

ETUDE DE LA CAPACITE DES SOLS DE NOUVELLE-CALEDONIE A PERMETTRE LA SURVIE DES LEPTOSPIRES PATHOGENES

Rapport de stage

**INSTITUT PASTEUR DE NOUVELLE-CALEDONIE –
FRANCE**

Unité Recherche et Expertise sur la Leptospirose

Stage réalisé du 04/01/2021 au 19/07/2021

Dans le cadre du **MASTER 2 GIMAT** (Gestion Intégrée des
Maladies Animales Tropicales)

Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – Université Paul Sabatier –
CIRAD de Montpellier

Réalisé sous la direction de
Dr GOARANT Cyrille

Présenté le 16/06/2021

Par
CHAVOIX, Chloé, Cécile, Marie
Née le 05/03/1996 à Paris 14^{ème} arrondissement

TABLE DES MATIERES

Remerciements	4
Liste des abréviations	5
Liste des illustrations.....	6
Résumé en Français.....	7
Abstract in english.....	7
Introduction	8
Première partie : synthèse bibliographique	9
1- Données générales sur la Nouvelle-Calédonie	9
2- Généralités sur la leptospirose.....	9
2.1- Aspects historiques.....	9
2.2- Biologie	9
2.3- Classification	10
2.4- Epidémiologie	12
2.5- Pathogénie	12
2.6- Symptômes chez l'Homme	13
2.7- Détection et identification des leptospires.....	14
2.8- Traitement	15
2.9- Prévention.....	16
2.10- Surveillance	16
3- La leptospirose en Nouvelle-Calédonie	16
3.1- Généralités et historique.....	16
3.2- Sérogroupes et espèces animales impliquées	17
3.3- Leptospirose et climat tropical	17
4- Leptospirose et environnement	17
4.1- Survie des leptospires dans les sols.....	18
4.2- Survie des leptospires dans les eaux douces.....	18
Deuxième partie : résultats du travail personnel	19
Introduction.....	19
1- Matériel et méthodes	19
1.1- Récolte des échantillons de sols sur le terrain	19
1.2- Tamisage et réhydratation des sols.....	20
1.3- Réalisation des microcosmes de sol et inoculation des leptospires.....	21
1.4- Modification du design des microcosmes de sol après les premiers résultats.....	23
1.5- Extraction de l'ADN de leptospires des microcosmes de sol.....	24
1.6- Quantification de la quantité d'ADN par qPCR.....	24

1.7- Analyse de la composition des sols	25
1.8- Analyses statistiques	27
2- Résultats	27
2.1- Pesées des tubes et évaporation.....	27
2.2- Détection de leptospires dans les sols natifs.....	28
2.3- Suivi de la survie des leptospires dans les microcosmes de sol par qPCR.....	28
2.4- Comparaison des résultats de survie des leptospires avec la composition des sols.....	31
3- Discussion	34
Conclusion.....	37
Annexes.....	38
Annexe I : Nombre de cas humains de leptospirose par mois en 2020-2021 en Nouvelle-Calédonie	38
Annexe II : Récapitulatif des points de prélèvements : communes et types de sols	39
Annexe III : Protocole ajusté d'extraction d'ADN des sols grâce au kit DNeasy PowerSoil Kit de Qiagen	40
Annexe IV : Protocole d'extraction d'ADN en solution grâce au kit QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen	41
Annexe V : Rappel de la technique de qPCR TaqMan	42
.....	42
Annexe VI : Rappel de la technique de qPCR SYBR Green	43
Annexe VII : Dosages physico-chimiques des 20 sols (pH, humidité, conductivité, granulométrie et spectrométrie de fluorescence X).....	44
Annexe VIII : Mesures de la fraction biodisponible et mobile des éléments des sols – extractions chimiques des métaux grâce à l'EDTA (tableau du haut) et au CaCl ₂ (tableau du bas)	45
Annexe IX : Triangle des textures obtenu suite aux mesures de granulométrie	46
Annexe X : Scripts utilisés pour réaliser l'analyse statistique des données de survie des microcosmes de sol	47
Annexe XI : Analyses en Composantes Principales (ACP) pour les concentrations totales en éléments traces métalliques (Spectrométrie de fluorescence X) et les extractions chimiques des éléments à l'aide du CaCl ₂	48
Annexe XII : Statistiques descriptives de chaque paramètre mesuré.....	49
Annexe XIII – Matrices de corrélation entre la survie et l'intégralité des paramètres physico-chimiques mesurés pour la première série de microcosmes (première figure) et pour la deuxième série de microcosmes (deuxième figure)	53
Bibliographie.....	55

REMERCIEMENTS

Je remercie la Fondation Pierre Ledoux Jeunesse Internationale ainsi que la Direction Internationale de l'Institut Pasteur pour m'avoir attribué une bourse qui m'a permis de réaliser mon stage.

Je remercie Marc Jouan, ancien directeur du Réseau International des Instituts Pasteur et directeur actuel de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, pour m'avoir accueillie au sein son établissement. Je remercie mon maître de stage Cyrille Goarant, responsable de l'Unité de Recherche et d'Expertise sur la Leptospirose (UREL) pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein de l'unité, guidée durant toute cette étude et pour ses nombreux conseils et relectures. Je remercie Marie-Estelle Soupé-Gilbert, assistante ingénieure, qui m'a guidée et accompagnée sur le terrain, pour les manipulations et tout le long du projet, et qui m'a enseigné les techniques de laboratoire. Merci à elle pour sa patience et ses conseils. Merci à Alexandre Bourles, post-doctorant, pour l'aide qu'il m'a apportée pour les statistiques et la maîtrise du logiciel R. Je remercie Roman Thibeaux, post-doctorant, et Malia Kainiu, assistante ingénieure, qui m'ont également accompagnée et conseillée dans ce projet.

Je remercie Farid Juillot, chercheur à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) ainsi que Jessica Vilanova, ingénieure d'étude à l'IRD, sans qui la campagne de prélèvements des sols n'aurait pas pu se faire, et pour m'avoir aidée sur la partie de l'analyse physico-chimique des sols.

Je remercie Monika Lemestre, technicienne de recherche de l'Université de Nouvelle-Calédonie (UNC), pour son aide sur l'analyse granulométrique des sols. Je remercie également Léocadie Jamet pour avoir réalisé les analyses physico-chimiques des sols au sein du LAMA (Laboratoire des Moyens Analytiques).

Je remercie les membres du jury de ma soutenance de stage, Romain Volmer, mon rapporteur ainsi que Timothée Vergne, mon examinateur.

Enfin, je tiens à remercier mes parents et ma sœur, pour leur soutien depuis le tout début et pour leurs nombreux conseils.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP : Analyse en Composantes Principales

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFM : Analyse Factorielle Multiple

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

DL₁₀₀ : Dose Létale pour tuer 100% des individus

Eau PPI : Eau Pour Préparation Injectable

ECG : Electrocardiogramme

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, i.e. dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

EMJH : Ellinghausen-McCullough modifié par Johnson et Harris

ENSO : El Niño Southern Oscillation, i.e. El Niño – Oscillation australe

Ig : Immunoglobuline

IAC : Institut Agronomique néo-Calédonien

IRD : Institut de Recherche pour le Développement

Km : Kilomètre

LPS : lipopolysaccharide

MALDI-ToF : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight, i.e. spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol

MAT : Microscopic Agglutination Test, i.e. test d'agglutination microscopique

µL : Micro-litre

µm : Micro-mètre

µM : Micro-molaire

mg : Milligramme

mL : Millilitre

PCR : Polymerase Chain Reaction, i.e. réaction de polymérisation en chaîne

ppm : Partie par million

qPCR : PCR quantitative en temps réel

RIA : Radio-Immuno Assay, i.e. dosage radio-immunologique

RPM : Rotation Par Minute

SGNC : Service Géologique de la Nouvelle-Calédonie

UNC : Université de Nouvelle-Calédonie

UREL : Unité de Recherche et d'Expertise sur la Leptospirose

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WP : Work Package

Liste des éléments chimiques :

Al : Aluminium

As : Arsenic

Ba : Baryum

Ca : Calcium

Cd : Cadmium

Co : Cobalt

Cr : Chrome

Cu : Cuivre

Fe : Fer

K : Potassium

Mg : Magnésium

Mn : Manganèse

Ni : Nickel

P : Phosphore

Pb : Plomb

Rb : Rubidium

S : Soufre

Sb : Antimoine

Se : Sélénium

Si : Silicium

Sr : Strontium

Ti : Titane

V : Vanadium

Zn : Zinc

Zr : Zirconium

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : <i>Leptospira</i> spp.....	10
Figure 2 : Arbre phylogénétique des 64 espèces de leptospires	11
Figure 3 : Cycle d'infection de la leptospirose	12
Figure 4 : Carte de la Grande Terre (en haut à droite) et focus sur la zone des prélèvements avec les 18 points GPS (à gauche).....	19
Figure 5 : Photographies des prélèvements de terrain du point VLP 55	20
Figure 6 : Dispositifs de réhydratation des sols	21
Figure 7 : Schéma récapitulatif des 14 tubes de microcosmes réalisés pour chaque point GPS	21
Figure 8 : Méthode de comptage des leptospires sur cellule de Petroff-Hausser	22
Figure 9 : Evolution de la concentration en leptospires vivants/microcosme dans les sols en fonction du temps pour la première série	28
Figure 10 : Evolution de la concentration en leptospires morts/microcosme dans les sols en fonction du temps pour la première série	29
Figure 11 : Evolution de la concentration en leptospires vivants/microcosme dans les sols en fonction du temps pour la deuxième série	30
Figure 12 : Temps (en jours) nécessaire pour atteindre 3% de la concentration initiale en leptospires à J0 pour chaque sol (barres bleues) et pour les leptospires morts (barre orange).....	31
Figure 13 : Matrices de corrélations comparant la survie des leptospires et les différents paramètres physico-chimiques des sols.....	32
Figure 14 : Résultats de l'ACP avec les variables pH, conductivité, humidité, granulométrie, centrifugation ainsi que la fraction biodisponible des éléments du sol obtenue par extraction à l'EDTA	33
Tableau 1 : Statistiques descriptives de la série de valeurs des pourcentages d'évaporation d'eau ...	27
Tableau 2 : Pourcentage d'eau contenue dans chaque sol.....	28
Tableau 3 : P-values significatives des corrélations entre la survie et les paramètres physico-chimiques des sols pour un intervalle de confiance à 95%.....	33

RESUME EN FRANÇAIS

La leptospirose est une maladie bactérienne zoonotique dont l'incidence est élevée dans les îles du Pacifique, en particulier en Nouvelle-Calédonie. Cette maladie peut se transmettre par contact direct avec des urines ou des tissus de mammifères infectés, mais le mode de transmission principal se fait de manière indirecte, *via* l'environnement. En effet, les eaux et les sols constituent un réservoir important des leptospires en leur permettant d'y survivre. Afin de mieux comprendre les mécanismes de survie des leptospires dans l'environnement, des microcosmes de sols sur 20 prélèvements sur la Grande Terre de Nouvelle-Calédonie ont été réalisés. La cinétique de survie des leptospires a été quantifiée au cours du temps et a montré des différences de survie relativement marquées entre les différents sols. En parallèle, des analyses physico-chimiques de ces 20 sols ont été réalisées afin de déterminer les paramètres permettant une meilleure survie. Les résultats ont montré des corrélations significatives positives entre la survie et la quantité totale de rubidium et de zirconium pour une partie des sols. Pour une autre partie des sols, les résultats ont montré des corrélations significatives positives entre la survie et la quantité de soufre biodisponible dans les sols, ainsi que des corrélations significatives négatives entre la survie et la quantité mobile d'aluminium et entre la survie et la quantité de particules de sable dans les sols. Il n'a cependant pas été possible de conclure quant à l'impact d'une concentration totale des éléments chimiques ou d'une fraction extraite sur la survie des leptospires. Des tendances sont également ressorties concernant le lien entre la survie des leptospires et un pH du sol neutre à légèrement alcalin. Par ailleurs, les quantifications des leptospires présents naturellement dans les sols ont montré qu'environ 40 % des sols échantillonnés présentaient des leptospires pathogènes, qui n'ont cependant pas été identifiés.

Mots-clés : **Leptospirose – Leptospores pathogènes – Sols – Nouvelle-Calédonie – Microcosmes – Environnement**

ABSTRACT IN ENGLISH

Leptospirosis is a zoonotic bacterial disease with a high incidence in the Pacific islands, especially in New-Caledonia. This disease is transmitted by direct contact with urines or tissues from infected mammals, but the main transmission route is by indirect contact with the environment. Indeed, freshwater and soil are an important reservoir of leptospires, allowing their survival. To better understand the mechanisms of survival of leptospires in the environment, soil microcosms of 20 samples taken on the Grande Terre of New Caledonia have been studied. Survival kinetic of leptospires has been quantified during several weeks and showed important differences of survival between the soils. At the same time, chemico-physical analysis of these 20 soil samples have been realized to determine the parameters which allow a better survival. Results showed significant positive correlations between survival of leptospires and the total quantity of rubidium and zirconium for a part of the soils. For the other part, results showed significant positive correlations between survival and the quantity of bioavailable sulfur in the soils, and significant negative correlations between survival and quantity of exchangeable aluminum and between survival and the proportion of sand in the soils. However, it was not possible to conclude about the impact of a total concentration of chemical elements or an extracted fraction of these elements on the survival of leptospires. Tendencies have been showed about the link between survival of leptospires and a soil of neutral to alkaline pH. Moreover, quantifications of leptospires naturally present in the soils showed that around 40 % of the soils contained pathogenic leptospires, not identified during this study.

Key words : **Leptospirosis – Pathogenic leptospires – Soils – New-Caledonia – Microcosms – Environment**

INTRODUCTION

La leptospirose est une maladie bactérienne zoonotique ubiquitaire, retrouvée sur toute la surface du globe et endémique dans de nombreuses régions tropicales. Elle est causée par une bactérie spirochète appartenant au genre *Leptospira*.

Cette maladie touche de très nombreuses espèces animales ainsi que l'Homme. Les petits mammifères, et en particulier les rongeurs, sont des porteurs asymptomatiques et réservoirs. Les leptospires sont hébergés dans leurs reins, puis excrétés dans l'environnement *via* les urines. Ces bactéries ont la capacité de survivre jusqu'à plusieurs mois dans l'environnement. La contamination se fait principalement par contact indirect avec des eaux ou des sols contaminés, mais elle peut également se faire par contact direct avec les urines ou les tissus des animaux infectés.

Chaque année, on recense près d'un million de cas dans le monde et presque 60 000 décès (Costa et al. 2015). L'incidence moyenne mondiale annuelle est de 0,4 – 0,9 / 100 000 habitants, et elle est 50 à 100 fois plus élevée dans les régions tropicales comme certaines collectivités Françaises d'Outre-Mer, dont la Nouvelle-Calédonie. Les épidémies apparaissent généralement vers la fin de la saison chaude, après les épisodes de fortes pluies (Levett 2001; « Leptospirose » 2015). L'année 2021 est une année très particulière concernant la leptospirose en Nouvelle-Calédonie. En effet, le Pacifique est soumis au phénomène climatique La Niña, impliquant de très fortes pluies, qui remettent en suspension les leptospires dans les eaux. Le nombre de cas humains de leptospirose est cette année beaucoup plus élevé que la moyenne. Au 18 mai 2021, on dénombrait 190 cas de leptospirose et 3 décès. En comparaison, l'année 2020 s'est clôturée avec 69 cas et 4 décès (voir Annexe I : nombre de cas de leptospirose par mois en 2020-2021) (« La leptospirose | Direction des Affaires Sanitaires et Sociales de Nouvelle-Calédonie » 2021).

Cette étude s'est focalisée sur les conditions de survie des leptospires dans l'environnement de Nouvelle-Calédonie, en particulier dans les sols. Nous nous sommes interrogés sur le lien entre les propriétés physico-chimiques des sols et la survie des leptospires. Différents prélèvements de sols ont été réalisés sur la Grande Terre, île principale de l'archipel, ce choix se justifiant par la quasi-absence de cas de leptospirose sur l'île des Pins et les îles Loyauté.

Cette étude a été réalisée au sein de l'UREL (Unité de Recherche et d'Expertise sur la Leptospirose) à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, sous la supervision de Cyrille Goarant et Roman Thibeaux. Elle trouve sa place au sein du projet de recherche SpiRAL (« Soils, Rainfall and Leptospirosis » pour « Sols, pluie et leptospirose ») soutenu par un financement de l'Agence Nationale de la Recherche. Ce projet de recherche s'organise autour de trois Work Packages (WP). Le WP1 a pour but d'identifier les habitats naturels des leptospires, en collectant des échantillons de terrain : 150 échantillons de sols et 80 biofilms. Le WP2 vise à étudier l'habitat, la survie ainsi que le mode de vie des leptospires, en particulier leurs interactions avec les amibes. Le stage s'est axé sur les WP1 et 2, en particulier sur les prélèvements de sols et l'étude de la survie des leptospires au sein de ces derniers. Enfin, le WP3 a pour but de modéliser la re suspension des leptospires lors de fortes pluies pour ainsi créer une carte spatiale du risque de leptospirose à l'échelle de la Nouvelle-Calédonie.

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1- Données générales sur la Nouvelle-Calédonie

La Nouvelle-Calédonie est un archipel Français situé dans l’océan Pacifique sud à 1210 km de la côte est Australienne. Elle est composée d’une île principale, la Grande Terre, faisant 400 km de long et une soixantaine de km de large, et de plusieurs îles. Elle est découpée en trois provinces : la province des Iles Loyauté, la province Nord et la province Sud. La population est d’environ 270 000 habitants d’après le dernier recensement de 2019. Près des $\frac{3}{4}$ de la population se localise dans la province Sud qui inclut Nouméa (« ISEE - Recensement » s. d.).

Le climat est de type maritime tropical, avec une saison chaude et humide allant de novembre/décembre à mars/avril et une saison plus sèche le reste de l’année (« Les climats en outre-mer | Météo-France » s. d.). La Nouvelle-Calédonie est un territoire sous l’influence du phénomène climatique El Niño Southern Oscillation (ENSO), qui lie les océans et l’atmosphère et contribue à la distribution spatiale des pluies et des vents dans les îles tropicales du Pacifique (AGIER s. d.). El Niño, une des phases du phénomène ENSO, correspond à une anomalie chaude des eaux de surface au centre de l’océan Pacifique équatorial et survient irrégulièrement, tous les 2 à 7 ans. A cause des changements de pressions atmosphériques, les vents diminuent et les eaux chaudes restent à l’est du pacifique, ce qui crée de fortes pluies à l’est (côtes du Pérou) et une sécheresse à l’ouest (Indonésie). La Niña est le phénomène inverse. Les vents augmentent, les eaux sont plus froides à l’est du Pacifique et plus chaudes à l’ouest, ce qui entraîne beaucoup de pluies à l’ouest, dont en Nouvelle-Calédonie (Keith Meldahl 2011 ; « El Niño et La Niña | Météo-France » s. d.).

2- Généralités sur la leptospirose

2.1- Aspects historiques

La première description de leptospirose ictérique avec déficience rénale a été attribuée au médecin allemand Adolf Weil en 1886, à l’université de Heidelberg. Un syndrome similaire avait déjà été décrit quelques années auparavant chez des égoutiers, mais également au sein des rizières en Chine. Le terme Japonais « Akiyami », autrement dit fièvre d’automne, est encore utilisé aujourd’hui. L’étiologie de la leptospirose a été démontrée indépendamment en Allemagne et au Japon (Levett 2001).

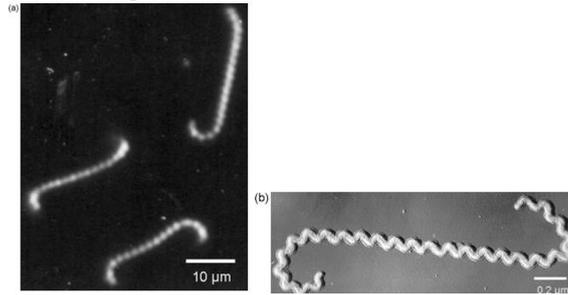
Les leptospires pathogènes ont été observés pour la première fois par Stimson en 1907 sur des tissus rénaux colorés à l’argent d’un patient rapporté mort de la fièvre jaune. La bactérie observée a été nommée *Spirochaeta interrogans*, son nom provenant de la ressemblance de son extrémité avec un point d’interrogation. La première description valide des leptospires saprophytes (i.e. non-pathogènes) a été faite en 1914 (Wolbach et Binger 1914) et celle des leptospires pathogènes a été faite en 1916 (Inada et al. 1916).

Leptospira interrogans sérovar Icterohaemorrhagiae aurait été introduit en Europe de l’Ouest au cours du XVIII^{ème} siècle en même temps que l’introduction du rat brun (*Rattus norvegicus*) depuis l’Eurasie. C’est en 1917 que le rôle des rongeurs comme réservoirs principaux des leptospires a été démontré (cité dans Levett 2001; 2015).

2.2- Biologie

La bactérie responsable de la leptospirose appartient à l’ordre des *Spirochaetales* et au genre *Leptospira*. Elle est en forme de fine spirale et mesure 0,1 µm de diamètre et 6 à 20 µm de longueur (figure 1). À son extrémité se trouve une sorte de crochet en forme de point d’interrogation. C’est une bactérie présentant une mobilité importante permise grâce à la présence de deux endoflagelles, conférant à la bactérie deux types de mouvements : translationnel et non translationnel.

Figure 1 : Leptospira spp.
(a) : microscopie à fond noir, (b) : microscopie électronique
D'après Adler et de la Peña Moctezuma 2010



Comme les autres spirochètes, les leptospires possèdent une double membrane. La membrane cytoplasmique et la paroi de peptidoglycanes sont fortement associées et sont recouvertes d'une membrane externe.

Ce sont des bactéries aérobies obligatoires avec un optimum de croissance entre 28°C et 30°C. Elles sont catalase + et oxydase +. Elles sont capables de se développer dans un milieu riche en vitamines (notamment la B2 et la B12 qui sont des facteurs de croissance), en acides gras à longues chaînes et en sels d'ammonium (Levett 2001).

Le génome des leptospires compte en moyenne 5 000 000 pb (paires de bases) et présente un chromosome principal d'environ 4 400 000 pb et un autre chromosome d'environ 350 000 pb. Une vingtaine de plasmides ont été mis en évidence dans différentes souches (Y. Wang et al. 2015).

2.3- Classification

Le genre *Leptospira* est défini par plusieurs critères. Les leptospires sont mobiles et présentent un crochet terminal à leur extrémité. Ce sont les seules bactéries spirochètes à pouvoir pousser sur le milieu EMJH (Ellinghausen-McCullough modifié par Johnson et Harris). Elles ont un métabolisme aérobie, contrairement aux autres bactéries de l'ordre des spirochètes (genre *Borrelia* microaérophile et genre *Treponema* le plus souvent anaérobie). Elles utilisent des acides gras comme source de carbone et d'énergie. Enfin, elles incorporent des bases puriques au lieu de bases pyrimidiques, ce qui leur confère une résistance au 5-fluoro-uracile, qui est un analogue des bases pyrimidiques (Postic et al. 2000).

2.3.1- Classification sérologique

La classification sérologique repose sur le sérovar, qui est l'unité de base taxonomique de l'espèce *Leptospira* dans ce système taxonomique. Plus de 250 sérovats pathologiques et plus de 60 sérovats saprophytes ont été décrits (Postic et al. 2000). Si le sérovar est l'unité de base ayant une valeur taxonomique, les sérovats proches sont regroupés par simplicité en sérogroupes, lesquels n'ont pas de valeur taxonomique. Cette classification sérologique est encore largement utilisée du fait de la prédominance du diagnostic sérologique. Elle est complétée par une classification génotypique incluant les souches saprophytes et virulentes et se basant sur des espèces génomiques.

2.3.2- Classification génétique

Historiquement, le genre *Leptospira* était divisé en deux espèces selon leur milieu de vie :

- *L. interrogans* sensu lato, contenant toutes les souches pathogènes pour l'Homme et/ou l'animal.
- *L. biflexa* sensu lato, contenant toutes les souches saprophytes isolées de l'environnement et non pathogènes pour l'Homme ni pour l'animal (Levett 2001).

Ces deux espèces peuvent s'identifier grâce à des critères phénotypiques. Elles peuvent toutes les deux croître en culture EMJH à 29°C. En revanche, seule l'espèce *L. biflexa* peut croître à 13°C et en présence de 8-azaguanine. Les espèces historiques (*L. interrogans* et *L. biflexa*) ont été conservées, initialement en se distinguant de l'ancienne taxonomie grâce au suffixe *sensu stricto*. Trois sous-groupes ont alors été définis :

- Sous-groupe pathogène, regroupant toutes les espèces capables d'infecter l'Homme et l'animal et causant la leptospirose.
- Sous-groupe intermédiaire, pouvant causer la maladie chez l'Homme et l'animal mais avec une virulence et des symptômes plus faibles.
- Sous-groupe saprophyte, regroupant les bactéries non-pathogènes présentes dans l'environnement (Goarant 2016).

En 2019, une nouvelle classification du genre *Leptospira* a été proposée, divisant les leptospires en deux clades :

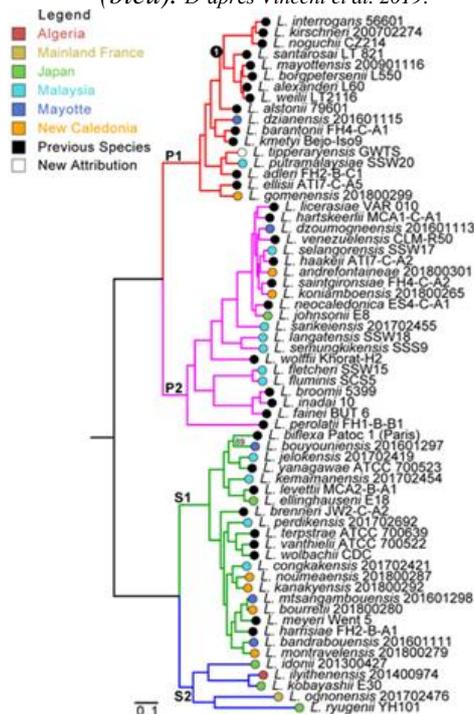
- P pour « pathogènes », regroupant toutes les espèces responsables d'infections chez les humains et animaux ainsi que les souches environnementales phylogénétiquement proches, même celles dont le statut de virulence n'a pas été prouvé.
- S pour « saprophytes », regroupant les espèces isolées dans l'environnement naturel et non-responsables d'infections.

