

Génotypes circulants de *Leptospira* en Polynésie française: étude de suivi de surveillance épidémiologique moléculaire sur 9 ans

Linda Grillová, Hilde Angermeier, Marc Levy, Marine Giard, Stéphane Lastère, Mathieu Picardeau

Version 2 Publié: 28 septembre 2020 • <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008662>

Abstrait

Contexte

La leptospirose est une zoonose répandue avec un impact mondial, en particulier parmi les populations vulnérables dans les milieux pauvres en ressources des pays tropicaux. Les rongeurs ont été considérés comme le principal réservoir de la maladie; cependant, une grande variété de mammifères peut également servir d'hôtes. Nous examinons ici la diversité génétique des souches de *Leptospira* à partir d'échantillons biologiques de patients et d'animaux en Polynésie française (PF) de 2011 à 2019.

Méthodologie / Principaux résultats

De 2011 à 2019, nous avons collecté 444 échantillons sanguins de patients diagnostiqués comme atteints de leptospirose. Le volume limité de matériel clinique et la faible quantité d'ADN leptospiral dans les échantillons sanguins nous ont conduit à développer une PCR imbriquée ciblant le locus *secY* qui nous a permis d'amplifier et de séquencer 244 échantillons (55%). De plus, 20 souches de *Leptospira* récupérées dans le sang de patients de 2002 à 2011 ont été séquencées et entièrement caractérisées au niveau du sérotype et utilisées comme souches de référence pour l'association de différentes branches phylogénétiques avec les sérotypes respectifs. Les séquences *secY* ont été comparées aux séquences disponibles publiquement de patients et de réservoirs animaux en FP (n = 79). Nous avons identifié les rats comme la principale source d'infection pour *L. borgpetersenii* sérotype Ballum et *L. interrogans* de Icterohaemorrhagiae, chiens comme la principale source d'infection pour *L. interrogans* de Australis, et les porcs de la ferme comme principale source d'infection pour *L. interrogans* sérotypes Pomona ou Canicola. *L. interrogans* a été associé aux infections les plus graves avec respectivement 10 et 5 cas mortels dus aux sérotypes Icterohaemorrhagiae et Australis. La mortalité était significativement associée à un âge plus avancé (valeur p <0,001).

Conclusions / importance

Nous avons décrit la dynamique des populations de leptospires circulant parmi les patients en PF, y compris deux patients qui ont été réinfectés avec des génotypes de *Leptospira* non apparentés, et clarifié le rôle local des réservoirs animaux dans la voie de transmission de la leptospirose à l'homme. Le génotypage systématique de *Leptospira* directement sur des échantillons biologiques devrait permettre le suivi épidémiologique des souches en circulation et évaluer l'impact des interventions de lutte sur la transmission de la maladie.

Résumé de l'auteur

Les leptospires pathogènes sont les agents responsables de la leptospirose, une zoonose négligée survenant dans le monde entier avec la plus forte incidence de la maladie dans la région du Pacifique, y compris la Polynésie française (PF). Dans cette étude, une PCR imbriquée d'échantillons sanguins a permis une fréquence d'isolement élevée de l'ADN de *Leptospira* chez les patients atteints de maladie fébrile en PF. Les isolats infectants de *Leptospira* ont été caractérisés par séquençage du gène *secY* à partir de 244 échantillons cliniques de 2011 à 2019. Les génotypes ont été attribués aux espèces et sérotypes de *Leptospira* en comparant les séquences avec les génomes des souches isolées avant 2011 en FP. Cette étude permet donc de suivre la distribution des génotypes / sérotypes sur une période de 18 ans. Les séquences leptospirales de patients ont également été comparées aux séquences *secY* de différents réservoirs animaux d'une étude précédente en FP montrant que non seulement les rats mais aussi les chiens et les porcs pourraient jouer un rôle important dans la circulation de souches pathogènes de *Leptospira* dans FP. De nouveaux progrès dans notre compréhension de l'épidémiologie des génotypes circulants de *Leptospira* devraient contribuer à la mise en œuvre de mesures de prévention et d'intervention pour réduire le risque de transmission de la leptospirose en PF.

Citation: Grillová L, Angermeier H, Levy M, Giard M, Lastère S, Picardeau M (2020) Génotypes circulants de *Leptospira* en Polynésie française: étude de suivi de surveillance épidémiologique moléculaire sur 9 ans. PLoS Negl Trop Dis 14 (9): e0008662. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008662>

Editeur: Joseph M. Vinetz, Yale University School of Medicine, ÉTATS-UNIS

Reçu: 11 mai 2020; **Accepté:** 31 juillet 2020; **Publié:** 28 septembre 2020

Copyright: © 2020 Grillová et al. Il s'agit d'un article en libre accès distribué sous les termes de la [licence d'attribution Creative Commons](#), qui permet une utilisation, une distribution et une reproduction sans restriction sur tout support, à condition que l'auteur et la source d'origine soient crédités.

Disponibilité des données: Des séquences *secY* partielles représentant tous les génotypes trouvés dans cette étude (génotype 1 - génotype 20) ont été déposées dans GenBank sous les numéros d'accès suivants: MT235218 - MT235235. L'ensemble des séquences génomiques des souches sélectionnées a été soumis au BIGSdb accessible au public hébergé à l'Institut Pasteur MLST et aux bases de données du génome entier MLST (Bacterial Isolate Genome Sequence database, <https://bigsdb.pasteur.fr/leptospira/>).

Financement: Ce travail a été soutenu financièrement par une subvention PTR (PTR30-17) de l'Institut Pasteur (MP, LG) et du Programme européen de microbiologie de santé publique (EUPHEM) du Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (HA). Les bailleurs de fonds n'ont joué aucun rôle dans la conception de l'étude, la collecte et l'analyse des données, la décision de publier ou la préparation du manuscrit.

