



**Relations hôtes – parasites zoonotiques : diversité,
aspects évolutifs et implications épidémiologiques. Le
cas de la leptospirose dans les îles du sud-ouest de
l’océan Indien**

Yann Gomard

► **To cite this version:**

Yann Gomard. Relations hôtes – parasites zoonotiques : diversité, aspects évolutifs et implications épidémiologiques. Le cas de la leptospirose dans les îles du sud-ouest de l’océan Indien. Maladies infectieuses. Université de la Réunion, 2015. Français. <NNT : 2015LARE0029>. <tel-01326943>

HAL Id: tel-01326943

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01326943>

Submitted on 6 Jun 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université de La Réunion

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR D'UNIVERSITE
Doctorat Sciences du Vivant
Spécialité : Microbiologie

Ecole Doctorale (542) : Sciences Technologies Santé

Relations hôtes-parasites zoonotiques :

Diversité, aspects évolutifs et implications épidémiologiques.

Le cas de la leptospirose dans les îles du Sud-ouest de l'Océan Indien

Présentée et soutenue publiquement par

Yann Gomard

Le 08 Décembre 2015, devant le Jury composé de :

Serge MORAND	Directeur de Recherche, CNRS, Montpellier	Rapporteur
Jean-François COSSON	Directeur de Recherche, INRA, Montferrier-sur-Lez	Rapporteur
Steven M. GOODMAN	MacArthur Field Biologist, Field Museum de Chicago Professeur, Université d'Antananarivo	Examineur
Vincent HERBRETEAU	Chargé de Recherche, IRD, Université de Guyane, Université de Montpellier et Université de La Réunion	Examineur
Sébastien JAQUEMET	Professeur, Université de La Réunion	Examineur
Koussay DELLAGI	Professeur de médecine à l'Université de Tunis, Institut Pasteur	Directeur de thèse
Pablo TORTOSA	Maître de Conférence, Université de La Réunion	Co-directeur de thèse

Laboratoires de Recherche :

CRVOI : Centre de Recherche et de Veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien (2007-2015).

UMR PIMIT : Unité Mixte de Recherche, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical INSERM U1187, CNRS 9192, IRD 249, Université de La Réunion.

Avant-propos

La présente thèse, débutée en Octobre 2012, a été réalisée au sein de l'Ecole Doctorale Sciences Technologies Santé de l'Université de La Réunion (ED 542) et a été financée par une allocation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. La majeure partie des travaux s'est effectuée au Centre de Recherche et de Veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien (CRVOI) situé sur la plateforme de Recherche CYROI (Sainte Clotilde, La Réunion). Depuis 2015, le CRVOI a intégré l'UMR PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Université de La Réunion INSERM U 1187, CNRS 9192, IRD 249).

Les recherches ont été menées grâce au support financier de différents programmes du Fond Européen de Développement Régional - Programme Opérationnel de Coopération Territoriale Réunion (FSOI #31189, LeptOI #32913 et ParamyxOI #33857) mais aussi au programme ECOSAN/CNR-INEE "BatMan" et à une subvention de l'Agence Régionale de Santé de la région Océan Indien (ARS-OI).

Au cours de mon travail de thèse, les missions de terrain ont été effectuées dans différentes îles de la région mais principalement à Madagascar. Les institutions, organisations et partenaires des pays ayant rendu possible ces travaux, fourni les permis de recherche, de collecte et d'exportation des échantillons sont cités dans les publications.

Remerciements

Une thèse c'est une Aventure ! Ces trois dernières années, j'ai fait la rencontre de personnes qui ont enrichi et contribué à ma thèse, la rendant ainsi inoubliable. Je tiens ici à les remercier car grâce à elles j'ai pu vivre une Grande Aventure ! Merci.

Je tiens tout d'abord à adresser mes sincères remerciements à mes deux directeurs de thèse : le Pr. Koussay Dellagi et le Dr. Pablo Tortosa. Avec eux, j'ai reçu un encadrement de qualité et surtout j'ai beaucoup appris autant sur le plan scientifique et que sur le plan humain.

Merci Koussay pour votre encadrement, votre disponibilité, vos conseils et vos remarques toujours très très intéressantes !

Merci Pablo d'avoir toujours été présent pour moi tout au long de cette thèse ! Il y a près de 5 ans maintenant en répondant à ton offre de stage sur les insectes je ne pensais pas que j'irai jusqu'à faire une thèse et pourtant la vie nous réserve bien des surprises ! Merci de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse ! Merci tout simplement de m'avoir transmis cette vision de la Recherche.

Je remercie le Dr. Patrick Mavingui qui à peine arrivé s'est investi sans compter dans la fin de ma thèse, merci pour vos relectures, corrections et encouragements.

Je remercie le Dr. Serge Morand et le Dr. Jean-François Cosson d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie, le Pr. Steven M. Goodman, le Pr. Sébastien Jaquemet et le Dr. Vincent Herbreteau d'avoir accepté de faire partie des membres de ce jury de thèse.

Cette thèse est le fruit d'une étroite collaboration avec l'Association Vahatra de Madagascar. Je tiens sincèrement à remercier les différents membres qui ont rendu possible ces travaux.

J'adresse un très grand remerciement au Pr. Steven M. Goodman. Merci Steve pour toutes ces missions de terrain qui ont été très enrichissantes, j'ai énormément appris scientifiquement mais aussi humainement. Merci de m'avoir fait découvrir Madagascar, le pays de mes ancêtres et surtout un très grand merci de m'avoir accueilli au sein de ta famille.

Merci au Dr. Voahangy Soarimalala, au Pr. Achille Raselimanana, au Dr. Marie Jeanne Raherilalao, à Madame Malalarisoa Razafimpahanana pour votre accueil toujours chaleureux au sein de Vahatra et les bons moments sur le terrain.

Un grand merci à Beza Ramasindrazana ! Merci Beza pour toutes ces aventures, je me

souviendrai toujours de notre périple au Parc National Tsingy de Bemaraha, conclusion : Il faut toujours avoir un GPS !

Merci à Lédada pour ces bons petits plats sur le terrain !

Je tiens à remercier Séverine Licciardi et Erwan Lagadec qui ont été là dès mes débuts de stagiaire de Master 2. Merci Séverine pour « la formation simulies » et bien d'autres techniques de laboratoire. Grâce à toi maintenant je remarque même les plus petits insectes et j'apprends à les apprécier (sauf les cafards) ! Merci aussi pour tes précieux conseils et ton humour (noir) !

Erwan ... Erwan ... Erwan depuis la clio à Pablo à capturer des insectes avec un filet à papillon sur toute l'île, en passant par Maurice, les Seychelles et le Mozambique (avec Mister Gildas), que d'aventures que nous avons vécu ensemble et j'espère qu'il y en aura plein d'autres ! Erwan tu as toujours été là pour moi et je t'en suis sincèrement reconnaissant.

J'ai une pensée particulière pour le Dr. Alain Michault qui nous a quitté récemment avec qui j'ai eu l'occasion de travailler.

Merci à l'équipe du GHSR Sud (Parasitologie, Bactériologie, Virologie et Hygiène) de m'avoir accueilli et enseigné l'art du MAT. Merci particulièrement à Géraldine, Ketty, Guillaume et Florelle.

Julien, merci car ça n'aurait pas été la même chose sans toi. Comme tu le dis on a fait nos thèses ensemble, on a broyé ensemble, on a travaillé sur les mêmes échantillons ensemble, on a fait des conférences ensemble ... En tous cas ça a été un plaisir de faire ce bout de chemin avec toi : depuis les commandes du laboratoire ... jusqu'aux nuits blanches ! Je te souhaite bon vent et le meilleur pour la suite mon Ami ! Je te souhaite devenir un très grand chercheur et j'espère que nos chemins se croiseront encore ! Allez maintenant un petit galopin ?

Claire, merci tu as toujours su nous remonter le moral ! Je te remercie pour ton aide et surtout de m'avoir fait rappeler qu'un stylo et un papier étaient largement plus efficaces que de rester « planter » devant son écran d'ordinateur !

Je remercie les post docs et les chercheurs auprès de qui j'ai beaucoup appris et qui m'ont fait progresser durant ces dernières années: Najla D., Muriel D., Camille L., David W., Célestine A., Sarah T., Mathieu S., Hervé P., Catherine S., Josselin Cornuault, un merci particulier au Pr. Ara Monadjem. Je remercie aussi Nicolas Wieseke et Olivier Florès qui m'ont aidé et apporté leurs expertises pendant cette thèse, j'espère que nous aurons encore

beaucoup de collaborations. Je remercie également Laurence Humeau et Johanna Clémencet pour leurs expertises sur les présentations orales (☺). Merci aussi à Wildriss pour les conseils de laboratoire et les dépannages de produits !

Merci Gildas pour ces moments de terrain uniques au Mozambique et aux Seychelles ! Bonne chance dans tes projets ! Je croise les doigts !

Un grand merci à Virginie, Marina et Françoise pour leurs bonnes humeurs et surtout leurs patiences pour mes débâcles administratives !

Je n'oublie pas le bureau du fond à coté des cartons, « le bureau des sardines », je remercie les personnes qui y ont résidé: Magali, Damien, Beza, Lizah, Claire B, (Merci pour les stats et les cartes !), Matthieu R., Laura A, Aude, Camille S. ... et j'en oublie désolé. Merci à tous les stagiaires et oui il y en a eu beaucoup !

Merci aux derniers arrivant dans le bureau des sardines : Léon, Miora, Etienne et Colette (même si elle n'est pas dans le bureau, enfin pas encore ...). Merci de m'avoir supporté durant ces derniers mois. Bon courage dans vos thèses respectives.

Je remercie tous les amis, les personnes avec qui j'ai pu échangé que ce soit dans les labos, dans les bureaux, au détour d'un bon café ou sur le terrain. Je ne vais pas commencer à faire une liste car elle serait aussi grande que la thèse et j'ai peur d'en oublier ! Merci !

Je remercie « nos voisins », Solène et Sébastien pour leurs encouragements !

Je remercie aussi mes amis de long date, qui ont toujours été là et prêts à m'épauler : Benoit, Victor, Morguen et Tristan. Merci pour tout.

Je remerciement tout particulièrement les membres de ma famille qui m'ont toujours poussé et aidé à aller de l'avant. Merci pour votre soutien et votre présence. Merci. Je n'oublie pas ma belle famille qui m'a aussi beaucoup aidé! Merci.

Je remercie ma mère qui m'a laissé toute liberté dans le choix de mes études. Merci maman, merci pour tout ! J'ai aussi une pensée pour ma sœur et mon frère. Bon courage dans vos parcours respectifs, il ne faut jamais baisser les bras!

Frédérique, je te remercie pour ta patience sans faille, ton soutien dans les moments difficiles et ton Amour. Merci.

Bonne lecture,

Yann

Résumé

La leptospirose est considérée comme la zoonose la plus répandue au monde mais les incidences sont les plus élevées dans les régions tropicales et en particulier sur les îles. Les îles du Sud-ouest de l'Océan Indien (SOOI) ne dérogent pas à la règle puisque la maladie y représente un problème de santé humaine majeur sur plusieurs îles, notamment aux Seychelles qui enregistrent un des plus forts taux d'incidence humaine au monde. Sur la base des données disponibles, l'épidémiologie humaine apparaît contrastée à l'échelle de la région : les cas cliniques sur Mayotte résultent d'infections par quatre espèces de leptospires distinctes alors qu'à La Réunion ou aux Seychelles, une seule espèce est à l'origine de la grande majorité des cas cliniques. L'objectif général de cette thèse est d'identifier certains des déterminants de cette épidémiologie singulière.

Nous avons dans un premier temps complété les informations humaines en investiguant la leptospirose en Union des Comores, pays n'ayant jamais rapporté de transmission autochtone. Nos résultats indiquent que les populations humaines y sont exposées à des antigènes de leptospires comparables à ceux retrouvés sur l'île voisine de Mayotte. Ce résultat suggère que l'absence de leptospirose sur certaines îles est le résultat d'un déficit de surveillance. Nous avons ensuite caractérisé la diversité génétique des leptospires au sein de la faune de certaines îles, caractérisées par des niveaux d'endémisme élevés à même d'être en partie à l'origine de cette épidémiologie contrastée. Nous décrivons d'une part une importante diversité des leptospires pathogènes chez les chauves-souris (Chiroptères) malgaches. Nous montrons d'autre part que cette diversité de leptospires n'est pas structurée géographiquement mais présente au contraire une importante spécificité d'hôte, résultant de différents processus évolutifs incluant co-spéciation et host-switch. Nous avons exploité cette spécificité d'hôte pour éclairer l'épidémiologie de la leptospirose à Mayotte, où nous montrons que l'importante diversité bactérienne impliquée dans les cas cliniques résulte de la présence de nombreux réservoirs, dont certains originaires de Madagascar.

Ainsi, il apparaît que l'épidémiologie humaine de la leptospirose dans le SOOI est le reflet d'assemblages distincts de leptospires cosmopolites et autochtones/endémiques maintenus et excrétés par des réservoirs animaux particuliers.

Mots clés: Leptospirose, *Leptospira*, Chiroptères, petits mammifères, associations hôtes-parasites, MAT, MLST, co-phylogénie, Madagascar, Mayotte, Union des Comores, Sud-ouest de l'Océan Indien.

Abstract

Leptospirosis is considered as the most widespread zoonosis worldwide but the incidence levels are higher in tropical regions and particularly on islands. The South-western Indian Ocean (SWOI) islands are no exception and the disease is of major medical concern on several islands notably in Seychelles, displaying one of the highest human incidence rates ever reported. Based on available data, human epidemiology appears to be different across the region : on Mayotte, human cases result from the infection with four distinct *Leptospira* species whereas on Reunion Island or Seychelles, a single species causes the majority of clinical cases. The main objective of this thesis is to identify some of the drivers of this singular epidemiology.

We first completed information in the region available on this human disease by investigating the leptospirosis situation in the Union of the Comoros, a country where no autochthonous transmission has been reported to date. Our results indicate that Comorian populations are exposed to *Leptospira*, which are antigenically comparable to those detected in the neighbouring island of Mayotte. This finding suggests that the apparent absence of leptospirosis on some islands simply reflects a lack of medical surveillance. We then investigated the genetic diversity of *Leptospira* on distinct islands home to distinct endemic animal species that may shed distinct *Leptospira* lineages and, thus, at least in part explain the contrasted epidemiology of leptospirosis across the region. Specifically, we describe a high diversity of pathogenic *Leptospira* within Malagasy bats (Chiroptera) and further show that *Leptospira* diversity is not structured by geography. Instead, we show that these *Leptospira* display a strong specificity towards their hosts, which may result from different evolutionary processes including co-speciation and host-switch. Using this tight host specificity, we investigated the leptospirosis epidemiology on Mayotte, where we show that the important bacterial diversity reported in clinical cases is due of the presence of several distinct animal species acting as reservoirs, some of which were introduced from the neighbouring Madagascar.

Altogether, the results presented herein, including data produced by our lab, suggest that the epidemiology of leptospirosis in the SWOI results from distinct assemblages of cosmopolitan and autochthonous/endemic *Leptospira*.

Keywords: Leptospirosis, *Leptospira*, Chiroptera, small mammals, hosts-parasites associations, MAT, MLST, co-phylogeny, Madagascar, Mayotte, Union of Comoros, South-western Indian Ocean.

Sommaire

Introduction	1
1. Les maladies infectieuses (ré)-émergentes	2
2. Les zoonoses et leur contrôle	4
3. La leptospirose et les leptospires	7
3.1. La leptospirose : une maladie ré-émergente et négligée.....	7
3.2. Les leptospires	8
3.2.1. Systématique et biologie	8
3.2.2. Classification des leptospires	9
3.2.3. Les génomes de leptospires.....	12
3.2.4. Cycle de transmission.....	13
3.3. La leptospirose humaine.....	14
3.3.1. Les différentes formes de la maladie.....	15
3.3.2. Le diagnostic biologique	16
3.3.3. Traitements.....	17
3.4. La leptospirose animale.....	17
3.5. Associations hôtes-leptospires.....	18
3.6. Etude de la leptospirose dans les îles.....	20
4. La leptospirose dans les îles du Sud-ouest de l’Océan Indien	21
5. Déterminants de l’épidémiologie de la leptospirose dans le SOOI	24
6. Objectifs des travaux de thèse	26
Chapitre I : La leptospirose en Union des Comores	29
1. L’Union des Comores : indemne de leptospirose humaine ?.....	31
2. Article 1: Serologic evidence of Leptospirosis in humans, Union of the Comoros, 2011	32
3. Résultats majeurs	36
Chapitre II : Les leptospires et les chiroptères de la région du SOOI	37
1. Les leptospires des chauves-souris d’Union des Comores et de Madagascar.....	39
2. Article 2: Pathogenic <i>Leptospira</i> spp. in bats, Madagascar and Union of the Comoros	40
3. Résultats majeurs	44
Chapitre III : Associations hôtes-leptospires et évolution des leptospires au sein de leurs hôtes	45
1. Le cas des leptospires pathogènes des chauves-souris de Madagascar.....	47
2. Article 3: Malagasy bats shelter a considerable diversity of pathogenic <i>Leptospira</i> displaying a strong host-specificity pattern	49
3. Résultats majeurs	109
Chapitre IV : Implication des leptospires de la faune de Mayotte dans l’épidémiologie de la leptospirose humaine	111
1. La leptospirose à Mayotte	113
2. Article 4: An introduced wild mammal species (<i>Tenrec</i> : Tenrecidae) to Mayotte Island, western Indian Ocean, is an important reservoir of the human pathogenic <i>Leptospira mayottensis</i>	114
3. Résultats majeurs	138

Discussion, conclusions et perspectives	139
Discussion et conclusions.....	141
1. La leptospirose en Union des Comores	141
2. Diversité et structuration des leptospires pathogènes chez les chiroptères.	142
2.1. Diversité d'espèces hôtes et diversité de leptospires.....	142
2.2. Structuration des leptospires par espèces hôtes.....	143
3. Evolution des leptospires au sein de leurs hôtes : le cas des leptospires des chiroptères de Madagascar	145
4. Epidémiologie de la leptospirose humaine dans le SOOI	147
Perspectives	150
Références bibliographiques	154
Valorisations scientifiques	166

Liste des figures

Figure 1. Illustration de cinq étapes à travers lesquelles un pathogène d'origine animale va évoluer et se retrouver dans un cycle strictement confiné à l'Homme.....	5
Figure 2. Image de <i>Leptospira interrogans</i> souche RGA.....	8
Figure 3. Phylogénie de 21 espèces de leptospires basée sur la séquence complète de l'ARN ribosomique 16S.....	10
Figure 4. Diagramme de Venn montrant le nombre de gènes uniques et partagés parmi <i>Leptospira interrogans</i> , <i>L. borgpetersenii</i> et <i>L. biflexa</i>	13
Figure 5. Cycle de transmission des leptospires.....	14
Figure 6. La nature biphasique de la leptospirose.....	15
Figure 7. Les îles de la région du Sud-ouest de l'Océan Indien.....	21
Figure 8. Facteurs pouvant expliquer l'épidémiologie contrastée de la leptospirose dans le Sud-ouest de l'Océan Indien.....	24
Figure 9. Situation géographique de l'archipel des Comores : Union des Comores (Grande Comore, Mohéli et Anjouan) et Mayotte (France).....	31
Figure 10. Sérogroupes des leptospires détectés dans les populations humaines des îles de l'archipel des Comores.....	36
Figure 11. Evènements évolutifs dans les associations hôtes-parasites.....	49
Figure 12. Les évènements uniques de colonisation des 4 ancêtres de mammifères placentaires à l'origine de la diversité des mammifères terrestres endémiques de Madagascar.....	145
Figure 13. Synthèse des données produites permettant de comprendre en partie l'épidémiologie de la leptospirose dans les îles du Sud-ouest de l'Océan Indien.....	148

Liste des tableaux

Tableau 1. Correspondances entre sérogroupes et génomo-espèces de leptospires (<i>Leptospira</i>)	11
Tableau 2. Exemples d'animaux réservoirs de certains serovars de leptospires	19

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism

ARN : Acide RiboNucléique

ARNr 16S : ARN ribosomique 16S

CDC : Centers for Disease Control and Prevention

CNR de la Leptospirose : Centre National de Référence de la Leptospirose

CRVOI : Centre de Recherche et de Veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien

DMSO : Dimethyl Sulfoxide

DySIIIs : Dynamique des Systèmes Infectieux Insulaires

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMJH : Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

GIEC : Groupe d'Experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat

LERG : Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group

LPHS : Leptospirosis-associated Pulmonary Haemorrhage Syndrome

LPS : Lipopolysaccharide

IgG : Immunoglobulines de type G

IgM : Immunoglobulines de type M

MAT : Test de Micro Agglutination (Microscopic Agglutination Test)

Mb : Mégabases

MERS : Le Syndrome Respiratoire du Moyen-Orient (Middle East Respiratory Syndrome)

MLST : Multi Locus Sequence Typing

MLVA : Multi Locus Variable number of tandem repeats Analysis

NCID : National Center for Infectious Diseases

PNLP : Programme National de Lutte contre le Paludisme (en Union des Comores)

PCR : Polymerase Chain Reaction

PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis

RT-PCR : Real Time-Polymerase Chain Reaction

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise

SRAS : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère

SPHS : Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome

SOOI : Sud-ouest de l'Océan Indien

UMR PIMIT : Unité Mixte de Recherche, Processus Infectieux en Milieu Insulaire
Tropical

UN : United Nations

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VFVR : virus de la Fièvre de la vallée sur Rift

WHO : World Health Organization

5-FU : 5-fluoro-uracile

Introduction

1. Les maladies infectieuses (ré)-émergentes

Les maladies infectieuses représentent un problème de santé publique majeur et sont impliquées dans plus d'un quart des 57 millions de décès annuel dans le monde (Morens *et al.* 2004). Les maladies dites "émergentes" (ou "ré-émergentes") constituent une partie non négligeable de ces maladies infectieuses et se définissent comme étant des infections nouvellement apparues dans une zone géographique, ou déjà existantes mais dont les incidences et/ou la distribution géographique augmentent rapidement (Morens *et al.* 2004). Les épisodes d'émergence sont influencés par des facteurs qui affectent l'exposition et par conséquent la transmission des pathogènes dans les populations humaines, animales¹ ou végétales (Cohen 2000). L'investigation de ces facteurs d'émergence fait l'objet d'un nombre croissant d'études qui viendront probablement éclairer des concepts dont certains sont encore aujourd'hui controversés car basés sur un corpus d'études encore limité. Néanmoins, la croissance démographique et les perturbations au moins en partie liées à l'intensification des activités humaines sont considérées comme facilitant les émergences. Nous dressons ci-après une liste non exhaustive de ces facteurs d'émergence directement ou indirectement liés à l'expansion des populations humaines (Cohen 2000).

L'intensification des échanges internationaux touristiques ou commerciaux peut favoriser la diffusion rapide et à large échelle de pathogènes ou de vecteurs arthropodes (Wilson 1995 ; Kilpatrick & Randolph 2012). La propagation rapide du SRAS (Syndrome Respiratoire Aigu Sévère) depuis Hong Kong vers différents pays (exemple : Malaisie, Canada) par le biais de vols internationaux (Riley *et al.* 2003 ; Ruan *et al.* 2003) en est un exemple emblématique, de même que la dispersion de certaines arboviroses tels que la Dengue (Gubler & Clark 1995) ou le Chikungunya ou le Zika (Kwong *et al.* 2013). **La perturbation et la fragmentation des habitats** peuvent également favoriser l'émergence et la transmission de maladies infectieuses en facilitant des contacts particuliers entre populations naïves et réservoirs² sauvages de parasites³ infectieux (Sars-Coronavirus et Nypah Virus). Il a également été proposé que la

¹ Tout au long de ce manuscrit les termes relatifs aux "animaux" désignent des animaux non humains.

² Le terme "réservoir" se réfère à la définition de Drexler *et al.* (2012) et désigne un taxon animal hébergeant de façon chronique une importante diversité génétique d'un parasite donné au niveau populationnel (avec ou sans manifestation de la maladie) et qui est naturellement infecté au-delà des limites géographiques d'échanges entre les populations.

³ Le terme "parasite" est ici utilisé au sens de la définition de Combes (2001), à savoir un organisme se reproduisant et se développant au dépend de l'hôte au cours d'une interaction durable. Je considérerai ici que les termes "pathogène" ou "parasite pathogène" désignent un parasite pouvant produire des troubles chez son hôte.

perte de diversité (gènes, espèces, écosystèmes) découlant notamment du développement des activités humaines pouvait sensiblement affecter les risques de transmission d'agents infectieux (Keesing *et al.* 2010) par des effets de dilution ou d'amplification (Schmidt & Ostfeld 2001 ; Ostfeld & Keesing 2012) mais le nombre encore trop limité d'études a conduit d'autres auteurs à contredire parfois de manière virulente ces hypothèses (LoGiudice *et al.* 2003 ; Randolph & Dobson 2012 ; Lafferty & Wood 2013 ; Ostfeld 2013 ; Ostfeld & Keesing 2013 ; Wood & Lafferty 2013). Enfin, **le changement climatique**, dont l'origine au moins en partie anthropique est aujourd'hui à peu près admise (à quelques climatosceptiques près), influence également l'émergence de maladies infectieuses. L'augmentation des températures peut favoriser l'expansion de l'aire de distribution de vecteurs arthropodes rendant ainsi possible une transmission autochtone de pathogènes dans des régions jusque là épargnées (Khasnis & Nettleman 2005). Ainsi au cours de ces dernières années, l'aire de distribution du moustique *Aedes albopictus* s'est étendue vers le nord et des transmissions autochtones de Chikungunya ont été rapportées en Italie (Angelini *et al.* 2007a, 2007b) et Espagne et en France (Gould *et al.* 2010 ; Grandadam *et al.* 2011). Le réchauffement climatique peut également favoriser le maintien des pathogènes dans l'environnement et/ou augmenter l'abondance de réservoirs vertébrés. Par exemple, le nombre de cas de leptospirose humaine aux Pays-Bas en 2014 a été multiplié par près de 5 par rapport aux années précédentes. Les seules variables corrélées étaient la température moyenne et, surtout, la température minimale durant l'hiver antérieur, significativement plus élevée que la normale, ce qui aurait pu permettre une meilleure survie des populations de rongeurs réservoirs (disponibilité en ressources alimentaires) et/ou des leptospires dans l'environnement (Marga Goris, IX^{ème} conférence de l'International Leptospirosis Society, 7-10 octobre 2015, Semarang, Indonésie). Gageons que les multiples appels à projets listant le réchauffement climatique dans leurs mots clefs permettront de multiplier les études et donc de compléter nos connaissances dans ce domaine.