Ces deux clades ont été divisés en deux sous-clades :

- P1 : regroupement de l'ancien groupe « pathogène ».
- P2 : regroupement de l'ancien groupe « intermédiaire ».
- S1 : regroupement de l'ancien groupe « saprophyte ».
- S2 : nouveau sous-clade incluant plusieurs nouvelles espèces saprophytes, notamment *L. idonii* (Vincent et al. 2019).

Aujourd'hui, 64 espèces de leptospires ont été identifiées, mais la taille du genre *Leptospira* ne cesse d'augmenter par la description régulière de nouvelles espèces, appartenant à la fois aux groupes saprophyte, intermédiaire et pathogène (Thibeaux et al. 2018) (figure 2).

Figure 2 : Arbre phylogénétique des 64 espèces de leptospires
Les branches colorées correspondent aux quatre sous-clades : P1 (rouge), P2 (rose), P3 (vert), P4 (bleu). D'après Vincent et al. 2019.



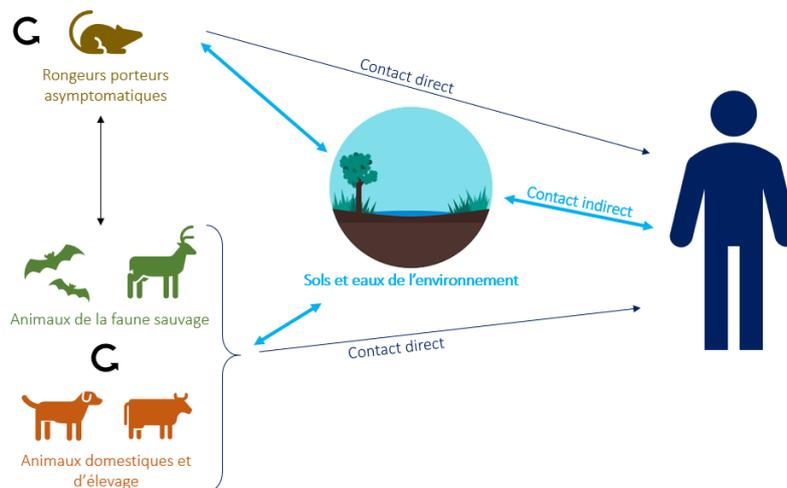
2.4- Epidémiologie

La contamination d'un hôte mammifère se fait soit de manière directe par contact avec les urines ou les organes d'un animal infecté, soit de manière indirecte par contact avec des environnements contaminés ou *via* les sols et les eaux douces (figure 3). Les transmissions interhumaines sont très rares mais des transmissions sexuelles sont possibles (Levett 2001; Goarant 2016). La leptospirose touche davantage les adultes que les enfants, et elle est également plus sévère chez les adultes. Les raisons en sont cependant peu connues (Guerrier et al. 2013).

Les hôtes de maintenance sont des espèces réservoirs qui permettent une circulation enzootique du pathogène. Les principaux hôtes de maintenance sont les petits mammifères et en particulier les rongeurs. On retrouve également les animaux de bétail, en particulier les vaches et les porcs, mais également les animaux domestiques comme le chien (Guernier et al. 2018). De très nombreuses espèces animales peuvent être porteuses de leptospires. Elles excrètent les bactéries pathogènes dans leurs urines qui se retrouvent alors dans l'environnement.

L'homme est un hôte accidentel dans le cycle car il n'excrète pas suffisamment de leptospires pour être considéré comme un réservoir. Les voies d'entrée principales du pathogène sont les coupures sur la peau et les conjonctives et muqueuses. La contamination peut se faire par contact direct avec des urines ou après une immersion prolongée dans l'eau, par inhalation d'eau ou d'aérosols infectés et plus rarement par une morsure d'animal. L'excrétion de la bactérie dans les urines peut persister plusieurs mois après guérison. Les sites de persistance des leptospires sont les tubules rénaux proximaux, assurant la dissémination des bactéries et la chambre antérieure et l'humeur vitrée de l'œil.

Figure 3 : Cycle d'infection de la leptospirose
Figure personnelle, réalisée d'après Ko, Goarant, et Picardeau 2009



L'infection de l'homme survient en contexte professionnel ou lors d'activités de loisir. Certains professionnels sont plus à risque que d'autres, notamment tous ceux en contact avec des animaux ou avec des sols et eaux risquant d'être contaminés : vétérinaires, travailleurs en abattoir, égoutiers, éleveurs, mineurs, agriculteurs... Certaines activités de loisir sont aussi plus à risque, notamment la baignade en eaux douces, le canoé, le rafting et la pêche (Levett 2001; Ko, Goarant, et Picardeau 2009; Goarant 2016).

2.5- Pathogénie

Le pathogène pénètre dans l'organisme *via* une coupure sur la peau, les conjonctives, les muqueuses ou plus rarement par voie orale ou par morsure. La pénétration des leptospires dans l'organisme ainsi

que leur virulence sont facilitées par leur mobilité et leur morphologie. En effet, la mobilité serait nécessaire à la virulence en favorisant l'entrée du pathogène ainsi que sa dissémination dans l'organisme (Ristow 2007, Fontana et al. 2016). Le pathogène se disperse ensuite dans le corps *via* la circulation sanguine. Les leptospires sont rarement observés au sein des cellules de l'hôte. Ils peuvent toutefois y entrer mais ce processus est mal connu. Les bactéries vont ensuite se loger dans certains organes et colonisent en particulier les tubules rénaux, le foie et les poumons. Les leptospires sont détectables dans le sang quelques minutes après une inoculation expérimentale, et ils sont détectés dans les organes cibles à partir du 3^{ème} jour d'infection (Ko, Goarant, et Picardeau 2009).

En termes de lésions d'organes, la leptospirose entraîne des vascularites, des dommages endothéliaux dans les cas les plus sévères, des infiltrations inflammatoires, des hémorragies, des pétéchies et une CIVD (Coagulation intravasculaire disséminée). L'histopathologie est particulièrement marquée sur le foie, les reins, le cœur et les poumons (Levett 2001; Ko, Goarant, et Picardeau 2009).

Certains leptospires pathogènes produisent des toxines, comme par exemple le sérovar Pomona qui produit une hémolysine et entraîne une maladie hémolytique chez le bétail, le sérovar Canicola qui produit une phospholipase ou encore les sérovats Pomona et Copenhageni qui produisent une protéine cytotoxique (Levett 2001). Toutefois, les mécanismes de virulence des leptospires pathogènes demeurent largement méconnus (Picardeau 2017).

La réponse immunitaire est principalement humorale. Il y a également un peu de réponse cellulaire avec la production d'interféron gamma. Les anticorps ont pour cible principale le LPS (lipopolysaccharide) présent à la surface de la membrane externe des leptospires. D'autres protéines de surface peuvent être la cible des anticorps (Ristow 2007). L'immunité est relativement spécifique à un sérovar ou à des sérovats homologues, et il y a en général peu de réaction croisée du fait de la spécificité des LPS (Levett 2001; Ko, Goarant, et Picardeau 2009).

2.6- Symptômes chez l'Homme

La période d'incubation varie de 5 à 14 jours en moyenne et peut aller de 2 jusqu'à 30 jours dans les extrêmes. Les manifestations cliniques sont très diverses et dépendent de plusieurs facteurs, notamment la sensibilité de l'hôte, la dose infectieuse ainsi que les caractéristiques de la virulence de la souche. Dans la majorité des cas, le patient guérit rapidement une semaine après le début des symptômes. Entre 5 et 15% des patients développent d'autres manifestations plus graves dans une phase plus tardive qui survient 2 à 6 jours après le début des symptômes (Ko, Goarant, et Picardeau 2009). La létalité varie de 5 à 30% selon la présentation clinique (Goarant 2016).

Le premier symptôme de la maladie est une fièvre aiguë d'apparition brutale. Elle est souvent accompagnée par des maux de tête, des myalgies, des douleurs abdominales, des suffusions conjonctivales et plus rarement des rougeurs cutanées. Dans de très rares cas, on peut rencontrer des méningites aseptiques et des hémorragies pulmonaires. Cette forme de maladie, appelée leptospirose anictérique, survient dans la majorité des cas. Elle dure environ une semaine et les symptômes disparaissent quand la production d'anticorps commence.

La forme ictérique est beaucoup plus rare (5-10%) mais beaucoup plus sévère et rapidement progressive. Elle contribue à la létalité élevée. Elle se manifeste par un ictère non-associé à une nécrose hépatocellulaire, à une déficience rénale souvent avec oligurie (facteur de létalité) ainsi que des hémorragies, notamment alvéolaires dans les aggravations pulmonaires (Levett 2001). Cette triade de symptômes (ictère, hémorragies et insuffisance rénale) est aussi appelée maladie de Weil (Goarant 2016).

La déficience rénale est souvent associée à une pancréatite, parfois nécrosante, et à une thrombocytopénie (> 50% des cas). D'autres symptômes respiratoires peuvent apparaître, tels que de la toux, une dyspnée, des hémoptysies, des insuffisances respiratoires, des effusions pleurales et parfois un syndrome de détresse respiratoire.

Il peut également y avoir des manifestations cardiaques comme des myocardites, des anomalies de l'ECG (électrocardiogramme) ou encore des arythmies. On peut rencontrer des formes oculaires avec suffusions conjonctivales et ictère de la sclère (pathognomonique de la maladie), plus rarement une uvéite antérieure avec perturbation de l'acuité visuelle (Levett 2001).

Enfin, il peut y avoir des manifestations neurologiques comme des méningites aseptiques ou encore des manifestations gastro-intestinales comme de la diarrhée et des vomissements (Goarant 2016).

Certains facteurs de risque associés à des formes sévères de leptospirose ont été mis en évidence, comme le fait d'être un fumeur régulier, un délai supérieur à deux jours entre le début des symptômes et le début de l'antibiothérapie ainsi que le fait d'être infecté par la souche *Leptospira interrogans* séro groupe Icterohaemorrhagiae (Tubiana et al. 2013).

L'hypothèse d'une infection chronique chez l'Homme a été proposée mais pas encore démontrée. Des cas d'uvéites, maux de tête et perturbations visuelles récurrents ainsi qu'un cas de méningite ont été décrits bien après un diagnostic de leptospirose (Levett 2001). Quelques cas d'isolement de leptospires provenant d'urines de patients ayant eu la leptospirose longtemps auparavant ont été décrits, mais ces cas ne sont pas considérés comme significatifs sur le plan épidémiologique (Ganoza et al. 2010).

2.7- Détection et identification des leptospires

2.7.1- Isolement, visualisation microscopique et culture

Les leptospires isolés peuvent être observés directement par microscopie à fond noir ou microscopie optique avec coloration argentique de Warthin-Starry (peu utilisée en pratique). Le seuil de détection est de 10^4 bactéries par mL (Levett 2001). Morphologiquement, rien ne permet de distinguer les leptospires pathogènes des leptospires saprophytes. Des techniques de coloration peuvent être appliquées, comme l'immunofluorescence et la coloration à l'acridine orange.

Des cultures de leptospires peuvent également être réalisées. Le milieu de culture le plus utilisé est le tween-albumine, aussi appelé EMJH (Ellinghausen-McCullough modifié par Johnson et Harris). Ce milieu peut être rendu sélectif par ajout de 5-fluoro-uracile. D'autres milieux peuvent être utilisés tels que le milieu de tween-albumine solide, le milieu de Korthof ou encore le milieu de Stuart. L'incubation se fait à 28-30°C à l'obscurité. Les leptospires étant aérobies, une agitation des cultures facilite la croissance.

Après la culture, les bactéries peuvent être observées au microscope à fond noir (Postic et al. 2000). Toutefois, la culture est délicate du fait que les leptospires ont une croissance lente, rendant les cultures sensibles aux risques de contamination. Ainsi, lors de l'isolement d'un leptospire pathogène, les cultures doivent être conservées et observées régulièrement pendant 12 à 14 semaines, rendant cette technique inutile pour le diagnostic biologique en pratique médicale.

2.7.2- Diagnostic sérologique

Les anticorps sont détectables dans le sang 5 à 7 jours après le début des symptômes. Le test le plus spécifique et méthode de référence en sérologie est le MAT (Microscopic Agglutination Test). Il consiste à mélanger des dilutions croissantes du sérum de patient avec des leptospires vivants de sérovars connus en suspension, puis à évaluer le degré d'agglutination des leptospires au microscope à fond noir. Le diagnostic est positif quand on observe plus de 50% des leptospires qui agglutinent. Les anticorps mis en évidence sont des IgM (immunoglobulines M) au début de l'infection puis des IgG.

Il existe d'autres tests sérologiques comme la méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, i.e. dosage d'immunoabsorption par enzyme liée), la macroagglutination sur lame ou encore la fixation du complément (Postic et al. 2000 ; Levett 2001). Il est souvent préférable de confirmer les résultats de ces techniques en utilisant la méthode de référence MAT (Goarant 2016).

2.7.3- Détection d'antigènes

La détection d'antigène a une meilleure spécificité que la visualisation par microscopie sur fond noir. Plusieurs techniques peuvent être utilisées, comme le RIA (Radio-Immuno Assay, i.e. dosage radio-immunologique), permettant de détecter 10^4 à 10^5 leptospires/mL et la technique ELISA, permettant de détecter 10^5 leptospires/mL (Levett 2001).

2.7.4- Diagnostic moléculaire

Après extraction de l'ADN de la matrice contenant les leptospires, des PCR (Polymerase Chain Reaction, i.e. réaction de polymérisation en chaîne) peuvent être réalisées. Plusieurs gènes peuvent être amplifiés spécifiquement, notamment une séquence spécifique du gène codant la sous-unité ribosomale 16S, gène présent et conservé chez toutes les espèces bactériennes (Postic et al. 2000 ; Levett 2001).

La qPCR (PCR quantitative en temps réel) a permis d'augmenter la sensibilité et la spécificité du diagnostic. Plusieurs technologies fluorescentes sont possibles, comme le SYBR Green I et la technologie TaqMan (Goarant 2016). Pour diagnostiquer la leptospirose, une qPCR ciblant des gènes présents uniquement chez les espèces pathogènes peut être utilisée. Parmi ces gènes, on retrouve le gène *lfb1*, un fragment d'ADN de 331 pb, le gène *secY* ainsi que le gène *lipL32*. La PCR ciblant ce dernier gène est très efficace et utilisée en routine dans le plus grand nombre de laboratoires (Stoddard et al. 2009). Des études ont montré une meilleure efficacité de la détection de certaines espèces de leptospires en utilisant des amorces dégénérées telles que lipL32-47Fd, lipL32-301Rd et lipL32-189P avec la sonde TaqMan initialement décrite (Thibeaux et al. 2018).

Enfin, lorsqu'on dispose d'une souche isolée, d'autres techniques d'identification peuvent être utilisées, comme le séquençage du génome complet, ou encore l'analyse de spectre de masse des protéines par la technique émergente dans le domaine de la microbiologie MALDI-Tof (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight, i.e. spectrométrie de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol). Ces deux techniques permettent l'identification de l'espèce de leptospire à l'aide d'une comparaison avec les génomes ou les spectres de masse des espèces de référence enregistrés dans une base de données (Thibeaux et al. 2018). Elles ne sont cependant pas ou très peu utilisées pour du diagnostic car elles nécessitent un isolat bactérien.

2.7.5- Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel de la leptospirose est vaste car les symptômes de la maladie ne sont pas spécifiques. Dans les zones tropicales avec la présence de moustiques, il inclut la dengue et la malaria. Etant donné que la leptospirose est une maladie ubiquitaire à répartition mondiale, de nombreuses autres pathologies rentrent dans le diagnostic différentiel comme la grippe, le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), la typhoïde, les encéphalites, les méningites, la fièvre Q, les infections par les entérovirus, la maladie de Kawasaki, la poliomyélite, la rougeole, la rickettsiose, la brucellose, la mononucléose, les hépatites virales, les pneumonies, les infections par les hantavirus, le typhus murin et les cas de fièvres isolées (Levett 2001; S. Wang, Stobart Gallagher, et Dunn 2020). Du fait de la quasi absence de signe pathognomonique, le diagnostic biologique est indispensable à la confirmation d'une suspicion clinique et épidémiologique de leptospirose.

2.8- Traitement

Le traitement antibiotique doit être réalisé le plus précocement possible après le début des symptômes afin de limiter les formes graves. Les leptospires sont sensibles à de nombreux antibiotiques comme l'amoxicilline, la pénicilline, les tétracyclines et la ceftriaxone, qui sont efficaces. D'autres molécules peuvent également être utilisées, comme les céphalosporines de 3^{ème} génération, les quinolones et l'érythromycine. S'il y a un risque de co-infection, la doxycycline peut être utilisée.

Il n'existe pas de résistance acquise des leptospires aux antibiotiques démontrée à ce jour.

Si une forme sévère survient, des soins intensifs avec fluidothérapie et éventuellement dialyse sont nécessaires. Des corticoïdes peuvent être utilisés en cas de choc septique et réponse inflammatoire excessive.

2.9- Prévention

De nombreux vaccins ont été commercialisés mais ils sont en pratique très peu utilisés. D'une part, ils ne protègent souvent que contre un seul sérovar et ne confèrent donc pas d'immunité croisée. D'autre part, l'immunité induite dure peu de temps et on conseille un rappel annuel, ce qui pose problème pour la vaccination à large échelle. De nombreux essais sont en cours afin de trouver une protéine de surface qui procurerait une meilleure protection, contre un plus grand nombre de sérogroupes et avec une durée d'immunisation plus longue. Des vaccins polyvalents sont aujourd'hui utilisés chez les animaux, comme le vaccin L4 chez le chien.

Une chimioprophylaxie avec de la doxycycline a déjà été utilisée, notamment chez des soldats envoyés dans des zones à haut risque, mais l'efficacité n'a jamais été démontrée (Goarant 2016).

Il existe de nombreuses mesures de prévention qui doivent être mises en place en particulier avant les périodes de risque élevé. Ces mesures passent par les campagnes d'éradication des rongeurs ou encore une vérification du bon fonctionnement des égouts afin d'éviter des inondations. Des campagnes de préventions sont également réalisées, en conseillant par exemple d'éviter de se baigner après des fortes pluies, d'éviter de marcher pieds nus ou encore de garder les réserves alimentaires bien fermées hermétiquement afin d'éviter la venue et la prolifération de rongeurs. Ces mesures de prévention visent à limiter le réservoir des mammifères porteurs d'une part, et à limiter l'exposition des hommes à la contamination d'autre part (Goarant 2016).

Enfin, les leptospires sont très sensibles aux rayons UV (ultra-violet), aux produits chlorés et aux détergents ainsi qu'à des conditions acides et aux basses températures (Goarant 2016).

2.10- Surveillance

La définition clinique d'un cas suspect de leptospirose est la suivante : « syndrome fébrile aigu avec des maux de tête, myalgies et une prostration pouvant aussi inclure des suffusions conjonctivales, un méningisme, une anurie/oligurie ou protéinurie, un ictère, des hémorragies, des déficiences cardiaques ou arythmies et des éruptions cutanées chez un patient ayant eu une exposition potentielle à un animal infecté ou à un environnement avec de l'urine animale » (Goarant 2016).

Lorsqu'un cas est suspecté ou confirmé, plusieurs données sont à collecter, notamment des données géographiques, démographiques, cliniques, épidémiologiques et météorologiques. Une surveillance événementielle des cas est mise en place, accompagnée d'une surveillance syndromique visant à identifier d'éventuelles épidémies (nombre élevé de fièvres d'origine inconnue, de syndromes hémorragiques ou encore de déficiences rénales) (Goarant 2016).

3- La leptospirose en Nouvelle-Calédonie

3.1- Généralités et historique

L'Océanie est la région la plus impactée dans le monde par la leptospirose en termes de morbidité et de mortalité, avec en moyenne 150 cas pour 100 000 habitants par an et 9,6 décès pour 100 000 habitants par an. Le climat tropical, la pauvreté, l'isolement ainsi que le mode de vie expliquent l'importance de ce fardeau en Océanie (Guernier et al. 2018). L'incidence de la leptospirose est 10 à 100 fois plus élevée dans les zones tropicales que dans les zones tempérées.

La leptospirose a vraisemblablement été importée en Nouvelle-Calédonie par bateau par le biais de rats contaminés lors de la colonisation en 1853. Les premiers cas ont été détectés en 1954. L'incidence moyenne actuelle est supérieure à 30 cas annuels pour 100 000 habitants, avec une fatalité d'environ 3%. Dans certaines régions où la leptospirose est hyper-endémique, l'incidence annuelle peut aller jusqu'à 500 cas pour 100 000 habitants (Perez et al. 2011). Actuellement, on estime que l'incidence de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie est quasiment 100 fois plus élevée que celle de métropole.

D'importantes épidémies ont eu lieu en 2008, 2009 et 2011. Une étude réalisée sur dix ans, de 2006 à 2016, a montré que les hommes étaient plus souvent touchés que les femmes, avec un sexe ratio hommes/femmes de 2. L'âge moyen des cas est de 33,6 ans et l'âge moyen des cas mortels est de 48,6 ans (Klement-Frutos et al. 2020).

3.2- Sérogroupes et espèces animales impliquées

Une étude réalisée entre 2006 et 2016 a montré que le séroroupe le plus présent chez les malades atteints de leptospirose en Nouvelle-Calédonie est *Leptospira interrogans* séroroupe Icterohaemorrhagiae, retrouvé chez plus de 57% des patients malades. Les autres sérogroupes les plus fréquemment retrouvés sont Pyrogenes (20%), Australis (12%), Ballum (6%) et Pomona (2%) (Klement-Frutos et al. 2020).

La biodiversité de mammifères est relativement faible en Nouvelle-Calédonie. Il n'existe que quatre espèces de rongeurs présents sur le territoire : le rat polynésien (*Rattus exulans*), le rat brun (*Rattus norvegicus*), le rat noir (*Rattus rattus*) et la souris grise (*Mus musculus*). Le rat brun est le réservoir principal de *Leptospira interrogans*, séroroupe Icterohaemorrhagiae et la souris grise est le réservoir principal de *Leptospira borgpetersenii*, séroroupe Ballum (Perez et al. 2011). Un contrôle de la population de rongeurs, principaux réservoirs des leptospires pathogènes pour l'Homme, est donc nécessaire afin de limiter le nombre de cas (Tubiana et al. 2013).

Parmi les autres espèces animales pouvant être atteintes par la leptospirose, on retrouve principalement les bovins, les porcs, les cerfs, les chevaux ainsi que les chiens en Nouvelle-Calédonie (C. Goarant et al. 2009).

3.3- Leptospirose et climat tropical

La majorité des cas survient entre le mois de décembre et le mois d'avril, avec un pic saisonnier autour de mars/avril. Cette période correspond à la fin de la saison des pluies (Klement-Frutos et al. 2020). Sous l'effet du phénomène climatique ENSO, en particulier lors des phases La Niña, on constate également des pics épidémiques de la maladie (Weinberger et al. 2014). Lors de ces périodes chaudes et pluvieuses, le risque d'inondation est plus important, augmentant ainsi le risque d'exposition de l'Homme aux leptospires présents dans les eaux et sols humides (Perez et al. 2011).

On estime que le changement climatique global actuel aura un impact sur la distribution des leptospires dans l'environnement, entraînant une modification de l'épidémiologie de la maladie (Bierque, Thibeaux, et al. 2020).

4- Leptospirose et environnement

Les leptospires saprophytes se retrouvent naturellement dans l'environnement, mais il a été démontré que les leptospires pathogènes peuvent également y survivre et conserver leur virulence pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois. Le sol constitue un réservoir environnemental des leptospires pathogènes en leur offrant une atmosphère protectrice. Ils peuvent y survivre, mais ne peuvent probablement pas ou seulement exceptionnellement s'y multiplier (Bierque, Thibeaux, et al. 2020). Les écosystèmes doivent donc être considérés comme des réservoirs passifs, mais néanmoins majeurs, dans l'épidémiologie de la maladie (Thibeaux et al. 2018). Certains facteurs biotiques et

abiotiques influencent la survie des leptospires dans l'environnement, en particulier un pH légèrement alcalin (allant jusqu'à 8), un haut niveau en oxygène et une faible concentration en sels.

Les cas humains de leptospirose apparaissent très souvent après d'importantes précipitations. L'hypothèse émergente est que les fortes pluies remettent en suspension les leptospires avec les particules du sol, les transportant ainsi dans les eaux de surface, où les Hommes s'exposent (Bierque, Thibeaux, et al. 2020).

4.1- Survie des leptospires dans les sols

Les leptospires peuvent survivre dans les sols saturés en eau jusqu'à six mois, cette durée dépendant de la souche et de l'espèce.

Certains sols de Nouvelle-Calédonie sont dits ultramafiques, c'est-à-dire qu'ils sont riches en métaux (dont le nickel) car ils proviennent de roches magmatiques contenant elles-mêmes beaucoup de métaux. Les caractéristiques de ces sols permettent le développement d'un écosystème original très diversifié (Jourand et al. 2010). Les leptospires de l'environnement peuvent s'associer avec d'autres bactéries du sol, comme *Azospirillum* ou *Sphingomonas*, et y former des biofilms (Barragan et al. 2011, Vinod Kumar et al. 2015). Il a été démontré qu'une co-incubation des leptospires avec des *Sphingomonas* augmente leur taux de croissance. Il a également été démontré que l'adsorption des leptospires dans les sols est augmentée lorsqu'ils sont en contact avec *Azospirillum brasilense* (Barragan et al. 2011). De même, des interactions entre les leptospires et les amibes, des microorganismes du sol, sont suspectées, mais des recherches sont encore en cours, notamment dans le cadre des Work Packages 1 et 2 du projet SpiRAL (Bierque, Thibeaux, et al. 2020).

4.2- Survie des leptospires dans les eaux douces

Les eaux douces constituent également une des sources principales de leptospires pour les humains et animaux. On retrouve cependant moins de leptospires dans les eaux que dans les sols. Les concentrations en bactéries sont généralement plus élevées dans les zones urbaines que les zones rurales. Des études ont montré une forte corrélation entre la concentration en leptospires et la turbidité de l'eau. Les eaux des égouts sont également une source importante. Dans des bidonvilles du Brésil par exemple, de l'ADN de leptospire a été détecté dans 36% des échantillons d'eaux d'égout (en l'occurrence, des caniveaux d'eaux usées à ciel ouvert) (cité dans Bierque, Soupé-Gilbert, et al. 2020).

