

Master GIMAT (M2) Gestion Intégrée des Maladies Animales Tropicales

Écologie et caractérisation de l'infection par *Leptospira* en populations de mammifères sauvages issues de sites d'élevage de ruminants : enquête de terrain en région Rhône-Alpes, France, de 2018 à 2020.

Rapport de stage :

Présenté par : *Rebecca Her*

Tuteurs : Laurent Crespin⁽¹⁾ et Gauthier Dobigny⁽²⁾
Co-tuteurs : Florence Ayrat⁽³⁾ et Julien Cappelle^(1,4)

Période de stage : du 15/01/ 2020 au 15/06/2020
Soutenance le 10 juin 2020

(1) INRAE, UMR INRAE-VetAgro Sup Epidémiologie des maladies animales et zoonotiques, Marcy-L'Étoile.

(2) UMR CBGP (IRD, Cirad, INRAE et Montpellier Sup-Agro), Laboratoire de biologie appliquée, Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Université d'Abomey-Calavi.

(3) INRAE, VetAgro Sup, USC 1233, Rongeurs sauvages, Risques Sanitaires et Gestion des populations, Marcy L'Étoile.

(4) UMR ASTRE, CIRAD, INRAE, F-34398, Montpellier, France.

Remerciements

A Gauthier Dobigny, Laurent Crespin, Julien Cappelle et Florence Ayral,
encadrants de stage et d'étude
pour leur patience, explications et conseils, au cours de ce projet.

A Angeli Kodjo, Marine Le Guyader et Zorée Djelouadji
Du laboratoire d'Analyses Vétérinaires de Macy-l'Etoile
pour m'avoir accueillie et formée au sein du Laboratoire de VetagroSup.

A Sébastien Massegla, *de l'unité EPIA de l'INRAe,*
pour avoir réalisé l'identification génétique des petits mammifères capturés.

A Mr.Grael et Mr.Colcombet,
pour votre implication et votre disponibilité dans ce projet.

Aux professeurs Gualbert Houemenou et Youssao, et toute l'équipe
Du laboratoire de l'Université d'Abomey-Calavi,
pour m'avoir accueillie et accompagnée dans ce projet au Bénin.

A Nadine et Adrian
Du Centre de Lutte contre le Paludisme du Bénin
pour l'aide technique apportée.

Au **Docteur Matthieu Dossou** *directeur de l'abattoir de Cotonou,* ainsi que ses employés,
pour avoir aidé au bon déroulement des nuits de prélèvements à l'abattoir.

Aux éleveurs de Ladjji et à Matthias qui a établi le contact et facilité les échanges,
pour m'avoir fait confiance lors des prélèvements sur leurs animaux.

A François Bride, *directeur de la Fédération de Chasse de Rhône-Alpes,*
pour avoir participé à ce projet et pour m'avoir donné accès à une formation de piégeage.

Aux associations de piégeurs de Lentilly, Sourcieux-les-Mines et Bully : les Associations
Communales de Chasse de Bully, l'association communale de chasse de Lentilly et de
Sourcieux-les-Mines, et l'association particulière du Poirier et Tronchyl à Lentilly,
pour leur participation à ce projet.

Aux étudiants de VetAgro Sup
pour leur aide lors des sessions de capture.

Je remercie enfin les encadrants et responsables du Master, pour cette année riche
d'enseignements, et plus particulièrement **Mr Sicard** et **Mr Corbière** pour leur aide
précieuse.

Avant-propos lié à l'épidémie de Coronavirus

La pandémie de COVID-19 et le confinement qui s'en est suivi ont entravé le déroulement du projet sur l'épidémiologie de la leptospirose animale. Le projet est articulé en deux volets, l'un en zone de forte incidence (Bénin) et l'autre en zone de faible incidence (France). Les activités de recherche au Laboratoire d'Analyses Vétérinaires de Marcy l'Etoile et au centre INRAE de Theix ont été suspendues à partir du 16 mars 2020 et ont eu des conséquences majeures sur l'avancée du volet « Bénin » et limitées sur le volet « France ».

L'arrêt des activités de laboratoire n'a pas permis la finalisation de la partie analytique sur l'échantillonnage des animaux de production collectés au Bénin, en particulier les étapes de PCR sur 116 échantillons de rein (nombre total 116) et de tests sérologiques à partir de 257 prélèvements de sang (nombre total 257). L'objet de ce volet étant de décrire le statut infectieux d'animaux de production au Bénin, il ne sera pas développé dans le présent rapport.

Le volet de l'étude qui porte sur la faune sauvage en France, a démarré en 2018 et a donc été avancé en amont du confinement cependant, l'analyse des échantillons collectés en mars 2020 n'a pas été finalisée, en particulier les PCR sur les tissus issus de 8 petits mammifères parmi un nombre total de 183 individus, les PCR sur les tissus issus de 9 fouines et ragondins parmi un nombre total de 46 individus et 22 demandes de séquençage sur un nombre de 37 PCR positives. L'identification génétique des espèces de petits mammifères collectés dans cette étude n'a également pas été finalisée. Le travail de Master s'est donc centré sur ce volet en adaptant toutefois les objectifs en fonction de l'avancée et des résultats à disposition. L'analyse des données du volet « France » a pu être réalisée, bien que certaines données pourraient venir compléter cette analyse (séquençage VNTR des ADN de *Leptospira* extraits, identification génétique des petits mammifères capturés).

En termes de travail personnel, j'ai eu la chance d'avoir une expérience sur le terrain et de participer à ce projet tôt, en amont du stage de Master. Depuis mai 2018, j'ai réalisé quatre sessions de capture de petits mammifères en autonomie, et ai été aidée sur quatre autres par des étudiants en Enseignement Personnalisé sur l'Etude des populations de petits mammifères, dispensé à Vetagro Sup campus vétérinaire, et par mes encadrants. J'étais en contact régulier avec les deux éleveurs impliqués dans l'étude afin de disposer d'une pâture dans chaque site et à chaque saison, j'étais en charge de la préparation du matériel (80 pièges, nourriture, équipement de protection individuel, traçage des plans de capture, balisage), de la mise en place du plan de capture et de l'organisation des relevés des étudiants lorsqu'ils étaient impliqués (plannings, relevé des informations et organisation du matériel). J'ai manipulé, sacrifié et autopsié et prélevé la majorité des individus capturés. J'ai réalisé les extractions et les PCR des quatre dernières sessions. Au-delà du travail d'analyse et d'interprétation, j'ai donc produit une large part des résultats présentés dans ce mémoire.

Concernant le volet « Bénin », j'ai eu la possibilité de réaliser l'échantillonnage de bovins, petits ruminants et porcs à l'abattoir de Cotonou (reins et sérums) et de prélever les mêmes espèces (sérums) auprès de différents élevages dans un quartier périphérique de Cotonou, sous l'encadrement de Gauthier Dobigny. J'ai pu réaliser les extractions ADN de ces échantillons de retour en France. Les analyses PCR de ces extraits et les analyses MAT des sérums sont en attente, l'analyse de données n'a donc pas pu être réalisée pour l'instant.

Table des matières

Table des figures	6
Table des tableaux	7
Table des annexes.....	8
Liste des abréviations	10
I. Introduction	11
II. Synthèse bibliographique.....	13
A. Leptospires et leptospirose	13
1- Phylum et classification des leptospires	13
<i>a - Classification sérologique</i>	<i>13</i>
<i>b - Classification moléculaire</i>	<i>13</i>
2- Méthodes de détection des leptospires.....	14
<i>a - Méthodes de détection indirecte : présentation de la MAT</i>	<i>14</i>
<i>b - Méthode de détection directe : présentation des méthodes PCR.....</i>	<i>14</i>
<i>c - Technique de séquençage : présentation du typage VNTR.....</i>	<i>15</i>
B. L'interface leptospires – bovins - animaux sauvages	15
1- Excrétion de leptospires par les hôtes réservoirs	15
2- Maintien des leptospires dans l'environnement.....	16
3- Voies de transmission aux bovins et facteurs de risque en élevage.....	16
4- Souches de <i>Leptospira</i> identifiées en élevages bovins.....	17
C. Le réservoir faune sauvage.....	18
1- Description du portage rénal par la faune sauvage.....	18
2- Souches identifiées par espèces de la faune sauvage.....	19
3- Ecologie des espèces en contact avec les élevages bovins	21
<i>a - Identification des espèces en contact avec les élevages bovins</i>	<i>21</i>
<i>b - Comportement et niche écologique de ces espèces.....</i>	<i>21</i>
III. Matériel et méthode.....	22
A. Etudes de terrain	22
1- Ethique.....	22
2- Sites d'échantillonnage et collecte d'échantillons	22
3- Captures et prélèvements	22
<i>a - Cas des petits mammifères.....</i>	<i>22</i>
<i>b - Cas des fouines et ragondins</i>	<i>23</i>
4- Définition d'un individu infecté	24
5- Analyses moléculaires	24
B. Etude descriptive	25
1- Description de l'échantillonnage	25
<i>a - Paramètres descriptifs de l'échantillonnage</i>	<i>25</i>
<i>b - Proportions d'individus infectés observées</i>	<i>25</i>
2- Cartographie des sites de piégeage	25
C. Etude analytique.....	26

1-	Modèles de régression logistique.....	26
a -	<i>Définition des variables : variable réponse et variables explicatives.....</i>	26
b -	<i>Régressions logistiques de Firth.....</i>	26
2-	Sélection de modèle sur AICc	26
a -	<i>Hypothèses de départ.....</i>	26
b -	<i>Choix d'un classement sur AICc.....</i>	27
c -	<i>Evaluation des modèles sur critères graphiques</i>	27
3-	Estimations prédites par un modèle de régression logistique	28
4-	Inférence multimodèle	28
a -	<i>Principe de l'inférence multimodèle.....</i>	28
b -	<i>Estimations par inférence multimodèle.....</i>	28
c -	<i>Calcul d'incertitude relative à l'inférence multimodèle</i>	28
IV.	Résultats	29
A.	Étude descriptive	29
1-	Description de la population d'échantillonnage	29
a -	<i>Échantillonnage de petits mammifères</i>	29
b -	<i>Échantillonnage de fouines et ragondins.....</i>	30
2-	Distribution des individus infectés	30
a -	<i>Cas des petits mammifères.....</i>	30
b -	<i>Cas des fouines et ragondins</i>	32
3-	Distribution spatiale des piégeages.....	32
B.	Étude analytique.....	33
1-	Sélection de modèle sur AICc	33
a -	<i>Établissement d'un ensemble de modèles</i>	33
b -	<i>Sélection de modèle sur AICc</i>	34
c -	<i>Critères d'évaluation graphiques du modèle sélectionné.....</i>	34
d -	<i>Estimations du modèle « Sexe*Saison »</i>	35
2-	Inférence multimodèle	36
a -	<i>Justification de l'inférence multimodèle.....</i>	36
b -	<i>Estimations des proportions d'individus positifs</i>	36
c -	<i>Calcul d'incertitude relative à l'inférence multimodèle</i>	36
d -	<i>Comparaison des résultats du meilleur modèle de régression logistique avec ceux de l'inférence multimodèle</i>	37
V.	Discussion	38
VI.	Conclusion	41
	Bibliographie	42
	Annexes.....	47
	Résumé.....	68

Table des figures

Figure 1. Illustration de l'interface étudiée : place de la faune sauvage en environnement d'élevage bovin dans le cycle épidémiologique des leptospires.	12
Figure 2. Sérogroupes identifiés en élevages bovins en France (Ayrat, 2016 ; Gazso, 2017 ; Delaborde, 2019).....	18
Figure 3. Taux de portage rénal par espèces de la faune sauvage en France (*: <i>Castor fiber</i> , <i>Glis glis</i> , <i>Marmota Spermophilus</i>).....	19
Figure 4. Souches identifiées dans la faune sauvage en France (*: <i>Microtus Arvalis</i> , <i>Microtus agrestis</i> , <i>Myodes glareolus</i> , <i>Apodemus flavicollis</i> , <i>Sorex araneus</i>)	20
Figure 5. Répartition par espèces des petits mammifères capturés sur les pâtures (A = site A, B = site B, 1 à 8 correspond aux numéros de sessions).....	29
Figure 6. Proportions d'individus infectés par espèces par session	30
Figure 7. Proportions d'individus infectés par sexe au cours des saisons	31
Figure 8. Distribution des sérovars identifiés par VNTR, par espèces de petits mammifères	31
Figure 9. Représentation cartographique des sites de captures de petits mammifères par des diagrammes (taille relative à celle de l'échantillon): nombre d'individus infectés et nombre d'individus non infectés (CLC 2018).....	33
Figure 10. Graphique des résidus standardisés de déviance en fonction des valeurs attendues par le modèle «Sexe*Saison».....	34
Figure 12. Graphique des distances de Cook en fonction du leverage pour le modèle «Sexe*Saison»	35
Figure 13. Estimations des probabilités d'infection par sexe et saison par le modèle de régression logistique de Firth « Sexe*Saison » issu de la sélection sous AICc.....	36
Figure 14. Représentation graphique des estimations issues de l'inférence multimodèle pour le stade de maturité sexuelle immature	37

Table des tableaux

Tableau 1. Principales leptospires pathogènes identifiées en France, d'après la classification sérologique (Levett, 2001 ; Kodjo, 2017)	13
Tableau 2. Sex ratio des petits mammifères par session de capture	29
Tableau 3. Répartition des individus capturés par les associations de piégeurs par espèces et communes	30
Tableau 4. Proportions d'individus infectés observées par espèce, sexe et stade de maturité.....	32

Table des annexes

Annexe 1. Distribution spatiale des sites d'étude : résultats sur les élevages bovins (négatif, séro groupe Australis, séro groupe Sejroe), numéros d'individus fouines et ragondins, sites de captures de petits mammifères (CLC 2012, Eu Rivières 2015)	47
Annexe 2. Caractéristiques macroscopiques et biologiques par genres de petits mammifères capturés (Quéré, Le Louarn, 2011)	48
Annexe 3. Caractéristiques biologiques et comportementales des espèces de l'étude (Quéré, Le Louarn, 2011).....	48
Annexe 4. Exemple de pose de pièges pour la session de captures numéro 4 au site A	49
Annexe 5. Exemple de pose de pièges pour la session de captures numéro 4 au site B.....	49
Annexe 6. Proportions d'individus infectés observées par espèces de petits mammifères (x=nombre d'individus infectés, n=nombre de captures).....	50
Annexe 7. Proportions d'individus infectés observées par sexe des petits mammifères (x=nombre d'individus infectés, n=nombre de captures).....	51
Annexe 8. Proportions d'individus infectés observées par stade de maturité sexuelle sur les petits mammifères (x=nombre d'individus infectés, n=nombre de captures)	52
Annexe 9. Définition du critère d'AICc	52
Annexe 10. Formule de la fonction de lien logit	53
Annexe 11. Formule de la variance inconditionnelle associée à chaque estimation de l'inférence multimodèle	53
Annexe 12. Sex ratio des petits mammifères capturés au cours des sessions	53
Annexe 13. Proportions de petits mammifères infectés par stade de maturité et session.....	54
Annexe 14. Proportions de petits mammifères infectés observées par sexe au cours des sessions.....	54
Annexe 15. Représentation cartographique des sites de piégeages de fouines et ragondins et de la distribution spatiale des individus infectés (CLC 2018).....	55
Annexe 16. Typologies des pâtures utilisées pour les captures de petits mammifères	56
Annexe 17. Répartition des typologies des sites de capture (CLC 2018) sur les sites A et B	56
Annexe 18. Typologies des sites de captures de fouines et ragondins (CLC 2018).....	57
Annexe 19. Répartition des typologies des sites de piégeages de fouines et ragondins entre les 3 communes de piégeage (CLC 2018).....	58

Annexe 20. Sélection par AICc à partir d'un ensemble de 19 modèles de régression logistique à réduction de biais (régressions logistiques de Firth)	59
Annexe 21. Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs attendues par le modèle de régression logistique de Firth « Sexe*Saison »	60
Annexe 22. Graphique des résidus de déviance standardisés en fonction de l'ordre d'apparition des observations pour le modèle de régression logistique de Firth « Sexe*Saison »	60
Annexe 23. Courbe ROC du modèle de régression logistique de Firth « Sexe*Saison »	61
Annexe 24. Estimations des proportions d'individus infectés attendues par le modèle de régression logistique de Firth « Sexe*Saison ».....	61
Annexe 25. Estimations issues de l'inférence multimodèle (cr= crocidure, ca=campagnol, mul=mulot ; imm=immature, mat=mature ; A=site A, B=site B)	63
Annexe 26. Distribution du pourcentage d'incertitude lié à la sélection de modèles de l'inférence multimodèle	63
Annexe 27. Exemple de modalités à pourcentages d'incertitude élevés sur les estimations issues de l'inférence multimodèle.....	64
Annexe 28. Représentation graphique des estimations issues de l'inférence multimodèle.....	64
Annexe 29. Extraits du script utilisé dans le logiciel R 3.6.3 : sélection de modèles, exemple de calcul d'estimation par inférence multimodèle, exemple de calcul de l'erreur standard de l'estimation issue de l'inférence multimodèle	67

Liste des abréviations

AICc	Critère d'Information d' Akaike avec correction pour les petits effectifs
ADN	Acide désoxyribonucléique
ATU	Autorisation Temporaire d'Utilisation
AUS	Australis (séro groupe)
BRAT	Bratislava (séro groupe)
CLC	<i>Corine Land Cover</i>
CNR	Centre National de Référence
DGAL	Direction Générale de l'Alimentation
EJMH	Ellinghausen et. McCullough modifié par Johnson et Harris (milieu de culture)
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
g	grammes
IgG	Immunoglobulines de type G (anticorps)
IgM	Immunoglobulines de type M (anticorps)
INRAe	Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement
Km	kilomètres
LNR	Laboratoire National de Référence
MAT	<i>Microscopic Agglutination Test</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OIE	Organisation mondiale de la santé animale
Vetagro Sup Lyon	Ecole vétérinaire de Lyon
UV	Rayonnements ultra-violet
°C	Degrés Celsius

I. Introduction

La leptospirose est une maladie zoonotique aux conséquences majeures sur la santé publique. Chaque année, près de 500 000 cas sévères, parmi 1.03 millions de cas recensés, sont enregistrés à l'échelle mondiale, avec un taux de mortalité de 5 à 20%, soit un nombre de décès dus à la leptospirose estimé à 58 900 par an. (Levett, 2001). Des formes graves, d'hémorragies pulmonaires et rénales, aggravent le pronostic de cette maladie (Bharti et al., 2003). Cette zoonose est causée par des bactéries du genre *Leptospira*. Elle est associée à une épidémiologie complexe car les espèces animales hôtes sont multiples et la transmission a une composante environnementale forte (Bharti et al., 2003). Les animaux domestiques et en particulier les ruminants et porcins peuvent être hôtes de *Leptospira*. L'activité en élevage est un contexte favorable à la transmission de leptospires entre les animaux domestiques et l'homme (Abadia G., 2005). L'infection en élevage est, de plus, associée à des pertes économiques non négligeables pour l'éleveur (Ayrat F., 2013). Réduire les infections des ruminants permettrait donc de réduire le risque des cas humains acquis en élevage et de réduire les pertes économiques. Plusieurs alternatives existent pour prévenir l'infection par les leptospires en élevage, les mesures sanitaires visant la réduction de l'exposition des bovins doivent pouvoir s'appuyer sur la connaissance des populations hôtes infectées en interaction avec ce milieu. En effet, une meilleure connaissance des caractéristiques du portage de leptospires en populations hôtes permettra *in fine* de proposer des modes de conduite des troupeaux raisonnés pour réduire le risque d'exposition des bovins.

Un écosystème est l'ensemble des interactions entre les êtres vivants au sein d'un milieu spécifique. Au sein de l'écosystème, ici constitué d'élevages bovins en région tempérée, il existe une multitude d'interfaces c'est-à-dire des zones de contact entre plusieurs espaces différenciés engendrant des dynamiques d'échange entre ces espaces. Etudier les leptospires à l'interface entre les bovins, la faune sauvage et leur environnement permet donc une description holistique de la présence de leptospires dans cet écosystème. Trois pôles caractérisent cette interface, (1) le troupeau bovin, (2) les populations de mammifères sauvages, et (3) la zone de contact, à savoir l'environnement. Ces trois éléments, en interaction, sont représentés dans la figure 1. Un premier volet d'étude ciblant le pôle « troupeau bovin » a été réalisé précédemment (Delaborde, 2019). Le volet présenté dans ce rapport s'intéresse au pôle « faune sauvage » et en particulier à l'écologie de l'infection par les leptospires parmi les populations de mammifères sauvages issues de sites d'élevages bovins. L'écologie de l'infection par les leptospires est ici entendue comme l'étude des liens entre les populations sauvages infectées *vs* non infectées et l'environnement et inclut les caractéristiques des populations infectées *vs* non infectées.

Cette étude entre dans le cadre du projet de travail du Pôle d'Expertise Vétérinaire et Agronomique des Animaux Sauvages (<http://evaas.vetagro-sup.fr/>) (2018 – 2021), lot de travail 1.3 intitulé Plan de surveillance pour la détection précoce de risques d'émergence de maladies infectieuses à partir de réservoirs sauvages : application à la leptospirose des rongeurs. Son financement est principalement issu de la DGAL, de VetAgro Sup et de l'INRAe.

La figure 1 représente les trois pôles de l'interface étudiée et illustre le contexte de l'étude.

