Master 2 Biologie Santé, parcours Gestion Intégrée des Zoonoses et des Maladies Animales Tropicales

RAPPORT DE STAGE

EVALUATION DE LA PREVALENCE ET DE LA DIVERSITE EN LEPTOSPIRES PATHOGENES CHEZ LES BOVINS ET CAPRINS EN THAILANDE

Présenté par Alice DUMOUCHEL

Réalisé sous la direction de : Dr Vanina GUERNIER

Tuteur de stage : Dr Timothée VERGNE

Laboratoire d'accueil et lieu du stage : UMR 242 – IEES Paris, Sorbonne Université, 4 Place Jussieu, 75005 Paris. Avec mission en Thaïlande, à l'Université de Kasetsart, Faculté de Technologie Vétérinaire, Ngamwongwan Road Lat Yao, Chatuchak 10900 Bangkok, Thaïlande

Période de stage : du 15 janvier au 14 juin 2024

Date de soutenance : le 27 juin 2024

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS 4

LISTES DES FIGURES 5

LISTE DES TABLEAUX 6

LISTE DES ABREVIATIONS 7

RESUME EN FRANÇAIS 8

ABSTRACT IN ENGLISH 8

INTRODUCTION 9

PARTIE 1 : ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS DE L'ETUDE 12

I- Généralités épidémiologiques de la leptospirose **12**

a) Pathogène et classification *12*

b) Aspects cliniques, chronologiques et diagnostics *13*

c) Modes de transmission et facteurs de risques associés *14*

II- Epidémiologie et impacts de la leptospirose chez les animaux d'élevage **16**

a) Prévalence et séroprévalence de la leptospirose à l'échelle mondiale chez les animaux d'élevage *16*

b) Signes cliniques et pathologie chez les animaux d'élevage *16*

c) Conséquences économiques et sanitaires de la leptospirose *17*

III- Situation en Thaïlande : contexte épidémiologique, prévalence et diversité des leptospires **17**

a) Données épidémiologiques en Thaïlande (rongeurs, bétail, homme) *17*

b) Environnement et climat favorables à la propagation des leptospires *18*

c) Diversité des sérovars / espèces et comparaison avec les autres régions du monde *19*

OBJECTIFS 20

PARTIE 2 : MATERIEL ET METHODES 21

I- Etudes de terrain **21**

a) Conception de l'étude et échantillonnage *21*

b) Accords éthiques *22*

II- Etudes de laboratoire **22**
a) Extraction des acides nucléiques *22*
b) Détection de Leptospira *23*

III- Etudes analytiques **24**
a) Analyses phylogénétiques *24*
b) Analyses spatiales *24*
c) Analyses statistiques *25*

PARTIE 3 : RESULTATS 26

I- Exploration des données de l'échantillon **26**
a) Répartition biologique et géographique de l'échantillonnage *26*
b) Détection de Leptospira et proportion de cas infectés chez les animaux échantillonnés *27*

II- Analyses inférentielles de l'infection à *Leptospira* selon les facteurs biologiques et géographiques **27**
a) Comparaison des résultats de l'infection à Leptospira entre bovins et caprins dans la région Sud *27*
b) Comparaison des résultats de l'infection à Leptospira entre les races autochtones et allochtones *28*
c) Mesure de l'interaction entre races et régions sur la proportion de cas infectés par Leptospira *28*

III- Analyses à effets multiples de l'infection à *Leptospira* selon les facteurs environnementaux **29**
a) Sélection du modèle sur l'AIC *29*
b) Influence des facteurs environnementaux sur la proportion de cas infectés par Leptospira chez les bovins viandes et laitiers *30*

IV- Analyses phylogénétiques **31**

PARTIE 4 : DISCUSSION 33

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 37

ANNEXES 41

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon encadrante de stage, la **Dr Vanina GUERNIER**, responsable de mon accueil, pour son encadrement très formateur, ses conseils et son implication constante dans mon travail. Cette expérience a contribué à mon enrichissement professionnel et personnel.

Je remercie également **Dr Timothée VERGNE**, mon tuteur de stage et responsable de master pour m'avoir, pour m'avoir soutenu et guidé tout au long de cette période.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux **Dr Ketsarin KAMYINGKIRD** et **Dr Ruttayaporn NGASAMAN** pour leur collaboration, leur confiance et pour m'avoir permis de participer à leurs projets respectifs.

Je remercie le **Dr Julien CLAUDE**, le **Dr Serge MORAND** et le **Dr Julien GASPARINI**, pour leur disponibilité et leur aide précieuse face aux difficultés rencontrées durant ce stage.

Je souhaite aussi remercier **Dr Anamika KRITIYAKAN**, **Mo AREEYAKRI**, **Chuanphot THINPHOVONG** et **Nook** pour leur hospitalité et leur accueil chaleureux au sein de l'université de Kasetsart.

Et enfin, un grand merci aux doctorantes **Elisa FOUJOLS** et **Nolwenn BLACHE** pour leurs précieux conseils et leur soutien tout au long de ce stage.

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Bactéries *Leptospira interrogans* observées au microscope électronique à balayage (MEB)

Figure 2 : Arbre phylogénétique des 64 espèces du genre *Leptospira*

Figure 3 : Schéma récapitulatif de la présence de leptospires et des méthodes de détection par phase de l'infection

Figure 4 : Schéma du cycle de transmission épidémiologique de la leptospirose

Figure 5 : Description de l'échantillonnage (a) effectif de l'échantillon du projet principal répartis par province et (b) effectif de l'échantillon de notre étude répartis par hôte et par province

Figure 6 : Distribution des échantillons de bovins et caprins (a) par région et province en Thaïlande et (b) par race

Figure 7 : Représentation graphique de l'effet des variables du modèle linéaire généralisé représentant l'interaction entre les variables « Race » et « Région »

Figure 8 : Représentation graphique de l'effet de chaque variable du modèle GLM réduit retenu

Figure 9 : Arbre phylogénétique de vraisemblance maximale (modèle K80+G+I ; 1000 réplicas) déduit du gène rrs 16S (séquence de 472 pb)

Figure 10 : Représentation cartographique de la prévalence de l'infection *à Leptospira* chez les bovins échantillonnés par province entre juin 2023 et mai 2024

Figure 11 : Carte de la densité des bovins viandes en Thaïlande sur l'année 2022 exprimée en nombre d'individus par km²

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Comparaison des données épidémiologiques des 4 maladies infectieuses zoonotiques majeures dans le monde

Tableau 2 : Comparaison des données épidémiologiques des 4 maladies infectieuses zoonotiques majeures en Thaïlande

Tableau 3 : Coût de la leptospirose dû à la perte de productivité par pays, sur l'année 2019

Tableau 4 : Résultats du modèle linéaire généralisé sur l'interaction des variables « Race » et « Région »

Tableau 5 : Résultats du modèle linéaire généralisé entre l'infection à *Leptospira* et les variables explicatives retenues par la sélection pas à pas descendante

LISTE DES ABREVIATIONS

- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- **AIC** : Akaike Information Criterion
- **DALYs** : Disability Adjusted Life Years
- **DEM** : Digital Elevation Model
- **DLD** : Department of Livestock Development
- **ELISA** : *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*
- **GLM** : General Linear Model
- **IC** : Intervalle de Confiance
- **IgM** : Immunoglobulines M
- **MAT** : Microscopic Agglutination Test
- **OR** : Odds Ratio
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **PIB** : Produit Intérieur Brut
- **qPCR** : quantitative Polymerase Chain Reaction
- **SIG** : Système d'Informations Géographiques

RESUME EN FRANÇAIS

La leptospirose est une maladie bactérienne zoonotique, endémique dans les pays tropicaux. Elle est associée à de nombreux animaux dont le rat, connu comme réservoir principal, mais aussi à l'Homme et à l'environnement. En Thaïlande, l'épidémiologie moléculaire de la leptospirose, visant à établir des liens de transmission entre les cas humains et les réservoirs animaux, a rarement été étudiée. Afin de mieux comprendre quelles souches pathogènes de *Leptospira* circulent entre les animaux d'élevages (n = 399 bovins et n = 263 caprins) et les Hommes, nous avons analysé la présence de leptospires pathogènes par qPCR sur ces 662 échantillons sanguins répartis dans plusieurs régions et provinces de la Thaïlande. La proportion de cas infectés par *Leptospira* était de 18,3% chez les bovins et de 3,42 % chez les caprins. Nous avons analysé ces résultats par espèce hôte, par région et en fonction de variables environnementales pour mieux évaluer les facteurs de risque. Une interaction positive a été montrée entre 2 races de bovins et leur répartition géographique. L'analyse phylogénétique, basée sur des séquences de la littérature a montré la circulation de plusieurs souches de leptospires pathogènes impliquant différents hôtes. Nos résultats révèlent que l'infection à *Leptospira* circule activement chez les bovins et caprins en Thaïlande et également chez l'Homme, dans des cycles excluant potentiellement le rat. Pour aller plus loin dans notre étude, il est nécessaire de séquencer nos échantillons infectés et de développer les études moléculaires sur la leptospirose humaine en Thaïlande.

Mots-clés : *Leptospira*, Elevages, Environnement, Facteurs de risques, Diagnostic moléculaire, Phylogénie

ABSTRACT IN ENGLISH

Leptospirosis is a zoonotic bacterial disease endemic in tropical region. It is associated with several animals, like a rat, known as principal reservoir, and with humans and environment. In Thailand, molecular epidemiology of leptospirosis, aiming to establish transmittal links between human's cases and animal's reservoir, has rarely been studied. To better understand which pathogenic strains of *Leptospira* circulate between livestock (n = 399 cattle and n = 263 goat) and humans, we analysed the presence of pathogenic leptospira by qPCR on these 662 blood samples distributed in several regions and provinces of Thailand. The percentage of positive cases of *Leptospira* infection was 18,3 % for cattle and 3,42 % for goat. We analysed these results by host species, by region and based on environmental variable to better assess risk factors. A positive interaction was shown between 2 cattle breed and their geographical distribution. Phylogenetic analysis, based on literature sequences, showed the circulation of several strains of pathogenic leptospira involving different hosts. Our results shown that *Leptospira* infection is actively circulating in cattle and goats in Thailand, also in humans in cycles potentially excluding rats. To go further in our study, it is necessary to sequence our infected samples and to develop molecular studies on human leptospirosis in Thailand.

Keywords: *Leptospira,* Livestock*,* Environment, Risks factors, Molecular diagnostic, Phylogeny

INTRODUCTION

La leptospirose est l'une des maladies infectieuses bactériennes les plus importantes dans le monde en terme de morbidité, parmi les agents zoonotiques qui se transmettent entre animaux et humains (Torgerson et al., 2015). C'est une zoonose de répartition mondiale mais plus commune dans la bande intertropicale où le climat chaud et humide permet la survie de la bactérie en dehors de l'hôte (Levett, 2001). Dans cette zone, incluant l'Asie du Sud-Est, l'Afrique subsaharienne, les Caraïbes et les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien, on recense 73% des cas (Costa et al., 2015; Biscornet et al., 2020; Rajapakse, 2022).

Au niveau mondial, la leptospirose humaine cause 1 million de cas par an et 58 900 décès (Costa et al., 2015) **(Tableau 1)**. Depuis plusieurs années, l'incidence de la leptospirose augmente dans les pays industrialisés (Mori et al., 2017). Par exemple, en France métropolitaine, l'incidence est passée de 0,32 /100 000 habitants en 2009 (Institut Pasteur, 2014) à 1,10 /100 000 habitants en 2021 (Institut Pasteur, 2021). Dans les départements d'Outre-mer, elle peut être 10 à 50 fois plus élevée qu'en métropole (Bourhy, 2017). Les raisons de ce changement ne sont pas clairement identifiées et sont probablement multiples (e.g., réchauffement climatique, augmentation des populations de rongeurs et augmentation des activités à risques) (Abadia et al., 2005; Mori et al., 2017). En Thaïlande, la leptospirose se classe parmi les maladie infectieuses zoonotiques ayant le plus haut de mortalité **(Tableau 2).**

Tableau 1 : Comparaison des données épidémiologiques des 4 maladies infectieuses zoonotiques majeures dans le monde. Seules les informations pour la dernière année disponible sont incluses.

Maladies infectieuses	Date	Nombre cas	Nombre morts	Taux mortalité (%)	Sources
Leptospirose	2022	1 million	58 900	5 à 20	(Rajapakse, 2022)
Dengue	2023	400 millions	22 000	-	(Roy and Bhattacharjee, 2021)
Paludisme	2022	249 millions	608 000	14,3 *	(World Health Organization, 2023a)
Tuberculose	2022	10,6 millions	1,3 million	12,6	(World Health Organization, 2023b)

*Ici le taux de mortalité représente les décès pour 100 000 habitants à risque

Tableau 2 : Comparaison des données épidémiologiques des 4 maladies infectieuses zoonotiques majeures en Thaïlande. Seules les informations pour la dernière année disponible sont incluses. Source : (Peerapakorn and Yingyong, 2021)

Maladies infectieuses	Date	Nombre cas	Nombre morts	Taux mortalité (%)	Incidence (/100 000 hab)
Leptospirose	2021	1 240	10	0,81	1,87
Dengue		10 617*	6	0,06	11,75
Paludisme		786	1	0,13	1,19
Tuberculose		12 808*	18	0,14	19,32

*Ce nombre comprend les cas de toutes les formes de la maladie

Le coût de la leptospirose dû à la perte de productivité a été estimé dans l'étude de (Agampodi et al., 2023) en convertissant les Disabilities Adjusted Life Years (DALYs) perdues à cause de la leptospirose en valeur monétaire, en utilisant le Produit Intérieur Brut (PIB) par habitant (**Tableau 3**). Les régions de l'OMS les plus impactées sont l'Asie du Sud-Est et le Pacifique occidental, représentant respectivement 38,9 % et 28,3 % de la charge mondiale. La Chine et l'Inde subissent les plus lourds fardeaux économiques, avec des pertes respectives de 4,8 milliards et 4 ,6 milliards de dollars. La Thaïlande se classe 6ème parmi les 20 principaux pays en termes de coûts de productivités. La région Asie-Pacifique est la plus touchée avec des pays subissant des pertes de productivité dépassant 500 milliards de dollars (Agampodi et al., 2023).

Tableau 3 : Coût de la leptospirose dû à la perte de productivité par pays, sur l'année 2019. Ce tableau inclus seulement les 10 premiers pays avec le cout de productivité le plus élevé. Données issues de (Agampodi et al., 2023).

PAYS	PERTE DE PRODUCTIVITE (MILLIARDS DE DOLLARS)
MONDE	29,3
CHINE	4,8
INDE	4,6
INDONESIE	2,8
SRI LANKA	2,1
USA	1,3
THAÏLANDE	1,2
VIETNAM	0,9
BRESIL	0,8
MALAISIE	0,6

Cette zoonose est causée par des bactéries du genre *Leptospira.* Le rat en est le principal animal réservoir asymptomatique mais elle infecte aussi une large diversité d'espèces animales hôtes ainsi que l'environnement (Levett, 2001). Elle entraine des symptômes variés allant de la fièvre à l'insuffisance rénale et reproductive. La compréhension de sa prévalence permet de mieux gérer et traiter la maladie chez ces animaux. Les animaux domestiques sont une cible de *Leptospira* et l'activité en l'élevage est un contexte favorable à la circulation des leptospires entre l'Homme et l'animal. Les infections par les leptospires pathogènes peuvent réduire la productivité des animaux en termes de production laitière et de croissance, entraînant des pertes économiques majeures pour les éleveurs (Mori et al., 2017).

De plus, les épidémies de leptospirose nécessitent des interventions vétérinaires couteuses et des mesures de contrôle, augmentant les dépenses pour les éleveurs et les autorités sanitaires (Sohm et al., 2023). Diminuer les infections chez les ruminants permettrait de réduire le risque de transmission de la leptospirose chez les humains travaillant dans les élevages et ainsi réduire les pertes économiques associées. Pour mettre en place des mesures de prévention afin de réduire l'exposition des bovins aux leptospires, les stratégies sanitaires doivent s'appuyer sur une compréhension approfondie des populations d'hôtes infectés et de leur interaction avec l'environnement. En identifiant les leptospires pathogènes circulants chez les bovins et caprins, l'étude contribue à évaluer le risque pour les travailleurs agricoles et les populations rurales en contact avec ces animaux.