Tout comme dans les sols, la survie des leptospires dans l'eau est possible pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois et est intrinsèque à la souche et à l'espèce. Une étude a montré la survie et la conservation de la virulence de *L. interrogans* dans de l'eau minérale de bouteille pendant environ 20 mois, après inoculation en milieu de culture EMJH (Bierque, Soupé-Gilbert, et al. 2020).

Il reste encore de nombreuses lacunes concernant la connaissance des facteurs environnementaux qui conditionnent la survie des espèces virulentes en lien avec la maladie humaine et animale (Bierque, Thibeaux, et al. 2020).

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS DU TRAVAIL PERSONNEL

Introduction

La leptospirose est une maladie bactérienne dont la contamination se fait principalement par contact indirect avec l'environnement, et en particulier avec les eaux et les sols contaminés. Durant ce stage, nous avons étudié la survie de leptospires pathogènes dans différents types de sols, puis corrélé cela avec les paramètres physico-chimiques de ces sols. Pour cela, nous avons utilisé des microcosmes de sols, qui sont de petits environnements artificiels reproduisant au mieux les caractéristiques environnementales dans lesquelles les leptospires survivent. Plusieurs études ont déjà été menées sur les microcosmes, démontrant notamment une rapide diminution des nombres de leptospires dans les microcosmes de sol (Casanovas-Massana et al. 2018a).

Dans le cadre du projet SpiRAL, un total de 150 prélèvements de sols doit être effectué sur toute la Grande Terre. Dans cette étude, les 20 premiers échantillons de sols ont été prélevés sur le terrain, dans la moitié Sud-Ouest de la Grande Terre de Nouvelle-Calédonie. Ces prélèvements de terrain ont été réalisés en partenariat avec l'IRD (Institut de Recherche pour le Développement) et l'IAC (Institut Agronomique néo-Calédonien) dans le cadre du projet VALOPRO, qui vise à la valorisation des sols de Nouvelle-Calédonie. Les microcosmes ont été réalisés à partir des échantillons de sols prélevés, et ils ont été inoculés avec des leptospires pathogènes *Leptospira interrogans* Manilae, en quantité connue. Pendant ensuite plusieurs semaines, les microcosmes inoculés avec les leptospires ont été suivis au cours du temps, et l'ADN a été extrait puis quantifié par qPCR à différents intervalles de temps : J0 (correspondant au jour de l'inoculation des microcosmes avec les leptospires), J4, J7, J14, J21, J28, J35 et J42. En parallèle, des analyses physico-chimiques des sols prélevés ont été menées à l'IRD. La quantification de l'ADN des sols par qPCR a permis de déterminer une variable de survie, qui a ensuite été comparée aux paramètres physico-chimiques des sols.

1- Matériel et méthodes

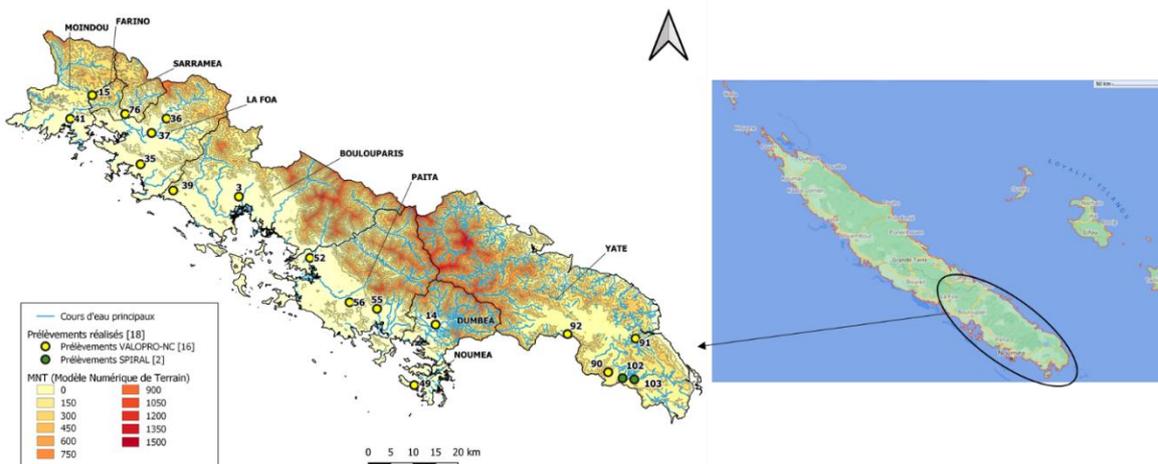
1.1- Récolte des échantillons de sols sur le terrain

Les 20 prélèvements de sols ont été réalisés dans la moitié sud de la Grande Terre, sur un total de neuf communes différentes : Boulouparis, Dumbéa, Farino, La Foa, Moindou, Nouméa, Païta, Sarraméa et Yaté (figure 4). L'Annexe II contient le récapitulatif des points de prélèvements avec les communes et types de sols. Concernant la numérotation des points, chacun d'eux commence par « VLP » pour le projet « VALOPRO » et est suivi d'un numéro, attribué en classant toutes les communes par ordre alphabétique. Les deux points commençant par « SPI » ont été ajoutés et ne font pas partie du projet VALOPRO mais uniquement du projet SpiRAL.

Les points VLP 39 et VLP 52 ont fait l'objet de deux prélèvements chacun car les parcelles possédaient deux types de sols relativement différents. Ces prélèvements ont été nommés VLP 39_1, 39_2, 52_1 et 52_2.

Figure 4 : Carte de la Grande Terre (à droite) et focus sur la zone des prélèvements avec les 18 points GPS (à gauche)

Carte de droite : Google Map, Carte de gauche : réalisée sur Qgis par J. Vilanova



Pour chaque point GPS, cinq échantillons représentatifs de la parcelle et relativement espacés ont été prélevés. La distance entre les points dépendait de la taille de la parcelle. Plus celle-ci était grande, plus les points étaient espacés. Pour chaque échantillon, un cube de terre de 20 cm de côté a été creusé. Une photographie avec une échelle ainsi qu'une ardoise avec le numéro du point et des éventuelles remarques a été prise (figure 5 A). Une photographie de l'environnement autour du point de prélèvement a également été réalisée.

Puis, des mesures d'humidité, de conductimétrie et de température ont été prises dans le sol à l'aide de l'humidimètre FieldScout TDR 150 Spectrum, en faisant une moyenne sur quatre mesures prises sur chacune des faces du trou. Sur un des cinq échantillons, 500 mg de terre récoltée à la surface du trou ont été mis dans deux tubes PowerSoil DNA (2 x 250 mg) afin de rechercher la présence de leptospires directement dans le sol natif. Enfin, 500 g de terre environ ont été prélevés sur une des faces du trou, allant de 0 à 20 cm, et mis dans un grand bac.

Cette opération a été répétée pour les quatre autres prélèvements du point GPS donné. A la fin, une photographie des cinq prélèvements dans le bac a été prise (figure 5 B), puis ces cinq prélèvements ont été homogénéisés pendant quelques minutes. La quantité totale de terre a été ensuite répartie dans deux sachets plastiques d'environ un kg, un pour l'IRD et un pour l'Institut Pasteur.

Figure 5 : Photographies des prélèvements de terrain du point VLP 55

A : photographie du cinquième échantillon du point VLP 55 : trou réalisé, échelle donnée à l'aide du mètre gradué et ardoise informative avec le nom du point GPS, le numéro de l'échantillon (Pt 5) ainsi que des commentaires éventuels (ici EG signifie « Eléments grossiers »).

B : photographie des cinq échantillons prélevés et mis dans le bac avant homogénéisation. L'ardoise est placée devant le premier échantillon, puis les autres ont été ajoutés dans le sens des aiguilles d'une montre. Source personnelle



De retour au laboratoire, le sachet de terre a été stocké au réfrigérateur à 4°C.

1.2- Tamisage et réhydratation des sols

Au laboratoire, 100 g de chaque sol ont été tamisés à travers un tamis de 2 mm afin de retirer les éléments grossiers (cailloux, racines...), puis de nouveau homogénéisés.

Les sols ont ensuite été réhydratés (figure 6). Pour cela, environ 10 g de terre ont été déposés dans une boîte de Pétri et 2 à 10 mL d'eau ultrapure (Eau pour préparation injectable – eau PPI) ont été ajoutés. La quantité d'eau ajoutée variait selon le type de sol, en particulier leur capacité à retenir l'eau et leur degré d'humidité déjà présent initialement. Le but de la réhydratation était de saturer les sols en eau.

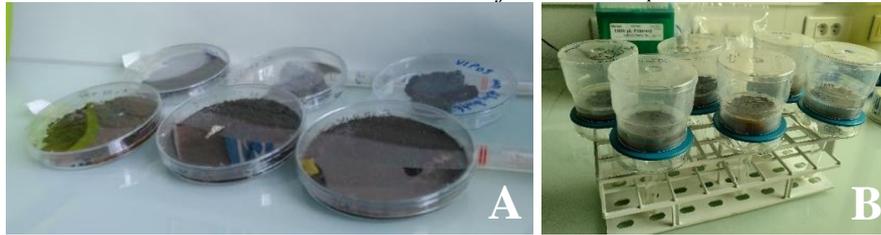
Les boîtes de Pétri ont ensuite été inclinées d'un angle d'environ 10° et laissées ainsi pendant deux jours afin que le surplus d'eau s'écoule dans la partie déclinée de la boîte.

En parallèle et afin de déterminer la meilleure façon de réhydrater chaque sol, une autre technique a été utilisée. Dix grammes de terre ont été déposés dans un entonnoir de filtration Nalgene (porosité 1,2 µm). La terre a été réhydratée de la même façon par ajout d'environ 2 à 10 mL d'eau PPI. Les entonnoirs ont été bouchés à leur extrémité inférieure afin que l'eau en surplus ne coule pas sur la paille. Tout comme les boîtes de Pétri, ils ont été laissés pendant deux jours. Au bout de deux jours, une aspiration sous vide a été réalisée afin de retirer le surplus d'eau dans la terre.

Figure 6 : Dispositifs de réhydratation des sols

A : Boîtes de Pétri inclinées

B : Entonnoirs bouchés avec filtres. Source personnelle



1.3- Réalisation des microcosmes de sol et inoculation des leptospires

1.3.1- Pesées et réalisation des microcosmes de sol

Dans un premier temps et avant de commencer les microcosmes de sols, les tubes et les bouchons ont été rincés une première fois avec de l'eau du robinet (un passage), puis avec de l'eau distillée (trois passages) afin de les nettoyer des impuretés. Puis, les tubes ont été mis à sécher à l'air libre toute la nuit, et ils ont ensuite été passés à l'autoclave pour les rendre stériles.

Les microcosmes ont ensuite été réalisés. Pour cela, 250 mg de sol réhydraté pendant deux jours ont été introduits dans un tube à microcosmes d'une contenance de 2 mL. Pour la première série de sols (J0 le 23/02/2021), les pesées ont été réalisées avec une précision de +/- 1 mg. Pour les autres sols, les pesées ont été réalisées avec une précision de +/- 5 mg.

Pour chaque point GPS prélevé, 14 tubes de microcosmes ont été préparés (figure 7) :

- 8 tubes avec ajout d'un inoculum de 5×10^6 *Leptospira interrogans* Manilae dans 10 μ L d'eau PPI, correspondant aux différents time points : J0, J4, J7, J14, J21, J28, J35 et J42. J0 correspond au jour de l'inoculation des microcosmes avec les leptospires.

- 4 tubes avec ajout de 10 μ L d'inoculum de leptospires « morts » après un passage de 10 minutes à 97°C : J0, J7, J14 et J21.

- 2 tubes sans ajout d'inoculum et contenant éventuellement des leptospires natifs, c'est-à-dire présents naturellement dans le sol : J0 et fin de cinétique.

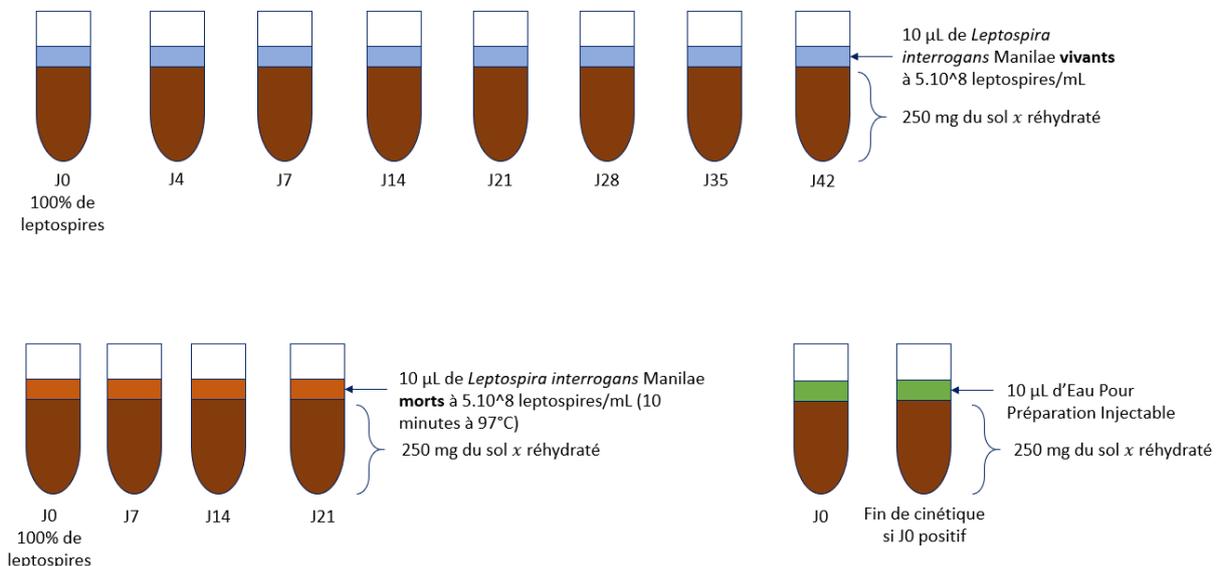
Figure 7 : Schéma récapitulatif des 14 tubes de microcosmes réalisés pour chaque point GPS

En bleu : suivi des microcosmes avec inoculation de leptospires vivants, 8 time points réalisés

En orange : suivi des microcosmes avec inoculation de leptospires morts, 4 time points réalisés

En vert : suivi des microcosmes natifs sans inoculation de leptospires, 2 time points réalisés

Figure personnelle



Pour chaque tube, trois pesées ont été réalisées à J0 : pesée du tube vide, pesée du tube avec les 250 mg de terre et pesée du tube après inoculation (10 µL d'inoculum) avec les leptospires.

La notation des tubes s'est faite de la manière suivante :

- « VLP numéro du sol J x » pour les tubes inoculés avec des leptospires vivants.
- « VLP numéro du sol mort J x » pour les tubes inoculés avec des leptospires morts.
- « VLP numéro du sol J x N » pour les tubes sans inoculation de leptospires, autrement appelés natifs.

Après les pesées, tous les tubes ont été centrifugés à 587 g pendant une minute afin de faire glisser au fond du tube la terre restée sur les parois lors de la pesée.

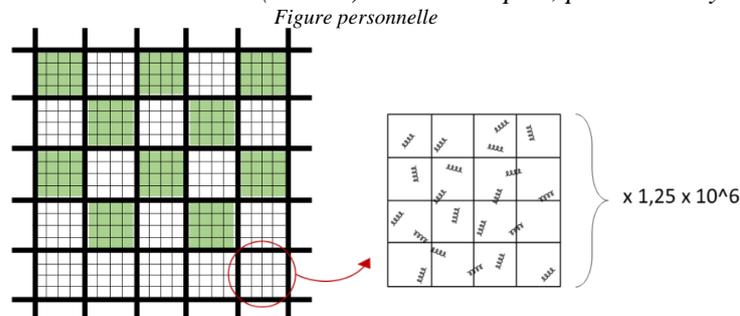
1.3.2- Inoculation des microcosmes avec les leptospires

Des cultures de leptospires en milieu EMJH ont été préalablement réalisées. Afin de préparer l'inoculum en concentration connue à ajouter aux tubes de microcosmes, 2 mL de leptospires en culture ont été prélevés et mis dans 4 tubes Eppendorf (4 x 2 mL en tout).

Puis les 4 tubes Eppendorf ont été centrifugés à 1150 g pendant 12 minutes. Le surnageant a ensuite été éliminé des 4 tubes, qui ont été poolés en 2 tubes de 2 mL, centrifugés à 1150 g pendant 12 minutes. Le surnageant a été éliminé et ces deux tubes ont été poolés en un seul, centrifugé à 1150 g pendant 12 minutes. Le surnageant a été éliminé et le culot a été re suspendu dans 350 µL d'EPPI.

Une dilution à 1/1000^{ème} a ensuite été réalisée afin d'obtenir une concentration permettant de pouvoir compter les leptospires au microscope. Le comptage a ensuite été réalisé sur cellule de Petroff-Hausser au microscope optique à fond noir (figure 8). Pour cela, les leptospires présents dans dix carreaux en en comptant un sur deux ont été comptés, et une moyenne a été faite.

*Figure 8 : Méthode de comptage des leptospires sur cellule de Petroff-Hausser
Les leptospires présents sur dix carreaux (en vert) ont été comptés, puis une moyenne a été réalisée*



La formule suivante permet de connaître la concentration initiale (C_i) en leptospires dans la suspension-mère :

$$C_i = x \text{ leptospires/carreau en moyenne} \times 1,25 \times 10^6 \times 1000 \text{ leptospires/mL}$$

Avec $1,25 \times 10^6$ la résolution de la cellule de Petroff-Hausser et 1000 le facteur de dilution appliqué.

On veut déterminer le volume V_i de suspension-mère à prélever afin d'avoir une concentration finale C_f de 5×10^6 leptospires/microcosmes, soit 5×10^8 leptospires/mL car on ajoute 10 µL d'inoculum par microcosme.

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Avec C_i la concentration initiale obtenue en comptant les leptospires (voir formule ci-dessus).

V_f se calcule en fonction du nombre de tubes de microcosmes grâce à la formule suivante :

$$V_f = 14 \times \text{nombre de séries de microcosmes} \times 0,01 \text{ mL}$$

Avec 14 le nombre de tube par série de microcosmes et 0,01 le volume ajouté à chaque tube en mL.

$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i} = \frac{5 \times 10^8 \times 14 \times \text{nombre de séries de microcosmes} \times 0,01}{\text{nombre moyen de leptospire par carreau} \times 1,25 \times 10^6}$$

Ce volume V_i est ensuite prélevé et ajouté dans V_f d'EPPI – V_i . Par exemple, pour la série de microcosmes du 2 mars, on trouvait $V_i = 18,46 \mu\text{L}$ à prélever et $V_f = 600 \mu\text{L}$. On a donc ajouté $18,46 \mu\text{L}$ de notre solution-mère à $600 - 18,46 = 581,54 \mu\text{L}$ d'EPPI afin d'avoir un volume final V_f de $600 \mu\text{L}$.

Une fois la suspension-fille préparée à la bonne concentration de 5×10^8 leptospores/mL, $10 \mu\text{L}$ de cette suspension ont été ajoutés dans les 8 tubes de microcosmes « vivants » pour chaque sol. Pour les leptospores morts, le volume nécessaire a été prélevé de la suspension-fille puis chauffé à 97°C pendant dix minutes afin de tuer les leptospores. Dix microlitres de cet inoculum « mort » ont été ajoutés dans les quatre tubes de microcosmes « morts » pour chaque sol. Enfin, pour les tubes de microcosmes natifs, $10 \mu\text{L}$ d'EPPI ont été ajoutés. Puis, tous les tubes ont été pesés, le bouchon a été vissé partiellement afin d'avoir des conditions aérobies nécessaires à la survie des leptospores, et les tubes ont été mis à incuber à 30°C dans l'étuve dans une enceinte humide et à l'obscurité.

Pour la deuxième série de sols, un test de réensemencement des leptospores morts a été réalisé afin de vérifier que les leptospores étaient bien morts. Pour cela, $10 \mu\text{L}$ de l'inoculum contenant les leptospores morts ont été ajoutés dans $500 \mu\text{L}$ de milieu EMJH. La culture a été incubée à l'étuve à 30°C pendant trois jours, puis observée au microscope optique à fond noir.

Après observation des premiers résultats et constat d'une très forte diminution de la concentration de leptospores dès les premiers jours, un test a été réalisé afin de savoir si la centrifugation et le lavage fragilisaient les leptospores et si cela contribuait à cette forte diminution. Le même protocole a été appliqué, mais les leptospores n'ont pas été centrifugés ni lavés. La comparaison s'est faite avec les résultats du même sol, pour lequel les leptospores avaient été lavés et centrifugés.

1.3.3- Suivi de l'évaporation

A chaque time point, tous les tubes ont été pesés afin de faire un suivi de l'évaporation d'eau. Par ailleurs, pour chaque sol et au moment de la préparation des tubes de microcosmes, environ $1,5 \text{ g}$ de terre (précision de $\pm 0,2 \text{ g}$) a été pesé et mis dans un tube Eppendorf prépesé. Ces tubes ont ensuite été chauffés pendant cinq jours à 110°C avec le bouchon ouvert afin que toute l'eau s'évapore. Ceci a permis de calculer le pourcentage total d'eau présent dans le sol.

1.4- Modification du design des microcosmes de sol après les premiers résultats

1.4.1- Modification du nombre de time points

Après avoir lancé les deux premières séries de microcosmes (neuf sols) et les avoir suivies pendant les 42 jours, les premiers résultats nous ont amené à modifier le design des microcosmes pour la suite des expériences. Pour chaque sol, 16 tubes de microcosmes ont été réalisés. Concernant le suivi des leptospores vivants, des répliqués de chaque time point ont été réalisés afin d'avoir davantage de précision. Le suivi ne s'est fait que jusqu'à 21 jours au lieu de 42 jours. Il n'y a pas eu de changement concernant le suivi des leptospores morts ni pour les microcosmes natifs sans inoculation. Il y a donc eu au total dix tubes pour les leptospores vivants (J0, J4, J7, J14 et J21 en répliqués), quatre tubes pour les leptospores morts (J0, J7, J14 et J21) et deux tubes pour les microcosmes natifs (J0 et J21).

1.4.2- Modification des conditions de réalisation de l'inoculum

A partir des cultures de leptospores préalablement réalisées, huit tubes Eppendorf contenant chacun 2 mL de culture de leptospores ont été réalisés. Ces tubes ont ensuite été centrifugés une seule fois à 94

g pendant 20 minutes, soit 1,7 fois plus longtemps mais avec une vitesse de centrifugation environ 12 fois plus faible. Le surnageant a été retiré dans chaque tube. Puis, 150 µL d'eau PPI ont été ajoutés dans le premier tube. Le culot a été remis en suspension, puis l'intégralité de la suspension a été transférée dans le deuxième tube, et ce jusqu'au dernier tube. La différence entre le volume final et le volume d'eau PPI ajoutée au début a permis de connaître la quantité de milieu EMJH encore présent et de calculer le pourcentage final d'EMJH que chaque tube microcosme recevra. Une dilution au 1/100^{ème} a ensuite été réalisée pour le comptage. Pour la suite, les manipulations et les calculs étaient les mêmes que pour le protocole de base. Il a été décidé de réaliser deux inoculums différents pour chaque réplicat.

1.5- Extraction de l'ADN de leptospires des microcosmes de sol

A chaque time point, l'ADN génomique des microcosmes a été extrait grâce au kit DNeasy PowerSoil Kit (voir Annexe III pour le protocole d'extraction). Pour cela, le contenu du tube PowerSoil DNA de Qiagen a été versé directement dans les microcosmes afin d'éviter les pertes. Les tubes ont ensuite été bien homogénéisés. Avec ce même kit, les échantillons de sols natifs prélevés directement sur le terrain pour chaque point GPS ont également été extraits. A la fin des extractions, tous les extraits d'ADN génomique ont été stockés au réfrigérateur à 4°C.

Pour chaque extraction, un contrôle interne plasmidique a été ajouté afin de valider l'extraction. Pour cela, 10 µL du plasmide synthétique zIAC inséré dans la bactérie *E. coli* dilué au 1/1000^{ème} ont été ajoutés en début d'extraction dans chaque tube.

Pour chaque série de microcosmes, 10 µL d'ADN génomique de l'inoculum de leptospires morts et d'inoculum de leptospires vivants a également été extrait grâce au kit QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen (voir Annexe IV pour le protocole d'extraction).

1.6- Quantification de la quantité d'ADN par qPCR

1.6.1- qPCR LipL32 sur les microcosmes de sols inoculés

Afin de déterminer la quantité d'ADN de leptospire présent dans les tubes, des qPCR ont été réalisées. La technique TaqMan a été utilisée et ciblait le gène *lipL32*, présent uniquement sur les leptospires pathogènes et pathogènes faiblement virulentes (Stoddard et al. 2009) (voir Annexe V pour un rappel de la technique de qPCR TaqMan). En parallèle, un contrôle interne plasmidique avec une qPCR ciblant le plasmide synthétique zIAC a été réalisé. Le kit Perfecta Toughmix, adapté à l'amplification d'ADN contenant des inhibiteurs, a été systématiquement utilisé.

Pour chaque série, un plan de plaque pouvant contenir 96 échantillons a été réalisé. Chaque échantillon a été déposé dans deux puits pour davantage de précision. Chaque puits de réaction contenait 10 µL de réactifs :

- 2 µL d'eau distillée
- 5 µL de Perfecta Toughmix 2X (contenant les nucléotides, les enzymes...)
- 0,4 µL de l'amorce LipL32-F à une concentration de 10 µM
- 0,4 µL de l'amorce LipL32-R à une concentration de 10 µM
- 0,2 µL de la sonde LipL32-P à une concentration de 6,5 µM
- 2 µL d'ADN à quantifier

Huit microlitres de *Mix* ont été ajoutés dans chaque puits de réaction. Puis, 2 µL d'ADN ont été ajoutés individuellement dans chaque puits. Un témoin positif (« TAP ») contenant de l'ADN de *Leptospira interrogans* Verdun ainsi qu'un témoin négatif (« TNA ») contenant du *Mix* ont également été ajoutés. Une fois la plaque remplie, cette dernière a été introduite dans le LightCycler 480 (Roche Applied Science). Le programme de qPCR « Taqman LipL32 CDC 55 cycles » a ensuite été lancé. Ce dernier était constitué d'une première étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10 minutes, puis

de 55 cycles de dénaturation pendant 5 secondes à 95°C et d'hybridation/élongation pendant 15 secondes à 58°C en alternance.