En 2050 on estime que la taille de la population humaine sera de plus de 9,7 milliards contre 7,4 en 2015 (World Population Prospects the 2015 revision, UN), et une augmentation de température estimée au maximum à 4,8°C d'ici 2100 (GIEC). Dans ce contexte, il est raisonnable de penser que l'incidence de certaines maladies émergentes va augmenter. Les derniers épisodes d'émergence (le Syndrome Respiratoire du Moyen-Orient (MERS), SRAS, Chikungunya) ont conduit à des réponses inadaptées illustrées parfois par des peurs paniques des populations touchées et par de mauvaises mesures de gestion publique. Par exemple, le

gouvernement chinois a passé sous silence le premier cas de SRAS localisé dans la province Guangdong et a restreint l'accès aux malades (Kleinman & Watson 2006) ce qui a sans doute favorisé l'extension géographique de l'épidémie par la suite (Enserink 2003). Ces émergences ont des conséquences économiques et sanitaires parfois catastrophiques. Dans le cas du SRAS, les personnels des hôpitaux ont été contaminés par méconnaissance du cycle de transmission et par la mise en place de protections individuelles inadaptées (SRAS, WHO). S'agissant d'un champ de recherche encore relativement vierge, l'investigation de l'écologie et de l'évolution des parasites à potentiel d'émergence est d'un intérêt académique évident. Au delà, une meilleure compréhension de la biologie des parasites infectieux devrait permettre de prévenir, au moins dans une certaine mesure, ces épisodes dans l'avenir, et *a minima* de fournir des informations robustes qui permettront une meilleure préparation des autorités de santé et des populations concernées aux futurs épisodes d'émergence.

2. Les zoonoses et leur contrôle

Les zoonoses sont des pathologies dont les agents étiologiques sont partagés par les populations humaines et animales. Elles constituent plus de 60% des maladies infectieuses émergentes (Jones *et al.* 2008) et sont intimement liées à l'Histoire de l'Homme. La rage, la peste ou encore la rougeole, sont considérées comme des maladies "anciennes" (Vittecoq *et al.* 2015) contrairement au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), au SRAS ou encore aux pathologies hémorragiques à virus Ebola qui n'ont été documentées que durant les dernières décennies. L'étude des zoonoses a permis de mettre à jour des éléments importants dans la compréhension des cycles de ces parasites mais aussi dans la gestion des épidémies. Ainsi, certains pathogènes sont considérés "d'origine animale" même lorsqu'ils se sont adaptés et se maintiennent au sein des populations humaines, tels que les virus de la rougeole et du Sida (le VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine). A l'opposé il est des pathogènes zoonotiques dont les animaux demeurent les sources majeures si ce n'est exclusives, tels que le virus de la rage (Lyssavirus) (Vittecoq *et al.* 2015) qui trouve chez l'homme un hôte accidentel sans que celui-ci n'ait d'impact significatif sur la maintenance du virus en période inter épidémique. Cette classification, tout comme la classification du vivant en espèces, est bien entendu schématique et il existe vraisemblablement un continuum de situations intermédiaires (Wolfe *et al.* 2007) (Figure 1). Dans la suite du manuscrit, nous traiterons principalement des zoonoses dont les animaux constituent les réservoirs jouant un rôle majeur dans le maintien et l'évolution des pathogènes en situation inter épidémique, et plus

généralement sur de longues échelles de temps.

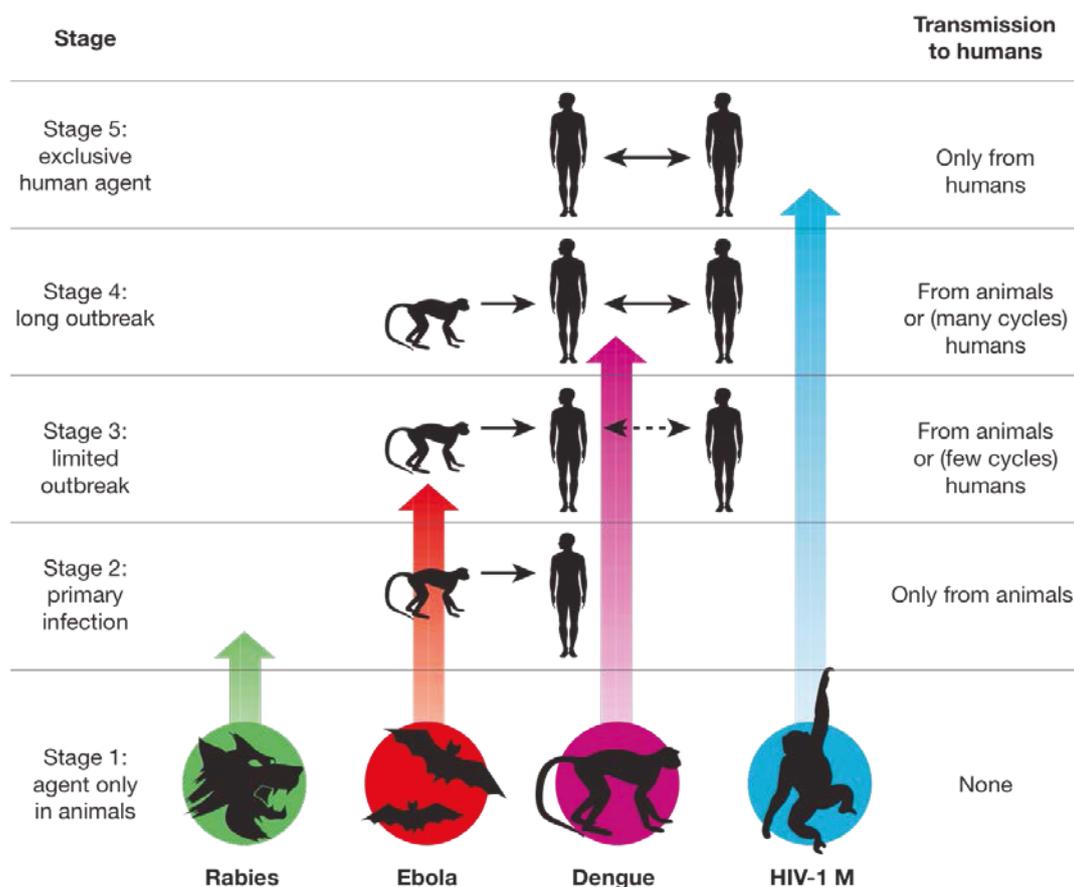


Figure 1. Illustration de cinq étapes à travers lesquelles un pathogène d'origine animale va évoluer et se retrouver dans un cycle strictement confiné à l'Homme (d'après Wolfe et al. 2007).

Il est incontournable, pour une meilleure gestion des maladies zoonotiques, de déterminer le mode de transmission des pathogènes. Trois grandes catégories sont actuellement décrites (Woolhouse *et al.* 2001) : les zoonoses (i) à *transmission directe* (exemple : transmission du virus de la rage par morsure d'un animal infecté), (ii) à *transmission indirecte* (exemple : transmission de la leptospirose à l'homme par contact avec un environnement contaminé) et enfin (iii) à *transmission vectorielle* qui impliquent un protagoniste additionnel, arthropode notamment, assurant le lien entre le réservoir et l'hôte secondaire ou accidentel (exemple : transmission des virus du Chikungunya et de la Dengue par piqûres de moustiques du genre *Aedes*). Dans le cas de maladies non vectorielles, il est *a priori* possible de limiter les contacts directs et indirects en contrôlant l'abondance des populations réservoirs, en limitant les contacts entre l'homme et ces mêmes populations, ou encore en limitant les contacts entre l'homme et les environnements contaminés (à la suite d'épisodes de pluie dans le cas de la

leptospirose, par exemple). Un contrôle des populations naturelles de vecteurs (par les Techniques de l'Insecte Stérile/Incompatible) ou de leur compétence vectorielle⁴ (utilisation d'endosymbiotes) pourront limiter la transmission d'arboparasites⁵.

D'autres éléments sont à prendre en considération pour la gestion des zoonoses tels que les prévalences d'infections ou encore les variations spatiales ou temporelles du système réservoir/parasite. Récemment, l'investigation d'une maternité de chauves-souris insectivore de La Réunion a montré que la dynamique d'infection de deux pathogènes, *Leptospira* (bactérie) et *Paramyxovirus* (virus), était étroitement associée à la dynamique de la population hôte (Dietrich *et al.* 2015). Plus généralement, aucun contrôle durable de transmission de pathogène zoonotique ne peut être réalisé sans une compréhension du maintien et de la transmission de ces parasites au niveau du pathosystème⁶ réservoir/parasite/hôte secondaire, et sans l'identification de conditions qui favorisent la co-occurrence de populations humaines, de réservoirs infectés et de conditions environnementales favorisant la transmission des parasites à l'homme.

L'exploration de tels systèmes est rendue plus complexe encore s'agissant de pathogènes "multi-hôtes", à savoir de pathogènes (ou de variants génétiques) pouvant infecter et se maintenir dans plusieurs hôtes (Woolhouse & Gowtage-Sequeria 2005). Il s'agit alors d'évaluer la diversité génétique du pathogène et des hôtes réservoirs et de définir leurs implications respectives dans l'épidémiologie de la maladie.

L'exploration d'espèces animales réservoirs doit inclure les espèces commensales de l'Homme telles que des espèces domestiques, péri-domestiques sans oublier les espèces appartenant à la faune sauvage qui constituent une source importante de parasites pathogènes pour l'Homme (Daszak *et al.* 2000 ; Jones *et al.* 2008) et sont à l'origine de 70% des zoonoses (Jones *et al.* 2008). Ces investigations ne doivent pas se limiter aux seules espèces commensales ou connues pour véhiculer des pathogènes tels que les rongeurs (Luis *et al.* 2013 ; Wilkinson *et al.* 2014) mais doivent permettre de décrire la diversité et la distribution des parasites à potentiel zoonotique à différentes échelles de temps et d'espace, de

⁴ Définit le potentiel d'un vecteur à être infecté par un parasite, à le répliquer et à le transmettre à un hôte lors d'un deux 2^{ème} repas de sang.

⁵ Fait référence à des parasites transmis par des arthropodes (**arthropod-borne parasites**)

⁶ Un pathosystème est un ensemble fonctionnel et actif qui comprend les compartiments pathogène et hôte dans un environnement donné.

comprendre leur écologie et leur évolution et, plus largement, de rassembler toute information pertinente permettant d'évaluer leur potentiel d'émergence.

La compréhension de ces pathosystèmes complexes requiert la mise en place de programmes de recherche multidisciplinaires couvrant un large champ de spécialités dont la systématique, l'écologie et l'évolution des mammifères, de leurs parasites et (éventuellement) de leurs vecteurs (Vinetz *et al.* 2005 ; Morse *et al.* 2012 ; Wood *et al.* 2012 ; Hayman *et al.* 2013). C'est dans ce contexte que nos travaux ont été conduits afin d'éclairer l'épidémiologie régionale de **la leptospirose** : une zoonose ré-émergente dont les bactéries pathogènes (genre *Leptospira*) sont diversifiées et présentent un large spectre d'hôtes.

3. La leptospirose et les leptospires

3.1. La leptospirose : une maladie ré-émergente et négligée

La leptospirose, causée par des bactéries pathogènes du genre *Leptospira* (Leptospiraceae), est une zoonose ré-émergente qui pose des problèmes de santé humaine et animale. La leptospirose est considérée comme la zoonose la plus répandue au monde (Faine *et al.* 1999 ; Levett 2001 ; Adler & de la Peña Moctezuma 2010). En 1999, le LERG (Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group, WHO) estimait que chaque année 500 000 humains contractaient la maladie et que 10% en mourraient. Récemment, en se basant sur les incidences de la maladie issues d'études dans différents pays, des auteurs estiment que cette maladie touche chaque année plus de 1 million de personnes et cause près de 60 000 décès (Costa *et al.* 2015). Bien que considérables, ces chiffres sont certainement sous estimés car la leptospirose est une maladie dont la présentation clinique est "non spécifique" c'est à dire caractérisée par des symptômes qui peuvent être associés à d'autres pathologies telle que la malaria ou la dengue (Halliday *et al.* 2015). L'incidence humaine est nettement supérieure dans les régions tropicales (Costa *et al.* 2015) et plus élevée encore dans les îles tropicales (Pappas *et al.* 2008). Cette situation est due à différents facteurs environnementaux et socio-économiques tels que des climats chauds et humides qui vont favoriser une meilleure survie des bactéries dans l'environnement (Levett 2001) ou des mauvaises conditions sanitaires subies par les populations humaines des pays en voie de développement qui contribuent au développement de la maladie. L'absence de diagnostic "au lit du patient" rapide, sensible et spécifique limite une prise en charge et une antibiothérapie précoces. Elle limite également la compréhension de l'épidémiologie de la maladie et la mise en place de moyens de prévention tels que la sensibilisation des populations. L'absence de syndromes spécifiques, de diagnostic

rapide et peu coûteux ainsi que la fragilité des populations déshéritées contribuent à faire de cette maladie la zoonose la plus répandue dans le monde. Si la leptospirose, pour des raisons discutables, n'est pas listée parmi les maladies tropicales négligées, elle peut en revanche être légitimement qualifiée de *maladie tropicale des populations négligées* (M. Reies, communication personnelle).

3.2. Les leptospires

3.2.1. Systématique et biologie

Le genre *Leptospira* appartient à la famille des Leptospiraceae, de l'ordre des Spirochaetales du grand phylum des Spirochaetes. Les spirochètes sont un groupe de bactéries très ancien (Saier 2000 ; Charon & Goldstein 2002) comprenant, outre les leptospires, d'autres espèces d'importance médicale telles que *Treponema pallidum* (agent de la syphilis) ou encore *Borellia burgdorferi* (responsable de la borréliose de Lyme). La radiation ancienne des spirochètes est associée à des structures cellulaires particulières telles que des chromosomes et plasmides linéaires (*Borellia*) (Casjens 2000). La famille des Leptospiraceae contient trois genres : *Leptospira*, *Leptonema* et *Turneriella* (Levett 2015).

Les leptospires sont des bactéries très mobiles avec une forme allongée, fine et hélicoïdale (Cameron 2015). Le diamètre moyen d'un leptospire est de l'ordre de 0,1 μm avec une longueur variant de 6 à 20 μm . Les extrémités des cellules présentent souvent une forme courbée faisant penser à un crochet (Faine *et al.* 1999 ; Levett 2001) (Figure 3).

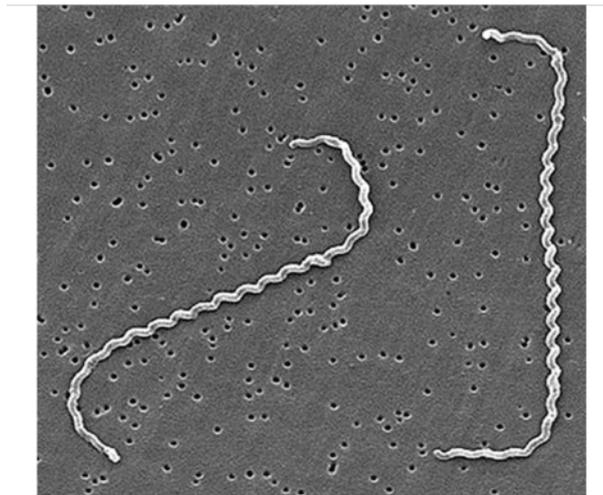


Figure 2. Image de *Leptospira interrogans* souche RGA obtenue par microscopie électronique à balayage (d'après Cameron (2015), image de Rob Weyant du Centre National pour les Maladies Infectieuses (NCID) - Centre de Contrôle et de Prévention des Maladies (CDC)).

Les leptospires possèdent une double membrane. La membrane externe est composée entre autres de Lipopolysaccharides (LPS), éléments impliqués dans la virulence, les réactions immunitaires et qui sont utilisés pour la classification sérologique des leptospires. Comme les bactéries Gram négatif, la rigidité et la structure générale sont assurées par le peptidoglycane qui, dans le cas des leptospires, est accolé à la membrane plasmique. Enfin, deux endoflagelles indépendantes (flagelles périplasmiques) et responsables de la mobilité des leptospires (Levett 2001 ; Cameron 2015) ont une localisation périplasmique.

Les leptospires sont des bactéries aérobies obligatoires dont la température optimale de croissance se situe entre 28 et 30°C et le pH optimal entre 6,8 et 7,4 (Bharti *et al.* 2003). Ces bactéries peuvent être cultivées à partir du sang ou de tissus dans des milieux liquides, le plus utilisé étant le milieu d'Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Ellinghausen & McCullough 1965 ; Johnson & Harris 1967), enrichi avec différentes vitamines. Des antibiotiques, tels que le 5-fluoro-uracile (5-FU) ou la néomycine, peuvent être ajoutés afin d'éviter les contaminations pouvant limiter le développement des leptospires. La conservation des souches de leptospires peut se faire sur milieu semi-solide tel que le milieu Fletcher qui permet de garder les cultures pendant plusieurs mois à température ambiante. Les souches peuvent être aussi congelées à -80°C ou en azote liquide avec ou sans cryoprotecteur tel que le DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (Levett 2001 ; Cameron *et al.* 2008).

3.2.2. Classification des leptospires

Il existe deux types de classification des leptospires : une classification sérologique basée sur la signature antigénique portée par le LPS et une classification moléculaire qui utilise, au travers d'une batterie de schémas de génotypage, la diversité génétique des bactéries. La classification sérologique distingue les leptospires en au moins 300 sérovars (exemple : *canicola*, *australis*, *ballum*) regroupés en plus de 20 sérogroupes (exemple : Icterohaemorrhagiae, Mini, Pyrogenes) (Picardeau 2013). Cette classification est largement utilisée pour le diagnostic clinique et pour les investigations épidémiologiques. La technique de référence pour ces détections sérologiques est le Test de Micro Agglutination (MAT) (Martin & Pettit 1918) détectant les anticorps (IgG et IgM) de l'hôte qui vont agglutiner des leptospires de références choisis en fonction des sérogroupes prévalents dans un environnement donné.

La classification génétique différencie les leptospires en espèces (genomo-espèces ou espèces génomiques). Le séquençage au *locus rrs2* (ARNr 16S) bactérien permet de

dénombrer aujourd'hui 23 espèces de leptospires génomiques (Parte 2013). Toutefois ce nombre est probablement sous estimé étant donné le rythme élevé de description de nouvelles espèces telles que *Leptospira kmetyi* (Slack *et al.* 2009), *L. idonii* (Saito *et al.* 2013), *L. mayottensis* (Bourhy *et al.* 2014) ou encore la description d'un nouveau clade (Clade C) en Amazonie (Ganoza *et al.* 2006). Sur la base du *locus rrs2*, les espèces de leptospires sont classées en trois groupes : saprophytes, intermédiaires et pathogènes (Cerqueira & Picardeau 2009) (Figure 5). Le groupe des saprophytes comprend notamment *L. meyeri* et *L. biflexa*. Le groupe intermédiaire correspond à des espèces de leptospires dont la pathogénicité est controversée, tels que *L. fainei* et *L. inadai*. Actuellement, le groupe des leptospires pathogènes comprend neuf espèces dont *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* (Levett 2015). La pathogénicité du Clade C est inconnue (Ganoza *et al.* 2006).

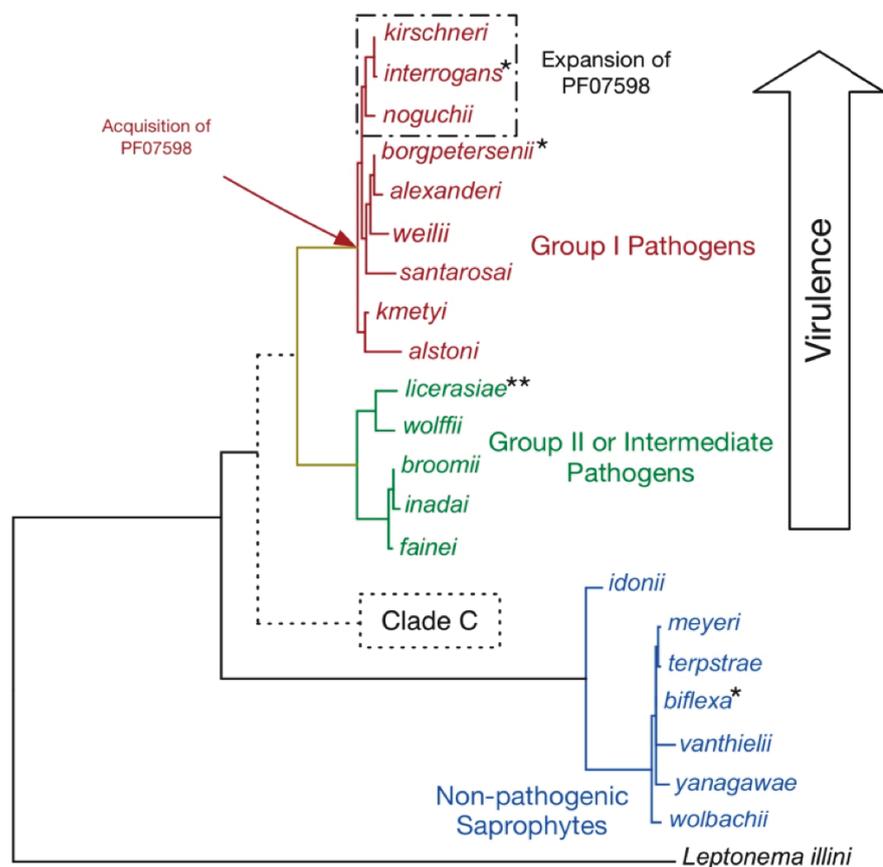


Figure 3. Phylogénie de 21 espèces de leptospires basée sur la séquence complète de l'ARN ribosomique 16S (d'après Lehmann *et al.* 2014). Le Clade C regroupe des leptospires isolés dans des échantillons d'eau au Pérou et dont la pathogénicité est inconnue (Ganoza *et al.* 2006). PF07598 est une famille de gènes dont certains sont impliqués dans la virulence et potentiellement dans la colonisation spécifique des tissus de l'hôte. Pour certaines espèces de leptospires, des génomes complets (*) ou assemblés en contigs (**) sont disponibles sur les bases de données publiques.

Les classifications sérologiques et génomiques ne sont pas congruentes puisqu'une même genomo-espèce peut correspondre à plusieurs sérogroupes et un séro groupe à plusieurs genomo-espèces (Levett 2001) (Tableau 1). Le plus souvent, cette incongruence ne permet pas de croiser les informations sérologiques et génétiques. De plus, il existe au sein de la communauté scientifique des confusions encore importantes entre les différentes classifications. Ces confusions ne facilitent pas la compréhension globale de l'épidémiologie de la leptospirose.

Tableau 1. Correspondances entre sérogroupes et génomo-espèces de leptospires (*Leptospira*) (d'après Levett 2001).

Sérogroupes	Génomo-espèces
Andamana	<i>Leptospira biflexa</i>
Australis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Autumnalis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Ballum	<i>L. borgpetersenii</i>
Bataviae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Canicola	<i>L. interrogans</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Celledoni	<i>L. weilii</i> , <i>L. borgpetersenii</i>
Codice	<i>L. wolbachii</i>
Cynopteri	<i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Djasiman	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. kirschneri</i>
Grippotyphosa	<i>L. interrogans</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Hebdomadis	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. kirschneri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Hurstbridge	<i>L. fainei</i>
Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Javanica	<i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. alexanderi</i>
Louisiana	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i>
Lyme	<i>L. inadai</i>
Manhao	<i>L. weilii</i> , <i>L. inadai</i> , <i>L. alexanderi</i>
Mini	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i> , <i>L. alexanderi</i>
Panama	<i>L. noguchii</i> , <i>L. inadai</i>
Pomona	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. kirschneri</i>
Pyrogenes	<i>L. interrogans</i> , <i>L. noguchii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i>
Ranarum	<i>L. interrogans</i> , <i>L. meyeri</i>
Sarmin	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i>
Sejroe	<i>L. interrogans</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. meyeri</i>
Semarang	<i>L. meyeri</i> , <i>L. biflexa</i>
Shermani	<i>L. noguchii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. inadai</i>
Tarassovi	<i>L. noguchii</i> , <i>L. weilii</i> , <i>L. santarosai</i> , <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. inadai</i>

Le développement de la biologie moléculaire s'est accompagné de l'application de nombreuses techniques de génotypage des leptospires : AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), MLVA (Multi Locus Variable number of tandem repeats Analysis), PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) ou MLST (Multi Locus Sequences Typing). Si ces méthodes permettent aux laboratoires de diagnostic de détecter et caractériser les leptospires pathogènes dans les échantillons cliniques, les méthodes de typage basées sur les séquences d'ADN ont l'avantage de fournir des caractères moléculaires qui peuvent être déposés dans des bases de données ouvertes (exemple : PubMLST ou GenBank) et permettre d'intégrer des données obtenues mondialement. Le génotypage par MLST, qui consiste à séquencer différents gènes, est aussi utilisé dans les études d'épidémiologie humaine (Thaipadungpanit *et al.* 2007 ; Bourhy *et al.* 2012 ; Zhang *et al.* 2015) et de caractérisation de leptospires animales (Dietrich *et al.* 2014). Les séquences générées permettent entre autre (i) de comparer les leptospires humaines et animales et donc de proposer des réservoirs potentiels, (ii) de déterminer les relations phylogénétiques entre différentes lignées bactériennes et (iii) de proposer des hypothèses quant aux histoires évolutives des leptospires (Dietrich *et al.* 2014). Ces méthodes de génotypage sont aujourd'hui complétées par le séquençage à haut débit permettant d'accéder aux génomes complets des leptospires.