Intérêts concurrents: les auteurs ont déclaré qu'il n'y avait pas d'intérêts concurrents.

introduction

La leptospirose, une maladie zoonotique émergente, est causée par des spirochètes du genre *Leptospira*. Il comprend 64 espèces appartenant à des groupes phylogénétiques en corrélation avec la virulence: les saprophytes (S1, S2), les intermédiaires (P2) et les pathogènes (P1) [1]. Chaque année, le *Leptospira* pathogène cause plus d'un million de cas graves et 60 000 décès dans le monde [2]. Cependant, la leptospirose est sous-diagnostiquée en raison de manifestations cliniques non spécifiques et d'une faible sensibilité des tests diagnostiques actuels. Les rats sont des porteurs asymptomatiques et servent de réservoir principal, mais *Leptospiraspp.* peut coloniser les tubules rénaux d'une grande variété de mammifères sauvages et domestiques. Les bactéries sont excrétées dans l'urine des animaux infectés et persistent dans l'eau douce [3]. La transmission à un nouvel hôte se produit généralement après une exposition à cette eau contaminée [4]. Les infections sont plus courantes dans les régions à faibles ressources, tropicales et subtropicales et les épidémies surviennent souvent après des catastrophes naturelles telles que des ouragans avec une augmentation des précipitations et des inondations [5].

Cette étude se concentre sur la Polynésie française (FP) qui est un pays d'outre-mer français composé de 22 territoires dans l'océan Pacifique Sud englobant 118 atolls et îles [6]. Sa population totale est estimée à 270 000 habitants. Tahiti est l'île la plus peuplée de PF avec environ 70% de sa population qui y vit. La PF est un point chaud de la leptospirose avec une incidence annuelle de 30 à 55 cas pour 100 000 habitants [7]. Bouscaren et ses collègues ont rapporté les données de surveillance de 1356 cas confirmés et probables de leptospirose de 2007 à 2017 montrant que la prévalence de la leptospirose est beaucoup plus élevée chez les mâles et que les activités d'élevage et d'élevage ainsi que le contact avec les animaux sont des facteurs de risque potentiels [8]. La leptospirose en PF est également associée à de fortes pluies et se produit principalement dans les îles hautes (îles sous le vent, îles du vent et Marquises). Les rats ont été identifiés comme une source majeure de leptospirose humaine dans la FP en génotypant l'ADN de *Leptospira* de patients (n = 33) et de différents réservoirs animaux, y compris des rats, des porcs de ferme et des chiens domestiques [7]. Cependant, les données épidémiologiques sont encore incomplètes et de nombreuses questions restent sans réponse: quel est le rôle des porcs d'élevage dans la transmission de la leptospirose en PF [7], quelles sont les souches associées à la gravité de la maladie, et voit-on l'émergence de nouvelles souches pendant le suivi à long terme?

Nous avons séquencé et analysé 264 échantillons prélevés sur des patients atteints de leptospirose en 2002-2019 en PF avec les objectifs suivants: i.) Clarifier le rôle du réservoir animal pour les espèces pathogènes de *Leptospira* et aborder la voie de transmission aux humains, ii.) Décrire le l'épidémiologie moléculaire de la leptospirose et identifier les tendances de la dynamique des populations de génotypes de *Leptospira* au fil du temps, et iii.) déterminer si certaines souches étaient associées à une évolution sévère de la maladie. Cette étude montre que la surveillance épidémiologique moléculaire de la leptospirose peut être réalisée par génotypage direct à partir d'échantillons biologiques. Ces résultats devraient contribuer à établir des mesures de contrôle et de prévention appropriées pour réduire le fardeau de cette maladie émergente.

Méthodes

Collecte d'échantillons cliniques, isolats et sérotypage

De 2011 à 2019, nous avons collecté 444 échantillons de sérum de patients diagnostiqués avec leptospirose au Centre hospitalier de Polynésie Française à Tahiti, FP. Le diagnostic était basé sur les symptômes cliniques en combinaison avec le dépistage de qPCR. L'ADN a été isolé en utilisant le kit Magna Pure LC DNA Isolation (Roche, France). Des échantillons d'ADN ont ensuite été envoyés au Centre national de référence pour la leptospirose (NRC) à l'Institut Pasteur de Paris, France, pour une analyse moléculaire plus approfondie. De plus, 20 souches de *Leptospira* isolées chez des patients de 2002 et 2011 ont été utilisées comme souches de référence. *Leptospira*les souches ont été cultivées dans un milieu liquide EMJH à 30 ° C. L'identification des espèces a été réalisée par amplification et séquençage de l'ADNr 16S. La caractérisation sérologique des isolats a été réalisée au National Reference Center for *Leptospira* en utilisant des antisérums de lapin contre des sérotypes de référence représentant une batterie standard de 24 sérogroupes [9].

Typage moléculaire

La PCR conventionnelle pour amplifier *secY* a été réalisée comme décrit précédemment [10]. La PCR nichée a été réalisée en utilisant les amorces nouvellement conçues ([tableau S1](#)) amplifiant un fragment d'ADN de 410 pb de long dans les conditions suivantes: 95 ° C (1 min); 94 ° C (30 s), 55 ° C (30 s) et 72 ° C (1 min) pendant 45 cycles; avec l'extension finale à 72 ° C pendant 10 min. La deuxième étape de la PCR nichée a été réalisée dans les mêmes conditions, mais avec une température d'hybridation diminuée (52 ° C). Chaque mélange de PCR contenait 1U d'ADN polymérase de Taq recombinant GE Healthcare (Scientific Laboratory Supplies, Nottingham, Royaume-Uni), 5 µM de dNTP, 25 mM de MgCl₂, 5 µl de tampon 10x, 10 µM de chaque amorce, 5 µl d'ADN obtenu à partir d'échantillons de sérum de patient dans la première étape et 1 µl de la réaction PCR initiale terminée dans la deuxième étape. Le mélange réactionnel a été complété avec de l'eau de qualité PCR jusqu'à un volume final de 50 µl.