Les qPCR ont été lancées après chaque extraction des différents time points. Lorsque tous les time points d'un sol ont été extraits (à J42 pour les neuf premiers sols), une qPCR « complète » a été lancée avec tous les échantillons de la série. Pour chaque sol, le J0 « vivant » correspondait au standard, dont la concentration était de 5×10^6 leptospires/tube de microcosme. Ainsi, les concentrations en leptospires dans les tubes suivants ont pu être calculées.

Les sols VLP 35, 36 et 37 ne présentent pas de time point à J21 car le suivi était en cours au moment de rendre le rapport. Néanmoins, les time points J0, J4, J7 et J14 ont pu y être représentés.

Après obtention des premiers résultats, des concentrations de leptospires anormalement basses dans les sols VLP 90 et 91 nous ont amené à suspecter la présence d'inhibiteurs dans ces sols. L'ADN de ces deux sols a donc été dilué au $1/10^{\text{ème}}$ dans de l'eau PPI, puis tous les échantillons de chaque time point ont été repassés en qPCR *LipL32* et *zIAC* afin de valider ou non cette hypothèse. Les concentrations ont ensuite été multipliées par dix afin de les normaliser.

1.6.2 - qPCR *LipL32* sur les sols natifs

La quantité de leptospires présents naturellement dans les sols a été mesurée par qPCR de la même manière, dans deux séries de tubes différents :

- Dans les prélèvements réalisés directement sur le terrain, sur un seul des cinq points de prélèvement (deux prélèvements par sol).
- Dans les tubes de microcosmes « natifs », dans lesquels de l'eau PPI a été ajoutée.

1.6.3- qPCR *lfb1* sur les échantillons douteux

Après observation des résultats de qPCR *lipL32*, le sol VLP 56 a montré des aberrations. Une qPCR SYBR Green I (voir Annexe VI) ciblant le gène *lfb1* détectable uniquement chez les espèces de leptospires pathogènes virulentes a été réalisée sur les huit échantillons « vivants », les quatre échantillons « morts » ainsi que sur l'échantillon natif à J42.

Chaque capillaire contenait 20 μL de réactifs (18 μL de *Mix* et 2 μL d'ADN) :

- 10,8 μL d'eau distillée.
- 2 μL de *Mix* Reaction mix SYBR 10X.
- 1 μL d'amorce *lfb1-F* à 10 μM .
- 1 μL d'amorce *lfb1-R* à 10 μM .
- 3,2 μL de MgCl_2 .
- 2 μL d'ADN à quantifier.

Les 18 μL du *Mix* ont été déposés dans chaque tube micro-capillaire. Les 2 μL d'ADN à quantifier ont été ajoutés dans les tubes. Puis, les tubes micro-capillaires ont été rebouchés et centrifugés pendant 15 secondes à 587 g. Ils ont ensuite été déposés dans la machine LC2 2.0, et le programme de qPCR SYBR Green *Lfb1* a été lancé.

1.7- Analyse de la composition des sols

1.7.1- Mesures du pH des sols

Des mesures du pH des sols ont été réalisées à l'IRD. Pour chaque sol, 6 g de terre tamisée à 2 mm ont été introduits dans un Falcon Tube de 50 mL. Un ratio de 1/5 étant nécessaire pour la mesure de pH, 30 mL d'eau Milli Q ont été ajoutés. Les tubes ont ensuite été laissés sous agitation pendant 1h. Un

cinquième des échantillons ont été réalisés en réplicats (trois réplicats à chaque fois). Les mesures de pH ont ensuite été réalisées à l'aide du pH-mètre, avec une précision au centième.

1.7.2- Mesures de la conductivité des sols

Des mesures de conductivité des sols ont également été mesurées à partir des mêmes préparations que pour les mesures de pH. Les mesures ont été réalisées à l'aide du conductimètre, avec une précision au dixième.

1.7.3- Mesure de fraction biodisponible et mobile des éléments du sol : extractions chimiques des métaux

1.7.3.1- Réaction au CaCl₂ : extraction de la fraction mobile

L'extraction des éléments au CaCl₂ permet d'obtenir la fraction mobile (aussi appelée échangeable) des sols. Cela correspond à la fraction susceptible d'être présente en solution lorsque le sol est saturé en eau. Des solutions de sols ont été préparées. Pour cela, 4 g de terre tamisée à 2 mm ont été introduits dans un Falcon Tube de 50 mL, et 40 g de solution CaCl₂ ont été ajoutés afin d'avoir un ratio terre/solution de 1/10. La solution de CaCl₂ a été préparée à partir de poudre anhydre : 1,11 g de poudre ont été dilués dans un litre d'eau Milli Q. La solution finale avait une concentration de 0,1 mol/L de CaCl₂. Un tiers des échantillons ont été réalisés en réplicats (trois réplicats à chaque fois).

Une fois la solution préparée, les 40 g ont été ajoutés dans chaque tube, puis ces derniers ont été mis sous agitation pendant 24h. Le lendemain, les tubes ont été centrifugés pendant 20 minutes à 2500 rpm. Environ 30 mL du surnageant ont été filtrés à travers un filtre de 0,2 µm. Ces solutions de sol ont ensuite été envoyées au LAMA (Laboratoire des Moyens Analytiques) pour l'analyse. Les résultats obtenus ont été exprimés en mg/L, puis convertis en ppm (partie par million, soit mg/kg).

1.7.3.2- Réaction à l'EDTA : extraction de la fraction biodisponible

L'extraction des éléments à l'EDTA permet d'obtenir la fraction biodisponible, c'est-à-dire susceptible d'être absorbée et utilisée par les organismes vivants du sol. De la même façon que pour l'extraction au CaCl₂, des solutions de sols ont été préparées afin d'extraire la fraction biodisponible des métaux. Le même protocole que pour l'extraction au CaCl₂ a été appliqué. Quatre grammes de sol ont été mélangés à 40 g de solution EDTA. La solution a été préparée à partir de poudre anhydre : 18,6 g de poudre ont été dilués dans un litre d'eau Milli Q. La solution finale avait une concentration de 0,05 mol/L d'EDTA. Un tiers des échantillons ont été réalisés en réplicats.

Les tubes ont été mis sous agitation pendant 24h, puis centrifugés pendant 20 minutes à 2500 rpm. Environ 30 mL du surnageant ont été filtrés à travers un filtre de 0,2 µm, puis les solutions ont été envoyées au LAMA pour l'analyse. Les résultats obtenus ont été exprimés en mg/L, puis convertis en ppm (partie par million, soit mg/kg).

1.7.4- Mesures de la granulométrie des sols

Des mesures de granulométrie des sols ont été réalisés à l'UNC (Université de Nouvelle-Calédonie) à l'aide d'un granulomètre laser, ainsi que du logiciel Mastersizer 2000. Pour cela, environ 1 g de sol tamisé à 2 mm a été introduit dans un tube, puis de l'eau a été ajoutée afin de recouvrir la terre et le tube a été vortexé pendant 30 secondes. Avant d'introduire les échantillons dans la machine, ces derniers ont été soumis à des ultrasons pendant 15 minutes afin de casser les agrégats. Enfin, une goutte du mélange a été introduite dans la machine. Pour chaque échantillon, cinq mesures de granulométrie ont été faites. Toutes ces mesures ont ensuite permis de réaliser un triangle des textures (voir Annexe IX) à partir des pourcentages de sables, limons et argiles dans les sols.

1.7.5- Quantification des concentrations totales en éléments traces métalliques

Une analyse semi-quantitative à l'aide de la spectrométrie de fluorescence X a été réalisée. Cette analyse renvoie la concentration totale des éléments chimiques présents dans le sol. Pour cela, tous les sols tamisés à 2 mm ont été broyés mécaniquement pendant 20 minutes à 250 tours/minute avec un broyeur planétaire à billes de type ZM 200 (Retsch). Puis, les mesures de fluorescence X ont été faites à l'aide de l'appareil portable de type X-MET7500 SERIES (Oxford Instruments) mis à disposition par le Service Géologique de la Nouvelle-Calédonie (SGNC). Pour chaque échantillon, la durée d'analyse était de 60 secondes. Les données brutes ont ensuite été corrigées par la méthode « Soil_fp ». Les résultats obtenus ont été exprimés en ppm.

1.8- Analyses statistiques

Les analyses de corrélation entre la survie et les paramètres physico-chimiques des sols ont été réalisées avec le logiciel R version 3.6.3. Une Analyse Factorielle Multiple (AFM) et plus précisément une Analyse en Composantes Principales (ACP) ainsi que des matrices de corrélations réalisées avec le coefficient de corrélation de Pearson ont été effectuées. Deux matrices ont été faites pour chacune des deux séries de microcosmes. En effet, ces séries n'ayant pas été réalisées avec les mêmes protocoles, il n'était pas exact de les analyser ensemble.

Un test de significativité des résultats de corrélation renvoyant la liste des p-values pour un intervalle de confiance de 95% a également été réalisé. L'Annexe X regroupe les différents scripts utilisés sur le logiciel R et l'Annexe XI présente les figures des ACP.

De plus, des statistiques descriptives à l'aide de boîtes à moustaches ont été faite sur tous les paramètres physico-chimiques des sols : pH, conductivité, granulométrie, humidité, concentrations totales en éléments traces métalliques et mesures de la fraction biodisponible et mobile des éléments du sol. Deux groupes de sols ont été comparés : ceux présentant une « mauvaise survie », dont le nombre de jours pour atteindre 3% de la concentration initiale est inférieur à 7, et ceux présentant une « bonne survie », dont le nombre de jours pour atteindre 3% de la concentration initiale est supérieur à 7. Les résultats sont présentés en Annexe XII. Des statistiques descriptives (moyenne, quartiles et médiane) ont également été utilisées pour les calculs de pesées des microcosmes et d'évaporation d'eau.

2- Résultats

2.1- Pesées des tubes et évaporation

A chaque time point, tous les tubes ont été pesés afin de vérifier que l'évaporation n'était pas trop importante et que la quantité d'eau ajoutée était homogène tout au long du suivi. Les pesées et calculs ont montré qu'il y avait entre -2,810 et 5,536 % d'évaporation, avec une moyenne de 0,037 % et seulement 0,020% des valeurs en dehors de l'intervalle [-1 % ; 1 %]. Les valeurs négatives étaient probablement dues à une condensation d'eau sur les tubes, qui les rendait légèrement plus lourds. Le tableau 1 contient quelques statistiques descriptives des valeurs.

Tableau 1 : Statistiques descriptives de la série de valeurs des pourcentages d'évaporation d'eau
Figure personnelle

Moyenne	1er Quartile	Médiane	3ème Quartile
0,0374	0,0000	0,0522	0,1132

Ces résultats ont montré que la perte d'eau par évaporation, en moyenne très inférieure à 1%, était négligeable et que l'on pouvait donc considérer que la quantité d'eau dans les tubes restait homogène durant tout le suivi.

Le tableau 2 présente le pourcentage d'eau présent dans chaque sol au moment de l'inoculation et durant tout le suivi (eau présente naturellement + eau ajoutée au moment de la réhydratation).

Tableau 2 : Pourcentage d'eau contenue dans chaque sol

Figure personnelle

Nom du sol	VLP 03	VLP 14	VLP 15	VLP 35	VLP 36	VLP 37	VLP 39_1	VLP 39_2	VLP 41	VLP 49
Eau (%)	39,62	35,23	37,45	17,52	21,40	29,54	32,72	32,08	34,12	26,76
Nom du sol	VLP 52_1	VLP 52_2	VLP 55	VLP 56	VLP 76	VLP 90	VLP 91	VLP 92	SPI 102	SPI 103
Eau (%)	32,91	15,77	25,47	18,83	22,47	22,37	14,39	18,65	15,91	7,68

La variabilité de ces teneurs en eau peut s'expliquer par la composition différente des sols. Les teneurs les plus élevées (autour de 40%) se retrouvent dans les sols les plus argileux comme le VLP 03, tandis que les teneurs les plus basses (autour de 10%) se retrouvent dans les sols davantage sableux comme les SPI 102 et 103.

2.2- Détection de leptospires dans les sols natifs

Les quantifications par qPCR des leptospires présents naturellement dans les sols ont montré que :

- Dans les tubes prélevés directement sur le terrain, 15% présentaient des leptospires détectables par qPCR, soit 3 sols sur 20.
- Dans les tubes de microcosmes « natifs » dans lesquels de l'eau PPI a été ajoutée, 40% présentaient des leptospires détectables par qPCR à J0 (8 sols sur 20) et 30% en fin de cinétique (6 sols sur 20).

La plus grande proportion de leptospires détectés dans les tubes de microcosmes natifs s'explique par le fait que le sol à l'intérieur est issu du mélange des cinq prélèvements (probabilité plus importante de détecter des leptospires), alors que le tube prélevé directement sur le terrain contient le sol d'un unique prélèvement.

2.3- Suivi de la survie des leptospires dans les microcosmes de sol par qPCR

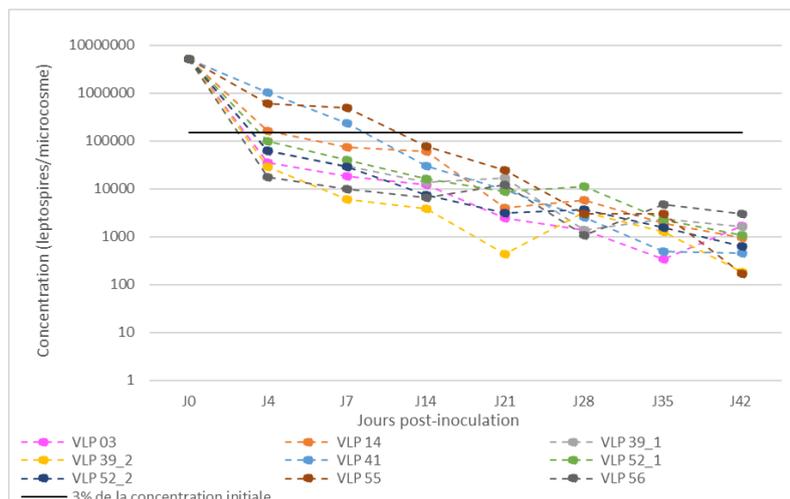
2.3.1- Première série de microcosmes

2.3.1.1- Suivi des leptospires vivants

La figure 9 représente le suivi de la concentration en leptospires aux différents time points (J0, J4, J7, J14, J21, J28, J35, J42) pour la première série de microcosmes qui contenait neuf sols (VLP 03, 14, 39_1, 39_2, 41, 52_1, 52_2, 55 et 56). A J0, le jour de l'inoculation, chaque tube contenait 5×10^6 leptospires. Le choix d'une échelle logarithmique se justifie par la très forte diminution de la concentration dans les premiers jours.

Figure 9 : Evolution de la concentration en leptospires vivants/microcosme dans les sols en fonction du temps pour la première série

Les courbes en pointillés colorées représentent les différents sols et la courbe noire représente le seuil de 3% de la concentration initiale, soit 150 000 leptospires/microcosme. *Figure personnelle*



Les résultats montrent une décroissance très rapide dans les premiers jours de la concentration en leptospires. En effet, quatre jours après inoculation, six sols sur les neuf présentent déjà une concentration en-dessous du seuil de 3% de la concentration initiale, soit 150 000 leptospires/microcosme. Ce seuil de 3% a été déterminé en observant nos courbes de décroissance et semble être le plus discriminant afin d'interpréter nos résultats. Après J4, la décroissance se fait ensuite plus progressivement.

Une tendance semble se dégager en début de cinétique jusqu'à J14, avec les sols VLP 14, 41 et 55 qui semblent permettre une meilleure survie. Le sol 39_2 semble permettre une moins bonne survie. A partir de J14, on ne distingue plus ces tendances et les courbes s'entrecroisent.

Par ailleurs, les résultats de la qPCR du contrôle plasmidique interne zIAC ont montré que tous les échantillons étaient ressortis positifs, signifiant que l'extraction d'ADN a bien fonctionné. Il y a cependant eu quelques écarts entre les différentes valeurs pour une série d'extractions, allant jusqu'à un facteur dix de différence dans les concentrations du plasmide zIAC. Ces différences de concentrations se retrouvent aléatoirement sur les échantillons, et peuvent être dues à une variabilité sur l'extraction d'ADN ou au rendement de la qPCR (données non représentées).

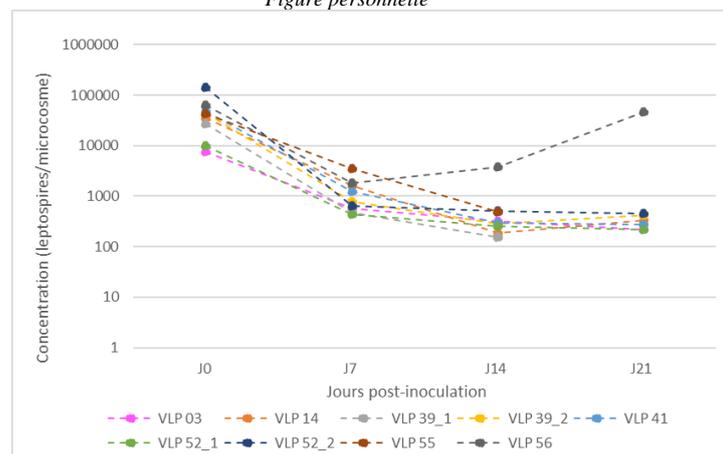
Concernant les tests de centrifugation, les résultats ont montré que le fait de centrifuger et laver les leptospires semble les fragiliser, contribuant probablement à la très forte décroissance observée dans les premiers jours. Il a donc été choisi pour le deuxième protocole de centrifuger à une vitesse beaucoup moins forte.

2.3.1.2- Suivi des leptospires morts

La figure 10 montre le suivi de la concentration des leptospires morts aux différents time points (J0, J7, J14, J21) pour cette même première série de sols. A J0, le jour de l'inoculation, tous les tubes contenaient 5×10^6 leptospires, de la même manière que pour les tubes contenant les leptospires vivants.

Figure 10 : Evolution de la concentration en leptospires morts/microcosme dans les sols en fonction du temps pour la première série

Figure personnelle



Les résultats montrent une décroissance beaucoup plus importante des leptospires morts par rapport aux leptospires vivants, même à J0. En effet, à J0, on peut observer des concentrations en leptospires morts de 34 jusqu'à 660 fois plus basses que les concentrations en leptospires vivants. On peut donc supposer que la présence de micro-organismes dans les sols dégrade très rapidement l'ADN. Cette décroissance se poursuit au cours du temps, avec parfois une quantité qui n'est plus détectable comme pour le sol VLP 39_1 par exemple (gris clair).

Le sol VLP 56 (gris foncé) présente ici des aberrations à J14 et J21. En effet, la concentration en leptospires morts croît pour ces deux time points. L'hypothèse de la présence d'une autre espèce de leptospire a été émise. Pour confirmer ou infirmer cela, une qPCR SYBR Green ciblant le gène *lfb1*, détecté uniquement chez les espèces pathogènes et virulentes, a été réalisée. Les résultats ont montré qu'à J0 et J7, la qPCR était positive et le pic de température de fusion était compatible avec la souche inoculée *L. interrogans* Manilae. Cependant, à J14 et J21, la qPCR était négative, alors qu'elle était fortement positive pour le gène *lipL32*. Ces résultats montrent que le leptospire présent n'est pas *L. interrogans* Manilae, mais probablement une autre espèce de leptospires pathogènes peu virulente, qui est détectée avec la qPCR ciblant le gène *lipL32* mais qui n'est pas détectée avec la qPCR ciblant le gène *lfb1*.

2.3.2- Deuxième série de microcosmes

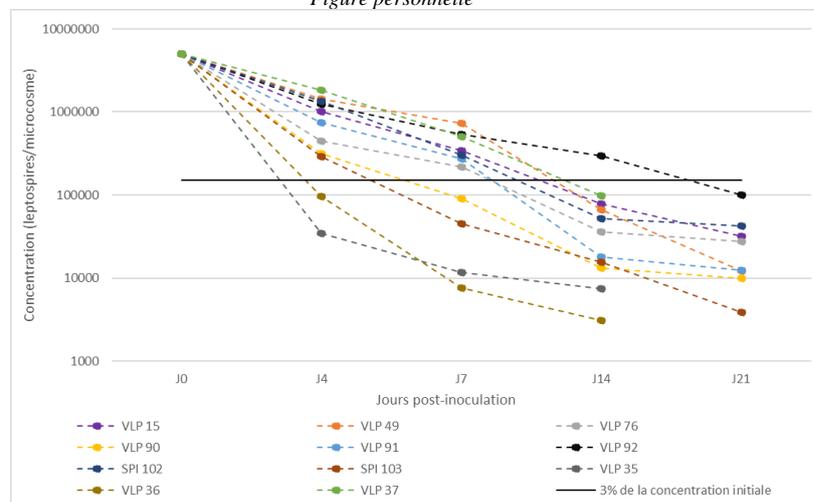
2.3.2.1- Suivi des leptospires vivants

La figure 11 représente le suivi de la concentration en leptospires aux différents time points (J0, J4, J7, J14, J21) pour la deuxième série de microcosmes qui contenait onze sols (VLP 15, 35, 36, 37, 49, 76, 90, 91, 92 et SPI 102 et 103). A J0, le jour de l'inoculation, chaque tube contenait 5×10^6 leptospires, tout comme pour la première série. Le choix d'une échelle logarithmique se justifie également par la très forte diminution de la concentration dans les premiers jours. Les deux séries de microcosmes n'ont volontairement pas été reportées sur le même graphique. En effet, le suivi ne s'est fait que sur 21 jours au lieu de 42 et avec des réplicats pour la deuxième série, et les conditions de préparation de l'inoculum n'étaient pas les mêmes entre les deux séries.

Figure 11 : Evolution de la concentration en leptospires vivants/microcosme dans les sols en fonction du temps pour la deuxième série

Les courbes en pointillés colorées représentent les différents sols et la courbe noire représente le seuil de 3% de la concentration initiale, soit 150 000 leptospires/microcosme.

Figure personnelle



Tout comme pour la première série de microcosmes, les résultats montrent une décroissance rapide de la concentration en leptospires dans les premiers jours (entre J0 et J4), mais cette décroissance semble moins importante. On peut donc supposer que le fait de centrifuger les leptospires une seule fois, plus longtemps mais moins fort au moment de la préparation de l'inoculum les abime moins. De la même façon, la décroissance se poursuit progressivement. Des tendances semblent plus facilement ressortir, avec par exemple le sol VLP 92 (noir) qui semble permettre une meilleure survie et les sols VLP 35, 36 et SPI 103 (respectivement en gris foncé, marron clair et marron foncé) qui semblent permettre une moins bonne survie.

Concernant les sols VLP 90 et 91 (respectivement jaune et bleu clair), les premiers résultats avaient montré des concentrations anormalement basses à chaque time point, y compris J0. Par ailleurs, les qPCR réalisées sur le contrôle interne plasmidique zIAC ont également montré des concentrations anormalement basses. L'hypothèse de la présence d'inhibiteurs de PCR dans ces deux sols a donc été émise. Après dilution à $1/10^{\text{ème}}$ de l'ADN (permettant de réduire l'inhibition en diluant les inhibiteurs) puis multiplication des concentrations obtenues par dix, les valeurs de qPCR sont revenues dans les normes (valeurs représentées sur le graphique). L'hypothèse de la présence d'inhibiteurs dans ces deux sols a donc été fortement suspectée.

Les calculs de la quantité d'EMJH ajoutée dans chaque tube à cause de la plus faible centrifugation et donc d'un culot moins marqué, ont montré qu'il y avait entre 0,03 et 0,23 % d'EMJH/tube de microcosme. Cette quantité a été jugée négligeable par rapport au volume de terre dans le tube et donc sans impact sur la survie des leptospires.

2.3.2.2- Suivi des leptospires morts

Les résultats du suivi des leptospires morts ont montré une diminution de survie très semblable aux données observées pour la première série de microcosmes. A J0, on constate une très forte diminution de concentration des leptospires morts. Puis, la diminution de concentration s'est faite progressivement mais sans se négativer pour tous les sols à J21. A nouveau, ces résultats montrent qu'on ne peut pas conclure sur le fait de ne détecter que des leptospires vivants lors des qPCR sur les séries de leptospires vivants.

2.4- Comparaison des résultats de survie des leptospires avec la composition des sols

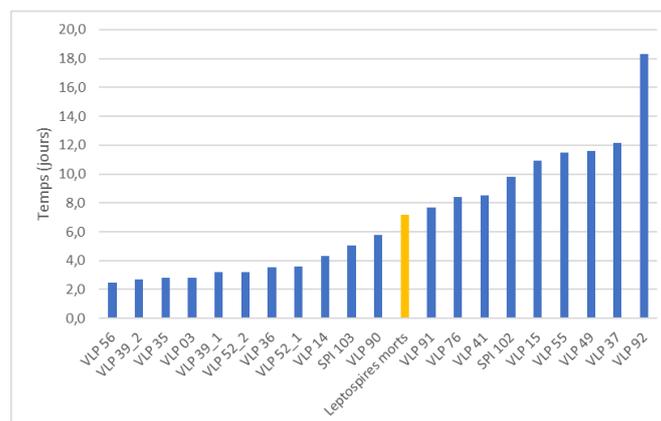
2.4.1- Calcul d'une variable de survie des leptospires

Afin d'estimer la survie des leptospires dans les différents sols, il a été décidé de calculer le temps nécessaire pour atteindre 3% de la concentration initiale dans les microcosmes. Cette valeur a été choisie après observation des courbes et semble être correcte afin de discriminer les différents sols. Pour cela, les pourcentages de diminution des quantités de leptospires ont été calculés à chaque time point, puis les équations des portions des droites logarithmiques contenant la valeur de 3% ont été déterminées afin de calculer le nombre de jours. Le choix de calculer l'équation de la droite logarithmique et non pas celle de la droite linéaire se justifie de par la cinétique de décroissance de la concentration en leptospires, qui suit davantage une fonction logarithmique qu'une fonction linéaire.

La figure 12 représente, par ordre croissant, le temps (en jours) nécessaire pour atteindre 3% de la concentration initiale (5×10^6 leptospires/microcosme) pour chaque sol. Une moyenne des concentrations des leptospires morts a été faite et ce même temps a été calculé et introduit dans le graphique.