3.2.3. Les génomes de leptospires

Selon les espèces, le génome des leptospires a un contenu en Guanine + Cytosine (G+C) de 35 à 42 % et une taille variant de 3,9 Mb à 4,6 Mb (Picardeau 2015). Les génomes sont organisés en deux chromosomes circulaires **cI** (> 3,6 Mb) et **cII** (278-350 kb) (Zuerner 1991 ; Picardeau 2015) et d'un réplicon circulaire supplémentaire, **p74**, chez l'espèce saprophyte *L. biflexa* (Picardeau *et al.* 2008). Aujourd'hui des génomes complets sont disponibles pour les espèces *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. santarosai*, *L. biflexa* et *L. licerasiae*, et leur comparaison permet de mettre en évidence les gènes impliqués dans la virulence, la pathogénicité, l'écologie ou encore l'évolution des leptospires (Ren *et al.* 2003 ; Nascimento *et al.* 2004 ; Ricaldi *et al.* 2012 ; Lehmann *et al.* 2013, 2014; Pappas *et al.* 2015). Par exemple une étude comparative des génomes de l'espèce saprophyte *L. biflexa* et des espèces pathogènes *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* a mis en évidence un ensemble de gènes en commun (core genomes) à toutes les espèces analysées et a révélé que près d'un tiers des gènes présents chez *L. biflexa* est absent chez les espèces pathogènes (Picardeau *et al.* 2008) (Figure 7).

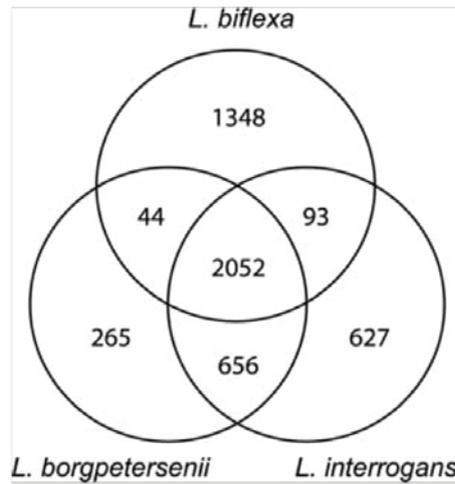


Figure 4. Diagramme de Venn montrant le nombre de gènes uniques et partagés parmi *Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii* et *L. biflexa* (d'après Picardeau *et al.* 2008).

Une autre étude a mis en évidence un niveau important de réduction génomique chez *L. borgpetersenii* en comparaison avec le génome de *L. interrogans* (Bulach *et al.* 2006). L'absence d'îlots génomiques et notamment de gènes impliqués dans le transport et l'utilisation de métabolites a conduit les auteurs à proposer que le génome réduit de *L. borgpetersenii* ne lui permet pas de survivre dans l'environnement, ce qui favoriserait une transmission directe de type hôtes-hôtes. A l'opposé, *L. interrogans* peut persister plusieurs mois dans l'environnement, facilitant une transmission indirecte aux hôtes accidentels au contact d'un environnement contaminé (Bulach *et al.* 2006).

3.2.4. Cycle de transmission

Le cycle de transmission de la maladie fait intervenir les bactéries, les animaux sauvages ou domestiques et l'environnement (Figure 9). Les bactéries ayant infecté les animaux réservoirs vont coloniser la lumière des tubules rénaux, s'y développer sous forme de biofilm et seront excrétées par la suite dans l'environnement via l'urine (Haake & Levett 2015). La contamination des autres animaux peut se faire directement par contact avec l'urine et/ou avec les tissus contaminés, ou indirectement via l'environnement contaminé (sols, eaux) où certaines espèces de leptospires peuvent se maintenir durant des périodes prolongées. L'homme est considéré comme un hôte accidentel, bien qu'il puisse excréter les bactéries pendant plusieurs mois voire même une année (Ganoza *et al.* 2010). Les leptospires pénètrent dans l'organisme via les abrasions, les coupures cutanées ou encore les muqueuses (Levett

2001). Chez l'homme, la contamination par des environnements souillés est le mode de transmission le plus commun et plusieurs activités ont été identifiées comme à risque tels que les travaux dans les champs, la chasse ou les activités aquatiques (Haake & Levett 2015).

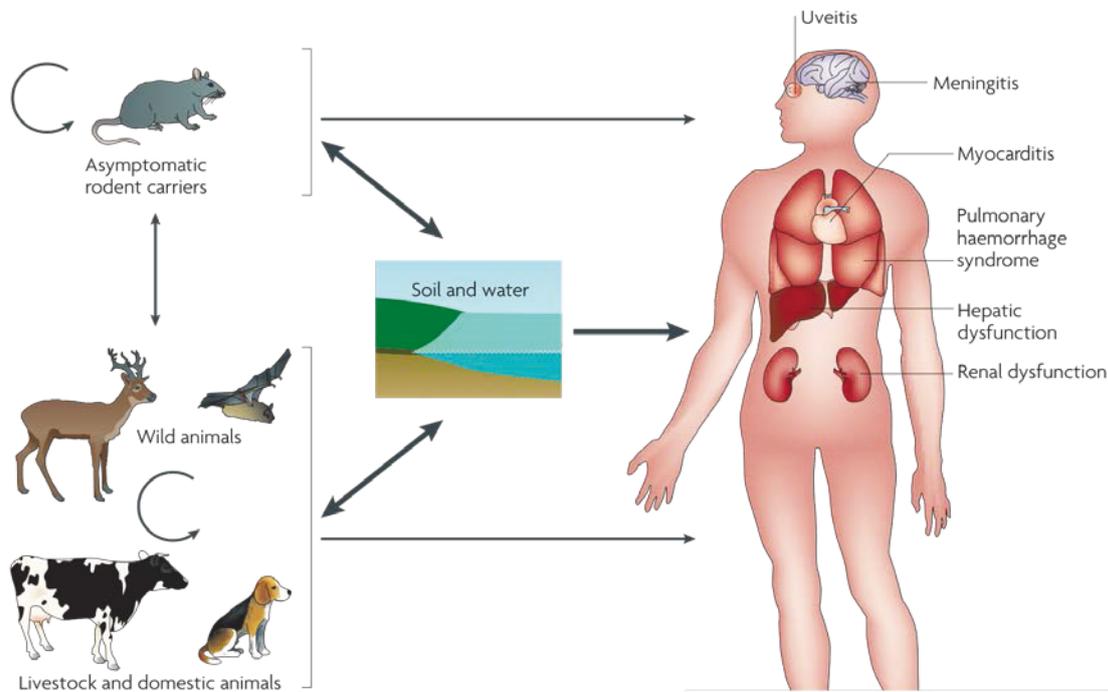


Figure 5. Cycle de transmission des leptospires (d'après Ko *et al.* 2009).

3.3. La leptospirose humaine

Les mécanismes physiopathologiques ne sont pas encore bien connus mais de part la variation des manifestations cliniques, il est possible que différents facteurs contribuent au tableau symptomatologique de la maladie (Bharti *et al.* 2003). Classiquement, on considère que la maladie résulte des effets directs de la bactérie et de la réponse immune de l'hôte (Bharti *et al.* 2003). Une fois la barrière cutanée passée, les leptospires vont établir une infection systémique par diffusion dans le sang (Faine *et al.* 1999). La période d'incubation varie de 2 à 30 jours (Faine *et al.* 1999). Par la suite, les leptospires vont atteindre différents organes (reins, poumons, foie) mais les reins sont les cibles principales. Au niveau des organes, la leptospirose est caractérisée par des lésions endothéliales, des vascularités et des infiltrats inflammatoires au niveau du foie, du cœur, des poumons, et des reins.

3.3.1. Les différentes formes de la maladie

La leptospirose est une maladie biphasique caractérisée par une phase aigüe (leptospiromique) qui dure en moyenne une semaine puis une phase immune (leptospiurique) avec production d'anticorps et présence de leptospires dans l'urine (Levett 2001) (Figure 11). C'est lors de la phase immune que surviennent les complications de la maladie.

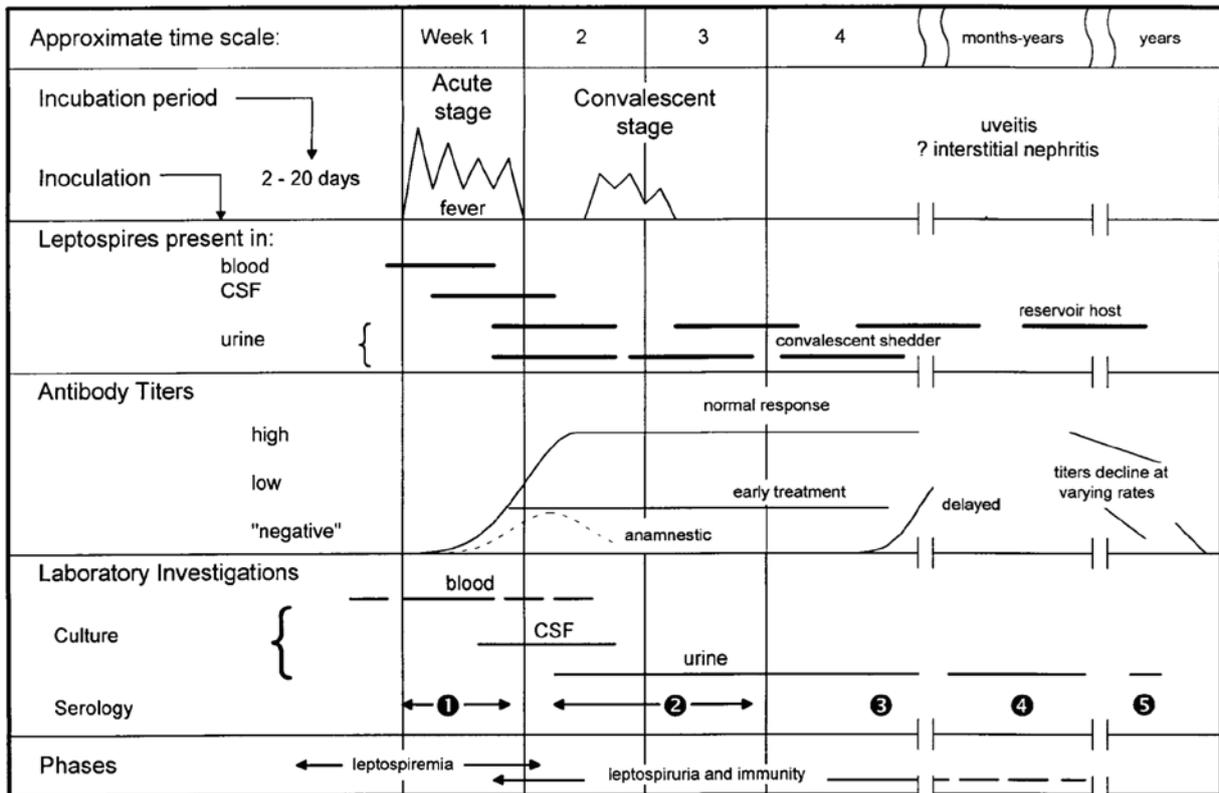


Figure 6. La nature biphasique de la leptospirose et les tests de laboratoires possibles (sérologie et culture) en fonction de l'avancée de la maladie (d'après Levett 2001). Leptospiromia : leptospiromique (phase aigüe) et leptospiuria : leptospiurique (phase immune).

La leptospirose anictérique constitue la majorité des infections et se caractérise principalement par une fièvre brutale, des céphalées et des myalgies. Mais d'autres symptômes peuvent être associés tels que douleurs abdominales, suffusions conjonctivales, ou encore vomissements (Levett 2001). La leptospirose ictérique est une forme plus grave de la maladie témoignant d'une atteinte hépatique sévère. Le plus souvent, on observe des associations variables de différentes manifestations telles que des ictères, des insuffisances rénales, des atteintes respiratoires, cardiaques, neurologiques et des hémorragies (Levett 2001).

Le syndrome de Weil (ou la maladie de Weil) est la présentation classique de la maladie. Elle se caractérise par la survenue séquentielle d'une phase septicémique, d'une phase ictérique et d'une insuffisance rénale. Le taux de mortalité peut être important de 5 à 15 % (Bharti *et al.* 2003).

Le syndrome d'hémorragie pulmonaire sévère (Severe Pulmonary Hemorrhagic Syndrome : SPHS ou Leptospirosis-associated Pulmonary Haemorrhage Syndrome : LPHS) est une forme fulminante de la maladie. Elle est caractérisée par des hémorragies pulmonaires massives associées à une détresse respiratoire aiguë. Le mécanisme de cette complication gravissime serait une atteinte de l'endothélium vasculaire et serait au moins en partie le témoin d'un processus auto-immun. Les taux de mortalité sont très élevés : plus de 50 % (McBride *et al.* 2005).

Pour des raisons inconnues, la leptospirose est essentiellement une maladie de l'adulte touchant particulièrement les individus masculins, peut-être en raison d'une exposition plus grande.

Finalement il convient de rappeler que les formes symptomatiques de la maladie, ne sont que le sommet de l'iceberg et ne représentent qu'une part très minoritaire de l'ensemble des infections par les leptospires. En effet dans la plupart des cas, l'infection peut être totalement asymptomatique ou donner lieu à un état fébrile bénin guérissant spontanément et échappant ainsi totalement à la détection. En zone d'endémie, la proportion de ces formes peut-être évaluée par la conduite d'enquêtes sérologiques systématiques.

3.3.2. *Le diagnostic biologique*

En fonction de l'évolution de la maladie (Figure 11), différentes techniques peuvent être utilisées pour détecter soit directement les bactéries soit les anticorps qui sont les témoins des infections. Ces techniques peuvent être regroupées en trois catégories : (i) l'isolement par culture, (ii) la sérologie et (iii) la biologie moléculaire (Bharti *et al.* 2003 ; Picardeau 2013 ; Haake & Levett 2015).

La culture bactérienne : Lors des deux premières semaines de la maladie, la bactérie peut être isolée par culture à partir du sang. L'urine peut être utilisée comme inoculum pour une mise en culture à partir de la troisième semaine. La culture bactérienne requiert des milieux spéciaux de qualité certifiée et beaucoup de temps car elles doivent être suivies par des lectures sous microscope à fond noir toute les semaines pendant au moins quatre mois.

La sérologie : Les techniques sérologiques sont les plus utilisées par les laboratoires d'analyses. Le MAT est la méthode sérologique de référence de part sa bonne spécificité et sensibilité. Toutefois cette technique requiert un personnel formé à la lecture des résultats. De plus, elle nécessite l'entretien d'une batterie de cultures de leptospires de serovars et serogroupes déterminés représentatifs de la région géographique concernée. D'autres tests sérologiques sont utilisés dont l'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) IgM.

La biologie moléculaire : Plusieurs systèmes de PCR (Polymerase Chain Reaction) ou de PCR en temps réel (RT-PCR : Real Time-Polymerase Chain Reaction) sont disponibles pour la détection des leptospires. Dans ces systèmes, différents gènes peuvent être utilisés : *rrs2*, *lipL32*, *secY*, *lfb1* ... (Mérien *et al.* 1992 ; Smythe *et al.* 2002 ; Ahmed *et al.* 2009 ; Thaipadunpanit *et al.* 2011).

3.3.3. Traitements

Le traitement varie en fonction de la sévérité et de la durée des symptômes lors du diagnostic du patient. Il fait appel à des antibiotiques tels que la doxycycline ou encore l'ampicilline. Les patients avec une forme sévère doivent être hospitalisés, et pour les plus gravement atteints, ils doivent être admis en soins intensifs (Levett 2001).

3.4. La leptospirose animale

Pratiquement toutes les espèces animales sont susceptibles d'être infectées par des leptospires cependant ce sont principalement les petits mammifères tels que les rongeurs (exemple : *Rattus norvegicus*) qui sont considérés comme les principaux réservoirs à l'origine des infections humaines (Plank & Dean 2000 ; Haake & Levett 2015). La liste des espèces est très longue et nous ne traiterons ici que de quelques groupes d'animaux d'élevages, domestiques et issus de la faune sauvage.

La leptospirose représente un réel problème de santé chez les animaux d'élevage (bovins, moutons, cochons) impactant grandement la reproduction et entraînant ainsi des pertes économiques importantes. La sévérité de la maladie va varier en fonction des serovars et des espèces animales (Plank & Dean 2000 ; Haake & Levett 2015). Classiquement les leptospires se retrouvent dans les reins et sont excrétés par l'urine mais ils peuvent se localiser aussi dans l'utérus. Bien que les mécanismes de la pathogénèse ne soient pas encore compris cela va entraîner des avortements et des maladies néonatales (Ellis 2015).

La proximité des chiens et de l'homme et leur rôle potentiellement intermédiaire entre les rongeurs et l'Homme a stimulé de nombreuses études qui ont montré que la maladie chez le chien est similaire à celle de l'Homme, et présente des formes anictériques et ictériques. En revanche, les chats sont considérés comme résistants à la maladie (Ellis 2015).

Un nombre considérable d'études rapporte des infections de leptospires chez les rongeurs. Toutefois peu d'informations concernant les signes cliniques de la maladie chez ces animaux sont disponibles (Ellis 2015). De plus en plus d'études montrent que des espèces de chauves-souris (Chiroptères) de différentes régions du monde hébergent des leptospires (notamment pathogènes) (Cox *et al.* 2005 ; Matthias *et al.* 2005 ; Dietrich *et al.* 2014 ; Ogawa *et al.* 2015). L'implication des chauves-souris dans les récents épisodes d'émergence virale soulève des questions quant aux rôles possibles de ces mammifères dans le maintien et la transmission de leptospires à la faune environnante mais aussi à l'Homme (Tulsiani *et al.* 2011 ; Dietrich *et al.* sous presse).

Les leptospires infectent aussi les espèces de mammifères aquatiques. Par exemple, dans les populations de lions de mer (*Zalophus californianus*), les infections entraînent échouages et mortalité (Cameron *et al.* 2008).

3.5. Associations hôtes-leptospires

Au niveau sérologique, on observe des associations entre sérvars/sérogroupe et certains taxons animaux (Bharti *et al.* 2003) (Tableau 3). Généralement les rats, les souris, les bovins et les chiens sont associés respectivement aux sérogroupe Icterohaemorrhagiae, Ballum, Hardjo et Canicola, (Ellis 2015). Toutefois ces associations ne sont pas absolues (Levett 2001 ; Adler & de la Peña Moctezuma 2010) et on observe des différences de sérogroupe pour une même espèce animale présente dans différentes régions géographiques (Bharti *et al.* 2003 ; Hamond *et al.* 2014). Par exemple, la Mangouste de Java (*Herpestes auropunctatus*) exprime des anticorps dirigés contre différents sérogroupe en fonction des régions (Bharti *et al.* 2003). Toutefois il faut rester prudent quant aux interprétations sérologiques car ces différences dans les sérogroupe détectés en fonction des régions pourraient être le résultat d'expositions à des leptospires différents. Globalement, les MATs devraient être considérés comme des marqueurs d'exposition mais ils sont souvent considérés comme des marqueurs d'infection. Au niveau moléculaire, les études montrent également certaines associations entre les leptospires et leurs hôtes. Par exemple, les espèces de *Rattus* sont généralement infectées par *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* et les espèces de *Mus* sont majoritairement infectées

par *L. borgpetersenii* bien que d'autres espèces de leptospires soient également détectées chez les souris (Matthias *et al.* 2008 ; Cosson *et al.* 2011; Guernier *et al.* en préparation).

Tableau 2. Exemples d'animaux réservoirs de certains serovars de leptospires (d'après Bharti *et al.* 2003).

Hôte réservoir	Serovar(s)
Cochons	<i>pomona, tarassovi</i>
Veaux	<i>hardjo, pomona</i>
Chevaux	<i>brastislava</i>
Chiens	<i>canicola</i>
Moutons	<i>hardjo</i>
Ratons laveurs	<i>grippotyphosa</i>
Rats	<i>icterohaemorrhagiae, copenhageni</i>
Souris	<i>ballum, arborea, bim</i>
Marsupiaux	<i>grippotyphosa</i>
Chauves-souris	<i>cynopteri, wolffi</i>

Les données sur les associations hôtes-leptospires sont importantes dans l'épidémiologie de la maladie puisqu'elles permettent de définir l'origine des infections et les chemins de transmission dans une région donnée, comme cela a pu être exploré à Mayotte (Desvars *et al.* 2012), à La Réunion (Guernier *et al.* en préparation) ou en Thaïlande (Cosson *et al.* 2014). La connaissance de la distribution des leptospires au sein de la faune est un élément de connaissance fondamental dans la caractérisation d'une épidémiologie (Levett 2001 ; Picardeau 2013). Bien qu'implicitement utilisées, peu de recherches se sont consacrées aux associations entre les leptospires et leurs hôtes et moins encore se sont directement intéressées aux patrons de spécificités d'hôtes. Parmi les quelques études publiées, citons les travaux de Wong *et al.* (2012) montrant une forte spécificité d'espèces hôtes pour des sérogroupes particuliers sur des îles hawaïennes. L'étude de Cameron *et al.* (2008) montre que les populations de lions de mer (*Eumetopias jubatus* et *Zalophus californianus*) et d'éléphants de mer (*Mirounga angustirostris*) de la côte Ouest des Etats Unis sont infectées respectivement par *L. interrogans* et *L. kirschneri*. En réalisant du génotypage MLST, Muriel Dietrich et ses collaborateurs montrent que les petits mammifères endémiques de Madagascar (incluant certaines espèces de chauves-souris) hébergent des lignées de leptospires spécifiques (Dietrich *et al.* 2014). Les auteurs proposent que la radiation des leptospires est liée à celle des hôtes mammifères endémiques.

3.6. Etude de la leptospirose dans les îles

Comme évoquée précédemment, la leptospirose est une des zoonoses ré-émergentes la plus largement répandue au niveau mondial (Faine *et al.* 1999 ; Levett 2001 ; Adler & de la Peña Moctezuma 2010). Des travaux antérieurs soulignent que la leptospirose est un bon modèle pour la compréhension d'émergence des maladies infectieuses mais que de nombreuses connaissances sont encore à apporter (Vinetz *et al.* 2005). Pour combler ces lacunes, les auteurs proposent une approche multidisciplinaire incluant des approches biomédicales, socio-culturelles et écologiques. La taxinomie, l'écologie et l'évolution des pathogènes (i.e. évolution du pathogène et des réservoirs mammifères) ainsi que l'écologie des interactions hôtes-pathogènes (exemples : mode de transmission, hôtes-pathogènes fidélité) restent pour l'essentiel à explorer (Vinetz *et al.* 2005). Les systèmes insulaires peuvent faciliter de telles études car ce sont des écosystèmes simples et relativement fermés qui sont considérés comme des laboratoires naturels pour les études d'évolution et d'écologie (Emerson 2002). En raison de leurs surfaces limitées et de l'éloignement avec les continents sources, les îles présentent une faible richesse spécifique (MacArthur & Wilson 1967) qui facilite l'investigation de la plupart voire de toute la diversité mammifère potentiellement impliquée dans un cycle de transmission. Le niveau d'endémisme élevé (Emerson 2002) et la connaissance de l'histoire géologique des îles océaniques permettent de tester des hypothèses quand aux introductions de pathogènes et leurs histoires évolutives. Ainsi les systèmes insulaires constituent de bons modèles pour la compréhension des mécanismes d'émergence des maladies et peuvent être utilisés pour plusieurs modèles arboparasites (Tortosa *et al.* 2012). Dans le cas de la leptospirose, des études ont été menées dans différentes îles et ont apporté des données importantes sur l'épidémiologie humaine et animale ou encore l'écologie des bactéries. Ainsi les travaux de Derne *et al.* (2011) soulignent que les niveaux élevés d'incidence de la maladie sur les îles peuvent résulter d'une faible diversité d'espèces (réservoirs) typique des écosystèmes insulaires. Des émergences de sérovars connus ou nouveaux sont aussi décrites sur les îles (Katz *et al.* 2011 ; Lau *et al.* 2012, 2015). A Mayotte (archipel des Comores, Sud-ouest de l'Océan Indien), des études rapportent une épidémiologie unique de la leptospirose impliquant une nouvelle espèce de leptospire : *Leptospira mayottensis* (Bourhy *et al.* 2010, 2012, 2014). A Hawaï, Wong *et al.* (2012) montrent que la communauté des bactéries est dépendante de facteurs écologiques et des interactions hôtes-pathogènes. Une revue de Desvars *et al.* (2011) sur la leptospirose des petits mammifères des petites îles tropicales montre qu'un panel de serovars spécifique circule au sein de chaque île et que cela dépend de la diversité des espèces animales et des environnements.

4. La leptospirose dans les îles du Sud-ouest de l’Océan Indien

La région du Sud-ouest de l’Océan Indien (SOOI) est composée de plusieurs îles ayant des origines géologiques et des âges différents (Figure 13).