La Thaïlande étant un pays tropical, son climat chaud et humide est un milieu favorable à l'infection par *Leptospira* (Bunmee et al., 2018). L'agriculture y joue un rôle économique important, occupant un tier du territoire national et comptant environ 7 millions d'exploitations agricoles (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2023). En 2022, le secteur agricole représentait 8,8% du PIB (2022) et mobilisait 1/3 de la population active du pays (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2023). Dans ce pays la leptospirose circule chez plusieurs hôtes, tels que le rat, les chiens, les bovins et l'Homme, avec plusieurs espèces de *Leptospira* identifiées (Kurilung et al., 2017). Notre étude vise à enrichir les connaissances sur les cycles épidémiologiques de *Leptospira,* pour déterminer si une infection circulante chez les animaux d'élevage (bovins et caprins) pourrait être impliquée comme source d'infection pour l'Homme.

PARTIE 1 : ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

I- Généralités épidémiologiques de la leptospirose

a) Pathogène et classification

Les leptospires sont des spirochètes longs, fins et mobiles (Centers for Disease Control and Prevention, 2023) **(Figure 1)**. Ils appartiennent à l'ordre des *Spirochaetales*, famille des *Leptospiraceae,* et genre *Leptospira* (Hovind-Hougen, 1979). Ce sont des bactéries Gram négatives (Suwancharoen et al., 2016), qui se localisent dans les tubules rénaux des animaux infectés (de manière chronique dans les réservoirs animaux ou temporairement lors d'une infection aiguë) et sont excrétées par leur urine (Levett, 2001; Guernier et al., 2017). Ils peuvent survivre plusieurs semaines voire des mois, dans l'eau douce ou dans les sols humides des zones chaudes (Chadsuthi et al., 2018).

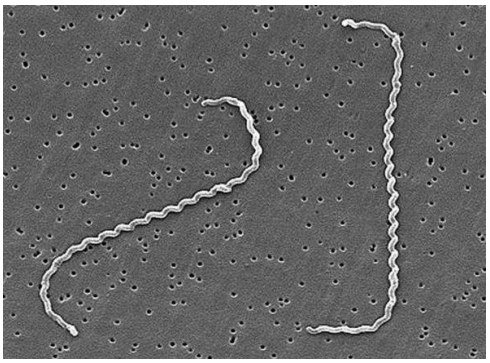


Figure 1 : Bactéries *Leptospira interrogans* observées au microscope électronique à balayage (MEB). Ces deux spirochètes ont été liés à un filtre de 0,2 µm. Source : CDC Public Health Image Library.

Une classification sérologique des leptospires a été établit pour distinguer les différents éléments du genre *Leptospira.* A ce jour, les leptospires sont classés en plus de 300 sérovars pathogènes sur la base de propriétés antigéniques (Amran et al., 2023). Un sérovar correspond à une entité possédant une unité antigénique (Centers for Disease Control and Prevention, 2023). Les sérovars possédant des antigènes similaires, ont été regroupés et qualifiés de sérogroupes, il en existe plus de 30 différents. Les sérogroupes n'ont pas de valeurs taxonomiques mais sont employés en épidémiologie et en clinique (Levett, 2001).

Au sein d'un sérogroupe, il existe une forte diversité génétique. Une classification moléculaire, basée sur la séquence du gène 16S a été élaborée. Historiquement, la taxonomie du genre *Leptospira* était divisée en trois sous-groupes mais cette classification a été modifiée par (Vincent et al., 2019) qui l'a divisé en 4 sous-clades : P1, P2, S1 et S2 à la place des clusters appelés historiquement saprophytes (S1 et S2), intermédiaire (P2) et pathogènes (P1) (Vincent et al., 2019) **(Figure 2)**. Il existe aujourd'hui 64 espèces génomiques dans le genre *Leptospira*, dont 35 espèces pathogènes (Vincent et al., 2019). Néanmoins, cette classification ne cesse d'évoluer comme le montre l'étude génomique de (Casanovas-Massana et al., 2020) avec la découverte de deux nouvelles espèces.

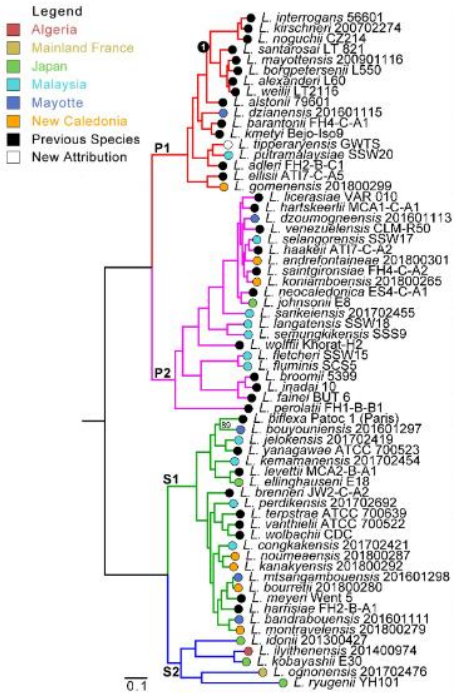


Figure 2 : **Arbre phylogénétique des 64 espèces du genre *Leptospira*.** Les branches sont colorées en fonction de leur appartenance aux 4 sous-clades : P1 en rouge, P2 en rose, S1 en vert et S2 en bleu. Les cercles de couleurs représentent l'origine géographique de chacune des nouvelles espèces décrites (cf. légende). Source (Vincent et al., 2019).

b) Aspects cliniques, chronologiques et diagnostics

Le spectre clinique de la leptospirose humaine peut varier d'un état pseudo-grippal à une insuffisance rénale aiguë (Institut Pasteur, 2014). Du fait de l'absence de signes cliniques spécifiques, la maladie peut être confondue avec des maladies « communes » comme la grippe, ou bien d'autres maladies fréquentes dans les zones tropicales, telles que la dengue, des fièvres hémorragiques ou le paludisme (Biscornet et al., 2020; Rajapakse, 2022). Considérée comme une maladie tropicale négligée, elle est très probablement sous-estimée (Bourhy, 2017). Parmi tous les cas de leptospiroses, 90% sont asymptomatiques ou de forme fébrile, qui se caractérise par de la fièvre, des maux de tête, frissons et douleurs musculaires (Biscornet et al., 2020). Seulement 10% des cas développent une forme sévère de la maladie, appelé le syndrome de Weil, caractérisé par un ictère et une insuffisance rénale aiguë (Rajapakse, 2022).

Chez l'Homme, la période d'incubation de la leptospirose peut varier entre 2 et 20 jours **(Figure 3)**. Durant cette phase les individus sont asymptomatiques. Ensuite, la maladie peut évoluer en forme fébrile (Bourhy, 2017; Rajapakse, 2022). La leptospirose est classiquement divisée en deux phases : la phase de leptospirémie, c'est-à-dire que les leptospires sont présents dans le sang, puis la phase de leptospirurie, où les leptospires sont présents dans l'urine, et sont excrétés (Levett, 2001) **(Figure 3)**. Dès les premiers jours où les leptospires pathogènes se retrouvent dans la circulation sanguine, un diagnostic précoce peut être réalisé par PCR sur des échantillons de sang. Cependant, la concentration de bactéries dans le sang est généralement faible (Bourhy, 2017). Environ une semaine après l'apparition des signes cliniques, une réponse immunitaire se met en place. On peut alors utiliser des tests de détection sérologiques tels que l'ELISA pour une détection des IgM ou le Microscopic Agglutination Test (MAT) pour détecter les immunoglobulines totales. Le MAT, méthode de référence en sérologie pour la leptospirose, consiste à quantifier au microscope à fond noir, les anticorps présents en suspension dans le sérum des patients qui agglutinent des leptospires vivants (Levett, 2001). Simultanément, lors de cette phase immunitaire, un test PCR peut également être effectué sur des échantillons d'urines (Bourhy, 2017). Durant cette phase, un diagnostic moléculaire est utile pour identifier

les espèces de leptospires infectantes. La PCR quantitative en temps réel, permet de détecter la présence d'ADN de *Leptospira* dans les urines, qui peut ensuite être amplifié et séquencé pour identifier les espèces infectantes. Les séquences obtenues permettent de construire un arbre phylogénétique et d'étudier les relations entre les organismes (Levett, 2001).

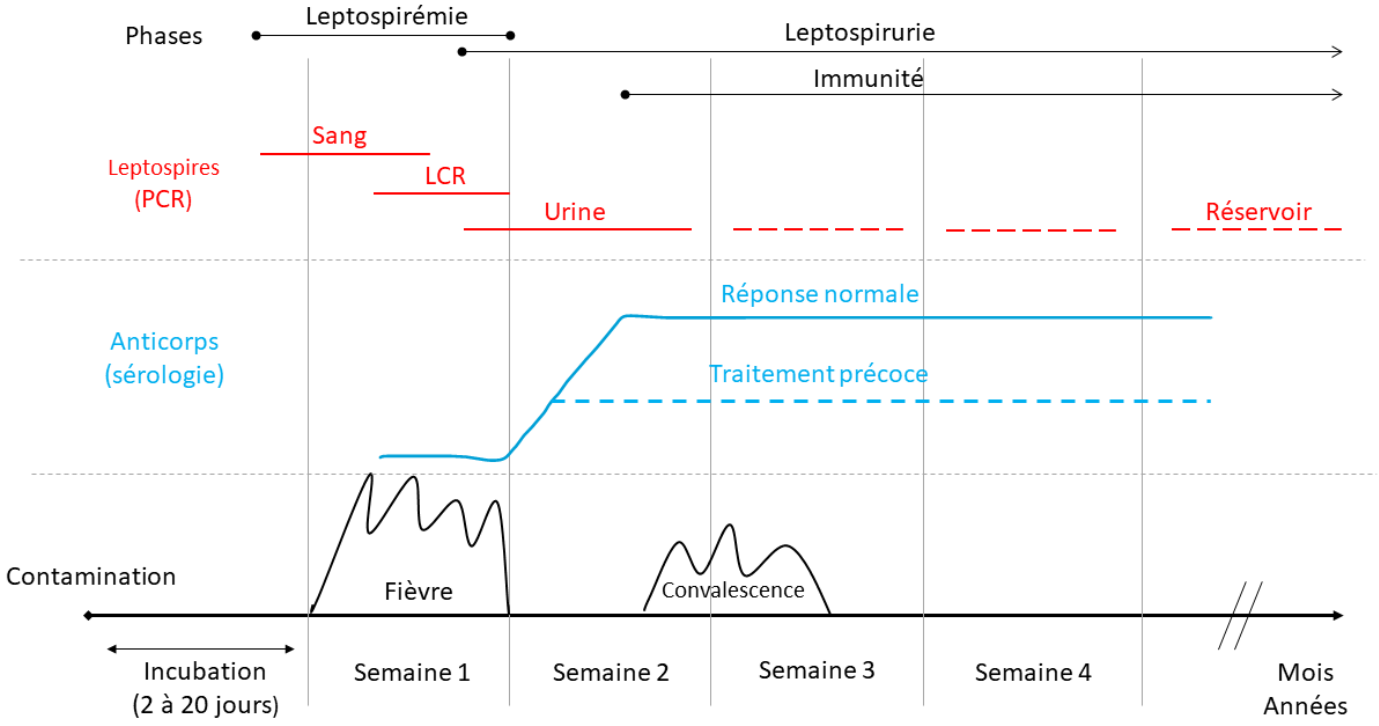


Figure 3 : Schéma récapitulatif de la présence de leptospires et des méthodes de détection par phase de l'infection. Evolution dans le temps des différentes phases de l'infection. L'infection commence avec la phase d'incubation, suivie de la phase aigüe qui s'installe durant la semaine 1 avec l'apparition de signes cliniques. Ensuite la phase de convalescence se manifeste entre la semaine 2 et 3. Enfin, à partir de la semaine 4 et plus des informations épidémiologiques, comme le sérogroupe infectieux présumé, peuvent être obtenues. Adapté de (Levett, 2001).

c) Modes de transmission et facteurs de risques associés

Le cycle de *Leptospira* implique un animal réservoir asymptomatique, le rat, et une large gamme d'animaux hôtes sensibles qui comprend les animaux domestiques (chiens, chats), les animaux d'élevage (porcs, buffles, vaches, chèvres) et même certains animaux sauvages (singes) (Levett, 2001; Guernier et al., 2016; Ngasaman et al., 2022) **(Figure 4)**. Pour chacune de ces espèces, l'agent pathogène se localise dans les reins et est excrété dans l'environnement via les urines (Sohm et al., 2023). Les leptospires peuvent survivre jusqu'à plusieurs semaines dans des conditions environnementales favorables (sols humides, eaux stagnantes…) (Bourhy, 2017). Dans le cycle, l'Homme est considéré comme une impasse épidémiologique puisqu'il ne permet pas la transmission de la bactérie à d'autres espèces (Levett, 2001).

La leptospirose peut se transmettre chez l'Homme, les animaux ou l'environnement (Narkkul et al., 2021) **(Figure 4).** L'infection peut persister sous forme chronique chez les animaux, en revanche chez l'Homme, cette forme d'infection a été suggéré mais pas démontrée (Levett, 2001). Les rongeurs, en tant que réservoirs, vont excrétés les leptospires en continu, tandis que d'autres espèces comme les chiens ou les

bovins, excrètent les leptospires par intermittence pendant plusieurs mois ou années (Bourhy, 2017; Ngasaman et al., 2022). La transmission de la bactérie animal-animal ou animal-Homme se fait, soit par contact direct avec l'urine d'un animal infecté à travers la peau et les muqueuses, soit par contact indirect avec l'eau, la boue ou le sol contaminé (Bourhy, 2017; Suwancharoen et al., 2013; Peerapakorn and Yingyong, 2021).

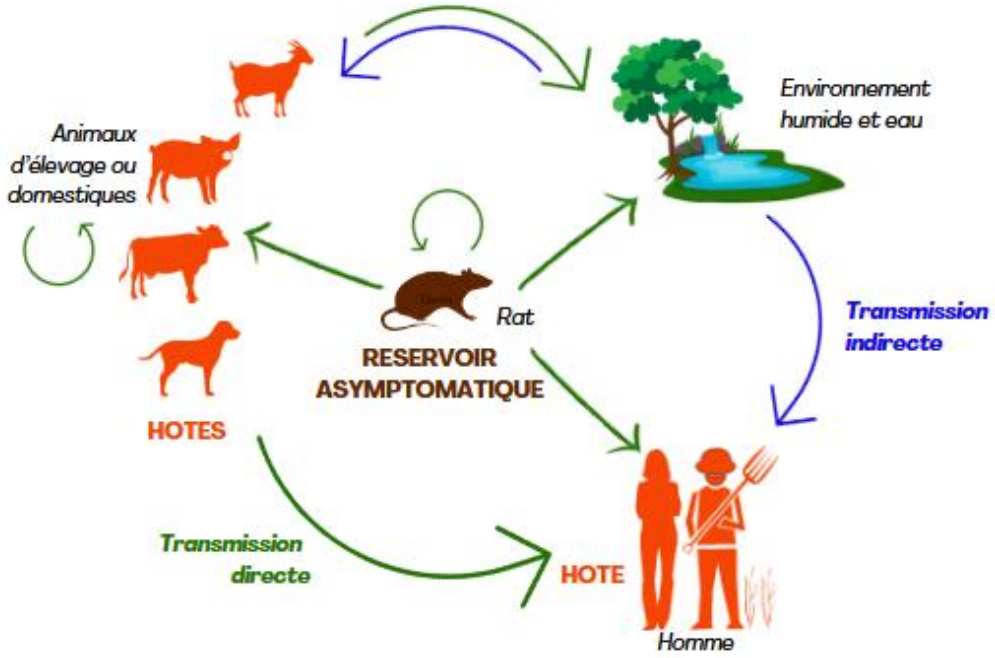


Figure 4 : Schéma du cycle de transmission épidémiologique de la leptospirose. Les flèches vertes représentent la transmission directe de leptospires par contact avec un animal infecté et les flèches bleues représentent la transmission indirecte de leptospires par contact avec de l'urine, de l'eau ou un sol contaminé. Figure personnelle réalisée d'après (Bourhy, 2017; Narkkul et al., 2021; Suwancharoen et al., 2013).