Figure 12 : Temps (en jours) nécessaire pour atteindre 3% de la concentration initiale en leptospires à J0 pour chaque sol (barres bleues) et pour les leptospires morts (barre jaune)

Figure personnelle



En moyenne, les leptospires morts mettent 7,2 jours pour atteindre 3% de leur concentration initiale. Onze sols mettent moins de temps pour atteindre ce seuil, entre 2,8 et 5,8 jours. Neuf sols mettent davantage de temps pour atteindre ce seuil, entre 7,6 et 18,3 jours. Les résultats concernant les leptospires morts ont montré que l'ADN peut encore être détecté jusqu'à 21 jours, mais de manière relativement homogène dans tous les sols. Par conséquent, les sols dont le temps pour atteindre le seuil de 3% se situe au-delà de 7,3 jours contiennent, de manière relative, davantage d'ADN de leptospires vivants que ceux situés en-dessous du seuil. Ces sols permettraient donc une meilleure survie des leptospires. Il n'est cependant pas possible de comparer les deux séries de microcosmes étant donné que le protocole de préparation de l'inoculum n'est pas le même.

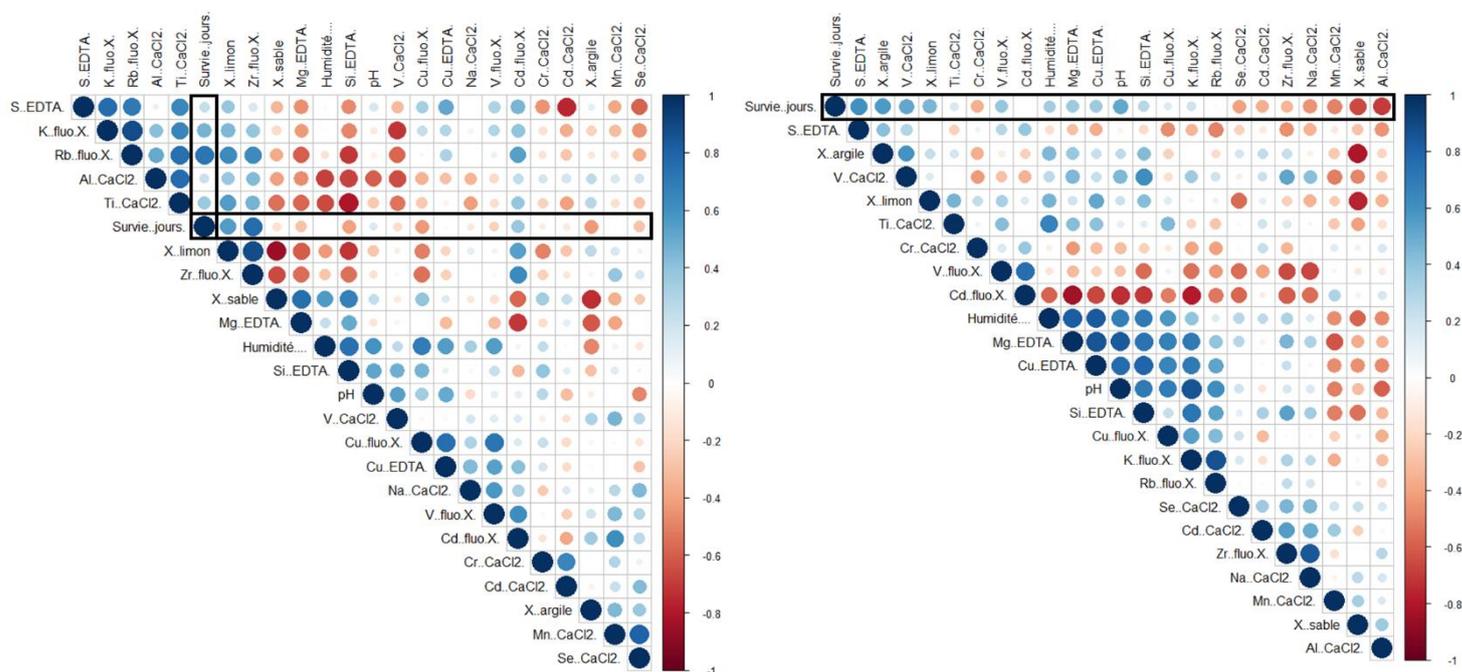
2.4.2- Corrélation entre la survie et les paramètres physico-chimiques des sols

Différents paramètres physico-chimiques des sols ont été mesurés : le pH et la conductivité, l'humidité, la granulométrie, la concentration totale en éléments traces métalliques et la fraction biodisponible et mobile des éléments du sol (voir Annexes VII et VIII). L'analyse granulométrique des sols a permis de réaliser un diagramme des textures (voir Annexe IX) et d'obtenir les pourcentages relatifs en sables, argiles et limons. Grâce à des matrices de corrélations (Figure 13) ainsi qu'une Analyse Factorielle Multiple (AFM), et plus précisément une ACP (Analyse en Composantes Principales, Figure 14), des relations entre ces paramètres et la survie des leptospires ont été cherchées.

Les matrices de corrélations (Figure 13), calculées avec le coefficient de corrélation de Pearson, permettent de se rendre compte des relations entre les variables. Il a été décidé de séparer les deux séries de microcosmes pour construire les matrices de corrélation. En effet, les deux séries n'ayant pas été réalisées avec le même protocole, il n'est pas possible de les comparer. Par ailleurs, au vu de la quantité importante de variables explicatives, il a été décidé de ne présenter dans la figure présentant cette matrice que les variables dont la corrélation avec la survie était supérieure à 0,35 ou inférieure à -0,35. Les matrices de corrélation complètes avec tous les paramètres sont présentées en Annexe XIII.

Figure 13 : Matrices de corrélations comparant la survie des leptospires et les différents paramètres physico-chimiques des sols

*A gauche : première série de microcosmes et à droite : deuxième série de microcosmes
Les ronds bleus représentent les corrélations positives et les ronds rouges les corrélations négatives.
Plus l'intensité de la couleur est forte, plus la corrélation l'est. Les encadrés noirs correspondent aux corrélations du paramètre « Survie » que l'on souhaite expliquer.*



Les matrices de corrélations montrent quelques résultats significatifs. Dans la première série de microcosmes, la survie semble corrélée avec des concentrations totales en rubidium (Rb) et zirconium (Zr) plus élevées (p-values pour un intervalle de confiance à 95% de 0,026 et 0,016 respectivement). Dans la deuxième série de microcosmes, la survie semble corrélée avec des concentrations en soufre (S) biodisponible et en aluminium (Al) mobile plus élevées, et un pourcentage de sable plus faible (p-values de 0,047 ; 0,018 et 0,030 respectivement). Le tableau 3 renvoie les p-values significatives des corrélations.

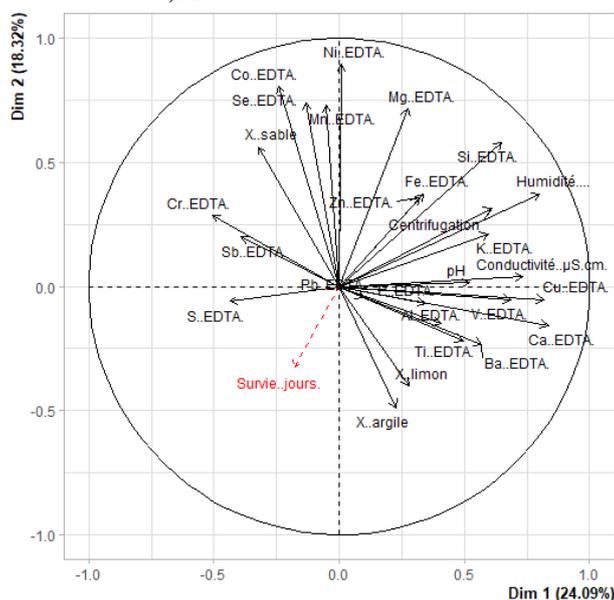
Tableau 3 : P-values significatives des corrélations entre la survie et les paramètres physico-chimiques des sols pour un intervalle de confiance à 95%

Figure personnelle réalisée d'après le logiciel R et la fonction cor.mtest

	Première série de microcosmes		Deuxième série de microcosmes		
	Rb (fluo X)	Zr (fluo X)	% sable	S (EDTA)	Al (CaCl2)
Survie	0,026	0,016	0,030	0,047	0,018

La figure 14 représente les résultats de l'Analyse en Composantes Principales. Les deux séries de sol ont été regroupées.

Figure 14 : Résultats de l'ACP avec les variables pH, conductivité, humidité, granulométrie, centrifugation ainsi que la fraction biodisponible des éléments du sol obtenue par extraction à l'EDTA
 Les flèches noires représentent les variables explicatives. Plus elles sont longues, plus elles expliquent la variabilité. La flèche rouge en pointillés représente le paramètre à expliquer « Survie », qui correspond au nombre de jour pour atteindre 3% de la concentration à J0. Plus les flèches pointent dans la même direction, plus les paramètres qu'elles représentent sont corrélés. A l'inverse, des flèches pointant dans des directions opposées indiquent que les paramètres sont anti-corrélés. L'axe des abscisses « Dim 1 » explique 24,09 % de la variabilité et l'axe des ordonnées « Dim 2 » explique 18,32 % de la variabilité.



Le vecteur « Survie », que l'on cherche à expliquer, est de petite taille et traduit un manque de puissance statistique probablement à cause du faible nombre de sols. Par conséquent, il est difficile d'interpréter les résultats. Le paramètre « Survie » ne semble, à première vue, pas très bien expliqué par les autres paramètres. Il semble cependant anti-corrélé avec plusieurs paramètres comme la centrifugation des leptospires inoculés (ce qui avait déjà été remarqué) ou encore la quantité de magnésium (Mg), de fer (Fe) et de silice (Si) libérés par une incubation en présence d'EDTA.

3- Discussion

Dans un premier temps, il a été mis en évidence qu'au cours du temps, la concentration en leptospires pathogènes au sein des sols diminue, de manière exponentielle en début de cinétique puis de manière plus progressive. Ces observations montrent que les sols étudiés permettraient aux leptospires pathogènes de survivre mais ne leur permettrait pas ou peu de se multiplier. Ceci avait déjà été mis en évidence dans des travaux précédents (Bierque 2020).

Des différences de survie entre les sols ont également été montrées, avec des temps pour atteindre 3% de la concentration initiale variant de 2,8 à 18,3 jours. Cependant, ces temps de survie sont à interpréter avec beaucoup de précautions. En effet, les deux séries de microcosmes ont été réalisées avec des protocoles différents, en particulier des temps et une vitesse de centrifugation différents pour le lavage des leptospires inoculés. On ne peut donc pas comparer ces deux séries en termes de survie. Or, les sols de la première série, qui ont été centrifugés plus fort, se retrouvent presque tous en-dessous du seuil de 3% de la concentration initiale en moins d'une semaine, à l'exception de deux sols. De même, les sols de la deuxième série, qui ont été centrifugés moins fort et plus longtemps, sont presque tous en-dessous du seuil de 3% de la concentration initiale à partir d'une semaine, à l'exception de quatre sols.

Ces observations ne permettent donc pas d'affirmer que ces différences de survie sont dues uniquement à la composition des sols. Par ailleurs, les tests effectués sur la centrifugation avaient montré que celle-ci fragilisait les leptospires et permettait donc une moins bonne survie. Il est donc probable que la meilleure survie observée sur la deuxième série de microcosmes soit due à la centrifugation moins forte.

Il est toutefois possible d'affirmer que dans la première série de microcosmes, deux sols semblent permettre une meilleure survie : VLP 41 et VLP 55. De même, dans la deuxième série de microcosmes, un sol semble se détacher du lot et permettre une meilleure survie, le VLP 92, tandis que les sols VLP 35, 36, 90 et SPI 103 ne semblent pas permettre une bonne survie en comparaison avec les autres sols.

Le seuil de 3% de la concentration initiale a été choisi par observations de nos courbes et après calculs, mais également car la concentration en leptospires que cela représente peut encore être contaminante pour l'Homme. En effet, le seuil de 3% de la concentration initiale correspond à 150 000 leptospires par microcosmes, soit 6×10^8 leptospires/kg de sol. A titre comparatif, la DL_{100} chez le hamster en laboratoire (Dose Létale pour tuer 100% des hamsters) est de 10^5 leptospires injectés en intra-péritonéal. La dose infectante chez l'Homme n'est pas connue, mais on peut supposer qu'une dose de 6×10^8 leptospires/kg de sol soit encore infectante.

Le choix de réaliser les microcosmes dans des tubes individuels correspondant à chaque time point découle des manipulations réalisées précédemment au cours de thèses et stages. En effet, les premiers essais de microcosmes ont été réalisés dans des pots à coproculture contenant 10 g de sol. Il s'est avéré que cette méthode n'était pas optimale car ne garantissait pas l'homogénéité de l'inoculum contenant les leptospires. Le choix du contenant s'est alors porté sur des tubes individuels. Par ailleurs, différentes conditions avaient été testées pour fermer les tubes : coton, film transparent ou bouchon fermé partiellement. C'est finalement le bouchon qui a été retenu, car c'est celui qui limitait le plus la perte d'eau.

La modification du protocole de réalisation des microcosmes au cours du stage nous a permis de plutôt privilégier la deuxième méthode. En effet, le fait de réaliser des répliquats limite les erreurs et permet une meilleure représentativité. De plus, il a été montré qu'une centrifugation trop forte fragilise les leptospires et diminue leur capacité de survie. Il est donc judicieux de privilégier une centrifugation plus faible pendant un temps plus long. Enfin, les résultats de la première série de microcosmes ont montré que la décroissance des leptospires se fait rapidement et de manière exponentielle en début de cinétique (entre J0 et J7, voire même J4), puis est plus progressive. Ces observations peuvent donc justifier de ne faire un suivi que jusqu'à J21 et non J42.

Par conséquent, ce nouveau protocole de réalisation des microcosmes sera probablement celui gardé pour le reste des prélèvements à réaliser. Des microcosmes avec les sols de la première série seront à nouveau réalisés avec ce protocole modifié afin de pouvoir les comparer avec les autres.

De plus, le fait d'avoir réalisé ce stage au début du projet SpiRAL nous a permis de tester plusieurs méthodes de réhydratation des sols. Dans les manipulations précédentes, plusieurs techniques avaient été réalisées, notamment la réhydratation à pF3, c'est-à-dire la quantité d'eau résiduelle après avoir appliqué une pression de 1 bar sur un sol saturé en eau. Cette méthode n'était pas entièrement satisfaisante puisque les sols semblaient trop secs. Nous avons donc décidé d'ajouter entre 2 et 10 mL d'eau afin de saturer les sols, dans deux dispositifs différents : une boîte de Pétri inclinée et un entonnoir avec un filtre à 1,2 μm . Après les premières manipulations, il s'est avéré que l'entonnoir, après aspiration sous vide de l'eau résiduelle, semblait être le meilleur dispositif de réhydratation des sols, et sera probablement celui gardé pour les prochaines manipulations. La question se pose cependant pour les sols très argileux, pour lesquels la boîte de Pétri resterait le meilleur dispositif de réhydratation, l'entonnoir ne permettant pas d'éliminer suffisamment l'eau résiduelle.

Grâce à l'analyse factorielle multiple ainsi qu'aux matrices de corrélations réalisées sur le logiciel R, des relations ont été cherchées entre une bonne survie et la composition physico-chimique des sols. Les résultats ont montré que pour la première série de microcosmes, la survie semblait corrélée avec des concentrations totales en rubidium (Rb) et zirconium (Zr) plus élevées. Dans la deuxième série de microcosmes, la survie semble corrélée avec des concentrations en soufre (S) biodisponible et en aluminium (Al) mobile plus élevées et un pourcentage de sable plus faible. La concentration totale d'un élément inclut la part utilisable directement par les organismes du sol mais également une part non utilisable. La fraction mobile (obtenue par extraction au CaCl_2) correspond à ce qui va se retrouver en solution lorsque le sol est saturé en eau, et la fraction biodisponible (obtenue par extraction à l'EDTA) correspond à ce qui va être absorbé et utilisable par les organismes présents dans le sol. Cela signifierait ici que pour certains éléments (comme le rubidium et le zirconium) ce sont les concentrations totales qui influenceraient la survie des leptospires. Pour d'autres éléments comme le soufre et l'aluminium, ce seraient les fractions labiles (respectivement biodisponible et mobile) qui influenceraient la survie des leptospires. Cependant, ces suppositions ne sont pas interprétables, car tous les éléments n'ont pas été mesurés avec les trois méthodes. En effet, ici, les concentrations totales en soufre et aluminium n'ont pas été quantifiées, et les fractions mobile et biodisponible du rubidium et du zirconium n'ont pas été quantifiées non plus. Il n'est donc pas possible de conclure quant à l'impact d'une concentration totale ou d'une fraction extraite sur la survie des leptospires.

Certaines tendances semblent également ressortir, comme une corrélation positive entre la survie et le pH (corrélation à 0,51), mais les résultats ne sont pas significatifs (p-value à 0,107). Il avait cependant déjà été démontré qu'un pH neutre à légèrement alcalin était favorable à la survie des leptospires (Bierque 2020).

Cependant, ces résultats sont à interpréter avec beaucoup de précautions. En effet, après analyse des résultats de granulométrie, il s'est avéré qu'il y avait eu des erreurs de lecture, probablement à cause d'une mauvaise dispersion des particules. En effet, les sols du sud dits « rouges » (VLP 90, 91, 92 et SPI 102 et 103) ont été classés comme étant plutôt limoneux alors qu'ils semblaient contenir des particules plus proches du sable. Par ailleurs, tous les sols ont été regroupés dans la même entité sur le triangle des textures (Annexe IX) alors qu'ils présentaient en réalité des granulométries différentes. Les mesures vont donc être refaites avec un nouveau protocole permettant une meilleure dispersion des particules d'argile et donc une lecture plus exacte. Enfin, la quantification des concentrations totales en éléments traces métalliques grâce à la spectrométrie de fluorescence X donne une analyse semi-quantitative et est fiable pour avoir une tendance mais ne permet pas d'avoir des résultats entièrement exacts.

Les résultats de l'ACP et des matrices de corrélations n'ont donc pas montré beaucoup de corrélations entre la survie des leptospires et les paramètres physico-chimiques des sols. De plus, les analyses ont été faites séparément pour les deux séries de microcosmes, qui n'avaient pas été réalisées avec les mêmes protocoles, et les résultats obtenus n'ont pas été les mêmes pour les deux séries. En

réalisant une matrice de corrélations avec l'ensemble des sols, aucune corrélation significative n'est ressortie. Le fait de n'avoir que peu de sols dans chaque série (neuf pour la première série et onze pour la deuxième série) a très certainement impacté cette différence constatée. Les corrélations obtenues ne sont donc pas extrapolables à l'ensemble des sols. Par ailleurs, les concentrations des éléments pour lesquels la corrélation était significative sont relativement faibles dans les sols, de l'ordre de la dizaine de ppm pour le rubidium et le soufre, de la centaine de ppm pour le zirconium et du dixième de ppm pour l'aluminium. Il existe donc probablement d'autres paramètres majeurs expliquant les différences de survie des leptospires. Enfin, les résultats sont significatifs pour certains paramètres mais les p-values restent relativement élevées, ne descendant pas en-dessous de 0,016.

Afin d'avoir davantage de résultats significatifs, il serait d'une part intéressant d'avoir davantage de sols, ce qui sera réalisé dans la suite du projet. D'autre part, il serait intéressant de mesurer d'autres paramètres physico-chimiques qui n'ont pas pu être mesurés ici, comme la porosité des sols, la teneur en dioxygène, la concentration en sels ou encore la capacité d'échange cationique. Des corrélations positives entre la survie et ces trois derniers paramètres ont déjà été démontrées (Bierque, s. d.). Il serait également intéressant de s'intéresser aux interactions entre les leptospires et les autres micro-organismes du sol comme les amibes afin de voir si ces interactions favorisent la survie. Des études sont actuellement en cours, notamment au sein des Work Packages 1 et 2 du projet SpiRAL.

Concernant la recherche de leptospires dans les sols natifs, les résultats montrent qu'une part non négligeable des sols contient des leptospires présents naturellement. Cependant, les détections en qPCR sont parfois très tardives, ce qui signifie que les quantités détectées sont relativement faibles. De plus, le gène *lipL32* ciblé par la qPCR est présent également chez les leptospires pathogènes peu virulents. Par conséquent, sans réaliser une qPCR ciblant un gène détecté uniquement chez les espèces pathogènes virulentes, comme le gène *lfb1*, ou sans réaliser un séquençage du génome, il n'y a aucun moyen d'affirmer que ces leptospires détectés sont virulents et représentent donc un réel danger. Il serait donc intéressant d'investiguer la nature des espèces détectées naturellement sur les sols afin de savoir si ces leptospires représentent un danger pour l'Homme et afin de prévenir les propriétaires des parcelles prélevées.

La cinétique des leptospires morts n'a pas été conclusive. En effet, l'ADN dans ces tubes était supposé ne plus être détecté rapidement, par l'action de dégradation par les micro-organismes du sol (Casanovas-Massana et al. 2018). Ainsi, nous aurions pu affirmer que l'ADN détecté dans les microcosmes de leptospires vivants appartenait bien à des leptospires vivants et donc potentiellement virulents. Cependant, malgré une très forte diminution de concentration à J0 par rapport à la quantité inoculée, les leptospires morts étaient encore détectés à J21. On ne peut donc pas conclure sur le fait de ne détecter que de l'ADN de leptospires vivants lorsque les qPCR sur les leptospires vivants sont réalisées. L'ADN quantifié peut également provenir de leptospires morts.

Cependant, les courbes de décroissance des leptospires morts étant relativement homogènes entre les différents sols, l'hypothèse qu'il y ait une même quantité d'ADN de leptospires morts dans tous les sols peut être émise. Ainsi, si une concentration d'ADN détectée est plus importante, on peut supposer qu'elle provient de leptospires vivants.

Ces manipulations sur les leptospires morts nous ont permis de supposer la présence d'autres espèces de leptospires pathogènes dans les sols. En effet, le sol VLP 56 présentait une cinétique anormale pour les leptospires morts, avec des concentrations qui augmentaient. Cette espèce de leptospire, dont l'ADN est détecté en qPCR ciblant le gène *lipL32* et non détecté en qPCR ciblant le gène *lfb1*, serait potentiellement une espèce pathogène mais peu virulente (Thibeaux et al. 2018). Il serait également intéressant d'investiguer la nature de l'espèce de ces leptospires détectés, par le biais de qPCR ciblant des gènes différents ou encore grâce au séquençage du génome après isolement.

Par ailleurs, ces résultats supposent qu'il y ait potentiellement cette espèce ou d'autres espèces de leptospires dans les sols, faussant ainsi les quantités d'ADN de *L. interrogans* Manilae détectées dans les autres tubes de microcosmes contenant des leptospires morts.

Concernant le contrôle interne plasmidique zIAC, ce dernier devait servir de contrôle quantitatif afin de valider les extractions et les qPCR. Cependant, dans de nombreux cas, des différences de

concentrations pouvant varier d'un facteur dix voire cent ont été mises en évidence. L'hypothèse la plus probable est une variabilité sur l'extraction d'ADN ou au niveau du rendement de la qPCR. Ce contrôle interne a surtout été semi-quantitatif dans nos manipulations. Lorsque la qPCR zIAC était positive sans atteindre des valeurs de Ct extrêmes, nous avons pu conclure que l'extraction s'était bien déroulée et que la qPCR *lipL32* était interprétable. Néanmoins, un contrôle quantitatif a pu être mis en place dans le cas des sols VLP 90 et 91, qui présentaient très probablement des inhibiteurs. Les concentrations en plasmides étaient jusqu'à 100 000 fois inférieures aux valeurs usuelles, confortant ainsi l'hypothèse de la présence d'inhibiteurs de PCR dans le sol, inhibant la qPCR *lipL32* mais également la qPCR zIAC. La dilution de l'ADN de ces sols au 1/10^{ème} a permis de retrouver des valeurs de concentrations du plasmide zIAC dans les normes et de calculer les concentrations en leptospires.

Le nombre relativement faible de prélèvements de sols effectués, ainsi que le fait que le protocole ne soit pas le même pour les deux séries de manipulations, font qu'il y a peu d'échantillons comparables (neuf dans la première série de microcosmes, onze dans la deuxième série). Ce nombre restreint de prélèvements réduit la puissance statistique et limite donc la portée de nos conclusions. Ce faible nombre est en partie dû au mois de confinement qu'il y a eu en mars en Nouvelle-Calédonie, stoppant ainsi toutes les missions de terrain. De plus, les mauvaises conditions météorologiques (cyclones et fortes pluies) causées par le phénomène climatique La Niña ont fait que beaucoup de missions ont été annulées et/ou reportées car les sols étaient détrempés et les terrains non praticables.

De ce fait, les 20 prélèvements de sols présentés dans ce rapport ne sont pas représentatifs de la Grande Terre puisqu'ils sont concentrés sur la moitié sud et la côte Ouest de la Nouvelle-Calédonie. Les résultats présentés ne sont donc pas extrapolables à tout le territoire. Toutefois, ce travail permet de montrer les approches statistiques qui pourront être mises en œuvre avec un nombre plus élevé de sols lorsque ceux-ci auront été prélevés et étudiés.

CONCLUSION

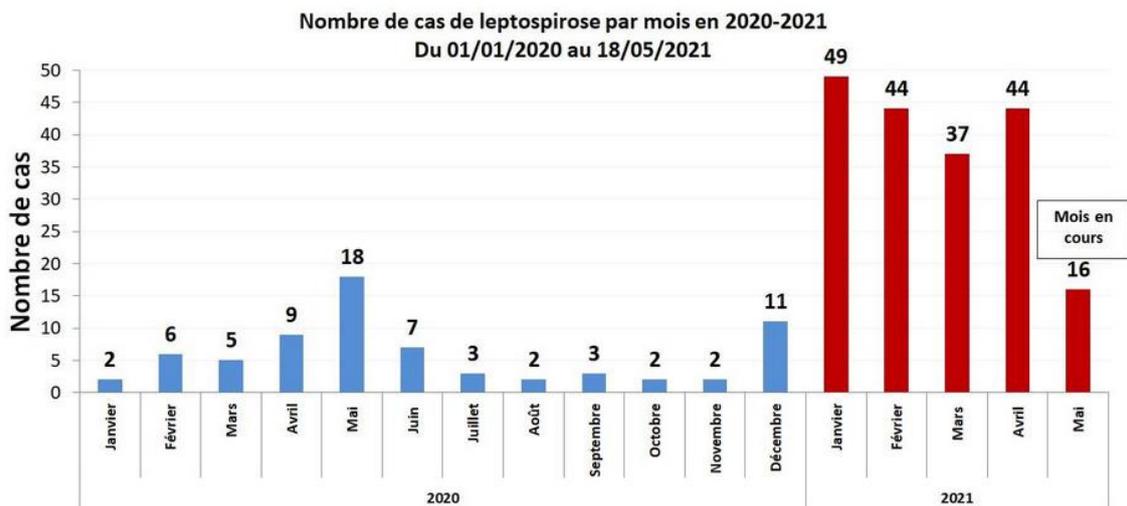
Cette étude avait pour but de déterminer les caractéristiques des sols de Nouvelle-Calédonie permettant une bonne survie des leptospires pathogènes, à partir de prélèvements réalisés à l'échelle de la Grande Terre. Le modèle d'étude était *Leptospira interrogans* Manilae, une souche de leptospire pathogène pour l'Homme et l'animal.