Séquençage de l'ADN et disponibilité des données

Le séquençage Sanger des produits de PCR a été réalisé par Eurofins Genomics Germany GmbH (Ebersberg, Allemagne) et les analyses de séquence ont été réalisées avec le logiciel Lasergene (DNASTAR v. 7.1.0.; DNASTAR, Madison, WI). La NGS a été réalisée pour les souches 200800517, 200212385, ainsi que 20040363 à l'aide du kit de préparation de bibliothèque d'ADN Nextera XT et des systèmes de séquençage NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USA) à la Mutualized Platform for Microbiology (P2M) de l'Institut Pasteur. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel CLC Genomics Workbench 9 (Qiagen, Hilden, Allemagne). *SecY* partielles des séquences représentant tous les génotypes trouvés dans cette étude (génotype 1 - génotype 20) ont été déposées dans GenBank sous les numéros d'accès suivants: MT235218 - MT235235. L'ensemble des séquences génomiques des souches sélectionnées a été soumis au BIGSdb accessible au public hébergé à l'Institut Pasteur MLST et aux bases de données du génome entier MLST (Bacterial Isolate Genome Sequence database, <https://bigsdbs.pasteur.fr/leptospira/>).

Analyses et statistiques phylogénétiques

Des arbres phylogénétiques à maximum de vraisemblance ont été générés avec MEGA 6 [11] en utilisant le modèle Tamura Nei et 1000 répliquats bootstrap pseudo-aléatoires. Les réseaux de jonction médian ont été générés avec la version 4 du réseau [12]. Les suppressions et les insertions étaient comptées comme des événements uniques. La dynamique de population des génotypes identifiés a été montrée par le diagramme de Muller généré dans R-studio (version 3.6.1.) En utilisant le package MullerPlot [13]. L'interférence statistique a été calculée dans R-studio (version 3.6.1). Nous avons utilisé des tests t ou ANOVA pour les variables numériques (âge, valeurs CT) et la comparaison des proportions et des tests chi-carré d'indépendance pour les variables catégorielles (sexe des patients, résultat clinique, année / saison d'échantillonnage, *Leptospira* espèces, lignées, génotypes et sérogroupes). Le niveau de signification a été fixé à 0,05.

Déclaration d'éthique

Un consentement éclairé écrit des patients n'était pas nécessaire car l'étude a été menée dans le cadre de la surveillance de routine du Centre Hospitalier de Polynésie française, Polynésie française, et aucun échantillon clinique supplémentaire n'a été collecté aux fins de l'étude. Les échantillons humains ont été anonymisés. La collecte des souches a été réalisée conformément à la Déclaration d'Helsinki.

Résultats

Conception et pouvoir de discrimination de la PCR imbriquée basée sur le gène *secY*

Nous avons extrait les séquences du gène *secY* à partir de 707 génomes de *Leptospira* pathogène disponibles dans la base de données MLST de l'Institut Pasteur (<https://bigsd.b.pasteur.fr/leptospira/>). Cet ensemble d'échantillons représente toutes les souches pathogènes qui avaient été séquencées au moment de la conception (juin 2019) isolées de différents hôtes à travers le monde. Les amorces pour la PCR nichée ([tableau S1](#)) ont été conçues sur la base de l'alignement des séquences pour amplifier la région hautement variable de *secY*. Les amorces externes *secY* ont été utilisées pour l'amplification des premiers produits PCR (554 pb) et *secY* des amorces internes ont été utilisées pour l'amplification des seconds et finaux produits de PCR. La PCR nichée nouvellement conçue ciblait un fragment d'ADN de 410 pb de long uniquement. Même si le fragment raccourci de 410 pb a perdu 10% de son pouvoir de discrimination par rapport au fragment plus long (554 pb), il a quand même pu distinguer 52%, 56% et 53% des séquences concaténées de gènes de typage du MLST 1 (Concatémère de 3 111 pb de 7 locus) [14], MLST 2 (4 189 pb de 8 locus) [15] et MLST 3 (2 980 pb de concatémère de 6 locus) [10], respectivement.

Les analyses phylogénétiques des séquences *secY* partielles du fragment 410-nt de 707 *Leptospira* pathogènes isolées dans le monde (dont 17 espèces pathogènes et 22 sérogroupes) ont révélé 114 génotypes, contre 300 CG en utilisant les 545 gènes de base définis par cgMLST [16]. Les séquences *secY* peuvent discriminer les souches au niveau des espèces et des sous-espèces mais, comme les schémas MLST, le niveau de discrimination ne permet pas toujours de prédire le sérotype.

Typage moléculaire

De 2011 à 2019, nous avons collecté 444 échantillons de sang de patients diagnostiqués comme ayant une leptospirose en PF. En raison de la faible quantité d'ADN de *Leptospira* présente dans les échantillons, il n'a pas toujours été possible de séquencer *secY* dans les échantillons positifs au qPCR. Une PCR imbriquée a donc été conçue pour augmenter l'efficacité de l'amplification et, en raison du volume limité de matériel clinique disponible, n'a été appliquée qu'à un sous-ensemble d'échantillons. L'efficacité d'amplification utilisant la PCR traditionnelle et nichée a atteint respectivement 44% et 65%, faisant de la PCR nichée la méthode de choix pour les études futures. Une combinaison de PCR traditionnelle et imbriquée nous a permis d'amplifier et de séquencer Sanger le *secY* locus dans 244 échantillons (55%). Parmi notre échantillon, la grande majorité des patients étaient des hommes (82%). L'âge médian était de 37 (8–88) ans. Les patients sont originaires de Tahiti (n = 177), Huahine (n = 21), Raiatea (n = 17), Moorea (n = 14), Bora Bora (n = 6), Tahaa (n = 4), Marquises (n = 2), îles Gambier (n = 2) et Austral (n = 1) ([tableau S2](#)).