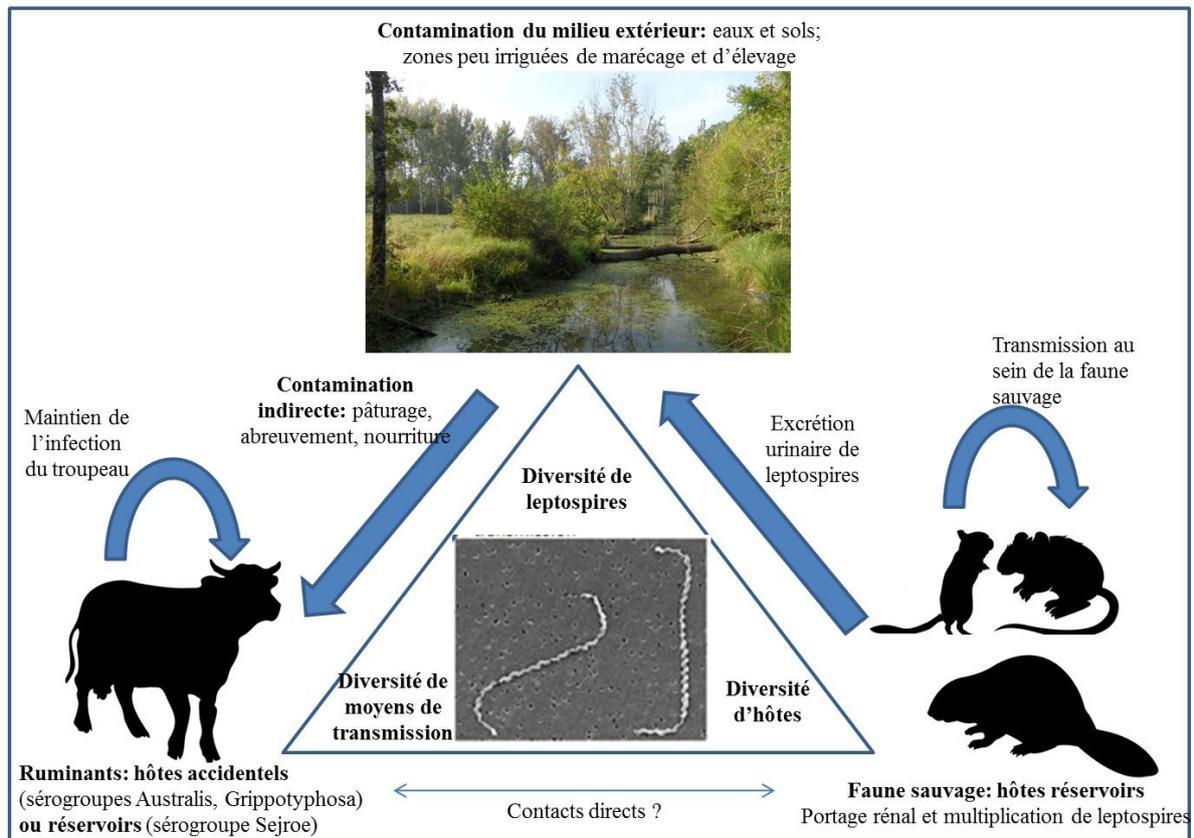


Figure 1. Illustration de l'interface étudiée : place de la faune sauvage en environnement d'élevage bovin dans le cycle épidémiologique des leptospires.

Sources : Ellis, 2005 ; Costa, 2005 ; Adler, 2015 ; Ayrat, 2016 ; Fischer, 2018.
 Crédits photo : Public Health Image Library, ARL riviere-environnement, Vecteezy.com.

La définition d'un hôte réservoir est celle d'un individu capable d'agir comme source naturelle d'infection pour sa propre espèce. Une population réservoir est définie comme une population d'une espèce animale qui agit comme réservoir continu d'infection dans un écosystème spécifique. Nous chercherons à identifier des populations réservoirs parmi les espèces de la faune sauvage. Un hôte accidentel est défini comme un individu qui agit comme une impasse épidémiologique et évolue soit vers la guérison soit vers le décès. Les bovins sont hôtes accidentels de certains sérogroupes (Australis, Grippotyphosa). L'environnement a ici un double rôle de surface de contact commune avec les bovins et les petits mammifères mais aussi de réservoir inerte de leptospires excrétées par les différentes populations infectées.

II. Synthèse bibliographique

A. Leptospires et leptospirose

1- Phylum et classification des leptospires

Les leptospires sont des bactéries de l'ordre des Spirochetales, de la famille Leptospiraceae, et du genre *Leptospira*. Deux méthodes de classification existent aujourd'hui, la classification sérologique et la classification moléculaire. Nous allons en développer les principes et usages.

a - Classification sérologique

Il existe une très grande variabilité antigénique au sein du genre *Leptospira* (Levett, 2015). Pour distinguer les différents éléments de ce genre, une classification sérologique des leptospires a été établie. Cette classification repose sur la détection d'anticorps agglutinants induits par les antigènes de leptospires. Un sérovar correspond à une entité possédant une unité antigénique. Certains groupes de sérovans possèdent entre eux une communauté antigénique forte. Ces groupes à déterminants antigéniques communs sont qualifiés de sérogroupes. Aujourd'hui plus de 300 sérovans sont décrits, parmi 25 sérogroupes (Levett, 2015).

La classification sérologique est employée en épidémiologie et en clinique. L'information du séro groupe et/ou du sérovar peut donner une indication de la source bactérienne et constitue un repère dans la symptomatologie. En effet, les souches appartenant à un sérovar ou séro groupe donné sont responsables de formes cliniques variables (Levett, 2015).

Sérogroupe	Sérovans
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Copenhagui
Canicola	Canicola
Australis	Australis, Bratislava, Muenchen
Autumnalis	Autumnalis, Bim
Grippotyphosa	Grippotyphosa, Vanderhoeni
Pyrogenes	Pyrogenes
Sejroe	Hardjo, Saxkoebing, Wolfi, Sejroe, Hardjo (bovis), Saxkoebing
Pomona	Pomona, Mozdok
Ballum	Ballum
Tarassovi	Tarassovi
Javanica	Javanica

Tableau 1. Principales leptospires pathogènes identifiées en France, d'après la classification sérologique (Levett, 2001 ; Kodjo, 2017)

b - Classification moléculaire

Au sein d'un même séro groupe, une diversité génétique existe. Une seconde classification, basée sur la séquence du gène de ménage 16S, a été élaborée. Actuellement, 64

espèces génomiques sont reconnues et sont désormais classées en deux groupes, les espèces pathogènes et les espèces saprophytes. On recense aujourd'hui 37 leptospires pathogènes, il s'agit de souches pour lesquelles la virulence a été constatée *in vivo*. Les espèces saprophytes, au nombre de 27, ont été isolées à partir de l'environnement, et sont des souches pour lesquelles la virulence n'a pas été décrite jusque-là (Vincent et al., 2019).

L'identification moléculaire est utilisée en recherche phylogénétique (Tamura et al., 2011) et lors d'enquêtes épidémiologiques, le niveau de distinction des souches étant plus fin selon la classification moléculaire, notamment par l'application de méthodes de séquençage.

2- Méthodes de détection des leptospires

Chez l'Homme, un individu symptomatique est infecté depuis 12 à 20 jours, durée d'incubation de la leptospirose (Adler, 2010). La leptospirose est transitoire et dure moins d'une semaine post-infection (Levett, 2001). Les anticorps (IgM) sont décelables dans le sang à partir de 10 jours post-infection (Adler, 2010). La leptospirose, ou excrétion de leptospires dans les urines, ne débute qu'à partir de la 2^{ème} semaine post-infection, et peut persister, par phases intermittentes, plusieurs mois après guérison clinique du sujet (Levett, 2001).

Différents tests directs et indirects existent pour statuer sur l'infection ou l'exposition d'un individu et doivent être utilisés selon le stade de l'infection. Nous ne présenterons que certains de ces tests.

a - Méthodes de détection indirecte : présentation de la MAT

Les tests indirects permettent de détecter la réponse du système immunitaire d'un individu suite à l'infection par des leptospires pathogènes. Toutefois la présence d'anticorps anti-leptospires peut être la conséquence d'une infection en cours ou passée. Pour cette raison, la présence d'anti-corps atteste *a minima* de l'exposition de l'individu aux leptospires.

La méthode de détection indirecte MAT (*Microscopic Agglutination Test*) est la méthode de référence pour le diagnostic sérologique de la leptospirose. Ce test consiste à évaluer au microscope à fond noir le pourcentage d'agglutination de suspensions de souches représentatives de différents sérogroupes de leptospires en présence de différentes dilutions du sérum du patient. La MAT est une épreuve spécifique de sérotype : le panel d'antigènes utilisés doit inclure des sérovats représentatifs de tous les sérogroupes ainsi que tous les sérovats communs dans la zone géographique d'origine de l'individu testé. Des réactions croisées, de coagglutination, peuvent apparaître entre sérogroupes du fait de la détection d'antigènes non spécifiques du sérotype (IgG) et limitent l'interprétation du test (Levett, 2001). La lecture requiert de l'expérience, une variabilité entre opérateurs a été décrite (Miller et al., 2011). Cette méthode permet de déterminer le sérotype infectant (Levett, 2003).

b - Méthode de détection directe : présentation des méthodes PCR

Les PCR, méthodes de mise en évidence d'ADN de leptospires, permettent de distinguer un individu d'infecté par des leptospires d'un individu sain. La PCR point final consiste en l'amplification d'un fragment de génome codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr) et est essentiellement utilisé en raison de portions du gène conservées dans toutes les bactéries du genre *Leptospira*. Cette méthode ne distingue pas les leptospires pathogènes des leptospires saprophytes. La détermination de l'espèce par séquençage de l'ADN amplifié

permet d'en faire la distinction (Cf 2.c). La PCR en temps réel est réalisée sur gène LipL32. Elle présente l'avantage par rapport à la PCR point final d'être plus rapide et moins sujette aux contaminations (Picardeau, 2013).

c - Technique de séquençage : présentation du typage VNTR

Le séquençage, permettant l'identification complète de la bactérie, est réalisé par le Centre National de Référence de la leptospirose en France (CNR). En raison de son coût important, des méthodes alternatives de séquençage partiel ont été développées pour répondre aux trois questions suivantes : le profil génétique correspond-il à (1) un agent pathogène ou un saprophyte; (2) une espèce de *Leptospira* connue; et (3) un sérotype et un sérovar connu.

L'analyse du nombre variable de répétitions en tandem (VNTR), aussi qualifiée d'analyse VNTR sur loci multiples (MLVA), s'avère être une méthode discriminante pour l'étude structurelle des populations. Les différentes souches de leptospires sont caractérisées grâce à la variabilité du nombre de répétitions en tandem (succèsions de motifs ADN non codants répétées) sur 3 à 5 loci à fort degré de polymorphisme. 92% des sérovars de *L.interrogans* et 90% des sérovars de *L. kirschneri* peuvent aujourd'hui être identifiés (Salaun et al., 2006). *L. borgpetersenii* est constituée de moins de répétitions en tandem, une méthode sur deux sets d'amorces permet de discriminer 60% des sérovars (Salaun et al., 2006).

Le typage VNTR est à même de fournir une méthode pratique et simple basée sur le produit de PCR du gène 16S, issu de la détection directe, pour définir un apparentement à un sérovar de *L. interrogans*, *L. kirschneri* ou de *L. borgpetersenii*. Le séquençage est appliqué au domaine de la recherche, et permet d'affiner les connaissances épidémiologiques des leptospires. La MLST a été développée sur l'espèce *L.interrogans* uniquement, le développement pour les autres espèces est en cours.

La combinaison PCR du gène 16S et VNTR permet d'obtenir une définition fine du profil génétique et de distinguer des leptospires, infectant des populations animales, génétiquement proches (Ayrat et al., 2015). Son application est pertinente dans le cadre d'études épidémiologiques à l'échelle d'un écosystème.

B. L'interface leptospires – bovins - animaux sauvages

1- Excrétion de leptospires par les hôtes réservoirs

Le rôle épidémiologique d'hôtes réservoirs de différentes espèces de mammifères dépend de leur capacité à maintenir un portage rénal de leptospires sans être atteint de leptospirose (Machang'u et al., 2004).

Les espèces de la faune sauvage identifiées comme hôtes naturels de persistance entretiennent la circulation de leptospires dans l'environnement par excrétion active de ces bactéries dans leurs urines (Barbagelata et al., 2013). Les zones peu irriguées, avec un faible courant et des zones ombragées par exemple les marais est en environnement favorable à la persistance des leptospires. Ces zones sont d'autant plus à risque de contamination par les leptospires que la présence d'hôtes réservoirs, notamment de rongeurs, est forte (Blackmore D. K. and Hathaway S. C., 1979).

L'infection par les leptospires a été étudiée expérimentalement, principalement sur l'espèce *Rattus Norvegicus*. La voie d'excrétion principalement observée est la voie urinaire. L'urine est la principale source de contamination de l'environnement (Adler and de la Peña Moctezuma, 2010). Une corrélation linéaire entre la charge bactérienne des reins et celle des urines a été mise en évidence pour cette espèce (Desvars et al., 2013 ; Costa et al., 2015). La quantité de leptospires émises dans les urines augmenterait en fonction du ratio poids/taille, ceci uniquement pour les individus mâles. Des différences dans l'excrétion rénale de ces espèces hôtes, et donc dans la contamination environnementale, pourraient être à associer aux variations du risque de leptospirose en fonction d'un écotype (Costa et al., 2015). Des leptospires du sérovar *Copenhageni* étaient majoritairement excrétées dans les urines de *Rattus norvegicus* et de *Rattus rattus* d'après une précédente étude (Levett et al., 1998). Ce dernier point est lié à la spécificité d'hôte des leptospires et suggère qu'une population hôte donnée favorise la contamination du milieu par une souche donnée de leptospires. Une autre voie d'excrétion actuellement étudiée est la voie pulmonaire suite à la détection de leptospires dans cet organe. Une colonisation pulmonaire par les leptospires a en effet été mise en évidence chez l'espèce *Rattus norvegicus* (Zilber et al., 2016).

2- Maintien des leptospires dans l'environnement

Le comportement des leptospires dans l'environnement dépend des espèces. Les espèces saprophytes sont des organismes aquatiques, vivant à l'état libre et se multipliant dans des eaux stagnantes. Les espèces pathogènes ne se multiplient pas en dehors de l'hôte, cependant elles peuvent survivre pendant des périodes d'autant plus longues que les conditions de température, pH, humidité, ensoleillement, richesse en nutriments y sont favorables (Bharti et al., 2003). Cette période peut être de l'ordre de plusieurs semaines selon les études (Trueba et al., 2004 ; Andre-Fontaine et al., 2015). Il a été montré que la virulence du sérovar *Icterohaemorrhagiae* était entièrement préservée pendant au moins 20 mois, y compris dans un milieu appauvri en nutriments, à pH<6 et à une température de 4°C (Andre-Fontaine et al., 2015).

L'ensemble des leptospires sont capables de synthétiser un biofilm, leur permettant d'adhérer aux cellules et à d'autres surfaces (Gomes et al., 2018). La synthèse de ce biofilm favorise la transmission via l'environnement, notamment par maintien des leptospires dans les eaux de surface (Ristow et al., 2008).

En plus de leur multiplicité d'hôtes, les leptospires sont des bactéries capables de survivre en milieu extérieur. Ce délai de survie est cependant favorisé par certains biotopes, humides et chauds (Bharti et al., 2003).

3- Voies de transmission aux bovins et facteurs de risque en élevage

La transmission de leptospires a lieu par contact avec les muqueuses, ou avec de la peau lésée (Adler, 2010). Chez les bovins adultes, l'infection aux leptospires peut être inapparente, associée à des troubles chroniques de la reproduction : troubles de la fertilité et avortements dans le dernier tiers de gestation. Elle est plus rarement associée à des manifestations aiguës (Ellis, 2015). La forme aiguë se manifeste par une hyperthermie et une chute complète de la production laitière (« drop milk syndrome ») (Adler, 2010). La forme

chronique, sous-diagnostiquée, est plus souvent rencontrée et est liée à des souches apparentées au séro groupe Sejroe (Ellis, 2015).

Des leptospires sont identifiées dans les semences (Masri et al., 1997), dans les sécrétions vaginales jusqu'à huit jours après avortement (Ellis et al., 1985) ainsi que dans le sang et les urines jusqu'à 40 semaines après inoculation, sans traitement antibiotique (Leonard et al., 1992). Une grande variété de sérogroupes a été signalée en élevage bovin, parmi lesquels les sérogroupes Australis, Grippotyphosa, Sejroe, Icterohaemorrhagiae (Trap et al., 1988 ; Ayrat, 2016 ; Gaszo, 2017 ; Delaborde, 2019). Le schéma d'infection dans un troupeau varie en fonction des souches de leptospires présentes et des conditions d'élevage (Ellis, 2015).

La transmission indirecte, par voie exogène, de l'environnement contaminé par des hôtes réservoirs aux bovins, est majoritaire. L'environnement est propice aux contacts indirects avec la faune sauvage, et ce par l'intermédiaire de sources d'abreuvement non renouvelées et accessibles aux rongeurs, ainsi que par une période au pâturage étendue (Fávero et al., 2017). La nourriture jouerait aussi un rôle en étant contaminée par les urines de rongeurs. L'utilisation d'ensilage plutôt que de concentrés, et le retrait des surplus suivi d'un nettoyage après 48H seraient des facteurs protecteurs (Delaborde H., 2019; Messaoud, K., 2017).

Les voies de transmission indirectes varient en fonction de l'espèce de la faune sauvage en cause et de son habitat. Il a été suggéré que le maintien à l'étable favoriserait la transmission de leptospires par des rongeurs préférant les bâtiments d'élevage (rats, souris) tandis que la mise au pâturage était en faveur d'une transmission de leptospires par des hôtes vivant à l'extérieur (campagnol, souris, mulot, hérisson) (Trap D., 1988).

4- Souches de *Leptospira* identifiées en élevages bovins

L'espèce bovine est un hôte de persistance du sérovar Serjoe appartenant au séro groupe Hardjo (Ellis, 2015). Une enquête de séroprévalence menée en 2004 sur 411 cheptels a montré pour 68 d'entre eux, soit 41% de ces élevages bovins, des profils sérologiques démontrant une exposition au sérovar Hardjo (Andre-Fontaine G. and , D. Nicholas, B. Scalzo, A. Keita, et I. Nanjiani. 2010.). Lors d'une étude dans l'Ouest de la France, 22 élevages ayant des bovins suspectés d'être infectés furent testés par kits ELISA, avec confirmation MAT. La séroprévalence a été observée à 18%, le séro groupe identifié étant le séro groupe Hardjo (Tresse, 2009).

Des études rétrospectives sur élevages de bovins suspectés d'être infectés, ont décrit une distribution géographique homogène des sérogroupes Australis et Serjoe, majoritairement identifiés en France (Ayrat et al., 2014; Gaszo F., 2017).

Dans l'étude de l'interface élevages bovins – mammifères sauvages, la partie concernant les animaux d'élevage (Delaborde, 2019) a été réalisée simultanément à celle du réservoir faune sauvage. Dans cette partie de l'étude, 48 élevages ont été sélectionnés, au sein desquels 481 bovins ont été prélevés au hasard. 27 élevages étaient séropositifs, à la MAT, soit une exposition aux leptospires pathogènes de 56 % (IC95% [41 % ; 70 %]) des troupeaux. Les sérogroupes incriminés ont été Australis pour 19 élevages soit 70% des élevages ayant au moins un bovin séropositif, et Sejroe pour 4 élevages soit 15% des élevages ayant au moins un bovin séropositif. Le sérovar Grippotyphosa a par ailleurs été identifié dans un élevage de

cette étude. Les élevages bovins sont répertoriés sur carte (annexe 1). Deux de ces élevages ont fait l'objet des sessions de captures de petits mammifères. Les résultats d'études de la distribution des sérogroupes de l'espèce bovine en France (Ayrat et al., 2014 ; Messaoud, 2017) et dans notre zone d'étude (Delaborde, 2019), sont regroupés dans la figure 2.

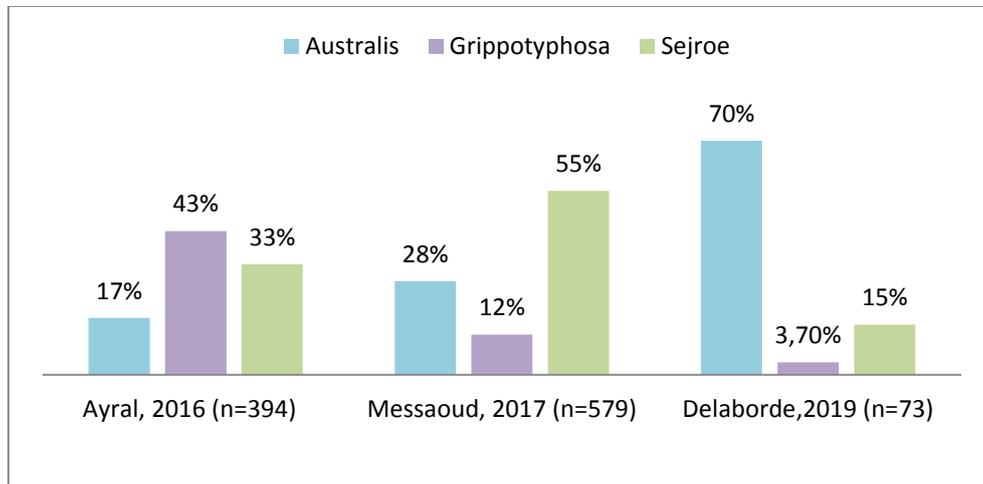


Figure 2. Sérogroupes identifiés en élevages bovins en France (Ayrat, 2016 ; Gazso, 2017 ; Delaborde, 2019)

On notera que si le rôle du bovin comme hôte de maintien du sérovar Sejroe est bien décrit dans un contexte d'élevage (Ellis, 2015), les bovins sont exposés à une plus grande diversité de souches de leptospires pathogènes que ce seul sérovar (Ayrat, 2016 ; Messaoud, 2017 ; Delaborde, 2019). Face à la diversité des leptospires identifiées en élevage bovin, il apparaît nécessaire d'en identifier les sources, afin d'en prévenir l'exposition.

C. Le réservoir faune sauvage

1- Description du portage rénal par la faune sauvage en France

Il y aurait une différence interspécifique dans le portage rénal de leptospires. Parmi les différentes espèces de la faune sauvage, on note des prévalences observées hautes pour le rat musqué (*Ondatra zibethicus*) (Ayrat et al., 2020), pour le rat surmulot (*Rattus norvegicus*) (Aviat et al., 2009) et pour le hérisson (*Erinaceus europaeus*) (Ayrat et al., 2016).

Le portage rénal de différentes espèces de la faune sauvage a été étudié dans différentes régions et à différentes périodes en France. Certains résultats de ces études sont synthétisés figure 3.

A l'échelle de l'individu, le poids serait un facteur en faveur de l'infection chez les petits mammifères *Microtis arvalis* et *Microtis agrestis* (Fischer et al., 2018). Il a été émis l'hypothèse que les animaux plus lourds étaient les plus âgés, et qu'ils étaient exposés depuis un temps plus long que de jeunes individus. Aucune étude n'a observé d'association entre le sexe et le statut infectieux sur les genres *Microtus*, *Apodemus*, *Clethrionomys*, *Crociodura* et *Sorex* (Mayer-Scholl et al., 2014).