Les résultats ont montré des différences de survie des leptospires relativement marquées entre les sols. Par ailleurs, les relations entre la survie et les paramètres physico-chimiques des sols ont montré des corrélations positives entre la survie et la quantité de rubidium, zirconium et soufre, ainsi qu'une corrélation négative entre la survie et le pourcentage de sable dans le sol. Les quantités de ces éléments étant relativement faibles dans les sols, il serait intéressant de réaliser des analyses supplémentaires sur d'autres paramètres du sol afin d'expliquer davantage la survie, comme la porosité, la teneur en dioxygène et en sels ou encore la capacité d'échange cationique. Des tendances ressortent également entre survie et pH : un pH neutre à légèrement alcalin favorisait la survie des leptospires.

Ce stage s'est inscrit à une échelle beaucoup plus vaste dans le projet SpiRAL. Cent-trente prélèvements de sols doivent encore être réalisés pour couvrir l'ensemble de la Grande Terre. L'objectif est de mieux comprendre l'habitat des leptospires en dehors d'un hôte en se basant sur une approche holistique de la composante environnementale de la maladie. Ainsi, sont étudiés l'habitat environnemental des leptospires (eaux et sols), les interactions de ces bactéries avec d'autres micro-organismes ou encore avec les particules du sol, ainsi que la dynamique de dispersion des leptospires dans l'environnement, en particulier les eaux d'inondation et de crue lors de fortes pluies. L'objectif final du projet est d'agir sur la prévention de cette maladie négligée pourtant très présente, en informant mieux les autorités de santé publique ainsi que les populations. Cette prévention passera par la création de modèles spatiaux du risque à l'échelle de la Grande Terre de Nouvelle-Calédonie.

ANNEXES

Annexe I : Nombre de cas humains de leptospirose par mois en 2020-2021 en Nouvelle-Calédonie



Source : « La leptospirose | Direction des Affaires Sanitaires et Sociales de Nouvelle-Calédonie » s. d.

Annexe II : Récapitulatif des points de prélèvements : communes et types de sols

Nom du sol	Commune	Type de sol
VLP 03	Boulouparis	Haplic Fluvisols
VLP 14	Dumbéa	Haplic Fluvisols
VLP 15	Farino	Haplic Cambisols (Magnesic) associés à des Lithic Leptosols sur péridotites
VLP 35	La Foa	Vertic Cambisols (Eutric) associés à des Lithic Leptosols sur roches basiques
VLP 36	La Foa	Haplic Fluvisols
VLP 37	La Foa	Haplic Fluvisols
VLP 39	La Foa	Haplic Vertisols associés à des sols hydromorphes
VLP 41	Moindou	Haplic Fluvisols
VLP 49	Nouméa	Vertic Cambisols (Eutric) associés à des Rendzic Leptosols
VLP 52	Païta	Haplic Vertisols (Magnesic) associés à des apports de Cambisols sur péridotites
VLP 55	Païta	Vertic Cambisols (Eutric) associés à des Lithic Leptosols sur roches basiques
VLP 56	Païta	Haplic Vertisols (Magnesic) associés à des apports de Cambisols sur péridotites
VLP 76	Sarraméa	Haplic Fluvisols
VLP 90	Yaté	Posic Ferrasol (Ferritic) sur péridotites
VLP 91	Yaté	Posic Ferrasol (Ferritic) sur péridotites
VLP 92	Yaté	Haplic Fluvisols (Ferritic)
SPI 102	Yaté	Haplic Fluvisols (Ferritic)
SPI 103	Yaté	Haplic Fluvisols (Ferritic)

Annexe III : Protocole ajusté d'extraction d'ADN des sols grâce au kit DNeasy PowerSoil Kit de Qiagen

1. Verser le contenu des tubes PowerBead dans les tubes de microcosmes. Bien homogénéiser.
2. Ajouter 60 μL de solution C1 ainsi que 10 μL du plasmide zIAC dilué au 1/1000^{ème}. Vortexer brièvement.
3. Mettre les tubes dans le MagnaLyser et vortexer à 2500 rpm pendant 5 minutes (3 fois 90 secondes + une fois 30 secondes).
4. Centrifuger les tubes à 15 000 g pendant une minute. Ajouter une minute supplémentaire pour les échantillons de sols argileux.
5. Transférer 500 μL de surnageant dans un tube Eppendorf propre de 2 mL. Le surnageant peut encore contenir des particules de sols.
6. Ajouter 250 μL de solution C2. Vortexer pendant 5 secondes puis mettre les tubes à incuber à 4°C pendant 5 minutes.
7. Centrifuger les tubes à 10 000 g pendant une minute.
8. En évitant le culot, transférer 600 μL du surnageant dans un tube Eppendorf propre de 2 mL.
9. Ajouter 200 μL de solution C3. Vortexer brièvement puis mettre les tubes à incuber à 4°C pendant 5 minutes.
10. Centrifuger les tubes à 10 000 g pendant une minute.
11. En évitant le culot, transférer jusqu'à 750 μL de surnageant dans un tube Eppendorf propre de 2 mL.
12. Bien remuer la solution C4 et en ajouter 1200 μL au surnageant. Vortexer pendant 5 secondes puis spiner.
13. Charger 675 μL sur une colonne MB Spin et centrifuger à 10 000 g pendant une minute. Jeter ce qui est passé à travers la colonne.
14. Répéter l'étape 13 jusqu'à ce que la totalité de l'échantillon soit passé sur la colonne (3 passages en tout).
15. Ajouter 500 μL de solution C5. Centrifuger à 10 000 g pendant 30 secondes.
16. Jeter ce qui est passé à travers la colonne, puis centrifuger à nouveau à vide à 10 000 g pendant une minute.
17. Placer précautionneusement la colonne MB Spin dans un tube Eppendorf propre de 2 mL. Eviter d'éclabousser la colonne avec la solution C5.
18. Ajouter 30 μL de solution C6 au centre de la membrane filtrante de la colonne. Laisser la membrane s'imprégner pendant 5 minutes.
19. Centrifuger le tube à température ambiante à 10 000 g pendant une minute. Jeter la colonne MB Spin et conserver le tube à 4°C.

Annexe IV : Protocole d'extraction d'ADN en solution grâce au kit QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen

1. Prélever 10 μL de culture à extraire et transférer dans un tube de 1.5 mL.
2. Ajouter 170 μL de PBS 1X.
3. Ajouter 200 μL de tampon AL.
4. Dans le bouchon du tube, ajouter 20 μL de protéinase K. Agiter et vortexer.
5. Laisser incuber pendant 30 minutes minimum à 56°C.
6. Ajouter 230 μL d'éthanol absolu, puis vortexer et pulser.
7. Transférer le contenu sur une colonne QIAamp Mini spin, puis centrifuger à 13 000 rpm pendant une minute.
8. Transférer la colonne sur un nouveau tube et ajouter 500 μL de tampon AW1. Centrifuger à 13 000 rpm pendant une minute.
9. Transférer la colonne sur un nouveau tube et ajouter 500 μL de tampon AW2. Centrifuger à 14 000 rpm pendant 3 minutes.
10. Jeter ce qui est passé à travers la colonne puis centrifuger à vide à 14 000 rpm pendant une minute.
11. Transférer la colonne sur un nouveau tube de 1.5 mL.
12. Eluer avec 30 μL de tampon AE. Laisser la membrane s'imprégner pendant 5 minutes.
13. Centrifuger le tube à 13 000 rpm pendant une minute. Jeter la colonne et conserver le tube à 4°C.

Annexe V : Rappel de la technique de qPCR TaqMan

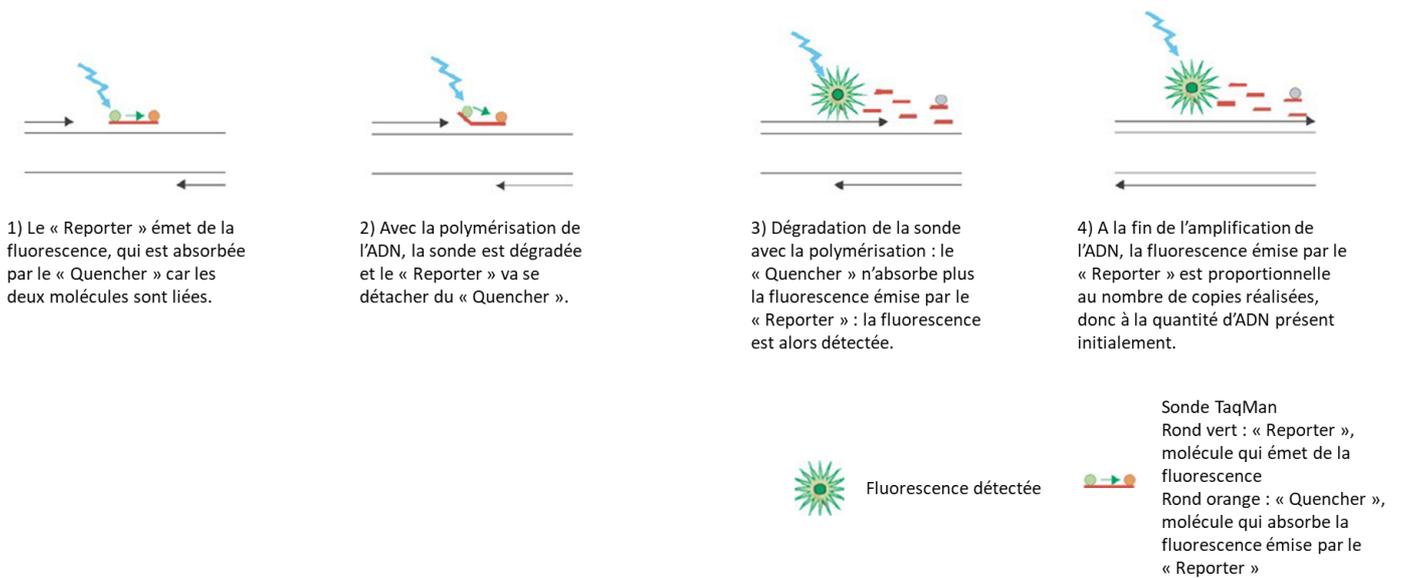


Figure réalisée d'après Van der Velden et al. *Leukemia* (2003) 17, 1013–1034.

Annexe VI : Rappel de la technique de qPCR SYBR Green

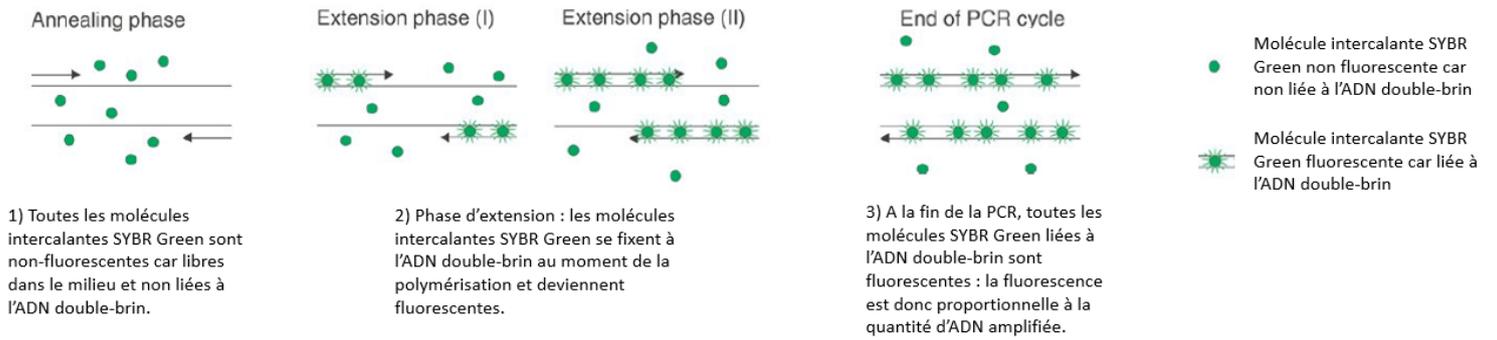


Figure réalisée d'après Van der Velden et al. *Leukemia* (2003) 17, 1013–1034.

Annexe VII : Dosages physico-chimiques des 20 sols (pH, humidité, conductivité, granulométrie et spectrométrie de fluorescence X)

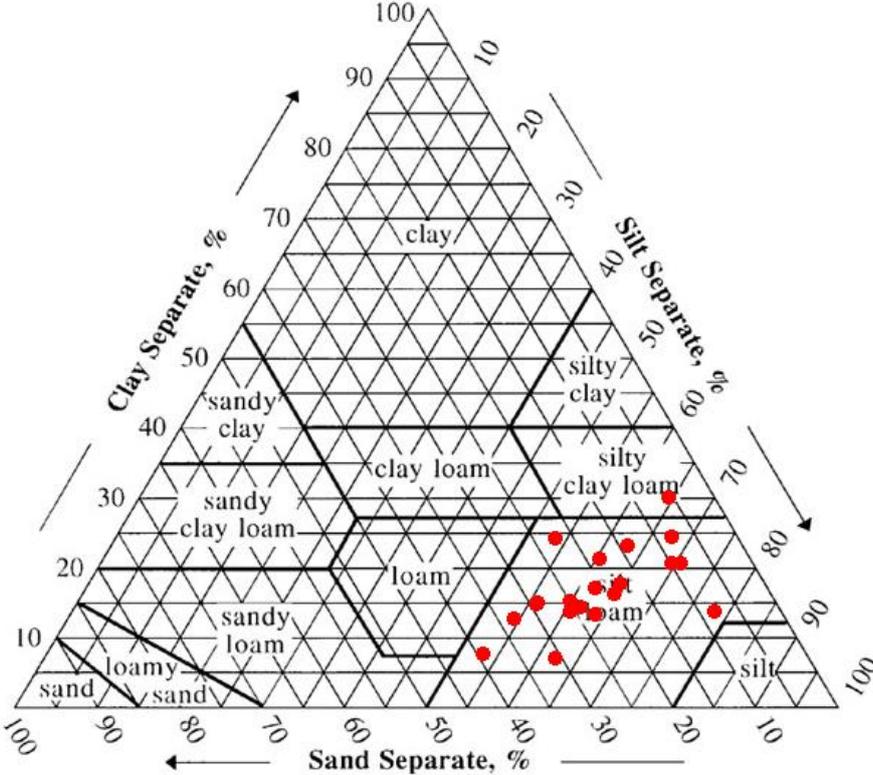
Nom du sol	pH	Humidité (%)	Conductivité (µS/cm)	Granulométrie				Spectrométrie de fluorescence X (ppm soit mg/kg)															
				% argile	% limon	% sable	K	Ca	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Rb	Sr	Zr	Cd	Ba	Pb
VLP 03	7,32	39,62	187,2	20,68	59,86	19,46	0	2996	9613	245	826	1860	50595	60	75	39	33	16	65	182	32	257	12
VLP 14	7,30	35,23	107,8	14,75	59,10	26,16	2004	5499	2386	93	6792	2971	167517	352	5274	24	268	23	41	78	15	0	40
VLP 39_1	6,94	37,45	51,4	20,19	68,80	11,02	721	4538	18119	447	260	1385	127256	59	73	54	79	25	23	170	42	0	13
VLP 39_2	6,44	17,52	57,8	14,17	55,21	30,63	3948	1314	5869	0	0	379	26619	45	17	11	18	44	82	348	27	156	19
VLP 41	6,10	21,4	27,8	23,74	52,85	23,42	1721	1396	6307	108	316	2141	36626	84	66	15	39	30	77	222	29	148	24
VLP 52_1	7,78	29,54	53,8	20,05	69,91	10,04	10580	5446	6562	142	214	1406	53085	38	124	32	72	72	135	170	27	191	27
VLP 52_2	5,95	32,72	108,5	17,25	64,00	18,76	2673	2712	6939	192	68	4320	56018	61	24	31	40	30	117	125	25	166	25
VLP 55	6,06	32,08	193,3	15,61	64,13	20,26	13872	9194	7039	225	0	1225	60984	0	26	45	65	48	248	133	25	123	26
VLP 56	7,38	34,12	174,4	13,18	59,90	26,92	9738	8453	5984	132	202	1522	48966	50	147	37	73	59	91	158	29	185	30
VLP 49	8,40	26,76	228,0	14,41	55,29	30,30	11021	54865	3811	167	0	654	27912	24	149	72	46	59	146	110	0	874	433
VLP 90	6,31	32,91	86,9	7,18	52,31	40,51	0	2717	545	72	6592	3699	187736	484	7126	22	123	11	14	11	14	0	0
VLP 91	5,62	15,77	61,3	22,62	62,08	15,29	2210	1805	3738	80	102	580	23569	26	40	12	28	32	85	183	23	171	16
VLP 92	6,23	25,47	128,7	13,18	77,50	9,32	9008	2278	5458	115	80	831	27820	30	47	0	52	58	134	529	30	182	25
VLP 76	6,66	18,83	148,1	23,81	66,84	9,35	1884	7281	2882	95	0	326	28902	26	37	15	36	26	64	135	23	139	13
VLP 15	6,50	22,47	93,0	16,49	61,27	22,24	4519	3066	4817	92	91	1299	40447	34	23	24	41	39	45	129	24	150	25
VLP 35	6,36	22,37	30,5	12,85	63,09	24,06	545	571	1024	233	16853	8533	441442	952	6197	21	256	21	0	0	56	0	0
VLP 36	6,17	14,39	24,7	13,77	60,97	25,26	884	731	1819	334	28375	4490	523321	399	2508	28	176	48	0	20	65	0	39
VLP 37	6,66	18,65	25,2	29,53	63,82	6,65	562	597	2180	369	23994	4083	448409	529	5225	0	252	20	0	51	62	0	15
SPI 102	6,21	15,91	49,5	12,05	53,63	34,32	831	1935	2904	396	38879	2750	472816	476	3614	19	247	31	14	78	68	0	29
SPI 103	5,59	7,68	15,8	6,45	61,46	32,09	843	787	3073	437	32418	2637	534780	380	2152	23	170	36	0	32	77	0	47

Annexe VIII : Mesures de la fraction biodisponible et mobile des éléments des sols – extractions chimiques des métaux grâce à l'EDTA (tableau du haut) et au CaCl₂ (tableau du bas)

Nom du sol	Fraction biodisponible des éléments du sol - extractions chimiques EDTA (mg/L)																			
	Ca	Mg	K	P	Si	Al	Ti	Fe	Mn	Ni	Co	Cr	Cu	Zn	Pb	S	Sb	Se	Ba	V
VLP 03	240,8	27,7	4,4	0,6	53,6	29,1	0,3	117,9	84	2,5	1,5	1,2	0,8	0,3	0,3	2	0	0	4,4	1,6
VLP 14	283,7	57	15,1	31,1	43,3	18,5	0,1	155,7	135,6	49,2	16,8	0,4	0,6	7,1	2,8	1,9	0	0	0,9	0,2
VLP 15	230,2	22	9,5	10,8	13,9	41,7	0,3	160,4	68,5	0,2	0,7	0,1	0,8	0,6	0,8	4,4	0	0	2,2	0,7
VLP 35	6,9	5,4	2	0	8,2	30,1	0,1	137,4	293,4	21,7	30,7	2,4	0,2	0,5	0,2	10,1	0,1	0,1	0,3	0,2
VLP 36	4,5	1,2	1,2	0	1,3	5,1	0,1	84,7	68,6	1,5	0,9	1,2	0,1	0,1	0,1	5,3	0	0	0,1	0,1
VLP 37	8,5	13,5	0,6	0	9,7	11,5	0,1	29,6	72,7	9,3	9,5	0,4	0,1	0,2	0,1	18,9	0	0	0,1	0,2
VLP 39_1	268,8	31	3,5	0,2	13	49,5	0,8	76,7	44,9	0,4	1,6	0,1	0,9	0,6	0,7	1,8	0	0	0,5	0,7
VLP 39_2	110,9	15,2	8,3	0,4	14,1	39,8	0,2	42,7	10	0,2	0,2	0	0,1	2,2	0,3	2,7	0	0	2,1	0,1
VLP 41	89,9	16,7	1,3	1,4	8,9	48,2	0,3	86,8	80,9	0,5	1,3	0,1	0,2	0,1	0,5	2	0	0	0,7	0,3
VLP 49	Na	35,5	14,3	0,3	12,9	4,4	0	3,8	16,7	1,3	0,3	0	0,8	0,4	29,1	3,9	0,1	0	4,7	0,1
VLP 52_1	262,9	26,9	3,6	2,1	26,9	37,4	0,8	145,4	68,7	3,5	1,6	0,2	1,1	0,6	0,5	2,2	0	0	1,9	0,8
VLP 52_2	152,4	77,5	5	0,8	20,1	30,8	0,5	110,9	212,6	0,5	2,5	0,1	0,9	0,3	0,5	2,7	0	0,1	1,8	0,8
VLP 55	393,4	37	32,1	5,6	23,5	33,4	0,5	61,6	55	0,4	1,1	0	0,7	0,6	0,3	4,6	0	0	1,2	0,5
VLP 56	391,8	20,1	19,5	12,2	19,5	31	0,5	140,6	68,2	3,6	1,5	0,2	1,3	1,2	1,4	4,7	0	0	1,8	0,6
VLP 90	85	202,9	17,5	0	48	18,3	0,1	86,9	159,1	57,6	19	0,3	0,2	0,8	0,1	1,2	0	0,1	0,1	0,2
VLP 91	138,1	16,4	6,5	1,1	10,3	21,3	0,1	69,5	25,3	1,4	0,4	0	0,3	0,5	0,3	1,5	0	0	2,1	0,1
VLP 92	162,3	16,4	12,7	3,5	7,3	31	0,1	81	32,9	1,5	0,3	0,1	0,2	0,6	0,6	3	0	0	2,6	0,1
VLP 76	575,2	46,4	17,8	101	14,9	22,3	0,2	70,6	14,9	0,8	0,3	0,1	0,4	2,5	0,2	4,1	0	0	1,5	0,4
SPI 102	82,1	7,4	1,5	0,1	3,3	19	0,4	114,2	34,5	3,2	2,6	2,9	0,1	0,3	0,1	10,6	0,1	0	0	0,1
SPI 103	2	3	0,7	0	-0,1	5	0	16,8	0,3	0,3	0	0,4	0	0	0	0,5	0	0	0	0

Nom du sol	Fraction mobile des éléments du sol - extractions chimiques CaCl ₂ (mg/L)																				
	Mg	Na	K	P	Si	Al	Ti	Fe	Mn	Ni	Co	Cr	Cu	Zn	As	Pb	Cd	Sb	Se	Ba	V
VLP 03	95,199	13,932	3,747	0,029	11,134	0,009	0,000	0,008	0,727	0,011	-0,033	0,001	0,002	0,011	0,011	0,002	0,000	0,009	0,007	1,454	0,006
VLP 14	118,374	6,171	12,458	0,034	13,379	0,006	0,000	0,015	0,002	0,288	-0,034	0,001	0,001	0,007	-0,002	-0,005	0,000	0,005	-0,007	0,152	0,003
VLP 15	37,113	8,073	2,050	0,008	3,739	0,018	0,000	0,014	0,014	0,004	-0,034	0,001	0,000	0,013	0,004	0,005	0,000	0,005	0,000	0,073	0,003
VLP 35	33,885	15,945	4,196	0,012	1,489	0,073	0,000	0,015	0,241	0,013	-0,034	0,001	0,000	0,006	0,002	0,006	0,000	0,009	0,007	0,907	0,004
VLP 36	21,433	7,667	0,753	0,009	2,077	0,116	0,000	0,007	0,314	0,039	-0,037	-0,001	0,000	0,009	-0,003	0,003	0,000	0,006	0,020	0,275	0,002
VLP 37	61,665	6,453	2,021	0,009	7,420	0,013	0,000	0,017	0,020	0,045	-0,037	-0,001	0,001	0,010	0,004	-0,003	0,000	0,008	-0,005	0,257	0,004
VLP 39_1	80,171	30,991	3,908	0,013	5,700	0,008	0,000	0,015	0,224	0,005	-0,034	-0,001	0,000	0,009	0,002	0,003	0,000	0,006	0,005	0,166	0,003
VLP 39_2	52,519	9,289	28,069	0,062	6,744	0,032	0,001	0,025	0,019	0,001	-0,034	0,000	0,002	0,008	0,006	0,002	-0,001	0,002	-0,004	0,192	0,001
VLP 41	54,079	8,878	17,085	0,351	6,781	0,022	0,000	0,026	0,050	0,053	-0,034	0,001	0,004	0,008	-0,001	0,001	0,000	0,003	-0,009	0,378	0,002
VLP 49	19,425	8,881	9,871	0,007	7,268	0,002	0,000	0,008	0,001	0,002	-0,035	-0,001	0,002	0,012	0,000	0,005	-0,001	0,006	0,011	1,573	0,003
VLP 52_1	118,582	5,436	14,986	0,014	17,094	0,011	0,000	0,013	0,000	0,102	-0,032	0,000	0,000	0,012	0,000	0,005	0,000	0,003	-0,001	0,000	0,003
VLP 52_2	21,082	5,806	4,854	0,011	2,435	0,054	0,001	0,038	0,412	0,074	-0,008	0,001	0,000	0,041	-0,003	-0,001	0,000	0,004	0,007	1,469	0,002
VLP 55	55,388	9,399	11,189	0,053	2,639	0,033	0,000	0,021	0,311	0,037	-0,030	-0,001	0,000	0,026	0,000	0,000	0,000	0,008	0,000	1,353	0,003
VLP 56	40,846	5,267	12,625	1,038	3,538	0,016	0,000	0,017	0,018	0,002	-0,033	-0,001	0,001	0,014	-0,001	0,001	-0,001	0,008	-0,004	0,256	0,004
VLP 90	25,124	7,803	8,477	0,021	2,408	0,017	0,000	0,019	0,187	0,000	-0,018	-0,001	0,001	0,012	-0,002	0,003	0,000	0,004	-0,004	0,516	0,002
VLP 91	8,239	6,706	1,437	0,013	2,770	0,028	0,000	0,035	0,240	2,694	-0,021	0,006	0,000	0,025	0,002	0,001	0,000	0,005	0,005	0,010	0,001
VLP 92	1,863	5,311	0,808	0,005	0,346	0,014	0,000	0,019	0,772	0,256	-0,028	0,000	0,000	0,014	0,005	0,000	0,000	0,003	0,000	-0,001	0,002
VLP 76	13,037	5,055	0,378	0,011	1,149	0,012	0,000	0,011	0,001	0,139	-0,034	0,000	0,000	0,013	0,001	0,006	0,000	0,008	-0,008	-0,002	0,004
SPI 102	7,793	5,985	1,164	0,009	0,594	0,013	0,000	0,014	0,145	0,096	-0,031	-0,001	0,000	0,010	0,001	0,003	0,000	0,009	-0,002	0,003	0,002
SPI 103	3,263	5,174	0,673	0,007	0,097	0,123	0,000	0,026	0,156	0,127	-0,018	0,002	0,000	0,018	-0,001	0,002	0,000	0,008	-0,013	0,031	0,002

Annexe IX : Triangle des textures obtenu suite aux mesures de granulométrie



Les trois sommets du triangle représentent 100% de sable (sand), d'argile (clay) et de limon (silt). En rouge sont représentés les différents sols.
 Figure réalisée par Farid Juillot à partir des résultats des mesures de granulométrie réalisées à l'Université de Nouvelle-Calédonie (UNC).