Nous avons combiné nos données avec les données *secY* déjà disponibles à partir d'une étude précédente dans FP [7] qui a amélioré notre échantillon de 321 échantillons ([tableau S2](#)). Des échantillons ont été prélevés sur des patients humains (n = 33) et des réservoirs animaux (rats, n = 15; chiens, n = 2; et porcs, n = 29) de 2012 à 2015 [7]. La majorité des échantillons provenaient de Tahiti (71%) qui est l'île la plus grande et la plus peuplée de FP [8]. En outre, 20 *Leptospira* souches isolées de patients en PF entre 2002 et 2011 ont été incluses dans notre étude. Un sérogroupage a été réalisé sur ces souches cultivées (Australis, n = 3; Ballum, n = 2; Canicola, n = 2; Icterohaemorrhagiae, n = 8; Pomona, n = 2; Mini, n = 4). Ces souches ont servi de références pour l'association de différentes branches phylogénétiques avec des sérogroupes respectifs. L'analyse du fragment *secY* de 410 pb a divisé notre ensemble d'échantillons en 20 génotypes qui se sont regroupés en 4 lignées ([Fig 1](#), [Fig 2](#)). Chaque génotype différait par au moins un variant nucléotidique unique (SNV) des autres. Les lignées ont été attribuées en fonction de la phylogénie et différaient les unes des autres d'au moins 4 SNV.

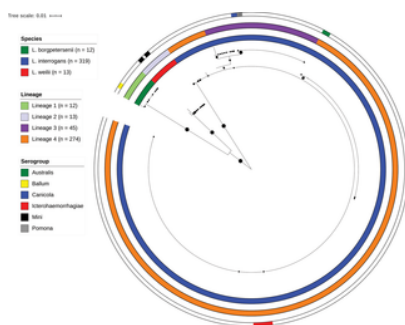


Fig 1. Phylogénie du maximum de vraisemblance (1000 répliquats bootstrap) des séquences de *Leptospira secY* de patients.

La phylogénie montre la distribution des lignées d'espèces et des sérogroupes circulant dans la PF pendant la période allant de 2002 à 2019 (n = 344). Les valeurs Bootstrap sont affichées avec la taille des cercles au milieu des branches, les bootstraps inférieurs à 70 ne sont pas affichés. Les noms d'espèces, de lignées et de sérogroupes sont donnés par les codes de couleur (des cercles intérieurs aux cercles extérieurs). Un sérogroupage a été réalisé sur des isolats de culture. La couleur blanche indique que les informations n'étaient pas disponibles.

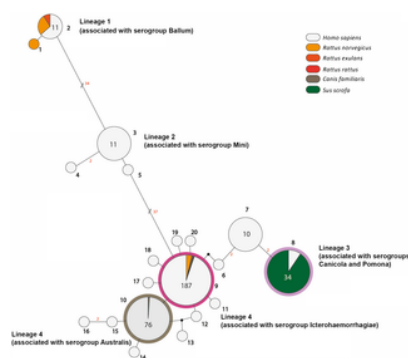


Fig 2. Réseau de jonction médiane montrant différents génotypes de *Leptospira* isolés à partir de différents hôtes et le nombre de différences mutationnelles entre eux.

Le nombre de mutations, lorsque > 1, est indiqué à côté des branches (en rouge). Les variantes alléliques inférées (vecteurs médians) sont représentées par de petits cercles de connexion noirs. S'ils sont contigus, les indels étaient considérés comme des événements uniques uniquement. Le nombre d'individus, lorsque > 1, est indiqué à l'intérieur des cercles et est indiqué par la taille du cercle. Le code couleur indique l'hôte. Les génotypes (en gras) et les lignées sont indiqués à côté des haplotypes associés.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008662.g002>

Lignée 1 contenait 12 échantillons appartenant à *L. borgpetersenii*. Cette lignée était partagée entre les patients ainsi que les rats et était associée au sérotype Ballum. Lignée 2 contenait 13 échantillons de *L. weilii*, a été trouvée exclusivement chez des patients et a été associée au sérotype Mini. La grande majorité des échantillons ont été identifiés comme *L. interrogans* créant 15 génotypes différents qui se sont regroupés en deux lignées. La lignée 4 était représentée par 12 génotypes dont deux centraux; génotype 10 (n = 75) trouvé principalement chez l'homme, mais aussi chez un chien et associé au sérotype Australis; et génotype 9 (n = 188). Ce dernier était le génotype le plus répandu, qui est partagé entre les humains, les rats (n = 10), un chien et un porc. Elle est associée au sérotype Icterohaemorrhagiae (Fig 2). La lignée 3 a été divisée en 3 génotypes. Le génotype 8 a été isolé de patients ainsi que de porcs d'élevage (n = 28) (figure 2) et a été associé au sérotype Canicola et au sérotype Pomona. Pour discriminer davantage les deux sérotypes différents partageant le même *secY* séquence, nous avons effectué un séquençage du génome entier et cgMLST basé sur 545 gènes de base [16]. Les souches du sérotype Pomona (ids 200403463 et 200210107) appartenaient au groupe clonal cgMLST 5, tandis que la souche du sérotype Canicola (id 200212385) appartenait au groupe clonal cgMLST 28, confirmant que la séquence *secY* seule ne peut pas discriminer entre ces deux sérotypes.

