant le gène de la β - actine chez les tortues.

8.A

Protocole	
Réactifs	Volume du mix PCR (μ l)
eau pure	21,6
tampon du mix	5X
$MgCl_2$	25 mM
dNTPs	10 mM
amorce sens	10 μ M
amorce anti - sens	10 μ M
Taq polymérase	5 U/ μ l
ADN	5,0
volume total	50,0

8.B

Profil thermique			
Étapes	Température	Temps	Nombre de cycles
dénaturation	94°C	3 min	
dénaturation	94°C	30 s	40 cycles
hybridation	56°C	45 s	
élongation	72°C	40 s	
élongation finale	72°C	3 min	

III - 2 - 5 Analyse de la présence d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma* dans les extraits d'ADN

En tenant compte des résultats obtenus après les différentes PCR et les méthodes d'extraction d'ADN effectuées, les étapes suivantes ont été suivies pour l'analyse de tous les échantillons :

- Extraction d'ADN dans échantillons de lavage nasal de tortues ;
- Mesure de la concentration d'ADN dans les extraits obtenus ;
- Détection du gène de la β - actine dans les extraits d'ADN des tortues ;
- Détection d'*Herpesvirus* dans les extraits d'ADN des tortues à partir de la technique optimisée ;
- Détection de *Mycoplasma* dans les extraits d'ADN des tortues à partir de la technique optimisée.

III - 2 - 6 Dosage de l'ADN dans les extraits obtenus

La concentration d'ADN des éluats obtenus à partir de papiers buvards et celle des extraits d'ADN à partir des échantillons a été mesurée par un spectrophotomètre « Nanodrop 2000 » (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, U.S.A.). Cet appareil permet de mesurer la concentration d'acides nucléiques et de protéines et d'indiquer la pureté d'un extrait d'ADN à partir d'un ratio de l'absorbance à 260 nm et à 280 nm (A260/A280). Un extrait d'ADN est considéré comme pur si ce ratio d'absorbance A260/A280 est supérieur ou égal à 1,8. A part le ratio A260/A280, un deuxième ratio d'absorbance A260/A230 peut aussi indiquer la pureté d'un extrait d'ADN. Dans cette étude, le ratio d'absorbance utilisé pour indiquer la pureté d'un extrait d'ADN a été le ratio A260/A280.

III - 2 - 7 Électrophorèse sur gel d'agarose

• Principe

L'électrophorèse est une technique de séparation des acides nucléiques suivant leur poids moléculaire sous l'effet d'un champ électrique. L'électrophorèse sur gel d'agarose permet la séparation des fragments d'ADN de 100 paires de base (pb) jusqu'à 60 000 pb. L'ADN chargé négativement migre de la cathode vers l'anode suivant le poids moléculaire. La révélation est réalisée sous Ultraviolet (UV)

en observant une fluorescence émise en présence du réactif SYBER SAFE, un agent intercalant de l'ADN.

- **Mode opératoire**

Un tampon de Tris - acétate EDTA 0,5X (TAE) (20 mM Tris - acétate, 0,5 mM EDTA) a été mélangé avec une poudre d'agarose pour obtenir un gel (à 60°C). Le pourcentage du gel utilisé varie suivant la taille attendue du produit d'amplification après la PCR effectuée. En effet, la migration pour les produits d'amplification après la PCR pour le gène de ménage et *Mycoplasma* a été effectuée avec 1,5 % de gel d'agarose. Pour le cas d'*Herpesvirus*, les produits de la PCR nichée qui ont été migrés avec 2 % de gel d'agarose.

La migration a été effectuée dans une cuve électrophorétique contenant du tampon TAE 0,5X. Un marqueur de poids moléculaire « DNA Ladder 100 pb » a été utilisé pour la mesure de la taille des bandes obtenues après migration.

La révélation des bandes sur gel a été faite en utilisant un transilluminateur UV appelé « gel scan ». Le résultat obtenu a été photographié pour l'interprétation. La confirmation de la présence de l'ADN cible dans les produits d'amplification est déduite de la révélation des bandes de taille identique à celle du contrôle positif.

III - 2 - 8 Séquençage des produits d'amplification

Les produits d'amplification avec lesquels les bandes attendues ont été révélées ont été soumis à une réaction de séquençage pour déterminer les séquences nucléotidiques correspondant aux bandes révélées. Le laboratoire, GENEWIZ (GENEWIZ France Ltd) a réalisé le séquençage. Les résultats du séquençage ont été ensuite analysés en utilisant BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) pour rechercher les espèces correspondantes aux produits du séquençage.

IV - RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

IV - 1 OPTIMISATION DE TECHNIQUES MOLÉCULAIRES

IV - 1 - 1 Concentration d'ADN dans les contrôles positifs d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma*

Comme attendu, les concentrations d'ADN dans les éluats obtenus à partir des papiers buvards diminuent suivant l'étape d'élution. La méthode d'élution en trois étapes consécutives a permis de récupérer la quantité maximale d'ADN sur le papier buvard (Annexe 7).

Pour le cas de l'ADN en solution, la concentration d'ADN dans la solution observée a été plus faible ($\approx 6 \text{ ng}/\mu\text{l}$) par rapport à la concentration de l'ADN élué à partir du papier buvard.

Pourtant, malgré la faible concentration d'ADN pour l'ADN en solution, le ratio A260/A280 de l'ADN en solution est supérieur à celui de l'ADN fixé sur papier buvard. Ainsi, l'ADN en solution est plus pur que l'ADN fixé sur papier buvard (Tableau 9).

Tableau 9 : Valeurs de concentration d'ADN élué à partir de papier buvard et d'ADN en solution d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma*

	<i>Herpesvirus</i>		<i>Mycoplasma</i>	
	ADN sur papier buvard	Solution d'ADN	ADN sur papier buvard	Solution d'ADN
Concentration d'ADN (ng/ μl)	[12,5 - 92,0]	5,8	[11,6 - 81,7]	6,6
Ratio A260/A280	[1,2 - 1,3]	1,9	[1,1 - 1,3]	1,8

Ces différents éluats ont été utilisés pour effectuer les différentes PCR pendant la partie de mise au point, puis comme contrôle positif pendant l'analyse moléculaire des échantillons de lavage nasal.

IV - 1 - 2 Mise au point des PCR pour la détection d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma*

Dans cette partie (IV - 1 - 2), les images A montrent les résultats après PCR en utilisant comme contrôle positif l'ADN sur papiers buvards (ADN de *Chelonid Herpesvirus* et de *Mycoplasma agassizii*) ; les images B indiquent les résultats après PCR avec la solution d'ADN de TeHV3 et de *Mycoplasma agassizii*.

IV - 1 - 2 - 1 Détection d'*Herpesvirus*

Les résultats obtenus après les trois types de PCR (conventionnelle, nichée et semi-nichée) avec les contrôles positifs d'*Herpesvirus* sont observés sur les Figures 7, 8 et 9.

- PCR conventionnelle

La taille de la bande attendue après la PCR conventionnelle est entre 182 - 187 pb. Seuls les dimères d'amorces ont été révélés après la PCR avec l'ADN élué à partir du papier buvard (Figure 7.A). Deux bandes non spécifiques ont été mises en évidence après la PCR en utilisant l'ADN en solution (Figure 7.B).

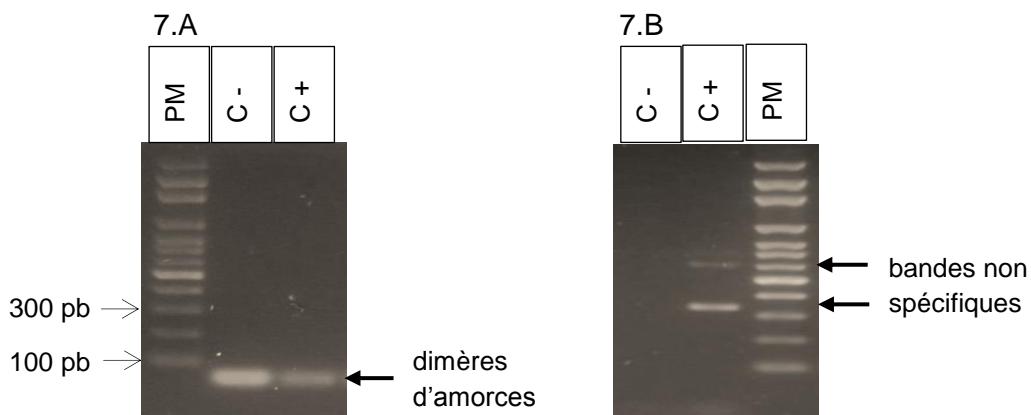


Figure 7 : Analyse sur gel d'agarose après PCR conventionnelle pour la détection du gène 12S rRNA d'*Herpesvirus* des tortues sur (A) l'ADN obtenu à partir du papier buvard et (B) l'ADN en solution.

C - : contrôle négatif

C + : contrôle positif

PM : marqueur de poids moléculaire, 100 pb

- PCR semi-nichée

La taille des bandes attendues après la migration sur gel pour le cas de la PCR semi-nichée sont à 535 pb pour la 1^{ère} PCR et à 319 pb pour la 2^{ème} PCR. Ces bandes attendues n'ont pas été révélées après l'utilisation de l'ADN élué à partir du papier buvard (Figure 8.A). Seules des bandes non spécifiques ont été observées après la PCR semi-nichée. En utilisant l'ADN en solution, après la PCR semi-nichée, la bande à 319 pb et deux autres bandes non spécifiques ont été observées (Figure 8.B). Cependant, la bande à 319 pb n'a pas été identifiée à une espèce d'*Herpesvirus* après une confirmation par séquençage.

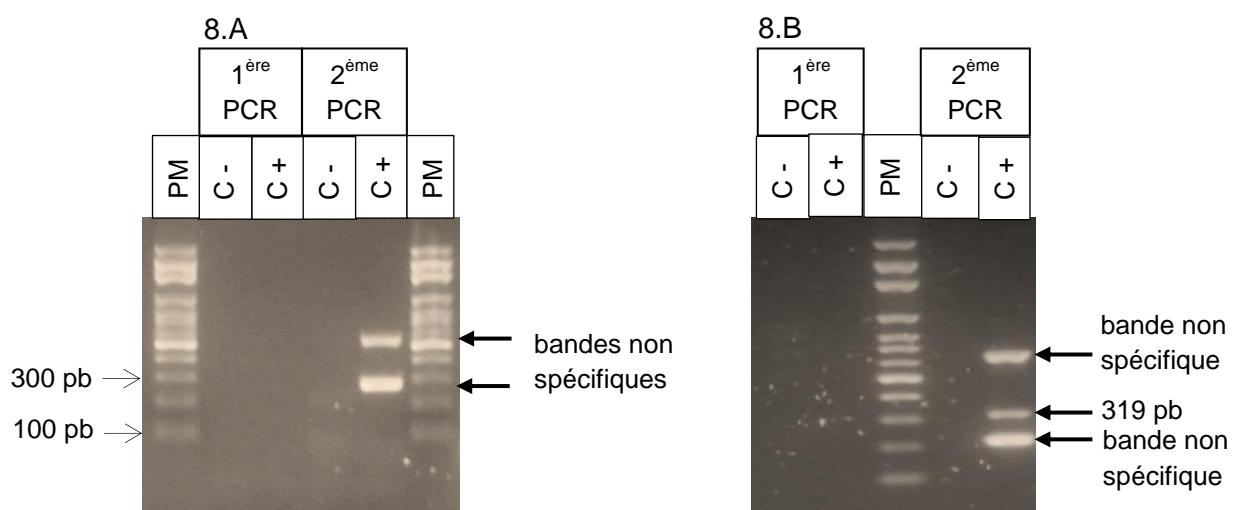


Figure 8 : Analyse sur gel d'agarose après PCR semi-nichée pour la détection du gène de l'ADN polymérase d'*Herpesvirus* des tortues sur (A) l'ADN obtenu à partir du papier buvard et (B) l'ADN en solution.