Dans plusieurs pays comme la France ou la Nouvelle-Zélande, la leptospirose est considérée comme une maladie professionnelle (Abadia et al., 2005; El-Tras et al., 2018). Les professions exercées directement en contact avec les animaux telles que les agriculteurs, les vétérinaires et soigneurs d'animaux, les ouvriers des abattoirs, les pêcheurs ou les producteurs laitiers, sont les plus exposés aux leptospires (Mori et al., 2017). Les personnes exerçant des professions en contact indirect avec des animaux comme les égoutiers, les travailleurs des mines ou les militaires sont aussi fortement exposés à *Leptospira* (Levett, 2001). Ils peuvent être infectés via leurs activités quotidiennes par contact avec le sol ou l'eau potentiellement infectée (Chadsuthi et al., 2017). Outre la profession, la pratique d'activités de loisirs aquatiques tels que la baignade, le kayak, le rafting ou le canyoning augmente également le risque d'infection (Bourhy, 2017; Mori et al., 2017). La leptospirose est plus courante parmi les populations agricoles rurales mais touche aussi les populations urbaines et semi-urbaines pauvres, en particulier en Asie du Sud-Est, en Afrique subsaharienne et dans les Caraïbes (Rajapakse, 2022). L'apparition de phénomènes naturels majeurs (inondations, cyclones, ouragans…) (Levett, 2001) sont souvent aussi à l'origine d'une recrudescence de cas de leptospirose en raison des conditions propices à la propagation de la bactérie dans l'environnement (Chadsuthi et al., 2018).

II- Epidémiologie et impacts de la leptospirose chez les animaux d'élevage

La leptospirose circule chez de nombreux animaux d'élevage tels que les porcs, les chevaux, les bovins et les petits ruminants. Cette partie se concentrera exclusivement sur les bovins et les caprins, les 2 espèces étudiées dans notre recherche. Nous n'avons pas effectué une revue exhaustive pour toutes les espèces.

a) Prévalence et séroprévalence de la leptospirose à l'échelle mondiale chez les animaux d'élevage

La prévalence de la leptospirose chez les bovins varie fortement à l'échelle mondiale. Elle est influencée par des facteurs environnementaux et climatiques spécifiques à chaque région. Dans les zones tropicales ou subtropicales, le climat chaud et humide favorise la survie des leptospires, on y retrouve une prévalence plus importante. Cependant, l'incidence réelle de la leptospirose chez les bovins et souvent sous-estimée en raison d'un manque de connaissance de la maladie et de diagnostics pas assez rapides (Bharti et al., 2003).

En Europe, les taux de séroprévalence varient largement d'un pays à l'autre. Des séroprévalences élevées (entre 38% et 100%) ont été signalées en France, Belgique, Espagne, Irlande, Ukraine et Royaume-Uni alors que des séroprévalences plus faibles (entre 0,4% et 1,1%) ont été observées en Bulgarie, Pays-Bas et Suède. Au sein de certains pays comme la Belgique, la séroprévalence peut être très disparate (entre 0 et 95%) (Sohm et al., 2023). En Italie, une étude réalisée entre 2010 et 2011, utilisant la méthode du MAT a révélé que 10,9% des bovins étaient séropositifs, et le sérovar Hardjo (sérogroupe Sejroe) était le plus répandus. Chez les chèvres, la séroprévalence était de 4,8% avec le sérovar Hardjo également prédominant (Tagliabue et al., 2016). Dans d'autres région du monde comme au Brésil, pays tropical, la séroprévalence d'infection à *Leptospira* chez les bovins est également très élevée. Par exemple, dans une étude brésilienne récente, des échantillons sanguins ont été prélevés chez 442 bovins laitiers dans 3 régions différentes, montrant une séroprévalence moyenne de 78,7% (348/442). Cette séroprévalence élevée souligne l'importance de l'infection dans les élevages bovins (Silva et al., 2022). Dans une autre étude menée au Brésil, des échantillons de chèvres ont été testés pour l'infection à *Leptospira*, montrant que 25,9% (89/343) d'entre elles étaient séropositives, ces résultats témoignent d'une infection importante aussi dans les élevages caprins (Martins et al., 2012).

b) Signes cliniques et pathologie chez les animaux d'élevage

Les signes cliniques identifiés chez les bovins et les caprins diffèrent selon l'âge de l'animal. Les veaux et les chevreaux vont plutôt manifester une forme aiguë de la maladie, tandis que les formes chroniques sont plus souvent observées chez les adultes (Martins and Lilenbaum, 2014; Sohm et al., 2023). La forme aiguë se caractérise par une perte de poids et d'appétit, une irritabilité, des diarrhées et une augmentation de la température corporelle (Mori et al., 2017). Cependant, *Leptospira* peut aussi persister longtemps dans l'appareil reproducteur et provoquer une forme chronique (Sohm et al., 2023). Cette dernière se manifeste par des problèmes de reproduction tels que l'infertilité, l'augmentation du nombre de saillies nécessaires pour une conception, des intervalles prolongés entre les mises-bas, ainsi que des avortements, des mortinaissances et la diminution de production de lait (Grooms, 2006; Martins and Lilenbaum, 2014). L'infection à *Leptospira* peut persister longtemps dans l'appareil reproducteur, ainsi les avortements peuvent subvenir plusieurs semaines

après l'infection de la mère et l'infertilité se manifeste par une mauvaise implantation de l'embryon chez la femelle infectée (Grooms, 2006; Sohm et al., 2023). L'infection peut passer inaperçue et être non diagnostiquée par le manque de symptômes visibles mais à long terme, les conséquences sur la perte de productivité des troupeaux peuvent être importantes sur le plan économique, notamment pour les éleveurs (Ngasaman et al., 2022).

c) Conséquences économiques et sanitaires de la leptospirose

La leptospirose est endémique dans de nombreux pays tropicaux, souvent en voie de développement. Dans ces pays, les élevages bovins et caprins jouent un rôle crucial dans l'économie locale et les moyens de subsistance des populations (Martins et al., 2012). Dans ces élevages, la leptospirose représente un lourd fardeau pour l'agro-industrie du pays, entraînant des pertes économiques considérables dues à la baisse de production laitière, aux avortements, et aux coûts de prévention et traitements (Yatbantoong and Chaiyarat, 2019). Le coût du contrôle de la leptospirose animale pourrait être bien plus élevés que le coût de la leptospirose humaine (Grooms, 2006). Les conséquences économiques de la leptospirose bovine concernent aussi les pays plus développés. Par exemple, en Nouvelle-Zélande, le coût de la perte de production chez les bovins viandes, les ovins et les cerfs a été estimé à environ 7,92 millions de dollars américains (Agampodi et al., 2023). De même qu'en France, une étude a estimé le coût annuel de l'infection à une perte variant de 88 € à 2 369 € par vache avortée, selon la gestion de l'éleveur (Ayral, 2013).

III- Situation en Thaïlande : contexte épidémiologique, prévalence et diversité des leptospires

a) Données épidémiologiques en Thaïlande (rongeurs, bétail, homme)

En 2021, l'incidence de la leptospirose humaine en Thaïlande variait entre 0 et 42,7 pour 100 000 habitants selon les provinces, et les hommes étaient plus touchés par la leptospirose que les femmes. Par exemple sur les 1240 cas de leptospirose recensés en 2021, 81,3% des cas étaient des hommes contre seulement 18,7% des femmes. La tranche d'âge la plus infectée était les 35-44 ans (2,52/100 000 hab.), suivie des 25-34 ans (2,19) et des jeunes de 10-14 ans (2,15) (Peerapakorn and Yingyong, 2021). Cette tendance où les hommes sont plus touchés que les femmes par la leptospirose, n'est pas spécifique à la Thaïlande et se retrouve également dans d'autre régions du monde.

Les données épidémiologiques disponibles sur la leptospirose en Thaïlande montrent une certaine complexité marquée par une répartition géographique inégale et des méthodes d'étude multiples. En effet, peu d'études ont été menées à l'échelle nationale, les recherches étant principalement regroupées dans des provinces de la région nord, comme Nan et Mahasarakham (Della Rossa et al., 2015; Pumipuntu and Suwannarong, 2016; Viroj et al., 2021). De plus, la majorité des études sont basées sur des méthodes sérologiques utilisées pour détecter une infection passée chez un individu ou un animal, elles confirment que l'infection par *Leptospira* circule chez différentes espèces en Thaïlande (Chadsuthi et al., 2017; Pumipuntu and Suwannarong, 2016; Suwancharoen et al., 2013). Une étude réalisée entre 2010 et 2015, sur toute la Thaïlande, a montré une séroprévalence de 28,1% (1026/3648) chez les bovins, 24,8% (107/432) chez les

buffles, 11,3% (356/3138) chez les porcs et 23,7% (471/1990) chez les humains. Le sérovar Shermani était le plus courant chez toutes les espèces, alors que le sérovar Ranarum se distinguait plutôt chez les bovins (Chadsuthi et al., 2017). Cette étude a aussi évalué la séroprévalence à travers les différentes régions de la Thaïlande. La prévalence globale la plus élevée a été observée dans la régions sud (35,4% ; 211/596) et la plus faible dans la région nord (13,1% ; 116/883).

Quelques études ont utilisé des méthodes moléculaires permettant de montrer une infection active par *Leptospira* chez plusieurs espèces en Thaïlande. Plusieurs espèces de rongeurs (*Rattus exulans, Rattus tanezumi, Bandicota indica, etc.*) ont été testées positives pour *L. interrogans* et identifiées comme vecteurs d'infections (Della Rossa et al., 2015). En Thaïlande, la leptospirose est couramment appelée « maladie du rat » et de nombreuses campagnes de prévention auprès de la population considèrent les rongeurs comme seule source de transmission. Cependant, une étude menée entre 2011 et 2012 dans le Nord-Est de la Thaïlande visait à évaluer le taux de portage de *Leptospira* pathogènes dans les réservoirs de rongeurs, et finalement, la prévalence estimée dans la population de rongeurs étudiée était plutôt faible (3,6% ; 18/495) (Krairojananan et al., 2020). Le rat n'est pas le seul animal présent dans les cycles de transmission de leptospires en Thaïlande. Il a été démontré dans l'étude de (Kurilung et al., 2017) que les espèces pathogènes de *Leptospira* étaient aussi présentes chez les animaux domestiques et dans des échantillons d'eau environnementale. Ainsi les urines de bovins, porcs, et chiens sont aussi des sources probables d'infections pour les humains. Cette étude a également montré la présence de 2 espèces pathogènes majeures de *Leptospira, L. interrogans* et *L. weilli*, dans la province de Nan.

b) Environnement et climat favorables à la propagation des leptospires

Dans les pays tropicaux comme la Thaïlande, la leptospirose humaine est considérée comme une maladie saisonnière dont l'incidence augmente pendant ou après la saison des pluies (Chadsuthi et al., 2022; Suwanpakdee et al., 2015). Ces périodes de fortes pluies et d'inondations favorisent la propagation des leptospires et augmentent la transmission de *Leptospira* entre les animaux et les Hommes. En effet, les urines des animaux infectées se retrouvent dans les rivières, les canaux et les eaux stagnantes des rizières (Chadsuthi et al., 2018; Levett, 2001). L'exposition professionnelle à la leptospirose est particulièrement élevée dans le secteur agricole, notamment chez les riziculteurs (Narkkul et al., 2021).

Dans une étude menée dans la province de Nan, l'importance de certains indices environnementaux a été montrée pour expliquer la présence de *Leptospira* chez les rongeurs (Della Rossa et al., 2015). Parmi ces indices, on retrouve une potentielle relation entre l'infection à *Leptospira* et l'habitat forestier ainsi que la fragmentation de l'habitat humain. De plus, les villages situés à proximité d'une rivière et dans un habitat dominé par les terres agricoles présentaient aussi une incidence de leptospirose importante. En Thaïlande, ces conditions environnementales et climatiques jouent un rôle crucial dans la dynamique de transmission de la leptospirose et soulignent l'importance d'étudier cette maladie en tenant compte des interactions entre santé humaine, animale et environnementale.

c) Diversité des sérovars / espèces et comparaison avec les autres régions du monde

La diversité des leptospires varie considérablement selon les régions du monde. Dans les pays et régions riches en mammifères, tels que le bassin Amazonien et l'Asie du Sud-Est, les mammifères sont infectés par une grande variété de leptospires (Bharti et al., 2003). En Nouvelle-Zélande, 3 espèces de *Leptospira* (*L. interrogans, L. borgpertersenii* et *L. kirschneri*) et une dixène de sérovars circulent dont 3 ont été spécifiquement identifiés chez les bovins : Hardjobovis, Balcanica et Pomona (El-Tras et al., 2018). En Europe, les principaux sérovars identifiés incluent Sejroe, Australis, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae et Pomona, avec les 3 mêmes espèces génomiques de *Leptospira* présentes en Nouvelle-Zélande (Bourhy, 2017; Sohm et al., 2023). Sur les îles françaises comme la Réunion et Tahiti, *L. borgpetersenii* a été identifiés chez les bovins, avec Sejroe comme sérovar principal. *L. interrogans* a été identifiée chez plusieurs espèces comme le porc, le chien et le rat et circulant aussi chez l'Homme (Guernier et al., 2017, 2016).

Les sérovars peuvent varier d'une espèce à l'autre. Certains sont plus ou moins associés à une espèce animale comme Canicola (sérogroupe Canicola) chez le chien, Icterohaemorrhagiae (sérogroupe Icterohaemorrhagiae) chez le rat et Ballum (sérogroupe Ballum) chez la souris domestique (Suwancharoen et al., 2013; Bourhy, 2017). Cependant, les membres d'un même groupe génétique n'appartiennent pas nécessairement au même sérogroupe. Par conséquent, les espèces de *Leptospira* devraient être caractérisées par des approches à la fois moléculaires et sérologiques (Bharti et al., 2003).

En Thaïlande, plusieurs études de séroprévalence sur des animaux ont montré que la séropositivité varie d'une espèce à l'autre (Chadsuthi et al., 2017; Viroj et al., 2021). De manière générale, les bovins présentent la séroprévalence la plus élevée, sans distinction notable entre les mâles et les femelles, mais avec une tendance à l'augmentation de la séroposivité avec l'âge (Suwancharoen et al., 2013). Les sérovars présents en Thaïlande incluent principalement Ranarum chez les bovins (Amran et al., 2023), Sejroe et Bratislava chez les humains (Suwancharoen et al., 2013), Grippotyphosa chez les porcs (Niwetpathomwat et al., 2006), et certains sérovars comme Shermani sont courant chez les bovins, les buffles, les porcs et les humains. Ces données nous indiquent que l'identification du leptospire infectant est important pour aider à déterminer la source d'infection par *Leptospira* (Amran et al., 2023).

OBJECTIFS

La leptospirose est une zoonose bactérienne endémique dans les pays tropicaux comme la Thaïlande. Les activités agricoles, le contact avec des animaux domestiques et sauvages, ainsi que la proximité avec des eaux contaminées sont des facteurs pouvant augmenter le risque d'infection par *Leptospira*, en Thaïlande, comme dans d'autres régions tropicales et subtropicales. Le rat est connu comme réservoir principal de la bactérie, cependant, les leptospires circulent aussi chez les animaux d'élevages tels que les bovins et caprins. En Thaïlande, des études antérieures ont porté sur la sérologie de *Leptospira*, mais peu sur la diversité génétique.

L'objectif principal de notre étude était de déterminer si une infection à *Leptospira* présente chez les bovins et caprins en Thaïlande pouvait être impliquée comme source d'infection pour l'Homme. Les objectifs secondaires étaient : (i) estimer la proportion de cas positifs à l'infection par *Leptospira* dans les sérums de bovins répartis sur toute la Thaïlande et de caprins échantillonnés dans la région Sud, (ii) identifier les potentiels facteurs pouvant augmenter le risque d'infection à *Leptospira* chez les bovins et caprins échantillonnés, (iii) décrire la diversité génétique des leptospires présents chez les animaux infectés, et (iv) comparer cette diversité génétique à celle observée dans les cas cliniques de leptospirose humaine en Thaïlande.

Au départ, nous avons fait l'hypothèse que l'infection à *Leptospira* ne circulait pas seulement chez l'Homme et le rat, mais que d'autres espèces hôtes pouvaient être importantes dans le cycle épidémiologique de la leptospirose humaine. La majorité des études réalisées en Thaïlande sont des études sérologiques, qui montrent une exposition aux leptospires pathogènes mais on ignore les espèces circulantes, ce qui ne nous donne pas l'information nécessaire pour savoir si les bovins et caprins sont impliqués dans la leptospirose humaine en Thaïlande. Notre objectif était d'obtenir un nombre suffisant d'échantillons positifs pour les séquencer, identifier les espèces infectantes, et comparer la diversité génétique identifiée à celle présente dans les cas cliniques humains et autre animaux hôtes, afin de mieux comprendre les cycles épidémiologiques.