En nous concentrant sur la leptospirose humaine, nous avons constaté que la plupart étaient des hommes (n = 206, 83%) et que l'âge des patients variait de 8 à 88 ans avec une médiane de 33 et une moyenne de 37 (IC à 99%: 33,91– 39,24) ans. L'inférence statistique a été calculée pour l'âge moyen et les variables catégorielles telles que le sexe, l'issue clinique (décès ou rétablissement), les espèces de *Leptospira*, les lignées et les génotypes. Sans surprise, nous avons trouvé une différence statistiquement significative de l'âge moyen des patients décédés de leptospirose par rapport à ceux qui ont survécu (valeur p < 0,001). Les patients plus âgés (âge médian 56 ans) avaient un taux de mortalité plus élevé que les patients plus jeunes (âge médian 35 ans) (S1 Fig). Au total, nous avons collecté des échantillons de 15 patients décédés des suites d'une leptospirose. Tous les patients ont été infectés avec les souches appartenant à la lignée 4 (*L. Interrogans* associés aux sérotypes Icterohaemorrhagiae, n = 10; et australis, n = 5). Fait intéressant, nous avons identifié une différence significative dans l'âge moyen des patients infectés par différentes lignées (Fig S2). Par rapport à des lignées 2, 3 et 4 qui infectent les individus avec un âge moyen de 33, 27, 37, respectivement, lignée 1 (*L. Borgpetersenii* associé au sérotype Ballum) était plus susceptible d'infecter des patients d'âge moyen plus élevé (57, valeur p = 0,0268). Hormis ce résultat, aucune autre corrélation n'a été trouvée. Au cours de notre suivi, des réinfections avec des génotypes non apparentés ont également été rapportées pour deux patients. Un individu a été réinfecté avec un autre génotype 4 Lignée (*L. Interrogans* associés à sérotypes Australis) 5 ans après l'infection initiale (*L. Interrogans* associés à sérotypes Icterohaemorrhagiae). Pour l'autre personne, réinfection avec un génotype non apparenté (Lignée 2; *L. Weilli*) se passe 1 an après la première infection (Lignée 3; *L. interrogans*). Ces observations suggèrent qu'une infection antérieure peut ne pas protéger contre une infection ultérieure.

Discussion

Les souches pathogènes de *Leptospira* sont des bactéries fastidieuses et à croissance lente, ce qui rend difficile l'isolement des souches infectieuses à partir de sources biologiques. Alternativement, les marqueurs génétiques peuvent être directement amplifiés à partir des échantillons et séquencés pour évaluer la diversité génétique de la bactérie. Un certain nombre de loci, dont *rrs* [9, 17], *ppk* [2], *ligB* [9], *flb1* [18, 20], *secY* [7, 17– 22] ont été utilisés pour identifier le *Leptospira* en circulation génotypes dans des échantillons biologiques. Pour faciliter une comparaison avec les études précédentes en FP [7], nous avons amplifié, séquencé et analysé le gène *secY* à partir d'échantillons biologiques prélevés sur des patients de 2011 à 2019. *SecY* est une cible largement utilisée pour l'analyse phylogénétique de *Leptospira* en raison de sa présence chez toutes les espèces de *Leptospira* et sa grande diversité de séquences permettant une discrimination au niveau de la sous-espèce [22]. Ce gène a déjà été utilisé dans un schéma de typage moléculaire (MLST3) [10] et comme locus de typage unique dans de nombreuses études épidémiologiques [7, 17– 22]. De plus, nous avons révélé que la phylogénie basée sur le locus *secY* des souches de *Leptospira* disponibles dans notre base de données (n = 707) a un pouvoir de discrimination équivalent à 38%, 52%, 56% et 53% des phylogénies basées sur cgMLST, MLST 1, MLST 2 et MLST 3, respectivement. De plus, malgré la grande diversité de séquences, la phylogénie basée sur le locus *secY* est capable de suivre la ramification de la phylogénie basée sur les génomes de noyau, permettant ainsi une identification précise des souches de *Leptospira* au niveau de l'espèce. Une cible à locus unique a été choisie pour les raisons suivantes: i.) Utilisation d'un volume limité de l'échantillon clinique correspondant et ii.) Faible quantité de *Leptospira* ADN présent dans les échantillons de sérum; les deux empêchant une amplification réussie de cibles multi-locus pour MLST. La sensibilité inférieure de la PCR dans les échantillons de sérum par rapport aux échantillons de sang total a déjà été

observée [23 , 24]. Le développement d'une PCR imbriquée a permis d'améliorer l'efficacité de l'amplification [25]. Ceci, à son tour, nous a permis d'amplifier et de séquencer 55% des échantillons de sérum disponibles des patients atteints de leptospirose dans notre étude.

Tous les mammifères peuvent agir comme réservoirs de la leptospirose. Le contact avec le bétail (bovins, chevaux et porcs), les chiens, les rats et les chats a déjà été signalé comme des facteurs de risque potentiels de leptospirose en PF entre 2007 et 2017 [8], mais les études portant sur la leptospirose animale en PF sont actuellement limitées [7]. En plus de l'étude de Guernier *et al.* [7] où les séquences de *Leptospira secY* ont été amplifiées à partir de porcs, de rats et de chiens, une étude sérologique a également montré que les bovins et les chevaux peuvent être séropositifs pour la leptospirose [26]. Il n'y a pas d'estimations fiables des populations de réservoirs potentiels en PF. Les chiens errants sont présents dans toutes les îles et l'élevage de porcs par la population rurale est un élément inhérent à la culture polynésienne ancestrale. Bien que le rôle des rats dans la leptospirose soit bien établi, il existe de plus en plus de preuves que d'autres animaux domestiques ou sauvages peuvent également servir d'hôtes importants pour *Leptospira* pathogène [27]. Des enquêtes sur les populations animales en PF, y compris leurs interactions avec les humains, sont nécessaires pour mieux comprendre leur potentiel de transmission des maladies zoonotiques.

Le *secY* séquencé à partir de nos échantillons cliniques et les séquences *secY* précédemment identifiées de FP [7] se regroupent en quatre lignées distinctes. Au moins un génotype de chaque lignée a été trouvé dans des échantillons humains ainsi que dans des échantillons d'origine animale nous permettant d'identifier la source de l'infection. Lineage 2 (*L. Weillii* associée à séro groupe Mini) est la seule exception, comme il a été constaté exclusivement dans des échantillons humains conduisant à la conclusion que le réservoir de cette lignée demeure inconnue. D'autres études écologiques sont nécessaires pour identifier le ou les hôtes réservoirs de ce génotype. Nous avons identifié les rats comme une source potentielle d'infection pour la lignée 1 (*L. Borgpetersenii*, associé au séro groupe Ballum). Porcs de la ferme ont été trouvés comme une source potentielle d'infection pour la lignée 3. En se basant uniquement sur les *Secy* séquences obtenues ici, nous avons pu déterminer si les infections sont dues à *L. interrogans* de Canicola ou *L. interrogans* séro groupe Pomona. Cependant, sérovar Pomona a été le plus commun sérovar isolé de porcs dans le monde [28] suggérant que la souche infectante porcs en FP est associée à *L. interrogans* séro groupe Pomona. Les rats et les chiens ont été identifiés comme sources potentielles d'infection par *L. interrogans* séro groupe Icterohaemorrhagiae et *L. interrogans* séro groupe Australis de la lignée 4, respectivement (Fig 2). Contrairement à l'étude précédente de 2017 [7], le génotype 8 (appartenant à la lignée 3) a été isolé chez des patients ainsi que chez des porcs d'élevage. Cela suggère fortement que les porcs d'élevage représentent une source d'infection humaine à Tahiti.