Annexe X : Scripts utilisés pour réaliser l'analyse statistique des données de survie des microcosmes de sol

Scripts réalisés sur le logiciel R version 3.6.3, adaptés de A. Bourles.

Installation des packages pour l'ACP

```
install.packages(c("lmtest", "Hmisc", "car", "agricole", "lawstat", "MASS", "ade4",  
"FactoMineR", "scatterplot3d", "vegan", "corrplot"), dependencies = TRUE,  
lib="/Library/Frameworks/R.framework/Versions/3.3/Resources/library")
```

Installation des bibliothèques pour l'ACP

```
library(lmtest)  
library(Hmisc)  
library(car)  
library(agricolae)  
library(lawstat)  
library(MASS)  
library(ade4)  
library(FactoMineR)  
library(scatterplot3d)  
library(vegan)  
library(corrplot)
```

Importation du fichier

```
data <- read.table("Tabcorr.csv", sep = ";", dec = ",", header=T, na.strings="Na")  
data
```

Réalisation de l'ACP et visualisation

```
res <- PCA(data, quali.sup=1, quanti.sup = 1)  
plot(res, choix="varcor", cex=0.8, shadowtext=TRUE, col.quanti.sup="red")
```

Propriétés de l'ACP et enregistrement d'un fichier texte

```
summary(res, nbelements=Inf)  
summary(res, nbelements=Inf, file = "Soilsolution-survival(1011)_ACPproperties.txt")
```

Réalisation Classification hiérarchique sur composantes principales (HCPC)

```
res.hcpc = HCPC(res)
```

Propriétés de l'HCPC

```
res.hcpc$desc.var
```

Réalisation de la matrice de corrélation

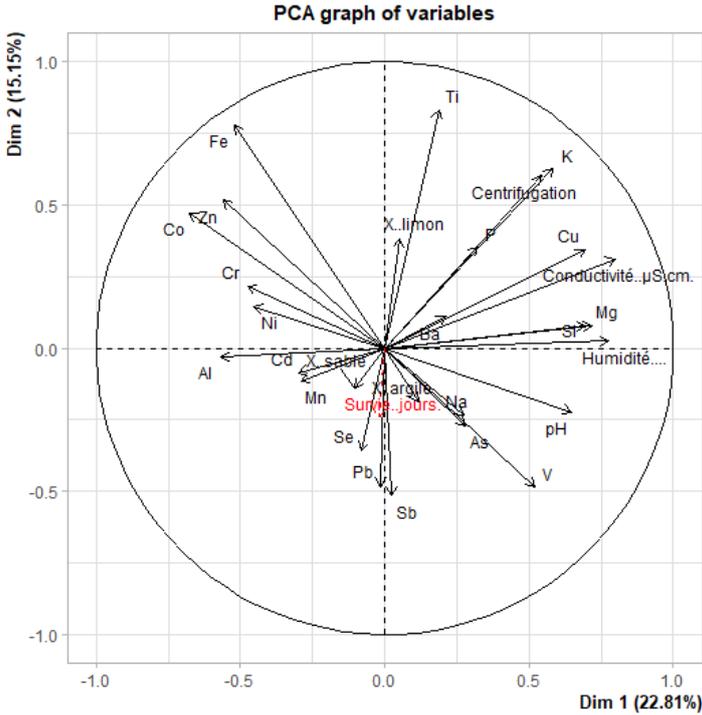
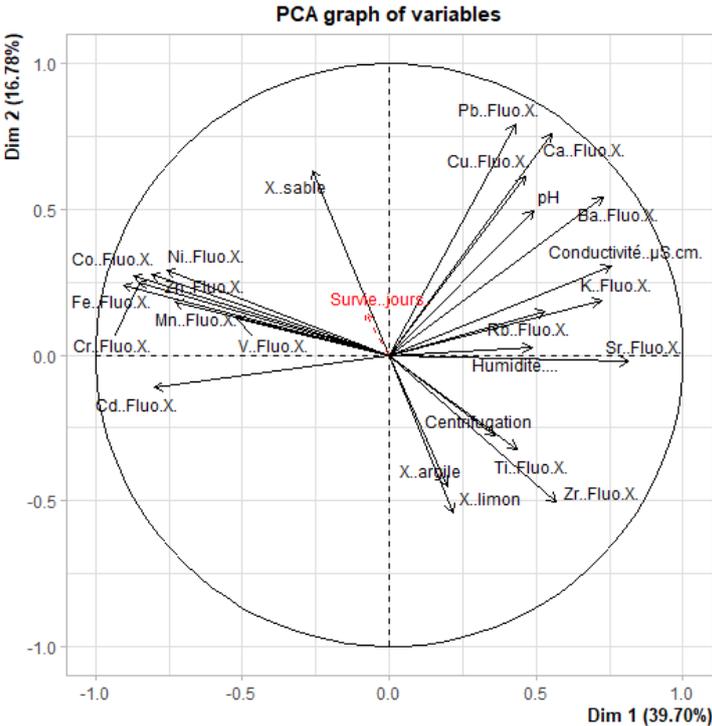
```
mcor <- cor(data)  
mcor  
corrplot(mcor, type="upper", order="hclust", tl.col="black")  
corrplot(mcor)
```

Calcul des p-values

```
res1 <- cor.mtest(data, conf.level = .95)  
res1
```

Annexe XI: Analyses en Composantes Principales (ACP) pour les concentrations totales en éléments traces métalliques (Spectrométrie de fluorescence X) et les extractions chimiques des éléments à l'aide du CaCl₂

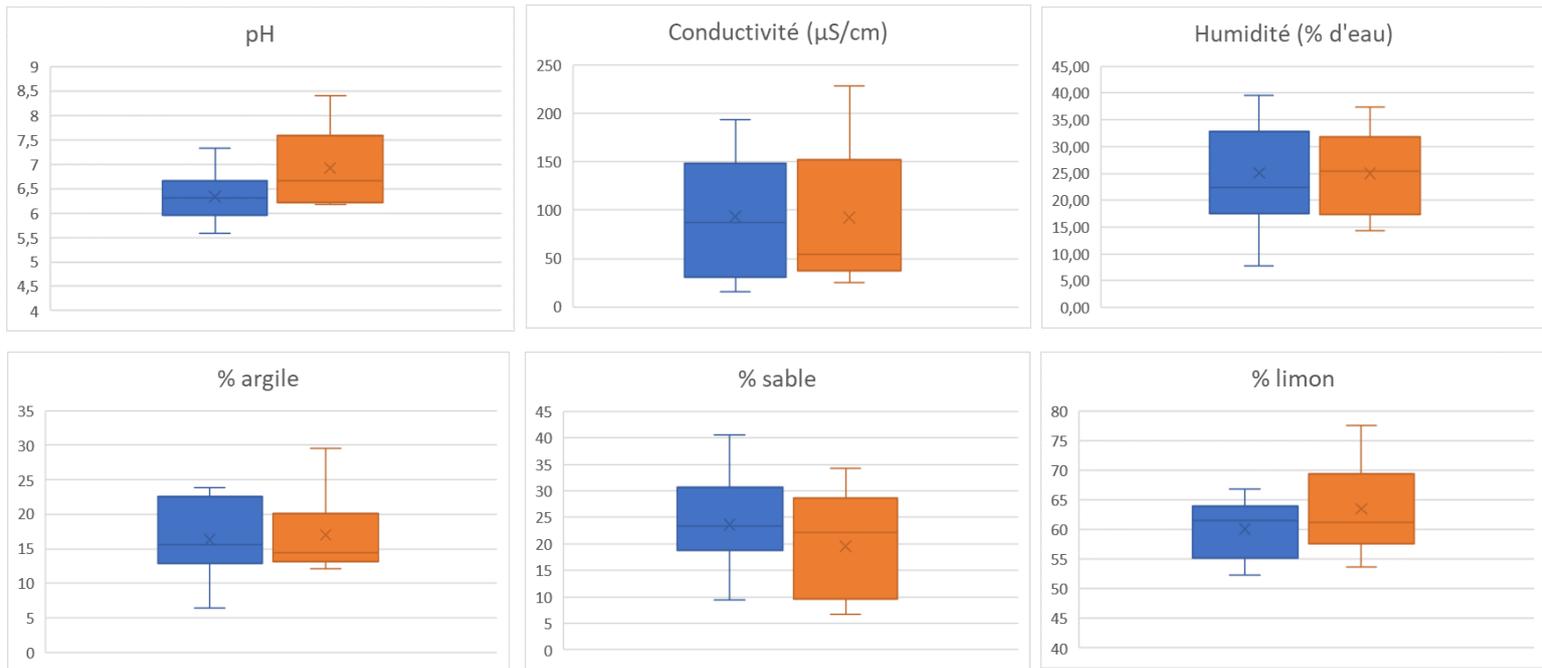
La première figure représente l'ACP réalisée avec les paramètres communs (Centrifugation, pH, humidité, conductivité et granulométrie avec les pourcentages en argiles, sables et limons) ainsi que les concentrations en éléments traces métalliques mesurées à l'aide de la spectrométrie de fluorescence X. La deuxième figure représente l'ACP réalisée avec les paramètres communs et les concentrations en éléments chimiques obtenues par extraction au CaCl₂. Ces figures ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 3.6.3, avec la formule PCA().



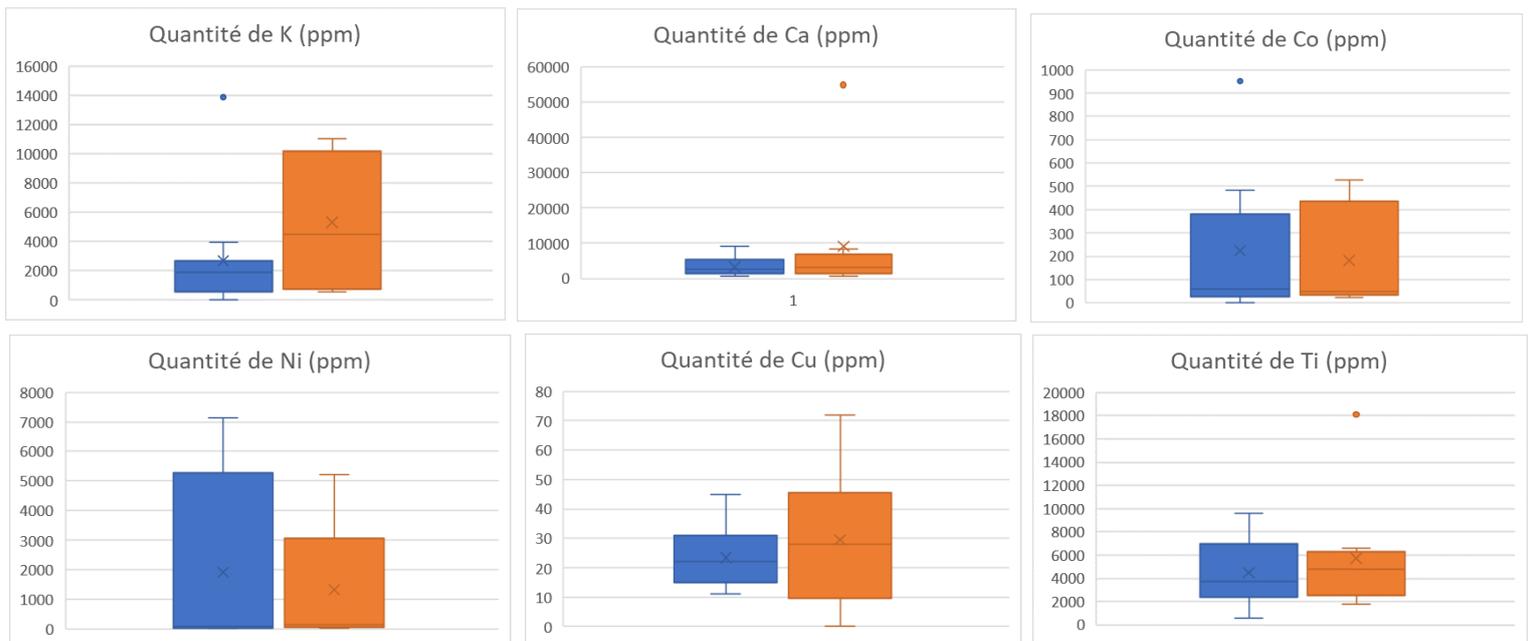
Annexe XII : Statistiques descriptives de chaque paramètre mesuré

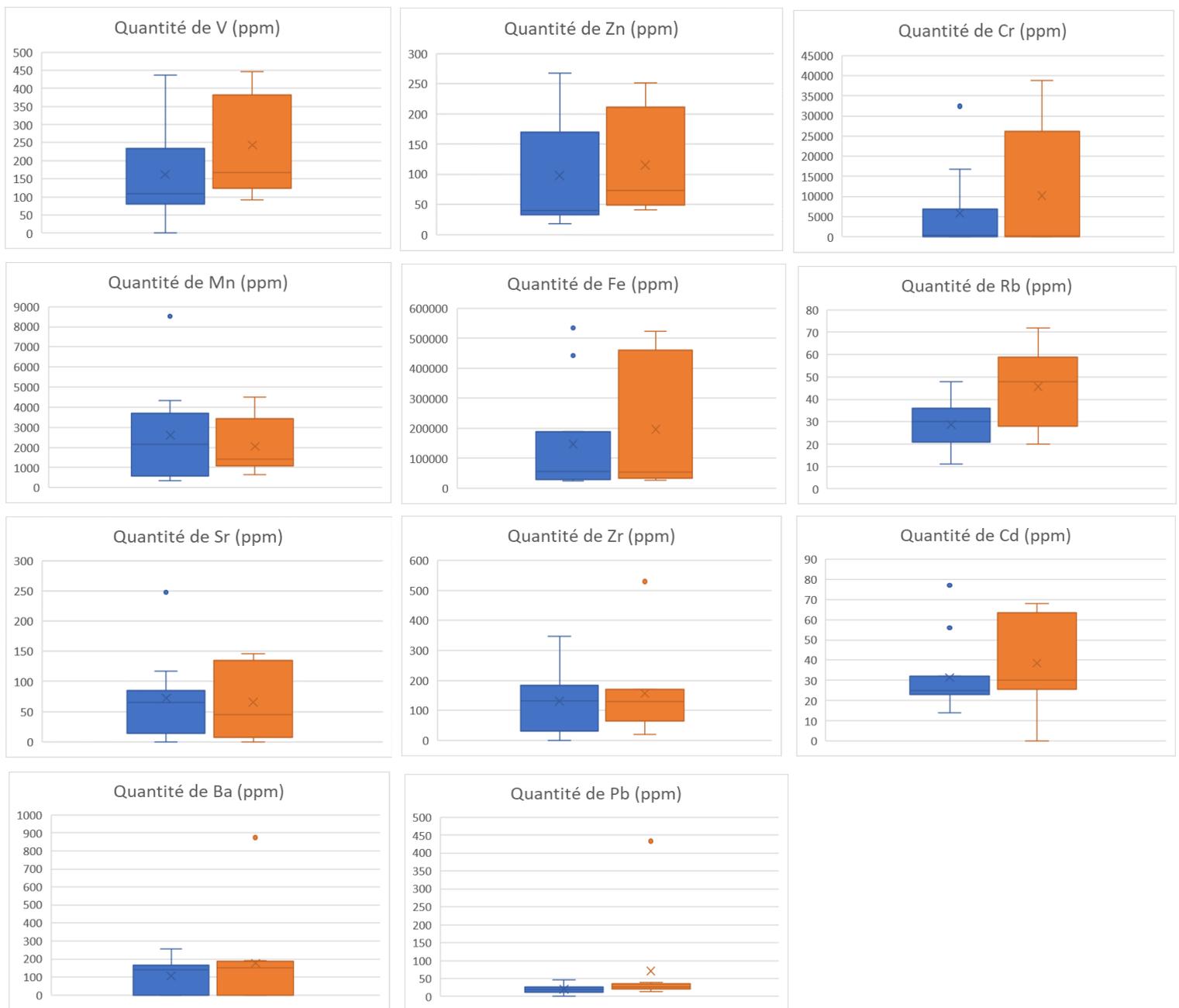
Les boîtes à moustaches suivantes représentent la distribution des valeurs pour chaque paramètre mesuré et pour deux catégories de sols : ceux permettant une « bonne survie », c'est-à-dire ceux dont le nombre de jours pour atteindre 3% de la concentration à J0 est supérieur à 7 (en orange) et ceux permettant une « mauvaise survie », c'est-à-dire ceux dont le nombre de jours pour atteindre 3% de la concentration à J0 est inférieur à 7 (en bleu).

- Paramètres communs (pH, humidité, conductivité, granulométrie avec les pourcentages en sables, argiles et limons) :

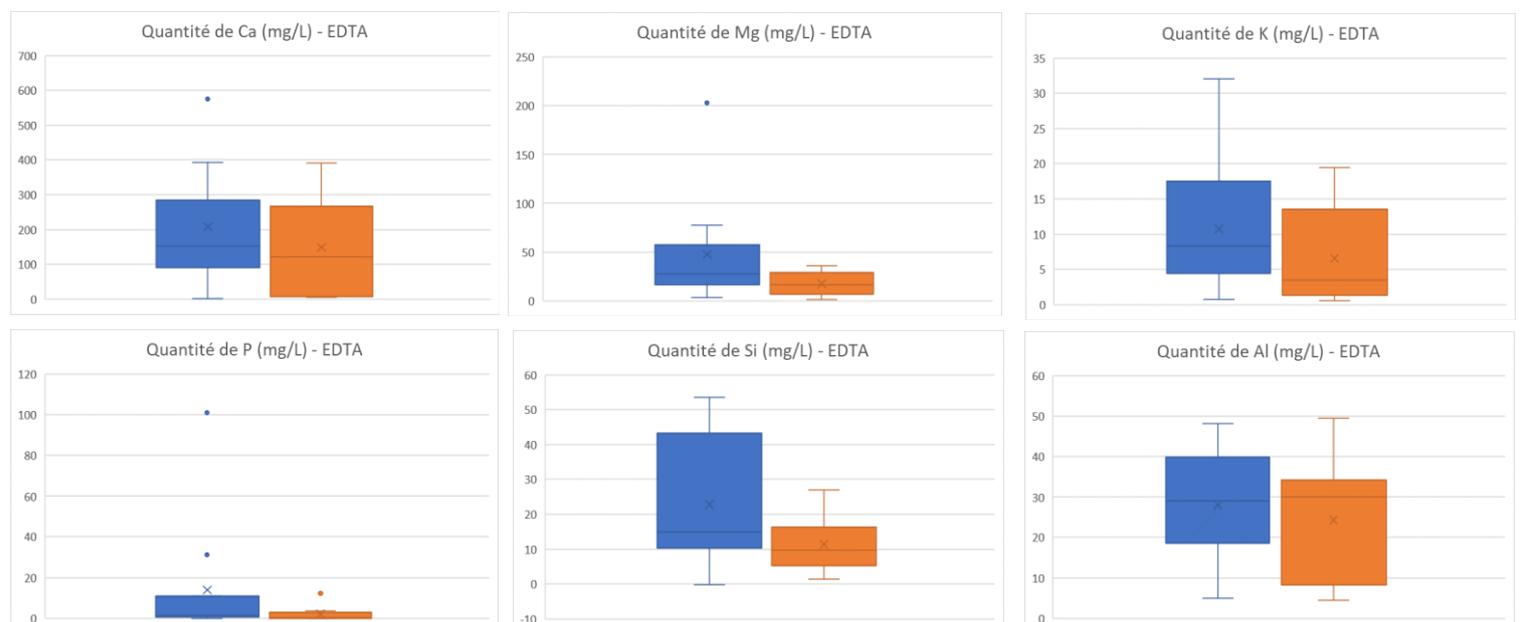


- Spectrométrie de fluorescence X :