En raison de la forme asymptomatique de la leptospirose chez les bovins et caprins, notre échantillonnage a été effectué au hasard dans le cadre d'une étude populationnelle et non clinique. La prévalence de l'infection à *Leptospira* n'a pas encore été évaluer chez les bovins à l'échelle nationale en Thaïlande. Pour étudier les facteurs de risque, le choix de nos variables explicatives s'est basé sur des hypothèses biologiques. Nos échantillons provenaient de différentes races bovines : des bovins allochtones (laitiers et viandes) et des bovins autochtones. Ces races, ayant des physiologies et des métabolismes distincts, pourraient influencer la prévalence de l'infection. Ensuite, les données géographiques des élevages répartis à l'échelle de la région et de la province, suggère un possible effet géographique sur la prévalence de l'infection à *Leptospira.* Enfin, sachant que la leptospirose se transmet par le biais d'un environnement contaminé par l'urine d'animaux, nous nous sommes intéressés à la couverture paysagère des différentes provinces pour évaluer un éventuel effet environnemental sur la prévalence de l'infection.

PARTIE 2 : MATERIEL ET METHODES

I- Etudes de terrain

a) Conception de l'étude et échantillonnage

Cette étude réutilise des échantillons collectés en Thaïlande dans le cadre de 2 projets antérieurs, le premier portant sur le diagnostic des maladies parasitaires à transmission vectorielle et la prévention des insectes vecteurs (FF(KU) 32.67), et le second portant sur la surveillance de la brucellose chez les chèvres dans les fermes du Sud de la Thaïlande. L'usage des échantillons collectés dans les deux projets n'étaient pas strictement réservé à notre étude.

Pour l'annonce du premier projet, l'objectif était de sélectionner des fermes bovines réparties sur toute la Thaïlande. Le choix des provinces dans lesquelles les fermes allaient pouvoir participer à l'étude a été communiqué via une lettre officielle et appel téléphonique par les bureaux provinciaux du Department of Livestock Development (DLD) et certaines unités universitaires nationales. Finalement, 5 provinces par région ont été choisies sur toute la Thaïlande. Le nombre d'échantillons était limité à 50 par province, 250 par région et 1000 sur toute la Thaïlande. Chaque ferme ne devait pas avoir plus de 60 animaux et ne pouvaient pas envoyer plus de 20 échantillons pour diagnostic. Les éleveurs souhaitant participer à ce service pouvaient en informer l'équipe en s'inscrivant via appel téléphonique, via les bureaux du DLD ou via inscription sur plateforme électronique. Au total, l'échantillonnage a eu lieu dans 17 provinces et 41 districts sur 966 animaux d'élevages (bovins laitiers, bovins viande, buffles, chèvres et cheval) **(Figure 5a)**. L'échantillonnage des bovins a eu lieu entre juin 2023 et janvier 2024. Au sein de ce projet principal, notre étude s'appuie sur un sous-échantillon de la sérobanque. Elle a été menée pour étudier la prévalence de *Leptospira* chez 399 bovins dont 199 vaches laitières Holstein, 158 bovins viandes issus de différents croisements, 41 bovins de race autochtone et 1 buffle répartis dans 13 provinces de Thaïlande. Une stratégie de sous-échantillonnage à plusieurs degrés, avec répartition par province (13/77), et par district (34/928), a été utilisée. Les 13 provinces sélectionnées pour l'étude, sont réparties dans les 4 régions géographiques de Thaïlande : le Sud, le Centre, le Nord et le Nord-Est **(Figure 5b**).

Pour le second projet, les fermes caprines étaient sous surveillance pour la brucellose et la taille des échantillons n'était pas contrôlée. L'échantillonnage des chèvres a eu lieu en mai 2022, réalisé par des Docteurs Vétérinaires exerçant dans les provinces de Songkhla et Yala, dans la région Sud de la Thaïlande. Nous avons utilisé un sous-échantillon de la sérobanque du projet pour mener notre étude. L'objectif était de détecter la présence de leptospires et évaluer leur prévalence chez 263 chèvres de race autochtone, réparties dans 2 provinces de la Thaïlande (**Figure 5b**).

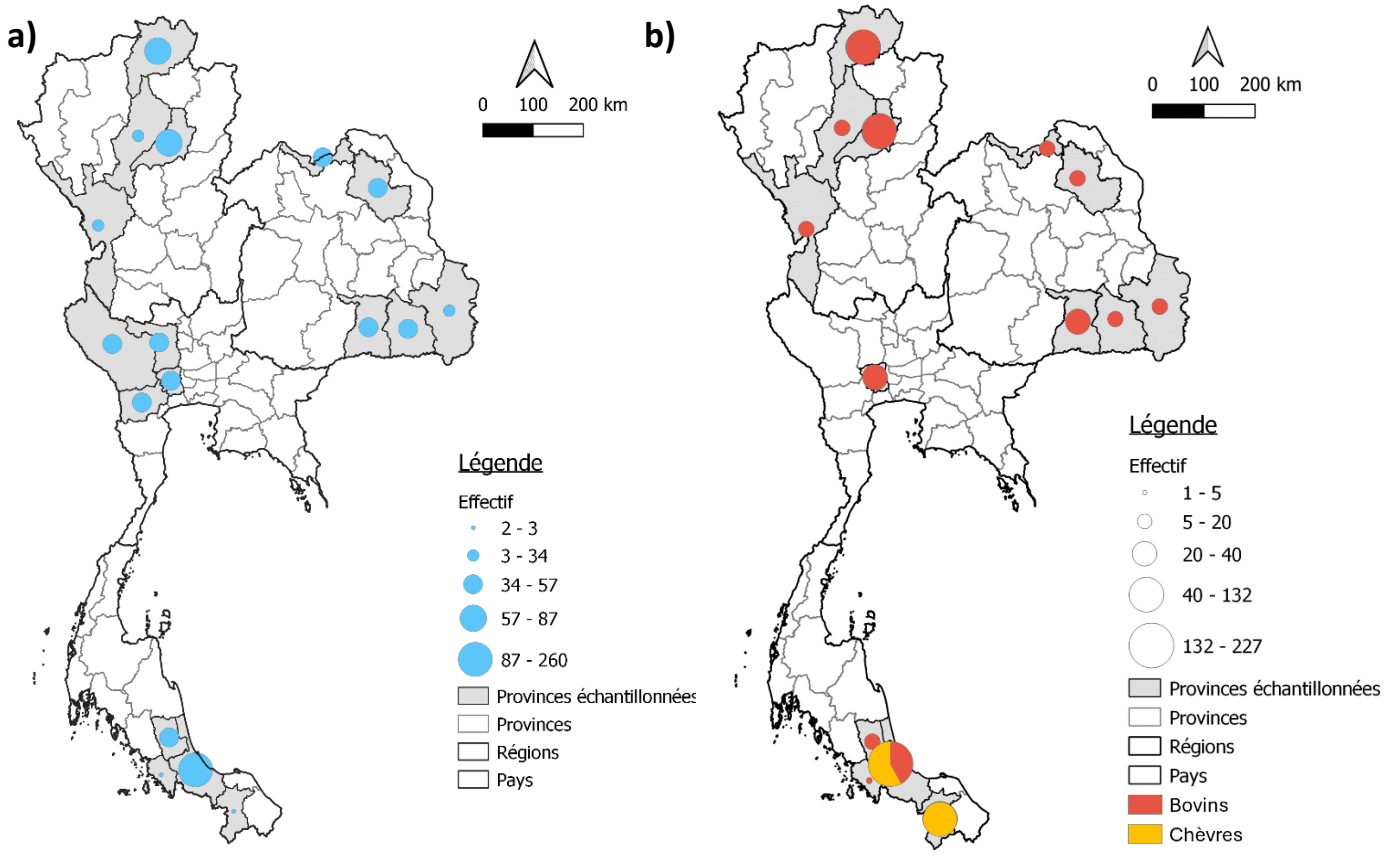


Figure 5 : Description de l'échantillonnage (a) effectif de l'échantillon du projet principal répartis par province et (b) effectif de l'échantillon de notre étude répartis par hôte et par province.

b) Accords éthiques

Tous les échantillons sur les bovins ont été collectés conformément au protocole d'utilisation des animaux, qui ont été soumis et examinés par le comité institutionnel de protection et d'utilisation des animaux de l'Université de Kasetsart (numéro d'approbation ACKU65-VET-095). Et tous les échantillons sur les chèvres ont été collectés conformément au protocole d'utilisation des animaux, qui ont été soumis et examinés par le comité institutionnel de protection et d'utilisation des animaux de l'Université Prince de Songkhla (numéro d'approbation : MHESI 68014/330).

II- Etudes de laboratoire

a) Extraction des acides nucléiques

Chez les bovins, des échantillons de sang total ont été prélevés dans des tubes EDTA, sur la période de juin 2023 à janvier 2024. Parmi les extraits prélevés, 200 µL ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN à l'aide du NucleoSpin blood DNA extraction kit (Machrey_Nagel, Allemagne), en suivant les recommandations du fabricant. Les échantillons d'ADN ont été extrait la semaine suivant la réception des

échantillons sanguins afin de fournir un résultat de diagnostic rapide aux agriculteurs. La période d'extraction d'ADN se situe donc sur la même période que l'échantillonnage, de juin 2023 à janvier 2024. La concentration et la qualité de l'ADN génomique ont été mesurées par le Eppendorf BioSpectrometer® (Eppendorf AG, Allemagne) à 260 et 280 nanomètres.

Chez les chèvres, des échantillons de sang total ont été prélevés en mai 2022 et utilisés pour l'extraction de l'ADN à l'aide du Genaid blood DNA extraction kit (Geneaid Biotech Ltd., Taïwan), en suivant les instructions du fabricant. L'ADN génomique a été extrait en juin 2022.

b) *Détection de Leptospira*

La présence de *Leptospira* a été testée dans les 662 échantillons sanguins par PCR quantitative en temps réel (qPCR) afin de détecter une région de 87 pb du gène rrs (ARNr 16S) avec les amorces Lepto F (5'-CCCGCGTCCGATTAG-3'), Lepto R (5'-TCCATTGTGGCCGRACAC-3') et la sonde Lepto P (5'-CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC-3'). Des tests de sensibilité ont été réalisés en amont sur des témoins positifs pour sélectionner le gène à cibler pour la détection de *Leptospira* dans les échantillons. Les amplifications ont été réalisées à l'aide du kit QuantiNova Probe PCR (QUIAGEN, Allemagne) conformément aux instructions du fabricant. Les qPCR ont été réalisées sur le thermocycleur CFX Opus 96, Real Time PCR System (Laboratoires Bio-Rad, France) en utilisant les conditions suivantes : une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, puis 45 cycles incluant une dénaturation à 95°C pendant 5 s, et une hybridation/élongation à 60°C pendant 5 s. La détection par PCR dans les échantillons a été réalisée en double si les courbes d'amplification n'avaient pas une allure correcte. Toutes les qPCR ont été réalisées avec des contrôles négatifs (H20) et positifs (souches *L. interrogans* sérovar Canicola et *L. interrogans* sérovar Icterohaemorrhagiae). Les échantillons identifiés comme positifs par qPCR ont été amplifiés en PCR conventionnelle, et révélés par migration sur gel d'agarose (1,5%) pour confirmer la détection de *Leptospira.* La PCR a été réalisée avec les amorces secY_F (5'-ATGCCGATCATTTTTGCTTC-3') et secY_R (5'-CCGTCCCTTAATTTTAGACTTCTTC-3') afin d'amplifier une région de 549 bp du gène secY et les amorces rrsLA (5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3') et rrsLB (5'-TTCCCCCCATTGAGCAAGATT-3') afin d'amplifier une région de 330 pb du gène rrs (ARNr 16S). Les amplifications ont été réalisées à l'aide du kit HotStarTaq Plus Master Mix (QUIAGEN, Allemagne) conformément aux instructions du fabricant. Les PCR ont été réalisées sur le thermocycleur Bio-Rad T100 (Laboratoires Bio-Rad, France) en utilisant les conditions suivantes : une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivie de 45 cycles incluant une dénaturation à 94°C pendant 30 s, une hybridation à 58°C pendant 30 s, et une élongation à 72°C pendant 30 s, et enfin une élongation finale à 72°C pendant 10 min. Toutes les PCR ont été réalisées avec des contrôles négatifs (H20) et des contrôles positifs (souches *L. borgpetersenii* sérovar Sejroe et *L. borgpetersenii* sérovar Mini, diluées au 1/4e).

III- Etudes analytiques

a) Analyses phylogénétiques

Le séquençage de nos séquences n'a pas pu être réalisés, les analyses phylogénétiques se sont donc basées sur des données existantes de la littérature.

Au total, 124 séquences nucléotidiques rrs (ARNr 16S) ont été collectés depuis la base de données GenBank (numéro d'accessions inclus sur la figure des résultats de phylogénie, **Figure 9**). Parmi cette sélection, 47 numéros d'accession sont issus de l'étude (Krairojananan et al., 2020), 32 sont issus de l'étude (Kurilung et al., 2017) et 45 sont issus des recherches (« *Lepstospira ssp* 16S Thailand », « *Leptospira interrogans* 16S Thailand », ect…) directement effectuée sur GenBank. Toutes les séquences sélectionnées ont été alignées à l'aide de Geneious Prime version 2024 0.5. L'alignement final a été utilisé pour comparer les souches de *Leptospira* présentes en Thaïlande chez différents hôtes (humains, rats, bovins, procs, chèvres, chiens, chats et eau). Pour déterminer les relations entre les souches de *Leptospira* circulantes chez les Hommes, les animaux et l'environnement, nous avons construit un arbre phylogénétique basé sur un fragment du gène 16S de 472 bp. Cet arbre a été construit sur la base de la méthode de vraisemblance maximale (modèle K80+G+I) avec 1000 bootstraps, en utilisant PhyML version 3.0. L'arbre a été visualisé sur FigTree version 1.4.4.

b) Analyses spatiales

La cartographie a été réalisée sur le logiciel QGIS version 3.28. Pour la carte de prévalence de la leptospirose bovine, la discrétisation des données continues, avec le choix du nombre de classes, a été réalisé d'après l'équation de Huntsberger : K = 1+ (10/3) x log(n), avec K, le nombre de classes et n, l'effectif de la donnée (Rican, 1998). Dans notre échantillon, la prévalence de la leptospirose présentait une asymétrie positive (dissymétrique à gauche). La méthode de progression géométrique préconisée n'étant pas disponible dans QGIS, le mode « Ruptures naturelles (Jenks) » a été utilisé en remplacement pour un découpage optimal des classes.

Les données des précipitations sont issues du site internet Open Government Data of Thailand (https://data.go.th/en/dataset/spatial-rain). Les données obtenues sont les précipitations moyennes (en mm) par mois et par province de Thaïlande sur l'année 2023. Les précipitations annuelles cumulées ont été calculées en additionnant les précipitation moyennes mensuelles, afin d'obtenir une valeur par province. Dans le logiciel Rstudio, version 4.3.2 (R Development Core Team, Vienne, Autriche), l'homogénéité des variances par province et par région a été comparé par un test de Fligner. Aucune significativité n'a été montré entre les variances des précipitations moyennes mensuelles des différentes provinces, en revanche, les variances des précipitations moyennes mensuelles entre les différentes régions sont significativement différentes. En effet, les précipitations sont plus élevées dans la région Sud de la Thaïlande. Cette dernière est divisée en 2 grandes saisons qui sont la saison chaude (de mars à mai) et la saison des pluies (de juin à février). Les régions Nord, Nord-Est et Centre, sont quant à elles, divisées en 3 saisons : une saison chaude (de mi-février à mi-mai), une saison des pluies (de mi-mai à mi-octobre) et une saison hivernale (de mi-octobre à mi-février). Aucune significativité n'a été montré entre les variances des précipitations moyennes annuelles cumulées entre les différentes régions.

La carte d'occupation du sol et le Digital Elevation Model (DEM) sont issus du site internet ESA CCI (https://www.esa-landcover-cci.org/) et ont été intégrés dans un système d'information géographique (SIG) dans le logiciel QGIS. La surface par province de chaque catégorie d'occupation du sol a été calculé dans QGIS, à l'aide de l'extension « GroupStat ». Puis les surfaces ont été classées en 5 catégories principales : forêts, terres agricoles sèches (c'est-à-dire agriculture non inondée), surfaces d'eau (étangs, lacs, rivières), terres agricoles avec présence d'eau (c'est-à-dire inondées, irriguées et les rizières), et forêts avec présence d'eau (c'est-à-dire inondées, irriguées). Les données de surface extraites de ce calcul ont été exportées en format .csv dans le logiciel Rstudio, afin de réaliser des analyses statistiques sur les facteurs environnementaux susceptibles d'être associés à la l'infection par *Leptospira* chez les bovins de notre étude.

c) Analyses statistiques

Les données de l'échantillonnage (type d'hôte, race, régions, provinces) ont été reçues et nettoyées sur le logiciel Microsoft Excel, puis formatées de manière optimale pour être exportées et traitées sur le logiciel Rstudio. Pour les analyses statistiques, le logiciel Rstudio a été utilisé permettant d'abord de décrire chacune des variables qualitatives de nos échantillons, pour ensuite étudier les liens potentiels entre les proportions de cas positifs à *Leptospira* chez les animaux échantillonnés et les variables environnementales extraites susceptibles d'être des facteurs associés. L'analyse descriptive des variables qualitatives (type hôte, race, région et province) a été réalisé avec de la fonction « geom_bar » du package « ggplot2 » sur R, et les résultats ont été représentés sous forme de diagramme en barres. Des analyses bivariées, utilisant la fonction « prop.test » incluse dans le package de base sur R, ont été réalisé pour comparer les proportions de nos variables qualitatives.