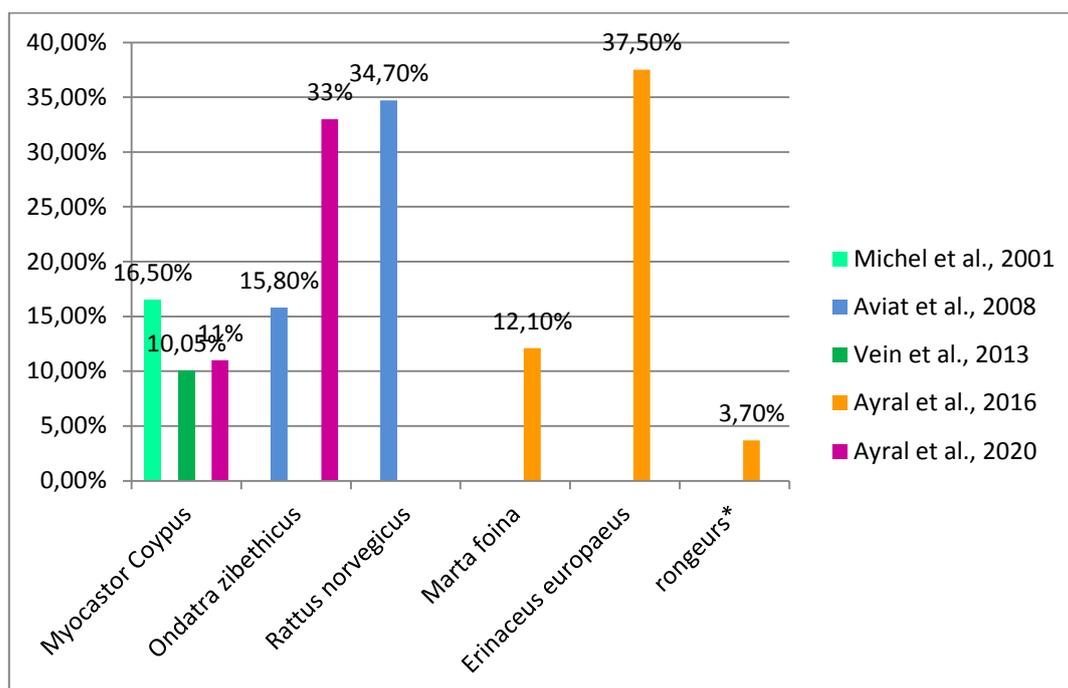


Figure 3. Taux de portage rénal par espèces de la faune sauvage en France (*: *Castor fiber*, *Glis glis*, *Marmota Spermophilus*)

Une étude parmi trois micro-habitats de type forêt, semi-urbain et urbain a mis en évidence une haute prévalence au portage de leptospires parmi la faune sauvage, en milieu forêt, à 19.4% (n=93), suivie de celle en milieu urbain, à 16.6% (n=163) et de celle en milieu semi-urbain, à 9.8% (n=113). Le milieu forêt présentait une plus grande biodiversité, tandis que le milieu urbain, notamment du fait de la présence de déchets, était caractérisé par une plus grande densité de rongeurs (Yusof et al., 2019).

Les environnements de type rivière et eaux closes, et à proximité d'élevage, seraient en faveur d'une forte séroprévalence pour les espèces *Myocastor coypus* et *Ondatra zibethicus*. Cette prévalence varierait en fonction des saisons : baisse en été et augmentation l'hiver (Darras C., 2004).

2- Souches identifiées par espèces de la faune sauvage

L'hypothèse d'espèces réservoirs majeures a été soulevée pour différentes espèces de la faune sauvage. En région tempérée, les hérissons seraient des excréteurs majoritaires du sérotype Australis (Ayral et al., 2016), tout comme les ragondins, tandis que les rats musqués seraient davantage excréteurs du sérotype Grippytyphosa (Ayral et al., 2020). Lors d'une étude menée à l'Ouest de la France, les sérotypes prédominants chez le ragondin (*Myocastor coypus*) ont été Icterohemorrhagiae, Sejroe, Australis et Grippytyphosa (Michel et al., 2001). La prédominance du sérotype Icterohaemorrhagiae a été retrouvée lors d'une étude sur ragondins en Nord Isère (Fromental P., 2004).

Différentes espèces de la faune sauvage ont été caractérisées, la figure 4 présente une vue synthétique des souches majoritairement identifiées par espèces.

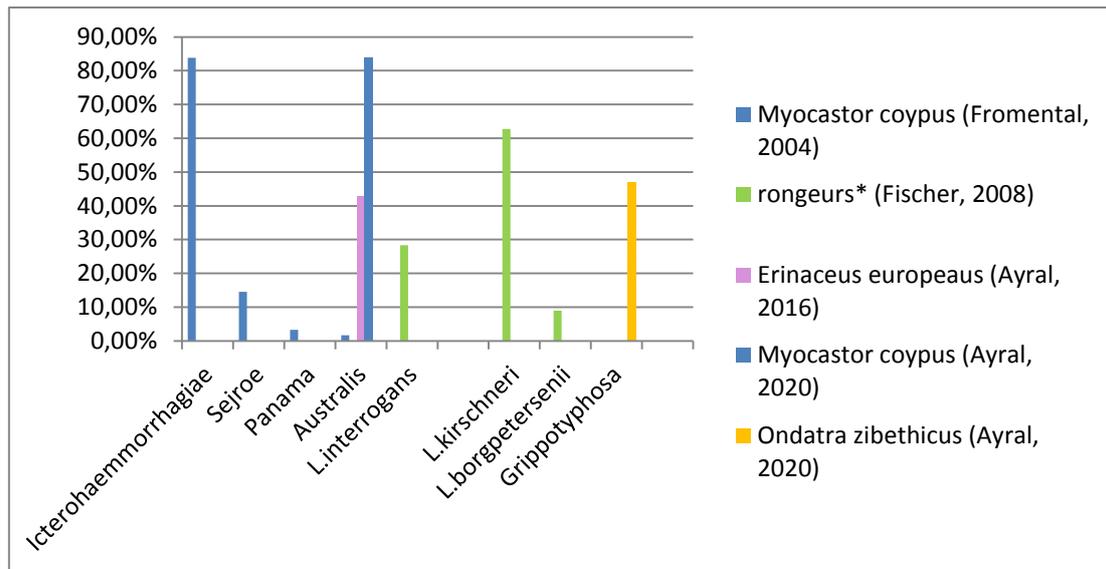


Figure 4. Souches identifiées dans la faune sauvage en France (*: *Microtus Arvalis*, *Microtus agrestis*, *Myodes glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Sorex araneus*)

Dans une étude comparée des séroprévalences de rongeurs semi-aquatiques et de bovins sur 26 départements français, les sérogroupes prédominants identifiés dans la faune sauvage étaient significativement différents selon la présence ou absence d'un élevage proche des sites de capture. Les ragondins et rats musqués capturés à proximité d'élevages étaient séropositifs et de sérogroupes prédominants respectifs Sejroe et Grippytyphosa. Le séro groupe prédominant identifié en élevages bovins était Grippytyphosa (Darras, 2004).

Une étude a décrit en Allemagne le portage rénal de leptospires par les petits mammifères (n=2973). Les genres *Apodemus spp.*, *Microtus spp.* et *Crocidura* correspondaient à des prévalences respectives de 11% (n=2272), 13% (n=1394) et de 20% (n=30) avec une prédominance de l'espèce *L.kirschneri*, suivi de de *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* (Mayer-Scholl et al., 2014).

L'hypothèse d'une association entre l'espèce *L. Borgpetersenii* et le genre *Apodemus* a été émise lors d'une étude des leptospires pathogènes isolées dans des populations de petits mammifères en différents types d'habitat (forêt, parc, site renaturalisé) (Obiegala, 2016). La prévalence observée la plus élevée entre sites fut celle de l'habitat forêt, pour une valeur de 11.6% (n=216 captures à ce site). L'espèce *L. kirschneri* a été majoritairement identifiée (Obiegala et al., 2016).

L'hypothèse que les espèces *Microtus arvalis* et *Microtus agrestis* pourraient être des hôtes réservoirs de *L. kirschneri* a été suggérée par une étude récente (Fischer et al., 2018). Une infection exclusive à *L. kirschneri* a été observée pour ces espèces, ce à une prévalence observée de 30%, tandis que *L. Interrogans*, *L.kirschneri* et *L. borgpetersenii* étaient retrouvées chez les espèces *Apodemus flavicollis* et *Myodes glareolus*.

3- Ecologie des espèces en contact avec les élevages bovins

a - Identification des espèces en contact avec les élevages bovins

Les espèces de petits mammifères recensées dans les quadrats de capture, d'après l'atlas des mammifères paru en 2019 (<https://atlasmam.fauneauvergnhonealpes.org/>), sont :

- le campagnol agreste (*Microtus agrestis*)
- le campagnol des champs (*Microtus arvalis*)
- le campagnol souterrain (*Microtus subterraneus*)
- le campagnol roussâtre (*Clethrionomys glareolus*)
- le campagnol terrestre (*forme fouisseuse*) (*Arvicola scherman*)
- le campagnol amphibie (*Arvicola sapidus*)
- le mulot à collier (*Apodemus flavicollis*)
- le mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*)
- le rat surmulot (*Rattus norvegicus*)
- la souris grise (*Mus musculus domesticus*)
- la crocidure commune (*Crocidura rossola*)

Des critères macroscopiques permettent la distinction entre les genres *Apodemus*, *Crocidura*, *Microtis* et *Clethrionomys*. Ces critères sont notamment la longueur du corps, la longueur de la queue et des critères plus spécifiques (taille des oreilles et des globes oculaires, couleur du pelage). Le poids permet d'estimer l'âge de l'individu (Sauer J. R. and Slade N. A., 1987). Les informations poids, période de natalité et âge de maturité sont des variables indicatrices de la dynamique d'une population pendant une période donnée. L'annexe 2 rassemble ces informations et les critères de reconnaissance macroscopique par genres.

b - Comportement et niche écologique de ces espèces

La niche écologique et le comportement entre congénères d'une même espèce, ainsi qu'avec les congénères d'autres espèces, sont des facteurs à prendre en compte dans les dynamiques de transmission de leptospires au sein du réservoir faune sauvage. Les paramètres populationnels (espèce sociale, grégaire ou territoriale, étendue du domaine vital, durée de vie moyenne, caractéristiques de reproduction) régissent le taux de contacts entre individus et indirectement entre les individus infectés et non infectés et pourraient avoir un effet sur la prévalence de l'infection dans une population. Une vue d'ensemble de ces caractéristiques par espèce est présentée en annexe 3 (Quéré, Le Louarn 2011).

La synthèse bibliographique a permis de souligner la diversité des leptospires identifiées en élevage et dans la faune sauvage. Les objectifs de ce volet d'étude vont être de décrire l'écologie et les caractéristiques des populations de mammifères sauvages infectées issues de zones d'élevage bovin. Une partie descriptive conviendra dans un premier temps afin de résumer les données observées selon les caractéristiques de l'échantillon. La distribution saisonnière, et spatiale, des petits mammifères infectés donnera des indications sur les liens entre les populations hôtes identifiées dans la faune sauvage et l'environnement. Des analyses statistiques de ces observations permettront dans un second temps d'estimer les variations de proportions d'individus infectés à partir des caractéristiques des populations hôtes et des paramètres d'environnement.

III. Matériel et méthode

A. Etudes de terrain

1- Ethique

Le protocole d'étude a été soumis au comité d'éthique de VetAgro Sup qui a émis un avis favorable (Avis n° 1813 – V2 datant du 18 septembre 2018). Tous les échantillons ont été prélevés sur des rongeurs dans le cadre réglementaire de la maîtrise des populations susceptibles d'occasionner des dégâts ou dans le cadre de l'étude selon le protocole pré établi et validé. Toutes les procédures sont en accord avec les normes éthiques des réglementations nationales et européennes applicables en matière de soins et d'utilisation des animaux (Arrêté 2007/04/06 et Directive 2010/63/CE).

2- Sites d'échantillonnage et collecte d'échantillons

Les deux sites de captures A et B correspondent à deux élevages dont le troupeau de bovins laitiers a été détecté séropositifs par MAT. Deux bovins par site ont réagi au test de microagglutination sur souches, aux sérogroupes Australis (sites A et B) et Sejroe (site B).

Les petits mammifères ont été piégés dans ces deux fermes d'élevage localisées à Sourcieux-les-Mines, le site A, et Lentilly, le site B, de mai 2018 à mars 2020 sur deux cycles saisonniers consécutifs, sur huit sessions de capture d'une douzaine de jours.

La région Rhône-Alpes, ici en zone périurbaine, au Nord-Ouest de Lyon, est caractérisée par un climat tempéré, semi-continentale. L'exploitation A est caractérisée par des terrains légèrement en pente, davantage de lisière de forêts et un cours d'eau (non répertorié cartographiquement), au contact de plus de la moitié de nos sites de piégeages. L'exploitation B est plus proche d'habitations urbaines et moins arborée. Ces observations ont été objectivées cartographiquement, et un exemple des pâtures du site A et du site B utilisées lors de la quatrième session de piégeage figure en annexes 4 et 5. L'exploitation du site A regroupe 95 vaches laitières, 50 vaches en allaitant, ainsi que 50 chevaux d'élevage ou en pension. La saison de pâturage pour cet élevage s'étend de mi-mars à fin novembre. Le cheptel du site B est constitué uniquement de 50 vaches en allaitant depuis le 10 mai 2019, date à laquelle l'éleveur a vendu ses 28 vaches laitières. Les vaches sont dehors toute l'année tant que les conditions le permettent. Aucun des deux éleveurs ne rapporte ni de baisse de la fertilité ni de chute de production, malgré l'exposition aux leptospires mise en évidence au sein de leur cheptel.

3- Captures et prélèvements

a - Cas des petits mammifères

Des pièges Ugglan® ont été utilisés pour les captures de petits mammifères : ces pièges sont constitués d'une palette à contre-poids laissant tomber l'animal lorsqu'il s'y introduit. Ces pièges ne permettent pas de cibler une espèce. Des individus de l'espèce *Crocidura russula*, protégée en France, ont été capturés du fait de l'absence de spécificité de

ces pièges. Si le crocidure était vivant, il était relâché. En cas contraire, l'animal était inclus dans l'échantillonnage. Quatre sessions par an ont été planifiées dans chacun des sites afin d'éventuellement pouvoir étudier l'effet saison. Les pièges Ugglan® enrichis avec des graines, des végétaux et du coton ont été placés, dans les pâtures mises à disposition par l'éleveur. Après une observation préalable de la pâture et l'éventuelle détection de traces de présence de petits mammifères (entrées de galerie, coulée, déjection, tumulus), les pièges étaient positionnés selon deux transects de 20 pièges le long des haies et des coulées, et distancés de minimum 2 mètres les uns par rapport aux autres. Selon notre expérience, un effectif de 40 pièges par site et en place pendant 10 jours pouvait permettre la capture d'environ 20 individus par site et par session en cas de forte présence.

Afin de réduire les effets de la néophobie des animaux sur le succès de capture, les pièges ont été placés non amorcés en amont de la session. Les pièges Ugglan® étaient placés trois à quatre jours avant la session alors que les ratières, présentes en continu sur les sites étaient appâtées trois semaines avant la session, les rats étant plus néophobes que les autres petits mammifères. La disposition des pièges était systématiquement cartographiée, afin de faciliter les relevés. Tous les pièges étaient amorcés la veille du premier jour de la session de capture puis relevés matin et soir chaque jour pendant huit à dix jours à l'exception de la dernière session arrêtée prématurément en absence de capture. L'absence de capture suggérant la faible présence des populations ciblées.

Immédiatement après la capture, les animaux étaient acheminés au laboratoire où ils ont été euthanasiés par ponction cardiaque après administration d'Isoflurane® et observation de l'inconscience (absence de mouvement à la stimulation). Le poids et la taille étaient mesurés. Le sexe et le stade de maturité sexuelle étaient établis au moment de l'autopsie à partir de l'observation des organes sexuels. Un individu avec la présence de glandes séminales ou d'un utérus développé était enregistré comme sexuellement mature et classé dans la catégorie « Mature ». A l'inverse l'absence de ces observations impliquait l'enregistrement de l'individu dans la catégorie « Immature ». Les échantillons d'organes et de fluides biologiques incluaient les deux reins, deux à trois fragments de poumon issus de lobes différents, un fragment de queue d'un centimètre, le sang et l'urine, l'ensemble collectés à l'aide d'un équipement stérilisé.

b - Cas des fouines et ragondins

Un plan d'échantillonnage des rongeurs semi-aquatiques et des fouines a été mis en œuvre en partenariat avec les Associations de Piégeurs Agréés dans les communes de Bully, Lentilly et Sourcieux les Mines et coordonné par la Fédération des Chasseurs du Rhône. Des fiches d'accompagnement permettaient d'avoir des informations sur l'espèce identifiée, la date de collecte du piège, la date de congélation de l'animal et la localisation GPS de la capture (ou à défaut la commune). Des congélateurs ont été mis à disposition des associations pour conserver les cadavres. A la demande des associations, une personne habilitée pour le déplacement de cadavres de la faune sauvage se chargeait de l'acheminement au Laboratoire de Vetagro Sup Lyon pour procéder aux prélèvements des reins, des poumons et de l'urine. Les échantillons étaient conservés à -20°C en attente d'analyses complémentaires.

4- Définition d'un individu infecté

La définition de l'individu infecté a été : tout individu échantillonné pour lequel une à plusieurs matrice(s) rein, urine, sang et/ou poumon était testée(s) positive(s) par la méthode de détection directe PCR point final.

5- Analyses moléculaires

Selon les instructions du fabricant, nous avons extrait l'ADN d'environ 25mg de tissu, prélevés à la jonction corticomédullaire sur les reins et aléatoirement sur différents lobes sur les poumons (2 à 3 échantillons de 2 à 5 mg). Ces échantillons ont ensuite été lavés au PBS puis homogénéisés aseptiquement à l'aide d'une seringue. Ils étaient incubés avec 180 µl d'ATL Tampon et 25 µl de protéinase K (QIAamp, Qiagen, Courtaboeuf, France) pendant 3 heures. Après digestion des protéines, l'ADN était extrait de 200 µl de tissu lysé en utilisant un tissu Nucleospin Kit 106 (QIAamp, Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les instructions du fabricant. Tous les échantillons d'ADN ont été stockés à -20 ° C.

Ces extraits ont été ensuite analysés par PCR point final, en condition pur et en dilution au 1/10^{ème} (1 µL d'échantillon et 9 µL d'eau stérile). La combinaison de ces deux conditions permettait la détection de l'ADN de leptospires en pur si sa concentration était faible, ainsi que l'expression de l'ADN de leptospires par dilution en cas de présence d'inhibiteurs.

Le mix de PCR MIX Maxima Hot Sart Green était préparé dans une salle dédiée, pour éviter toute contamination ADN. Des amorces Lept A et Lept B diluées au 1/10^{ème} ont été utilisées.

Quatre témoins étaient requis pour attester de la validité des résultats :

- un témoin négatif d'extraction par type de matrice à analyser, le NCS (« Negative Control Sample »), permettant de vérifier l'absence de contaminant lors de la phase d'extraction.
- un témoin positif d'extraction par lot analysé : PCS (« Positive Control Sample »), permettant de vérifier l'absence d'inhibiteur dans l'échantillon extrait.
- un témoin positif de PCR : BRAT, correspondant à de l'ADN de souche du sérovar Bratislava déjà extrait.
- un témoin négatif de PCR :NTC (No Template Control).

Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur au cours du cycle suivant: (1) dénaturation initiale à 95°C pendant 4 minutes puis (2) à 95°C pendant 30 secondes, (3) hybridation des amorces à 57°C pendant 30 secondes, (4) élongation à 72°C pendant 1 minute, (5) 35 répétitions des étapes (2) à (4), (6) maintien des amplifiats à 4°C, à l'infini.

6 µl de chaque amplifiat était déposé dans le puit correspondant, selon un plan de plaque, au sein de gels d'agarose à 1.5% dans cuves d'électrophorèse Advance Mupid-One (LEP-MOY-M24) avant d'être mis à migrer 30 minutes à 135 Volts, dans du tampon TAE 1X. Le dépôt de 6 µl de marqueur de poids moléculaire dans un puit du gel facilitait ensuite la lecture du gel sous lampe UV. Les résultats ont été conservés sous forme de photographies.

En cas de test PCR positif, une caractérisation moléculaire de l'espèce et du sérovar de *Leptospira* avait lieu. Un séquençage Sanger (Laboratoire Genoscreen, Lille) de la séquence

nucléotidique du fragment obtenu PCR conventionnelle sur le locus 16S de l'ADN ribosomal (Mérien et al., 1992) permettait d'identifier l'espèce de *Leptospira*.

L'analyse VNTR était réalisée sur chaque extrait d'ADN d'échantillon positif en utilisant l'amplification des loci VNTR 4, VNTR7, VNTR10. Les séquences ainsi obtenues étaient identifiées selon la base de données publiée par l'Institut Pasteur (Salaun et al., 2006) ainsi que les données du Laboratoire des Leptospores.

Afin d'identifier précisément les espèces de petits mammifères, les échantillons de queues prélevés sur chaque individu capturé ont été conservés dans l'éthanol et envoyés au laboratoire de biologie moléculaire de l'unité mixte de recherche EPIA (INRAE VetAgro Sup) pour séquençage et détermination génétique de l'espèce. Ces résultats n'étant pas encore disponibles (Cf. Avenant), nous désignerons par la suite les espèces de petits mammifères capturées par les noms « campagnols », « crocidures » et « mulots ».

B. Etude descriptive

1- Description de l'échantillonnage

a - Paramètres descriptifs de l'échantillonnage

La description des données a été réalisée selon les informations relatives aux petits mammifères capturés (espèce, sexe, stade de maturité) et selon les informations relatives aux captures en elles-mêmes (numéro de session, site, saison). Les données concernant les populations de fouines et ragondins ont été décrites par espèce, sexe, stade de maturité, date et commune de piégeage.

b - Proportions d'individus infectés observées

Les proportions d'individus infectés observées ont été calculées pour chaque espèce animale et chaque groupe d'animaux en fonction des paramètres définis ci-dessus. Les intervalles de confiance de ces proportions d'individus infectés ont été calculés à l'aide de la méthode de Wilson, méthode recommandée pour de petites tailles d'échantillons (Tobi, 2005).

2- Cartographie des sites de piégeage

La distribution spatiale du statut infectieux des individus échantillonnés dans les zones d'étude a été visualisée dans QGIS version 3.10.3 (ESRI, Redland, CA, États-Unis). Au site A, deux pâtures ont été utilisées à plusieurs reprises, l'une commune aux sessions 1 et 4, et la seconde commune aux sessions 6 et 8.

Autour des pâtures utilisées pour chaque session sur chaque site, une zone tampon fixe de 100 mètres a été créée. L'outil « Intersection » et la fonction mathématique « \$area » ont été utilisés pour découper ces zones avec la couche vecteur de CLC (France métropolitaine, 2018) et obtenir la surface en mètres carrés de chaque type d'utilisation des sols à l'intérieur de ces zones. Ces résultats ont été reportés dans une table de données sous forme de pourcentages (annexe 16) et catégorisés en fonction de la typologie prédominante (annexe 17).

Il a été procédé de même avec les captures de ragondins et fouines, lorsque les données de géolocalisation étaient renseignées, c'est-à-dire pour 23 individus sur 37 animaux testés (annexes 18 et 19). Les individus capturés provenaient de trois communes : Lentilly, Bully et Sourcieux-les-Mines. Nous rappelons ici que le site A de captures de micro-mammifères est sur la commune de Sourcieux-les-Mines, le site B sur la commune de Lentilly.

C. Etude analytique

1- Modèles de régression logistique

a - Définition des variables : variable réponse et variables explicatives

La variable réponse, à expliquer par modélisation, est le statut d'infection à *Leptospira*. Elle est définie par une proportion c'est-à-dire le rapport entre nombre d'individus infectés et le nombre d'individus total capturés.