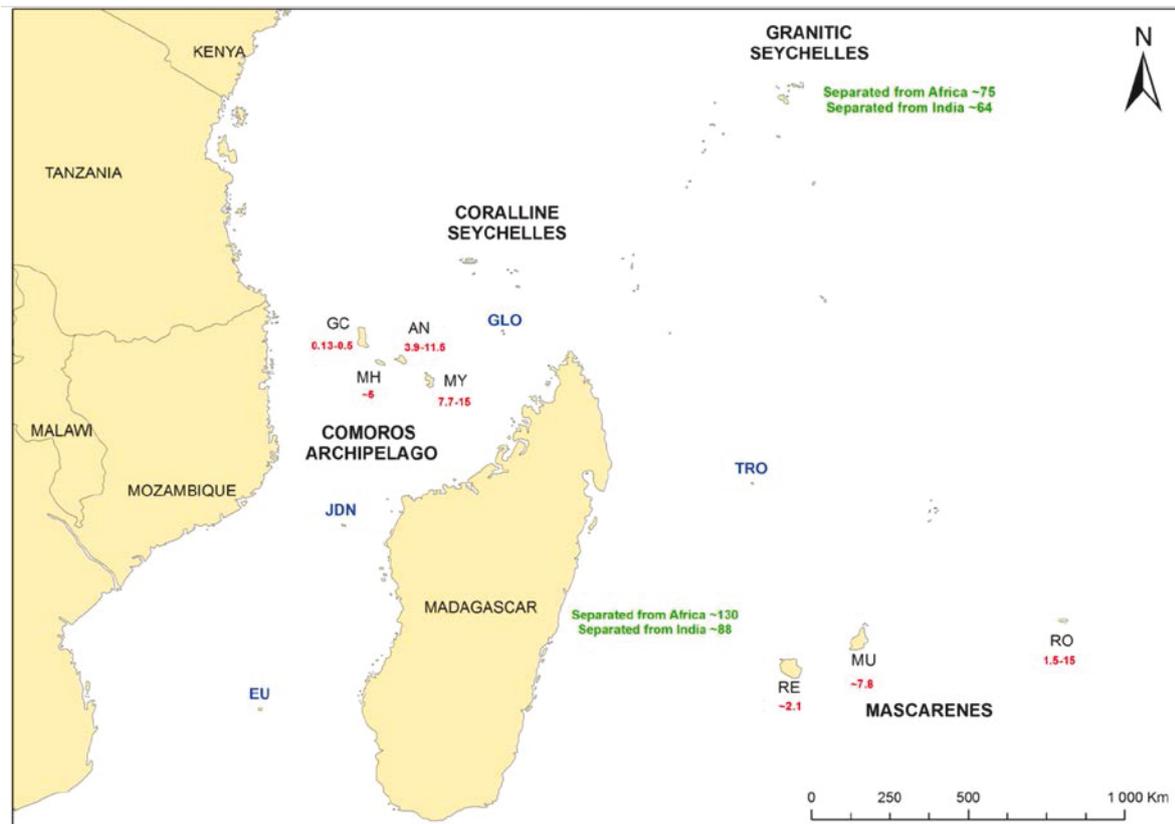


Figure 7. Les îles de la région du Sud-ouest de l’Océan Indien. Les îles granitiques, volcaniques et coralliennes sont indiquées respectivement en vert, en rouge et en bleu. L’archipel des Comores est composé de l’Union des Comores (GC : Grande Comore, AN : Anjouan et MH : Mohéli) et du département français de Mayotte (MY) ; l’archipel des Mascareignes comprend La Réunion, Maurice et Rodrigues (RE, MU et RO, respectivement) ; et enfin les îles Eparses incluent Europa, Juan de Nova et Les îles Glorieuses et Tromelin (EU, JDN, GLO et TRO, respectivement). Les âges approximatifs sont indiqués en millions d’années. D’après Tortosa *et al.* (2012) adaptée de Warren *et al.* (2005).

Dans cette région, la leptospirose humaine et animale est un problème de santé publique sur plusieurs îles. La maladie fait l’objet d’une surveillance proactive à La Réunion et à Mayotte alors qu’elle est très peu documentée voire absente sur plusieurs autres îles de la région (Union des Comores, Madagascar et Maurice) (Desvars *et al.* 2013a). Cette situation complique singulièrement l’intégration des données à une échelle régionale. Toutefois, les données accessibles aujourd’hui et dont le rythme de publications s’est accéléré ces dernières années suggèrent une épidémiologie contrastée entre les îles (Bourhy *et al.* 2010, 2012, 2014 ; Rahelinirina *et al.* 2010 ; Desvars *et al.* 2011, 2012 ; Desvars *et al.* 2013a; Pagès *et al.* 2014,

2015a, 2015b ; Naze *et al.* 2015; Ratsitorahina *et al.* 2015). Par exemple, les incidences annuelles de la maladie varient en fonction des îles. Ainsi, l'archipel des Seychelles est le pays au monde qui enregistre les plus fortes incidences annuelles de la maladie (Pappas *et al.* 2008). A La Réunion, entre 2008 et 2012 l'incidence moyenne était de 8,2 cas pour 100 000 habitants ce qui est plus faible qu'à Mayotte qui enregistre, en 2010, une incidence de 25 cas pour 100 000 habitants (Bourhy *et al.* 2012 ; Pagès *et al.* 2014). Une incidence de 2,5 pour 100 000 habitants est reportée pour Maurice et Rodrigues (D'Aoust *et al.* 2010 ; Pagès *et al.* 2014).

En plus des différences dans les incidences de la maladie, les observations montrent des variations des leptospires (sérogroupes/génotypes) circulants au sein de ces îles. A La Réunion, Icterohaemorrhagiae est le séro groupe clinique majeur (Pagès *et al.* 2014) alors que ce séro groupe n'a jamais été rapporté à Mayotte malgré une surveillance continue par le Centre National de Référence de la Leptospirose (CNR de la Leptospirose). Des études sérologiques menées par Desvars *et al.* (2013b) sur la faune réunionnaise montrent que l'infection bactérienne se retrouve dans plusieurs espèces de l'île telles que les chiens, les rats, les chats ou encore différents animaux d'élevage. Bien que ces mêmes travaux mettent en évidence la présence de leptospires dans les reins de plusieurs espèces (cochons, musaraignes ou encore chiens), des études moléculaires supplémentaires (séquençage) sont nécessaires afin de comprendre le rôle de ces espèces dans l'épidémiologie de la maladie (Desvars *et al.* 2013b). Les données génotypiques récentes sur La Réunion montrent que *L. interrogans* est la principale espèce impliquée dans les cas cliniques (Naze *et al.* 2015) mais que *L. borgpetersenii* est également associé à quelques cas sévères (Guernier *et al.* en préparation). L'investigation moléculaire montre une leptospirose humaine à *L. interrogans* quasi clonale avec deux haplotypes retrouvés chez l'homme (56 cas sur 58 positifs). Un seul de ces haplotypes est retrouvé chez les rats (*R. rattus* et *R. norvegicus*), alors que les chiens hébergent les deux haplotypes. Par ailleurs les souris et les bovins abritent des haplotypes *L. borgpetersenii* retrouvés chez l'homme (Guernier *et al.* en préparation). D'autres espèces de leptospires sont détectées dans la faune sauvage telles que *L. kirschneri* chez *Mus musculus* (Guernier *et al.* en préparation) et un leptospire proche de *L. borgpetersenii* chez *Mormopterus francoismoutoui*, chauve-souris très abondante et seule espèce mammifère endémique de l'île (Dietrich *et al.* 2014). Toutefois, aucune de ces bactéries n'a été détectée dans les cas cliniques (Guernier *et al.*, en préparation).

Aux Seychelles une étude en cours indique que la situation est comparable à celle de La Réunion puisque le séro groupe Icterohaemorrhagiae est largement dominant dans les cas cliniques (Yersin *et al.* 1998) et que *L. interrogans* est l'unique espèce identifiée à ce jour chez les humains (Biscornet *et al.* en préparation). Comme à La Réunion, les haplotypes retrouvés sont peu diversifiés et comprennent un haplotype majoritaire et commun avec les leptospires retrouvés chez les rats (*R. rattus* et *R. norvegicus*) et un second haplotype, minoritaire, dont le réservoir reste à identifier (Biscornet *et al.* en préparation).

A l'île de Maurice, Simon *et al.* (2012) décrivent un cas de leptospirose à *L. interrogans* chez un homme de retour de voyage de l'île.

A Madagascar, la plupart des données humaines sont sérologiques et révèlent de faibles niveaux de séroprévalence en population humaine et la circulation de différents sérogroupes dont le séro groupe Icterohaemorrhagiae apparaît comme prédominant (Lhuillier 1978 ; Ratsitorahina *et al.* 2015). Au niveau moléculaire chez les humains, les données sont peu nombreuses mais deux cas importés de Madagascar résultent d'infections à *L. kirschneri* et à *L. interrogans* (Bourhy *et al.* 2012 ; Pagès *et al.* 2015a). L'investigation de la faune sauvage est plus avancée et indique une situation particulière avec une infection à *L. interrogans* chez les mammifères introduits et des lignées très diversifiées et probablement autochtones ou endémiques chez les mammifères endémiques terrestres (Rahelinirina *et al.* 2010 ; Dietrich *et al.* 2014). Dietrich *et al.* (2014) ont montré que différentes lignées de *L. borgpetersenii* infectent les espèces de chauves-souris insectivores: *Miniopterus* spp. (Miniopteridae) et *Myotis goudoti* (Vespertilionidae).

Mayotte se caractérise par une diversité importante des espèces génomiques de leptospires chez les cas cliniques : *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri* et l'espèce nouvellement décrite *L. mayottensis* (anciennement *L. borgpetersenii* groupe B). Cependant aucun cas clinique impliquant le séro groupe Icterohaemorrhagiae n'a été rapporté (Bourhy *et al.* 2010, 2012, 2014). Au niveau de la faune, Desvars *et al.* (2012) montre que différentes espèces animales sont infectées (chauve-souris frugivore, lémuriens et chiens) mais propose que le rat noir (*R. rattus*) est le réservoir majeur des quatre espèces de leptospires à l'origine des infections humaines.

5. Déterminants de l'épidémiologie de la leptospirose dans le SOOI

Malgré des données incomplètes, difficilement superposables (sérogroupes/génomospèces) et des systèmes de santé significativement contrastés, il semble que l'épidémiologie de la leptospirose humaine soit assez différente entre les îles en termes d'incidence, de sérogroupes et d'espèces génomiques. Au sein d'un environnement la biodiversité des leptospires est affectée par le climat, la géographie, les interactions biotiques et les activités humaines (Bharti *et al.* 2003). Ainsi, nous proposons trois hypothèses permettant d'expliquer ces particularités (Figure 15)

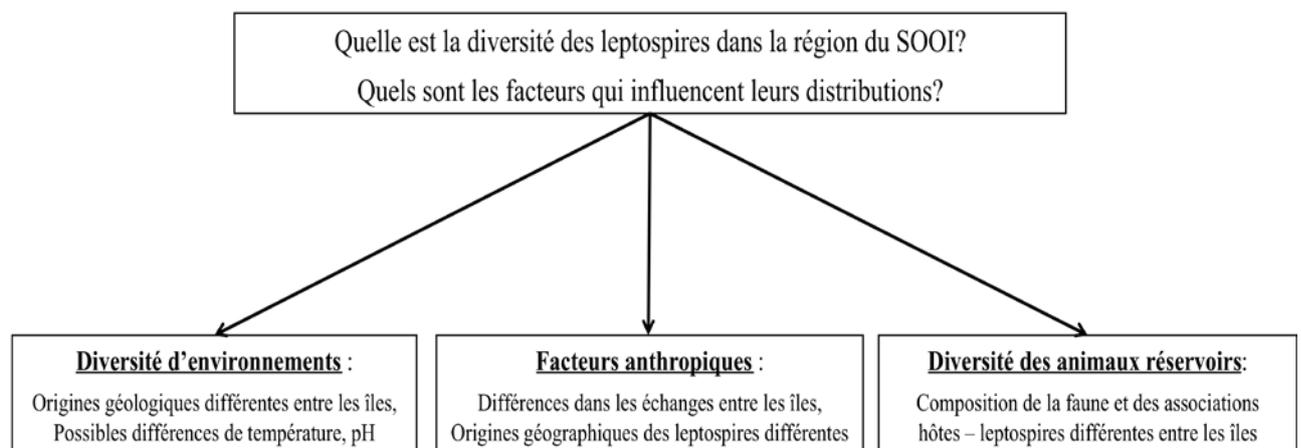


Figure 8. Facteurs pouvant expliquer l'épidémiologie contrastée de la leptospirose dans le Sud-ouest de l'Océan Indien.

Diversité des environnements : Différentes variables environnementales telles que la température, le pH, la disponibilité en nutriments ou encore la présence d'autres organismes peuvent affecter la survie des leptospires dans un environnement donné (Chang *et al.* 1948 ; Okazaki & Ringen 1957 ; Levett 2001 ; Trueba *et al.* 2004 ; Kumar *et al.* 2015). Le SOOI englobe des îles d'origines géologiques différentes (Figure 13) comprenant des îles granitiques résultant de la dérive des continents (Madagascar, Seychelles) et des îles océaniques d'origine volcanique ayant émergé *de novo* (Archipel des Comores, La Réunion, Maurice et Rodrigues). On peut émettre l'hypothèse que cette diversité d'environnements avec des conditions diverses (exemples: pH, ensoleillement, température et pluie) peut favoriser le maintien et la transmission de certaines espèces de leptospires au détriment d'autres.

Différences des échanges entre les îles : Les situations économiques et géopolitiques des îles ont conduit au développement d'échanges commerciaux et des mouvements de

populations humaines et animales différents entre les îles. A titre d'exemple, La Réunion entretient des niveaux d'échange importants avec la France métropolitaine tandis que l'Union des Comores importe des biens et des animaux en provenance d'Afrique de l'Est et de Madagascar. Ces échanges constituent des sources potentielles et continues d'introduction de leptospires qui peuvent ou non s'adapter à leur nouvel environnement. En Grande Comore (Union des Comores), un événement d'introduction a conduit à une épidémie dans le cheptel bovin : un parasite (*Theileria parva*) et son vecteur (*Rhipicephalus appendiculatus*) ont été introduits de Tanzanie en Union des Comores par le biais du marché de bétail (Deken *et al.* 2007 ; Yssouf *et al.* 2011). De tels événements couplés aux mouvements de bétail entre les îles de l'Archipel des Comores (Roger *et al.* 2014) pourraient expliquer que la situation de la leptospirose à Mayotte soit totalement différente de celles connues des autres îles de la région. Ainsi on peut s'attendre à ce que le profil de la leptospirose à Mayotte soit semblable à celui d'Afrique. En prenant l'exemple du rat noir, Desvars (2012) propose que la diversité des leptospires détectées à Mayotte résulte de la diversité des leptospires de la côte Est africaine et malgaches, d'où viendraient les rats noirs de Mayotte.

Diversité des réservoirs : La présence des leptospires dans une région donnée va dépendre de facteurs abiotiques décrits plus haut mais également de la présence de réservoirs particuliers. Ainsi, il est raisonnable de penser que la diversité des mammifères va influencer l'épidémiologie de la maladie locale. Madagascar abrite une diversité de mammifères extraordinaire et on peut s'attendre à ce que la diversité des leptospires y soit plus importante et renferme des lignées/espèces autochtones/endémiques. Les études récentes ont montré que les espèces introduites telles que *Rattus* spp. sont infectées par un seul haplotype de *L. interrogans* alors que les petits mammifères endémiques présentent des lignées très diversifiées de *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii* et *L. mayottensis* (Rahelinirina *et al.* 2010 ; Dietrich *et al.* 2014). Bien que peu de données sur la leptospirose humaine à Madagascar soient disponibles, il est vraisemblable que l'épidémiologie de la maladie y est totalement différente notamment de celle de La Réunion et des Seychelles.

6. Objectifs des travaux de thèse

Cette thèse a été initiée au Centre de Recherche et de Veille sur les Maladies Emergentes dans l'Océan Indien (CRVOI), dont l'une des thématiques était l'exploration de l'épidémiologie de la leptospirose dans la région Sud-ouest de l'Océan Indien (SOOI), où la maladie représente un problème de santé publique majeur sur plusieurs îles. Ces travaux ont été poursuivis par l'équipe DySIIs (Dynamique des Systèmes Infectieux Insulaires) au sein de l'UMR PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical). S'agissant d'une zoonose, nous nous sommes intéressés, dans le cadre de cette thèse, aux compartiments humains et animaux de cette pathologie avec pour **objectif général d'identifier les déterminants d'une épidémiologie apparemment contrastée entre les îles de la région.**

Dans un premier temps, nous avons cherché à compléter le corpus de données régionales en nous intéressant à la leptospirose humaine sur des îles jusque là considérées comme "indemnes" de la maladie : Grande Comore, Mohéli et Anjouan (Union des Comores) (**chapitre I**). Les objectifs étaient d'évaluer l'exposition éventuelle des populations humaines à la leptospirose et de décrire le profil sérologique de la maladie. Il paraissait vraisemblable que la sérologie de la maladie en Union des Comores soit comparable à celle de l'île voisine de Mayotte, qui appartient au même archipel d'un point de vue géographique et dont l'histoire est étroitement liée à celle de l'Union des Comores.

Nous nous sommes ensuite attachés à investiguer les leptospires pathogènes hébergés par la faune sauvage de la région. Nous avons notamment cherché à montrer que la diversité remarquable d'espèces animales, typique de ce point chaud de biodiversité, était associée à une diversité remarquable de leptospires pathogènes (Grande Comore, Madagascar et Mayotte). Ces données sont présentées dans les **chapitre II, III et IV**.

Au delà de ces aspects descriptifs, nous avons investigué un domaine encore peu documenté à savoir l'évolution des leptospires au sein de leurs espèces hôtes (**chapitre III**). Pour cela, nous avons utilisé le modèle biologique des chiroptères (chauves-souris) malgaches constitué d'une importante diversité d'espèces essentiellement endémiques et aux écologies et distributions géographiques variées.

Enfin, nous avons intégré l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de cette thèse et les travaux réalisés par l'ensemble de notre équipe ces dernières années pour décrypter le cas particulier de la leptospirose à Mayotte et plus généralement sur l'archipel comorien. Plusieurs études ont mis en évidence la présence d'une grande diversité d'espèces de

leptospires pathogènes chez l'homme. L'objectif principal des travaux présentés dans ce **quatrième et dernier chapitre**, était de montrer que l'épidémiologie particulière de la leptospirose dans l'archipel des Comores résultait au moins en partie de la présence de leptospires qui ont évolué au cœur d'un hotspot de la diversité animale.

L'ensemble des travaux présentés a fait l'objet de quatre articles originaux (deux articles publiés, un en révision et un soumis) qui sont intégrés au présent manuscrit. Une discussion générale vient compléter ce document et présente les perspectives d'investigations futures.

Chapitre I :
La leptospirose en Union des Comores

1. L'Union des Comores : indemne de leptospirose humaine ?

Située à l'entrée nord du Canal du Mozambique, l'archipel des Comores est constitué de quatre îles d'origine volcanique : les trois îles de l'Union des Comores (Grande Comore, Mohéli, Anjouan) et l'île de Mayotte, département français (Figure 17). Aucun cas de leptospirose n'a été, à notre connaissance, décrit en Union des Comores. De plus, en 2009 des médecins rencontrés à Moroni (capitale d'Union des Comores) lors de la visite d'une délégation du CRVOI n'ont pas eu connaissance de leptospirose humaine dans le pays (Dellagi et Tortosa, communication personnelle). En revanche, la littérature montre que la leptospirose a été diagnostiquée chez deux personnes de retour d'Union des Comores (Socolovschi *et al.* 2011 ; Bourhy *et al.* 2012). Ces cas importés de leptospirose associés à une origine géologique et un peuplement commun aux quatre îles, des échanges humains et animaux (légaux ou illégaux) intenses (Roger *et al.* 2014) et la présence de *Rattus rattus* sur l'ensemble de l'archipel (Louette *et al.* 2004) suggèrent que l'absence de leptospirose en Union des Comores résulte d'un biais de surveillance.

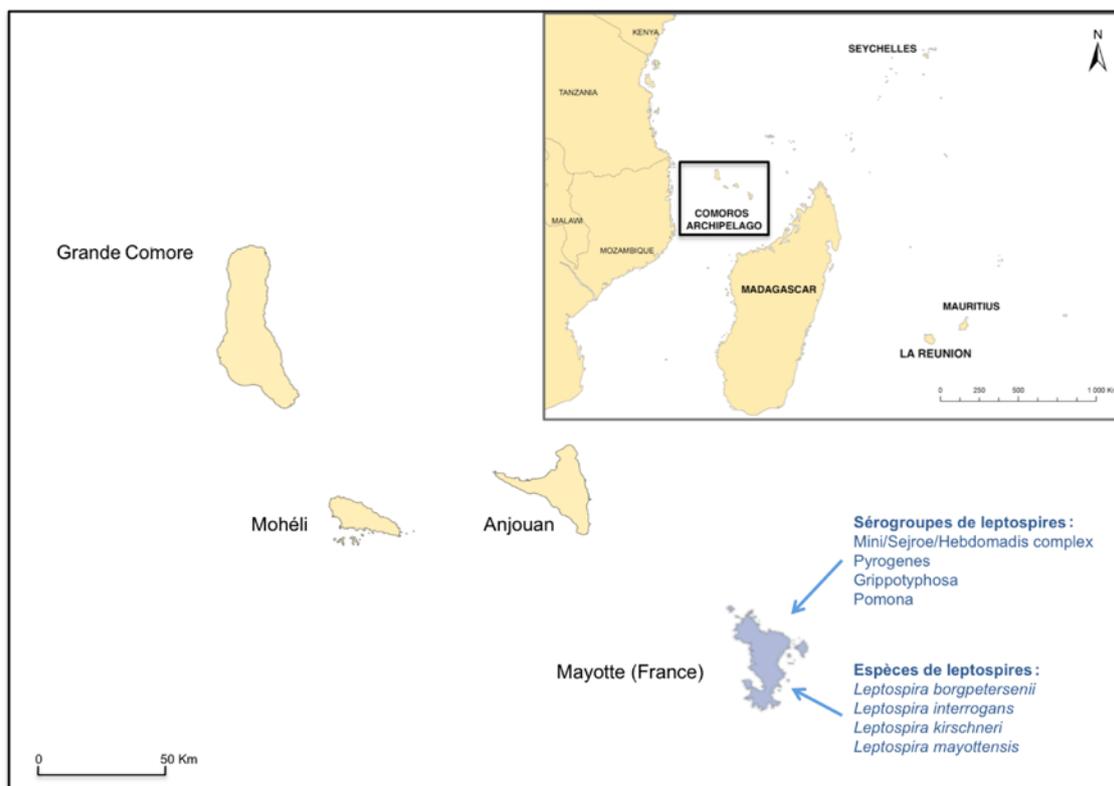


Figure 9. Situation géographique de l'archipel des Comores : Union des Comores (Grande Comore, Mohéli et Anjouan) et Mayotte (France). Les données des sérogroupes de leptospires à Mayotte sont présentés d'après les travaux précédents de Bourhy *et al.* (2010, 2012, 2014).

Une caractérisation de la situation de la maladie en Union des Comores constitue une information importante en terme de santé publique à un niveau national. D'un point de vue académique, la situation au niveau de l'archipel est intéressante puisqu'elle permet une comparaison du profil sérologique de cette zoonose en Union des Comores et à Mayotte où la leptospirose humaine est documentée depuis 1990 (Laporte *et al.* 1990). Ce département français enregistre des incidences plus élevées qu'à La Réunion et présente une épidémiologie singulière avec en particulier l'absence du sérotype Icterohaemorrhagiae, qui est pourtant rapporté comme le sérotype majoritaire sur la plupart des îles de la région (Laporte *et al.* 1990 ; Yersin *et al.* 1998 ; Bourhy *et al.* 2012 ; Simon *et al.* 2012 ; Desvars *et al.* 2013a; Pagès *et al.* 2015a ; Ratsitorahina *et al.* 2015).

C'est dans ce cadre que nous avons conduit une étude utilisant le Test de Micro Agglutination (MAT) (Martin & Pettit 1918), considéré comme un gold standard dans l'investigation de la leptospirose, sur des sérums humains (excès sera) provenant de différents laboratoires d'analyses et des laboratoires du Programme National de Lutte contre le Paludisme en d'Union des Comores (PNLP). Les résultats de ces travaux ont été publiés dans la revue *Emerging Infectious Diseases* - CDC en 2014.

2. Article 1

Serologic evidence of Leptospirosis in humans, Union of the Comoros, 2011

Gomard Y, Silai R, Hoarau G, Bon K, Gonneau F, Yssouf A, Michault A, Dellagi K and Tortosa P. (2014). *Emerging Infectious Diseases*, 20, 720–722.

**Julie Haendiges, Marvin Rock,
Robert A. Myers,
Eric W. Brown, Peter Evans,
and Narjol Gonzalez-Escalona**

Author affiliations: Department of Health and Mental Hygiene, Baltimore, Maryland, USA (J. Haendiges, M. Rock, R.A. Myers); and Food and Drug Administration, College Park, Maryland, USA (E.W. Brown, P. Evans, N. Gonzalez-Escalona)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2004.130818>

References

- González-Escalona N, Cachicas V, Acevedo C, Rioseco ML, Vergara JA, Cabello F, et al. *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:129–31. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1101.040762>
- González-Escalona N, Martínez-Urtaza J, Romero J, Espejo RT, Jaykus LA, DePaola A. Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing. *J Bacteriol*. 2008;190:2831–40. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01808-07>
- Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Dutta B, Takeda Y, Sack DA. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:39–48. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00025-06>
- DePaola A, Kaysner CA, Bowers J, Cook DW. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998). *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:4649–54. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.11.4649-4654.2000>
- Abbott SL, Powers C, Kaysner CA, Takeda Y, Ishibashi M, Joseph SW, et al. Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of vibrio-associated gastroenteritis on the West Coast of the United States and Mexico. *J Clin Microbiol*. 1989;27:2891–3.
- Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:595. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-11-595>
- Jolley KA, Hill DM, Bratcher HB, Harrison OB, Feavers IM, Parkhill J, et al. Resolution of a meningococcal disease outbreak from whole-genome sequence data with rapid Web-based analysis methods. *J Clin Microbiol*. 2012;50:3046–53. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01312-12>
- Jolley KA, Maiden MC. Automated extraction of typing information for bacterial pathogens from whole genome sequence data: *Neisseria meningitidis* as an exemplar. *Euro Surveill*. 2013;18:20379.
- Bryant D, Moulton V. Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol Biol Evol*. 2004;21:255–65. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msh018>
- Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet*. 2003;361:743–9. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12659-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12659-1)

Address for correspondence: Narjol Gonzalez-Escalona, Food and Drug Administration, Center for Food and Applied Nutrition, 5100 Paint Branch Pkwy, College Park, MD 20740, USA; email: narjol.gonzalez-escalona@fda.hhs.gov

Serologic Evidence of Leptospirosis in Humans, Union of the Comoros, 2011

To the Editor: Leptospirosis is a worldwide bacterial zoonosis caused by infection with pathogenic *Leptospira* spp. (Spirochaetales, Leptospiraceae). Most mammals can be infected, but rats are considered the main reservoir, maintaining *Leptospira* spirochetes in the lumen of renal tubules and contaminating the environment with bacteria-infected urine. Transmission to humans is accidental, occurring through contact with animal secretions or with contaminated environmental materials.