C - : contrôle négatif

C + : contrôle positif

PM : marqueur de poids moléculaire, 100 pb

- PCR nichée

Après la PCR nichée, les smires observés sur la Figure 9.A pourraient indiquer la présence d'impureté de quantité importante dans l'ADN d'*Herpesvirus* élue à partir du papier buvard. Cette présence d'impureté est cohérente avec la valeur du ratio d'absorbance A260/A280 $\approx 1,2$ observé de ces extraits (Tableau 9).

La bande attendue pour la 2^{ème} PCR, qui est à 267 pb, a pu être révélée avec l'utilisation de la solution d'ADN de TeHV3 (Figure 9.B').

Une bande plus claire et nette a été obtenue après la dilution au 10^{ème} de la solution d'ADN de TeHV3 (Figure 9.B''). Ainsi, *Herpesvirus* peut être détecté à faible concentration d'ADN (5,8 ng/ μ l d'ADN diluée au 10^{ème} correspondent à 0,58 ng/ μ l ou 580 pg/ μ l d'ADN).

Compte tenu de ces différents résultats, la PCR nichée est la technique pertinente parmi les trois types de PCR utilisés pour la détection des *Herpesvirus* chez les tortues.

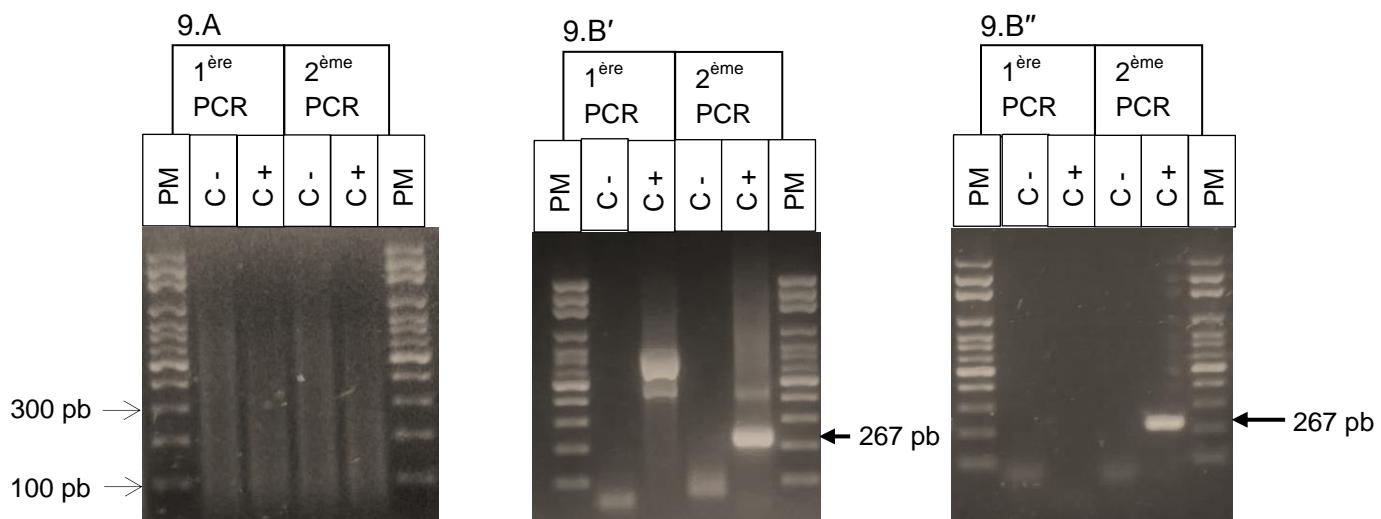


Figure 9 : Analyse sur gel d'agarose après PCR nichée pour la détection du gène de l'ADN polymérase de tous types d'*Herpesvirus* (A) dans l'ADN obtenu à partir du papier buvard, (B') dans la solution d'ADN pure et (B'') dans la solution d'ADN diluée au 10^{ème}.

IV - 1 - 2 - 2 Détection de *Mycoplasma*

Pour la recherche du gène de *Mycoplasma*, après la PCR conventionnelle avec différentes concentrations de MgCl₂ dans le mélange réactionnel (75 µM, 87,5 µM et 100 µM de MgCl₂), la bande attendue à 576 pb a été révélée en utilisant 100µM de MgCl₂ (Figure 10.A). Ainsi, la concentration de MgCl₂ joue un rôle important dans la PCR en favorisant l'amplification génique de l'ADN cible. Cependant, le même résultat n'a pas été obtenu après la reproduction de la manipulation, aucune bande n'a été révélée.

En utilisant la solution d'ADN pure de *Mycoplasma* et celle diluée au 10^{ème}, la bande attendue a été révélée après la migration sur gel (Figure 10.B). Ainsi, du fait que la concentration d'ADN de la solution pure soit de 6,6 ng/µl, *Mycoplasma* peut être détecté à une concentration d'ADN supérieur à 0,6 ng/µl (6,6 ng/µl de solution d'ADN diluée au 10^{ème} correspondent à 0,6 ng/µl ou 600 pg/µl d'ADN).

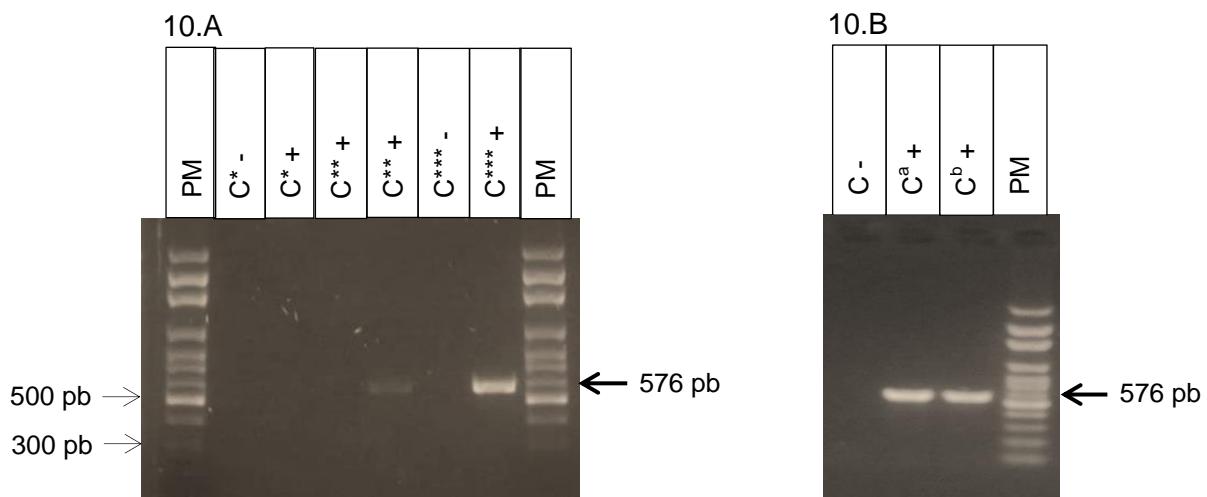


Figure 10 : Analyse sur gel d'agarose après PCR conventionnelle pour la détection du gène 16S rRNA de *Mycoplasma* de tortues (A) dans l'ADN obtenu à partir du papier buvard et (B) dans l'ADN en solution.

- 10.A
$$\begin{cases} \mathbf{C}^* : 75,0 \mu\text{M} \text{ de MgCl}_2 \text{ dans le mélange réactionnel} \\ \mathbf{C}^{**} : 87,5 \mu\text{M} \text{ de MgCl}_2 \text{ dans le mélange réactionnel} \\ \mathbf{C}^{***} : 100 \mu\text{M} \text{ de MgCl}_2 \text{ dans le mélange réactionnel} \end{cases}$$
- 10.B
$$\begin{cases} \mathbf{C}^a : \text{utilisation de la solution pure d'ADN} \\ \mathbf{C}^b : \text{utilisation de la solution d'ADN diluée au 10}^{\text{ème}} \end{cases}$$

IV - 1 - 3 Optimisation de l'extraction d'ADN des échantillons de lavage nasal de tortues

Les résultats de l'extraction d'ADN des tortues sur les quatre (4) échantillons (étude pilote) avec les deux différentes méthodes d'extraction d'ADN sont décrits dans le Tableau 10. A rappeler que la différence entre les deux méthodes est la présence d'étape de purification d'ADN pour la méthode d'extraction avec les kits commerciaux « QIAamp® DNA Mini kit » et « QIAamp® DNA Blood Mini kit » (QIAGEN) et l'absence de purification d'ADN pour la méthode d'extraction adaptée dans la publication de Brown *et al.* (1999).

Les concentrations d'ADN dans les extraits non purifiés ont été entre 276,8 et 554,2 ng/μl (Tableau 10.A) et celles dans les extraits purifiés ont été comprises entre 2,6 et 4,2 ng/μl (Tableau 10.B). Pour l'extraction d'ADN des échantillons avec purification, bien que les concentrations d'ADN obtenues ont été faibles, elles sont comparables aux indications dans le guide des kits « QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook ». En effet, la concentration d'ADN obtenue à partir de ce type d'échantillon (lavage nasal) doit être comprise entre 3 et 23 ng/μl.

Les ratios d'absorbance A260/A280 de tous les extraits ont été supérieurs à 1,8. Ainsi, la présence d'impureté a été faible dans les extraits purifiés et non purifiés.

Tableau 10 : Concentrations d'ADN de quatre extraits (A) non purifiés et (B) purifiés.

10.A

extraits	Concentration d'ADN (ng/μl)	Ratio A260/A280
1	554,2	2,7
2	276,8	2,7
3	566,4	2,6
4	622,7	2,8

10.B

extraits	Concentration d'ADN (ng/μl)	Ratio A260/A280
1	4,2	3,3
2	3,8	2,4
3	2,6	3,1
4	3,6	4,8

IV - 1 - 4 Détection des gènes de ménage de tortues dans quatre extraits d'ADN purifiés et non purifiés

Après recherche du gène de la β - actine dans les quatre extraits d'ADN de tortues, les bandes attendues à 289 pb ont été révélées pour le cas des extraits purifiés (Figure 11.B) tandis qu'aucune bande n'a été observée pour le cas des extraits non purifiés (Figure 11.A). Pour les extraits purifiés, trois (3) extraits parmi les quatre (4) testés ont été sortis positifs.

Suite à ces résultats, l'ADN de tous les échantillons de tortues à tester a été extrait et purifié soit à partir de « QIAamp® DNA Mini kit », soit à partir de « QIAamp® DNA Blood Mini kit » (QIAGEN).

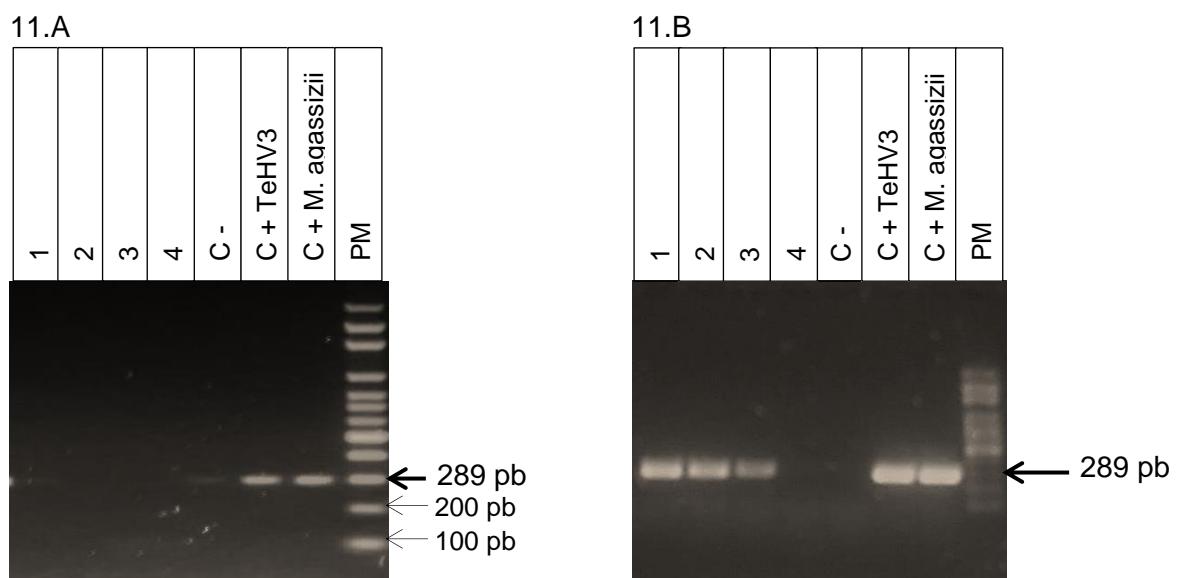


Figure 11 : Analyse sur gel d'agarose après PCR ciblant le gène de la β - actine sur les contrôles positifs et sur les extraits d'ADN de tortues (A) non purifiés et (B) purifiés.