Les sérotypes ou sérogroupes de *Leptospira* démontrent généralement des préférences d'hôte spécifiques [9]. Nos résultats sont en accord avec nos connaissances actuelles sur les préférences des hôtes: c'est-à-dire que les hôtes des sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Ballum sont des rongeurs, le séro groupe Australis peut être trouvé chez les chiens, tandis que les porcs sont le réservoir du séro groupe Pomona (voir ci-dessus). Dans notre étude, l'attribution des sérogroupes ne peut pas reposer exclusivement sur la séquence *secY*. La désignation du séro groupe a été attribuée en comparant les séquences *secY* avec celles de 20 souches locales appartenant à 6 sérogroupes et représentant la diversité des souches circulant dans la FP. Cependant, les souches des sérogroupes Canicola et Pomona appartenant au génotype 8 partagent le même *secY* séquence et sont indiscernables. En revanche, la cgMLST basée sur les 545 gènes de base peut discriminer les souches appartenant aux sérogroupes Canicola et Pomona.

Nous n'avons pas observé de changements majeurs dans la distribution des génotypes au cours de la période 2011-2019 (n = 322). Il n'est pas possible d'examiner la tendance de la distribution des génotypes avant 2011 en raison de la petite taille de l'échantillon (n = 20 pendant la période 2002-2010). La lignée la plus répandue 4 (*L. Interrogans*) est composée de deux génotypes principaux centraux, le génotype 9 (associé à séro groupe Icterohaemorrhagiae) et le génotype 10 (associé au séro groupe australis). Le génotype 9, détecté sur une période de 10 ans (depuis 2008), représentait le génotype prédominant trouvé dans la FP (Fig 3). Plusieurs autres études ont montré que les souches de leptospires prédominantes dans une population particulière peuvent changer avec le temps. Cela peut s'expliquer par un changement dans les populations relatives d'hôtes de maintenance [29]. Le génotype 9 a été isolé de plusieurs hôtes réservoirs animaux (y compris des rats, des chiens et des porcs), ce qui n'est pas le cas des autres génotypes. La capacité du génotype 9 à coloniser un large éventail d'hôtes et à provoquer des infections sévères (voir ci-dessous) peut être la raison de sa prévalence et de sa prédominance élevées au cours de la période de 18 ans.

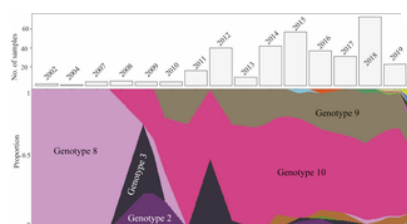


Fig 3. Diagramme de Muller - Proportions de génotypes infectant des hôtes humains à Tahiti au cours du cadre d'échantillonnage de 18 ans (panneau inférieur).

Les génotypes les plus répandus sont mis en évidence. Le diagramme à barres (panneau supérieur) montre le nombre d'échantillons séquencés chaque année.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008662.g003>

Le fait que la plupart des patients de notre échantillon (83%) étaient des hommes correspond bien aux résultats de nombreuses autres études épidémiologiques, où les hommes se sont avérés être les principales victimes de ce pathogène [3 , 6]. De plus, la leptospirose est connue pour être saisonnière et fortement associée aux pluies en milieu tropical. Cependant, nous n'avons observé aucune corrélation entre les espèces, lignées ou génotypes et la saison de prélèvement des échantillons.

Nous avons constaté que les patients plus âgés (âge médian 56) ont tendance à mourir plus fréquemment des suites de la leptospirose que les plus jeunes (âge médian 35), ce qui suggère que l'immunité et la forme physique générale des patients jouent un rôle important dans la manifestation de cette maladie. Tous les patients morts ont été infectés par leptospires appartenant à la lignée 4 (*L. Interrogans* associés à séro groupe Australis et Icterohaemorrhagiae), cependant, aucune corrélation entre les lignées et les résultats de la maladie a été observée, depuis leptospires de la lignée 4 étaient en fait les plus répandues dans notre

ensemble d'échantillons (infectant 81% des individus examinés). Cependant, contrairement aux leptospires appartenant au séro-groupe Icterohaemorrhagiae qui étaient déjà associés à la gravité de la maladie [30 - 32], nous avons également identifié des leptospires appartenant au séro-groupe Australis comme un agent causal d'une issue fatale. De plus, *L. borgpetersenii* associés au séro-groupe Ballum (lignée 1) ont été trouvés plus susceptibles d'infecter les patients plus âgés (valeur $p = 0,0268$). Par conséquent, les études futures devraient être conçues pour mieux identifier les facteurs de risque associés à la gravité de la maladie tels que les signes cliniques (par exemple bactériémie) et biologiques enregistrés à l'admission ainsi que les facteurs de risque sociaux (par exemple l'activité professionnelle). Notre étude montre également qu'une première infection peut ne pas contribuer à protéger contre une réinfection ultérieure. Ainsi, la réinfection avec un génotype non apparenté était responsable de maladies graves chez deux patients. Dans un cas, la réinfection a eu lieu dès 1 année montrant que la première infection n'a pas conféré une protection croisée entre sans rapport avec *Leptospira* espèces (*L. Interrogans* vs *L. weilii*). L'immunité naturellement acquise à la réinfection chez l'homme est mal documentée [33, 34] et des investigations complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre si certaines personnes sont à risque d'infections répétées. Une telle étude peut également avoir des implications majeures pour le développement d'un vaccin efficace contre la leptospirose chez l'homme et l'animal. Aujourd'hui, les seuls vaccins disponibles contre la leptospirose consistent en des bactéries entières tuées. Ces vaccins à base de *Leptospira* ont une gamme étroite de spécificité et n'offrent qu'une immunité à court terme (6).