Pour analyser l'infection à *Leptospira* chez les bovins, la probabilité de cas infecté/non infecté a été modélisée en fonction de plusieurs variables environnementales avec une régression logistique (Modèle Linéaire Généralisé (GLM) avec fonction binomiale) en utilisant le package lme4 fourni dans R. La variable à expliquer dans chaque régression logistique était la probabilité d'infection à *Leptospira* (Positif/Négatif) pour chaque échantillon de bovin. Le modèle initial incluait les variables explicatives potentielles liées à l'environnement : surfaces couvertes en forêts (SURF_FOREST), surfaces couvertes en terres agricoles sèches (SURF_CROP), surfaces couvertes en eau (SURF_WATER), surfaces couvertes en terres agricoles avec présence d'eau (SURF_CROPWAT), surfaces couvertes en forêts avec présence d'eau (SURF_FORESTWAT) et précipitations moyennes annuelles cumulées (RAINFALL). Aucune interaction n'a été ajoutée aux variables indépendantes. Les modèles ont été comparés en ce qui concerne la déviance et le degré de liberté à un niveau de signification de valeur $p < 0,05$ sous la distribution du chi carré. Le meilleur modèle a été sélectionné en utilisant le Akaike Information Criterion (AIC) qui prend en compte le maximum de vraisemblance et la parcimonie du modèle. Pour vérifier la corrélation entre nos variables explicatives du modèle, une matrice de corrélation comparant les variables environnementales 2 à 2 a été réalisée **(Annexe 1)**. Le test de corrélation de Pearson a été utilisé entre les différents types de données environnementales (types de couverture du sol et précipitations moyennes annuelles cumulées). Toutes les comparaisons par paires avec une valeur $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$ ont été considérées comme significatives.

I- Exploration des données de l'échantillon

Dans nos résultats, le terme « prévalence » sera utilisé pour désigner la proportion de cas infectés en leptospires dans l'échantillon testé.

a) Répartition biologique et géographique de l'échantillonnage

Dans un premier temps, nous avons regardé la répartition géographique de nos échantillons, par région et par province. D'après les analyses descriptives de nos données brutes, on observe que nos types d'hôtes, bovins et caprins, présentent un déséquilibre **(Figure 6).** Les chèvres sont réparties seulement dans la région Sud, alors que les bovins ont été échantillonnés dans les 4 régions (Nord, Nord-Est, Sud et Centre) de la Thaïlande. On constate aussi que la région Centre présente 3 fois moins d'animaux échantillonnés que les régions Sud, Nord et Nord-Est. De plus, les échantillons proviennent d'une seule province dans cette région alors que 4 provinces ou plus ont été échantillonnées dans les 3 autres régions. On note aussi une répartition déséquilibrée de l'échantillon à l'échelle de la province, avec des proportions qui varient entre 0,2 et 34,3 %. Dans un second temps, nous avons regardé la distribution par race. On compte un total de 263 chèvres, toutes de race autochtone contre 399 bovins divisés en 4 races : 1 buffle, 41 de race autochtone, 158 de type bovin viande et 199 de type bovin laitier. Cette répartition par race présente aussi un déséquilibre.

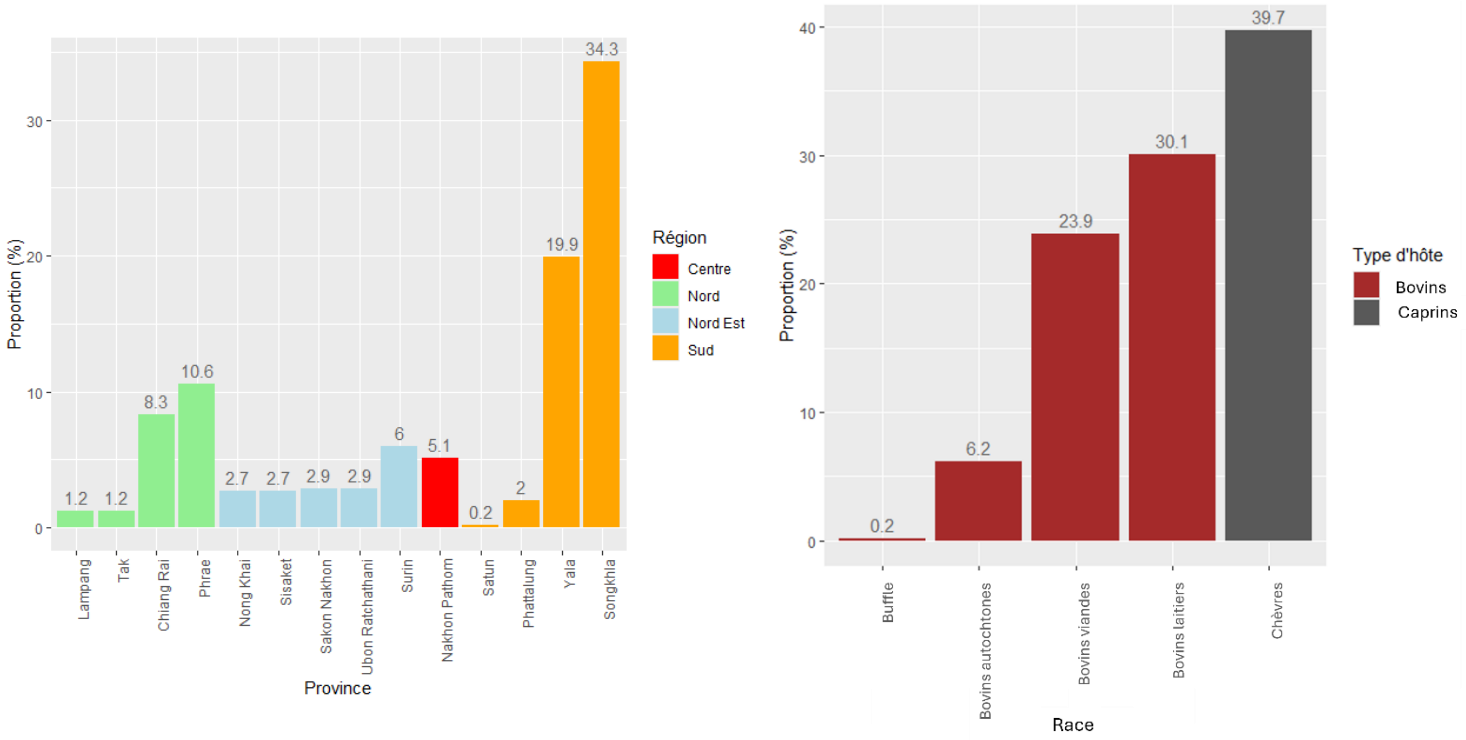


Figure 6 : Distribution des échantillons de bovins et caprins (a) par région et province en Thaïlande et (b) par race. Dans le diagramme de gauche, les barres représentent les proportions de l'échantillon par province et les couleurs représentent les régions. Dans le diagramme de droite, les barres représentent les proportions de l'échantillon par race et les couleurs représentent les types d'hôtes.

b) Détection de Leptospira et proportion de cas infectés chez les animaux échantillonnés

Dans cette partie, les résultats des bovins et caprins sont présentés séparément.

Parmi les bovins échantillonnés, 18,3% ont été testés positifs pour la présence d'ADN de *Leptospira* dans le sang **(Tableau 3).** Les bovins porteurs de leptospires provenaient de 8 provinces sur 13 échantillonnées, distribuées dans chacune des 4 régions géographiques de Thaïlande (Nord, Nord-Est, Centre et Sud). La prévalence obtenue variait entre 0% et 37,5% selon les provinces et entre 0 et 100% selon l'espèce hôte. Il faut préciser que parmi les cas positifs, une seule espèce d'hôte était présente par province. Pour la suite des analyses statistiques, nous avons exclu la race « Buffle car cette modalité présentait un seul individu. Parmi les chèvres échantillonnées, 3,42% ont été testées positives pour la présence d'ADN de *Leptospira* dans le sang **(Tableau 3).** Les chèvres positives étaient réparties sur les 2 provinces échantillonnées. La prévalence variait entre 3,3 et 3,8% selon les provinces. Les prévalences détaillées de *Leptospira* par province et espèce hôte sont fournies à titre d'informations supplémentaires dans l'**Annexe 2**.

Tableau 3 : **Proportion des bovins et caprins positifs à l'infection à *Leptospira* par espèce hôte et région.** Le nombre et la proportion d'échantillons de bovins et caprins positifs à la présence d'ADN de leptospires dans le sang est basé sur les résultats diagnostics obtenus en qPCR. Le résultat entre parenthèses est exprimé en %.

	Bovins viande	**Bovins laitiers**	**Bovins autochtones**	**Buffle**	**Chèvres**	**TOTAL**
Centre	-	12/34 (35,3)	-	-	-	12/34 (35,3)
Nord	3/86 (3,49)	19/55 (34,5)	-	-	-	22/141 (15,6)
Nord Est	14/59 (23,7)	7/54 (13,0)	-	1/1 (100)	-	22/114 (19,3)
Sud	0/13 (0)	17/56 (30,4)	0/41 (0)	-	9/263 (3,42)	26/373 (6,97)
TOTAL	17/158 (10,8)	55/199 (27,6)	0/41 (0)	1/1 (100)	9/263 (3,42)	82/662 (12,4)

II- Analyses inférentielles de l'infection à *Leptospira* selon les facteurs biologiques et géographiques

a) Comparaison des résultats de l'infection à Leptospira entre bovins et caprins dans la région Sud

La région du Sud est la seule région où les 2 types d'hôtes, bovins et caprins, ont été échantillonnés. Les proportions observées d'animaux positifs à l'infection par *Leptospira* dans cette région, étaient de 15,5 % (17/110) pour les bovins et de 3,4% (9/263) pour les chèvres. Pour déterminer si ces proportions différaient de manière significative entre les 2 groupes, nous avons effectué un test de proportions. L'hypothèse nulle (H0) du test supposait que la proportion d'animaux infectés était la même dans les 2 groupes, tandis que l'hypothèse alternative (H1) suggérait que ces proportions étaient différentes. Le test de proportion a donné une p-value < 0,001 (IC [0,043-0,198]), montrant une différence significative entre les proportions des 2 groupes. On conclut que la proportion de bovins infectés (15,5%) est significativement supérieure à la

proportion de chèvres infectées (3,4%) dans la région du Sud de la Thaïlande. Pour la suite des analyses statistiques, nous avons exclu les chèvres de nos analyses statistiques car leur répartition limitée à une seule région ne permettait pas de faire des analyses supplémentaires.

b) Comparaison des résultats de l'infection à Leptospira entre les races autochtones et allochtones

Dans notre échantillonnage, les bovins de race autochtone étaient présents uniquement dans la région Sud. Nous avons donc comparé les races autochtones avec les races allochtones (bovins viandes et laitiers). Les proportions observées d'animaux positifs à l'infection par *Leptospira* dans cette région, étaient de 0% (0/41) pour les bovins autochtones et de 24,6% (17/69) pour les bovins de races allochtones. Le test de proportion a donné une p-value de < 0,001, montrant une différence significative entre les proportions des 2 groupes. Les bovins de races allochtones sont significativement plus infectés par *Leptospira* que les bovins de races autochtones. Nous avons affiné le test en comparant séparément les bovins autochtones avec les bovins viandes, puis avec les bovins laitiers. La proportion de bovins viande infectés observée dans la région Sud était nulle, comme celle des bovins autochtones. Aucune de ces 2 races n'était infectée par *Leptospira* dans notre échantillon dans la région Sud. En revanche, une proportion de 30,4% (17/56) des bovins laitiers échantillonnés dans le Sud étaient infectés par *Leptospira*. Le test de proportions entre bovins autochtones et bovins laitiers a donné un p-value < 0,001, montrant une différence significative entre ces 2 races. Les bovins de race autochtone étant présents uniquement dans la région Sud, la suite des analyses statistiques, s'est portée sur la comparaison des différentes races allochtones, présentes dans plusieurs régions.

c) Mesure de l'interaction entre races et régions sur la proportion de cas infectés par Leptospira

Dans notre étude, globalement, une seule race de bovins a été échantillonnée par province, ce qui ne permet pas de comparer les races à l'échelle de la province. Nous avons donc fait le choix de comparer les races à l'échelle de la région. Les régions Nord, Nord-Est et Sud, sont les seules où on peut comparer les bovins viandes et les bovins laitiers. Les cas positifs de bovins laitiers sont présents dans les 3 régions, tandis que les cas positifs de bovins viandes sont présents seulement dans le nord et le Nord-Est. Les proportions détaillées sont rapportées dans le **Tableau 3**. Les régions Nord et Nord-Est sont donc les 2 seules ayant à la fois des cas positifs pour les 2 races allochtones. Afin de comprendre l'interaction entre ces variables, nous avons utilisé un modèle linaire généralisé (GLM) (**Tableau 4**). La variable binomiale « Positif / Négatif » à l'infection par *Leptospira* était notre variable réponse et les variables « Race » et « Région » étaient les variables explicatives.

Tableau 4 : Résultats du modèle linéaire généralisé sur l'interaction des variables « Race » et « Région ».

Variable	Coefficient	Erreur standard	Valeur z	OR	IC à 95%	p-value
Intercept	*- 3,320*	*0,588*	*- 5,650*	*0,036*	*0,009 – 0,096*	*< 0,001 ****
Hôte bovins laitiers	2,681	0,653	4,109	14,602	4,621 – 64,96	< 0,001 ***
Région NE	2,153	0,663	3,249	8,607	2,643 – 38,77	0,0012 **
Hôte b. laitier : Région NE	- 3,418	0,827	- 4,134	0,033	0,006 – 0,151	< 0,001 ***

OR = Odds Ratio, IC = Intervalle de confiance. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

Les résultats obtenus avec le GLM semblent montrer une interaction significative entre la race et la région sur la probabilité d'infection à *Leptospira* **(Figure 7 et Tableau 4).** Dans la région Nord, la probabilité d'infection est significativement ($p < 0,001$) plus élevée chez les bovins laitiers par rapport aux bovins viandes. Au contraire, dans la région du Nord-Est, la probabilité d'infection est significativement ($p < 0,001$) plus faible chez les bovins laitiers par rapport aux bovins viandes. L'interaction négative observée entre hôte et région sur l'infection à *Leptospira*, indique que l'effet d'être un bovin laitier infecté par rapport à être un bovin viande infecté est significativement ($p < 0,001$) réduit dans la région Nord-Est. Les intervalles de confiance relativement étendus **(Figure 7)** suggèrent une variabilité. Les estimations peuvent présenter une incertitude et doivent donc être interprétées avec prudence. Pour des conclusions plus robustes, il serait bénéfique d'augmenter la taille de l'échantillon ou examiner d'autres facteurs potentiels influençant l'infection.