C - : contrôle négatif

C + TeHV3 : contrôle positif, ADN de *Testudinid Herpesvirus 3*

C + M. agassizii : contrôle positif, ADN de *Mycoplasma agassizii*

PM : marqueur de poids moléculaire, 100 pb

1, 2, 3, 4 : les 4 extraits d'ADN de tortues testés

IV - 1 - 5 Résultats du séquençage des produits d'amplification

Les produits d'amplification avec les bandes attendues ont été envoyés dans un laboratoire de séquençage (GENEWIZ France Ltd) pour déterminer les séquences nucléotidiques correspondantes.

Les Figures 12, 13 et 14 présentent les exemples d'électrophorégramme obtenus après le séquençage. Dans ces figures, les pics correspondent aux profils de chaque nucléotide de la séquence.

IV - 1 - 5 - 1 Confirmation de la détection du gène de *Testudinid Herpesvirus* après séquençage

Le séquençage a été effectué à partir des produits de la PCR nichée après la détection d'*Herpesvirus* avec la bande à 267 pb. Les pics d'électrophorégramme sont bien distincts (Figure 12).

Les séquences obtenues après le séquençage ont été alignées sur BLASTn et le résultat a montré l'identité de *Testudinid Herpesvirus* 3 avec 98 % de similarité et un score de 1097.

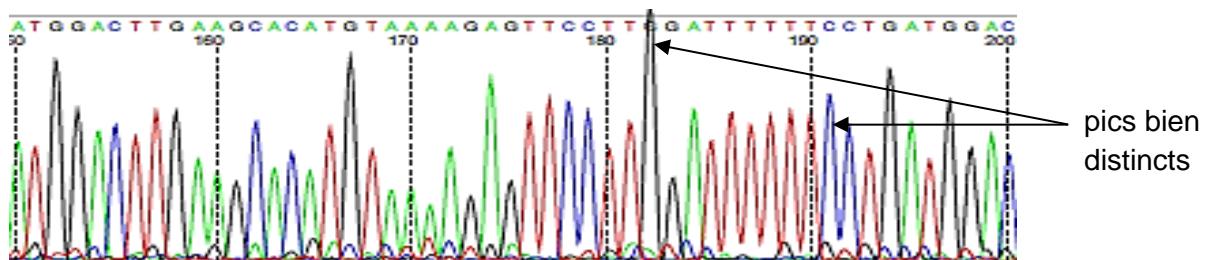


Figure 12 : Type d'électrophorégramme obtenu après séquençage des produits de la PCR nichée pour la détection d'*Herpesvirus* avec le contrôle positif.

IV - 1 - 5 - 2 Confirmation de la détection du gène de *Mycoplasma agassizii* après séquençage

Le séquençage a été réalisé à partir des produits de la PCR conventionnelle correspondant à la bande à 576 pb. L'électrophorégramme obtenu après le séquençage présente de pics bien distincts (Figure 13).

L'alignement sur BLASTn des séquences obtenues a démontré la correspondance de ces séquences à celles du *Mycoplasma agassizii* avec une similarité de 99 % et un score de 906.

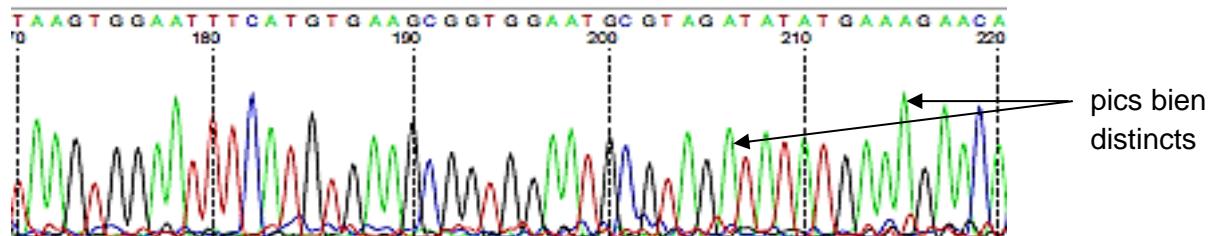


Figure 13 : Type d'électrophorégramme obtenu après séquençage des produits de la PCR conventionnelle pour la détection de *Mycoplasma* avec le contrôle positif.

IV - 1 - 5 - 3 Confirmation de la détection du gène de la β - actine après séquençage

Le séquençage a été fait à partir des produits de la PCR conventionnelle correspondant à la bande à 289 pb après la détection du gène de la β - actine.

Des pics bien distingués ont été observés sur l'électrophorégramme (Figure 14). L'alignement sur BLASTn des séquences obtenues a montré l'identité de séquence d'une tortue terrestre *Trachemys scripta* avec 95 % de similarité et un score de 305.

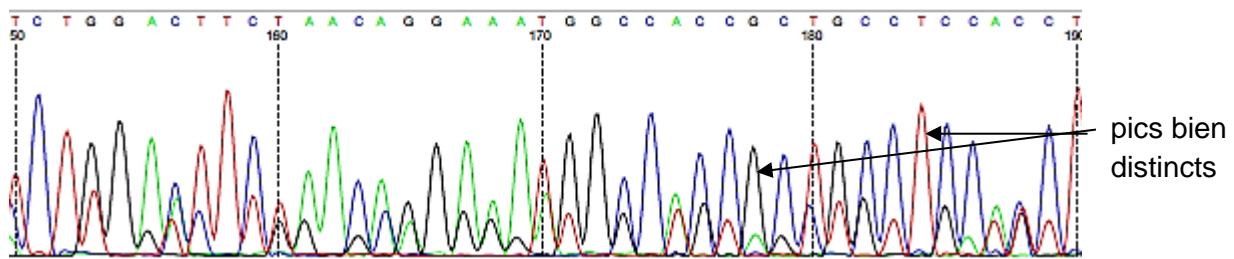


Figure 14 : Type d'électrophorégramme obtenu après séquençage des produits de la PCR conventionnelle pour la détection du gène de ménage dans les trois extraits d'ADN de tortues.

IV - 2 ANALYSE DES ÉCHANTILLONS DE LAVAGE NASAL DE TORTUES À PARTIR DES TECHNIQUES OPTIMISÉES

Après les mises au point des PCR sur les contrôles positifs d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma*, l'analyse des échantillons a été réalisée en suivant les étapes ci-dessous :

- Extraction et purification d'ADN de tortues dans les échantillons de lavage nasal ;
- Recherche du gène de ménage des tortues par PCR conventionnelle dans les extraits d'ADN purifiés en ciblant le gène de la β - actine ;
- Recherche d'*Herpesvirus* par PCR nichée dans les extraits d'ADN de tortues en ciblant la région conservée du gène de l'ADN polymérase de tous types d'*Herpesvirus* ;
- Recherche de *Mycoplasma* par PCR conventionnelle dans les extraits d'ADN purifiés des tortues.

Tableau 11 : Résumé des résultats des analyses de 275 échantillons de lavage nasal de tortues.

Espèces de tortues	Résultat de la PCR pour le gène de ménage des tortues (gène de la β - actine)		Résultat de la PCR pour le gène d' <i>Herpesvirus</i> (gène de l'ADN polymérase)		Résultat de la PCR pour le gène de <i>Mycoplasma</i> (gène 12S rRNA)		Total
	positif	négatif	positif	négatif	positif	négatif	
<i>Astrochelys yniphora</i>	127	55	0	182	0	182	182
<i>Pyxis planicauda</i>	32	61	0	93	0	93	93
Total	159	116	0	275	0	275	275
	275		275		275		

IV - 2 - 1 Extraction et purification d'ADN à partir des échantillons de lavage nasal de tortues

L'extraction d'ADN des échantillons a été effectuée à partir des kits « QIAamp® DNA Mini kit » ou « QIAamp® DNA Blood Mini kit » (QIAGEN). Les concentrations d'ADN des extraits obtenus à partir des 275 échantillons ont été comprises entre 2,1 - 11,4 ng/µl. D'après le Tableau 12, 232 extraits parmi les 275 ont eu une concentration comprise entre 2 - 6 ng/µl. 23 de ces extraits ont eu une concentration d'ADN inférieure à 3 ng/µl et 252 extraits ont eu une concentration d'ADN entre 3 - 23 ng/µl. Tous ces extraits ont été ensuite testés pour la détection du gène de la β - actine avant la recherche d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma* dans ces extraits.

Tableau 12 : Concentrations d'ADN dans tous les extraits d'ADN de tortues testées.

Intervalle de la concentration d'ADN (ng/µl)	Nombre d'extraits
[2 - 4[109
[4 - 6[123
[6 - 8[35
[8 - 10[5
[10 - 12[3
[2 - 12[275

IV - 2 - 2 Recherche du gène de la β - actine (gène de ménage) dans les extraits d'ADN purifiés de tortues

Pour la détection du gène de la β - actine, les bandes attendues à 289 pb ont été révélées pour 159 extraits parmi les 275 après la PCR conventionnelle (Tableau 11). La concentration d'ADN de ces extraits avec lesquels les bandes ont été observées est entre 2,4 - 11,4 ng/µl (Annexe 8).

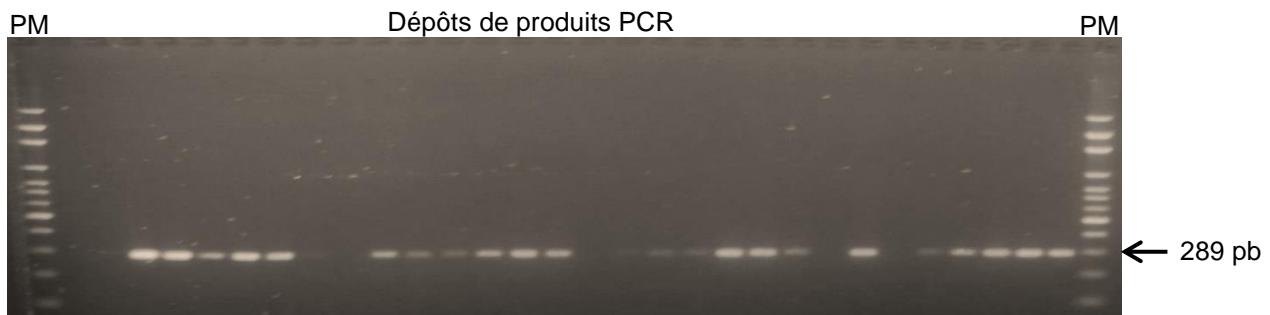


Figure 15 : Exemple de gel d'agarose obtenu après l'analyse des 275 extraits d'ADN de tortues avec PCR conventionnelle ciblant le gène de la β - actine.

IV - 2 - 3 Recherche du gène de l'ADN polymérase d'*Herpesvirus* (région conservée) dans les extraits d'ADN purifiés de tortues

Le contrôle positif utilisé pendant la PCR nichée a été la solution d'ADN de *Testudinid Herpesvirus* 3 diluée au 10^{ème}. Aucun résultat positif n'a été obtenu après la recherche d'*Herpesvirus* dans les 275 extraits d'ADN de tortues obtenus à partir des échantillons de lavage nasal (Tableau 11). Seule la bande du contrôle positif à 267 pb et celles des dimères d'amorces ont été observées après la révélation (Figure 16).