Sur l'échantillonnage de petits mammifères, nous avons choisi de modéliser nos proportions d'individus infectés en fonction de cinq facteurs explicatifs : Site, Saison, Espèce, Sexe, Stade de maturité. Les facteurs prennent respectivement les niveaux suivants : [Site A, Site B], [Printemps, Été, Automne], [Campagnols, Mulots, Crocidures], [Mâle, Femelle], [Immature, Mature].

b - Régressions logistiques de Firth

Le choix de la régression logistique de Firth, i.e. avec réduction de biais, est justifié du fait de petits échantillons sur des modalités à cinq variables.

Le nombre de prédicteurs, c'est-à-dire le nombre de variables explicatives et d'interactions en entrée, peut s'avérer élevé pour certains modèles testés. La quantité de données n'est alors pas suffisante pour observer certaines modalités décrites par le modèle. Dans ce cas, le maximum de vraisemblance ne converge pas et les estimations correspondant à ces modalités sont aberrantes.

L'emploi de la régression logistique de Firth (Firth, 1993) a permis de résoudre ce problème et d'obtenir une solution stable (estimations non aberrantes). Des intervalles de confiance ont pu être déterminés autour de l'ensemble des estimations. La fonction de régression logistique de Firth « `brglm` » a été utilisée, à partir du package homonyme dans le logiciel R version 3.6.3 (annexe 29).

2- Sélection de modèle sur AICc

a - Hypothèses de départ

Un premier travail de sélection des modèles les plus pertinents à partir de ces cinq variables explicatives a été réalisé, sur la base d'hypothèses biologiques.

La leptospirose étant une maladie saisonnière, l'impact des saisons a été considérée comme une variable d'intérêt. L'influence du sexe a été relevée à de nombreuses reprises chez

l'homme (Bourhy, 2017) et chez l'espèce *Rattus rattus* (Desvars et al., 2013), mais elle n'a pas été mise en évidence chez les petits rongeurs. Le choix de tester l'hypothèse « plus de mâles infectés que de femelles » a motivé l'ajout de la variable Sexe au modèle.

Les espèces sont différentes les unes des autres en termes de biologie, d'habitat, et de comportement. D'après une étude sur le portage rénal des petits mammifères en Allemagne, les prévalences observées respectives des genres *Apodemus spp.*, *Microtus spp.* et *Crocidura* étaient respectivement de 11% (n=2272), 13% (n=1394) et de 20% (n=30) (Mayer-Scholl et al., 2014). Cette variable a été retenue dans l'ensemble de modèles établi.

Enfin, les sites n'étant pas très éloignés ni radicalement différents, nous ne nous attendions pas à un impact important de cette variable sur le statut infectieux de nos individus.

b - Choix d'un classement sur AICc

L'échantillon étant de petite taille, l'AIC risquait de sélectionner des modèles avec beaucoup de paramètres. Le critère d'Akaike avec correction de continuité, AICc a été choisi. L'AICc est un outil de sélection sur un ensemble de modèles. La valeur de ce critère diminue quand la vraisemblance du modèle (« likelihood ») augmente et le nombre de paramètres de ce modèle diminue (annexe 9). La sélection de modèle a reposé sur le principe de parcimonie c'est-à-dire sur le principe d'optimiser la performance du modèle pour un nombre de paramètres minimal. Le modèle à plus faible AICc a été considéré comme le meilleur modèle de l'ensemble. Le delta AICc est la différence d'AICc d'un modèle de l'ensemble avec celui du modèle sélectionné. Plus le delta AICc est élevé, moins le modèle est plausible relativement au modèle sélectionné. Le poids d'Akaike est calculé à partir de ce delta AICc. Il s'agit de la probabilité que chaque modèle soit identifié comme le meilleur modèle par AICc, si l'échantillonnage était répété à plusieurs reprises. Ces deux outils ont permis de comparer les modèles de l'ensemble.

c - Evaluation des modèles sur critères graphiques

L'ajustement d'un modèle aux données a été examiné à l'aide des graphiques suivants : graphique des valeurs attendues par le modèle en fonction des valeurs observées, graphique des résidus standardisés de déviance en fonction des valeurs attendues par le modèle, graphique des résidus standardisés de déviance en fonction de l'ordre d'apparition des valeurs observées, graphique des distances de Cook en fonction de l'effet de levier, courbe ROC du modèle.

La distance de Cook est la mesure de l'effet de suppression d'une donnée. L'effet de levier, appelé « leverage », est la mesure de la distance entre la valeur attendue par le modèle et la valeur observée dans le jeu de données.

La courbe ROC est la représentation graphique du couple (1 – spécificité ; sensibilité). (1- spécificité) correspond à la capacité du modèle à identifier le non-événement c'est-à-dire l'événement « ne pas être infecté », et la sensibilité correspond à la capacité du modèle à identifier l'événement, « être infecté ». L'aire sous la courbe ROC (AUC) varie de 0.5 en cas de modèle aléatoire à 1 en cas de modèle idéal.

3- Estimations prédites par un modèle de régression logistique

La régression logistique de Firth permet d'estimer des coefficients de régression. A partir de la fonction inverse de la fonction de lien logit, il a été possible de calculer des estimations de la probabilité d'être infecté (notée p) en fonction de modalités c'est-à-dire de valeurs prises par les variables explicatives du modèle (annexe 10).

Aux estimations issues des régressions logistiques ont été associées des erreurs standards, elles-mêmes calculées à partir de la méthode delta, avec la fonction « `deltamethode` » du package « `msm` » dans le logiciel R version 3.6.3 (annexe 29). Ces erreurs standards ont permis de calculer des intervalles de confiance autour des estimations du modèle.

4- Inférence multimodèle

a - Principe de l'inférence multimodèle

L'inférence multimodèle est une méthode d'estimation sur plusieurs modèles. Le poids d'Akaike est la probabilité qu'un modèle soit le meilleur modèle relativement aux autres modèles d'un ensemble de modèles. Lorsque le poids d'Akaike du meilleur modèle est inférieur à 0.9, il est recommandé d'avoir recours à l'inférence multimodèle et d'inclure l'ensemble des modèles testés dans cette méthode (Burnham and Anderson, 2004). Dans cette étude, le choix a été d'inclure tous les modèles à poids d'Akaike supérieur ou égal à 10% du poids d'Akaike du meilleur modèle de l'ensemble de modèles.

b - Estimations par inférence multimodèle

Les estimations issues de la méthode d'inférence multimodèle sont les sommes des estimations des différents modèles inclus dans l'inférence pondérées par les poids d'Akaike de ces différents modèles. Un exemple de calcul figure en annexe 29.

c - Calcul d'incertitude relative à l'inférence multimodèle

La variance inconditionnelle de l'inférence multimodèle est la somme de la variance d'échantillonnage et de la variance due à la sélection de modèles (annexe 10). Il s'agit de la somme des carrés des erreurs standards pondérés par les poids d'Akaike de chaque modèle, additionnée à la somme des écarts entre l'estimation par inférence multimodèle et l'estimation par le $i^{\text{ème}}$ modèle inclus dans l'inférence.

La variance inconditionnelle nous permet de calculer les variances de chaque estimation et un intervalle de confiance à 95% autour des estimations issues de l'inférence multimodèle.

Un pourcentage d'incertitude liée à la sélection de modèle est calculé pour chaque estimation. Il s'agit du rapport de l'erreur standard de l'estimation par inférence multimodèle sur l'erreur standard de l'estimation par le modèle issu de la sélection sur AICc. Ce pourcentage d'incertitude varie en fonction de l'estimation. La mesure de l'incertitude relative à l'inférence multimodèle est un indice pour évaluer la précision des estimations obtenues par inférence multimodèle.

IV. Résultats

A. Étude descriptive

1- Description de la population d'échantillonnage

a - Échantillonnage de petits mammifères

Huit sessions de captures ont été réalisées sur deux sites A et B d'élevage de mai 2018 à mars 2020. Quatre sessions ont eu lieu par an, aux mois de mars, mai, août et octobre. Les trois espèces ont été capturées dans les mêmes proportions entre les deux sites avec respectivement 49 mulots, 27 campagnols, 11 crocidures au site A et 37 mulots, 25 campagnols et 20 crocidures au site B. La taille d'échantillonnage et sa composition par espèces ont varié au cours des différentes sessions. L'espèce crocidure n'a pas été capturée en été (figure 5).

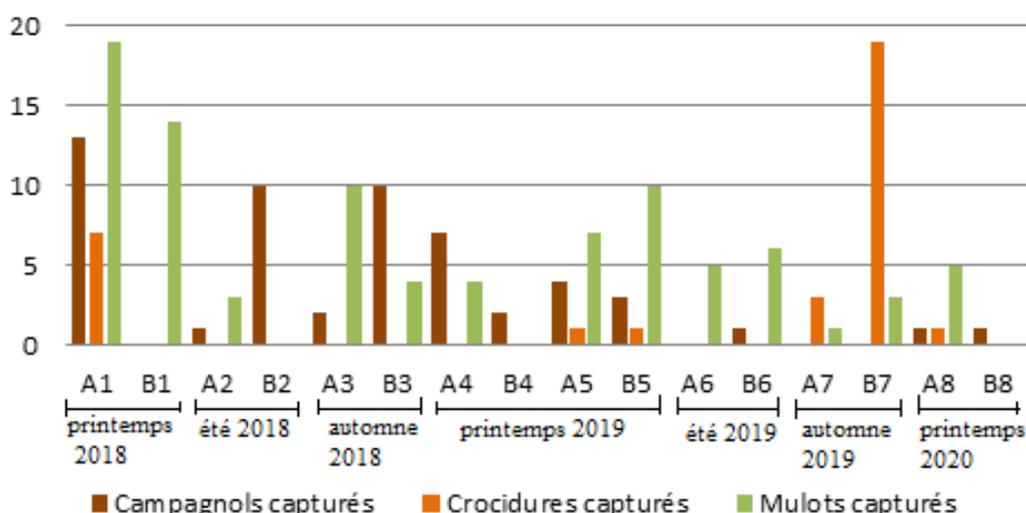


Figure 5. Répartition par espèces des petits mammifères capturés sur les pâtures (A = site A, B = site B, 1 à 8 correspond aux numéros de sessions)

Le sex ratio, rapport du nombre de mâles capturés sur le nombre de femelles capturées, est élevé, variant entre 6.4 l'automne, 4 au printemps et 5.25 l'été. Le sex ratio varie selon les saisons (tableau 4 et annexe 12).

Saison	Printemps	Eté	Automne	Printemps	Printemps	Eté	Automne
Session	1	2	3	4	5	6	7
Sex ratio	1	6	2	1,6	1,4	4,5	1,6

Tableau 2. Sex ratio des petits mammifères par session de capture

Des juvéniles ont été capturés au mois de mars, la session était ou déjà trop tardive pour l'hiver (absence de reproduction en cette saison en théorie) ou les conditions étaient favorables à une reproduction continue pour les deux années consécutives. Dans une

hypothèse comme dans l'autre, nous avons donc décidé de qualifier de printemps la saison de ces sessions réalisées au mois de mars. Nous avons donc capturé des petits mammifères sur deux sessions (sessions 3 et 7) pour la saison « automne », sur deux sessions pour la saison « été » (sessions 2 et 6) et sur quatre sessions pour la saison « printemps » (sessions 1,4,5 et 8).

b - Échantillonnage de fouines et ragondins

Les prélèvements réalisés grâce aux captures des associations de piégeurs ont eu lieu de novembre 2018 à mars 2020 et ont permis de récolter 46 animaux (30 ragondins, 10 fouines, 5 campagnols, 1 renard) sur trois communes (Sourcieux-les-Mines, Bully, Lentilly). Seuls 37 individus ont pu être testé par PCR (cf. Avenant). Le tableau 3 présente leur répartition par espèces et communes de piégeages.

Espèce \ Site	Bully	Sourcieux-les-Mines	Lentilly	Total
Ragondins	8	12	10	30
Fouines	5	1	1	7
Total	13	13	16	37

Tableau 3. Répartition des individus capturés par les associations de piégeurs par espèces et communes

Le sex ratio de cet échantillonnage a été de 0.8 pour les ragondins et de 1.7 pour les fouines. L'échantillonnage était majoritairement constitué d'individus matures (n=28) et de peu d'individus immatures (n=11). Les captures ont été réalisées essentiellement l'hiver (n= 29), avec moins d'individus l'été (n= 5) et l'automne (n=3).

2- Distribution des individus infectés

a - Cas des petits mammifères

La proportion de petits mammifères infectés au niveau rénal, pulmonaire et /ou urinaire par *Leptospira* a été observée à 0.22 (IC95% [0.1 ; 0.29], n=169). Les proportions observées par espèces, sexe et stade de maturité figurent en annexes 6, 7 et 8. Les proportions d'individus infectés observées ne varient pas selon l'espèce de petits mammifères (figure 6).

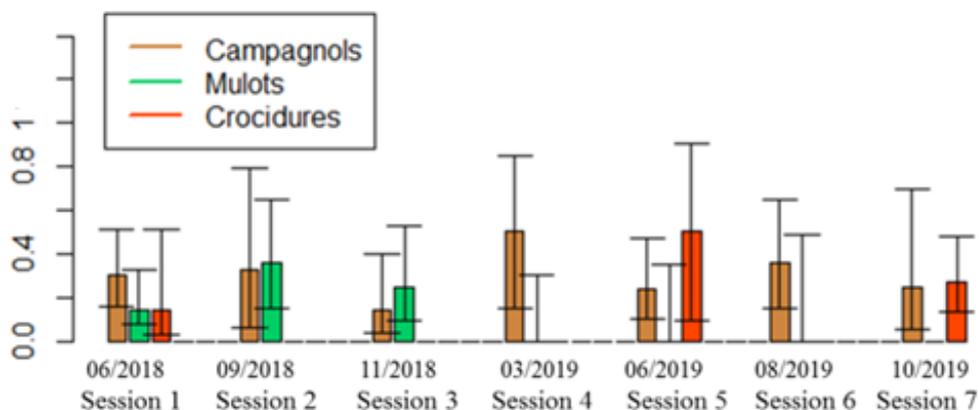


Figure 6. Proportions d'individus infectés par espèces par session

Les proportions d'individus infectés observés ne diffèrent pas selon le sexe (annexe 14) ni le stade de maturité sexuelle (annexe 13). Les proportions de petits mammifères infectés aux sites A et B ont été respectivement de 0.18 (IC95% [0.12 ; 0.28]) et 0.26 (IC95% [0.17 ; 0.36]). En été, aux sessions 2 et 5, seulement 4 femelles ont été capturées : aucune n'était infectée (figure 7). Cette saison correspond à la proportion d'individus infectés la plus élevée, de 0.45 (IC95% [0.27 ; 0.65]), pour les petits mammifères mâles.

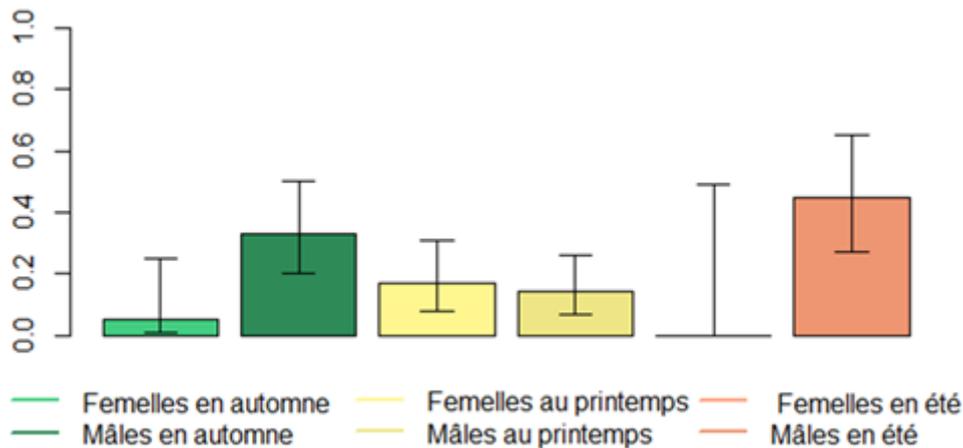


Figure 7. Proportions d'individus infectés par sexe au cours des saisons

Les espèces de leptospires identifiées ont été *L.interrogans* (n=8) et *L.kirschneri* (n=4) (figure 8). L'ensemble des petits mammifères infectés par l'espèce *L.interrogans* ont été des mulots. *L.kirschneri* a été identifié chez les trois espèces de petits mammifères. Parmi les individus infectés par *L.interrogans*, six d'entre eux ont présenté un profil apparenté au sérovar Bratislava, séro groupe Australis.

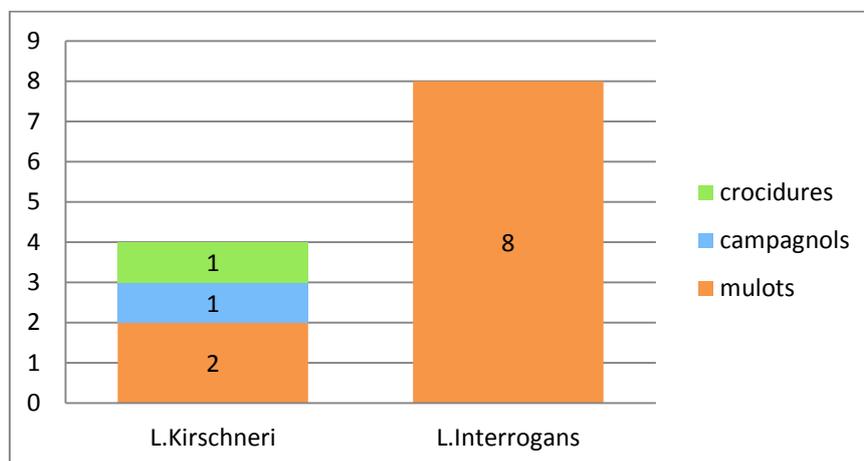


Figure 8. Distribution des sérovares identifiés par VNTR, par espèces de petits mammifères

Six rats et souris capturés aux sites A et B ont été testés : un seul individu était infecté, un rat mâle juvénile capturé au site A en été. L'ADN de leptospires extrait était en trop faible quantité pour être séquencé.

b - Cas des fouines et ragondins

La proportion d'individus fouines et ragondins infectés au niveau rénal, pulmonaire et /ou urinaire par *Leptospira* a été observée à 0.27 (IC95% [0.15 ; 0.5], n=37). Sur l'ensemble des individus capturés à Lentilly, aucun n'était infecté, 10 n'ont pas encore été testés (Cf. Avenant). Les proportions d'individus infectés par espèce, sexe et stade de maturité sexuelle sont présentées dans le tableau 4 ci-dessous.

Espèce	Sexe		Stade de maturité sexuelle		Totaux
	Femelles	Mâles	Immatures	Matures	
Fouines	1 (IC95% [0.44 ; 1], n=2)	0.4 (IC95% [0.12 ; 0.77], n=5)	1 (IC95% [0.2 ; 1], n=1)	0.6 (IC95% [0.25 ; 0.84], n=6)	0.27 (IC95% [0.11;0.61], n=7)
Ragondins	0.17 (IC95% [0.06 ; 0.39], n=17)	0.14 (IC95% [0.04 ; 0.40], n=13)	0.1 (IC95% [0.02 ; 0.4], n=10)	0.2 (IC95% [0.07; 0.39], n=20)	0.23 (IC95% [0.12;0.42], n=30)
Fouines et ragondins	0.20 (IC95% [0.09 ; 0.39], n=12)	0.24 (IC95% [0.11 ; 0.45], n=25)	0.13 (IC95% [0.02;0.47], n=13)	0.24 (IC95% [0.13 ; 0.40], n=13)	0.27 (IC95% [0.15;0.5], n=37)

Tableau 4. Proportions d'individus infectés observées par espèce, sexe et stade de maturité.

3- Distribution spatiale des piégeages

Les typologies des sites A et B sont relativement différentes, avec une prédominance de pâtures de type « forêts mélangées » au site A et une prédominance de pâtures de type agricole et urbain (« surfaces agricoles à territoires naturels importants » et « territoire urbain discontinu ») au site B (annexes 16 et 17).

Les proportions d'individus infectés par site et session sont représentées par des diagrammes sur la carte de distribution des sites de captures de petits mammifères (figure 9). La taille du diagramme est proportionnelle à la taille de l'échantillon sur lequel a été observée la proportion d'individus infectés en un site et une session donnée.

La géolocalisation n'a pas été renseignée pour l'ensemble des fouines et ragondins : la commune de Sourcieux-les-Mines (n=2) est moins représentée que celles de Bully (n=13) et de Lentilly (n=11) (annexes 15).

Sur la carte globale de répartition spatiale des ragondins et fouines piégés (annexe 15), davantage de ragondins et fouines capturés étaient infectés au Nord-Ouest de la zone d'étude. Ces individus sont issus des pâtures de type agricole, l'un d'eux à proximité d'un cours d'eau (individu numéro 37). D'après la carte globale de l'étude, les élevages bovins exposés aux leptospires sont distribués sans pattern spatial apparent (annexe 1).