In temperate countries, human leptospirosis is a sporadic disease; incidence is much higher in the tropics because climate and environmental conditions are conducive to the survival

of bacteria, resulting in increased exposure of humans to leptospirosis-causing pathogens (1). Among islands in the southwestern Indian Ocean, human leptospirosis is endemic to Mayotte, France, and La Réunion (2–4) and to the Seychelles, where the incidence of leptospirosis is one of the highest worldwide (5). Leptospirosis is poorly documented in other islands in the region, including Mauritius, Madagascar, and the Union of the Comoros (2,6–8). Whether the scant documentation indicates underdiagnosis or reflects local epidemiologic specificities is unknown. To improve knowledge of *Leptospira* infection in the region, we conducted a study in the Union of the Comoros to serologically assess the presence or absence of leptospirosis in humans. The Union of the Comoros consists of 3 islands: Grande-Comore, Mohéli, and Anjouan. Together with a fourth, southern island, Mayotte, these islands form the Comoros Archipelago.

For feasibility reasons, we used excess serum samples. Seventy-six samples were from healthy volunteers who gave informed consent; 318 clinical blood samples from patients had been obtained by private laboratories and by the surveillance laboratory of the National Malaria Control Programme (PNLP) during August 1–October 8, 2011. The Ministère de la Santé, de la Solidarité et de la Promotion du Genre of the Union of the Comoros, authorized the serologic investigation (authorization no. 1175/MSSPG/DNS).

We used the microscopic agglutination test (MAT) to test serum samples; the MAT was based on a panel of 15 *Leptospira* strains, enabling the screening of all recently reported serogroups for human and animal cases on neighboring Mayotte (2,4,9). A list of the tested strains follows, shown as *Genus species* Serogroup/Serovar (type strain): *L. borgpetersenii* Ballum/Castellon (Castellon 3), *L. borgpetersenii* Sejroe/Hardjobovis (Sponselee), *L. borgpetersenii* Sejroe/Sejroe (M 84),

L. borgpetersenii Tarassovi/Tarassovi (Perepelicin), *L. interrogans* Australis/Australis (Ballico), *L. interrogans* Autumnalis/Autumnalis (Akiyami A), *L. interrogans* Bataviae/Bataviae (Van Tienen), *L. interrogans* Canicola/Canicola (Hond Utrecht IV), *L. interrogans* Hebdomadis/Hebdomadis (Hebdomadis), *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae/Copenhageni (Wijnberg), *L. interrogans* Pyrogenes/Pyrogenes (Salinem), *L. kirschneri* Cynopteri/Cynopteri (3522C), *L. kirschneri* Grippotyphosa/Grippotyphosa (Moskva V), *L. kirschneri* Mini/Undetermined serovar (200803703) (9), *L. noguchii* Panama/Panama (CZ214K). Each serum sample was tested at dilutions ranging from 1:50 to 1:3,200 and considered positive when the MAT titer was ≥ 100 .

Our serologic findings showed evidence of *Leptospira* infection in humans on the 3 islands of the Union

of the Comoros (MAT titers 100–1,600, geometric mean titer [GMT] 194). The positivity rate was 10.3% (95% CI 4.8–15.9) for samples from Mohéli, 4.2% (95% CI 1.4–7.0) for samples from Grande-Comore, and 3.4% (95% CI 0.1–6.7) for samples from Anjouan; no significant difference was found between islands or by the age or sex of residents ($p > 0.05$, Fisher exact test). *Leptospira* infection was more prevalent and MAT titers were higher among serum samples from the patient group than the healthy donor group (20 positive samples/318 total vs. 3 positive samples/76 total; GMT 207 vs. GMT 126), but the difference was not significant ($p > 0.05$, Fisher exact test). In 78% of seropositive serum samples, antibodies reacted with serogroups Australis, Bataviae, Grippotyphosa, Panama, Pomona, Pyrogenes, Mini, and/or Sejroe.

MAT titers > 100 , which are suggestive of more specific antibodies to *Leptospira*, were observed for all serogroups except Australis and Sejroe. Pyrogenes serogroup was identified in one third of positive samples from Mohéli and was associated with the highest agglutination titers (Figure).

Our data indicate that *Leptospira* infections do occur in humans in the Union of the Comoros; this finding is consistent with those in studies reporting leptospirosis in persons returning from travel in the Union of the Comoros (2,8) and with the detection of pathogenic *Leptospira* spp. in bats sampled on these islands (10). The human leptospirosis-related serologic findings in Union of Comoros are most comparable to those from neighboring Mayotte, where leptospirosis is mainly caused by serogroups Mini/Sejroe/Hebdomadis complex, Pyrogenes,

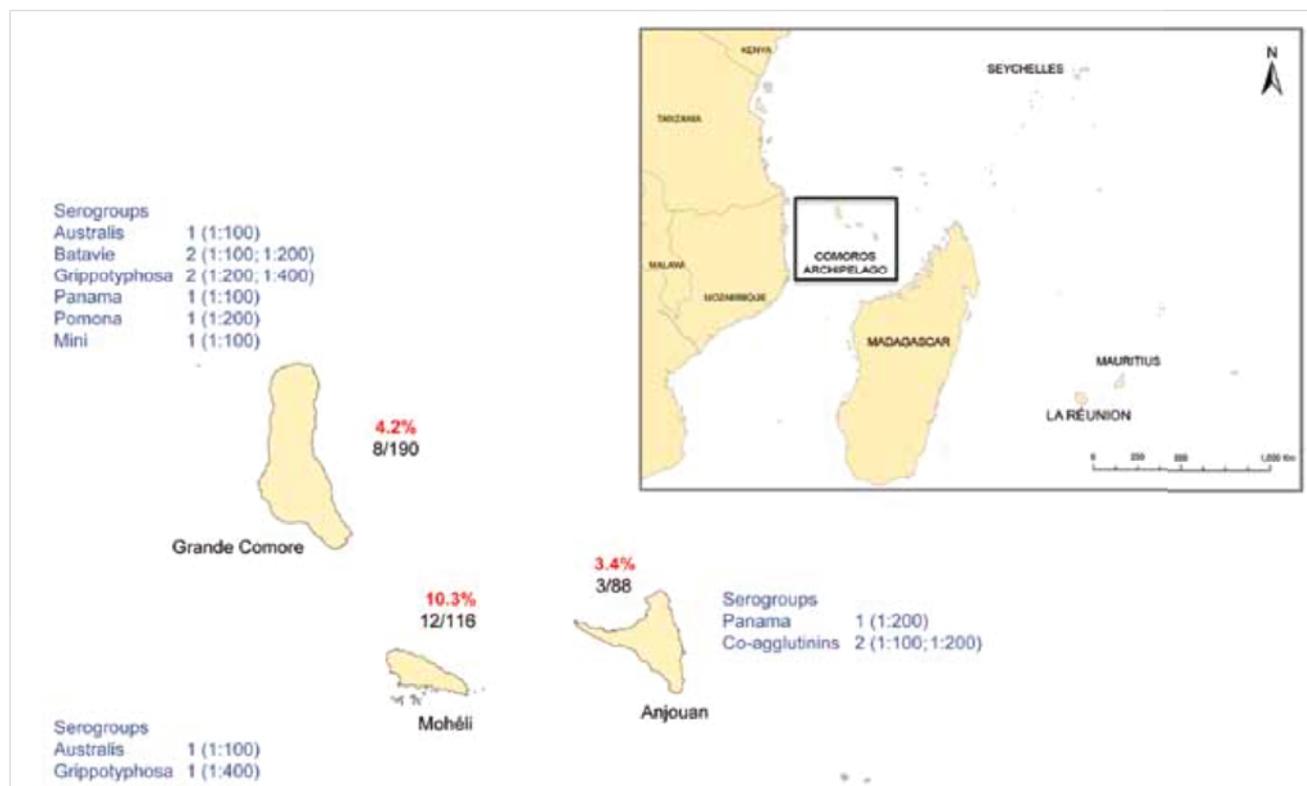


Figure. Microagglutination test results, showing serologic evidence of leptospirosis in humans, Union of the Comoros, 2011. The percentage of positive cases is shown for each island; the number below the percentage indicates the number of positive serum samples/total number tested. The serogroups identified on each island are shown; numbers represent the number of positive serum samples and, in parentheses, the number of corresponding titers. When agglutination was observed with > 1 serogroup, the serogroup with a titer difference ≥ 2 relative to other serogroups was considered to be the infecting serogroup; when no serogroup had a titer difference ≥ 2 relative to other serogroups, coagglutinins were considered to be present in the serum sample. Data for Mayotte Island are from previous studies (2,4).

Grippotyphosa, and Pomona and where serogroup Icterohaemorrhagiae is not detectable (2). These findings contrast with human leptospirosis findings from La Réunion and the Seychelles, where the Icterohaemorrhagiae serogroup is most common (3).

Our MAT-derived data cannot discriminate between recent and past *Leptospira* infections, nor can these data be used to determine the severity of the disease in the Union of the Comoros. Nonetheless, the data strongly support the presence of human leptospirosis on the 3 islands of the Union of the Comoros and emphasize the need for a proper diagnosis to ascertain the number of leptospirosis cases among the acute febrile illnesses in this country.

Acknowledgments

We thank Lisa Cavalerie and Marina Béral for their help with statistical analysis and with preparing the figure.

This work was supported by European Regional Development Funds ERDF-POCT; Réunion, *LeptOI* project.

**Yann Gomard,
Rahamatou Silai,
Géraldine Hoarau, Ketty Bon,
Florelle Gonneau,
Amina Yssouf, Alain Michault,
Koussay Dellagi,
and Pablo Tortosa**

Author affiliations: Centre de Recherche et de Veille sur les Maladies Emergentes dans l'Océan Indien (CRVOI), Ste. Clotilde, La Réunion, France (Y. Gomard, K. Dellagi, P. Tortosa); Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP), Moroni, Comoros (R. Silai, A. Yssouf); Centre Hospitalier Universitaire, St. Pierre, La Réunion (G. Hoarau, K. Bon, F. Gonneau, A. Michault); Université de La Réunion, Ste. Clotilde (Y. Gomard, P. Tortosa); Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, Marseille, France (A. Yssouf); and Institut de Recherche pour le Développement, Ste Clotilde (K. Dellagi)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2004.131207>

References

1. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:296–326. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
2. Bourhy P, Collet L, Lernout T, Zinini F, Hartskeerl RA, van der Linden H, et al. Human *Leptospira* isolates circulating in Mayotte (Indian Ocean) have unique serological and molecular features. *J Clin Microbiol.* 2012;50:307–11. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05931-11>
3. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect.* 2013;43:1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>
4. Bourhy P, Collet L, Clément S, Huerre M, Ave P, Giry C, et al. Isolation and characterization of new *Leptospira* genotypes from patients in Mayotte (Indian Ocean). *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e724. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000724>
5. Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis.* 2008;12:351–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2007.09.011>
6. Simon F, Morand G, Roche C, Coton T, Kraemer P, Fournier P-E, et al. Leptospirosis in a French traveler returning from Mauritius. *J Travel Med.* 2012;19:69–71. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1708-8305.2011.00573.x>
7. Rahelinirina S, Léon A, Harstkeerl RA, Sertour N, Ahmed A, Raharimanana C, et al. First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. *PLoS ONE.* 2010;5:e14111. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014111>
8. Socolovschi C, Angelakis E, Renvoisé A, Fournier P-E, Marié JL, Davoust B, et al. Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. *Int J Infect Dis.* 2011;15:e710–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2011.05.017>
9. Desvars A, Naze F, Vouret G, Cardinale E, Picardeau M, Michault A, et al. Similarities in *Leptospira* serogroup and species distribution in animals and humans in the Indian Ocean island of Mayotte. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87:134–40. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0102>
10. Lagadec E, Gomard Y, Guernier V, Dietrich M, Pascalis H, Temmam S, et al. Pathogenic *Leptospira* spp. in bats, Madagascar and Union of the Comoros. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1696–8. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1810.111898>

Address for correspondence: Pablo Tortosa, CRVOI, Plateforme de recherche CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Ste Clotilde, France; email: pablo.tortosa@univ-reunion.fr

Nosocomial Drug-Resistant Bacteremia in 2 Cohorts with Cryptococcal Meningitis, Africa

To the Editor: Cryptococcal meningitis is the second leading cause of AIDS-related deaths in Africa. The prolonged hospitalization necessary for optimal management may predispose severely immunocompromised persons to hospital-acquired infections. Limited data are available for sub-Saharan Africa regarding multidrug-resistant infections (1,2). We hypothesized that bacteremia was a major cause of death.

We reviewed bacteremia episodes in cryptococcal meningitis cohorts in Kampala, Uganda (n = 115 episodes) and Cape Town, South Africa (n = 72) during November 2010–April 2013. Data were obtained from the prospective cryptococcal optimal antiretroviral therapy timing trial (www.clinicaltrials.gov/NCT01075152), a randomized strategy trial assessing optimal antiretroviral therapy timing (n = 142) and another prospective observational cohort in Cape Town (n = 45).

We enrolled HIV-infected adults who had a first episode of cryptococcal meningitis diagnosed by cerebrospinal fluid culture or cryptococcal antigen testing. Standardized treatment was in accordance with World Health Organization (WHO) guidelines: amphotericin deoxycholate, 0.7–1.0 mg/kg/d for 14 days, and fluconazole, 800 mg/d, requiring a minimum 14-day hospitalization (3). Each person provided written informed consent. Institutional review board approval was obtained.

Blood cultures were obtained in accordance with physician discretion, typically with new onset fever (>38°C) unrelated to amphotericin. Two aerobic blood cultures were obtained from 1 peripheral site and not

3. Résultats majeurs

Notre étude met en évidence pour la première fois **une exposition des populations humaines des îles d'Union des Comores aux leptospires pathogènes** (Grande Comore, Mohéli et Anjouan). L'analyse révèle un **profil sérologique comparable à celui de Mayotte** avec notamment **l'absence du sérotype Icterohaemorrhagiae et la présence du sérotype Mini, jusque là limité dans la région à la seule île de Mayotte** (Figure 19). A l'échelle de la région, ces données confirment et renseignent les différences sérologiques de la maladie entre les îles. Nos résultats associés aux études précédentes indiquent deux situations sérologiques distinctes, un groupe d'îles constitué de La Réunion, de l'île Maurice et des Seychelles présentant une leptospirose à Icterohaemorrhagiae majoritaire et, d'autre part, l'archipel des Comores présentant un profil sérologique plus complexe avec une circulation de nombreux sérotypes et l'absence notable du sérotype Icterohaemorrhagiae.

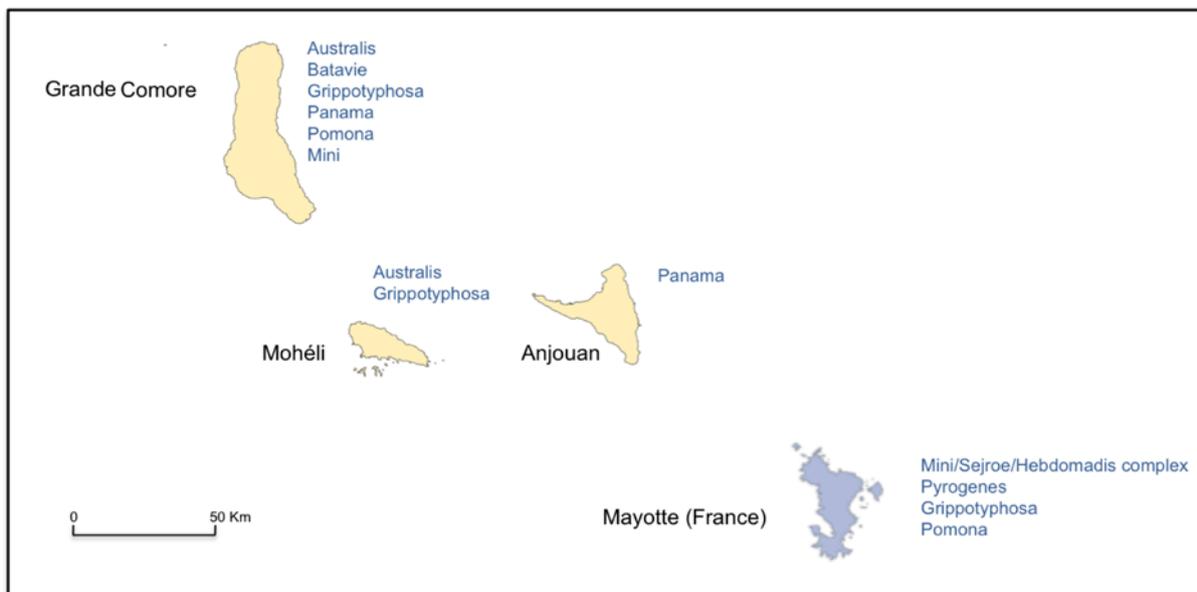


Figure 10. Sérogroupes des leptospires détectés dans les populations humaines des îles de l'archipel des Comores (d'après Bourhy *et al.* 2012 ; Gomard *et al.* 2014).

Chapitre II :
Les leptospires et les chiroptères
de la région du SOOI

1. Les leptospires des chauves-souris d'Union des Comores et de Madagascar

La compréhension de l'épidémiologie humaine de la leptospirose dans une région donnée requière une bonne connaissance des leptospires présents dans cette région ainsi que des réservoirs animaux qui les excrètent (Levett 2001). Idéalement, il faudrait pouvoir caractériser l'ensemble des leptospires hébergés par les différentes espèces animales de la faune locale mais une connaissance exhaustive est difficile à atteindre pour un pathogène présentant un spectre d'hôte extrêmement large. Le plus souvent, les études se limitent donc à l'investigation d'une fraction de la faune, choisie *a priori* en fonction de l'importance épidémiologique par rapport à la maladie humaine, en particulier en raison de la proximité d'une faune particulière avec les populations humaines, ou en raison de la diversité des pathogènes potentiellement associés à cette faune.

Dans le chapitre précédent nous avons mis en évidence une exposition des populations humaines de l'Union des Comores aux leptospires pathogènes (**chapitre I**). A notre connaissance, aucune donnée relative à la leptospirose animale n'est disponible sur ces îles. Comme pour la leptospirose humaine, l'absence de données concernant les réservoirs animaux résulte vraisemblablement d'une absence d'investigation. Le rôle joué par les rats noirs (*Rattus rattus*) dans la leptospirose humaine à Mayotte (Desvars *et al.* 2012) appelle une investigation approfondie de cette espèce de mammifère introduite en Union des Comores. Toutefois, nous nous sommes ici intéressés à un ordre de mammifère pour lequel peu d'informations sont encore disponibles aujourd'hui quant à son rôle potentiel de réservoir de leptospires : les chauves-souris (Ordre des Chiroptera). Cet ordre, ancien et reconnu comme réservoir pour de nombreux pathogènes humains (Calisher *et al.* 2006 ; Wong *et al.* 2007 ; Chomel *et al.* 2015), pourrait non seulement héberger des leptospires pathogènes mais surtout une diversité importante si l'on s'en tient à la définition de compartiment réservoir proposée par Felix Drexler (Drexler *et al.* 2012). A Mayotte, les sérogroupes Pyrogenes et Grippytyphosa ont été détectés dans la seule espèce de chauve-souris frugivore de l'île: *Pteropus seychellensis* (Pteropodidae) (Desvars *et al.* 2012). A Madagascar, les travaux de Kolochine-Erber & Brygoo (1956) et de Lhuillier (1978) sur *Pteropus rufus* n'ont pas mis en évidence d'infection à *Leptospira* chez cette autre espèce frugivore. Des études montrent la présence de leptospires chez les chauves-souris, notamment en Amérique du Sud (Matthias *et al.* 2005), en Australie (Cox *et al.* 2005) ou encore au Danemark (Fennestad & Borg-Petersen 1972). Dans cette partie des travaux, **nous avons cherché dans un premier temps à mettre**

en évidence des leptospires pathogènes dans différentes espèces de chauves-souris (frugivores et insectivores) régionales puis à caractériser la diversité des leptospires détectées.

Nous avons utilisé des approches moléculaires pour détecter (RT-PCR) et identifier (phylogénie moléculaire sur l'ARNr 16S) les leptospires pathogènes dans trois espèces de chauves-souris (deux espèces insectivores et une espèce frugivore) d'Union des Comores. Nous avons également intégré à l'étude neuf espèces insectivores échantillonnées à Madagascar. Les résultats de cette étude ont été publiés dans la revue *Emerging Infectious Diseases* - CDC en 2012.

2. Article 2

Pathogenic *Leptospira* spp. in bats, Madagascar and Union of the Comoros

Lagadec E*, Gomard Y*, Guernier V, Dietrich M, Pascalis H, Temmam S, Ramasindrazana B, Goodman S M, Tortosa P and Dellagi K. (2012). *Emerging Infectious Diseases*, 18, 1696–1698.

(*) : *Co-premiers auteurs*

References

1. Jones MS, Lukashov VV, Ganac RD, Schnurr DP. Discovery of a novel human picornavirus in a stool sample from a pediatric patient presenting with fever of unknown origin. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2144–50. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00174-07>
2. Abed Y, Boivin G. New Saffold cardiaviruses in 3 children, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:834–6. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1405.071675>
3. Drexler JF, Luna LK, Stöcker A, Almeida PS, Ribeiro TC, Petersen N, et al. Circulation of 3 lineages of a novel Saffold cardiavirus in humans. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1398–405. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1409.080570>
4. Blinkova O, Kapoor A, Victoria J, Jones M, Wolfe N, Naem A, et al. Cardiaviruses are genetically diverse and cause common enteric infections in South Asian children. *J Virol*. 2009;83:4631–41. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02085-08>
5. Zoll J, Erkens Hulshof S, Lanke K, Verduyn Lunel F, Melchers WJ, Schoondermark-van de Ven E, et al. Saffold virus, a human Theiler's-like cardiavirus, is ubiquitous and causes infection early in life. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000416. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000416>
6. Nielsen ACY, Böttiger B, Banner J, Hoffmann T, Nielsen LP. Serious invasive Saffold virus infections in children, 2009. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:7–12. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1801.110725>
7. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:1792–7. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>
8. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*. 2010;59:307–21. <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
9. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*. 2008;25:1253–6. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msn083>
10. Delpont W, Poon AF, Frost SD, Kosakovsky Pond SL. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics*. 2010;26:2455–7. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq429>

Address for correspondence: Jie Cui, Department of Biology, Millennium Science Complex, Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA; email: jiecui@yahoo.com

Pathogenic *Leptospira* spp. in Bats, Madagascar and Union of the Comoros

To the Editor: Leptospirosis is a zoonosis of global distribution; incidence rates are particularly high in tropical areas (1). Leptospirosis is a major public health problem on islands in the southwestern Indian Ocean, particularly La Réunion, Mayotte, and the Seychelles (where incidence rates are among the highest in the world) (1). In contrast, no human case has been reported on the nearby islands of Madagascar and Union of the Comoros. However, the recent demonstration of pathogenic *Leptospira* spp. in small mammals introduced to Madagascar suggests possible transmission from free-living animals to humans (2).

In addition to the fact that incidence rates vary among humans, clinical bacterial isolates from different islands belong to different serogroups and serovars and show diverse molecular features (3,4). This diversity might be correlated with that of the reservoir hosts; the islands in the southwestern Indian Ocean are a hot spot of biodiversity with extraordinary levels of vertebrate endemism. Most studies investigating wild-animal reservoirs of *Leptospira* spp. on the islands in the southwestern Indian Ocean have focused on small mammals that had been introduced to the islands (2,5), although bats infected with pathogenic *Leptospira* spp. have been identified in other regions (6). Whether bats are a reservoir of *Leptospira* spp. on these islands remains unknown. Therefore, we looked for this bacterium in bats from Madagascar and Union of the Comoros and characterized associated genetic diversity.

As part of an ongoing program aimed at identifying viral and

bacterial infectious agents in island wild fauna, 129 insectivorous and frugivorous bats were tested for *Leptospira* spp. The bats belonged to 12 species: 9 from Madagascar (*Mormopterus jugularis*, *Otomops madagascariensis*, *Triaenops furculus*, *T. menamena*, *Miniopterus gleni*, *Miniopterus griffithsi*, *Miniopterus mahafaliensis*, *Myotis goudoti*, *Hypsugo anchietae*) and 3 from Union of the Comoros (*Rousettus obliviosus*, *Chaerephon pusillus*, *Miniopterus griveaudi*). Bats were captured in mist nets or harp traps at 8 sites in Madagascar and 6 sites in Union of the Comoros. Organs were collected in the field and immediately stored in liquid nitrogen.

Total nucleic acids were extracted from a pool of kidney, spleen, and lung tissue by using the Biorobot EZ1 and EZ1 Virus Mini Kit version 2.0 (QIAGEN, Les Ulis, France). Reverse transcription was then performed with GoScript reverse transcriptase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) to obtain cDNA. We screened pathogenic *Leptospira* spp. with a probe-specific real-time PCR (7). The 25 positive samples were subsequently subjected to a PCR procedure that amplified fragments from 682 to 1,293 bp of the 16S rRNA gene (depending on the amplification success) by using published primers (8–10). Resulting PCR products from 7 samples were sequenced and compared with available sequences in GenBank by using phylogenetic construction with PhyML 3.0.