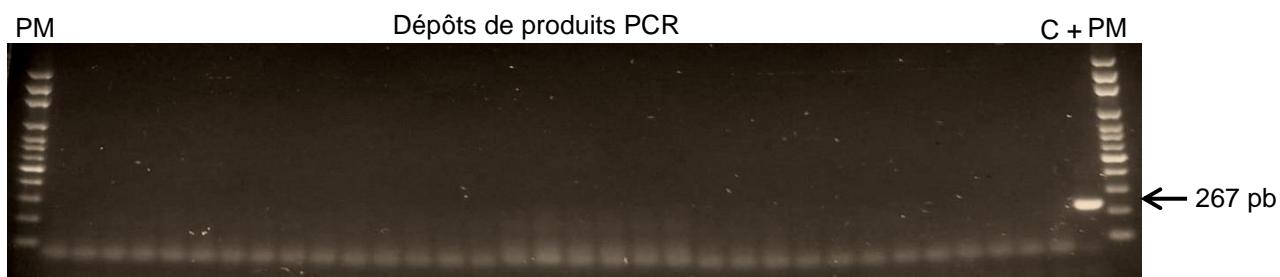


Figure 16 : Exemple de gel d'agarose obtenu après l'analyse des 275 extraits d'ADN de tortues avec la PCR nichée ciblant la région conservée du gène de l'ADN polymérase d'*Herpesvirus*.

IV - 2 - 4 Recherche du gène 12S rRNA de *Mycoplasma* dans les extraits d'ADN purifiés de tortues

La solution d'ADN de *Mycoplasma agassizii* diluée au 10^{ème} a été utilisée pendant la PCR. Seules les bandes de dimères d'amorces et la bande du contrôle positif à 576 pb ont été révélées (Figure 17). Aucun résultat positif n'a été déterminé après la recherche du gène 12S rRNA de *Mycoplasma* dans les 275 extraits d'ADN purifiés de tortues (Tableau 11).

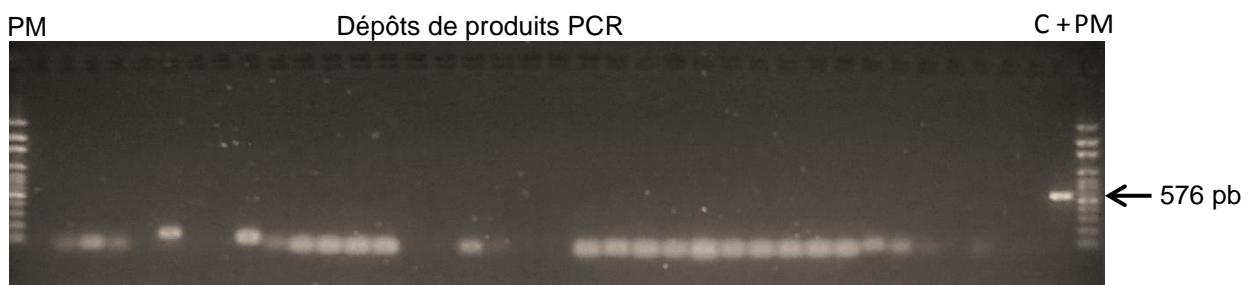


Figure 17 : Type de gel obtenu après l'analyse des 275 extraits d'ADN de tortues avec la PCR conventionnelle ciblant le gène 12S rRNA de *Mycoplasma*.

V - DISCUSSION

Herpesvirus et *Mycoplasma* sont des menaces pour la population de tortues dans le monde. Ce sont les deux agents les plus identifiés (Brown *et al.*, 1999 ; Gandar *et al.*, 2015). *Mycoplasma agassizii* a été identifié responsable de la maladie respiratoire (URTD) à l'origine d'une mortalité importante chez les tortues (Brown *et al.*, 2001 ; Wendland *et al.*, 2007 ; Braun *et al.*, 2013 ; Germano *et al.*, 2014 ; Jacobson *et al.*, 2014).

Brown *et al.* (1994) a affirmé que les microorganismes tels que *Herpesvirus* et *Mycoplasma* peuvent entraîner des maladies chroniques chez les tortues terrestres. En effet, les espèces de tortues touchées par ces deux agents pathogènes peuvent survivre pendant plusieurs années sans présenter de symptômes dus à l'infection de ces deux agents pathogènes (Dickinson *et al.*, 2005). Les porteurs sains de ces microorganismes sont un grand danger pour la population de tortues surtout dans le cas de translocation de ces espèces car ils peuvent transmettre ces agents pathogènes aux tortues saines et peuvent être source d'une épidémie. La capture, le transport et la translocation des tortues influent sur la transmission progressive de ces deux agents pathogènes dans la population (Jacobson *et al.*, 2014).

D'autres études ont montré que les espèces de tortues affectées par *Herpesvirus* et *Mycoplasma agassizii* peuvent aussi être asymptomatiques (duPre *et al.*, 2011 ; Sandmeier *et al.*, 2017). Ainsi, avant d'être libérées, les tortues mises en quarantaine dans les sites de DWCT doivent être analysées pour éviter la transmission de ces agents pathogènes en cas de présence de ces derniers.

En Espagne, les tortues terrestres sont plus exposées aux *Herpesvirus* qu'aux *Mycoplasma* avec une haute prévalence de 25 % et 6 %, respectivement (Salinas *et al.*, 2011). D'autres études de prévalence montrent que *Mycoplasma* est plus présent que *Herpesvirus* chez les tortues avec des taux de prévalence, respectivement, 2,4 % et 0,3 % en France (Mathes *et al.*, 2001) et 15,8 % et 8,2 % au Royaume-Uni (Soares *et al.*, 2004).

Dans cette étude, la mise au point des techniques de détection moléculaire a été effectuée à partir d'ADN de *Chelonid Herpesvirus* fixé sur papier buvard et d'ADN de *Testudinid Herpesvirus* en solution pour le cas des *Herpesvirus* ; pour le cas des *Mycoplasma*, l'ADN de *Mycoplasma agassizii* sur papier buvard et l'ADN en

solution de cette même espèce de *Mycoplasma* ont été utilisés. D'après des études précédentes, le papier buvard est un support adéquat pour conserver plus longtemps les matériaux biologiques à température ambiante et pour faciliter leur transport (Ilona *et al.*, 2003 ; Hirtz *et al.*, 2015). Cependant, les résultats obtenus ont démontré que la fixation d'ADN sur papier buvard a diminué la qualité de l'ADN. Le ratio d'absorbance A260/A280 de l'ADN élue sur papier buvard a été entre 1,1 - 1,3. Par contre, pour celui de la solution d'ADN, ce ratio est de 1,8 pour le cas d'*Herpesvirus* et 1,9 pour le cas de *Mycoplasma*. A rappeler que la valeur optimale de ce ratio pour de l'ADN pur est de 1,8. De ce fait, pour mettre en place une technique moléculaire, l'utilisation d'une solution d'ADN assure la qualité de celui-ci.

La recherche d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma* chez les tortues situées dans le site de DWCT a été effectuée à partir des prélèvements de lavage nasal de tortues appartenant aux espèces d'*Astrochelys yniphora* et de *Pyxis planicauda*. Aussi, des études précédentes sur ces agents pathogènes ont été réalisées à partir de prélèvements de lavage nasal de tortues (Brown *et al.*, 1994 ; duPre *et al.*, 2011). D'autres types de prélèvement peuvent être aussi utilisés pour l'étude d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma* (Une *et al.*, 2000 ; Bicknese *et al.*, 2010 ; Kane *et al.*, 2016). En 2004, Soares a affirmé que le prélèvement buccal est le type de prélèvement le plus fiable pour détecter ces deux agents pathogènes chez les tortues. Toutefois, vu que *Herpesvirus* peuvent aussi infecter les cellules des muqueuses nasales, les prélèvements de lavage nasal peuvent être utilisés pour détecter ces virus. Une étude a montré que le lavage nasal est plus pratique pour un individu à prélever pour une analyse moléculaire (Gritzfeld *et al.*, 2011).

La méthode d'extraction d'ADN avec le « QIAamp® DNA Mini kit » et « QIAamp® DNA Blood Mini kit » (QIAGEN) a été efficace pour obtenir de l'ADN purifié et de bonne qualité par rapport à la méthode publiée dans l'article de Brown *et al.* (1999). Le résultats obtenus pendant cette étude confirment cette efficacité. Par ailleurs, la méthode d'extraction d'ADN avec purification a été la méthode utilisée dans d'autres études moléculaires des *Herpesvirus* et de *Mycoplasma agassizii* (Soares *et al.*, 2004 ; duPre *et al.*, 2011).

Bien que l'ADN en solution des contrôles positifs aient une faible concentration (\approx 6 ng/ μ l), les PCR effectuées ont montré des résultats positifs à partir de ces contrôles positifs. D'ailleurs, les solutions d'ADN des contrôles positifs ont encore été diluées au 10^{ème}. Par conséquent, même en cas de faible

concentration d'ADN dans les extraits obtenus (2,1 - 11,4 ng/ μ l), *Herpesvirus* et *Mycoplasma* pourraient être détectés.

La recherche de gène de ménage des tortues dans les échantillons de lavage nasal a été réalisée en détectant le gène de la β - actine. Cette recherche du gène de ménage est nécessaire pour valider l'extraction d'ADN de tortues dans les échantillons. D'après les résultats, la PCR réalisée dans cette étude pour la détection du gène de la β - actine peut être utilisée pour une détection de gènes de ménage aussi bien chez les tortues que chez les mammifères (Dacheux *et al.*, 2008).

Pour la mise au point de la technique de détection d'*Herpesvirus*, les résultats obtenus après la PCR conventionnelle et la PCR semi-nichée n'ont pas été satisfaisants comme les bandes attendues après la migration sur gel n'ont pas été observées. Ces PCR pourraient être spécifiques pour une espèce d'*Herpesvirus* retrouvée chez les espèces de tortues étudiées (Murakami *et al.*, 2001 ; Soares *et al.*, 2004).

Parmi les trois PCR effectuées (PCR conventionnelle, PCR semi-nichée et PCR nichée), la PCR nichée effectuée dans cette étude est la technique adéquate pour détecter des espèces d'*Herpesvirus* chez les tortues terrestres de Madagascar. Cette PCR nichée est la PCR moins spécifique pour détecter une espèce d'*Herpesvirus* compte tenu des amorces utilisées ciblant une région conservée du gène de tous *Herpesvirus* (VanDevanter *et al.*, 1996). Par ailleurs, cette PCR est la plus utilisée pour une étude sur le virus et pour une identification de nouvelle espèce d'*Herpesvirus*, non seulement chez les tortues mais chez tous les reptiles et les autres classes d'animaux (Une *et al.*, 2000 ; Johnson *et al.*, 2005 ; Quackenbush *et al.*, 2006 ; Bicknese *et al.*, 2010 ; Lacoste *et al.*, 2010 ; Kane *et al.*, 2016).

Contrairement au cas des *Herpesvirus*, toutes les espèces de tortues peuvent avoir une infection bactérienne due au *Mycoplasma agassizii* (Brown *et al.*, 1999 ; Dickinson *et al.*, 2005 ; duPre *et al.*, 2011). La transmission inter-espèce voire inter-genre pourrait se produire (Soares *et al.*, 2004). La PCR conventionnelle pour la détection de *Mycoplasma* chez les tortues a été mise au point à partir de la technique décrite dans l'article de Brown *et al.* (1995). Les différentes concentrations de MgCl₂ utilisées pendant cette partie de l'étude a été de 75 μ M, 87,5 μ M et 100 μ M et la PCR a marché à 100 μ M de MgCl₂. Le résultat obtenu

après la variation de la concentration de MgCl₂ a démontré que le MgCl₂ joue un rôle important dans l'amplification génique. En effet, MgCl₂ agit principalement sur l'action de l'ADN polymérase pendant la PCR.

Après l'analyse des échantillons à partir des techniques mises au point pour la recherche d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma*, aucun résultat positif n'a été observé. 57,8 % (159/275) des résultats ont été validés vu que les gènes de ménage des tortues n'ont pas été détectés sur 116 extraits parmi les 275. L'échantillonnage des prélèvements de lavage nasal de tortues joue un rôle majeur pour les analyses moléculaires des échantillons. En effet, si aucun matériel biologique n'a été prélevé pendant l'échantillonnage, les résultats négatifs pourraient être des faux négatifs. Par conséquent, des fausses interprétations des résultats pourraient se présenter. Pour le cas des échantillons avec des résultats négatifs après la détection du gène de ménage des tortues, une hypothèse qu'aucune cellule muqueuse n'ait été prélevée lors du lavage nasal des tortues a été posée. Compte tenu de ces résultats, un nouvel échantillonnage et des analyses moléculaires de ces nouveaux échantillons seront effectués pour le cas des individus auxquels les résultats de la détection du gène de ménage ont été sortis négatifs.