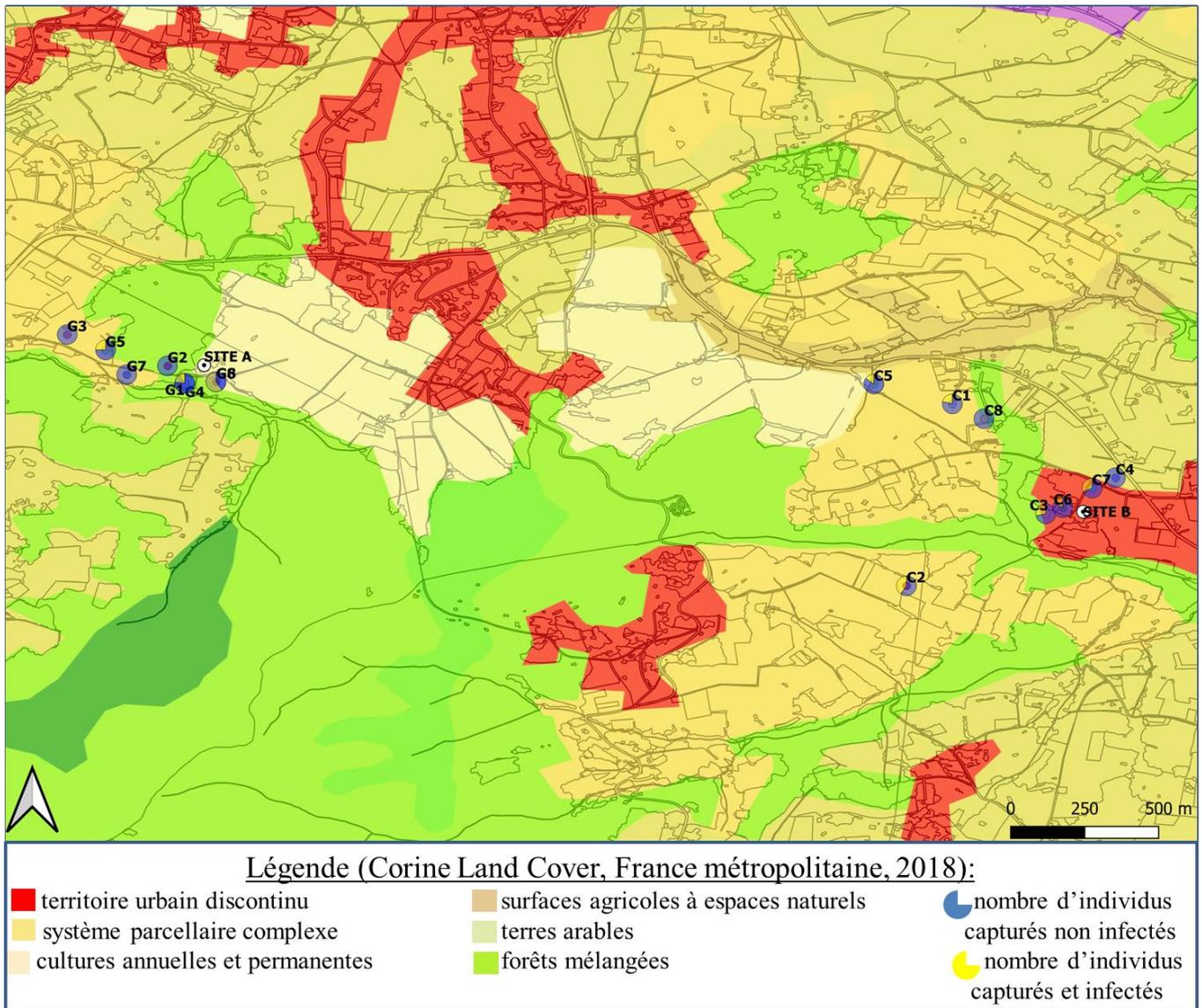


Figure 9. Représentation cartographique des sites de captures de petits mammifères par des diagrammes (taille relative à celle de l'échantillon): nombre d'individus infectés et nombre d'individus non infectés (CLC 2018)

B. Etude analytique

1- Sélection de modèle sur AICc

a - Établissement d'un ensemble de modèles

Nous avons établi une liste de 19 modèles de régression logistique de Firth (annexe 30). Ils ont été classés par ordre croissant d'AICc (annexe 20), soit du modèle le plus parcimonieux au modèle le moins parcimonieux. Le coefficient de dispersion associé à ce jeu de données a été calculé sur le modèle le plus complet et a été évalué à 1,26, soit un coefficient négligeable.

b - Sélection de modèle sur AICc

Le modèle ayant l'AICc le plus faible est le modèle «Sexe*Saison». Il s'agit du meilleur modèle de l'ensemble. Son AICc est de 111.78 et son poids d'Akaike est de 0.28. Les delta AICc des modèles suivants dans ce classement sont faibles (annexe 20). Les AICc du meilleur modèle et d'autres modèles de l'ensemble sont proches, et leurs poids d'Akaike peu différents.

Le modèle «Sexe*Saison + Espèce», second modèle dans l'ordre de classement, présente un delta AICc de 0.97 et un poids d'Akaike de 0.17. Le modèle «Sexe*Saison+Espèce» est pertinent d'un point de vue biologique et écologique, nous nous attendons à des variations de prévalence par espèce. Cependant, le modèle Sexe*Saison n'est construit que sur 6 paramètres, tandis que le modèle «Sexe*Saison+Espèce» repose sur 8 paramètres, soit 2 de plus que le meilleur modèle. Le modèle «Sexe*Saison+Espèce» est plus complexe. D'après le principe de parcimonie, le modèle retenu de la sélection sur AICc a été le modèle de régression logistique de Firth «Sexe*Saison» (modèle interaction sexe et saison).

c - Critères d'évaluation graphiques du modèle sélectionné

L'ajustement du modèle «Sexe*Saison » aux données a été évalué à l'aide de critères graphiques (figures 10 et 11, annexes 21 à 23).

D'après le graphique des valeurs observées en fonction des valeurs attendues par ce modèle (annexe 21), certaines observations sont éloignées des estimations de la régression logistique «Sexe*Saison», le modèle ne les ajuste pas correctement.

Sur le graphique des résidus standardisés de déviance en fonction des valeurs attendues par le modèle (figure 10), la dispersion des résidus est homogène et aléatoire sur l'intervalle $[-1.96 ; 1.96]$ et centrée sur zéro. La distribution des résidus suit théoriquement une loi asymptotiquement normale centrée réduite, les observations graphiques vont dans ce sens.

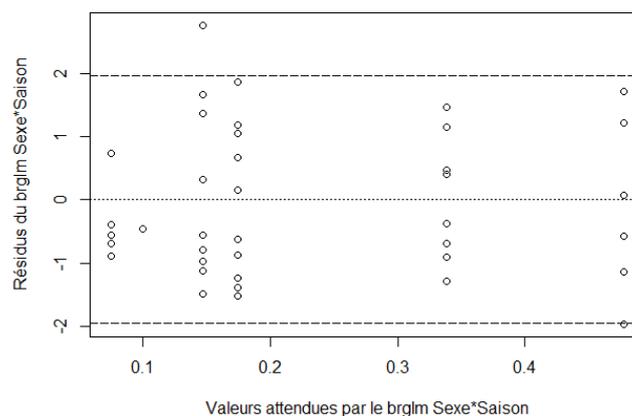


Figure 10. Graphique des résidus standardisés de déviance en fonction des valeurs attendues par le modèle «Sexe*Saison»

Le graphique des résidus en fonction de l'ordre d'arrivée des valeurs (annexe 22) ne montre pas d'effet cumulatif entre les résidus : graphiquement, les résidus n'apparaissent pas autocorrélés.

Deux observations sont remarquables sur le graphique des distances de Cook en fonction de l'effet de levier (figure 12). Il s'agit des observations numéro 1 « mulot mâle immature capturé au site A au printemps (session 1) » et numéro 57 « crocidure femelle mature capturée au site A au printemps (session 5) ». Ces observations correspondent respectivement à deux individus positifs sur deux individus capturés, et un individu positif sur un individu capturé. Elles sont influentes, c'est-à-dire que le jeu de données serait très différent sans elles, et atypiques, leurs espérances de résidus étant différentes de zéro. Le résidu de l'observation 1 est de -1.97, et celui de l'observation 57 est de 2.77.

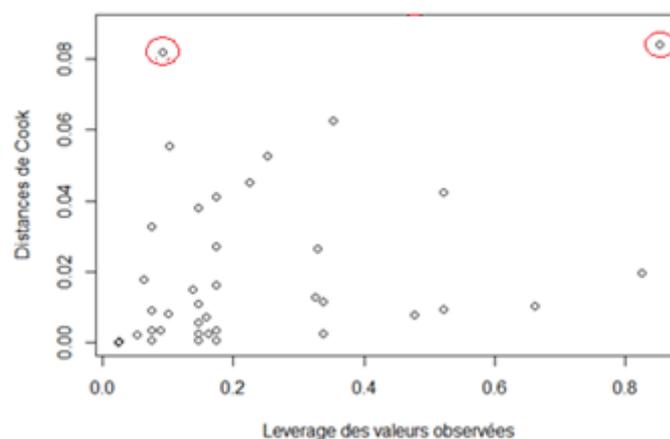


Figure 11. Graphique des distances de Cook en fonction du leverage pour le modèle «Sexe*Saison»

L'AUC de la courbe ROC (annexe 23) du modèle «Sexe*Saison» est de 0.77, soit un modèle correct (AUC supérieur à 0.7) mais assez peu discriminant (AUC inférieur à 0.9).

d - Estimations du modèle « Sexe*Saison »

Le modèle «Sexe*Saison» permet d'estimer cinq proportions d'individus infectés pour ce jeu de données. La modalité « femelles en été » ne peut pas être estimée : la proportion d'individus infectés observée est nulle. D'après ces estimations (annexe 24), représentées sur la figure 12, il est possible de décrire les résultats suivants :

- l'été serait la saison la plus à risque d'infection pour les individus mâles,
- en automne, les individus mâles sont plus à risque que les individus femelles ,
- au printemps, les individus mâles et femelles ont le même risque d'être infecté.

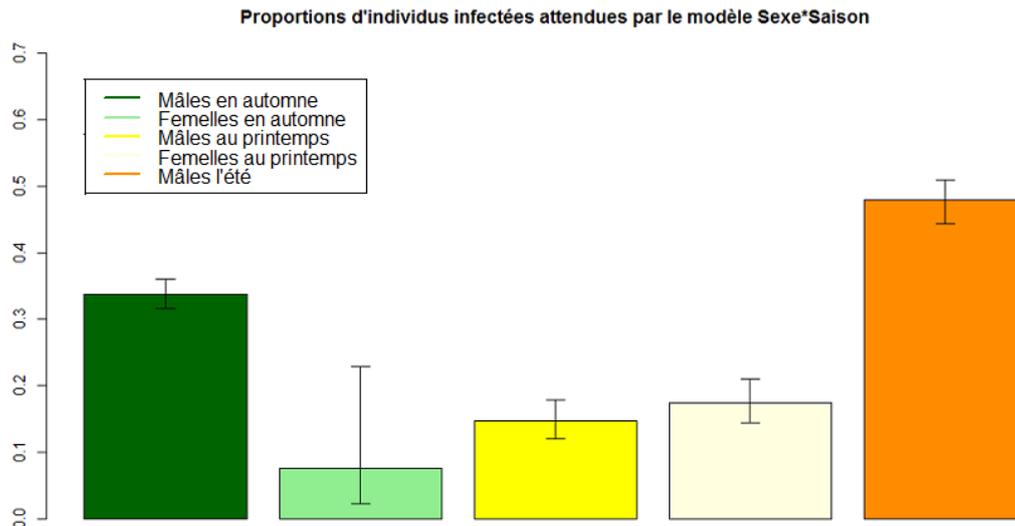


Figure 12. Estimations des probabilités d'infection par sexe et saison par le modèle de régression logistique de Firth « Sexe*Saison » issu de la sélection sous AICc

2- Inférence multimodèle

a - Justification de l'inférence multimodèle

Le poids d'Akaike du meilleur modèle, «Sexe*Saison», est de 0.28. Il s'agit d'un poids faible, inférieur à 0.9. L'inférence multimodèle est justifiée (Burnham and Anderson, 2004). Les modèles à poids d'Akaike supérieur ou égal à 10% du poids d'Akaike du modèle «Sexe*Saison», c'est-à-dire supérieur ou égal à 0.028, sont inclus dans l'inférence multimodèle. Huit modèles issus de l'ensemble défini en 1.a ont été inclus dans cette méthode, il s'agit des modèles M1 à M8 définis en annexe 20.

b - Estimations des proportions d'individus positifs

La méthode d'inférence multimodèle a permis le calcul de 42 estimations de probabilités « être infecté » sous différentes modalités (annexe 25). Les cinq variables explicatives sont incluses dans les huit modèles utilisés pour ces estimations. Un exemple de calcul de ces estimations est présenté annexe 30.

c - Calcul d'incertitude relative à l'inférence multimodèle

Le pourcentage d'incertitude lié à la sélection de modèles dans l'inférence multimodèle varie entre 25% (modalité « femelles campagnols matures l'automne au site B ») et 235% (modalité « mulots mâles immatures en automne au site B »). Ce pourcentage est en moyenne de 113%, avec une médiane à 97% (annexe 26).

Lors du calcul des erreurs standards des modèles inclus dans l'inférence, le second modèle «Sexe*Saison + Espèce» présente des erreurs standards élevées pour certaines modalités. Elles sont de: (1) 0.2 pour « mâles crocidures l'automne », (2) 0.12 pour « mâles mulots en automne », (3) 0.3 pour « mâles campagnols en été », (4) 0.5 pour « mulots mâles

l'été ». Il s'agit de modalités pour lesquelles respectivement : (1) 6 individus étaient infectés sur 19 capturés, (2) 4 individus étaient infectés sur 13 capturés, (3) 4 individus étaient infectés sur 10 capturés et (4) 6 individus étaient infectés sur 8 capturés. Ces proportions d'individus infectés observées sur de petits effectifs sont relativement élevées.

Les erreurs standards élevées pour ces modalités sont responsables de pourcentages d'incertitudes de l'inférence multimodèle élevés (annexe 27). La variance ajoutée par la sélection de modèles est importante.

Les intervalles de confiance autour des estimations par inférence multimodèle sont larges, approximativement de [0 ;0.9] (figure 14 et annexe 28).

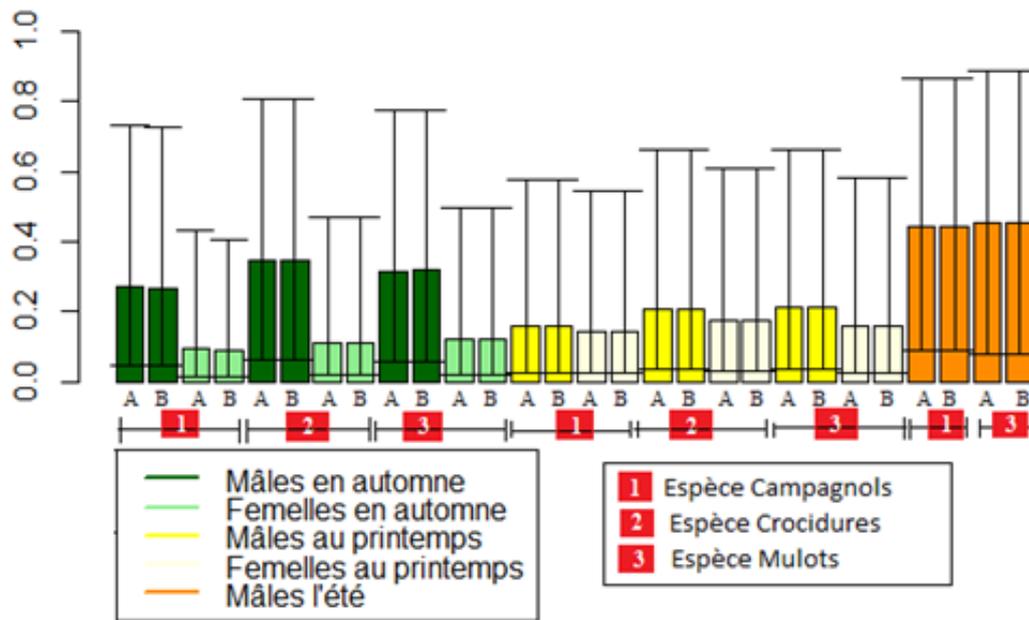


Figure 13. Représentation graphique des estimations issues de l'inférence multimodèle pour le stade de maturité sexuelle immature

d - Comparaison des résultats du meilleur modèle de régression logistique avec ceux de l'inférence multimodèle

Le critère d'inclusion des modèles à poids d'Akaike supérieur à 10% du poids d'Akaike du meilleur modèle a inclus dans la méthode d'inférence multimodèle des modèles à quatre variables explicatives, avec interaction. L'augmentation du nombre de variables explicatives incluses dans l'inférence multimodèle, sur un jeu d'échantillonnage de petite taille, ajoute une variance due à la sélection de modèles élevée à la variance d'échantillonnage. Les estimations issues de l'inférence multimodèle sont associées à une forte incertitude.

Les intervalles de confiance autour des cinq proportions d'individus infectés attendues par le modèle de régression logistique de Firth «Sexe*Saison» sont moins larges que dans le cadre de l'inférence multimodèle. La largeur de ces intervalles varie entre 0.05 et 0.21 (annexe 23). La marge d'erreur autour de ces résultats est moins importante.

V. Discussion

Les objectifs de cette étude ont été de décrire les caractéristiques et l'écologie du portage de leptospires par des populations de petits mammifères, en zones d'élevage bovin. Une analyse descriptive de la distribution des individus infectés dans l'échantillon a permis de dégager des facteurs écologiques et populationnels. La variation des proportions d'individus infectés selon ces facteurs a été estimée à l'aide d'une étude analytique.

Prévalences et souches de leptospires circulantes

Le portage de leptospires par les petits mammifères dans ce contexte d'élevage bovin a été estimé à 22% (IC95% [11% ; 29%]). Ce résultat est relativement élevé, en regard de la prévalence observée de 10% par Mayer-Scholl et al. (2014), sur les espèces *Apodemus flavicollis*, *Clethrionomys glareolus* et *Microtus agrestis*. Une prévalence observée similaire, de 21.5%, a été décrite sur les espèces *Myodes glareolus*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus agrarius*, *Apodemus sylvaticus*, *Sorex araneus*, *Microtus arvalis*, *Microtus agrestis* et *Muscardinus avellanarius* (Tokarz et al., 2016). Les prévalences observées par cette étude sur petits mammifères restent inférieures à celles observées sur l'espèce *Rattus norvegicus*, notamment de 34.7% en France métropolitaine (Aviat et al., 2009).

La proportion d'individus infectés pour l'espèce *Myocastor coypus* a été estimée à 21% (IC95% [9.8% ; 38.4%]). Ce résultat est plus élevé que les prévalences décrites par d'autres études, observées entre 3.3% et 16.5% (Aviat et al., 2009; Michel et al., 2001; Vein et al., 2014). La proportion d'individus infectés observée pour l'espèce *Marta foina*, de 14% (IC95% [2% ; 40%]), est similaire à celle observée par une étude antérieure qui était de 12.1% (Ayrat et al., 2016).

L'espèce de *Leptospira* majoritairement identifiée chez les petits mammifères a été *L. interrogans*, suivie de *L. kirschneri*. *L. interrogans* n'a été identifiée que chez les mulots. L'étude d'Obiegala et al. (2016) en Allemagne a mis en évidence une prédominance de l'espèce *L. kirschneri*, parmi les petits mammifères, notamment pour les espèces *Sorex araneus*, *Apodemus flavicollis*, *Myodes glareolus*, *Microtus Arvalis*, *Crocidura russula*, *Arvicola terrestris* et *Arvicola agrarius* (Obiegala et al., 2016). L'absence de *L. interrogans* parmi l'échantillon présenté dans Obiegala et al. et sa prédominance dans celui de la présente étude, en particulier parmi les mulots, suggèrent une variation spatiale des leptospires portées parmi les espèces de petits mammifères.

L. kirschneri a été identifié chez toutes les espèces de petits mammifères. Cette souche serait commune aux espèces partageant un même habitat, ici l'environnement d'élevage. Chacune des espèces de petits mammifères serait adaptée au portage de l'espèce *L. kirschneri*. Cette observation serait à préciser à l'aide d'identifications moléculaires par séquençage total ou partiel des souches de cette espèce.

L'hypothèse d'un portage spécifique de *L. borgpeterseni* par les individus du genre *Apodemus* a été soulevée par Obiegala et al (2016). Nos résultats, sont eux, en faveur d'un portage spécifique de *L. interrogans* par les individus du genre *Apodemus* (*A. flavicollis* et/ou *A. sylvaticus*). Le portage spécifique du genre *Apodemus* est suggéré à la fois par cette étude et les résultats d' Obiegala et al (2016). La différence d'espèces de *Leptospira* identifiées peut s'expliquer par un environnement différent, notre étude se situant dans un contexte d'élevage.

Caractéristiques des populations de petits mammifères infectées aux leptospires

Une variation du taux de portage bactérien par espèce de petits mammifères était attendue. Toutefois, elle n'a pas été observée par notre étude. Des variations de proportions d'individus infectés par genres ont été observées par Mayer-Scholl et al. (2004) : de 11% (n=2272) pour *Apodemus spp.*, 13% (n=1394) pour *Microtus spp.* et de 20% (n=30) pour *Crocidura*. Une taille d'échantillon plus importante permettrait de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse biologique d'une variation du taux de portage entre espèces de petits mammifères.

Aucune variation du taux de portage en fonction du stade de maturité sexuelle n'a été mise en évidence. Le stade de maturité sexuelle et le poids sont deux indicateurs pour estimer l'âge des individus. L'étude de Fischer (2018) suggérait une prévalence plus élevée pour les individus plus lourds, et ce plus particulièrement pour les espèces *Microtus arvalis* et *Microtus agrestis* (Fischer et al., 2018). L'hypothèse que les animaux lourds, donc âgés, étaient plus longtemps exposés avait été suggérée. Dans cette étude, des individus immatures ont été capturés sur l'ensemble des sessions, l'hypothèse d'une reproduction continue sur deux années, en conditions favorables, pouvant expliquer cette observation. La dynamique de reproduction, continue au lieu d'être saisonnière, peut avoir eu un impact sur l'exposition des individus immatures et matures. Il serait intéressant d'analyser les données selon la variable poids des individus afin d'observer si le taux de portage varie en fonction.

Aucune variation de la prévalence en fonction du sexe n'a été jusqu'à maintenant rapportée chez les petits mammifères. Dans l'étude de Fischer et al. (2018), le sexe n'était pas associé à une variation de la prévalence de *Leptospira* pour les espèces du genre *Microtus*. D'après les résultats de notre étude analytique, les mâles seraient davantage exposés au risque d'infection par les leptospires. Une hypothèse, explicitée par Desvars et al. (2013) sur l'espèce *Rattus rattus*, serait que les individus mâles, plus gros, présentent des reins plus développés et sujets au portage de leptospires.

Infections pulmonaires aux leptospires

Les poumons de petits mammifères ont été testés par PCR point final à titre exploratoire au cours de cette étude. Le taux de portage pulmonaire de leptospires par les petits mammifères a été observé à 32% (IC95% [20% ; 48%]). Un individu de l'espèce *Rattus norvegicus* et trois individus de l'espèce *Myocastor coypus* étaient infectés au niveau pulmonaire. Le portage pulmonaire de leptospires concernerait plusieurs espèces de la faune sauvage, et ceci dans une proportion non négligeable. L'observation de la présence de *Leptospira* dans les poumons soulève des questions à la fois sur les mécanismes de ce portage et sur les conséquences en termes de voies d'excrétions.

Ecologie de l'infection par les leptospires en population de petits mammifères

Dans cette étude, la proportion d'individus infectés la plus élevée a été observée l'été pour les petits mammifères mâles. L'augmentation du nombre d'individus infectés à cette saison correspond à la variation observée en Hongrie par Kurucz et al. (2018) sur les espèces *Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *Microtus arvalis*, and *Myodes glareolus* (Kurucz et al., 2018). L'étude de Fischer (2018), réalisée en Allemagne, a mis en évidence un pic saisonnier l'automne pour les proportions d'individus infectés parmi les espèces *Microtus arvalis* et *Microtus agresti*, tandis que l'espèce *Sorex araneus* était à risque d'infection plus

élevé l'été. Les cycles biologiques des petits mammifères étant différents les uns des autres, il peut être suggéré que la prévalence aux leptospires varie en fonction du climat et du cycle de l'espèce. Le résultat de notre étude suggère un taux de portage plus élevé l'été, toutes espèces confondues. Il serait intéressant d'explorer les variations du portage rénal en fonction des saisons et des espèces, afin de mesurer plus précisément l'impact de la saison sur le portage rénal en fonction de l'espèce considérée.