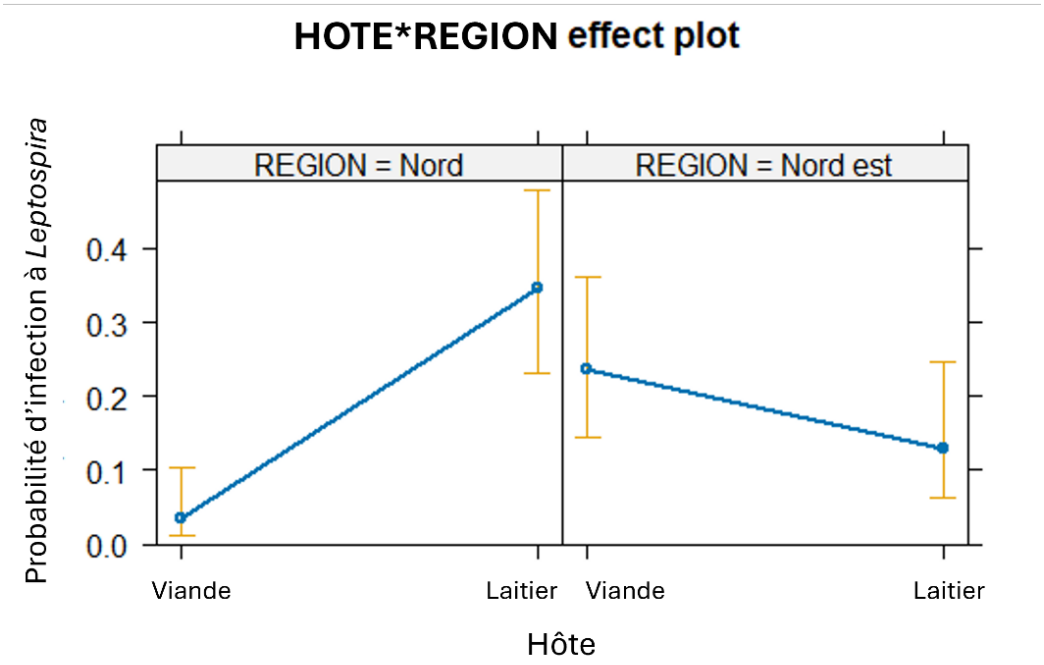


Figure 7 : Représentation graphique de l'effet des variables du modèle linéaire généralisé représentant l'interaction entre les variables « Race » et « Région ». L'interaction s'applique sur les races de bovins viandes et des bovins laitiers et sur les régions Nord et Nord-Est.

III- Analyses à effets multiples de l'infection à *Leptospira* selon les facteurs environnementaux

a) Sélection du modèle sur l'AIC

Une régression logistique binomiale a été effectuée incluant la variable hôte et toutes les variables environnementales sélectionnées, à savoir : la couverture en terres cultivées sèches (crop), la couverture en forêts sèches (forest), la couverture en eau (water), la couverture en terres cultivées avec présence d'eau (cropwater), la couverture en forêt avec présence d'eau (forestwater) et les précipitations moyennes annuelles cumulées (rainfall). La variable hôte comprenait les bovins viandes et laitiers répartis dans les régions du Nord et du Nord-Est. La sélection du meilleur modèle GLM s'est fait selon la méthode pas à pas descendante de

ces variables dont les résultats sont présentés dans le **Tableau 5.** Les variables retenues dans le modèle logistique réduit sont, l'hôte, la couverture en forêt avec présence d'eau, la couverture en terres cultivées avec présence d'eau, la couverture en eau et la couverture en forêt sèches. L'AIC du modèle de départ comprenant toutes les variables explicatives était de 283,7. Après la sélection pas à pas descendante, le modèle réduit obtenu ayant l'AIC le plus faible est de 279,9. L'AIC le plus faible représente le meilleur équilibre entre l'ajustement aux données et la complexité du modèle. Les informations détaillées du modèle pas à pas descendant sont rapportées dans l'**Annexe 3**.

Tableau 5 : Résultats du modèle linéaire généralisé entre l'infection à *Leptospira* et les variables explicatives retenues par la sélection pas à pas descendante.

Variable	Coefficient	Erreur standard	Valeur z	OR	IC à 95%	p-valeurs
Intercept	*- 5,057*	*1,111*	*- 4,551*	*0,006*	*0,0005- 0,042*	*< 0,001 ****
Host Dairy cattle	0,723	0,363	1,995	2,061	1,020 – 4,256	0,046 *
ForestWater	0,171	0,045	3,838	1,187	1,098 – 1,310	< 0,001 ***
Water	- 0,018	0,005	- 3,818	0,982	0,972 – 0,990	< 0,001 ***
CropWater	0,0008	0,0002	3,732	1,001	1,000 -1,001	< 0,001 ***
Forest	0,0002	0,0001	1,837	1,000	0,999 – 1,000	0,066

OR = Odds Ratio, IC = Intervalle de confiance. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

b) Influence des facteurs environnementaux sur la proportion de cas infectés par Leptospira chez les bovins viandes et laitiers

Les graphiques issus du GLM montrent comment la probabilité de l'infection par *Leptospira* varie en fonction de la race bovine et des différents types d'environnement. Les résultats du GLM montrent une influence des facteurs sélectionnés sur la variable réponse (**Tableau 5 et Figure 8**). Le modèle obtenu suggère que la race du bovin est liée à l'infection par *Leptospira.* Le fait d'être un bovin laitier favorise de manière significative la probabilité d'infection à *Leptospira* (OR = 2,061 ; $p < 0,05$) par rapport au fait d'être un bovin viande. Il existe une corrélation positive entre la couverture forestwat (OR = 1,187 ; $p < 0,001$) et la probabilité d'infection à *Leptospira.* Contrairement à la couverture en eau dont l'effet est significativement négatif (OR = 0,982, $p < 0,001$) sur la probabilité de l'infection. Les variables cropwater (OR = 1 ; $p < 0,001$) et forest (OR = 1 ; $p > 0,05$) ne semblent pas présenter d'effets sur la variable réponse. Il faut néanmoins faire attention à l'incertitude des estimations (zone en bleue sur les graphiques) et à l'étendue plutôt élevée des intervalles de confiance. Ces résultats sont à interpréter avec prudence. Nous avons aussi vérifié la surdispersion du modèle pour savoir si la relation entre la moyenne et la variance respecte bien celle du modèle choisi. Dans notre cas la surdispersion est 0,845 (267,96/317 = 0,845). La variabilité observée dans les données est légèrement inférieure à celle prévu par le modèle.

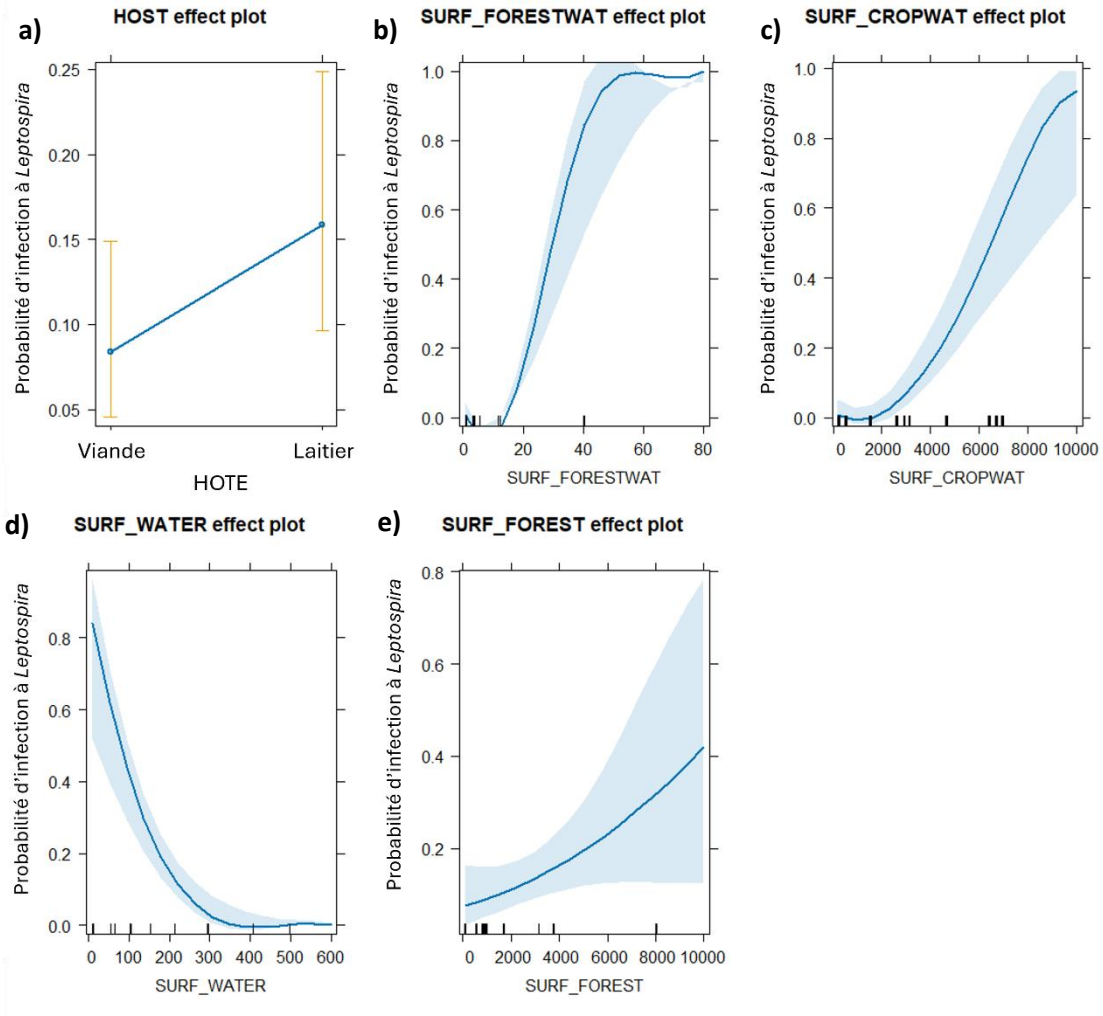


Figure 8 : Représentation graphique de l'effet de chaque variable du modèle GLM réduit retenu. Contribution de (a) la race de bovins, (b) la couverture en foret avec présence d'eau, (c) la couverture en terres agricoles avec présence d'eau et (d) la couverture en eau, (e) la couverture en foret, pour expliquer la probabilité d'infection par *Leptospira* chez les bovins. La surface couverte des variables environnementales est exprimée en km².

IV- Analyses phylogénétiques

L'amplification par PCR des gènes secY et rrs (16S) de nos 82 échantillons bovins et caprins positifs n'a pas réussie. Cette phylogénie a donc été construite sur la base de séquences issues de la banque de données GenBank pour décrire la diversité génétique actuellement connue en Thaïlande.

Les analyses de diversité génétique ont été menées sur un fragment de 472 pb du gène rrs 16S comprenant 36 séquences humaines, 18 séquences provenant de rats, 16 de bovins, 11 de porcs, une de chèvre, 11 de chiens, 7 de chats et 23 de l'environnement. L'arbre phylogénétique obtenu selon la méthode de maximum de vraisemblance a montré 3 clusters, décrivant 3 cycles épidémiologiques potentiellement différents **(Figure 9)**. Un premier groupe de *L. interrogans* comprend 19 cas cliniques humains, 12 rats, 3 bovins, 5 chiens, un chat et un échantillon d'eau. Un deuxième groupe de *L. borgpetersenii* regroupe 8 cas cliniques humains, 2 rats, un chien et 3 chats. Enfin, un troisième groupe de *L. weilii* inclus un seul cas clinique humain présent en Thaïlande, 11 bovins, 8 porcs, une chèvre, 3 chiens et un échantillon d'eau. Aucun rongeur

n'a été identifié dans ce dernier groupe, ce qui suggère un cycle épidémiologique excluant le rat. Les séquences clonales pour tous les hôtes exceptés les Hommes, ont été exclues pour une meilleure lisibilité sur l'arbre phylogénétique.

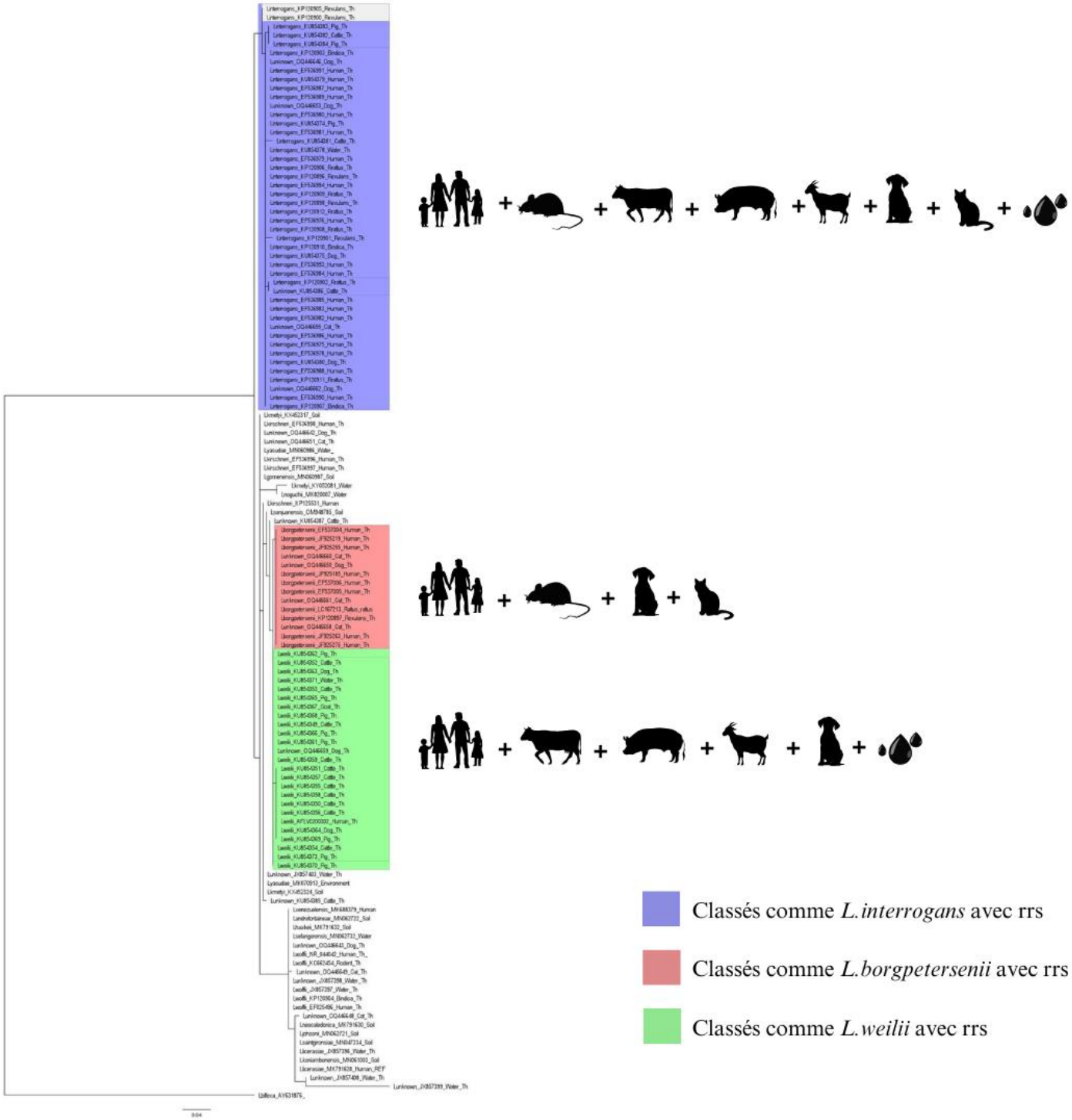


Figure 9 : **Arbre phylogénétique obtenu selon la méthode du maximum de vraisemblance (modèle K80+G+I ; 1000 réplicas) déduit du gène rrs 16S (séquence de 472 pb).** Les séquences présentes dans la phylogénie sont référencées en utilisant les espèces de *Leptospira* identifiées, suivies des numéros d'accessions GenBank, de l'espèce hôte et du pays d'origine. Elles sont issues d'études menées en Thaïlande (Th) et des séquences de références ont été ajoutées pour identifier l'espèce des souches non connues (« unknown »). Les principaux groupes génétiques sont mis en évidence par des couleurs. Les silhouettes en noir représentent les espèces d'hôtes.

PARTIE 4 : DISCUSSION

Cette partie est consacrée à la discussion des résultats. Tout d'abord, nous expliquerons en quoi les résultats obtenus dans notre étude permettent de valider ou non nos hypothèses de départ. Ils seront également discutés par rapport aux résultats existants dans la littérature. Ensuite, les limites de l'étude et leur influence sur les résultats seront explicités. Enfin, l'étude sera mise en perspective et des recommandations seront suggérées pour la suite du projet.

L'objectif de notre étude était de déterminer si les souches de *Leptospira* circulantes chez les bovins et caprins en Thaïlande, pouvait être impliquées comme source d'infection chez l'Homme. Cette étude a montré que la leptospirose circule activement dans les 4 régions de la Thaïlande chez toutes les espèces de bovins et est également présente chez les chèvres dans la région Sud. Cette étude est une des premières à étudier le lien entre les animaux d'élevages et les humains sur les espèces de *Leptospira* pathogènes en Thaïlande. Elle constitue une approche épidémiologique importante et les résultats pourraient permettre d'affiner la compréhension de la distribution des espèces de *Leptospira* au niveau national.