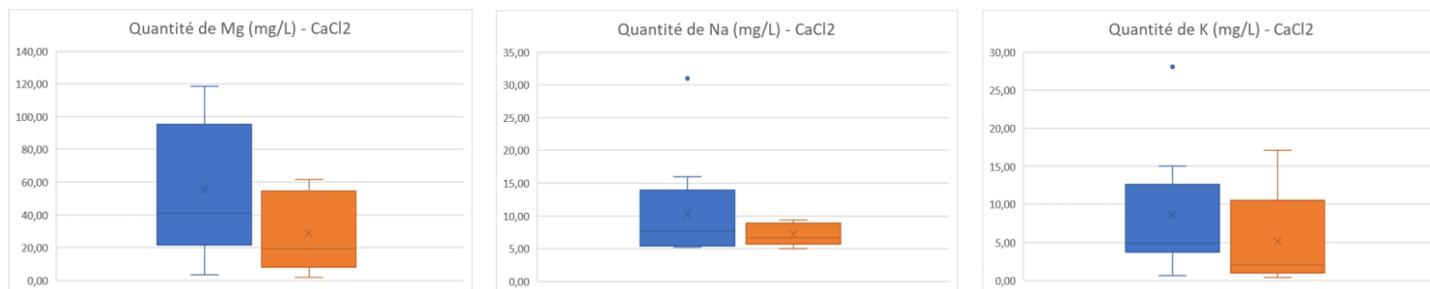


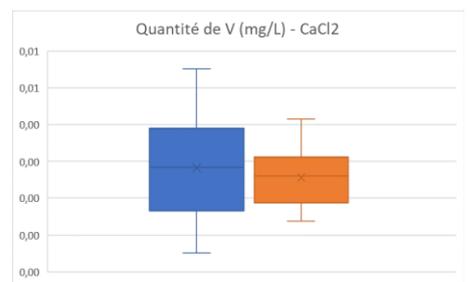
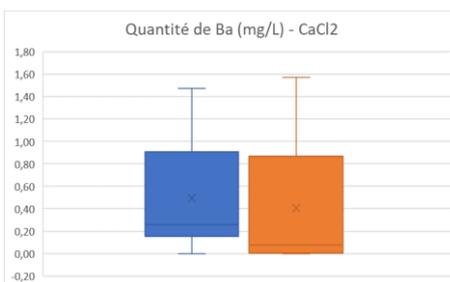
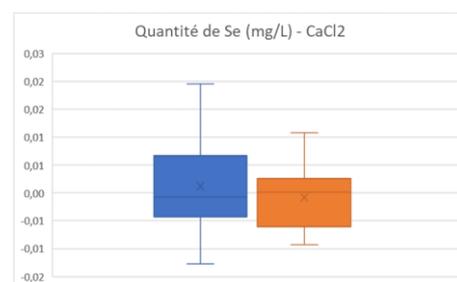
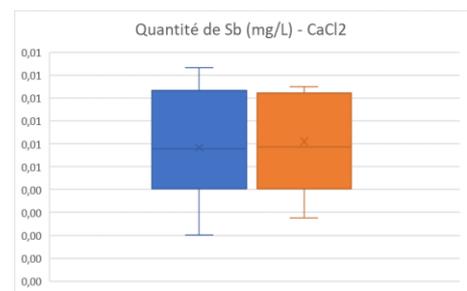
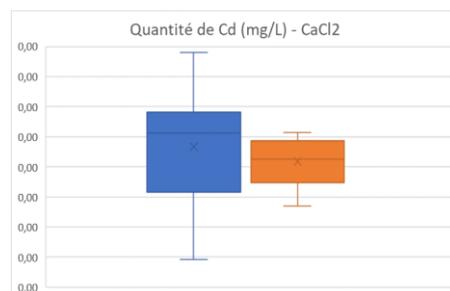
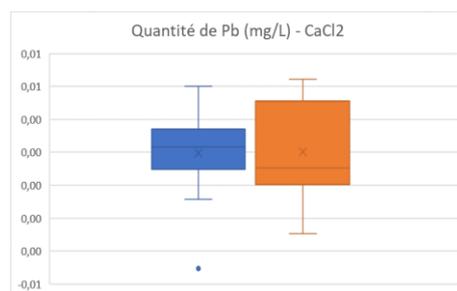
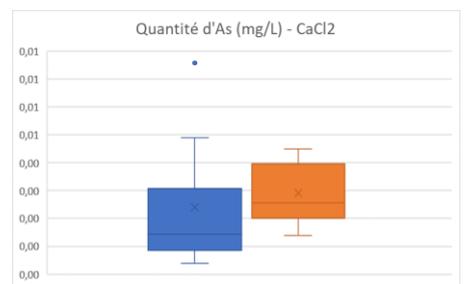
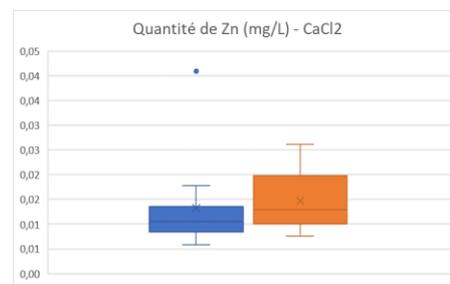
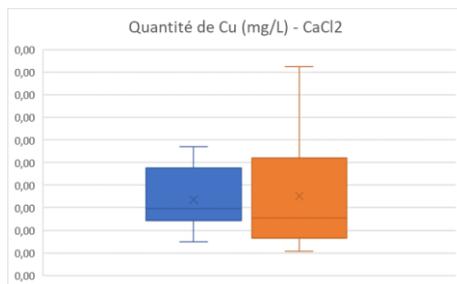
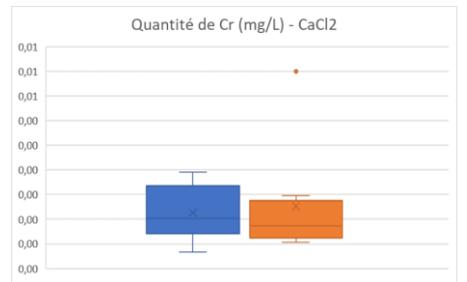
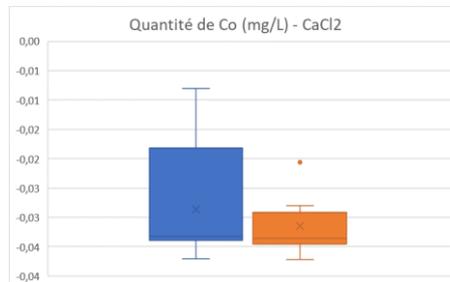
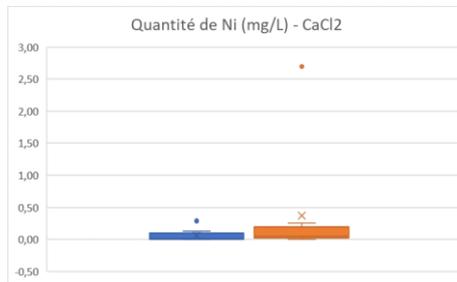
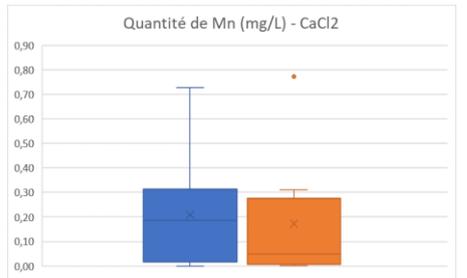
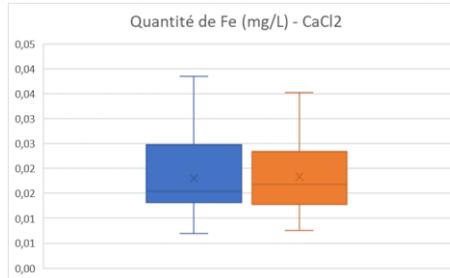
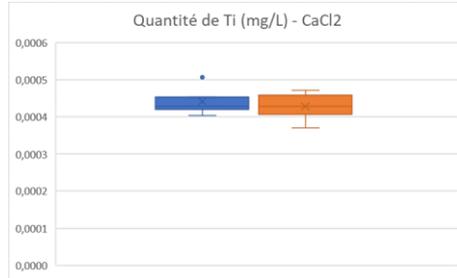
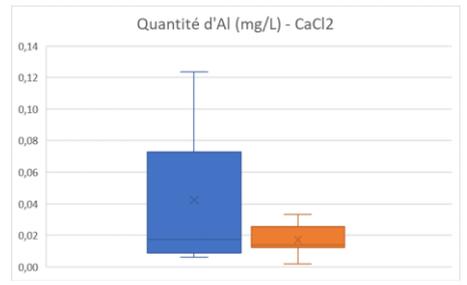
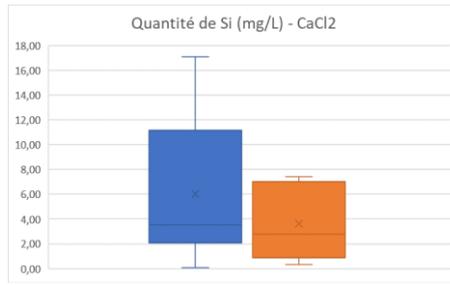
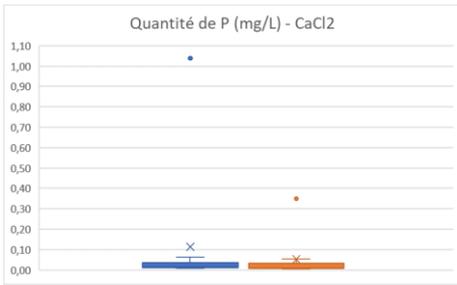
- Fraction biodisponible des éléments des sols – extractions chimiques des métaux grâce à l'EDTA :





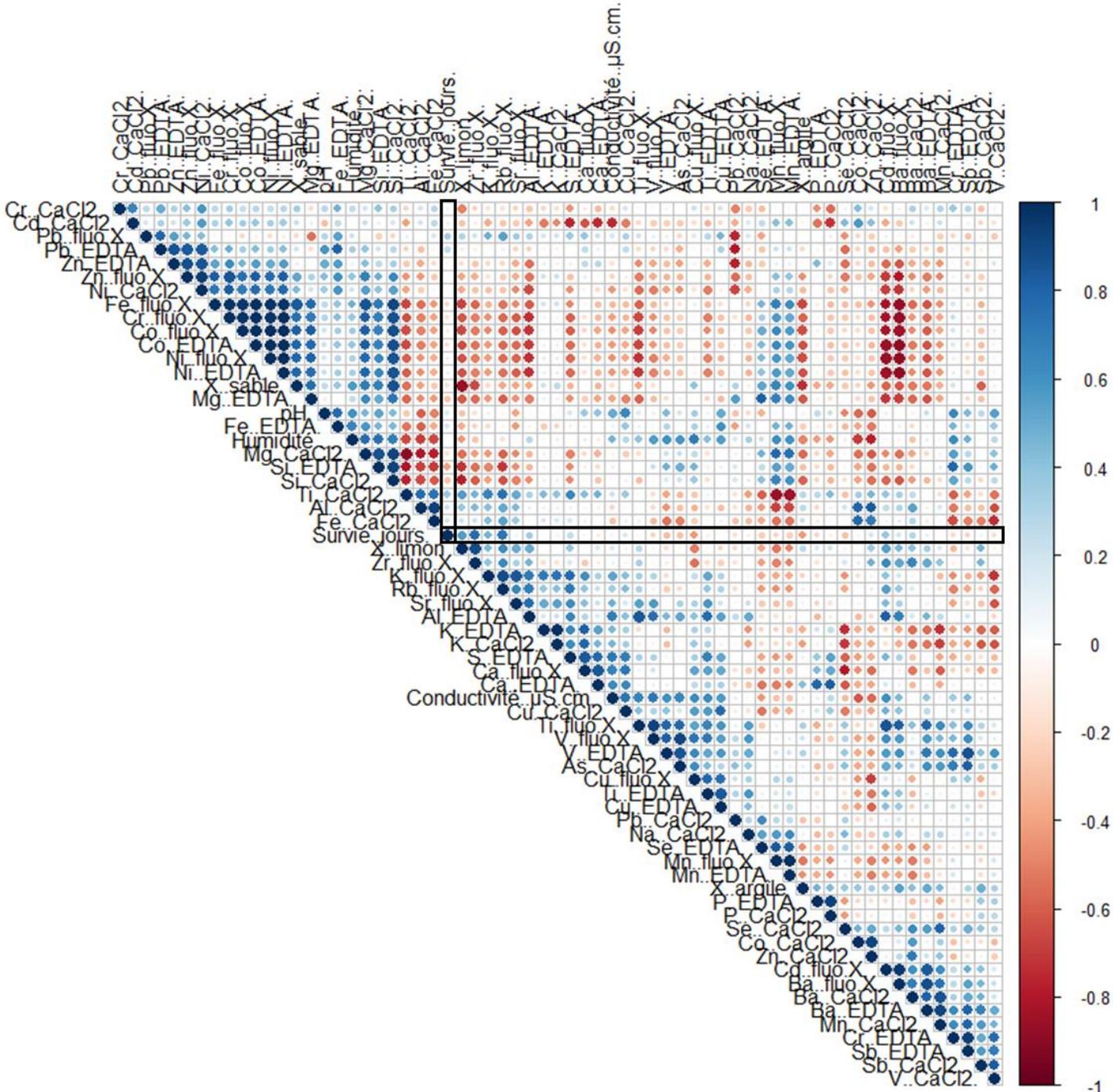
- Fraction mobile des éléments des sols – extractions chimiques des métaux grâce au CaCl_2 :



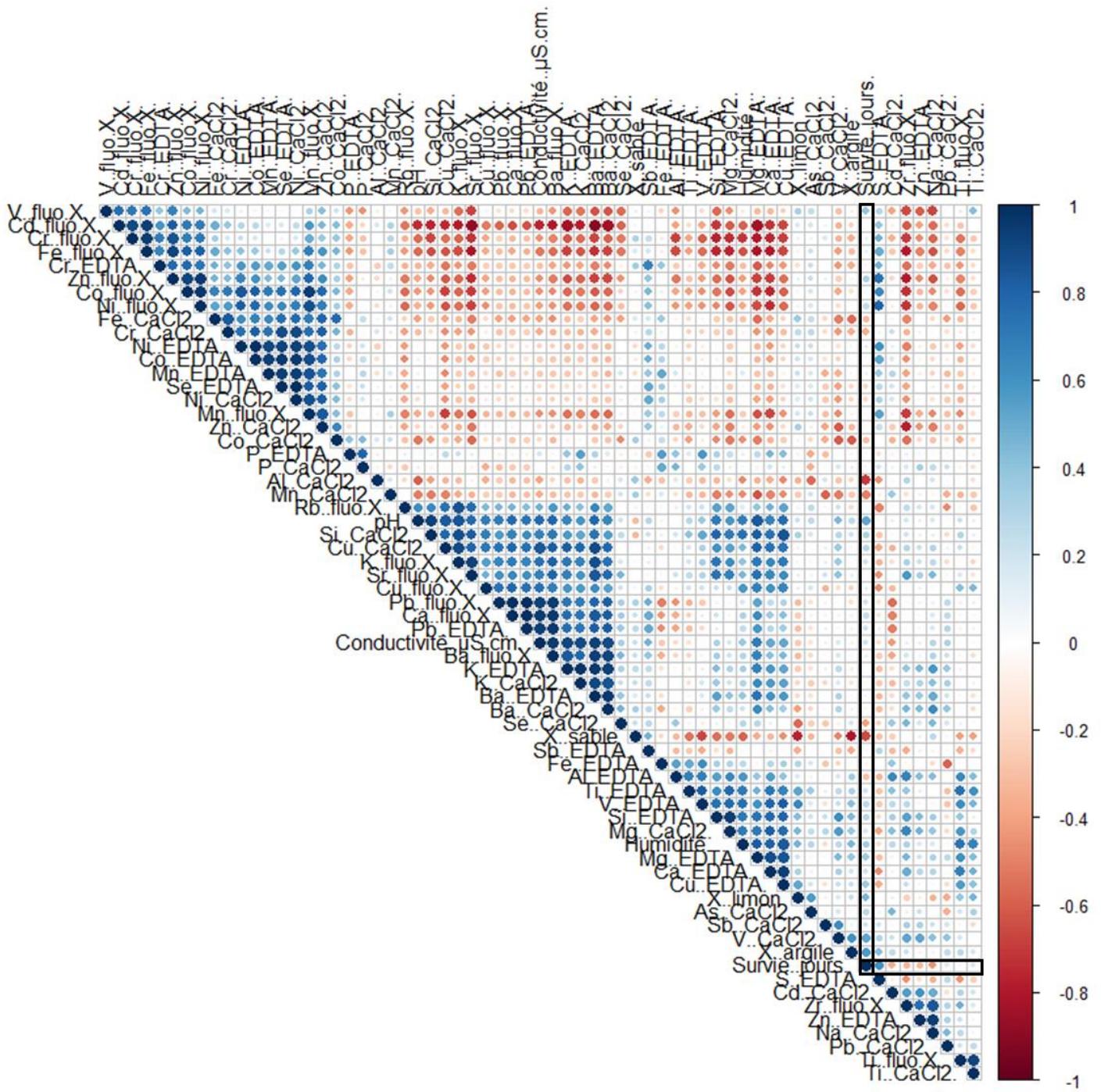


Annexe XIII – Matrices de corrélation entre la survie et l'intégralité des paramètres physico-chimiques mesurés pour la première série de microcosmes (première figure) et pour la deuxième série de microcosmes (deuxième figure)

Les ronds bleus représentent les corrélations positives et les ronds rouges les corrélations négatives. Plus l'intensité de la couleur est forte, plus la corrélation l'est. Les encadrés noirs correspondent aux corrélations du paramètre « Survie » que l'on souhaite expliquer.



Première série de microcosmes



Deuxième série de microcosmes

BIBLIOGRAPHIE

- Adler, Ben, et Alejandro de la Peña Moctezuma. 2010. « Leptospira and Leptospirosis ». *Veterinary Microbiology* 140 (3-4): 287-96. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>.
- AGIER, Caroline. s. d. « Météo Nouvelle-Calédonie - Le phénomène ENSO (El Niño Southern Oscillation) expliqué par notre climatologue Thomas ». Consulté le 14 avril 2021. <http://www.meteo.nc/nouvelle-caledonie/previsions/carte/8-actualites/583-le-phenomene-enso-el-nino-southern-oscillation-explique-par-notre-climatologue-thomas>.
- Barragan, Veronica A., María Eugenia Mejia, Andrés Trávez, Sonia Zapata, Rudy A. Hartskeerl, David A. Haake, et Gabriel A. Trueba. 2011. « Interactions of Leptospira with Environmental Bacteria from Surface Water ». *Current Microbiology* 62 (6): 1802-6. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9931-3>.
- Bierque, Emilie. s. d. « Déterminants écologiques et microbiologiques de la composante environnementale de la leptospirose en Nouvelle-Calédonie », 207.
- Bierque, Emilie, Marie-Estelle Soupé-Gilbert, Roman Thibeaux, Dominique Girault, Linda Guentas, et Cyrille Goarant. 2020. « Leptospira Interrogans Retains Direct Virulence After Long Starvation in Water ». *Current Microbiology* 77 (10): 3035-43. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02128-7>.
- Bierque, Emilie, Roman Thibeaux, Dominique Girault, Marie-Estelle Soupé-Gilbert, et Cyrille Goarant. 2020. « A Systematic Review of Leptospira in Water and Soil Environments ». *PLOS ONE* 15 (1): e0227055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055>.
- Casanovas-Massana, Arnau, Gabriel Ghizzi Pedra, Elsie A. Wunder, Peter J. Diggle, Mike Begon, et Albert I. Ko. 2018a. « Quantification of Leptospira interrogans Survival in Soil and Water Microcosms ». *Applied and Environmental Microbiology* 84 (13). <https://doi.org/10.1128/AEM.00507-18>.
- . 2018b. « Quantification of Leptospira Interrogans Survival in Soil and Water Microcosms ». *Applied and Environmental Microbiology* 84 (13). <https://doi.org/10.1128/AEM.00507-18>.
- Costa, Federico, José E. Hagan, Juan Calcagno, Michael Kane, Paul Torgerson, Martha S. Martinez-Silveira, Claudia Stein, Bernadette Abela-Ridder, et Albert I. Ko. 2015. « Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9 (9): e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>.
- « El Niño et La Niña | Météo-France ». s. d. Consulté le 21 janvier 2021. <https://meteofrance.com/comprendre-climat/monde/el-nino-et-la-nina>.
- Fontana, Célia, Ambroise Lambert, Nadia Benaroudj, David Gasparini, Olivier Gorgette, Nathalie Cachet, Natalia Bomchil, et Mathieu Picardeau. 2016. « Analysis of a Spontaneous Non-Motile and Avirulent Mutant Shows that FliM Is Required for Full Endoflagella Assembly in Leptospira Interrogans ». *PloS One* 11 (4): e0152916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152916>.
- Ganoza, Christian A., Michael A. Matthias, Mayuko Saito, Manuel Cespedes, Eduardo Gotuzzo, et Joseph M. Vinetz. 2010. « Asymptomatic Renal Colonization of Humans in the Peruvian Amazon by Leptospira ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (2): e612. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000612>.
- Goarant, C., S. Laumond-Barny, J. Perez, F. Vernel-Pauillac, S. Chanteau, et A. Guigon. 2009. « Outbreak of Leptospirosis in New Caledonia: Diagnosis Issues and Burden of Disease ». *Tropical Medicine & International Health* 14 (8): 926-29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02310.x>.
- Goarant, Cyrille. 2016. « Leptospirosis: Risk Factors and Management Challenges in Developing Countries ». *Research and Reports in Tropical Medicine*. Dove Press. 28 septembre 2016. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S102543>.
- Guernier, Vanina, Cyrille Goarant, Jackie Benschop, et Colleen L. Lau. 2018. « A Systematic Review of Human and Animal Leptospirosis in the Pacific Islands Reveals Pathogen and Reservoir Diversity ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 12 (5): e0006503. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006503>.

- Guerrier, Gilles, Pauline Hie, Ann-Claire Gourinat, Emilie Huguon, Yann Polfrit, Cyrille Goarant, Eric D'Ortenzio, et Isabelle Missotte. 2013. « Association between Age and Severity to Leptospirosis in Children ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7 (9): e2436. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002436>.
- Inada, R., Y. Ido, R. Hoki, R. Kaneko, et H. Ito. 1916. « THE ETIOLOGY, MODE OF INFECTION, AND SPECIFIC THERAPY OF WEIL'S DISEASE (SPIROCHAETOSIS ICTEROHAEMORRHAGICA) ». *The Journal of Experimental Medicine* 23 (3): 377-402. <https://doi.org/10.1084/jem.23.3.377>.
- « ISEE - Recensement ». s. d. Consulté le 1 avril 2021. <https://www.isee.nc/population/recensement>.
- Jourand, Philippe, Marc Ducouso, Clarisse Loulergue-Majorel, Laure Hannibal, Sylvain Santoni, Yves Prin, et Michel Lebrun. 2010. « Ultramafic soils from New Caledonia structure *Pisolithus albus* in ecotype ». *FEMS Microbiology Ecology* 72 (2): 238-49. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00843.x>.
- Keith Meldahl. 2011. *El Nino - La Nina*. https://www.youtube.com/watch?v=tyPq86yM_Ic.
- Klement-Frutos, Elise, Arnaud Tarantola, Ann-Claire Gourinat, Ludovic Floury, et Cyrille Goarant. 2020. « Age-Specific Epidemiology of Human Leptospirosis in New Caledonia, 2006-2016 ». *PLOS ONE* 15 (11): e0242886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242886>.
- Ko, Albert I., Cyrille Goarant, et Mathieu Picardeau. 2009. « Leptospira : The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen ». *Nature Reviews Microbiology* 7 (10): 736-47. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2208>.
- « La leptospirose | Direction des Affaires Sanitaires et Sociales de Nouvelle-Calédonie ». s. d. Consulté le 21 mai 2021. <https://dass.gouv.nc/votre-sante-maladies/la-leptospirose>.
- « Leptospirose ». 2015. Institut Pasteur. 6 octobre 2015. <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/leptospirose>.
- « Les climats en outre-mer | Météo-France ». s. d. Consulté le 14 avril 2021. <https://meteofrance.com/comprendre-climat/france/les-climats-en-outre-mer>.
- Levett, Paul N. 2001. « Leptospirosis ». *Clinical Microbiology Reviews* 14 (2): 296-326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>.
- . 2015. « Systematics of Leptospiraceae ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 387: 11-20. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_2.
- Perez, Julie, Fabrice Brescia, Jérôme Becam, Carine Mauron, et Cyrille Goarant. 2011. « Rodent Abundance Dynamics and Leptospirosis Carriage in an Area of Hyper-Endemicity in New Caledonia ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 5 (10): e1361. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001361>.
- Picardeau, Mathieu. 2017. « Virulence of the Zoonotic Agent of Leptospirosis: Still Terra Incognita? ». *Nature Reviews. Microbiology* 15 (5): 297-307. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>.
- Postic, Danièle, Fabrice Merien, Philippe Perolat, et Guy Baranton. 2000. *Diagnostic biologique leptospirose - borréliose de Lyme*. Institut Pasteur. Collection des laboratoires de Référence et d'Expertise. Pages 31 à 66.
- Ristow, Paula. 2007. « La leptospirose : Les défis actuels d'une ancienne maladie ». *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, n° 2: 267. <https://doi.org/10.4267/2042/47896>.
- Stoddard, Robyn A., Jay E. Gee, Patricia P. Wilkins, Karen McCaustland, et Alex R. Hoffmaster. 2009. « Detection of Pathogenic *Leptospira* Spp. through TaqMan Polymerase Chain Reaction Targeting the LipL32 Gene ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 64 (3): 247-55. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014>.
- Thibeaux, Roman, Dominique Girault, Emilie Bierque, Marie-Estelle Soupé-Gilbert, Anna Rettinger, Anthony Douyère, Michael Meyer, Gregorio Iraola, Mathieu Picardeau, et Cyrille Goarant. 2018. « Biodiversity of Environmental *Leptospira*: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis ». *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816>.
- Thibeaux, Roman, Gregorio Iraola, Ignacio Ferrés, Emilie Bierque, Dominique Girault, Marie-Estelle Soupé-Gilbert, Mathieu Picardeau, et Cyrille YR 2018 Goarant. s. d. « Deciphering the unexplored *Leptospira* diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence ». *Microbial Genomics* 4 (1): e000144. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144>.
- Tubiana, Sarah, Marc Mikulski, Jérôme Becam, Flore Lacassin, Patrick Lefèvre, Ann-Claire Gourinat, Cyrille Goarant, et Eric D'Ortenzio. 2013. « Risk Factors and Predictors of Severe Leptospirosis

- in New Caledonia ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7 (1): e1991. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001991>.
- Vincent, Antony T., Olivier Schiettekatte, Cyrille Goarant, Vasantha Kumari Neela, Eve Bernet, Roman Thibeaux, Nabilah Ismail, et al. 2019. « Revisiting the Taxonomy and Evolution of Pathogenicity of the Genus *Leptospira* through the Prism of Genomics ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13 (5): e0007270. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>.
- Vinod Kumar, K., Chandan Lall, R. Vimal Raj, K. Vedhagiri, et P. Vijayachari. 2015. « Coexistence and survival of pathogenic leptospire by formation of biofilm with *Azospirillum* ». *FEMS Microbiology Ecology* 91 (fiv051). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv051>.
- Wang, Sicong, Megan A. Stobart Gallagher, et Noel Dunn. 2020. « Leptospirosis ». In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441858/>.
- Wang, Yanzhuo, Xuran Zhuang, Yi Zhong, Cuicai Zhang, Yan Zhang, Lingbing Zeng, Yongzhang Zhu, et al. 2015. « Distribution of Plasmids in Distinct *Leptospira* Pathogenic Species ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9 (11): e0004220. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004220>.
- Weinberger, Daniel, Noémie Baroux, Jean-Paul Grangeon, Albert I. Ko, et Cyrille Goarant. 2014. « El Niño Southern Oscillation and Leptospirosis Outbreaks in New Caledonia ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8 (4): e2798. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002798>.
- Wolbach, S. B., et C. A. L. Binger. 1914. « Notes on a filterable Spirochete from fresh Water. *Spirocheta biflexa* (new Species) ». *The Journal of Medical Research* 30 (1): 23-26.1.

RESUME EN FRANÇAIS

La leptospirose est une maladie bactérienne zoonotique dont l'incidence est élevée dans les îles du Pacifique, en particulier en Nouvelle-Calédonie. Cette maladie peut se transmettre par contact direct avec des urines ou des tissus de mammifères infectés, mais le mode de transmission principal se fait de manière indirecte, *via* l'environnement. En effet, les eaux et les sols constituent un réservoir important des leptospires en leur permettant d'y survivre. Afin de mieux comprendre les mécanismes de survie des leptospires dans l'environnement, des microcosmes de sols sur 20 prélèvements sur la Grande Terre de Nouvelle-Calédonie ont été réalisés. La cinétique de survie des leptospires a été quantifiée au cours du temps et a montré des différences de survie relativement marquées entre les différents sols. En parallèle, des analyses physico-chimiques de ces 20 sols ont été réalisées afin de déterminer les paramètres permettant une meilleure survie. Les résultats ont montré des corrélations significatives positives entre la survie et la quantité totale de rubidium et de zirconium pour une partie des sols. Pour une autre partie des sols, les résultats ont montré des corrélations significatives positives entre la survie et la quantité de soufre biodisponible dans les sols, ainsi que des corrélations significatives négatives entre la survie et la quantité mobile d'aluminium et entre la survie et la quantité de particules de sable dans les sols. Il n'a cependant pas été possible de conclure quant à l'impact d'une concentration totale des éléments chimiques ou d'une fraction extraite sur la survie des leptospires. Des tendances sont également ressorties concernant le lien entre la survie des leptospires et un pH du sol neutre à légèrement alcalin. Par ailleurs, les quantifications des leptospires présents naturellement dans les sols ont montré qu'environ 40 % des sols échantillonnés présentaient des leptospires pathogènes, qui n'ont cependant pas été identifiés.

Mots-clés : **Leptospirose – Leptospores pathogènes – Sols – Nouvelle-Calédonie – Microcosmes – Environnement**

ABSTRACT IN ENGLISH

Leptospirosis is a zoonotic bacterial disease with a high incidence in the Pacific islands, especially in New-Caledonia. This disease is transmitted by direct contact with urines or tissues from infected mammals, but the main transmission route is by indirect contact with the environment. Indeed, freshwater and soil are an important reservoir of leptospires, allowing their survival. To better understand the mechanisms of survival of leptospires in the environment, soil microcosms of 20 samples taken on the Grande Terre of New Caledonia have been studied. Survival kinetic of leptospires has been quantified during several weeks and showed important differences of survival between the soils. At the same time, chemico-physical analysis of these 20 soil samples have been realized to determine the parameters which allow a better survival. Results showed significant positive correlations between survival of leptospires and the total quantity of rubidium and zirconium for a part of the soils. For the other part, results showed significant positive correlations between survival and the quantity of bioavailable sulfur in the soils, and significant negative correlations between survival and quantity of exchangeable aluminum and between survival and the proportion of sand in the soils. However, it was not possible to conclude about the impact of a total concentration of chemical elements or an extracted fraction of these elements on the survival of leptospires. Tendencies have been showed about the link between survival of leptospires and a soil of neutral to alkaline pH. Moreover, quantifications of leptospires naturally present in the soils showed that around 40 % of the soils contained pathogenic leptospires, not identified during this study.

Key words : **Leptospirosis – Pathogenic leptospires – Soils – New-Caledonia – Microcosms – Environment**