Aucune variation spatiale de la distribution des individus infectés aux leptospires n'a été mise en évidence à l'échelle de cette étude. La zone d'étude était limitée. Une étude à plus grande échelle permettrait de confirmer ou d'infirmer l'absence de variation spatiale de la distribution des individus infectés, en région tempérée et dans un contexte d'élevage bovin.

SérogroupeS identifiés par méthodes moléculaires

Le profil génétique obtenu par VNTR sur les souches appartenant à l'espèce *L. interrogans* est identique à celui de souches de référence du sérovar Bratislava, du séro groupe Australis. D'après les résultats d'une méthode interne en cours de développement, des profils génétiques non interprétables par VNTR seraient apparentés au séro groupe Grippotyphosa. Ces profils ont été identifiés sur deux individus du genre *Apodemus*. Les deux sérogroupeS mis en évidence sur cette espèce ont été identifiés par MAT dans les élevages bovins de la zone d'étude (Delaborde H., 2019). L'existence de sérogroupeS communs entre les espèces de la faune sauvage, dont plus particulièrement le genre *Apodemus*, et les animaux d'élevage est en faveur de l'hypothèse d'une transmission de leptospires au sein du même environnement.

Modèles analytiques

L'analyse des données a été réalisée à partir de régressions logistiques de Firth et par inférence multimodèle. La régression logistique de Firth du modèle avec interaction sexe et saison permet d'identifier des saisons estimées plus à risque d'infection des hôtes en fonction de leur sexe.

Pour ce jeu de données, le meilleur modèle présente un AICc proche des autres modèles de l'ensemble de sélection (delta AICc de 0.96 avec le second modèle du classement), la notion de « meilleur » modèle issu de la sélection est à relativiser.

Le recours à l'inférence multimodèle a permis d'inclure les estimations de sept autres modèles de l'ensemble, et de prendre en compte des variables explicatives que le modèle interaction sexe et saison, par définition, ne prenait pas en compte. L'incertitude due à la sélection de modèles limite l'interprétation de ces estimations.

Le modèle interaction sexe et saison avec la variable espèce en additif est précisément le modèle qui ajoute de l'incertitude aux estimations de l'inférence multimodèle pour certaines modalités. L'espèce crocidure n'a pas été capturée de manière régulière, et n'était pas ciblée par le protocole. Le jeu de données est déséquilibré pour la variable espèce.

L'ensemble de modèles testés par sélection sur AICc inclut 19 modèles, univariés et multivariés. Afin d'améliorer la sélection de modèle, l'étape de définition de l'ensemble de modèles pourrait être reprise sous deux contraintes : se limiter à des modèles simples et se limiter dans le nombre de modèles de l'ensemble. En effet, un ensemble de modèles plus sélectif, pour ce jeu de données, permettrait éventuellement d'obtenir de meilleures estimations, pour un pourcentage d'incertitude moindre, par inférence multimodèle.

VI. Conclusion

La présente étude a permis de décrire l'écologie et les caractéristiques du portage de *Leptospira* par des populations de petits mammifères issues de zones d'élevage.

Les prévalences observées sont élevées, et similaires entre les trois espèces cibles, mulots, campagnols et crocidures. Les résultats sont en faveur de la circulation de leptospires du sérotype Australis, également identifiées dans ces élevages, parmi les petits mammifères de la faune sauvage. *L. interrogans* apparenté au sérotype Australis n'a été identifié que chez les mulots (genre *Apodemus*). Le rôle de cette espèce dans la contamination du milieu et dans la transmission indirecte de leptospires aux bovins est donc à explorer.

Les résultats de l'étude analytique suggèrent une variation du taux de portage des petits mammifères selon le sexe et la saison. Les petits mammifères mâles en été seraient les individus les plus à risque d'être infecté, et de contaminer l'environnement.

Pour un élevage bovin, l'été serait la saison la plus à risque de contamination du troupeau en pâtures ou par l'intermédiaire de sources d'abreuvement souillées par des urines de petits mammifères infectés. Les recommandations en élevage seraient d'éviter les pâtures humides l'été, proches de cours d'eau, et de renouveler les sources d'abreuvement régulièrement. Des mesures d'hygiène (nettoyage régulier des mains et du matériel) et le port de gants seraient à recommander, en cas d'élevages exposés, ceci plus particulièrement en été.

Les résultats de ce volet d'étude suggèrent une variabilité du portage de *Leptospira* par les petits mammifères selon des facteurs écologiques et populationnels. Dans le prolongement de cette étude, et en regard des résultats, il serait intéressant :

- d'effectuer cette étude sur une durée plus longue pour obtenir un échantillonnage plus grand et plus représentatif,
- d'intégrer une analyse des variables écologiques, afin d'affiner la compréhension de la variation saisonnière observée.

Les leptospires identifiées sont également pathogènes pour l'Homme. La compréhension du cycle épidémiologique des leptospires dans le contexte de l'élevage permettra également de mieux prévenir l'exposition des personnes en plus de celle des animaux d'élevage selon une approche « une seule santé ».

Bibliographie

- Abadia G., 2005. Andre-Fontaine G., Baranton G., Bonnier M., Dantoine F., Capek I., Estavoyer J.M., Languille J., Lesrasle S., Morer I., Rousseau E., Knauer A., Rapport du Groupe de Travail du Conseil supérieur d'hygiène publique de France. « Nouvelles recommandations relatives à la prévention du risque chez les personnes exposées à la leptospirose ».
- Adler, B., de la Peña Moctezuma, A., 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140, 287–296.
- Andre-Fontaine, G., Aviat, F., Thorin, C., 2015. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water. *Curr. Microbiol.* 71, 136–142.
- Andre-Fontaine G., , D. Nicholas, B. Scalzo, A. Keïta, et I. Nanjiani. 2010., n.d. « Prévalence sérologique de la leptospirose à *Leptospira* sérovar hardjo chez les bovins femelles adultes en France en 2004 ». *Bulletin des GTV*, no 55: 67-74.
- Aviat, F., Blanchard, B., Michel, V., Blanchet, B., Branger, C., Hars, J., Mansotte, F., Brasme, L., De Champs, C., Bolut, P., Mondot, P., Faliu, J., Rochereau, S., Kodjo, A., Andre-Fontaine, G., 2009. *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 463–476.
- Ayral F., 2013. “La leptospirose dans les cheptels bovins laitiers en France : impact économique de l’infection” *Bulletin GTV n°69*; pages 61-63.
- Ayral, F.C., Bicout, D.J., Pereira, H., Artois, M., Kodjo, A., 2014. Distribution of *Leptospira* Serogroups in Cattle Herds and Dogs in France. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 91, 756–759.
- Ayral, F., Djelouadji, Z., Raton, V., Zilber, A.-L., Gasqui, P., Faure, E., Baurier, F., Vourc’h, G., Kodjo, A., Combes, B., 2016. Hedgehogs and Mustelid Species: Major Carriers of Pathogenic *Leptospira*, a Survey in 28 Animal Species in France (20122015). *PLOS ONE* 11, e0162549.
- Ayral, F., Kodjo, A., Guédon, G., Boué, F., Richomme, C., 2020. Muskrats are greater carriers of pathogenic *Leptospira* than coypus in ecosystems with temperate climates. *PLOS ONE* 15, e0228577.
- Ayral, F., Zilber, A.-L., Bicout, D.J., Kodjo, A., Artois, M., Djelouadji, Z., 2015. Distribution of *Leptospira interrogans* by Multispacer Sequence Typing in Urban Norway Rats (*Rattus norvegicus*): A Survey in France in 2011-2013. *PLOS ONE* 10, e0139604.
- Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E., Vinetz, J.M., 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* 3, 757–771.

- Blackmore D. K., Hathaway S. C., 1979. "The nidity of Zoonoses" Proceedings of the 2nd International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, 1979.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R. (Eds.), 2004. Model Selection and Multimodel Inference. Springer New York, New York, NY.
- Costa, F., Wunder, E.A., De Oliveira, D., Bisht, V., Rodrigues, G., Reis, M.G., Ko, A.I., Begon, M., Childs, J.E., 2015. Patterns in *Leptospira* Shedding in Norway Rats (*Rattus norvegicus*) from Brazilian Slum Communities at High Risk of Disease Transmission. PLoS Negl. Trop. Dis. 9, e0003819.
- Darras C., 2004. « Etude comparée des séroprévalences vis-à-vis des leptospires des rongeurs aquatiques et des bovins (à partir d'une enquête menée sur 26 départements) ». Thèse d'exercice vétérinaire n°63, soutenue le 24 mars 2004.
- Delaborde H., 2019. « Exposition et infection par les leptospires pathogènes en élevages bovins : étude de terrain dans l'Ouest Lyonnais, indicateurs du risque d'exposition et rôle de la faune sauvage », Thèse d'exercice vétérinaire, soutenue en novembre 2019.
- Desvars, A., Michault, A., Chiroleu, F., 2013. Influence of risk factors on renal leptospiral load in naturally infected wild black rats. Acta Trop. 125, 258–261.
- Ellis, W.A., 2015. Animal Leptospirosis. In: Adler, B. (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 99–137.
- Ellis, W., O'Brien, J., Bryson, D., Mackie, D., 1985. Bovine leptospirosis: some clinical features of serovar hardjo infection. Vet. Rec. 117, 101–104.
- Fávero, J.F., de Araújo, H.L., Lilenbaum, W., Machado, G., Tonin, A.A., Baldissera, M.D., Stefani, L.M., Da Silva, A.S., 2017. Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. Microb. Pathog. 107, 149–154.
- Firth, D., 1993. Bias reduction of maximum likelihood estimates. Biometrika 80, 27–38.
- Fischer, S., Mayer-Scholl, A., Imholt, C., Spierling, N.G., Heuser, E., Schmidt, S., Reil, D., Rosenfeld, U.M., Jacob, J., Nöckler, K., Ulrich, R.G., 2018. *Leptospira* Genomespecies and Sequence Type Prevalence in Small Mammal Populations in Germany. Vector-Borne Zoonotic Dis. 18, 188–199.
- Francois Barbagelata, S., Brihuega Fernández, B., Grune Loffler, S., Gattarello Marcos, V., Correa Pérez, D., Petrakovsky Melillo, J., Gualtieri Serragatta, C., Arestegui De Luca, M., 2013. Aislamiento de *Leptospira borgpetersenii* de fuentes de agua en Argentina. Rev. Cubana Med. Trop. 65, 177–184.
- Fromental P., 2004. « Infection des rongeurs sauvages par les leptospires en Nord-Isère : Etude comparée de la prévalence sérologique et du portage rénal ». Thèse d'exercice vétérinaire n°17, soutenue le 22 janvier 2004.
- Gazso F., 2017. « Distribution des sérogoupes de *Leptospira* chez les bovins en France métropolitaine. » Rapport de master Physiopathologie des maladies transmissibles. Université Lyon 1.

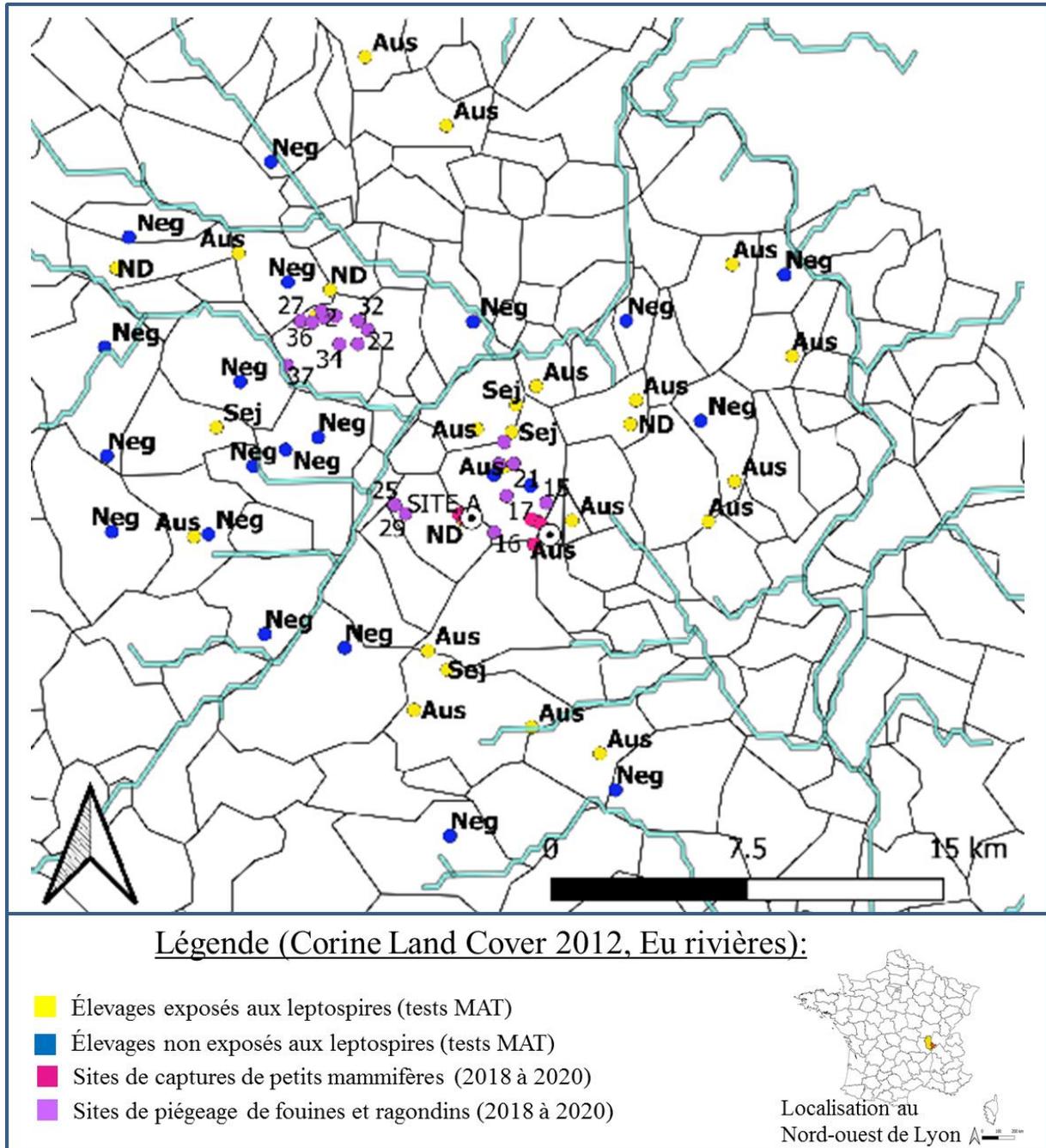
- Gomes, D.O., Chagas, L.G. da S., Ramos, G.B., Ciuffa, A.Z., Rezende, L.M., Cuccato, L.P., Reis, T.F.M. dos, Pires, B.C., Lima, A.M.C., 2018. Biofilm Production of *Leptospira* spp. Strains. *Acta Sci. Vet.* 46, 5.
- Kurucz, K., Madai, M., Bali, D., Hederics, D., Horváth, G., Kemenesi, G., Jakab, F., 2018. Parallel Survey of Two Widespread Renal Syndrome-Causing Zoonoses: *Leptospira* spp. and *Hantavirus* in Urban Environment, Hungary. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 18, 200–205.
- Leonard, F., Quinn, P., Ellis, W., O'Farrell, K., 1992. Duration of urinary excretion of leptospire by cattle naturally or experimentally infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Vet. Rec.* 131, 435–439.
- Levett, P.N., 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 296–326.
- Levett, P.N., 2003. Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.* 36, 447–452.
- Levett, P.N., 2015. Systematics of Leptospiraceae. In: Adler, B. (Ed.), *Leptospira and Leptospirosis*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 11–20.
- Levett, P.N., Walton, D., Waterman, L.D., Whittington, C.U., Mathison, G.E., Everard, C.O., Edwards, C.O., 1998. Surveillance of leptospiral carriage by feral rats in Barbados. *West Indian Med. J.* 47, 15–17.
- Machang'u, R., Mgode, G., Assenga, J., Mhamphi, G., Weetjens, B., Cox, C., Verhagen, R., Sondij, S., Goris, M., Hartskeerl, R., 2004. Serological and molecular characterization of leptospira serovar Kenya from captive African giant pouched rats (*Cricetomys gambianus*) from Morogoro Tanzania. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41, 117–121.
- Masri, S.A., Nguyen, P.T., Gale, S.P., Howard, C.J., Jung, S.C., 1997. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Veterinaire* 61, 15–20.
- Mayer-Scholl, A., Hammerl, J., Schmidt, S., Ulrich, R., Pfeffer, M., Woll, D., Scholz, H., Thomas, A., Nöckler, K., 2014. *Leptospira* spp. in Rodents and Shrews in Germany. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 11, 7562–7574.
- Mérien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., Saint Girons, I., 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2219–2224.
- Messaoud, K., 2017. «Leptospirose bovine en France métropolitaine : Séroprévalence et Facteurs de risques», Rapport de master Physiopathologie des maladies transmissibles : université Lyon 1, 43.
- Michel, V., Ruvoen-Clouet, N., Menard, A., Sonrier, C., Fillonneau, C., Rakotovao, F., Ganière, J.P., André-Fontaine, G., 2001. Role of the coypu (*Myocastor coypus*) in the epidemiology of leptospirosis in domestic animals and humans in France. *Eur. J. Epidemiol.* 17, 111–121.

- Miller, M.D., Annis, K.M., Lappin, M.R., Lunn, K.F., 2011. Variability in Results of the Microscopic Agglutination Test in Dogs with Clinical Leptospirosis and Dogs Vaccinated against Leptospirosis: Canine Leptospirosis MAT Variability. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 426–432.
- Obiegala, A., Woll, D., Karnath, C., Silaghi, C., Schex, S., Eßbauer, S., Pfeffer, M., 2016. Prevalence and Genotype Allocation of Pathogenic *Leptospira* Species in Small Mammals from Various Habitat Types in Germany. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004501.
- Picardeau, M., 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine Mal. Infect.* 43, 1–9.
- Quéré Jean-Pierre, Henri Le Louarn, n.d. Les rongeurs de France - Faunistique et biologie. 3ème édition Collection Guide pratique.
- Ristow, P., Bourhy, P., Kerneis, S., Schmitt, C., Prevost, M.-C., Lilenbaum, W., Picardeau, M., 2008. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology* 154, 1309–1317.
- Salaun, L., Merien, F., Gurianova, S., Baranton, G., Picardeau, M., 2006. Application of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Molecular Typing of the Agent of Leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3954–3962.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Tokarz, R., Markotić, A., Margaletić, J., Lipkin, W.I., Habuš, J., Jain, K., Turk, N., Svoboda, P., Vucelja, M., Desai, A., Tadin, A., 2016. Molecular Survey of Zoonotic Agents in Rodents and Other Small Mammals in Croatia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 466–473.
- Trap D., 1988. «Les petits mammifères sauvages, source de leptospirose», *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1988, 7 (4), 885-892.
- Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., Cullen, P., Haake, D., 2004. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* 7, 35–40.
- Vein, J., Leblond, A., Belli, P., Kodjo, A., Berny, P.J., 2014. The role of the coypu (*Myocastor coypus*), an invasive aquatic rodent species, in the epidemiological cycle of leptospirosis: a study in two wetlands in the East of France. *Eur. J. Wildl. Res.* 60, 125–133.
- Vincent, A.T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V.K., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Mohd Khalid, M.K.N., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Amara Korba, A., Bourhy, P., Veyrier, F.J., Picardeau, M., 2019. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007270.
- Yusof, M.A., Mohd-Taib, F.S., Ishak, S.N., Md-Nor, S., Md-Sah, S.A., Mohamed, N.Z., Azhari, N.N., Neela, V., Sekawi, Z., 2019. Microhabitat Factors Influenced the

Prevalence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Small Mammal Host. *EcoHealth* 16, 260–274.

Zilber, A.-L., Belli, P., Artois, M., Kodjo, A., Djelouadji, Z., 2016. First Observation of *Leptospira interrogans* in the Lungs of *Rattus norvegicus*. *BioMed Res. Int.* 2016, 1–8.