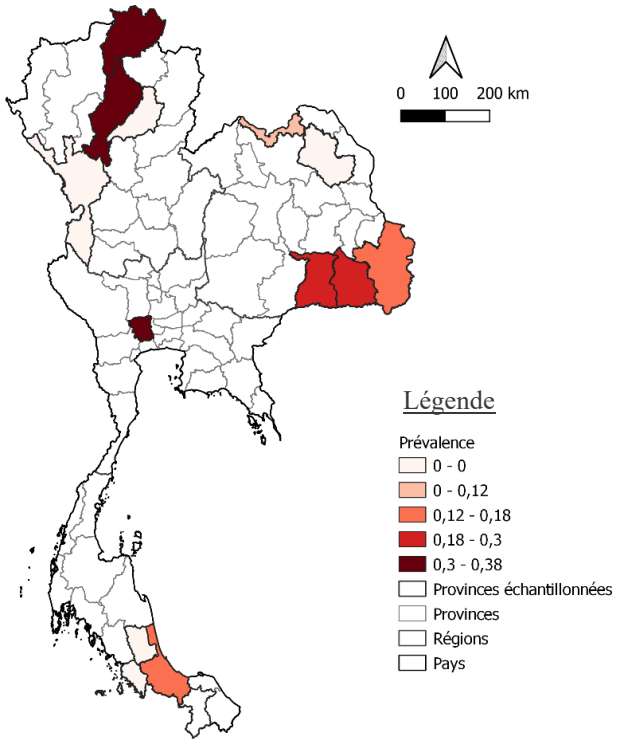


Figure 10 : Représentation cartographique de la prévalence de l'infection *à Leptospira* chez les bovins échantillonnés par province entre juin 2023 et mai 2024. Les couleurs représentent la prévalence d'infection (proportion de cas infectés dans notre échantillon), se référer à la légende.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence la présence de l'infection à *Leptospira* chez les bovins et les caprins en Thaïlande. Chez les bovins, la prévalence de l'infection, représentée ici par la proportion de cas infectés, était de 18,3% (illustrée **Figure 10**). Cette prévalence montre une circulation importante de la leptospirose chez ces hôtes. Une étude visant à évaluer le portage urinaire de leptospires pathogènes dans la province de Nan ; avait montré une prévalence de12,2% chez les bovins (Kurilung et al., 2017). Cependant, les échantillons provenaient d'une seule province de Thaïlande. Il n'existe aucune étude moléculaire réalisée à l'échelle nationale chez les bovins en Thaïlande, la plupart des études antérieures ont évalué la séroprévalence de l'infection à *Leptospira* qui témoigne d'une infection passée de la leptospirose

mais ne permet pas de mettre en évidence le rôle de l'hôte en tant que source d'infection pour la leptospirose humaine (Chadsuthi et al., 2017; Suwancharoen et al., 2013). Chez les chèvres, échantillonnées seulement dans la région Sud, la prévalence obtenue était de 3,42%. Dans d'autres régions du monde comme au Brésil, la leptospirose est la principale maladie infectieuse qui altère la reproduction chez les chèvres et les moutons (Martins et al., 2012). Ce bilan a aussi été observé dans d'autres pays en voir de développement, dans lesquels les petits ruminants sont une source économiques majeure pour la population (Martins and Lilenbaum, 2014).

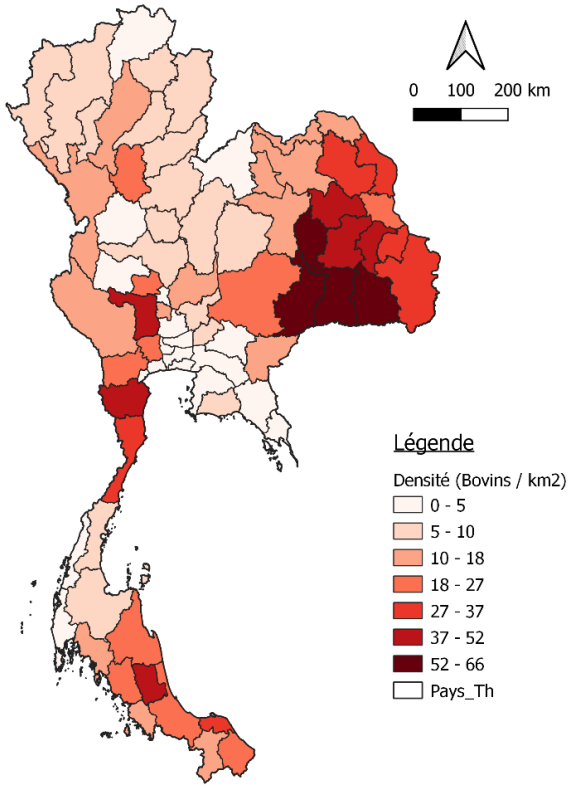


Figure 11 : Carte de la densité des bovins viandes en Thaïlande sur l'année 2022 exprimée en nombre d'individus par km². Source **:** (Office of agricultural economics, 2023)

Dans un second temps, l'analyse descriptive de la distribution des individus infectés dans notre échantillon a permis de dégager certains facteurs biologiques (races) et géographiques (régions). Dans notre étude, le seul buffle échantillonné (dans la province d'Ubon Ratchathani, région Nord-Est) était positif à l'Infection par *Leptospira*. Aucune étude moléculaire sur la leptospirose n'a été réalisé chez les buffles en Thaïlande. Néanmoins, une étude a estimé la séroprévalence à 63,6% (131/206) de cette infection chez les buffles dans la province de Sakon Nakhon, région Nord-Est de la Thaïlande montrant que la leptospirose circule chez cet hôte (Wongpanit et al., 2012). Pour les bovins viandes, les cas infectés dans notre étude étaient répartis dans les régions Nord-Est (23,7%) et Nord (3,5%) et aucun dans le Sud. La densité de bovins viandes en Thaïlande (**Figure 11**) montre que la région Nord-Est abrite la plus grande densité d'élevage de cette espèce, allant jusqu'à 66 bovins au km². C'est la région la plus agricole du pays, où les bovins sont élevés non seulement pour leur viande mais aussi pour leur utilisation dans les travaux agricoles (Wongpanit et al., 2012). Dans notre étude, la comparaison des prévalences obtenues chez les bovins viandes et les bovins laitiers n'est pas vraiment représentative puisque ces 2 races ne provenaient pas des mêmes fermes, ni des mêmes provinces. En Thaïlande, les bovins laitiers sont plutôt présents dans le régions Nord et Centre et les bovins viandes sont majoritaires dans le Nord-Est (Singhla et al., 2017). De plus, les pratiques d'élevage peuvent aussi influencer la transmission de la leptospirose chez les bovins viande et laitiers. En Thaïlande, les bovins laitiers sont généralement élevés en stabulation, tandis que les bovins viandes sont élevés dans des systèmes extensifs, souvent sur des petites parcelles près des champs de culture ou sur les rizières après la récolte

(Charoensook et al., 2013). Ensuite, les pratiques agricoles comme la transhumance, les déplacements fréquents des troupeaux de fermes en fermes ou sur les marchés représenteraient un risque supplémentaire de propagation de la leptospirose. Les animaux se retrouvent exposés à de nouvelles sources d'infection et à des sols potentiellement contaminés (Bharti et al., 2003). Ce facteur d'exposition est aussi intéressant, cependant, le manque d'informations à ce sujet dans notre étude ne permet pas de tirer des conclusions.

Ensuite, des facteurs environnementaux ont été estimé à l'aide d'une étude analytique. Les animaux d'élevage sont exposés à divers facteurs de risque de la leptospirose en raison de leur environnement, des pratiques d'élevage et de leurs interactions avec d'autres animaux. Les périodes de pluies et d'inondations sont connues pour augmenter l'exposition des animaux d'élevage aux sources d'infections (Martins and Lilenbaum, 2014). Les pratiques d'élevage jouent un rôle crucial, en effet l'accès facile à des eaux contaminées et le contact avec des animaux sauvages ou domestiques infectés, comme les rongeurs et les chiens, sont des facteurs majeurs (Yupiana et al., 2020). L'eau environnementale est généralement considérée comme un facteur commun de transmission de la leptospirose chez l'Homme et les animaux (Narkkul et al., 2021) . Une étude précédente dans la province de Nan a montré que la leptospirose humaine était plus associée à la présence d'eau qu'au contact avec les rongeurs (Della Rossa et al., 2015).

Enfin, dans cette étude, l'objectif était d'utiliser le séquençage comme outil épidémiologique pour étudier la diversité génétique des espèces de *Leptospira* présentes chez les bovins et caprins échantillonnés. Cependant, l'amplification par PCR de nos 82 échantillons infectés n'a pas pu aboutir. Nous avons donc basé nos analyses sur des études existantes menées en Thaïlande. Dans cette phylogénie, 3 principales espèces pathogènes de *Leptospira* sont ressorties : *L. interrogans, L. borgpetersenii* et *L. weilii. L. interrogans* a été détecté chez tous les types d'hôtes identifiés, incluant l'Homme, ce qui représente un premier cycle épidémiologique. Ensuite, *L. borgpetersenii* a été identifiés chez l'Homme, le rat, le chien et le chat, présentant un deuxième cycle épidémiologique. Enfin *L. weilii*, a été détecté à partir de plusieurs sources mais pas le rat. Sa présence chez les animaux domestiques (bovins, caprins, porcs, chiens) et dans l'eau de l'environnement représente une source probable d'infection humaine, même si un seul échantillon humain positif a été identifié en Thaïlande. Ces résultats ont été confirmés dans la province de Nan, au nord de la Thaïlande, où 8,39 % (11/131) des échantillons bovins ont été positif à une infection par *L. weilii* (Kurilung et al., 2017). Des isolats de *L. weilii* provenant de sources humaines et bovines en Australie ont montrés qu'ils partageaient un profil génétique identique, impliquant une transmission inter-espèces (Slack et al., 2007). Jusqu'à présent, *L. weilii* n'a jamais été détecté chez le rat ou autres rongeurs en Thaïlande, ce qui suggère que les bovins pourraient également être un réservoir important de leptospires pathogènes, remettant en question le rôle exclusif du rat comme réservoir asymptomatique. Néanmoins, le gène 16S n'est pas idéal pour l'épidémiologie moléculaire car comme on peut le voir dans notre phylogénie, certains clusters incluent plusieurs espèces. Il faut donc affiner les analyses avec des cibles plus discriminantes.

Notre étude présentait plusieurs déséquilibres dans l'échantillonnage. Tout d'abord, l'échantillonnage des chèvres n'était pas aussi représentatif que celui des bovins car elles ont été prélevées dans une région seulement (Sud), bien qu'elles soient présentes dans d'autres régions, comme le Centre et le Nord-Est (Pralomkarn et al., 2012). Ainsi, nos analyses sur les facteurs biologiques, géographiques et environnementaux n'ont pas pu être réalisées pour ce type d'hôte. En ce qui concerne les bovins, les échantillons étaient

inégalement répartis entre les provinces et les régions, la région Centre ayant 3 fois moins d'échantillons que les 3 autres régions. Un seul échantillon de buffle étant disponible, aucune analyse comparative de la prévalence n'a pu être réalisée pour cette race. De plus, les races autochtones, les bovins viandes et les bovins laitiers n'ont pas été échantillonnés dans les mêmes fermes, ni dans les mêmes provinces, rendant impossible certaines analyses comparatives. Le manque d'information sur les modes d'élevage pratiqués dans les fermes échantillonnés nous a empêché de tirer des conclusions sur les facteurs d'exposition environnementaux. Pour approfondir nos recherches, il serait nécessaire de contacter les éleveurs ou de retourner dans les fermes pour obtenir des informations sur les pratiques d'élevage et les comportements des troupeaux, afin de mieux évaluer l'exposition des animaux et des éleveurs à la leptospirose.

Bien qu'il existe quelques études moléculaires sur la leptospirose réalisées en Thaïlande, le nombre de données génétiques reste faible. Pour enrichir cette banque de données, il est nécessaire de séquencer les échantillons de bovins et caprins infectés issus de notre étude. Des travaux ultérieurs devraient également se concentrer davantage sur le séquençage de génomes d'isolats humains afin d'identifier les souches pathogènes et d'étendre la diversité génétique connues. L'acquisition de ces données supplémentaires permettraient de renforcer les conclusions sur une potentielle transmission inter-espèce entre bovins et humains en Thaïlande et de mettre potentiellement en évidence un cycle épidémiologique excluant le rat.

En conclusion, l'infection à *Leptospira* circule activement chez les bovins à travers toute la Thaïlande et chez les chèvres dans le Sud du pays. Pour la phylogénie, nos résultats basés sur des séquences existantes dans la littérature en Thaïlande, soutiennent l'hypothèse selon laquelle, *L. weilii* serait partagé entre l'Homme et les bovins, en Thaïlande, excluant potentiellement le rat. Les bovins pourraient donc constituer un potentiel réservoir asymptomatique impliqué dans la transmission de la leptospirose humaine. Notre étude souligne la nécessité d'une surveillance accrue et d'une analyse plus approfondie pour confirmer cette hypothèse. Elle fournit une meilleure connaissance de la circulation de la leptospirose chez les bovins et caprins en Thaïlande, ce qui peut permettre d'améliorer le contrôle de la maladie et le développement de stratégies de prévention.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abadia, G., Andre-Fontaine, G., Baranton, G., Bonnier, M., Dantoine, F., Capek, I., Estavoyer, J.-M., Languille, J., Lerasle, S., Morer, I., Rousseau, E., Knauer, A., 2005. Rapport de 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. 1–43.

Agampodi, S., Gunarathna, S., Lee, J.-S., Excler, J.-L., 2023. Global, regional, and country-level cost of leptospirosis due to loss of productivity in humans. PLoS Negl. Trop. Dis. 17, 1–11. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011291

Amran, F., Noor Halim, N.A., Muhammad, A.H., Mohd Khalid, M.K.N., Dasiman, N.M., Shamsusah, N.A., Abd Talib, A.K.A., Noh, M.A., Mohd Ali, M.R., Hashim, R., 2023. Application of Multilocus Sequence Typing for the Characterization of *Leptospira* Strains in Malaysia. Trop. Med. Infect. Dis. 8, 1–69. https://doi.org/10.3390/tropicalmed8020069

Ayral, F.C., 2013. La leptospirose dans les cheptels bovins laitiers en France : impact économique de l'infection. SNGTV. 61–68.

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. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2

Biscornet, L., De Comarmond, J., Bibi, J., Mavingui, P., Dellagi, K., Tortosa, P., Pagès, F., 2020. An Observational Study of Human Leptospirosis in Seychelles. Am. J. Trop. Med. Hyg. 103, 999–1008. https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0228

Bourhy, P., 2017. Diagnostic, surveillance et épidémiologie de la leptospirose en France. BEH.131–137.

Bunmee, T., Chaiwang, N., Kaewkot, C., Jaturasitha, S., 2018. Current situation and future prospects for beef production in Thailand — A review. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 31, 968–975. https://doi.org/10.5713/ajas.18.0201

Casanovas-Massana, A., Hamond, C., Santos, L.A., De Oliveira, D., Hacker, K.P., Balassiano, I., Costa, F., Medeiros, M.A., Reis, M.G., Ko, A.I., Wunder, E.A., 2020. *Leptospira yasudae* sp. nov. and *Leptospira stimsonii* sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 70, 1450–1456. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003480

Centers for Disease Control and Prevention, 2023. Leptospirosis. https://www.cdc.gov/leptospirosis/about/index.html

Chadsuthi, S., Bicout, D.J., Wiratsudakul, A., Suwancharoen, D., Petkanchanapong, W., Modchang, C., Triampo, W., Ratanakorn, P., Chalvet-Monfray, K., 2017. Investigation on predominant *Leptospira* serovars and its distribution in humans and livestock in Thailand, 2010-2015. PLoS Negl. Trop. Dis. 11, 1–18. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005228

Chadsuthi, S., Chalvet-Monfray, K., Geawduanglek, S., Wongnak, P., Cappelle, J., 2022. Spatial–temporal patterns and risk factors for human leptospirosis in Thailand, 2012–2018. Sci. Rep. 12, 1–11. https://doi.org/10.1038/s41598-022-09079-y

Chadsuthi, S., Chalvet-Monfray, K., Wiratsudakul, A., Suwancharoen, D., Cappelle, J., 2018. A remotely sensed flooding indicator associated with cattle and buffalo leptospirosis cases in Thailand 2011–2013. BMC Infect. Dis. 18, 602. https://doi.org/10.1186/s12879-018-3537-3

Charoensook, R., Knorr, C., Brenig, B., Gatphayak, K., 2013. Thai pigs and cattle production, genetic diversity of livestock and strategies for preserving animal genetic resources. Maejo Int J Sci Technol. 113–132

Costa, F., Hagan, J.E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M.S., Stein, C., Abela-Ridder, B., Ko, A.I., 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. PLoS Negl. Trop. Dis. 9, 1-19. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898.