VI - CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Actuellement, les tortues terrestres dans le monde sont en menace et en voie de disparition. Sur le plan sanitaire, un contrôle de la présence d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma* chez les tortues doit être fait pour éviter la propagation de ces agents pathogènes. Avant cette étude, aucune technique de détection d'*Herpesvirus* ni de *Mycoplasma* n'a été disponible pour le cas des tortues endémiques de Madagascar. Les techniques mises au point dans cette étude seront donc parmi les éléments indispensables pour la protection des tortues contre ces deux agents pathogènes.

La PCR nichée pour la recherche d'*Herpesvirus* et la PCR conventionnelle pour la recherche de *Mycoplasma* seront utilisées pour une analyse moléculaire des échantillons biologiques de tortues situées dans les sites de l'ONG DWCT avant la libération de ces tortues. Les tortues mises en quarantaine pour lesquelles les résultats des analyses moléculaires ont été négatifs et validés seront relachées dans la nature.

La limite d'utilisation de ces techniques optimisées est au niveau du coût. En effet, la PCR en général est coûteuse par rapport aux autres techniques de détection et d'analyses biologiques.

Pour maintenir la protection des deux espèces de tortues, *Astrochelys yniphora* et *Pyxis planicauda*, contre *Herpesvirus* et *Mycoplasma*, la recherche de ces deux pathogènes chez d'autres individus doit être réalisée. Les analyses moléculaires pour la détection d'*Herpesvirus* et *Mycoplasma* doivent être aussi réalisées chez les deux autres espèces non étudiées, *Astrochelys radiata* et *Pyxis arachnoides*, afin de poursuivre la protection des tortues terrestres endémiques de Madagascar contre ces deux agents pathogènes. En cas de résultat positif, des études sur la détermination de la séquence d'*Herpesvirus* affectant les tortues endémiques et sur la prévalence d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma* chez ces tortues endémiques de Madagascar pourraient être procédées. Une recherche de la présence éventuelle d'autres agents pathogènes qui pourraient être néfastes pour ces tortues endémiques est aussi nécessaire.

Dans le cadre de la protection de ces tortues endémiques de Madagascar, il faut aussi renforcer l'installation des programmes de sensibilisation de la population locale pour une lutte contre la capture de ces tortues en les utilisant comme une source d'alimentation et pour trafic illicite.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Bicknese E. J., Childress A. L. and Wellehan Jr. J. F. X.** A novel *Herpesvirus* of the proposed genus *Chelonivirus* from an asymptomatic bowsprit tortoise (*Chersina angulata*). *Journal of Zoo and Wildlife* 2010, 41 : 353 - 358.
2. **Braun J., Schrenzel M., Witte C., Gokool L., Burchell J. and Rideout B. A.** Molecular methods to detect *Mycoplasma* spp. and *Testudinid Herpesvirus* 2 in desert tortoises (*Gopherus agassizii*) and implications for disease management. *Journal of Wildlifes Diseases* 2014, 50 : 757 - 766.
3. **Brown D. R., Crenshaw B. C., Mc Laughlin G. S., Schumacher I. M., Mc Kenna C. E., Klein P. A., Jacobson E. R. and Brown M. B.** Taxonomic analysis of the tortoise mycoplasmas *Mycoplasma agassizii* and *Mycoplasma testudinis* by 16S ribosomal RNA gene sequence comparison. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1995, 45 : 348 - 350.
4. **Brown D. R., Merritt J. L., Jacobson E. R., Klein P. A., Tully J. G., Brown M. B.** *Mycoplasma testudineum* sp. nov., from a desert tortoise (*Gopherus agassizii*) with upper respiratory tract disease. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 2004, 54 : 1527 - 1529.
5. **Brown M. B., Schumacher I. M., Klein P. A., Keith H., Correll T. and Jacobson E. R.** *Mycoplasma agassizii* causes upper respiratory tract disease in the desert tortoise. *Infection and Immunity* 1994, 62 : 4580 - 4586.
6. **Brown M. B., Mc Laughlin G. S., Crenshaw B. C., Schumacher I. M., Brown D. R. and Jacobson E. R.** Upper respiratory tract disease in the gopher tortoise is caused by *Mycoplasma agassizii*. *Journal of Clinical Microbiology* 1999, 37 : 2262 - 2269.
7. **Brown M. B., Brown D. R., Klein P. A., Mc Laughlin G. S., Schumacher I. M., Jacobson E. R., Adams H. P. and Tully J. G.** *Mycoplasma agassizii* sp. nov., isolated from the upper respiratory tract of the desert tortoise (*Gopherus agassizii*) and the gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*). *International Journal of Systematic and Fonctionary Microbiology* 2001, 51 : 413 - 418.

8. Caccone A., Amato G., Gratry O. C., Behler J. and Powell J. R. A molecular phylogeny of four endangered Madagascar tortoises based on MtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1999, 12 : 1 - 9.
9. Dacheux L., Reynes J. M., Buchy P., Sivuth O., Diop B. M., Rousset D., Rathat C., Jolly N., Dufourcq J. B., Nareth C., Diop S., Lehlé C., Rajerison R., Sadorge C. and Bourhy H. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clinical Infectious Diseases* 2008, 47 : 1410 - 1417.
10. Dickinson V. M., Schumacher I. M., Jarchow J. L., Duck T. and Schwalbe C. R. Mycoplasmosis in free - ranging desert tortoises in Utah and Arizona. *Journal of Wildlife Diseases* 2005, 41 : 839 - 842.
11. duPre S. A., Tracy C. R. and Hunter K. W. Quantitative PCR method for detection of *Mycoplasma* spp. DNA in nasal lavage samples from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Journal of Microbiological Methods* 2011, 86 : 160 - 165.
12. Edward D. G. and Freundt E. A. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. *Journal of General Microbiology* 1956, 14 : 197 - 207.
13. Gandar F., Wilkie G. S., Getherer D., Kerr K., Marlier D., Diez M., Marschang R. E., Mast J., Dewals B. G., Davison A. J and Vanderplasschen A. F. C. The genome of a *Tortoise Herpesvirus* (*Testudinid Herpesvirus* 3) has a novel structure and contains a large region that is not required for replication in vitro or virulence in vivo. *Journal of Virology* 2015, 89 : 11438 - 11456.
14. Germano J., VanZerr V. E., Esque T. C., Nussear K. E. and Lamberski N. Impacts of upper respiratory tract disease on olfactory behavior of the Mojave desert tortoise. *Journal of Wildlife Diseases* 2014, 50 : 354 - 358.
15. Gritzfield J. F., Roberts P., Roche L., Batrawy S. E. and Gordon S. B. Comparison between nasopharyngeal swab and nasal wash, using culture and PCR, in the detection of potential respiratory pathogens. *BMC Research Notes* 2011, 4 : 122.

- 16. Hayflick L. and Chanock K. M.** *Mycoplasma* species of man. *Bacteriological Reviews*, 29 : 185 - 221.
- 17. Hervás J., Sánchez - Cordón P. J., Chacón de Lara F., Carrasco L. and Gómez - Villamandos J. C.** Hepatitis associated with herpesviral infection in the tortoise (*Testudo horsfieldii*). *Journal of Veterinary Medicine Series B* 2002, 49 : 111 - 114.
- 18. Hirtz C. and Lehmann S.** Le prélèvement sanguin sur papier buvard : une révolution de la biologie médicale en marche? *Annales de Biologie Clinique* 2015, 73 : 25 - 37.
- 19. Ilona L. F., Pia Ö., Marianne F. and Gunilla M.** Detection of *Herpes Simplex virus* DNA in dried blood spots making a retrospective diagnosis possible. *Journal of Clinical Virology* 2003, 26 : 39 - 48.
- 20. Jacobson E. R., Brown M. B., Wendland L. D., Brown D. R., Klein P. A., Christopher M. M. and Berry K. H.** Mycoplasmosis and upper respiratory tract disease of tortoises : a review and update. *The Veterinary Journal* 2014, 201 : 257 - 264.
- 21. Johnson A. J., Pessier A. P., Wellehan J. F. X., Brown R. and Jacobson E. R.** Identification of a novel *Herpesvirus* from a California desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Veterinary Microbiology* 2005, 111 : 107 - 116.
- 22. Kane L. P., Bunick D., Abd - Eldaim M., Dzhaman E. and Allender M. C.** Development and validation of quantitative PCR for detection of *Terrapene Herpesvirus 1* utilizing free - ranging eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Journal of Virological Methods* 2016, 232 : 57 - 61.
- 23. Lacoste V., Lavergne A., Thoisy B., Pouliquen J. F. and Gessain A.** Genetic diversity and molecular evolution of human and non - human primate *Gammaherpesvirinae*. *Infection, Genetics and Evolution* 2010, 10 : 1 - 13.

- 24. Marschang R. E., Gleiser C. B., Papp T., Pfitzner A. J. P., Böhm R. and Roth B. N.** Comparison of 11 *Herpesvirus* isolates from tortoises using partial sequences from three conserved genes. *Veterinary Microbiology* 2006, 117 : 258 - 266.
- 25. Mathes K. A., Jacobson E. R., Blakak S., Braun D. R., Schumacher I. M. and Fertard B.** *Mycoplasma* and *Herpesvirus* detection in European terrestrial tortoises in France and Morocco. *In proceedings of the Association of reptilian and amphibian veterinarians, Eighth Annual Conference, Orlando, Florida, 18 - 23 september 2001* : 97 - 99.
- 26. Mullis K. B. and Faloona F. A.** Specific synthesis of DNA in vitro via a Polymerase - catalyzed Chain Reaction. *Methods Enzymology* 1987, 155 : 335 - 350.
- 27. Murakami M., Matsuba C., Une Y., Nomura Y. and Fujitani H.** Development of species - specific PCR techniques for the detection of *Tortoise Herpesvirus*. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 2001, 13 : 513 - 516.
- 28. Nigro O., Yu G., Aguirre A. A. and Lu Y.** Sequencing and characterization of the full - length gene encoding the single - stranded DNA binding protein of a novel *Chelonian Herpesvirus*. *Archeology Virology* 2004, 149 : 337 - 347.
- 29. Origgi F. C., Klein P. A., Mathes K., Blahak S., Marschang R. E., Tucker S. J. and Jacobson E. R.** Enzyme - Linked Immunosorbent Assay for Detecting *Herpesvirus* Exposure in Mediterranean tortoises (Spur - thighed tortoise [*Testudo graeca*] and Hermann's tortoise [*Testudo hermanni*]). *Journal of Clinical Microbiology* 2001, 39 : 3156 - 3163.
- 30. Orozco-terWengel P., Chiari Y., Vieites D. R., Pedrono M. and Louis E. Jr.** Isolation and characterization of six polymorphic microsatellite loci for the Malagasy spider tortoise, *Pyxis arachnoides* and cross - amplification in *Pyxis planicauda*. *Amphibia - Reptilia* 2013, 34 : 125 - 128.