En conclusion, en utilisant un test PCR niché sensible qui peut discriminer les souches au niveau de la sous-espèce, nous avons identifié 20 génotypes de *Leptospira* circulant à la fois chez l'homme et l'animal dans la FP. Cet outil contribue à identifier de nouveaux réservoirs animaux pour les leptospires et facilite ainsi la détection précoce de nouveaux génotypes émergents. Nos résultats soulignent la nécessité d'interventions de santé publique appropriées pour contrôler non seulement les rongeurs, mais aussi les chiens et les porcs en tant que sources de ces souches qui causent des infections potentiellement mortelles.

Renseignements à l'appui

S1 Fig. Boîte à moustaches côte à côte de l'âge des patients décédés des suites d'une leptospirose et de ceux qui ont survécu.

La mortalité était significativement associée à un âge plus avancé (valeur $p < 0,001$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008662.s001>
(TIFF)

S2 Fig. Boxplots côte à côte de l'âge des patients infectés par différents phylogroupes de *Leptospira*.

Par rapport à des lignées 2, 3 et 4, la lignée 1 (*L. Borgpetersenii* associé au séro-groupe Ballum) était significativement plus susceptibles d'infecter les patients dont l'âge moyen plus élevé (57, p -value = 0,0268).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008662.s002>
(TIFF)

Tableau S1. Amorces utilisées pour l'amplification par PCR imbriquée du locus *secY*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008662.s003>
(DOCX)

Tableau S2. Échantillons cliniques examinés dans cette étude.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008662.s004>
(XLSX)

Remerciements

Nous tenons à remercier le Dr Robert Anthony Gaultney pour son aide dans la révision anglaise et également le Dr Silvia Herrera-Léon en tant que coordinatrice de première ligne de l'EUPHEM pour la révision de ce manuscrit. Nous remercions le Dr Vincent Enouf et l'équipe de la structure de base P2M (Institut Pasteur, Mutualized Platform for Microbiology) pour le séquençage génomique et le personnel du Centre de référence pour la leptospirose (Pascale Bourhy, Nathalie Armatys, Jean-François Mariet et Farida Zinini) pour le support et le traitement de certains des échantillons.

Les références

1. Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, et al. (2019) Revisiting the taxonomy and evolution of the pathogenicity of the genus *Leptospira* à travers le prisme de la génomique. *PLoS Negl Trop Dis.* 13 (5): e0007270. pmid: 31120895
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
2. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. (2015) Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis.* 9 (9): e0003898. pmid: 26379143
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
3. Bierque E, Thibeaux R, Girault D, Soupé-Gilbert ME, Goarant C (2020) Une revue systématique de *Leptospira* dans les milieux aquatiques et pédo-logiques. *PLoS One.* 15 (1): e0227055. pmid: 31986154
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
4. Adler B (2015) Histoire de la leptospirose et de la leptospire. *Curr Top Microbiol Immunol.* 387: 1–9. pmid: 25388129
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
5. Levett PN (2001) Leptospirose. *Clin Microbiol Rev.* 14 (2): 296–326. pmid: 11292640
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
6. Guernier V, Goarant C, Benschop J, Lau CL (2018) Une revue systématique de la leptospirose humaine et animale dans les îles du Pacifique révèle la diversité des agents pathogènes et des réservoirs. *PLoS Negl Trop Dis.* 12 (5): e0006503. pmid: 29758037
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
7. Guernier V, Richard V, Nhan T, Rouault E, Tessier A, Musso D (2017) Diversité de *Leptospira* chez les animaux et les humains à Tahiti, Polynésie française. *PLOS Maladies tropicales négligées.* 11 (6): e0005676. pmid: 28658269
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