Of the 12 bat species tested, 11 were positive for *Leptospira* spp. (the only *H. anchietae* bat tested was negative). Among 52 bats from Madagascar, 18 (34.6%) were infected; detection rates were often high, e.g., 8 (80%) of 10 *T. menamena* bats. In contrast, among 77 bats from Union of the Comoros, only 9 (11.7%) were infected. *Leptospira* spp. seem to be ubiquitous in the study areas; infected bats were found at 7 of 8

sites in Madagascar and 3 of 6 sites in the Union of the Comoros. Of the 7 *Leptospira* spp. sequences obtained from bats in this study, 3 were closely related to *L. borgpetersenii*, 1 grouped with *L. interrogans*, and 3 were not associated with any described species (Figure). *L. interrogans* and *L. borgpetersenii* were identified from *R. obliviosus* bats from the same cave in the Union of the Comoros, and the *L. borgpetersenii* sequence was closely related to that identified from the *O. madagascariensis* bats,

which are endemic to Madagascar. Potentially pathogenic *Leptospira* spp. were found in bats of a wide variety of species in Madagascar and Union of the Comoros, at most study sites, and at levels notably higher than those reported from similar studies in other regions (6). Some of the bats that were *Leptospira* spp.–positive by PCR, particularly the genera *Mormopterus* and *Chaerephon*, often occupy synanthropic day roost sites. For example, we sampled 1 positive colony of *C. pusillus* bats in a school

attic (Pomoni, Anjouan, Union of the Comoros), and bat scats were visible on the floor within the classroom.

Bats from Madagascar and Union of the Comoros harbor a notable diversity of *Leptospira* spp.; this finding is in accordance with the diversity found in a comparable investigation of bats in the Amazon region (6). Although leptospirosis in humans is suspected only on the islands associated with this study (10), incidence among humans in Mayotte, part of the Union of the Comoros archipelago, has been shown to be high and mainly associated with *L. borgpetersenii* (3). The use of more polymorphic markers combined with the sequencing of clinical isolates should provide better characterization of *Leptospira* spp. diversity and the potential role of bats in human leptospirosis.

Permits for this research were kindly issued by Direction du Système des Aires Protégées, Direction Générale de l'Environnement et des Forêts (Madagascar), and the Centre National de Documentation et de Recherche Scientifique (Union of the Comoros). This work was supported by Fonds Européen de Développement Régional Programme Opérationnel de Coopération Territoriale Réunion, Pathogènes Associés à la Faune Sauvage Océan Indien #31189. M.D. is supported by the European Community FP7 Capacity RegPot Run-Emerge Program.

**Erwan Lagadec,¹
Yann Gomard,¹
Vanina Guernier,
Muriel Dietrich,
Hervé Pascalis, Sarah Temmam,
Beza Ramasindrazana,
Steven M. Goodman,
Pablo Tortosa,
and Koussay Dellagi**

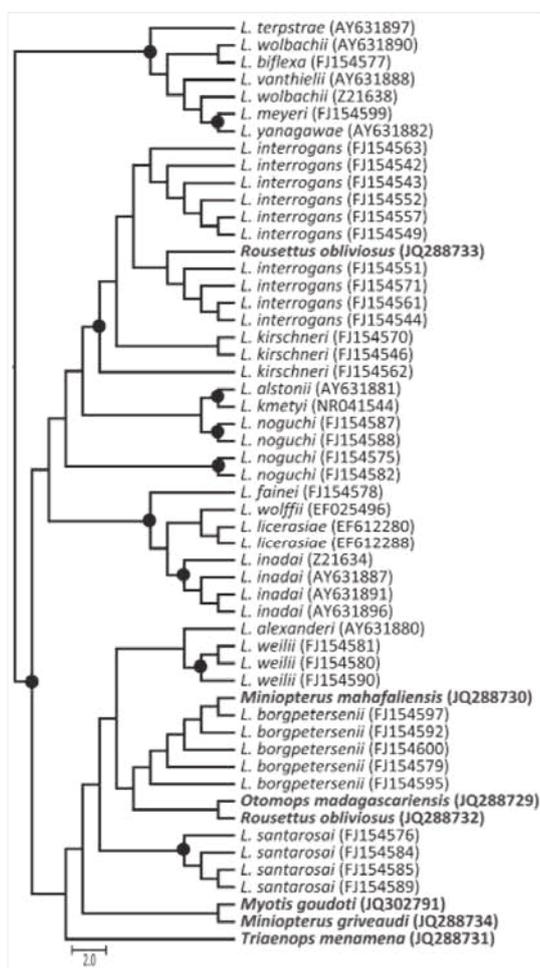


Figure. Maximum-likelihood phylogenetic tree of *Leptospira* spp. 16S rDNA in bats from Madagascar and the Union of the Comoros. The dendrogram was constructed with a fragment of 641 bp, with the TIMeF+I+G substitution model, and with 1,000 replications. Only bootstrap supports >70% are shown (circles). The precise geographic information of the sampled bats can be accessed through the GenBank accession numbers indicated in parentheses at branch tips. Host bat species for the sequences generated in this study are shown in boldface. Scale bar indicates number of nucleotide substitutions per site.

¹These authors contributed equally to this article.

Author affiliations: Centre de Recherche et de Veille sur les Maladies Émergentes dans l'Océan Indien, Ste. Clotilde, La Réunion, France (E. Lagadec, Y. Gomard, V. Guernier, M. Dietrich, H. Pascalis, S. Temmam, P. Tortosa, K. Dellagi); Université de Lyon, Villeurbanne, France (E. Lagadec, S. Temmam); Université de La Réunion, St. Clotilde (M. Dietrich, P. Tortosa); Université d'Antananarivo, Antananarivo, Madagascar (B. Ramasindrazana); Association Vahatra, Antananarivo (B. Ramasindrazana, S.M. Goodman); Field Museum of Natural History, Chicago, Illinois, USA (S.M. Goodman); and Institut de Recherche pour le Développement, Ste. Clotilde (Y. Gomard, V. Guernier, H. Pascalis, S. Temmam, K. Dellagi)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1810.111898>

References

- Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis.* 2008;12:351–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2007.09.011>
- Rahelinirina S, Leon A, Harstskeerl RA, Sertour N, Ahmed A, Raharimanana C, et al. First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. *PLoS One.* 2010;5:e14111. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014111>
- Bourhy P, Collet L, Clément S, Huerre M, Ave P, Giry C, et al. Isolation and characterization of new *Leptospira* genotypes from patients in Mayotte (Indian Ocean). *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e724. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000724>
- Yersin C, Bovet P, Mérien F, Wong T, Panowsky J, Perolat P. Human leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): a population-based study. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:933–40.
- Desvars A, Cardinale E, Michault A. Animal leptospirosis in small tropical areas. *Epidemiol Infect.* 2011;139:167–88. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268810002074>
- Matthias MA, Diaz MM, Campos KJ, Calderon M, Willig MR, Pacheco V, et al. Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by Bayesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:964–74.
- Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, et al. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis.* 2002;2:13. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-2-13>
- Fenner JS, Anjum MF, Randall LP, Pritchard GC, Wu G, Errington J, et al. Analysis of 16S rDNA sequences from pathogenic *Leptospira* serovars and use of single nucleotide polymorphisms for rapid speciation by D-HPLC. *Res Vet Sci.* 2010;89:48–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.12.014>
- Lourdault K, Aviat F, Picardeau M. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *J Med Microbiol.* 2009;58:648–55. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.008169-0>
- Silverie R, Monnier M, Lataste-Dorolle C. Recent survey of leptospirosis on Madagascar. Contribution to the study of human, bovine and porcine leptospirosis in the southern region [in French]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1968;61:346–59.

Address for correspondence: Pablo Tortosa, CRVOI, Plateforme de Recherche CYROI, 2 Rue Maxime Rivière, 97490 St. Clotilde, France; email: pablo.tortosa@univ-reunion.fr

West Nile Virus Meningoencephalitis Imported into Germany

To the Editor: West Nile virus (WNV) is a single-stranded RNA virus in the family *Flaviviridae* that is transmitted to humans by mosquitoes. Approximately 80% of WNV infections in humans are asymptomatic, whereas ≈20% of infected persons experience fever, often accompanied by a rash. Less than 1% of infections are manifested as neuroinvasive disease, such as meningoencephalitis, polyradiculoneuritis, and polio-like flaccid paralysis (1). WNV is

endemic in Africa, southern Asia, and northern Australia, and only sporadic cases or small epidemics are seen in Europe (2). In 1999, WNV emerged in North America. By 2010, ≈1.8 million persons had become infected, with 12,852 reported cases of meningoencephalitis and 1,308 deaths (2). In Europe, the last notable outbreak of WNV infection occurred in Greece in 2010; 197 persons were infected, and 33 died (3). The Czech Republic, Denmark, France, and the Netherlands reported laboratory-confirmed WNV infections in travelers returning from North America (1).

We report a case of WNV meningoencephalitis in a 28-year-old German woman, who sought treatment the emergency department of a hospital in Potsdam, Germany, on September 7, 2011. She had a 3-day history of fever of up to 40°C and mental confusion. Six days before admission, she had returned from a 2-week holiday trip to Ottawa, Ontario, Canada. She had spent most of her time in the city of Ottawa.

The patient's medical history was unremarkable. She was in a reduced general condition because of a severe encephalitic syndrome characterized by somnolence, meningism, fever, and mental confusion. Laboratory investigations revealed leukocytosis with 15,000 leukocytes/μL (reference range 4,400–11,300 leukocytes/μL) and elevated C-reactive protein of 14.8 mg/L (reference <3 mg/L). Cerebrospinal fluid (CSF) analysis on the day of admission showed pleocytosis, 430 cells/μL (72% granulocytes, 27% lymphocytes, and 1% monocytes); elevated levels for total protein, 1,023 mg/L (reference range 150–450 mg/L); an albumin level of 637 mg/L (normal range 0–350 mg/L); and a moderately elevated level of the albumin quotient of 20 (reference range <6.5). The CSF/serum diagrams demonstrated a moderate disturbance of the blood–CSF barrier and a substantial intrathecal IgM synthesis of 27.6%

3. Résultats majeurs

Cette étude met en évidence des **leptospires dans la faune sauvage des îles de l'Union des Comores, et plus largement chez les chiroptères de la région. Plusieurs espèces de chauves-souris de l'Union des Comores et de Madagascar sont infectées par des leptospires pathogènes.** Sur la base de séquences au locus ARNr 16S, **nous montrons une diversité importante de leptospires pathogènes comprenant des lignées connues (*Leptospira interrogans* et *L. borgpetersenii*) et des lignées génétiquement distantes des espèces pathogènes connues à ce jour et constituant probablement des taxons originaux.**

Chapitre III :
Associations hôtes-leptospires
et évolution
des leptospires au sein de leurs hôtes

1. Le cas des leptospires pathogènes des chauves-souris de Madagascar

Les régions tropicales sont caractérisées par une diversité spécifique importante qui diminue à mesure que la latitude augmente. Ce patron, plus connu sous le terme de *loi de Rapoport*, a été peu investigué au niveau des micro organismes même si quelques études semblent indiquer que cette loi s'applique aux microbes (Guernier *et al.* 2004). Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence une diversité importante de leptospires au sein des chauves-souris de l'Union des Comores et de Madagascar. Cette dernière étude correspondait à une investigation préliminaire et était basée sur un nombre limité d'espèces (n=12) et sur des séquences au locus 16S bactérien (*rrs2*) faiblement polymorphe et donc peu discriminant (Ahmed *et al.* 2006). Les leptospires pathogènes sont connus pour (i) être extrêmement diversifiés et (ii) infecter une large gamme d'hôtes ; en revanche très peu d'études ont exploré leur spécificité d'hôte. Une étude réalisée à Mayotte a montré que la seule espèce *Rattus rattus* pouvait être infectée par quatre espèces distinctes de leptospires (Desvars *et al.* 2012). Des études menées sur d'autres espèces réservoirs suggèrent une spécificité d'hôte plus stringente même si le nombre d'espèces explorées et les méthodes (sérologique/moléculaire) ne permettent pas de dégager de règle concernant la spécificité de ces bactéries pour leurs hôtes. **Nous avons utilisé le modèle des chiroptères malgaches pour déterminer si la diversité des leptospires associés est structurée par des variables géographiques ou au contraire par une spécificité d'hôte et donc par l'occurrence des espèces hôtes sur un territoire.**

Le modèle chiroptères malgaches/leptospires pathogènes a été choisi pour différentes raisons. La grande île héberge une diversité de chiroptères remarquable constituée de neuf familles de chiroptères comprenant pas moins de 45 espèces distinctes dont 80% sont endémiques (Goodman 2011 ; Goodman & Ramasindrazana 2013 ; Foley *et al.* 2015). Par ailleurs, la distribution et l'écologie de ces chiroptères permettent d'investiguer les déterminants de la structuration des pathogènes associés : certaines espèces sont largement distribuées sur l'île alors que d'autres ont des aires de distribution très limitées (Goodman & Ramasindrazana 2013). Ces chiroptères occupent des niches écologiques particulières telles que les grottes, les arbres et/ou les constructions humaines (espèces synanthropiques), voire différentes niches pour une même espèce (exemple : les espèces de Molossidae). Enfin, au

sein d'un même gîte, on peut retrouver plusieurs espèces distinctes vivant en sympatrie⁷ voire en syntonie⁸, à savoir en contact physique au sein d'une même colonie. Ainsi, plusieurs du genre *Miniopterus* de la famille des *Miniopteridae* sont régulièrement retrouvées en syntonie avec *Myotis goudoti*, espèce appartenant à une famille différente : *Vespertilionidae* (Goodman 2011 ; Goodman & Ramasindrazana 2013).

Au delà de ces considérations écologiques, il est à noter que les hôtes et les parasites investigués ici appartiennent à des ordres anciens et permettent donc d'explorer les histoires évolutives des deux partenaires sur des pas de temps importants. L'ordre des chiroptères remonte à plus de 50 millions d'années (Teeling *et al.* 2005) et constitue après les rongeurs, le deuxième groupe de mammifère le plus diversifié avec plus de 1 100 espèces reconnues (Simmons 2005). La biogéographie de nombreuses espèces chiroptères malgaches a été étudiée et a révélée une origine africaine pour la majorité des espèces (Goodman & Benstead 2003). Des études complètes ont montré, par exemple, que les nombreuses espèces du genre *Miniopterus* résultaient de deux à trois événements de colonisation remontant à 4,5 millions d'années suivis par de une radiation locale (Christidis *et al.* 2014). Les leptospires pathogènes sont elles mêmes très diversifiées et appartiennent à l'ordre des spirochètes qui sont issues d'une évolution très ancienne (Saier 2000 ; Charon & Goldstein 2002).

En se basant sur un important échantillonnage de chauves-souris représentant 31 espèces (18 genres et 7 familles) issues de différents sites et régions bioclimatiques de Madagascar, les objectifs de la présente étude étaient (i) d'évaluer la diversité génétique des leptospires hébergés par les chiroptères malgaches; (ii) d'identifier des déterminants de structuration de ces communautés des leptospires et enfin (iii) de comprendre quels sont les événements évolutifs (co-spéciation⁹, host-switch¹⁰, duplication¹¹, lineage sorting¹²) ayant conduit à cette diversité (Figure 21). Les résultats de cette étude ont été soumis pour publication à la revue *FEMS Microbiology Ecology*, en Septembre 2015, manuscrit actuellement en révision.

⁷ Espèces occupant un même habitat.

⁸ Espèces sympatriques en contact physique.

⁹ Spéciation du parasite durant la spéciation de l'hôte.

¹⁰ Changement d'espèce hôte et spéciation du parasite sur la nouvelle espèce hôte.

¹¹ Spéciation du parasite au sein de l'hôte sans spéciation de l'hôte (spéciation intra hôte).

¹² Après la spéciation de l'hôte, le parasite ne va se maintenir que sur une des nouvelles espèces.

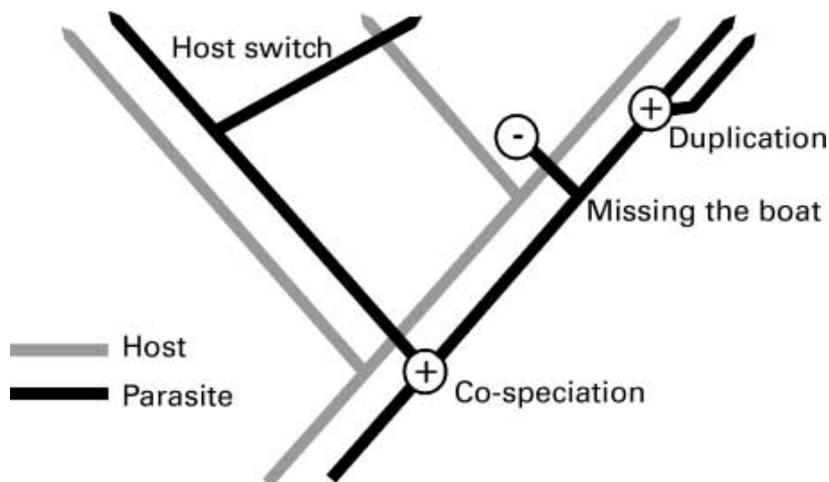


Figure 11. Evènements évolutifs dans les associations hôtes-parasites : Co-spéciation, host-switch, duplication et lineage sorting (missing the boat) (d'après Widmann (2012) adapté de Paterson & Gray (1997) et de Taraschewski (2006)).

2. Article 3

Malagasy bats shelter a considerable diversity of pathogenic *Leptospira* displaying a strong host-specificity pattern

Gomard Y, Dietrich M, Wieseke N, Ramasindrazana B, Lagadec E, Goodman S M, Dellagi K and Tortosa P.

Lors de la rédaction de ce manuscrit, cet article était en révision dans la revue FEMS Microbiology Ecology et a été accepté par la suite dans cette même revue. Ci – dessous les nouvelles références de l'article publié:

Gomard Y, Dietrich M, Wieseke N *et al.* Malagasy bats shelter a considerable genetic diversity of pathogenic *Leptospira* suggesting notable host-specificity patterns.

***FEMS Microbiol Ecol* 2016: fiw037.**

Pour des raisons de résolutions d'images, nous avons également inséré les versions d'origines des figures soumises.

<http://mc.manuscriptcentral.com/fems>

**Malagasy bats shelter a considerable diversity of pathogenic
Leptospira displaying a strong host-specificity pattern**

Journal:	<i>FEMS Microbiology Ecology</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Research article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Gomard, Yann; CRVOI, Centre de Recherche et de Veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien; UMR PIMIT - Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical INSERM U1187, CNRS 9192, IRD 249, Université de La Réunion</p> <p>Dietrich, Muriel; CRVOI, Centre de Recherche et de Veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien; University of Pretoria, Department of Microbiology and Plant Pathology, Faculty of Natural and Agricultural Sciences</p> <p>Wieseke, Nicolas; University of Leipzig, Parallel Computing and Complex Systems Group, Faculty of Mathematics and Computer Science</p> <p>Ramasindrazana, Beza; CRVOI, Centre de Recherche et de Veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien; UMR PIMIT - Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical INSERM U1187, CNRS 9192, IRD 249, Université de La Réunion; Association Vahatra, Scientific Counselor</p> <p>Lagadec, Erwan; CRVOI, Centre de Recherche et de Veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien; UMR PIMIT - Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical INSERM U1187, CNRS 9192, IRD 249, Université de La Réunion</p> <p>Goodman, Steven; Field Museum of Natural History, Science and Education; Association Vahatra, Scientific Counselor</p> <p>Dellagi, Koussay; CRVOI, Centre de Recherche et de Veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien; UMR PIMIT - Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical INSERM U1187, CNRS 9192, IRD 249, Université de La Réunion; IRD La Réunion, Institut de Recherche pour le Développement</p> <p>Tortosa, Pablo; CRVOI, Centre de Recherche et de Veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien; UMR PIMIT - Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical INSERM U1187, CNRS 9192, IRD 249, Université de La Réunion</p>
Keywords:	Leptospira, Chiroptera, Madagascar, host-parasite association, host-specificity, co-phylogeny

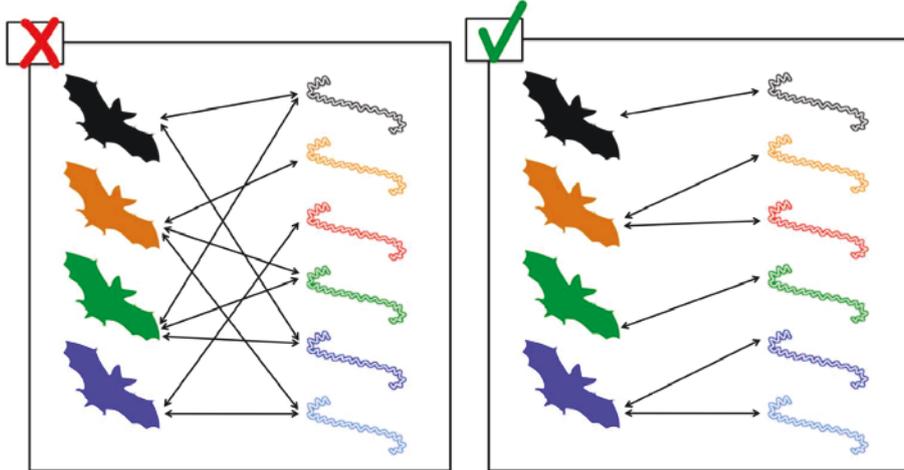
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Bats - *Leptospira* specificity



194x117mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4 **1 Malagasy bats shelter a considerable diversity of pathogenic *Leptospira***
5
6
7 **2 displaying a strong host-specificity pattern.**
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

4 Yann Gomard^{1,2}, Muriel Dietrich^{1,3}, Nicolas Wieseke⁴, Beza Ramasindrazana^{1,2,5}, Erwan
5 Lagadec^{1,2}, Steven M. Goodman^{5,6}, Koussay Dellagi^{1,2,7}, and Pablo Tortosa^{1,2,*}

6 ¹Centre de Recherche et de Veille sur les maladies émergentes dans l'Océan Indien (CRVOI), 97490 Sainte Clotilde, La
7 Réunion, France, ²Université de La Réunion, UMR PIMIT "Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical", INSERM U
8 1187, CNRS 9192, IRD 249. Plateforme de Recherche CYROI, 97490 Sainte Clotilde, Saint-Denis, La Réunion, France,
9 ³Department of Microbiology and Plant Pathology, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria,
10 Pretoria 0002, South Africa, ⁴Parallel Computing and Complex Systems Group, Faculty of Mathematics and Computer
11 Science, University of Leipzig, Augustusplatz 10, D-04109 Leipzig, Germany, ⁵Association Vahatra, BP 3972, Antananarivo
12 101, Madagascar, ⁶Field Museum of Natural History, 1400 South Lake Shore Drive, Chicago, IL 60605-2496, United States
13 of America, ⁷Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 97490 Sainte Clotilde, La Réunion, France.

14
15 ***Corresponding author:** CRVOI, UMR PIMIT, Université de La Réunion, INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249,
16 Plateforme de Recherche CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Ste Clotilde, La Réunion, France. Tel: +262 262 938 820
17 Fax: +262 262 938 801. E-mail: pablo.tortosa@univ-reunion.fr

18
19 **Running title:** *Leptospira* host-specificity in Malagasy Chiroptera

20 **One sentence summary:** This study highlights the high diversity of *Leptospira* in Madagascar bats and demonstrates that
21 this diversity is structured by a strong host-specificity pattern.

22 **ABSTRACT**

23 Pathogenic *Leptospira* are the causative agents of leptospirosis, a disease of global concern
24 with major impact in tropical regions. Despite the importance of this zoonosis for human
25 health, the evolutionary and ecological drivers shaping bacterial communities in vertebrate
26 host reservoirs remain poorly investigated. Here, we describe *Leptospira* communities hosted
27 by Malagasy bats, composed of mostly endemic species, in order to characterize host-
28 pathogen associations and investigate their evolutionary histories. We screened 947 individual
29 bats (representing 31 species, 18 genera and seven families) for *Leptospira* infection and
30 subsequently genotyped positive samples using three different bacterial *loci*. Molecular
31 identification showed that these *Leptospira* are notably diverse and include several distinct
32 lineages mostly belonging to two dominant species: *L. borgpetersenii* and *L. kirschneri*. The
33 exploration of the most probable host-pathogen evolutionary scenarios suggests that bacterial
34 diversity results from a combination of events related to the ecology and the evolutionary
35 history of their hosts. Importantly, the remarkable host-specificity highlighted herein together
36 with a lack of geographical structuration of bacterial diversity indicate that the *Leptospira*
37 community at a given site depends on the co-occurring bat species assemblage. The
38 implications of such tight host-specificity on the epidemiology of leptospirosis are discussed.

39

40 **Keywords:** *Leptospira*, Chiroptera, Madagascar, host-parasite association, host-specificity,
41 co-phylogeny.

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

45 INTRODUCTION

46 Bats (Order Chiroptera) represent the second most diversified group of mammals on Earth,
47 with over 1,100 recognized species (Simmons 2005). These flying mammals play important
48 roles in ecological processes (Kunz et al. 2011) and are known reservoirs of numerous
49 pathogens, including zoonotic viruses that in some cases have been comprehensively studied
50 mainly due to their medical importance (Calisher et al. 2006; Wong et al. 2007; Chomel et al.
51 2015). However, the ecological factors and evolutionary processes shaping this microbial
52 diversity remain poorly understood.

53 Among bat infecting agents, bacteria have been less explored as compared to viruses,
54 but different investigations have reported bats as carriers of pathogenic *Leptospira* (Emanuel,
55 Mackerras and Smith 1964; Fennestad and Borg-Petersen 1972; Bunnell et al. 2000; Smythe
56 et al. 2002a; Cox, Smythe and Leung 2005; Matthias et al. 2005; Zetun et al. 2009; Franco
57 Bessa et al. 2010; Tulsiani et al. 2011; Desvars et al. 2012; Lagadec et al. 2012; Mgone et al.
58 2014; Ogawa et al. 2015), the etiological agent of leptospirosis, a prototypical environmental
59 zoonosis with a nearly global distribution. The bacterial cycle is maintained in nature by
60 infected mammals, which excrete living *Leptospira* in their urine, contaminating the
61 environment where the bacteria remain viable for several months. Humans are accidentally
62 infected, either during outdoor activities through contact with contaminated water or mud, or
63 via direct exchange with infected animal secretions (Levett 2001; Bharti et al. 2003; Adler &
64 de la Peña Moctezuma 2010).