31. Quanckenbush S. L., Work T. M., Balazs G. H., Casey R. N., Rovnak J., Chaves A., duToit L., Baines J. D., Parrish C. R., Bowser P. R. and Casey J. W. Three closely related herpesviruses are associated with Fibropapillomatosis in marine turtles. *Virology* 1998, 246 : 392 - 399.
32. Rebouças E. de L., Costa J. J. do N., Passos M. J., Hurk R. V. D. and Silva J. R. V. Real time PCR and importance of housekeepings genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2013, 56 : 143 - 154.
33. Reme A. Quelques problèmes sanitaires et pathologiques dans l'élevage intensif de la tortue marine (*Chelonia mydas*, L.) à La Réunion. *Revue D'Élevage et de Médecine Vétérinaire Des Payx Tropicaux* 1980, 33 : 177 - 192.
34. Roizman B. The Herpesviruses. *Chicago : Edition Heinz Franenkel - conrat and Robert R. Wagner volume 1.* 1982 ; 445 p.
35. Salinas M., Francino O., Sánchez A. and Altet L. *Mycoplasma and Herpesvirus* PCR detection in tortoises with rhinitis - stomatitis complex in Spain. *Journal of Wildlife Diseases* 2011, 47 : 195 - 200.
36. Sandmeier F. C., Weitzman C. L., Maloney K. N., Tracy C. R., Nieto N., Teglas M. B., Hunter K. W., DuPré S., Gienger C. M. and Tuma M. W. Comparison of current methods for the detection of chronic mycoplasmal URTD in wild populations of the Mojave desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Journal of Wildlife Diseases* 2017, 53 : 1 - 11.
37. Soares J. F., Chalker V. J., Erles K., Holtby S., Waters M. and Mc Arthur S. Prevalence of *Mycoplasma agassizii* and *Chelonian Herpesvirus* in captive tortoises (*Testudo* sp.) in the United Kingdom. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2004, 35 : 25 - 33.
38. Une Y., Murakami M., Uemara K., Fujitani H., Ishibashi T. and Nomura Y. Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of *Herpesvirus* in tortoises. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2000, 62 : 905 - 907.

- 39. VanDevanter D. R., Warrener P., Bennett L., Schultz E. R., Coulter S., Garber R. L. and Rose T. M.** Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1996, 34 : 1666 - 1671.
- 40. Wendland L. D., Zacher L. A., Klein P. A., Brown D. R., Demcovitz D., Littell R. and Brown M. B.** Improved Enzyme - Linked Immunosorbent Assay to reveal *Mycoplasma agassizii* exposure : a valuable tool in the management of environmentally sensitive tortoise populations. *Clinical and Vaccine Immunology* 2007, 14 : 1190 - 1195.

ANNEXES

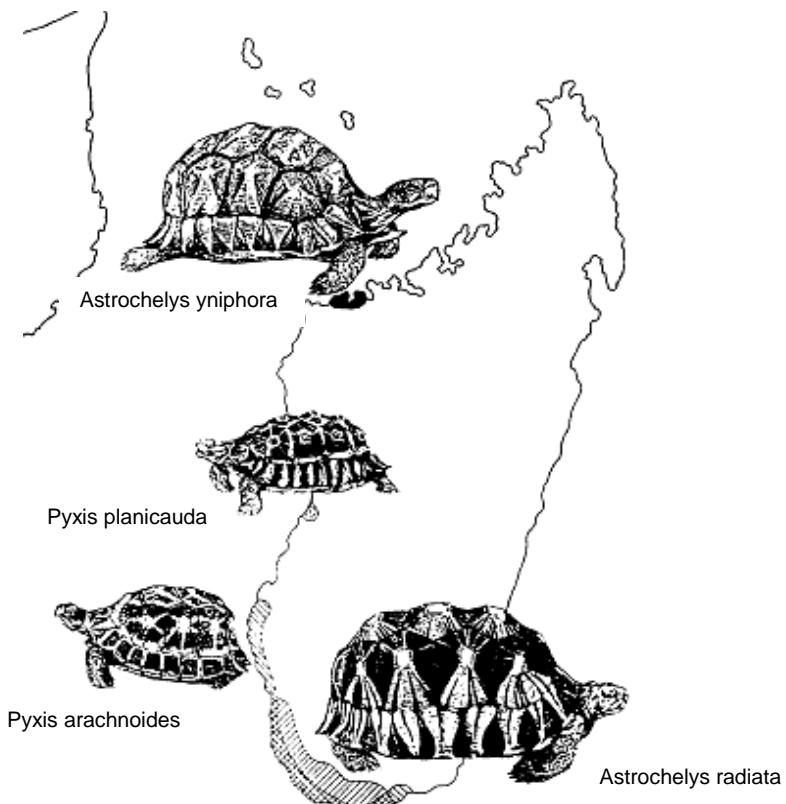
Annexe 1 : Projets de conservation de l'ONG « *Durrell Wildlife Conservation Trust* » sur la faune et la flore à Madagascar.

(Source : <https://www.durrell.org/conservation/regions/madagascar>)



Annexe 2 : Distribution géographique de tortues terrestres endémiques de Madagascar.

(Caccone et al., 1999)



Annexe 3 : Images et classification de tortues terrestres endémiques de Madagascar.



Astrochelys radiata

(<https://www.google.com/search?q=astrochelys+radiata>)



Astrochelys yniphora

(https://www.durrell.org/wildlife/wp-content/themes/wcdurrell/assets/media/Solitaire/solitaire_27.pdf)



Pyxis arachnoides

(<https://www.google.com/search?q=pyxis+arachnoides>)



Pyxis planicauda

(<https://www.google.com/search?q=pyxis+planicauda>)

Classification

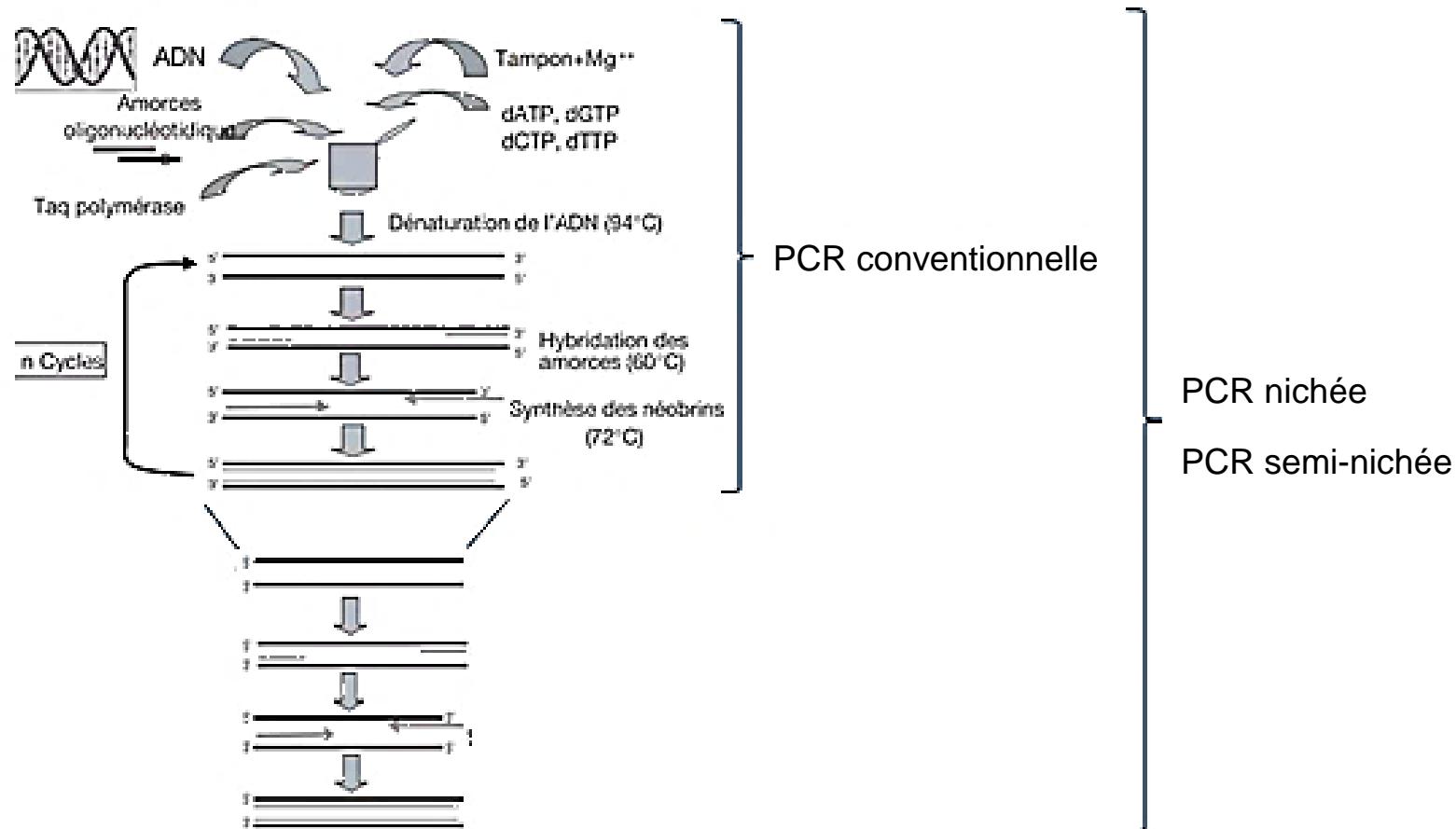
Règne	<i>Animalia</i>			
Embranchement	<i>Chordata</i>			
Classe	<i>Reptilia</i>			
Sous - classe	<i>Chelonii</i>			
Ordre	<i>Testudines</i>			
Sous - ordre	<i>Cryptodira</i>			
Famille	<i>Testudinidae</i>			
Genre	<i>Astrochelys</i>			
Espèce	<i>radiata</i>	<i>yniphora</i>	<i>arachnoides</i>	<i>planicauda</i>
Nom vernaculaire	Tortue étoilée	Tortue à soc	Pyxide arachnoïde	Pyxide à dos plat

Annexe 4 : Matériels et réactifs utilisés pendant les manipulations.

	Matériels	Réactifs
ÉLUTION D'ADN SUR PAPIER BUVARD	<ul style="list-style-type: none"> - tubes 1,5 ml - micropipettes et cônes : 100 µl - papier buvard 	<ul style="list-style-type: none"> - tampon d'élution
EXTRACTION D'ADN	<ul style="list-style-type: none"> - kits Qiagen pour extraction d'ADN : <ul style="list-style-type: none"> • tubes à colonne • tubes collecteurs - micropipettes et cônes à filtre : 20 µl, 200 µl, 1000 µl - tubes stériles 1,5ml - portoir - vortex - bloc chauffant - centrifugeuse 	<ul style="list-style-type: none"> - kit QIAGEN pour extraction d'ADN (QIAamp® DNA Mini Kit) : <ul style="list-style-type: none"> • tampon de lyse • protéinase K • tampon de lavage • tampon d'élution - kit QIAGEN pour extraction d'ADN (QIAamp® DNA Blood Mini Kit) : <ul style="list-style-type: none"> • tampon de lyse • protéase • tampon de lavage • tampon d'élution - éthanol absolu (96 à 100 %)
QUANTIFICATION D'ADN	<ul style="list-style-type: none"> - micropipette et cônes : 10 µl - papiers non pelucheux - appareil Nanodrop 2000 	<ul style="list-style-type: none"> - eau distillée
PCR	<ul style="list-style-type: none"> - tubes 0,2 ml et 1,5 ml - portoir - micropipettes et cônes à filtre : 10 µl, 20 µl, 100 µl - centrifugeuse - thermocycleur 	<ul style="list-style-type: none"> - Gotaq® G2/dNTP Mix, Custom Kit : <ul style="list-style-type: none"> • tampon 5X • MgCl₂ 25 mM • dNTP Mix10 Mm • Taq polymerase 500 U - eau pure - amorces 10 µM
MIGRATION SUR GEL D'AGAROSE	<ul style="list-style-type: none"> - cuve à électrophorèse - balance - ballons 50 ml et 250 ml - moule, peigne - four microonde - micropipettes et cônes à filtre : 10 µl, 100 µl - gel scan 	<ul style="list-style-type: none"> - poudre d'agarose - TAE : Tris Acétate d'EDTA (20 mM Tris - acétate, 0,5 mM EDTA) - Syber SAFE - marqueur de taille 100 bp (DNA ladder)

Annexe 5 : Schéma de la réaction d'amplification par *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

(https://www.google.com/search?q=%C3%A9tapes+de+la+PCR&client=firefox-b&source=lnms&tbo=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjEg6TP1-DXAhXOZpoKHZi_CX0Q_AUICigB&biw=1138&bih=547)



Annexe 6 : Séquences des amores utilisées pendant les réactions d'amplification.