Annexes



Annexe 1. Distribution spatiale des sites d'étude : résultats sur les élevages bovins (négatif, séro groupe Australis, séro groupe Sejroe), numéros d'individus fouines et ragondins, sites de captures de petits mammifères (CLC 2012, Eu Rivières 2015)

Genre	Nom commun	Critères de reconnaissance phénotypique	Longueur (tête et thorax)	Longueur de la queue	Poids à la naissance	Poids adulte	Période de natalité	Age de maturité sexuelle
<i>Crocidura</i>	Crocidure	Museau pointu, oreilles ramassées, pelage uniforme, queue unicolore	0,4 à 0,6 cm	30 à 46mm	0,25g	8,5 à 13g	Avril à août	1 an
<i>Apodemus</i>	Mulot sylvestre	Grandes oreilles, queue plus longue que le corps	9,5 à 11 cm	6.9 à 11.5cm	1 à 2g	15 à 30g	Mars à octobre	Moins d'un an
<i>Microtus</i>	Campagnol des champs	Queue plus courte que le corps, petits yeux et petits oreilles dépilées	9 à 12 cm	3 à 4.5 cm	2g	35 à 45g	Février à décembre	30 jours
<i>Clethrionomys</i>	Campagnol roussâtre	Idem que celui des champs, pelage du dos roux	9 à 12 cm	3 à 4,5 cm	2g	35 à 45g	Février à décembre	30 jours

Annexe 2. Caractéristiques macroscopiques et biologiques par genres de petits mammifères capturés (Quéré, Le Louarn, 2011)

Nom latin	Nom commun	Habitat	Comportement	Période des naissances	Périmètre d'action et densité	Longévité
<i>Crocidura russula</i>	Crocidure	Landes, prairies, lisières de bois	Territorial sauf en période de reproduction	Avril à août (2 portées par an)	100 m ² ; 12 individus/ ha maximum ; pic de population l'été, minimum l'hiver	13 mois (forte mortalité des juvéniles)
<i>Apodemus</i>	Mulot	Bois, champs, haies	Territorial l'été et non l'hiver	Mars à octobre (pic en juillet/août)	100 m ² ; jusque 100 individus/ha (espèce prolifique)	12 à 18 mois
Genres <i>Arvicola</i> et <i>Microtus</i>	Campagnol	Prairies pâturées, zones de culture	Territorial l'été (portées)	Février à décembre	1500m ² mâles et 350m ² femelles ; NR	19 mois
<i>Myocastor</i> <i>Coypus</i>	Ragondin (maturité sexuelle à 6 mois)	Berges, marais, zones de culture	Crépusculaire et nocturne,	Début automne et fin de l'hiver	1.5 ha ; NR (espèce prolifique)	4 à 5 ans
<i>Marta Foina</i>	Fouine (maturité sexuelle à 1-2ans)	Lisières de bois	Nocturne, solitaire (conflits intra-spécifiques fréquents)	Printemps de l'année n+1	80 ha de domaine vital (variable), NR	Jusque 8 ans

Annexe 3. Caractéristiques biologiques et comportementales des espèces de l'étude (Quéré, Le Louarn, 2011)



Annexe 4. Exemple de pose de pièges pour la session de captures numéro 4 au site A



Annexe 5. Exemple de pose de pièges pour la session de captures numéro 4 au site B

Site A	Session	Mulot	Campagnol	Crocidure	Total
	1	0.11, x=2 n=19 [0.03 ; 0.31]	0.08, x=1 n=13 [0.01 ; 0.33]	0.14, x=1 n=7 [0.03 ; 0.51]	0.10, x=4 n=39 [0.04 ; 0.24]
	2	0.33, x=1 n=3 [0.06 ; 0.79]	0, x=0 n=1 [0 ; 0.79]	NR	0.25, x=1 n=4 [0.46 ; 0.70]
	3	0.1, x=1 n=10 [0.02 ; 0.40]	0, x=0 n=2 [0 ; 0.66]	NR	0.08, x=1 n=12 [0.15 ; 0.35]
	4	0.5, x=2 n=4 [0.15 ; 0.85]	0, x=0 n=7 [0 ; 0.35]	NR	0.18, x=2 n=11 [0.05 ; 0.48]
	5	0.29, x=2 n=7 [0.08 ; 0.64]	0, x=0 n=4 [0 ; 0.49]	1, x=1 n=1 [0.21 ; 0.1]	0.25, x=3 n=12 [0.09 ; 0.53]
	6	0.6, x=3 n=5 [0.23 ; 0.88]	NR	NR	0.6, x=3 n=5 [0.23 ; 0.88]
	7	1, x=1 n=1 [0.21 ; 0.1]	NR	0.33, x=1 n=3 [0.06 ; 0.79]	0.5, x=2 n=4 [0.15 ; 0.85]
	Toutes sessions	0.25, x=12, n=49 [0.15 ; 0.38]	0.04, x=1, n=27 [0.01 ; 0.18]	0.27, x=3, n=11 [0.10 ; 0.57]	0.18, x=16, n=87 [0.11 ; 0.28]
Site B	Session	Mulot	Campagnol	Crocidure	Total
	1	0.21, x=3 n=14 [0.08 ; 0.48]	NR	NR	0.21, x=3 n=14 [0.08 ; 0.48]
	2	NR	0.4, x=4 n=10 [0.17 ; 0.69]	NR	0.4, x=4 n=10 [0.17 ; 0.69]
	3	0.25, x=1 n=4 [0.46 ; 0.70]	0.3, x=3 n=10 [0.11 ; 0.60]	NR	0.29, x=4 n=14 [0.12 ; 0.55]
	4	NR	0, x=0 n=2 [0 ; 0.66]	NR	0, x=0 n=2 [0 ; 0.66]
	5	0.2, x=2 n=10 [0.06 ; 0.51]	0, x=0 n=3 [0 ; 0.56]	0, x=0 n=1 [0 ; 0.79]	14,29%, x=2 n=14 [4 ; 39,94]
	6	0.17, x=1 n=6 [0.03 ; 0.56]	NR	NR	0.17, x=1 n=6 [0.03 ; 0.56]
	7	0, x=0 n=3 [0 ; 0.56]	NR	0.26, x=5 n=19 [0.12 ; 0.49]	0.23, x=5 n=22 [0.10 ; 0.43]
	Toutes sessions	0.19, x=7, n=37 [0.95 ; 0.34]	0.27, x=7, n=26 [0.14 ; 0.46]	0.25, x=5, n=20 [0.12 ; 0.47]	0.23, x=19, n=82 [0.15 ; 0.33]

Annexe 6. Proportions d'individus infectés observées par espèces de petits mammifères (x=nombre d'individus infectés, n=nombre de captures)

Sites	Site A		Site B	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
1	0.16, x=3 n=19 [0.06 ; 0.38]	0.05, x=1 n=20 [0.01 ; 0.24]	0.25, x= 2 n=8 [0.07 ; 0.59]	0.17, x=1 n=6 [0.03 ; 0.56]
2	0.5, x=1 n=2 [0.09 ; 0.91]	0, x=0 n=2 [0 ; 0.66]	0.4, x=4 n=10 [0.17 ; 0.69]	NR
3	0.14 x=1 n=7 [0.03 ; 0.51]	0%, x=0 n=5 [0 ; 0.43]	0.4, x=4 n=10 [0.17 ; 0.69]	0, x=0 n=4 [0 ; 0.66]
4	0.25, x=2 n=8 [7,15 ; 59,07]	0%, x=3 n=3 [0 ; 56,15]	NR	0, x=0 n=2 [0 ; 0.49]
5	0, x=0 n=7 [0 ; 0.35]	0.4, x=2 n=5 [0.12 ; 0.77]	0, x=0 n=8 [0 ; 32,44]	0.33, x=2 n=6 [0.1 ; 0.7]
6	0.75, x=3 n=4 [0.30 ; 0.95]	0, x=0 n=1 [0 ; 0.79]	0.4, x=2 n=5 [0.12 ; 0.77]	0, x=0 n=1 [0 ; 0.79]
7	0.67, x=2 n=3 [0.21 ; 0.94]	0, x=0 n=1 [0 ; 0.79]	0.31, x=4 n=13 [0.13 ; 0.58]	0.09, x=1 n=11 [0.02 ; 0.38]
Toutes sessions	22,03% x=13, n=50 [13,35 ; 34,12]	13,51% x=6, n=37 [5,91 ; 27,98]	0.3, x=16, n=54 [0.19 ; 0.43]	0.14, x=4, n=28 [0.06 ; 0.31]

Annexe 7. Proportions d'individus infectés observées par sexe des petits mammifères (x=nombre d'individus infectés, n=nombre de captures)

Sites	Site A		Site B	
	Immatures	Matures	Immatures	Matures
1	0.14, x=2 n=14 [0.04 ; 0.40]	0.08, x=2 n=25 [0.02 ; 0.25]	0, x=0 n=4 [0 ; 0.49]	0.3, x=3 n=10 [0.11 ; 0.60]
2	1, x=1 n=1 [0.21 ; 1]	0, x=0 n=3 [0 ; 0.56]	0.25, x= 2 n=8 [0.07 ; 0.59]	0.5, x=1 n=2 [0.09 ; 0.91]
3	0.14, x=1 n=7 [0.03 ; 0.51]	0, x=0 n=5 [0 ; 0.43]	0.14, x=1 n=7 [0.03 ; 0.51]	0.29, x=2 n=7 [0.08 ; 0.64]
4	0, x=0 n=2 [0 ; 0.66]	0.22, x=2 n=9 [0.06 ; 0.55]	0, x=0 n=1 [20,65 ; 100]	0, x=0 n=1 [20,65 ; 100]
5	0.17, x=1 n=6 [0.03 ; 0.56]	0.17, x=1 n=6 [0.03 ; 0.56]	0, x=0 n=3 [0 ; 0.56]	0.18, x=2 n=11 [0.05 ; 0.48]
6	1, x=2 n=2 [0.34 ; 1]	0.33, x=1 n=3 [0.06 ; 0.79]	0, x=0 n=3 [0 ; 0.56]	0.67, x=2 n=3 [0 ; 0.49]
7	0.33, x=1 n=3 [0.06 ; 0.79]	1, x=1 n=1 [0.21 ; 1]	0.28, x=5 n=18 [0.12 ; 0.51]	0, x= 0 n=4 [0 ; 0.43]
Toutes sessions	0.2, x=7, n=35 [0.10 ; 0.36]	0.13, x=7, n=52 [0.07 ; 0.25]	0.18, x=8, n=44 [0.1 ; 0.32]	0.26, x=10, n=38 [0.15 ; 0.42]

Annexe 8. Proportions d'individus infectés observées par stade de maturité sexuelle sur les petits mammifères (x=nombre d'individus infectés, n=nombre de captures)

$$AICc = -2 \times \log(L) + 2 \times p + \left[\frac{2 \times p \times (p + 1)}{n - p - 1} \right]$$

p est le nombre de coefficients du modèle, constante incluse.

n est le nombre de lignes de données sans données manquantes

L est la fonction de vraisemblance: $L(\vartheta|y)$ probabilité des observations y selon la valeur des coefficients ϑ du modèle

Annexe 9. Définition du critère d'AICc

$$\text{logit}(\mu) = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i \times X_i$$

$$\mu = p/(1 - p)$$

β_0 intercept du modèle

β_i coefficient de la différence entre le paramètre i et celui de l'intercept

X_i variable i pour laquelle le paramètre diffère entre l'intercept et la modalité de p

Annexe 10. Formule de la fonction de lien logit

$$\text{var}(\bar{\theta}) = \sum_{i=1}^R w_i [(\hat{\theta}_i - \bar{\theta}) + \text{var}(\hat{\theta}_i | M_i)]$$

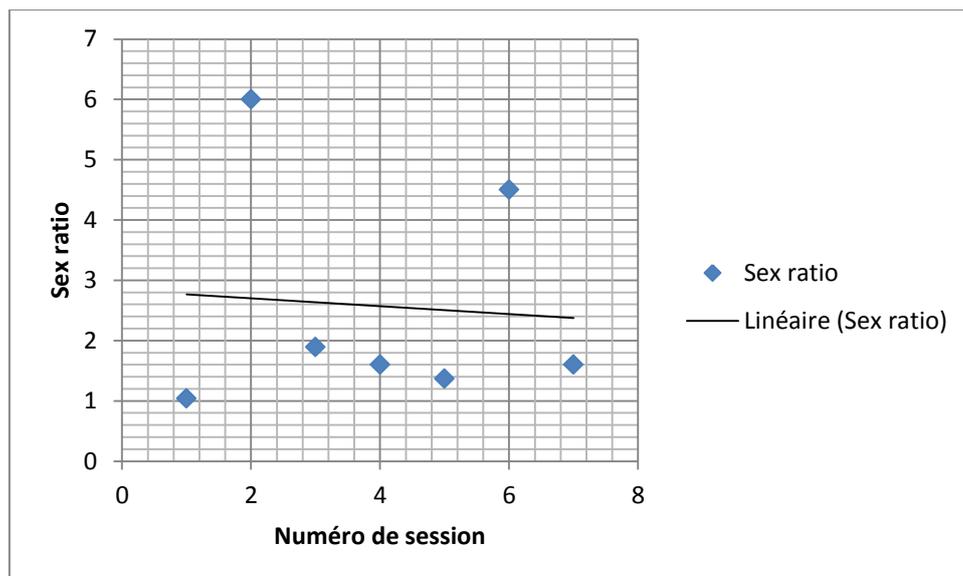
w_i poids d'Akaike du ième modèle inclus dans l'inférence modèle

$\hat{\theta}_i$ estimation par le modèle i de la probabilité θ

$\bar{\theta}$ moyenne pondérée des R probabilités θ

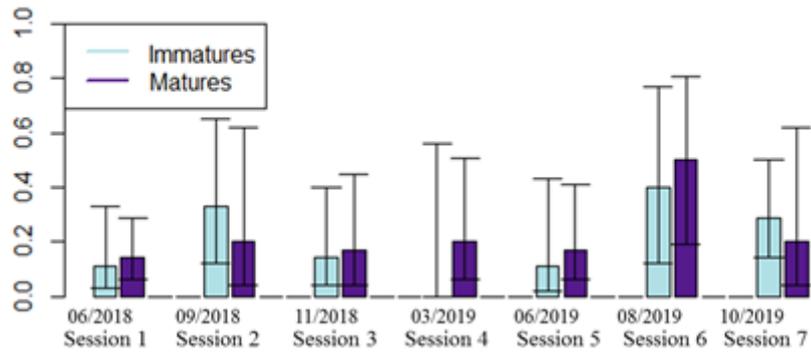
$\text{var}(\hat{\theta}_i | M_i)$ variance du modèle i autour de l'estimation $\hat{\theta}_i$ de la probabilité θ

Annexe 11. Formule de la variance inconditionnelle associée à chaque estimation de l'inférence multimodèle



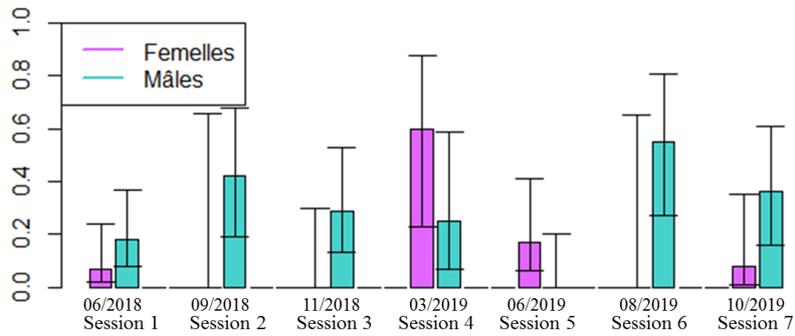
Annexe 12. Sex ratio des petits mammifères capturés au cours des sessions

Proportions d'immatures et matures infectés au cours des sessions

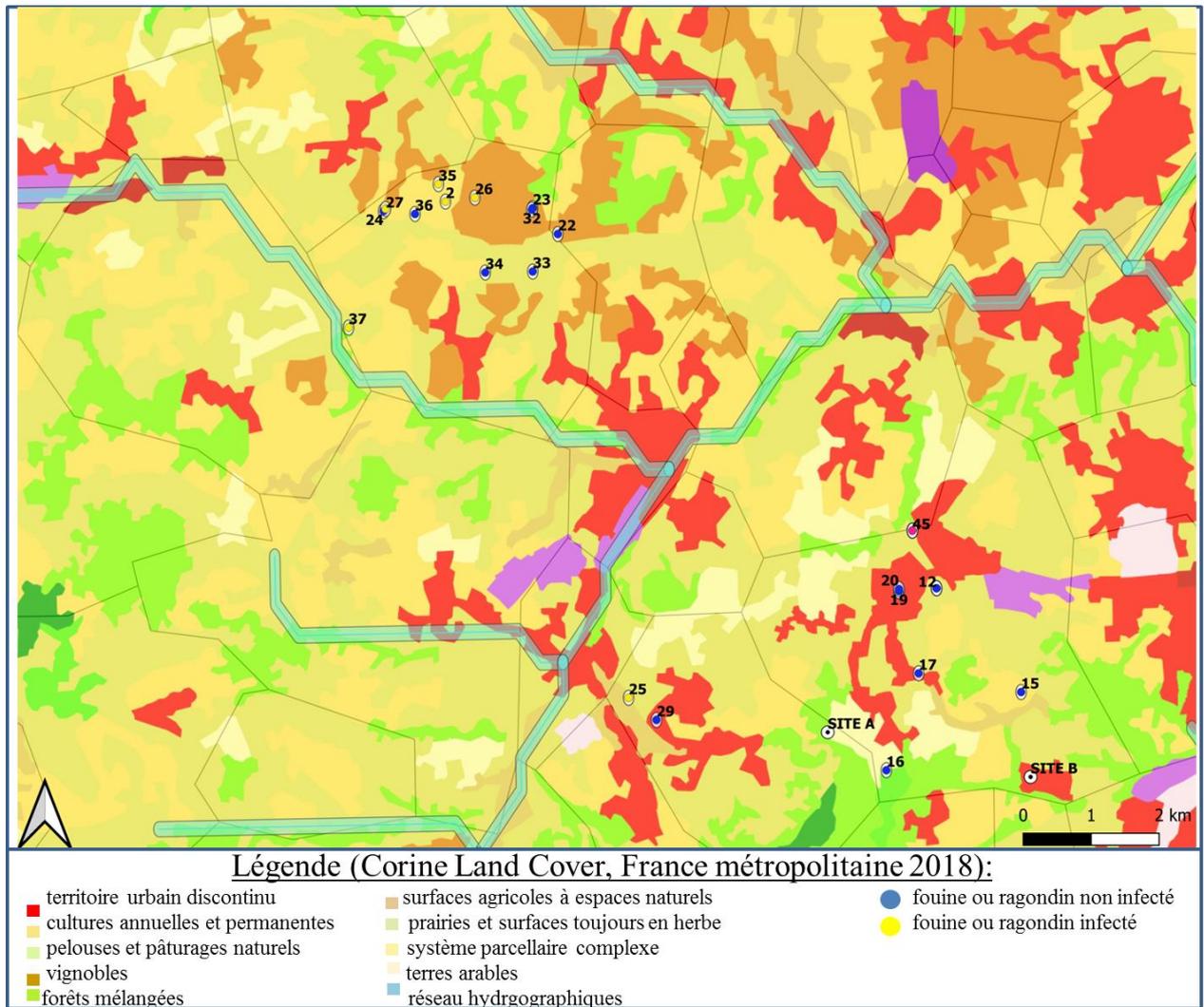


Annexe 13. Proportions de petits mammifères infectés par stade de maturité et session

Proportions de mâles et femelles infectés au cours des sessions



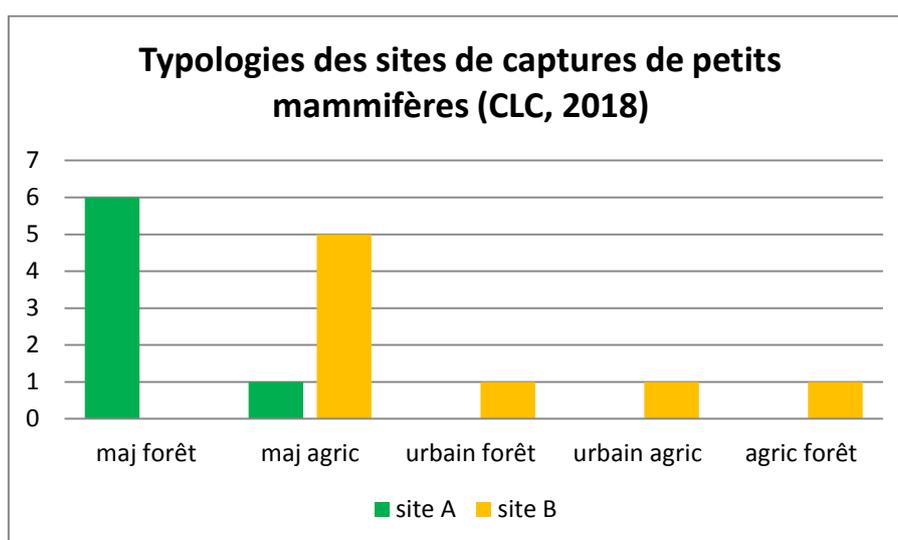
Annexe 14. Proportions de petits mammifères infectés observées par sexe au cours des sessions



Annexe 15. Représentation cartographique des sites de piégeages de fouines et ragondins et de la distribution spatiale des individus infectés (CLC 2018)

Site	Session	urbain	agricole	forêt	Utilisation du sol principale
A	1	0	0,2	0,8	forêt
A	2	0	0,1	0,9	forêt
A	3	0	1	0	agricole
A	4	0	0,2	0,8	forêt
A	5	0	0,3	0,7	forêt
A	6	0	0,6	0,4	forêt
A	7	0	0,3	0,7	forêt
A	8	0	0,6	0,4	forêt
B	1	0	1	0	agricole
B	2	0	1	0	agricole
B	3	0,6	0	0,4	urbain
B	4	0,4	0,6	0	urbain et agricole
B	5	0	1	0	agricole
B	6	1	0	0	agricole
B	7	0,8	0,2	0	agricole et forêt
B	8	0	0,5	0,5	agricole

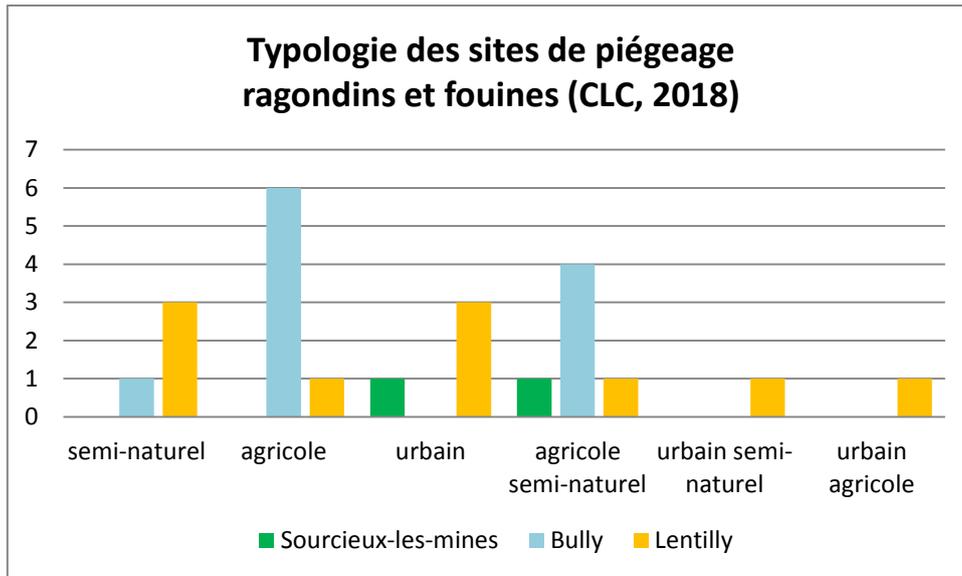
Annexe 16. Typologies des pâtures utilisées pour les captures de petits mammifères



Annexe 17. Répartition des typologies des sites de capture (CLC 2018) sur les sites A et B

Id	semi-naturel	agricole	urbain	Utilisation du sol principale
2	0	1	0	agricole
12	1	0	0	semi-naturel
13	1	0	0	semi-naturel
14	1	0	0	semi-naturel
15	0	1	0	agricole
16	0,6	0,4	0	agricole semi-naturel
17	0,4	0	0,6	urbain semi-naturel
18	0	0	1	urbain
19	0	0	1	urbain
20	0	0	1	urbain
22	0,4	0,6	0	agricole semi-naturel
24	0	1	0	agricole
25	0,4	0,6	0	agricole semi-naturel
26	0	1	0	agricole
27	0	1	0	agricole
28	0	0,6	0,4	urbain agricole
29	0	0	1	urbain
32	0	1	0	agricole
33	1	0	0	semi-naturel
34	0,4	0,6	0	agricole semi-naturel
35	0	1	0	agricole
36	0,3	0,7	0	agricole semi-naturel
37	0,8	0,2	0	agricole semi-naturel