65 *Leptospira* are typically classified into serovars and serogroups according to their
66 antigenic determinants (Ahmed et al. 2012). More recently, genetic classifications have been
67 developed allowing the identification of *Leptospira* species, including pathogenic species
68 such as *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri* and *L. mayottensis* (Ahmed et al.

1
2
3
4 69 2006; Lehmann et al. 2013; Bourhy et al. 2014).

5
6 70 Studies have revealed a high diversity of *Leptospira* in bats, some of which are highly
7
8
9 71 divergent from known lineages (Matthias et al. 2005; Lagadec et al. 2012; Dietrich et al.
10
11 72 2014). Using a multilocus sequence analysis, Dietrich et al. (2014) showed tight host-parasite
12
13 73 specificity between *Leptospira* spp. and endemic Malagasy small terrestrial mammals
14
15 74 (rodents [Nesomyinae] and tenrecs [Tenrecidae]) and some Malagasy bats species, suggesting
16
17 75 that long-term co-evolution has shaped *Leptospira* diversity in these animals. However, Lei
18
19 76 and Olival (2014) recently proposed that *Leptospira* diversity in bats is structured by
20
21 77 geography rather than by the phylogenetic relationships of their hosts. Given that bats evolved
22
23 78 relatively deep in geological time (Agnarsson et al. 2011) and are a highly diversified order
24
25 79 (Simmons 2005) occupying different ecological niches, they represent an outstanding
26
27 80 biological model to investigate the biotic and abiotic drivers shaping host–parasite
28
29 81 associations.
30
31

32
33 82 Considered as one of the five most important hot spots of macro-organism biodiversity
34
35 83 in the world (Myers et al. 2000), Madagascar shelters over 46 bat species of which nearly
36
37 84 80% are endemic (Goodman and Ramasindrazana 2013; Goodman et al. 2015a;b). Of interest
38
39 85 in the present work, Malagasy bats occupy different types of day roosts, including
40
41 86 synanthropic structures and natural sites (such as caves), often composed of distinct
42
43 87 taxonomic assemblages with certain species in physical contact (Goodman 2011). Moreover,
44
45 88 some of these taxa have broad distributions on the island, while others are geographically
46
47 89 limited (Goodman and Ramasindrazana 2013). These different aspects allow testing
48
49 90 for geographical vs. taxonomical structure of bacterial diversity within these organisms.
50
51

52
53 91 In the present work, we screened 947 bats representing 31 species sampled along a
54
55 92 broad north-south transect encompassing distinct bioclimatic zones of the island, to analyse
56
57
58
59
60

1
2
3
4 93 the effect of host specificity and geography on the structure of *Leptospira* diversity. For this,
5
6 94 samples were screened through RT-PCR for *Leptospira* infection and positive samples were
7
8 95 further genotyped using three housekeeping genes as markers. The role of host species
9
10 96 assemblages on the composition of *Leptospira* was investigated at the roost site scale and the
11
12 97 geographical patterns of bacteria distribution was tested across sampling sites. Finally,
13
14 98 cophylogenetic signal and evolutionary scenarios that may account for the contemporary bat-
15
16 99 *Leptospira* associations were evaluated using both distance- and event-based approaches.
17
18
19
20

100

101 MATERIALS AND METHODS

102 Study design and sampling

103 Bats were sampled on Madagascar from February 2012 to March 2013 in the context of a
104 multi-level research program examining the taxonomy and biogeography of the island's bat
105 fauna (e.g. Goodman and Ramasindrazana 2013; ; Goodman et al. 2015a;b; Christidis et al.
106 2014) with the description of their associated micro- and ecto-parasites (Tortosa et al. 2013;
107 Duron et al. 2014; Wilkinson et al. 2014). Bats were trapped using mist nets, harp traps and
108 butterfly nets in different natural or synanthropic habitats, encompassing four of the five
109 recognized bioclimatic zones of the island (Cornet 1974). Specimens were captured,
110 manipulated and euthanized following guidelines accepted by the scientific community for
111 the handling of wild mammals (Sikes and Gannon 2011) and in strict accordance with permits
112 issued by Malagasy national authorities (see further details in the acknowledgements section).
113 Herein we use the designation *Miniopterus manavi* (sensu lato) for members of this genus
114 captured at Ambohitantely, where a range of divergent forms of this species complex occur in
115 sympatry (Goodman et al. 2015b). Standard external morphological measurements were taken
116 from each individual and tissue samples preserved in liquid nitrogen soon after the animals

60

1
2
3
4 117 were dispatched. Once back to the laboratory, the samples were stored at -80°C until
5
6 118 molecular analyses. Voucher specimens were deposited at the Université d'Antananarivo,
7
8 119 Département de Biologie Animale (UADBA), Antananarivo, and at the Field Museum of
9
10 120 Natural History (FMNH), Chicago.
11
12

13 121

122 DNA extraction, *Leptospira* detection and prevalence

123 For each specimen, total nucleic acids were extracted from a pool of kidney, spleen and lung
124 tissues using EZ1 Virus Mini Kits version 2.0 (Qiagen, Les Ulis, France) on an EZ1 Biorobot
125 as previously described (Wilkinson et al. 2012). A Reverse Transcription step was performed
126 on total nucleic acids with GoScript Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI) and
127 molecular detection was carried out on cDNA with a Real Time – Polymerase Chain Reaction
128 (RT-PCR) using a pathogenic *Leptospira* specific fluorescent probe targeting the 5' end of the
129 16S encoding gene, following a previously described procedure (Smythe et al. 2002b). We
130 used a Fisher's exact test implemented in R software version 2.15.3 (R Core Team 2013) to
131 test the significance of difference in infection rates among bat species.
132

133 *Leptospira* identification

134 *Leptospira* were identified to the species level by sequencing a portion of *secY*, a highly
135 polymorphic housekeeping gene (Ahmed et al. 2006) commonly used for the determination of
136 members of this genus (Perez and Goarant 2010; Dietrich et al. 2014). In addition, *Leptospira*
137 phylogenies were constructed using two additional genes, *adk* and *rrs2*, both markers used in
138 combination with *secY* in a previously described multilocus sequence typing (MLST) scheme
139 (Ahmed et al. 2006), which was recently optimized by Dietrich et al. (2014). In each reaction,
140 Polymerase Chain Reaction (PCR) mixture contained 12.5 µL of GoTaq Hot Start Green

1
2
3
4 141 Master Mix 2X (Promega, Madison, WI), 1 μ L (10 mM) of each primer, 8.5 μ L of nuclease
5
6 142 free water and 2 μ L of cDNA. The PCR conditions consisted of an initial denaturation step at
7
8 143 95°C for 5 min followed by 45 cycles at 94°C for 30 s, 52 – 56°C for 30 s and 72°C for 1 min
9
10 144 and a final elongation step of 7 min at 72°C. PCR products were visualized under UV light
11
12 145 after electrophoresis on a 2% agarose gel stained with 1X GelRed™ (Biotium Inc.) and
13
14 146 sequenced on both strands through direct Sanger sequencing (Genoscreen, Lille, France)
15
16 147 using the same amplification primer set.
17
18
19
20 148

21 149 **Phylogenetic analyses**

22
23
24 150 Nucleotide sequences were verified, corrected by visual inspection and aligned under the
25
26 151 software Geneious pro software v.5.4 (Drummond et al. 2011). Nucleotide polymorphism was
27
28 152 evaluated for each gene by quantifying the number of polymorphic sites using DnaSP 5.10.01
29
30 153 (Librado and Rozas 2009). The model of sequence evolution that best fit the data was
31
32 154 determined for each marker using jModelTest v.0.1.1 (Posada 2008) based on the Akaike
33
34 155 Information Criterion (AIC). Phylogenies were first constructed separately for each marker
35
36 156 using sequences generated in the present work together with those available on GenBank (see
37
38 157 Supplementary Table 1). Phylogenetic constructions were carried out using Bayesian
39
40 158 Inference analyses implemented in MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003). The
41
42 159 analyses consisted of two independent runs of four incrementally heated Metropolis Coupled
43
44 160 Markov Chain Monte Carlo (MCMCMC) starting from a random tree. MCMCMC was run
45
46 161 for 2,000,000 generations with trees and associated model parameters sampled every 100
47
48 162 generations. For each phylogeny, the convergence level was validated by an average standard
49
50 163 deviation of split frequencies inferior to 0.05. The initial 10% of trees from each run were
51
52 164 discarded as burn-in and the consensus phylogeny and posterior probabilities were obtained
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 165 from the remaining trees. The congruence between topologies obtained using each specific
5
6 166 marker was verified using the Incongruence Length Difference (ILD) test implemented in
7
8 167 PAUP 4.0b10 (Swofford 2002).
9

10
11 168

12 13 169 Genetic diversity and structure of bat-borne *Leptospira*

14
15 170 Although *adk* and *secY* markers both display a relatively high level of polymorphism, the
16
17 171 number of obtained sequences was more important for *secY* (see results). Hence, only *secY*
18
19 172 data were used to analyze the genetic structure of *Leptospira*, in order to maximize the
20
21 173 number of species and sampling sites integrated into the analyses. The relative role of host
22
23 174 specificity vs. spatial structure in shaping *Leptospira* diversity was examined by performing a
24
25 175 molecular variance analysis (AMOVA) implemented in ARLEQUIN v.3.5.1.3 (Excoffier and
26
27 176 Lischer 2010). In our analyses, a “population” corresponds to *Leptospira* sequences obtained
28
29 177 from a single bat species at a given sampling site. Geographical structure was firstly
30
31 178 addressed by grouping populations by bioclimatic regions (humid, sub-humid, dry and sub-
32
33 179 arid) (Cornet 1974) and subsequently by grouping populations by sampling site. Host
34
35 180 specificity was analyzed by grouping populations at the level of host family (Hipposideridae,
36
37 181 Miniopteridae, Molossidae, Pteropodidae, Rhinonycteridae and Vespertilionidae). The
38
39 182 significance levels of the fixation indices were obtained using 1023 nonparametric
40
41 183 permutations. Finally, we assessed the role of host species community composition in shaping
42
43 184 *Leptospira* diversity by analysing the correlation between host species richness at a given
44
45 185 sampling site and the number of detected *Leptospira* haplotypes, using a Pearson’s R
46
47 186 correlation test under R software version 2.15.3 (R Core Team 2013).
48
49 187

50 51 188 Co-phylogeny 52 53 54 55 56 57 58 59 60

1
2
3
4 189 Host-parasite associations were analysed using the phylogenies of bats and associated
5
6 190 *Leptospira*. We specifically used sequentially a pruned phylogeny of *secY*, *adk* and *rrs2*,
7
8 191 which resulted in a tree including only one sequence by well-supported *Leptospira* group
9
10 192 detected in the Bayesian analyses. Thus, we defined 17, 12 and 22 *Leptospira* groups for
11
12 193 *secY*, *adk* and *rrs2*, respectively. Bat phylogenies were built using the mitochondrial
13
14 194 cytochrome b encoding gene (*cyt b*) available from GenBank (see Supplementary Table 2). In
15
16 195 the case of Malagasy bat species for which *cyt b* sequences were incomplete or not available
17
18 196 (*Hipposideros commersoni*, *Triaenops menamena*, *Paratriaenops furculus*, *Mormopterus*
19
20 197 *jugularis*, *Neoromicia robertsi* and *Otomops madagascariensis*), PCRs and subsequent *cyt b*
21
22 198 sequencing were carried out using L14724 and H15915 primers (Irwin, Kocher and Wilson
23
24 199 1991) (see Supplementary Table 2). Finally, bat and pruned bacteria phylogenies were
25
26 200 generated by Maximum Likelihood under GTR + G model with RAxML (v.8.0.26)
27
28 201 (Stamatakis 2006) by using rapid bootstrapping with 1,000 repetitions using the RAxML GUI
29
30 202 (Silvestro and Michalak 2011). Parasite-host associations were visualized using TreeMap 3b
31
32 203 software (Charleston 2011).

33
34
35
36
37 204 In order to assess the levels of congruence between bats and *Leptospira* phylogenies,
38
39 205 two programs based on global-fit methods were used: ParaFit (Legendre, Desdevises and
40
41 206 Bazin 2002) and Procrustean Approach to Cophylogeny (PACo) (Balbuena, Míguez-Lozano
42
43 207 and Blasco-Costa 2013). These programs require two input matrixes of patristic distances
44
45 208 obtained from bat and *Leptospira* phylogenies together with a matrix of parasite-host
46
47 209 associations (presence/absence of a *Leptospira* lineage in a bat species). The null hypothesis
48
49 210 tested by ParaFit is a random association between parasites and hosts, while PACo tests the
50
51 211 dependence of parasite and host phylogenies (Balbuena, Míguez-Lozano and Blasco-Costa
52
53 212 2013). ParaFit and PACo were performed with 999 and 10,000 permutations, respectively.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 213 Both tests were conducted using R software version 2.15.3 (R Core Team 2013) with APE
5
6 214 package (version 3.0-8) (Paradis, Claude and Strimmer 2004) for both ParaFit and PACo, and
7
8 215 with VEGAN packages (version 2.0-7) (Dixon 2003) for PACo.
9

10
11 216

12 13 217 [Investigation of evolutionary history of host–parasite association](#)

14
15 218 The reconciliation tool CoRe-PA version 0.5.1 (Merkle, Middendorf and Wieseke 2010), an
16
17 219 event-based tree reconciliation program, was used to determine the most probable
18
19 220 evolutionary scenarios (considering co-speciation, sorting, duplication and host-switching
20
21 221 events) leading to the contemporary structure of *Leptospira* spp. within Malagasy bats. CoRe-
22
23 222 PA is able to incorporate timing information to restrict possible co-evolutionary scenarios. An
24
25 223 applicable timing for the nodes of the aforementioned phylogenetic trees was computed using
26
27 224 the branch lengths of the given tree. As a first step, the branch lengths were adjusted to obtain
28
29 225 trees with all paths from the root to a leaf having the same length. Thereafter, an
30
31 226 optimization problem was defined using integer linear programming (ILP) (Wolsey and
32
33 227 Nemhauser 1999). For each branch length b_i of a branch i , a factor/multiplier f_i , ranging
34
35 228 from 0.25 to 4.0 was sought, such that for the tree with adjusted branch lengths $b_i * f_i$ all
36
37 229 paths from the root to a leaf were equal. From all possible sets of factors, the set finally
38
39 230 selected was the one minimizing the branch length adjustment $\sum_i |b_i - (b_i * f_i)|$. In a
40
41 231 second step, time zones were assigned to nodes with root node designated to time zone 0 and
42
43 232 leaves to time zone 10. The inner nodes were assigned to time zones proportionally to the
44
45 233 length of the path from the root to the respective node in the adjusted tree. In order to lower
46
47 234 the stringency of evolutionary scenario selection, a time zone interval of ± 5 of the previously
48
49 235 computed time zones was assigned to each node of the *Leptospira* tree. CoRe-PA analyses
50
51 236 were performed using the "rank" and "automatic cost evaluation" options with 5,000 random
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

237 cycles. The statistical significance was assessed with 100 reconstructions of the same trees
238 and randomly generated *Leptospira* - bat leaf-to-leaf associations.

For Peer Review

239 RESULTS

240 Bats sampling

241 In total, tissue samples from 947 bat specimens representing 31 species, 18 genera and seven
242 families (Table 1) were obtained from 52 sites on Madagascar (see Supplementary Table 3).

243 The sampling was conducted in caves (n = 22), synanthropic sites (n = 18) and forested zones
244 (outdoor trapping) (n = 12). Thirty-nine percent (n = 7) of synanthropic sites were composed
245 of two or three bat species and harboured only Molossidae species: *Chaerephon* spp., *Mops*
246 spp. and *Mormopterus jugularis*. Seventy-three percent (n = 16) of caves contained two to
247 seven sympatric bat species. Within these sites, the bats composition varied from two bat
248 families (example: Miniopteridae and Vespertilionidae or Hipposideridae and Molossidae) to
249 five families (example: Hipposideridae, Miniopteridae, Molossidae, Rhinonycteridae and
250 Vespertilionidae). Few details are available about possible physical contact between
251 sympatric bat taxa. However, some Miniopteridae species are known to occur in syntopy, *i.e.*
252 with physical contact within the colony; the same pattern has been reported for *Miniopterus*
253 spp. and *Myotis goudoti* (Vespertilionidae) (Goodman 2011). Of interest, in the present study,
254 six caves harboured at least two different *Miniopterus* spp. and in five caves, *Myotis goudoti*
255 occurred in sympatry with at least one *Miniopterus* sp. (see Supplementary Table 3).

257 *Leptospira* detection and identification

258 Real-Time PCR revealed 203 positive samples, indicating a global *Leptospira* infection rate
259 of 21.4% and at least one infected bat species per family (Table 1). At the species level, 18 of
260 the 31 bat taxa were infected, with significant differences in leptospiral infection between
261 species (P-value < 0.001, Fisher's exact test). Herein, we report *Leptospira* infection in seven
262 bat species that have not been previously investigated: *Coleura kibomalandy*

Table 1. *Leptospira* detection in Malagasy bats by Real-Time PCR. Infected species are indicated in bold. I: insectivorous species, F: frugivorous species.

Bat family	Bat species	Sample size	Number positive (%)
Emballonuridae (I) (n = 9)	<i>Coleura kibomalandy</i>	3	1 (33.3)
	<i>Paremballonura tiavato</i>	6	0
Hipposideridae (I) (n = 27)	<i>Hipposideros commersoni</i>	27	13 (48.1)
Miniopteridae (I) (n = 289)	<i>Miniopterus aelleni</i>	7	0
	<i>Miniopterus manavi sensu lato</i>	19	14 (73.7)
	<i>Miniopterus gleni</i>	22	0
	<i>Miniopterus griffithsi</i>	7	5 (71.4)
	<i>Miniopterus griveaudi</i>	116	10 (8.6)
	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	89	45 (50.6)
	<i>Miniopterus majori</i>	7	2 (28.6)
Molossidae (I) (n = 406)	<i>Miniopterus sororculus</i>	22	13 (59.1)
	<i>Chaerephon atsinanana</i>	34	0
	<i>Chaerephon leucogaster</i>	94	1 (1.1)
	<i>Mops leucostigma</i>	68	0
	<i>Mops midas</i>	19	0
Rhinonycteridae (I) (n=56)	<i>Mormopterus jugularis</i>	152	27 (17.8)
	<i>Otomops madagascariensis</i>	39	4 (10.3)
	<i>Paratriaenops furculus</i>	14	1 (7.1)
Pteropodidae (F) (n = 80)	<i>Triaenops menamena</i>	42	27 (64.3)
	<i>Eidolon dupreanum</i>	11	0
Vespertilionidae (I) (n = 80)	<i>Pteropus rufus</i>	20	2 (10.0)
	<i>Rousettus madagascariensis</i>	49	15 (30.6)
	<i>Hypsugo bemaity</i>	2	0
	<i>Myotis goudoti</i>	48	21 (43.8)
	<i>Neoromicia malagasyensis</i>	2	0
	<i>Neoromicia matroka</i>	4	0
	<i>Neoromicia robertsi</i>	1	1 (100.0)
	<i>Pipistrellus / Neoromicia sp.</i>	8	0
	<i>Pipistrellus hesperidus</i>	11	0
	<i>Pipistrellus raceyi</i>	3	0
<i>Scotophilus marovaza</i>	1	1 (100.0)	

1
2
3
4 263 (Emballonuridae), *Hipposideros commersoni* (Hipposideridae), *Miniopterus manavi*
5
6 264 (Miniopteridae), *Chaerephon leucogaster* (Molossidae), *Rousettus madagascariensis*
7
8 265 (Pteropodidae), and *Neoromicia robertsi* and *Scotophilus marovaza* (Vespertilionidae). All
9
10 266 tested species within the Hipposideridae and Rhinonycteridae were found positive for
11
12 267 *Leptospira*. Similarly, all but two *Miniopterus* spp. (*M. aelleni* and *M. gleni*) were found
13
14 268 infected with *Leptospira*. Within the Molossidae, *Chaerephon* spp. and *Mops* spp. showed
15
16 269 lower rates of infection than *Mormopterus jugularis* and *Otomops madagascariensis* (P-value
17
18 270 < 0.01, Fisher's exact test). Noteworthy, *M. jugularis* was the only species sampled both in
19
20 271 caves (n = 31) and synanthropic sites (n = 108). A Pearson's Chi-square test indicated that
21
22 272 there was no-significant difference in infection rate of this species sampled in both types of
23
24 273 habitat (P-value = 0.54).

25
26
27
28 274 We could successfully amplify and sequence at least one of the three bacterial markers
29
30 275 (*secY*, *adk* and *rrs2*) for 120 out of the 203 RT-PCR-positive *Leptospira* samples.
31
32 276 Amplification failed at all three loci for 83 RT-PCR positive samples. Based on *secY*-
33
34 277 phylogeny (see below), all identified *Leptospira* clustered into the pathogenic clade and most
35
36 278 of them (67.0%) were typed as *L. borgpetersenii* and *L. borgpetersenii*-related. *Leptospira*
37
38 279 *kirschneri* was identified in 12.3% of genotyped individuals and the remaining sequences
39
40 280 (20.5%) could not be assigned to any known *Leptospira* taxon.
41
42
43
44
45

46 282 *Phylogeny of Leptospira*

47
48 283 Amplification of *secY*, *adk* and *rrs2* loci was performed on all *Leptospira* positive samples
49
50 284 and produced 73, 36 and 116 sequences of 482, 500 and 503-504 base pairs, respectively. All
51
52 285 sequences were deposited in GenBank (see Supplementary Table 4). The number of
53
54 286 polymorphic sites was higher in *secY* (38%) and *adk* (37%) than in *rrs2* (8%). Phylogenies of
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 287 *Leptospira* based on *secY*, *adk* and *rrs2* markers are depicted in Figures 1, S1 and S2,
5
6 288 respectively. No concatenated phylogeny was produced since the ILD test did not validate the
7
8 289 congruence of topologies obtained with the different markers (P-value < 0.01). The *secY*-
9
10 290 based phylogeny displays seven well-supported pathogenic *Leptospira* clades (A to G)
11
12 291 infecting Malagasy bats (Fig. 1). Clade A corresponds to *L. borgpetersenii* and is composed
13
14 292 of sequences obtained only from *Miniopterus* spp. and *Myotis goudoti*. Bacterial sequences
15
16 293 obtained from Molossidae (*Mormopterus jugularis* and *Otomops madagascariensis*) and
17
18 294 Pteropodidae (*Rousettus madagascariensis*) taxa cluster in two distinct monophyletic clades C
19
20 295 and D, respectively, both being closely related to *L. borgpetersenii* clade A. Clade B includes
21
22 296 *L. kirschneri* haplotypes and, as for clade A, is composed only of *Leptospira* infecting
23
24 297 *Miniopterus* spp. and *Myotis goudoti*. Clade E is composed of haplotypes obtained from
25
26 298 *Hipposideros commersoni* and clades F and G are composed of haplotypes obtained from
27
28 299 *Triaenops menamena*. Interestingly, these three later clades do not cluster with any known
29
30 300 pathogenic *Leptospira* taxon, although clade G is embedded into a clade containing *L.*
31
32 301 *noguchii*, *L. kirschneri* and *L. interrogans*. Finally, a sequence from *Neoromicia robertsi*
33
34 302 clustered with a sequence obtained from *H. commersoni*.

35
36
37
38
39 303 Phylogenetic reconstruction with *adk* displayed comparable information to that
40
41 304 obtained with *secY* despite a more limited number of sequences (see Supplementary Figure 1).
42
43 305 A greater number of sequences were obtained from *rrs2*, but the resulting phylogeny was
44
45 306 poorly resolved (see Supplementary 2).
46
47
48
49
50

51 308 Genetic population structure of *Leptospira*

52
53 309 The AMOVA indicated that the genetic diversity of bat-borne *Leptospira* was not dependent
54
55 310 on geoclimatic parameters, specifically the distinct bioclimatic regions of Madagascar ($F_{CT} =$
56
57
58
59
60



Fig. 1 Phylogenetic tree based on pathogenic *Leptospira* *secY* (482 bp) gene. The analysis was carried out using Bayesian Inference under the HKY+I substitution model. Nodal values correspond to posterior probabilities. The letters (A to G) designate the main well-supported *Leptospira* clades. *Leptospira* haplotypes are coloured according to host family (red: Hipposideridae, blue: Miniopteridae, purple: Molossidae, orange: Pteropodidae, light blue: Rhinonycteridae and green: Vespertilionidae). Names typed in black refer to *Leptospira* (*L.*) sequences accessible from GenBank (see Supplementary Table 1). Hi: Hipposideros, Mi: Miniopterus, Mo: Mormopterus, My: Myotis, Ne: Neoromicia, Ot: Otomops, Ro: Rousettus and Tr: Triaenops.