Della Rossa, P., Tantrakarnapa, K., Sutdan, D., Kasetsinsombat, K., Cosson, J.-F., Supputamongkol, Y., Chaisiri, K., Tran, A., Supputamongkol, S., Binot, A., Lajaunie, C., Morand, S., 2015. Environmental factors and public health policy associated with human and rodent infection by leptospirosis: a land cover-based study in Nan province, Thailand. Epidemiol. Infect. 144, 1550–1562. https://doi.org/10.1017/S0950268815002903

El-Tras, W.F., Bruce, M., Holt, H.R., Eltholth, M.M., Merien, F., 2018. Update on the status of leptospirosis in New Zealand. Acta Trop. 188, 161–167. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.021

Grooms, D.L., 2006. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. Theriogenology 66, 624–628. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.016

Guernier, V., Lagadec, E., Cordonin, C., Le Minter, G., Gomard, Y., Pagès, F., Jaffar-Bandjee, M.-C., Michault, A., Tortosa, P., Dellagi, K., 2016. Human Leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: Are Rodents the (Only) Ones to Blame? PLoS Negl. Trop. Dis. 10, 1-19. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004733

Guernier, V., Richard, V., Nhan, T., Rouault, E., Tessier, A., Musso, D., 2017. *Leptospira* diversity in animals and humans in Tahiti, French Polynesia. PLoS Negl. Trop. Dis. 11, 1-16. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005676

Hovind-Hougen, K., 1979. *Leptospzraceae*, a New Family to Include *Leptospira* Noguchi 1917 and Leptonema gen. nov. 29, 245–251.

Institut Pasteur, 2021. Rapport annuel d'activité du CNR de la leptospirose, 2021. Institut Pasteur. 1-79.

Institut Pasteur, 2014. Rapport annuel d'activité du CNR de la leptospirose, 2014. Institut Pasteur. 1-9.

Krairojananan, P., Thaipadungpanit, J., Leepitakrat, S., Monkanna, T., Wanja, E.W., Schuster, A.L., Costa, F., Poole-Smith, B.K., McCardle, P.W., 2020. Low Prevalence of *Leptospira* Carriage in Rodents in Leptospirosis-Endemic Northeastern Thailand. Trop. Med. Infect. Dis. 5, 154. https://doi.org/10.3390/tropicalmed5040154

Kurilung, A., Chanchaithong, P., Lugsomya, K., Niyomtham, W., Wuthiekanun, V., Prapasarakul, N., 2017. Molecular detection and isolation of pathogenic *Leptospira* from asymptomatic humans, domestic animals and water sources in Nan province, a rural area of Thailand. Res. Vet. Sci. 115, 146–154. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.017

Levett, P., 2001. Leptospirosis 14. https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001

Martins, G., Lilenbaum, W., 2014. Leptospirosis in sheep and goats under tropical conditions. Trop. Anim. Health Prod. 46, 11–17. https://doi.org/10.1007/s11250-013-0480-6

Martins, G., Penna, B., Hamond, C., Leite, R.C.-K., Silva, A., Ferreira, A., Brandão, F., Oliveira, F., Lilenbaum, W., 2012. Leptospirosis as the most frequent infectious disease impairing productivity in small ruminants in Rio de Janeiro, Brazil. Trop. Anim. Health Prod. 44, 773–777. https://doi.org/10.1007/s11250-011-9964-4

Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, 2023. Les politiques agricoles à travers le monde.

Mori, M., Bourhy, P., Le Guyader, M., Van Esbroeck, M., Djelouadji, Z., Septfons, A., Kodjo, A., Picardeau, M., 2017. Pet rodents as possible risk for leptospirosis, Belgium and France, 2009 to 2016. Eurosurveillance. 1-6. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.43.16-00792

Narkkul, U., Thaipadungpanit, J., Srisawat, N., Rudge, J.W., Thongdee, M., Pawarana, R., Pan-ngum, W., 2021. Human, animal, water source interactions and leptospirosis in Thailand. Sci. Rep. 11, 3215. https://doi.org/10.1038/s41598-021-82290-5

Ngasaman, R., Chanchayanon, B., Kaewnoi, D., Kamyingkird, K., 2022. A Variety of *Leptospira* Serovar Distribution in Bullfighting Cattle in Southern of Thailand. Zoonotic Dis. 2, 73–81. https://doi.org/10.3390/zoonoticdis2020008

Niwetpathomwat, A., Luengyosluechakul, S., Geawduanglek, S., 2006. A serological investigation of leptospirosis in sows from central Thailand. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 37, 716–9.

Peerapakorn, S., Yingyong, T., 2021. Annual epidemiological surveillance report 2021. Ministry of public health, department of disease control. 1-645.

Pralomkarn, W., Supakorn, C., Boonsanit, D., 2012. Knowledge in Goats in Thailand. Walailak J. Sci. Technol. WJST 9, 93–105.

Pumipuntu, N., Suwannarong, K., 2016. Seroprevalence of *Leptospira* Spp. in Cattle and Dogs in Mahasarakham Province, Thailand. J. Health Res. 30, 223–226. https://doi.org/10.14456/JHR.2016.30

Rajapakse, S., 2022. Leptospirosis: clinical aspects. Clin. Med. 22, 14–17. https://doi.org/10.7861/clinmed.2021-0784

Rican, S., 1998. La cartographie des données épidémiologiques: Les principales méthodes de discrétisation et leur importance dans la représentation cartographique : Géographie de la santé. pp. 461–470.

Roy, S.K., Bhattacharjee, S., 2021. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. Can. J. Microbiol. 67, 687–702. https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0572

Silva, J.F. da, Alba, D.A.H., Jorge, S., Gindri, P., Bialves, T.S., Souza, G.N. de, Bruhn, F.R.P., Pegoraro, L.M.C., Dellagostin, O.A., 2022. Leptospirosis in Dairy Cattle from Southern Brazil - Risk Factors. Acta Sci. Vet. 50. https://doi.org/10.22456/1679-9216.116363

Singhla, T., Boonyayatra, S., Punyapornwithaya, V., VanderWaal, K.L., Alvarez, J., Sreevatsan, S., Phornwisetsirikun, S., Sankwan, J., Srijun, M., Wells, S.J., 2017. Factors Affecting Herd Status for Bovine Tuberculosis in Dairy Cattle in Northern Thailand. Vet. Med. Int. 2017, 1–6. https://doi.org/10.1155/2017/2964389

Slack, A.T., Symonds, M.L., Dohnt, M.F., Corney, B.G., Smythe, L.D., 2007. Epidemiology of *Leptospira weilii* serovar Topaz infections in Australia 31.

Sohm, C., Steiner, J., Jöbstl, J., Wittek, T., Firth, C., Steinparzer, R., Desvars-Larrive, A., 2023. A systematic review on leptospirosis in cattle: A European perspective. One Health 17, 100608. https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100608

Suwancharoen, D., Chaisakdanugull, Y., Thanapongtharm, W., Yoshida, S., 2013. Serological survey of leptospirosis in livestock in Thailand. Epidemiol. Infect. 141, 2269–2277. https://doi.org/10.1017/S0950268812002981

Suwancharoen, D., Limlertvatee, S., Chetiyawan, P., Tongpan, P., Sangkaew, N., Sawaddee, Y., Inthakan, K., Wiratsudakul, A., 2016. A nationwide survey of pathogenic leptospires in urine of cattle and buffaloes by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method in Thailand, 2011–2013. J. Vet. Med. Sci. 78, 1495–1500. https://doi.org/10.1292/jvms.15-0493

Suwanpakdee, S., Kaewkungwal, J., White, L.J., Asensio, N., Ratanakorn, P., Singhasivanon, P., Day, N.P.J., Pan-Ngum, W., 2015. Spatio-temporal patterns of leptospirosis in Thailand: is flooding a risk factor? Epidemiol. Infect. 143, 2106–2115. https://doi.org/10.1017/S0950268815000205

Tagliabue, S., Figarolli, B.M., D'Incau, M., 2016. Serological surveillance of Leptospirosis in Italy: two-year national data (2010--2011). Vet. Ital. 129–139. https://doi.org/10.12834/VetIt.58.169.2

Torgerson, P.R., Hagan, J.E., Costa, F., Calcagno, J., Kane, M., Martinez-Silveira, M.S., Goris, M.G.A., Stein, C., Ko, A.I., Abela-Ridder, B., 2015. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. PLoS Negl. Trop. Dis. 9, e0004122. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004122

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. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270

Viroj, J., Claude, J., Lajaunie, C., Cappelle, J., Kritiyakan, A., Thuainan, P., Chewnarupai, W., Morand, S., 2021. Agro-Environmental Determinants of Leptospirosis: A Retrospective Spatiotemporal Analysis (2004–2014) in Mahasarakham Province (Thailand). Trop. Med. Infect. Dis. 6, 115. https://doi.org/10.3390/tropicalmed6030115

Wongpanit, K., Suwanacharoen, D., Srikram, A., 2012. Serological survey of leptospirosis in Thai swamp buffalo *(Bubalus bubalis)* in Sakon Nakhon province, Thailand. Kasetsart J. Nat. Sci. 46, 736–741.

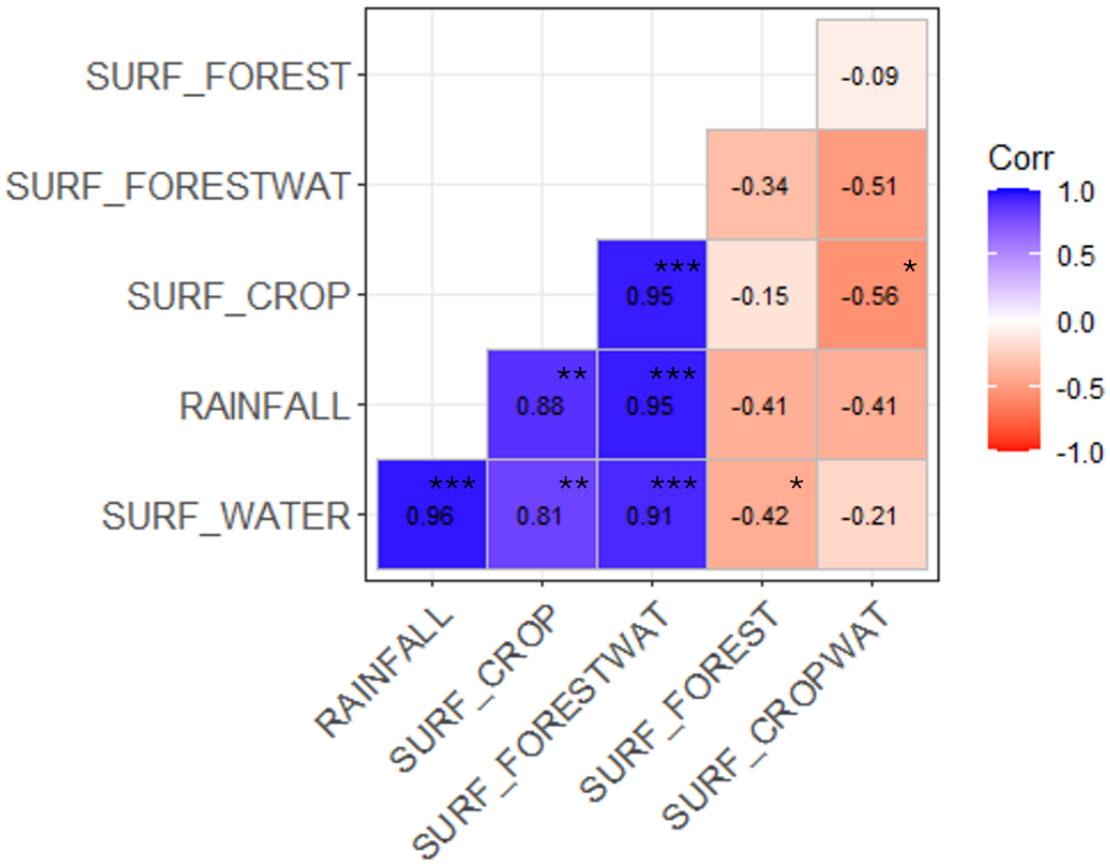
World Health Organization, 2023a. World Malaria report 2023.

World Health Organization, 2023b. Global Tuberculosis report 2023.

Yatbantoong, N., Chaiyarat, R., 2019. Factors Associated with Leptospirosis in Domestic Cattle in Salakphra Wildlife Sanctuary, Thailand. Int. J. Environ. Res. Public. Health 16, 1042. https://doi.org/10.3390/ijerph16061042

Yupiana, Y., Vallée, E., Wilson, P., Weston, J.F., Benschop, J., Collins-Emerson, J., Heuer, C., 2020. On-farm risk factors associated with *Leptospira* shedding in New Zealand dairy cattle. Epidemiol. Infect. 148, e219. https://doi.org/10.1017/S095026882000103X

Annexe 1



Annexe 1 : Matrice de corrélation comparant les variables explicatives environnementales 2 à 2. La matrice de corrélation a été réalisée avec le coefficient de corrélation de Pearson. Les couleurs froides (proches du bleu) tendent vers 1 et représentent les variables avec une corrélation positive (variables autocorrelées). Les couleurs chaudes (proches du rouge) tendent vers -1 et représentent les variables avec une corrélation négative (variables inversement corrélées). Les p-values ont été ajoutées selon la légende suivante : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Annexe 2

Site d'échantillonnage	*Bovins viandes*	*Bovins laitiers*	*Bovins autochtones*	*Buffle*	*Prévalence bovine par site (%)*
Ubon Ratchathani	2/19	-	-	1/1	3/20 (15)
Nong Khai	-	2/17	-	-	2/17 (11,8)
Songkla	-	17/56	0/40	-	17/96 (17,7)
Sisaket	-	5/18	-	-	5/18 (27,8)
Surin	12/40	-	-	-	12/40 (30)
Satun	-	-	0/1	-	0/1 (0)
Lampang	3/8	-	-	-	3/8 (37,5)
Chiang Rai	-	19/55	-	-	19/55 (34,6)
Nakhon Pathom	-	12/34	-	-	12/34 (35,3)
Phattalung	0/13	-	-	-	0/13 (0)
Phrae	0/70	-	-	-	0/70 (0)
Sakhon Nakhon	-	0/19	-	-	0/19 (0)
Tak	0/8	-	-	-	0/8 (0)
Total	**17/158**	**54/199**	**0/41**	**1/1**	**73/399 (18,3)**

Annexe 2a : Prévalence bovine de *Leptospira* détaillées par province et par race.

Site d'échantillonnage	*Chèvres*	*Prévalence caprine par site (%)*
Songkhla	5/126	(3,97)
Yala	4/128	(3,13)
Total	**9/263**	**3,42**

Annexe 2b : Prévalence caprine de *Leptospira* détaillées par province.

Annexe 3

```
> model_host2envt_reduit <- step(model_host2envt, direction = "backward", trace = 1)
Start:  AIC=283.73
INTERP_BIN ~ HOST + SURF_CROP + SURF_FORESTWAT + RAINFALL + SURF_WATER +
    SURF_CROPWAT + SURF_FOREST

                Df Deviance    AIC
- RAINFALL       1   267.78 281.78
- SURF_CROP      1   267.93 281.93
- HOST           1   268.47 282.47
- SURF_FOREST    1   268.61 282.61
<none>               267.73 283.73
- SURF_WATER     1   274.52 288.52
- SURF_FORESTWAT 1   274.90 288.90
- SURF_CROPWAT   1   290.66 304.66

Step:  AIC=281.78
INTERP_BIN ~ HOST + SURF_CROP + SURF_FORESTWAT + SURF_WATER +
    SURF_CROPWAT + SURF_FOREST

                Df Deviance    AIC
- SURF_CROP      1   267.96 279.96
- SURF_FOREST    1   268.80 280.80
- HOST           1   268.85 280.85
<none>               267.78 281.78
- SURF_FORESTWAT 1   275.13 287.13
- SURF_WATER     1   287.26 299.26
- SURF_CROPWAT   1   293.78 305.78

Step:  AIC=279.96
INTERP_BIN ~ HOST + SURF_FORESTWAT + SURF_WATER + SURF_CROPWAT +
    SURF_FOREST

                Df Deviance    AIC
<none>               267.96 279.96
- SURF_FOREST    1   271.22 281.22
- HOST           1   272.02 282.02
- SURF_WATER     1   291.48 301.48
- SURF_CROPWAT   1   294.62 304.62
- SURF_FORESTWAT 1   294.91 304.91
```

Annexe 3 : Script du modèle linéaire généralisé pas à pas descendant