8. Bouscaren N, Benoit de Coignac C, Lastère S, Musso D, Teissier Y, Formont J, et al. (2019) Leptospirose en Polynésie française: 11 ans de données de surveillance, 2007-2017. *Nouveaux microbes New Infect.* 29: 100518. pmid: 30899522
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
9. Bourhy P, Collet L, Clément S, Huerre M, Ave P, Giry C, et al. (2010) Isolement et caractérisation de nouveaux génotypes de *Leptospira* chez des patients de Mayotte (océan Indien). *PLoS Negl Trop Dis.* 4 (6): e724. pmid: 20582311
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
- dix. Ahmed N, Devi SM, de los Á Valverde M, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, et al. (2006) Méthode de typage de séquences multi-focus pour l'identification et la classification génotypique des espèces de *Leptospira* pathogènes . *Un antimicrobien Clin Microbiol.* 5 (1): 28.
[Voir l'article](#) • [Google Scholar](#)
11. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiński A, Kumar S (2013) MEGA6: Analyse génétique évolutive moléculaire version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30 (12): 2725–9. pmid: 24132122
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
12. Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Réseaux de jonction médian pour inférer des phylogénies intraspécifiques. *Mol Biol Evol.* 16 (1): 37–48. pmid: 10331250
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
13. Farahpour F., Saeedghalati M., Hoffmann D (2016) MullerPlot: Génère un graphique de Muller à partir de données de dynamique de population / d'abondance / de fréquence. Version du package R 0.1.2.
[Voir l'article](#) • [Google Scholar](#)
14. Boonsilp S, Thaipadungpanit J, Amornchai P, Wuthiekanun V, Bailey MS, Holden MTG, et al. (2013) Un schéma de typage de séquence multi-focale unique (MLST) pour sept espèces de *Leptospira* pathogènes . *PLoS Maladies tropicales négligées.* 7 (1): e1954. pmid: 23359622
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
15. Varni V, Ruybal P, JJ Lauthier, Tomasini N, Brihuega B, Koval A, et al. (2014) Réévaluation des schémas MLST pour *Leptospira* spp. tapant dans le monde entier. *Infection, génétique et évolution.* 22: 216-22. pmid: 23932960
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
16. Guglielmini J, Bourhy P, Schiettekatte O, Zinini F, Brisse S, Picardeau M (2019) Typage de séquence multilocus du génome du noyau de *Leptospira* à l'échelle du genre pour la taxonomie des souches et la surveillance mondiale. *PLOS Maladies tropicales négligées.* 13 (4): e0007374. pmid: 31026256
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
17. Cosson JF, Picardeau M, Mielcarek M, Tatar C, Chaval Y, Suputtamongkol Y, et al. (2014) Épidémiologie de *Leptospira* transmise par les rongeurs en Asie du Sud-Est. *PLoS Negl Trop Dis.* 8 (6): e2902. pmid: 24901706
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
18. Rahelinirina S, Moseley MH, Allan KJ, Ramanohizakandrany E, Ravaoarino S, Rajerison M, et al. (2019) *Leptospira* dans le bétail à Madagascar: les souches non cultivées, les infections mixtes et la transmission des petits mammifères et du bétail mettent en évidence les défis du contrôle et du diagnostic de la leptospirose dans les pays en développement. *Parasitologie.* 146 (14): 1707–13. pmid: 31554531
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
19. Mason MR, Encina C, Sreevatsan S, Muñoz-Zanzi C (2016) Distribution and Diversity of Pathogenic *Leptospira* Species in Peri-Domestic Surface Waters from South Central Chile. *PLoS Negl Trop Dis.* 10 (8): e0004895. pmid: 27529550
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
20. Perez J, Goarant C (2010) Identification rapide de *Leptospira* par séquençage direct des produits de diagnostic PCR en Nouvelle-Calédonie. *BMC Microbiol.* 10: 325. pmid: 21176235
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
21. Mahtab M, Khan F, Azam M, Rizvi M, Sultan A, Shukla I, et al. (2019) Caractérisation moléculaire et analyse phylogénétique d' espèces de *Leptospira* pathogènes pour l'homme circulant dans un hôpital de soins tertiaires de l'ouest de l'Uttar Pradesh en Inde. *Pathogènes et santé mondiale.* 113 (6): 275–81. pmid: 31818236
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
22. Victoria B, Ahmed A, Zuerner RL, Ahmed N, Bulach DM, Quinteiro J, et al. (2008) La conservation du locus S10-spc-a dans des génomes par ailleurs hautement plastiques fournit un aperçu phylogénétique du genre *Leptospira*. *PLoS ONE.* 3: e2752. pmid: 18648538
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
23. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M (2011) Comparaison des tests PCR en temps réel pour la détection de *Leptospira* spp. dans le sang et identification des variations dans les séquences cibles. *Journal de microbiologie clinique.* 49 (6): 2154–60. pmid: 21471336
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
24. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR (2009) Détection de *Leptospira* spp. par réaction en chaîne de polymérase TaqMan ciblant le gène LipL32. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 64 (3): 247–55. pmid: 19395218
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)

25. Grillová L, Jolley K, Šmajš D, Picardeau M (2019) Une base de données publique pour le nouveau système MLST pour *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* : surveillance et épidémiologie de l'agent causal de la syphilis. PeerJ. 6: e6182. pmid: 30643682
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
26. Raust P (1988) Leptospirose animale en Polynésie française. Enquêtes sérologiques préliminaires [en français]. Rev Elev Med Vet Pays Trop Nouvelle-Calédonie. 12 h 15–9
[Voir l'article](#) • [Google Scholar](#)
27. Desvars A, Cardinal E, Michault A (2011) Leptospirose animale dans les petites zones tropicales. Epidemiol Infect. 139 (2): 167–88. pmid: 20875197
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
28. Ellis WA (2015) Leptospirose animale. Curr Top Microbiol Immunol. 387: 99-137. pmid: 25388134
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
29. Chadsuthi S, Bicout DJ, Wiratsudakul A, Suwancharoen D, Petkanchanapong W, Modchang C, et al. (2017) Enquête sur les sérotypes prédominants de *Leptospira* et sa distribution chez l'homme et le bétail en Thaïlande, 2010-2015. PLOS Maladies tropicales négligées. 11 (2): e0005228. pmid: 28182662
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
30. Hochedez P, Theodose R, Olive C, Bourhy P, Hurtrel G, Vignier N, et al. (2015) Facteurs associés à la leptospirose sévère, Martinique, 2010–2013. Infect Dis émergents. 21 (12): 2221–4. pmid: 26583702
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
31. Tubiana S, Mikulski M, Becam J, Lacassin F, Lefèvre P, Gourinat AC, et al. (2013) Facteurs de risque et prédicteurs de la leptospirose sévère en Nouvelle-Calédonie. PLoS Negl Trop Dis. 7 (1): e1991. pmid: 23326614
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
32. Herrmann-Storck C, Saint-Louis M, Foucand T, Lamaury I, Deloumeaux J, Baranton G, et al. (2010) Leptospirose sévère chez les patients hospitalisés, Guadeloupe. Infect Dis émergents. 16 (2): 331–4. pmid: 20113574
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
33. Felzemburgh RD, Ribeiro GS, Costa F, Reis RB, Hagan JE, et al. (2014) Étude prospective de la transmission de la leptospirose dans une communauté de bidonvilles urbains: rôle d'un environnement pauvre dans des expositions répétées à l'agent *Leptospira*. PLoS Negl Trop Dis. 8 (5): e2927. pmid: 24875389
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)
34. Vijayachari P, Sugunan AP, Murhekar MV, Sharma S, Sehgal SC (2004) Leptospirose chez les écoliers des îles Andaman et Nicobar, Inde: faibles niveaux de morbidité et de mortalité chez les enfants pré-exposés lors d'une épidémie. Epidemiol Infect. 132 (6): 1115–20. pmid: 15635969
[Voir l'article](#) • [PubMed / NCBI](#) • [Google Scholar](#)