Détection	PCR	Amores	Séquence (5' vers 3')	Position et gène cible	Références
<i>Herpesvirus</i>	gène de la β - actine	conventionnelle	sens	TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A	48 - 72 Dacheux <i>et al.</i> , 2008
			anti - sens	CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G	
	conventionnelle	sens	GAG GAG CCT GTT CTA TAA TC	107 - 126	Soares <i>et al.</i> , 2004 (12S rRNA)
			anti - sens	ATG TAG CCC ATT TCT TCC ATC	
		1 ^{ère}	sens	AGG CGG GAA AGG ATT ATG TC	73 - 92 Murakami <i>et al.</i> , 2001
			anti - sens	AGT TTG ATA GGG GAT TTG AA	
	semi-nichée	2 ^{ème}	sens	GAT TTA CTG GCG TGG CTA TG	289 - 308 (gène de l'ADN polymérase)
			anti - sens	AGT TTG ATA GGG GAT TTG AA	
		1 ^{ère}	sens (1)	GAY TTY GCN AGY YTN TAY CC	72764 - 72783 70844 - 70873 72541 - 72516 71536 - 71564 71778 - 71803 VanDevanter <i>et al.</i> , 1996
			sens (2)	TCC TGG ACA AGC AGC ARN YSG CNM TNA A	
			anti - sens	GTC TTG CTC ACC AGN TCN ACN CCY TT	
			2 ^{ème}	TGT AAC TCG GTG TAY GGN TTY ACN GGN GT	
			anti - sens	CAC AGA GTC CGT RTC NCC RTA DAT	
<i>Mycoplasma</i>	conventionnelle	sens	CCT ATA TTA TGA CGG TAC TG	471 - 490	Brown <i>et al.</i> , 1995 (16S rRNA)
		anti - sens	TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC	1055 - 1031	

Annexe 7 : Détails de la concentration d'ADN des contrôles positifs (éluats de chaque papier buvard et solution d'ADN) d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma*.

Agents pathogènes	Papiers buvards	éluats	Concentration d'ADN (ng/µl)	Ratio A260/A280
<i>Herpesvirus</i>	1	1 ^{er}	92,0	1,2
		2 ^{ème}	33,6	1,2
		3 ^{ème}	14,0	1,2
		1 ^{er} + 2 ^{ème} + 3 ^{ème}	37,8	1,2
	2	1 ^{er}	61,4	1,2
		2 ^{ème}	12,5	1,3
	ADN en solution		5,8	1,9
<i>Mycoplasma</i>	1	1 ^{er}	47,2	1,2
		2 ^{ème}	17,7	1,2
		3 ^{ème}	9,0	1,2
		1 ^{er} + 2 ^{ème} + 3 ^{ème}	14,2	1,2
	2	1 ^{er}	53,6	1,1
		2 ^{ème}	15,2	1,2
	3	1 ^{er}	43,9	1,2
		2 ^{ème}	11,6	1,3
	4	1 ^{er}	81,7	1,2
		2 ^{ème}	20,9	1,3
	ADN en solution		6,6	1,8

Annexe 8 : Tableau récapitulatif des résultats d'analyse moléculaire des extraits d'ADN de tortues.

Numéro des échantillons	Espèces de tortues étudiées	Extraction d'ADN (kit utilisé)	Concentration d'ADN (ng/µl)	Ratio A260/A280	Résultats de la PCR (gène de ménage des tortues)	Résultats de la PCR (Mycoplasma)	Résultats de la PCR (Herpesvirus)	Validation des résultats
1	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	6,9	4,24	-	-	-	
2	<i>P. planicauda</i>	DNA Blood Mini kit	4,0	3,19	+	-	-	validé
3	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,1	2,23	+	-	-	validé
4	<i>P. planicauda</i>	DNA Blood Mini kit	5,3	2,72	+	-	-	validé
5	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,5	2,59	-	-	-	
6	<i>P. planicauda</i>	DNA Blood Mini kit	4,0	3,13	-	-	-	
7	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,5	2,19	-	-	-	
8	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,5	2,28	-	-	-	
9	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,5	1,67	-	-	-	
10	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	6,1	1,62	+	-	-	validé
11	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,2	2,10	-	-	-	
12	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,3	2,30	-	-	-	
13	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,7	1,87	-	-	-	
14	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,1	2,20	+	-	-	validé
15	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,0	1,87	-	-	-	
16	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,8	1,88	-	-	-	
17	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	5,1	1,92	-	-	-	
18	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,5	2,01	-	-	-	
19	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,4	2,49	-	-	-	
20	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	2,7	3,02	-	-	-	
21	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,6	2,20	-	-	-	
22	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,2	1,88	+	-	-	validé
23	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,6	2,14	+	-	-	validé
24	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,2	1,91	-	-	-	

25	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,1	2,84	-	-	-	-	
26	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,5	1,66	+	-	-	-	validé
27	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,1	2,05	+	-	-	-	validé
28	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,5	1,89	+	-	-	-	validé
29	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	2,8	2,41	-	-	-	-	
30	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	5,1	1,61	-	-	-	-	
31	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	8,4	1,92	-	-	-	-	
32	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	2,9	2,53	+	-	-	-	validé
33	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,1	2,10	-	-	-	-	
34	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,8	1,73	-	-	-	-	
35	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,9	1,84	+	-	-	-	validé
36	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,2	2,57	-	-	-	-	
37	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	5,2	1,96	-	-	-	-	
38	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,6	2,23	-	-	-	-	
39	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,6	3,01	-	-	-	-	
40	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	9,5	1,96	+	-	-	-	validé
41	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	5,6	2,59	-	-	-	-	
42	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,9	2,37	+	-	-	-	validé
43	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	5,2	2,25	-	-	-	-	
44	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,1	2,27	+	-	-	-	validé
45	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	5,8	1,96	-	-	-	-	
46	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,1	2,37	-	-	-	-	
47	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,7	2,51	+	-	-	-	validé
48	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	6,7	1,84	-	-	-	-	
49	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,0	3,89	+	-	-	-	validé
50	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,6	4,21	-	-	-	-	
51	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,4	5,11	-	-	-	-	
52	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,8	2,47	-	-	-	-	
53	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	5,5	2,65	+	-	-	-	validé

54	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,3	2,18	-	-	-	-	
55	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,0	2,85	-	-	-	-	
56	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	2,8	3,27	-	-	-	-	
57	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,0	2,57	+	-	-	-	validé
58	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	2,2	3,85	+	-	-	-	validé
59	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,1	5,25	-	-	-	-	
60	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,0	2,85	+	-	-	-	validé
61	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	5,7	2,01	-	-	-	-	
62	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	5,3	2,29	-	-	-	-	
63	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	5,7	2,19	-	-	-	-	
64	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,5	3,08	-	-	-	-	
65	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	5,2	1,83	-	-	-	-	
66	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,7	2,38	+	-	-	-	validé
67	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,6	2,00	-	-	-	-	
68	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,8	2,41	-	-	-	-	
69	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,2	2,30	-	-	-	-	
70	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,6	2,66	-	-	-	-	
71	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,9	2,24	-	-	-	-	
72	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,4	2,06	+	-	-	-	validé
73	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	9,9	1,71	+	-	-	-	validé
74	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	2,7	2,82	-	-	-	-	
75	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,7	1,95	-	-	-	-	
76	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,8	1,72	-	-	-	-	
77	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,3	1,96	-	-	-	-	
78	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	5,1	1,79	-	-	-	-	
79	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	7,4	1,74	-	-	-	-	
80	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,8	1,93	+	-	-	-	validé
81	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,1	1,95	+	-	-	-	validé
82	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,4	2,14	+	-	-	-	validé

83	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	6,0	2,08	+	-	-	-	validé
84	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,7	1,73	+	-	-	-	validé
85	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,9	2,16	-	-	-	-	
86	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,9	1,86	-	-	-	-	
87	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,6	1,69	-	-	-	-	
88	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,8	1,90	+	-	-	-	validé
89	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	7,8	1,68	-	-	-	-	
90	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,4	1,84	+	-	-	-	validé
91	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,4	1,61	-	-	-	-	
92	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	4,4	1,71	+	-	-	-	validé
93	<i>P. planicauda</i>	DNA Mini kit	3,9	2,08	-	-	-	-	
94	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,0	2,09	-	-	-	-	
95	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,4	2,44	+	-	-	-	validé
96	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	2,6	2,47	+	-	-	-	validé
97	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,9	1,95	+	-	-	-	validé
98	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	4,2	2,02	+	-	-	-	validé
99	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	2,5	4,34	+	-	-	-	validé
100	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	4,1	2,06	+	-	-	-	validé
101	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,1	4,01	-	-	-	-	
102	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,4	3,12	+	-	-	-	validé
103	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	6,7	1,65	+	-	-	-	validé
104	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	7,1	1,83	+	-	-	-	validé
105	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	7,1	1,65	+	-	-	-	validé
106	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	10,4	1,66	+	-	-	-	validé
107	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,8	2,15	+	-	-	-	validé
108	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	4,3	1,73	+	-	-	-	validé
109	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	4,0	1,73	-	-	-	-	
110	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	5,3	1,83	+	-	-	-	validé
111	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	5,4	1,89	-	-	-	-	

112	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,1	1,41	+	-	-	-	validé
113	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	4,4	1,67	+	-	-	-	validé
114	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	4,8	1,72	+	-	-	-	validé
115	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,2	1,93	+	-	-	-	validé
116	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	2,7	1,70	-	-	-	-	
117	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	6,6	1,71	+	-	-	-	validé
118	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	6,0	1,81	+	-	-	-	validé
119	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	4,7	1,56	+	-	-	-	validé
120	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	4,0	1,58	+	-	-	-	validé
121	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,1	2,42	+	-	-	-	validé
122	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	2,6	1,67	+	-	-	-	validé
123	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,0	2,05	-	-	-	-	
124	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	6,2	1,49	+	-	-	-	validé
125	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,3	1,85	-	-	-	-	
126	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,2	1,68	+	-	-	-	validé
127	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	4,8	1,55	+	-	-	-	validé
128	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	2,4	2,00	-	-	-	-	
129	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	4,1	1,34	-	-	-	-	
130	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	6,8	1,70	-	-	-	-	
131	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	5,5	1,84	-	-	-	-	
132	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,3	3,37	+	-	-	-	validé
133	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	7,0	1,70	-	-	-	-	
134	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	2,1	2,47	-	-	-	-	
135	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,1	1,96	+	-	-	-	validé
136	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	5,5	1,79	-	-	-	-	
137	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	7,5	1,50	-	-	-	-	
138	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	2,9	2,04	+	-	-	-	validé
139	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,6	2,22	+	-	-	-	validé
140	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,5	2,30	+	-	-	-	validé

141	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	4,1	2,17	-	-	-	-	
142	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,7	2,37	-	-	-	-	
143	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,0	1,84	+	-	-	-	validé
144	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	4,7	2,02	+	-	-	-	validé
145	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,4	1,75	+	-	-	-	validé
146	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,4	2,46	-	-	-	-	
147	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	2,8	2,51	-	-	-	-	
148	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	6,8	1,96	+	-	-	-	validé
149	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,3	2,09	+	-	-	-	validé
150	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	5,7	2,58	-	-	-	-	
151	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	5,5	1,95	+	-	-	-	validé
152	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	4,5	1,99	-	-	-	-	
153	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,6	2,43	-	-	-	-	
154	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,3	2,32	+	-	-	-	validé
155	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,3	2,57	-	-	-	-	
156	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,4	2,20	-	-	-	-	
157	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,3	2,41	+	-	-	-	validé
158	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	2,7	2,25	+	-	-	-	validé
159	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	5,5	1,93	-	-	-	-	
160	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,9	2,64	-	-	-	-	
161	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,3	2,72	+	-	-	-	validé
162	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	5,8	2,09	+	-	-	-	validé
163	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	5,5	2,03	-	-	-	-	
164	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	4,3	1,82	+	-	-	-	validé
165	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	5,3	1,93	-	-	-	-	
166	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	7,0	1,70	-	-	-	-	
167	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,9	2,06	-	-	-	-	
168	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,4	2,31	-	-	-	-	
169	<i>A. yniphora</i>	DNA Mini kit	3,6	2,76	-	-	-	-	