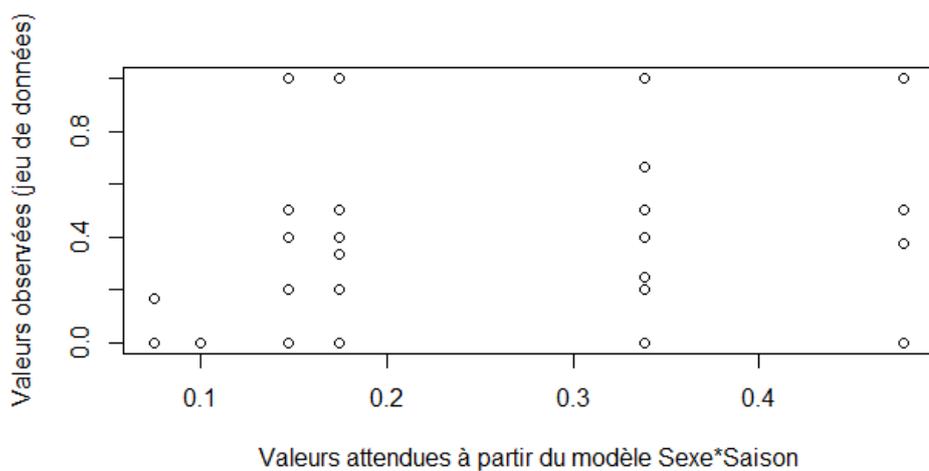
Annexe 18. Typologies des sites de captures de fouines et ragondins (CLC 2018)



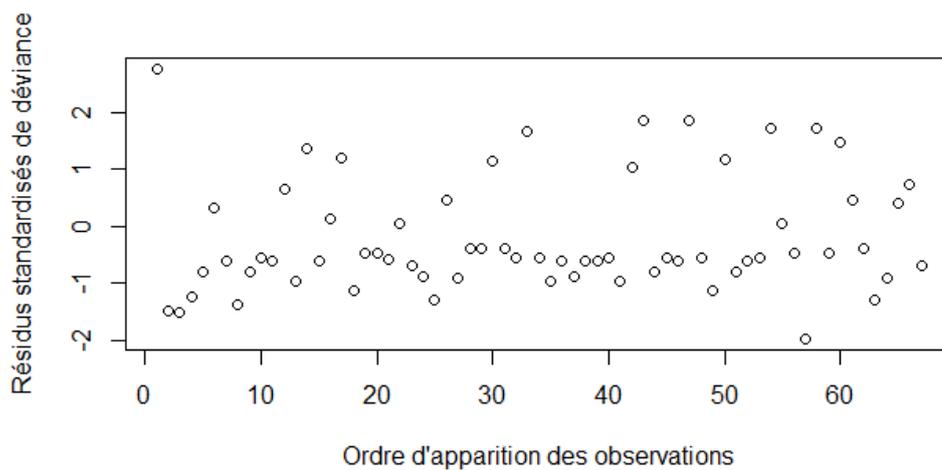
Annexe 19. Répartition des typologies des sites de piégeages de fouines et ragondins entre les 3 communes de piégeage (CLC 2018)

Numéro de modèle	Combinaison de variables explicatives du modèle	Nombre de paramètres	AICc	deltaAICc	Poids d'Akaike
M1	Sexe* Saison	6	111.78	0	0.280
M2	Sexe * Saison + Espèce	8	112.75	0.97	0.165
M3	Sexe+Saison	4	114.73	2.96	0.107
M4	Sexe	2	114.98	3.21	0.095
M5	Stade + Espèce + Saison *Sexe	9	115.25	3.58	0.083
M6	Sexe * Saison + Site	7	115.25	3.48	0.079
M7	Espèce + Site + Saison *Sexe	9	115.42	3.64	0.062
M8	Saison	3	115.82	4.05	0.042
M9	Site	2	117.49	5.72	0.022
M10	Session	7	117.90	6.12	0.018
M11	Nul	1	118.25	6.47	0.010
M12	Sexe * Site + Saison	6	119.33	7.55	0.010
M13	Stade	2	120.02	8.24	0.008
M14	Site + Saison + Espèce	6	120.11	8.34	0.008
M15	Espèce	3	120.87	9.10	0.007
M16	Stade * Saison	6	120.90	9.12	0.005
M17	Espèce * Site + Saison	8	121.92	10.14	0.005
M18	Site + Saison * Espèce	9	124.13	12.35	0.003
M19	Espèce * Site + Saison *Espèce	11	128.68	16.90	0.001

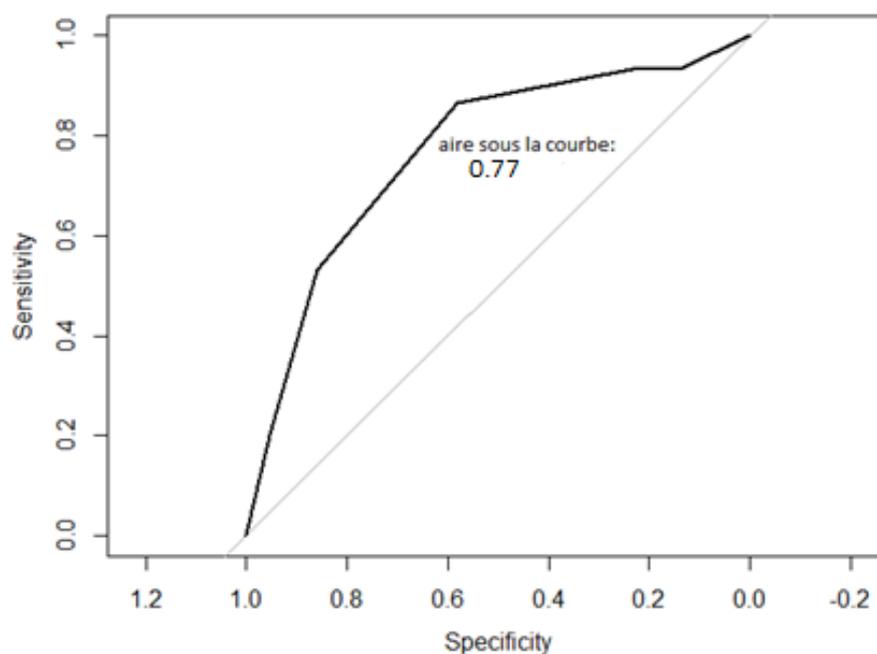
Annexe 20. Sélection par AICc à partir d'un ensemble de 19 modèles de régression logistique à réduction de biais (régressions logistiques de Firth)



Annexe 21. Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs attendues par le modèle de régression logistique de Firth « Sexe*Saison »



Annexe 22. Graphique des résidus de déviance standardisés en fonction de l'ordre d'apparition des observations pour le modèle de régression logistique de Firth « Sexe*Saison »



Annexe 23. Courbe ROC du modèle de régression logistique de Firth « Sexe*Saison »

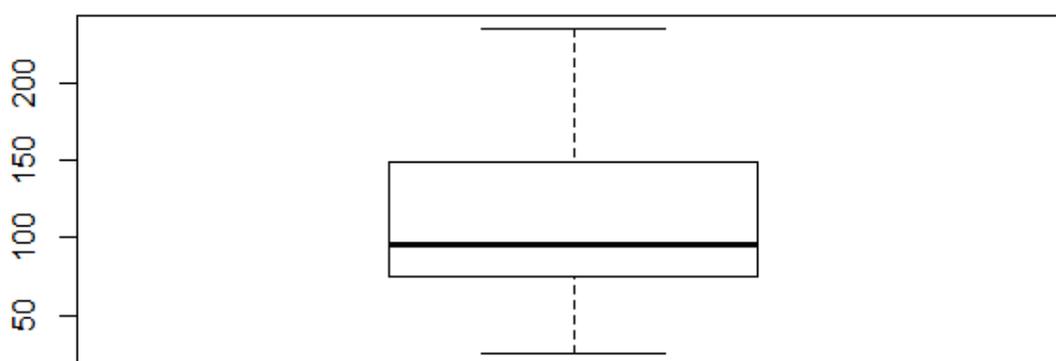
Modalité définie sur Sexe et Saison	Estimation de la probabilité d'infection par le modèle Sexe*Saison	Borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95%	Borne supérieure de l'intervalle de confiance à 95%	Largeur de l'intervalle de confiance
Mâle en automne	0,34	0,32	0,36	0.05
Femelle en automne	0,08	0,02	0,23	0.21
Mâle au printemps	0,15	0,12	0,18	0.06
Femelle au printemps	0,17	0,14	0,21	0.07
Mâle l'été	0,48	0,44	0,51	0.07

Annexe 24. Estimations des proportions d'individus infectés attendues par le modèle de régression logistique de Firth « Sexe*Saison »

Modalité définie sur Sexe, Espèce, Saison, Stade et Site	Estimation de la probabilité d'infection par inférence multimodèle	borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95%	borne supérieure de l'intervalle de confiance à 95%
mâle ca aut imm A	0,27	0,05	0,73
mâle ca aut mat A	0,28	0,05	0,74
mâle ca aut imm B	0,26	0,05	0,73
mâle ca aut mat B	0,27	0,05	0,73
femelle ca aut imm B	0,09	0,01	0,41
femelle ca aut mat B	0,09	0,01	0,41
mâle cr aut imm A	0,35	0,06	0,81
mâle cr aut imm B	0,35	0,06	0,81
femelle cr aut imm B	0,11	0,02	0,47
femelle cr aut mat B	0,11	0,02	0,46
mâle mul aut imm A	0,32	0,06	0,78
mâle mul aut mat A	0,33	0,06	0,79
mâle mul aut imm B	0,32	0,06	0,78
mâle mul aut mat B	0,33	0,06	0,78
femelle mul aut imm A	0,12	0,02	0,50
femelle mul aut mat A	0,14	0,02	0,52
femelle mul aut mat B	0,13	0,02	0,52
mâle ca pr imm A	0,16	0,03	0,58
mâle ca pr mat A	0,16	0,03	0,58
mâle ca pr mat B	0,16	0,03	0,58
femelle ca pr imm A	0,14	0,02	0,55
femelle ca pr mat A	0,15	0,02	0,55
femelle ca pr imm B	0,14	0,02	0,55
femelle ca pr mat B	0,15	0,02	0,55
mâle cr pr imm A	0,21	0,03	0,67
mâle cr pr imm B	0,21	0,03	0,67
male cr pr imm A	0,21	0,03	0,67
femelle cr pr imm A	0,17	0,03	0,61
femelle cr pr mat A	0,18	0,03	0,62
mâle mul pr imm A	0,21	0,04	0,66
mâle mul pr mat A	0,20	0,03	0,65

Modalité définie sur Sexe, Espèce, Saison, Stade et Site	Estimation de la probabilité d'infection par inférence multimodèle	borne inférieure de l'intervalle de confiance à 95%	borne supérieure de l'intervalle de confiance à 95%
mâle mul pr imm B	0,21	0,04	0,66
mâle mul pr mat B	0,20	0,03	0,65
femelle mul pr imm B	0,16	0,03	0,58
femelle mul pr mat B	0,16	0,03	0,58
mâle ca été imm B	0,44	0,09	0,87
mâle ca été mat B	0,47	0,10	0,88
mâle mul été imm A	0,46	0,08	0,89
mâle mul été mat A	0,49	0,09	0,90
mâle mul été imm B	0,46	0,08	0,89
mâle mul été mat B	0,49	0,09	0,90

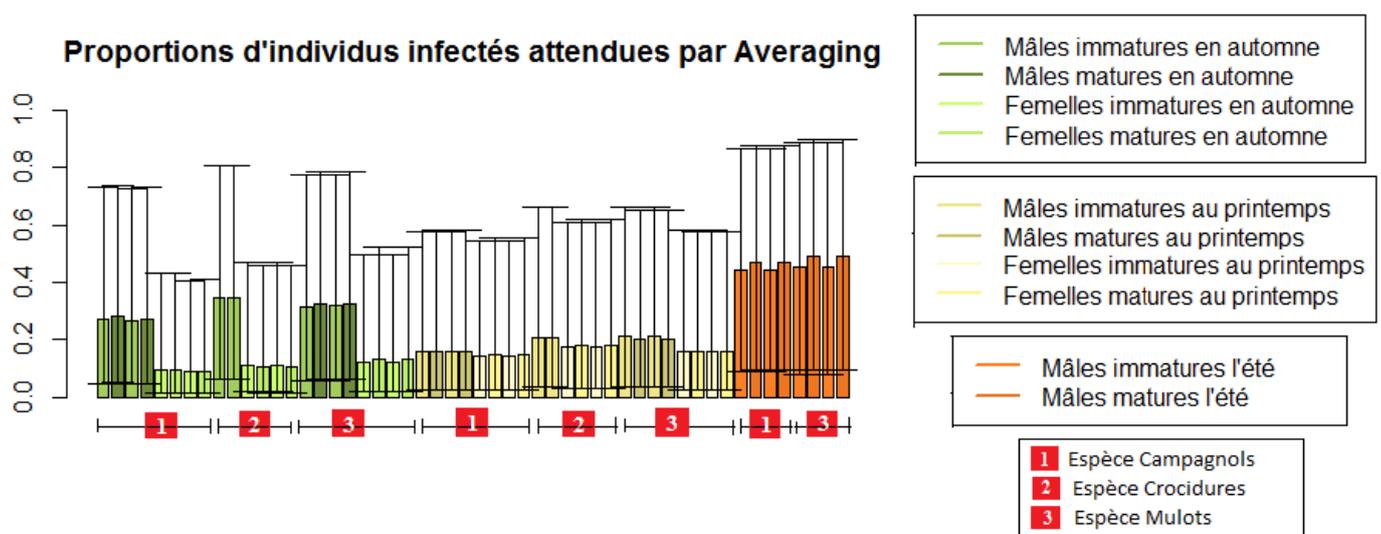
Annexe 25. Estimations issues de l'inférence multimodèle (cr= crocidure, ca=campagnol, mul=mulot ; imm=immature, mat=mature ; A=site A, B=site B)



Annexe 26. Distribution du pourcentage d'incertitude lié à la sélection de modèles de l'inférence multimodèle

modalité pour l'événement « être infecté »	estimation par régression logistique de Firth Sexe*Saison	estimation par inférence multimodèle	erreurs standards associées aux estimations par inférence	pourcentage d'incertitude ajouté par l'inférence multimodèle
mâle campagnol mature en automne au site B	0.34	0.28	0.12	75.1
mâle campagnol mature en automne au site B	0.34	0.27	0.13	86.5
mâle crocidure immature en automne au site A	0.34	0.35	0.21	197.11
mâle crocidure immature en automne au site B	0.34	0.35	0.21	195.6

Annexe 27. Exemple de modalités à pourcentages d'incertitude élevés sur les estimations issues de l'inférence multimodèle



Annexe 28. Représentation graphique des estimations issues de l'inférence multimodèle

[SCRIPT R]

#1. Elaboration de l'ensemble de modèles de régression logistique de Firth

```
## Modèles univariés##  
sexe <- brglm(formula = cbind(pos, neg) ~ Sexe, family = binomial(link = "logit"), BDD)  
saison <- brglm(formula = cbind(pos, neg) ~ Saison, family = binomial(link = "logit"), BDD)  
# même commande pour les variables « espèce », « site », « stade », « session »  
# inclure un modèle sans variable explicative  
nul <- brglm(formula = cbind(pos, neg) ~ 1, family = binomial(link = "logit"), BDDInt)  
  
## Modèles multivariés##  
M1 <- brglm(formula = cbind(pos, neg) ~ Sexe*Saison, family = binomial(link = "logit"),  
data = BDD)  
M2 <- brglm(formula = cbind(pos, neg) ~ Sexe * Saison + Espèce, family = binomial(link =  
"logit"), data = BDD)  
M3 <- brglm(formula = cbind(pos, neg) ~ Sexe+Saison, family = binomial(link = "logit"),  
data = BDD)  
# même commande pour les 9 autres modèles multivariés de l'ensemble défini
```

2. Sélection de modèles

```
# fonction AICc du package AICmodavg sur chaque modèle :  
  
library(AICmodavg)  
AICc(M1)  
  
## Détermination des AIC corrigé de Mod1 à M12, ainsi que sur les modèles univariés  
## (saison, site, sexe, espece, stade, session) et le modèle nul.  
  
## Obtention des poids d'Akaike avec la fonction «Weights» du même package.  
  
round(Weights(AICc(M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10, M11, M12, saison, site,  
espece, stade, saison)), 3)  
  
# On obtient en sortie les poids rangés dans le même ordre que les modèles. Attention, ils sont  
# déterminés relativement les uns aux autres (dépendent du set de modèles en entrée).  
# On réutilisera cette fonction pour l'inférence multimodèle, en veillant à recalculer ces poids  
# sur les modèles inclus pour cette méthode.
```

#3. Calcul des estimations dans le cadre de l'inférence multimodèle

Exemple pour une estimation sur les 3 modèles « Sexe*Saison », « Sexe*Saison + Espèce »
et « Sexe+Saison ».

`summary(M1)` #pour plus de facilité de lecture, je n'afficherais pas tous les coefficients.

```
Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -0.6712 0.3679 -1.824 0.0681
```

#Intercept de M1 : mâle l'automne

`summary(M2)`

```
Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -1.3657 0.5441 -2.510 0.0121
```

#Intercept de M2: campagnol mâle l'automne

`summary(M3)`

```
Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -0.9254 0.3504 -2.641 0.00827
```

#Intercept de M3 : mâle l'automne

#Soit $p(\text{inference})$ la probabilité estimée d'après inférence sur ces 3 modèles pour un mâle campagnol d'être infecté l'été :

#Calcul des estimations de chaque modèle $p(M1)$, $p(M2)$ et $p(M3)$:

```
p(M1)= exp(-0.6712) / (1+ exp (-0.6712)) #coefficient de M1 -0.6712
p(M2)= exp(-1.3657) / (1+ exp (-1.3657)) # coefficient de M2 -1.3657
p(M3)= exp(-0.9254) / (1+ exp (-0.9254)) # coefficient de M3 -0.9254
```

on obtient $p(M1)=0.28$, $p(M2)=0.34$ et $p(M3)=0.20$.

Calcul des poids d'Akaike sur un ensemble constitué de ces trois modèles pour l'inférence:

```
round(Weights(AICc(M1, M2, M3), 3)
```

```
# p(inference) = poids M1 * p(M1) + poids M2 * p(M2) + poids M3 * p(M3)
```

ici les poids respectifs de M1, M2 et M3 sont 0.507, 0.299 et 0.194.

$p(\text{inference}) = 0.507 \cdot 0.28 + 0.299 \cdot 0.34 + 0.194 \cdot 0.20 = 0.28$ #arrondi à 2 chiffres significatifs

#4. Calculs des erreurs standards par la méthode delta

#Exemple sur le même exemple que précédemment (estimations).

```
library(msm)
```

on reprend les coefficients issus des summary des modèles.

```
estmean1=M1$coefficient #coefficients du modèles (cf. summary)
estvar1=vcov(M1) # matrice variance covariance
```

```
err (M1) <- deltamethod( ~ exp(-0.6712) / (1+ exp (-0.6712)), estmean1(1), estvar1[1,1])
```

```
estmean2=M2$coefficient
estvar2=vcov(M2)
```

```
err (M2) <- deltamethod( ~ exp(-1.3657) / (1+ exp (-1.3657)), estmean2(1), estvar3[1,1])
```

```
estmean3=M3$coefficient
estvar3=vcov(M3)
```

```
err (M1) <- deltamethod( ~ exp(-0.9254) / (1+ exp (-0.9254)), estmean3(1), estvar3[1,1])
```

$\text{err}(\text{inference}) = \text{poids M1} * \text{err (M1)} + \text{poids M2} * \text{err (M2)} + \text{poids M3} * \text{err (M3)}$

on obtient $\text{err (M1)}=0.07$, $\text{err (M2)}=0.08$ et $\text{err (M3)}= 0.08$

on reprend les poids issus du calcul d'estimations.

$\text{err}(\text{inference}) = \text{poids M1} * \text{err (M1)} + \text{poids M2} * \text{err (M2)} + \text{poids M3} * \text{err (M3)}$

Soit :

$\text{err}(\text{inference}) = 0.507 \cdot 0.07 + 0.299 \cdot 0.08 + 0.194 \cdot 0.08 = 0.078$ #arrondi à 2 chiffres significatifs

Annexe 29. Extraits du script utilisé dans le logiciel R 3.6.3 : sélection de modèles, exemple de calcul d'estimation par inférence multimodèle, exemple de calcul de l'erreur standard de l'estimation issue de l'inférence multimodèle

Résumé

L'objectif de cette étude a été de décrire les caractéristiques et l'écologie de l'infection aux leptospires d'espèces de la faune sauvage au contact d'élevages bovins. Des méthodes de PCR point final et de séquençage VNTR ont été utilisées pour analyser des échantillons de reins, poumons, sang et urines provenant de 87 mulots (*Apodemus sylvaticus*), 51 campagnols (*Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Arvicola terrestris*), 31 crocidures (*Crocidura russula*), 35 ragondins (*Myocastor coypus*), 10 fouines (*Marta foina*), 4 rats (*Rattus norvegicus*) et 2 souris (*Mus Musculus*) en région Rhône-Alpes.

La proportion observée de petits mammifères infectés aux leptospires a été de 22% (IC95% [11% ; 29%]), et celle des fouines et ragondins de 21% (IC95% [10% ; 38%]). L'espèce majoritairement identifiée a été *L.interrogans*, uniquement sur le genre *Apodemus*, suggérant un portage spécifique de cette espèce. L'identification du séro groupe Australis, commun aux élevages bovins de la zone d'étude renforce l'hypothèse d'une transmission indirecte de leptospires des petits mammifères aux bovins. Une analyse des caractéristiques des populations de petits mammifères infectés a suggéré un taux du portage de *Leptospira* plus élevé l'été pour les individus mâles. Cette étude suggère une variabilité de l'infection des petits mammifères à *Leptospira* selon des facteurs écologiques et populationnels. Une compréhension plus approfondie permettrait de mieux définir le risque d'exposition des bovins dans ce contexte d'élevage, en zone tempérée.

Mots-clefs : Leptospires, Transmission, Rongeurs, Epidémiologie, Elevage, Ecologie.

Abstract

The objective of this study was to characterize the *Leptospira* infection of wild animals living near farm animals. Endpoint PCR and molecular characterization (VNTR) were used to analyze kidneys, lungs, blood and urine samples from 87 wood mice (*Apodemus sylvaticus*), 51 voles (*Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Arvicola terrestris*), 31 shrews (*Crocidura russula*), 35 coypus (*Myocastor coypus*), 10 house martens (*Marta foina*), 4 rats (*Rattus sp.*), 2 mice (*Mus Musculus*) in Rhône-Alpes.

The proportion of small mammals infected with *Leptospira* was 22% (95% CI [11%; 29%]) and, for the house martens and coypus the proportion was 21% (95% CI [10%; 38%]). The major species of *Leptospira* has been *L. interrogans*, detected only for genus *Apodemus*, which suggest a specific carrying of this species. The identification of the Australis serogroup, detected in cattle farms of the study, reinforces the hypothesis of an indirect transmission of leptospires from small mammals to cattle. The study of infected small mammals characteristics suggested a higher rate of *Leptospira* carriage during summer for male individuals. This study suggests that infection of small mammals with *Leptospira* depends on ecological and population factors. A thorough understanding is necessary in order to precise the risk of exposure of cattle in this context of breeding, in temperate areas.

Key-words: Leptospires, Transmission, Rodents, Epidemiology, Livestock, Ecology.