170	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	6,3	2,21	+	-	-	-	validé
171	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,8	2,24	-	-	-	-	
172	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,1	1,73	+	-	-	-	validé
173	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	2,2	2,17	-	-	-	-	
174	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	2,6	2,56	-	-	-	-	
175	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,0	3,04	+	-	-	-	validé
176	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	2,8	2,75	-	-	-	-	
177	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	2,2	1,97	-	-	-	-	
178	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	2,4	2,33	+	-	-	-	validé
179	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,3	2,03	-	-	-	-	
180	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,4	2,68	-	-	-	-	
181	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,8	1,72	-	-	-	-	
182	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,7	1,78	+	-	-	-	validé
183	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,2	1,84	+	-	-	-	validé
184	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,1	1,50	-	-	-	-	
185	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,3	1,85	-	-	-	-	
186	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,3	2,79	-	-	-	-	
187	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	2,4	2,38	-	-	-	-	
188	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,1	1,91	+	-	-	-	validé
189	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,9	2,25	+	-	-	-	validé
190	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,6	1,93	+	-	-	-	validé
191	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,9	2,12	-	-	-	-	
192	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,1	2,26	-	-	-	-	
193	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,8	2,28	+	-	-	-	validé
194	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	2,4	1,59	-	-	-	-	
195	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,9	1,75	-	-	-	-	
196	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,8	2,52	+	-	-	-	validé
197	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	10,9	1,63	+	-	-	-	validé
198	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,6	2,42	-	-	-	-	

199	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,8	2,35	+	-	-	-	validé
200	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,6	2,85	-	-	-	-	
201	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,5	2,36	-	-	-	-	
202	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,2	2,47	-	-	-	-	
203	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,7	2,26	-	-	-	-	
204	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,0	2,05	+	-	-	-	validé
205	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,2	1,93	-	-	-	-	
206	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,5	2,23	-	-	-	-	
207	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,5	1,80	-	-	-	-	
208	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,2	2,23	+	-	-	-	validé
209	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	2,9	3,01	-	-	-	-	
210	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,8	2,06	+	-	-	-	validé
211	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	7,5	2,37	-	-	-	-	
212	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	6,4	1,97	+	-	-	-	validé
213	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,3	2,10	-	-	-	-	
214	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	7,0	2,09	+	-	-	-	validé
215	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,3	2,10	-	-	-	-	
216	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,9	2,03	+	-	-	-	validé
217	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,1	2,23	+	-	-	-	validé
218	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,9	1,90	-	-	-	-	
219	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,9	1,64	-	-	-	-	
220	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,6	1,63	+	-	-	-	validé
221	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,4	1,98	+	-	-	-	validé
222	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	7,7	1,73	-	-	-	-	
223	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,7	1,68	+	-	-	-	validé
224	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,5	1,52	-	-	-	-	
225	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	6,5	1,82	-	-	-	-	
226	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,3	1,73	-	-	-	-	
227	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,6	2,10	+	-	-	-	validé

228	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,7	2,20	-	-	-	-	
229	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,6	1,72	+	-	-	-	validé
230	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,5	2,03	+	-	-	-	validé
231	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	7,2	1,89	-	-	-	-	
232	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	6,0	1,88	+	-	-	-	validé
233	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,5	1,95	-	-	-	-	
234	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,1	1,67	-	-	-	-	
235	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,5	1,62	-	-	-	-	
236	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	7,4	1,9	-	-	-	-	
237	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,1	1,66	+	-	-	-	validé
238	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,2	1,47	-	-	-	-	
239	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,3	1,91	-	-	-	-	
240	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	6,7	1,78	-	-	-	-	
241	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	6,1	2,07	+	-	-	-	validé
242	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,2	1,98	-	-	-	-	
243	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,4	1,75	-	-	-	-	
244	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	11,4	1,80	+	-	-	-	validé
245	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,1	2,39	-	-	-	-	
246	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,8	2,07	+	-	-	-	validé
247	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,4	2,01	+	-	-	-	validé
248	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,6	2,16	-	-	-	-	
249	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,2	1,86	-	-	-	-	
250	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,7	2,65	-	-	-	-	
251	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	7,5	2,00	-	-	-	-	
252	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,0	1,75	-	-	-	-	
253	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,5	2,17	-	-	-	-	
254	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,6	1,99	+	-	-	-	validé
255	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,4	1,81	-	-	-	-	
256	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,5	1,96	-	-	-	-	

257	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	7,7	1,99	-	-	-	-	
258	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,4	1,86	-	-	-	-	
259	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,7	2,43	-	-	-	-	
260	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,7	1,83	+	-	-	-	validé
261	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	6,3	2,38	-	-	-	-	
262	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,4	1,97	-	-	-	-	
263	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,1	2,72	+	-	-	-	validé
264	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	4,1	2,88	-	-	-	-	
265	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	8,4	2,21	-	-	-	-	
266	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,0	1,59	-	-	-	-	
267	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,4	2,40	+	-	-	-	validé
268	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	7,5	1,64	-	-	-	-	
269	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	8,0	1,71	+	-	-	-	validé
270	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	3,6	2,65	+	-	-	-	validé
271	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	7,9	1,54	-	-	-	-	
272	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,9	1,8	+	-	-	-	validé
273	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	6,0	1,91	-	-	-	-	
274	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	6,9	2,00	-	-	-	-	
275	<i>A. yniphora</i>	DNA Blood Mini kit	5,1	1,77	+	-	-	-	validé

Nom : RASOANARIVO

Prénoms : Liantsoa Sahazaniaina Anjaralahatra Fifaliana

E-mail : anjaraliantsoa@gmail.com

Titre : « Mise au point des techniques moléculaires pour la détection d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma* chez les tortues terrestres endémiques de Madagascar »

RÉSUMÉ

Les maladies respiratoires sont parmi les causes de déclin de la population des tortues terrestres dans le monde. Ces maladies sont dues principalement aux *Herpesvirus* et aux *Mycoplasma*. Cette étude a pour objectif de mettre au point des techniques moléculaires pour la détection de ces deux agents pathogènes chez deux espèces de tortues terrestres endémiques de Madagascar, *Astrochelys yniphora* et *Pyxis planicauda*.

La mise au point de techniques de détection moléculaire d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma* a été effectuée à partir de contrôles positifs d'ADN fixé sur papier buvard et d'ADN en solution avec trois types de PCR (conventionnelle, semi-nichée et nichée). Des échantillons de lavage nasal de tortues (275), composés de 182 *Astrochelys yniphora* et 93 *Pyxis planicauda*, ont été ensuite analysés avec les PCR mises au point après optimisation de la technique d'extraction d'ADN.

Les résultats des PCR effectuées sur les contrôles positifs ont montré une meilleure détection d'*Herpesvirus* après la PCR nichée et de *Mycoplasma* après la PCR conventionnelle. L'efficacité de l'extraction d'ADN des échantillons de tortues a pu être évaluée grâce à une PCR ciblant les gènes de ménage des tortues. Ces gènes de ménage ont été détectés dans 159 extraits d'ADN parmi les 275. Les procédures d'échantillonnage des prélèvements des tortues pourraient influencer ces résultats. Après PCR spécifiques pour *Herpesvirus* et *Mycoplasma*, aucun résultat positif n'a été observé.

Bien que seulement 57,8 % (159/275) des résultats ont été validés, la mise au point des PCR spécifiques pour *Herpesvirus* et *Mycoplasma* a permis d'analyser les échantillons de tortues terrestres endémiques de Madagascar. Les tortues avec les résultats validés seront relâchées dans la nature. Cependant, il faut tenir compte de la présence d'autres agents pathogènes qui pourraient être néfastes pour ces tortues.

Mots clés : *Herpesvirus*, *Mycoplasma*, PCR, tortues, Madagascar.

Encadrantes : - Pr RALAMBORANTO Laurence
- Dr FILIPPONE Claudia

Name : RASOANARIVO

First name : Liantsoa Sahazaniaina Anjaralahatra Fifaliana

E-mail : anjaraliantsoa@gmail.com

Title : « Mise au point des techniques moléculaires pour la détection d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma* chez les tortues terrestres endémiques de Madagascar »

ABSTRACT

Respiratory diseases caused by *Herpesvirus* and *Mycoplasma* are considered as a source of decline of tortoise population in the world. This study aims to develop molecular methods for the detection of these two pathogens in two species of endemic tortoises of Madagascar, *Astrochelys yniphora* and *Pyxis planicauda*.

Optimization of *Herpesvirus* and *Mycoplasma* detection methods was carried out using positive controls (DNA on blot paper and DNA in solution) with different types of PCR (conventional, hemi-nested and nested). Nasal wash samples of 275 tortoises, 182 belonging to *Astrochelys yniphora* and 93 to *Pyxis planicauda*, were then analyzed using the developed methods following optimization of the extraction method.

PCR results on positive controls showed better detection of *Herpesvirus* following nested PCR and *Mycoplasma* following conventional PCR. The efficiency of DNA extraction could be assessed through a PCR targeting tortoise housekeeping genes. Tortoise housekeeping genes were detected in 159 of the 275 extracts. Sampling procedure of tortoise may affect these results. No evidence of *Herpesvirus* and *Mycoplasma* was observed in samples following specific PCR detection.

Although only 57,8% (159/275) of the results were validated, the use of the specific PCR for *Herpesvirus* and *Mycoplasma* allowed analyzing the samples of endemic tortoises of Madagascar. Tortoises with validated results will be released into the wild. However, it is necessary to take into account the presence of the others pathogens that could be fatal for these tortoises.

Key words : *Herpesvirus*, *Mycoplasma*, PCR, tortoises, Madagascar.

Supervisors : - Pr RALAMBORANTO Laurence
- Dr FILIPPONE Claudia

Nom : RASOANARIVO

Prénoms : Liantsoa Sahazaniaina Anjaralahatra Fifaliana

E-mail : anjaraliantsoa@gmail.com

Titre : « Mise au point des techniques moléculaires pour la détection d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma* chez les tortues terrestres endémiques de Madagascar »

RÉSUMÉ

Les maladies respiratoires sont parmi les causes de déclin de la population des tortues terrestres dans le monde. Ces maladies sont dues principalement aux *Herpesvirus* et aux *Mycoplasma*. Cette étude a pour objectif de mettre au point des techniques moléculaires pour la détection de ces deux agents pathogènes chez deux espèces de tortues terrestres endémiques de Madagascar, *Astrochelys yniphora* et *Pyxis planicauda*.

La mise au point de techniques de détection moléculaire d'*Herpesvirus* et de *Mycoplasma* a été effectuée à partir de contrôles positifs d'ADN fixé sur papier buvard et d'ADN en solution avec trois types de PCR (conventionnelle, semi-nichée et nichée). Des échantillons de lavage nasal de tortues (275), composés de 182 *Astrochelys yniphora* et 93 *Pyxis planicauda*, ont été ensuite analysés avec les PCR mises au point après optimisation de la technique d'extraction d'ADN.

Les résultats des PCR effectuées sur les contrôles positifs ont montré une meilleure détection d'*Herpesvirus* après la PCR nichée et de *Mycoplasma* après la PCR conventionnelle. L'efficacité de l'extraction d'ADN des échantillons de tortues a pu être évaluée grâce à une PCR ciblant les gènes de ménage des tortues. Ces gènes de ménage ont été détectés dans 159 extraits d'ADN parmi les 275. Les procédures d'échantillonnage des prélèvements des tortues pourraient influencer ces résultats. Après PCR spécifiques pour *Herpesvirus* et *Mycoplasma*, aucun résultat positif n'a été observé.

Bien que seulement 57,8 % (159/275) des résultats ont été validés, la mise au point des PCR spécifiques pour *Herpesvirus* et *Mycoplasma* a permis d'analyser les échantillons de tortues terrestres endémiques de Madagascar. Les tortues avec les résultats validés seront relâchées dans la nature. Cependant, il faut tenir compte de la présence d'autres agents pathogènes qui pourraient être néfastes pour ces tortues.

Mots clés : *Herpesvirus*, *Mycoplasma*, PCR, tortues, Madagascar.

Encadrantes : -

Pr RALAMBORANTO Laurence

- Dr FILIPPONE Claudia