222x154mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4 311 -0.02769, P-value = 0.63734) or the geographic location of sampling sites ($F_{CT} = -0.08457$, P-
5
6 312 value = 0.67449) (Table 2). Moreover, bats of the same species and sampled at distant sites
7
8 313 shared closely related bacterial haplotypes (Fig. 2). This aspect was observed with *Leptospira*
9
10 314 spp. detected in *Myotis goudoti*, *Miniopterus* spp., *Hipposideros commersoni*, *Triaenops*
11
12 315 *menamena*, *Otomops madagascariensis* and *Rousettus madagascariensis*. In keeping with this
13
14 316 pattern, *Mormopterus jugularis* was infected with a unique *Leptospira* haplotype regardless of
15
16 317 the roost site type (synanthropic or natural) and bioclimatic zone (dry, sub-arid, sub-humid or
17
18 318 humid). In contrast, we detected that global leptospiral diversity was strongly associated with
19
20 319 the host, as differences between host families accounted for 51.45% of the variation ($F_{CT} =$
21
22 320 0.51451, P-value < 0.001). The AMOVA test also indicated a high genetic variation (49.82%)
23
24 321 within host species (Table 2), associated with the observation that certain bat species can
25
26 322 harbour several distinct *Leptospira* lineages, as exemplified for *Myotis goudoti*, *Miniopterus*
27
28 323 spp., *H. commersoni* and *T. menamena*. Finally, we found a significant positive correlation
29
30 324 between host species richness at a given site and the associated *Leptospira* diversity ($r^2 =$
31
32 325 0.87, df = 12, P-value < 0.001) (Fig. 3).
33
34
35
36
37
38
39
40
41

327 Co-phylogeny

42 328 ParaFit and PACo did not support co-evolution between bats and their respective *Leptospira*
43
44 329 based on *secY* (ParaFitGlobal = 4.5128, P-value = 0.09; m2 global value = 25.9503, P-value =
45
46 330 0.06) and *adk* datasets (ParaFitGlobal = 0.4922, P-value = 0.47; m2 global value = 16.5497,
47
48 331 P-value = 0.26). When *rrs2* data were used, ParaFit analysis was consistent with the absence
49
50 332 of global co-evolution between bats and *Leptospira* (ParaFitGlobal = 0.0249, P-value = 0.07),
51
52 333 while PACo analysis indicated a co-evolution pattern (m2 global value = 7.4856, P-value <
53
54 334 0.01).
55
56
57
58
59
60

Table 2. Analysis of molecular variance (AMOVA) based on *Leptospira secY* gene. In each analysis, a population is referred to all *Leptospira* sequences detected in a single bat species at a given sampling site.

Comparison	Source of variation	d.f.	Fixation indices (F)	P-value	% of variation
<i>Bioclimatic regions</i>	Among regions (n = 4)	3	$\Phi_{CT} = -0.02769$	0.63734	-2.77
	Among host species within regions	36	$\Phi_{SC} = 0.43875$	< 0.001	45.09
	Within host species	33	$\Phi_{ST} = 0.42321$	< 0.001	57.68
<i>Sampling sites</i>	Among sites (n = 23)	22	$\Phi_{CT} = -0.08457$	0.67449	-8.46
	Among host species within sites	17	$\Phi_{SC} = 0.47232$	< 0.01	51.23
	Within host species	33	$\Phi_{ST} = 0.42769$	< 0.001	57.23
<i>Host families</i>	Among families (n = 6)	5	$\Phi_{CT} = 0.51451$	< 0.001	51.45
	Among host species within families	34	$\Phi_{SC} = -0.02617$	0.48680	-1.71
	Within host species	33	$\Phi_{ST} = 0.50180$	< 0.001	49.82

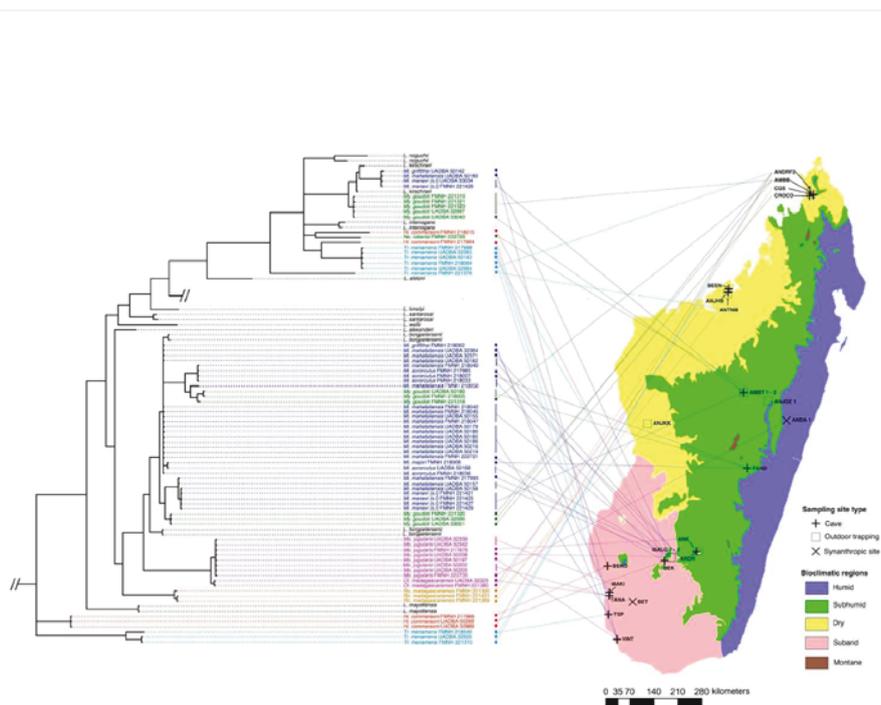
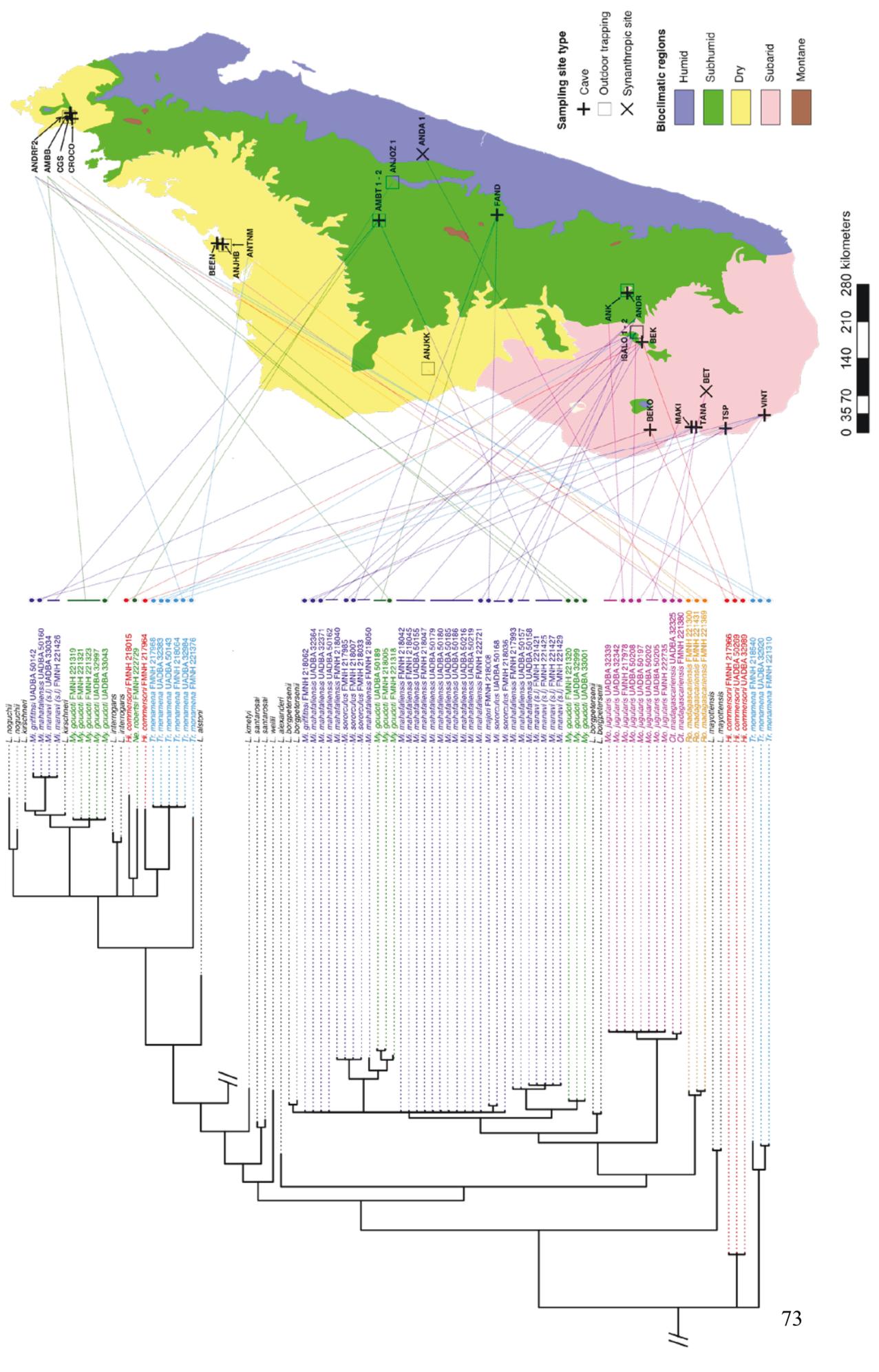


Fig. 2 Distribution of pathogenic *Leptospira* spp. in bats sampled in different sites and bioclimatic regions (Cornet 1974) of Madagascar. *Leptospira* phylogeny is based on *secY* sequences. For details on code colours and acronyms see Figure 1 and for sampling sites (example: BET, TSP, VINT...) see Supplementary Table 3.
217x147mm (300 x 300 DPI)



0 35 70 140 210 280 kilometers

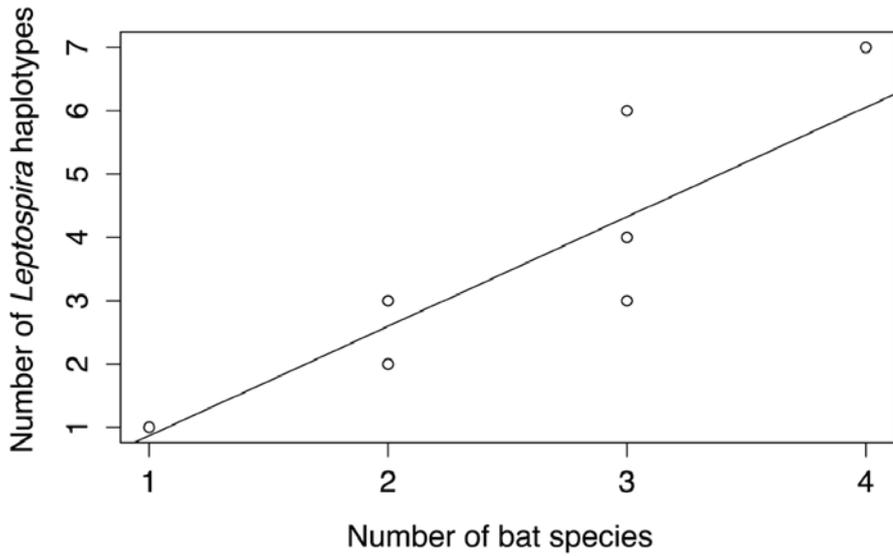


Fig. 3 Correlation between *Leptospira* haplotype diversity (based on the *secY* gene) and host species richness within sampling sites ($r^2 = 0.87$, $df = 12$, P -value < 0.001 , Pearson's R correlation test). At a given sampling site, the number of host corresponds to the number of bat species from which at least one *secY* sequence was obtained.

141x114mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 3355
6 336 [Analyses of co-evolutionary scenarios](#)
7

8 337 The CoRe-PA analysis was not performed on *adk* as branch lengths were notably different
9
10 338 and did not allow length adjustment, or on *rrs2* because of the poor resolution of this marker
11
12 339 (see Supplementary Figure 2). Based on the *secY* data set, the *Leptospira* and bat co-
13
14 340 phylogeny analysis using CoRe-PA produced 384 distinct co-evolutionary reconstructions.
15
16 341 Fifteen solutions displayed the same quality value (0.108) and corresponded to the preferred
17
18 342 reconstruction. All of the 15 reconstructions had the same event frequencies: seven co-
19
20 343 speciation, 25 sorting, 11 duplication and seven host-switching events. For the remaining
21
22 344 reconstructions, the quality value varied from 0.122 to 1.029. The randomized data sets
23
24 345 showed more co-speciation events (8.21 on average) and a better quality value (0.040) than
25
26 346 the original data set (0.108). Moreover, 69% of the randomized reconstructions showed more
27
28 347 co-speciation events than did the original dataset. These results do not support co-phylogeny
29
30 348 between bats and their associated *Leptospira*. Lastly, five of the seven detected host-switching
31
32 349 events involved *Myotis goudoti* and three occurred between *Miniopterus* spp. and *Myotis*
33
34 350 *goudoti* (Fig. 4).
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

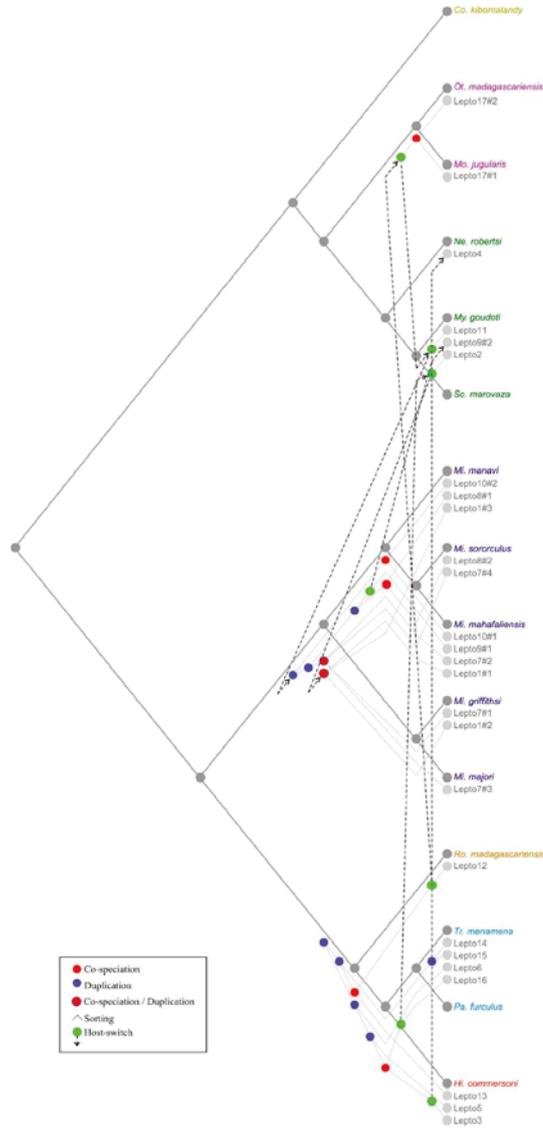
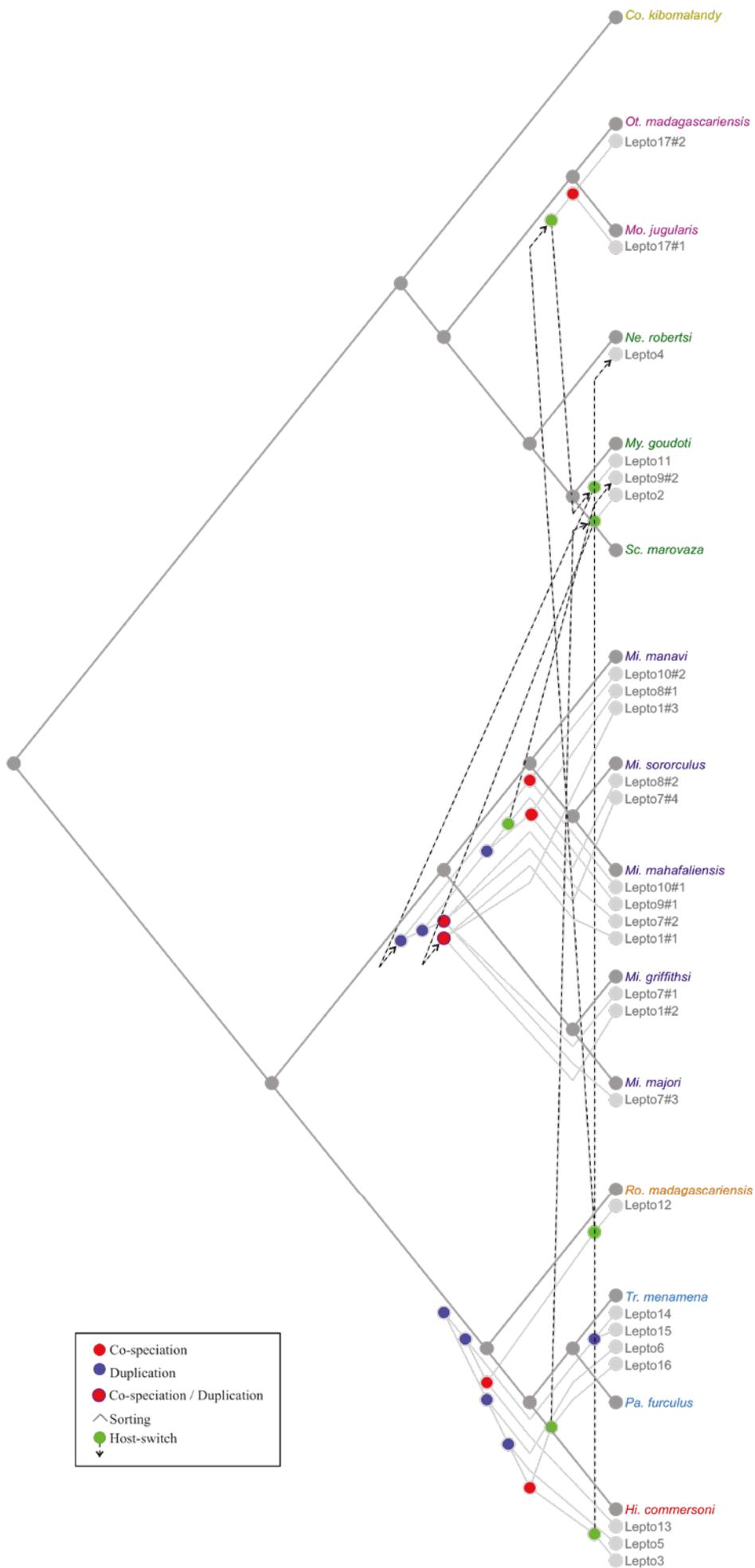


Fig. 4 Representation of the most parsimonious co-evolutionary scenario for *Leptospira* (light grey) and bat lineages (dark grey) proposed by CoRe-Pa. *Leptospira* and bat phylogenies were based on *secY* and *cyt b*, respectively. As for *Leptospira* lineages, 17 distinct groups were defined based on the *secY* phylogeny and numbered accordingly. A given *Leptospira* can be found in different bat species and is annotated as for example: Lepto8#1 in *Miniopterus manavi* and Lepto8#2 in *Miniopterus sororculus*. Each colour corresponds to a bat family (yellow: Emballonuridae, red: Hipposideridae, blue: Miniopteridae, purple: Molossidae, orange: Pteropodidae, light blue: Rhinonycteridae and green: Vespertilionidae). Co: Coleura, Hi: Hipposideros, Mi: Miniopterus, Mo: Mormopterus, My: Myotis, Ne: Neoromicia, Pa: Paratriaenops, Ot: Otomops, Ro: Rousettus, Sc: Scotophilus and Tr: Triaenops.
336x595mm (300 x 300 DPI)



351 **DISCUSSION**352 **A high diversity of pathogenic *Leptospira* is detected in several Malagasy bat species**

353 Our study highlights that *Leptospira* infection is widespread in Malagasy bats with new
354 documented cases of infection in species belonging to seven families. Interestingly, as
355 previously reported from the New World tropics (Matthias et al. 2005), we detected
356 considerable variation in leptospiral infection rates among different Malagasy bat species. Our
357 data also showed either absence or low infection rates in the genera *Chaerephon* and *Mops*
358 (Molossidae), whereas other members of this family, *Mormopterus jugularis* and *Otomops*
359 *madagascariensis*, showed high infection rates. This may be associated with differences in
360 roosting ecology: our sampled individuals of *Chaerephon* spp. and *Mops* spp. were
361 predominantly from synanthropic roost sites, whereas *M. jugularis* and *O. madagascariensis*
362 where at least in part from natural cave roost sites. We did not find significant differences in
363 infection rates among *M. jugularis* sampled in natural as compared to synanthropic roost sites.

364 The present study reveals a higher diversity of pathogenic *Leptospira* spp. in Malagasy
365 bats than previously documented (Lagadec et al. 2012; Dietrich et al. 2014). *Leptospira*
366 *borgpetersenii* has been already reported in Madagascar bats (Lagadec et al. 2012; Dietrich et
367 al. 2014) and appear herein as a dominant *Leptospira* taxon. It is interesting to note that *L.*
368 *borgpetersenii* and *L. kirschneri* (which is reported here for the first time in Malagasy bats)
369 have been also reported in South American and African bats (Matthias et al. 2005; Ogawa et
370 al. 2015). We also detected undescribed *Leptospira* lineages hosted notably by *Hipposideros*
371 *commersoni*, *Neoromicia robertsi*, *Rousettus madagascariensis* and *Triaenops menamena*.
372 Lastly, even though we failed to amplify and sequence the *secY* and *adk* genes of *Leptospira*
373 infecting some bat species within our sample (*Paratriaenops furculus*, *Coleura kibomalandy*
374 and *Scotophilus marovaza*), the obtained *rrs2* sequences were indicative of other potentially

1
2
3
4 375 undescribed bacterial lineages. The presence of divergent *Leptospira* lineages and/or the low
5
6 376 bacterial loads could explain the PCR failures from certain *Leptospira*-positive bats. For
7
8 377 example, we could not genotype *Leptospira* from *Miniopterus griveaudi* samples for which
9
10 378 RT-PCR Cycle Threshold (CT) values were high (40.0 ± 1.19 , $n = 10$). In contrast, we
11
12 379 obtained *Leptospira* sequences from the other Miniopteridae species, which displayed lower
13
14 380 CT values ranging from 29.7 ± 6.24 ($n = 5$) to 33.3 ± 5.19 ($n = 2$). Altogether, our work
15
16 381 suggests that the actual bacterial diversity in Malagasy bats is likely even higher than
17
18 382 documented herein.
19
20
21

22 383
23
24 384 ***Leptospira* spp. display a strong host-specificity pattern**

25 385 Although serological tools have indicated some specificity of *Leptospira* towards host
26
27 386 reservoirs with certain serovars commonly associated to specific animals (Bharti et al. 2003),
28
29 387 only a few studies have addressed the question of *Leptospira* host-specificity at the molecular
30
31 388 level (Cameron et al. 2008; Cosson et al. 2014; Dietrich et al. 2014; Koizumi et al. 2015).
32
33 389 Based on species-specific primers, Cameron et al. (2008) highlighted a *Leptospira* host-
34
35 390 specificity pattern in pinniped populations with sea lions (*Eumetopias jubatus* and *Zalophus*
36
37 391 *californianus*) infected only by *L. interrogans* and northern elephant seals (*Mirounga*
38
39 392 *angustirostris*) infected only by *L. kirschneri*. Similarly, endemic Malagasy small terrestrial
40
41 393 mammals and bats have been shown to be infected by distinct *Leptospira* lineages (Dietrich et
42
43 394 al. 2014).
44
45
46
47

48 395 Using molecular approaches and Malagasy bats, which provide a powerful biological
49
50 396 model of high levels of endemicity and a varied diversity of geographical distribution for host
51
52 397 species, the present study looks deeper into patterns of *Leptospira* host-specificity. Our data
53
54 398 indicate that *Leptospira* spp. display a high degree of host-specificity for Malagasy bats at
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 399 different taxonomic levels. Generally, each bat species harbours its own *Leptospira* lineage or
5
6 400 lineages. For the *Miniopteridae*, the bacteria host-specificity pattern has to be considered at
7
8 401 the level of host genus, as there is no evidence of specific *Leptospira* haplotypes (or clades)
9
10 402 restricted to a given *Miniopterus* species. Overall, the host-specificity pattern together with
11
12 403 the lack of geographical structure of *Leptospira* diversity indicate that (i) co-roosting bat
13
14 404 species do not share the same *Leptospira* community (except in the case of *Miniopterus* in
15
16 405 which different species within the genus can harbour the same *Leptospira* community) and
17
18 406 (ii) the *Leptospira* diversity depends on the bat host species diversity at a given site (Fig. 3).
19
20 407 Such bacteria host associations imply that the geographical distribution of a given *Leptospira*
21
22 408 haplotype depends on the dispersal patterns of the host species. For instance, *Mormopterus*
23
24 409 *jugularis* harbours a unique *Leptospira* haplotype across a broad area of the island,
25
26 410 irrespective of the roost site type or bioclimatic zone. The maintenance of this unique
27
28 411 haplotype could be also reinforced by the fact that *M. jugularis* is genetically panmictic across
29
30 412 its distribution and indicating broad patterns of dispersal (Ratrimomanarivo et al. 2009).
31
32

33
34
35 413 Globally, analyses with *secY* and *adk* genes did not show evidence of a co-evolution
36
37 414 signal between Malagasy bats and their respective *Leptospira*. Using the same global-fit
38
39 415 methods employed herein (ParaFit and PACo), Lei and Olival (2014) conducted a similar
40
41 416 study using previously published *rrs2* sequences (26 sequences belonging to 20 bat species)
42
43 417 and did not find evidence of co-evolution between bats and *Leptospira*. Here, with 116 *rrs2*
44
45 418 *Leptospira* sequences from 31 bat species, we come to a similar conclusion based on the
46
47 419 ParaFit analyses while PACo analyses provide evidence of co-evolution. This result may be
48
49 420 biased because of the poor resolution of the *rrs2* tree and the presence of many related
50
51 421 *Leptospira* in the same host. These findings underline that results provided by co-evolutionary
52
53 422 analyses should be interpreted cautiously as they strongly depend on the resolution of the used
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 423 genetic marker, the chosen method and sample size.
5
6

7 424

8 425 **The leptospiral diversity related to the ecology and the evolution history of bats**
9

10 426 Based on the *secY* gene, the CoRe-PA analysis indicated that the Malagasy bat–*Leptospira*
11
12 427 evolutionary history results from a combination of duplication, co-speciation, host-switching
13
14 428 as well as numerous sorting events (Fig. 4). These events could be explained by the ecology
15
16 429 of the hosts, as for example their roosting behaviour, particularly when species occur in
17
18 430 sympatric or syntopic day roost sites. Such roosting behaviour could favour parasite
19
20 431 transmission between co-roosting bat species (Hayman et al. 2013) and in turn favour host-
21
22 432 switching events. In the present study, this assumption was substantiated by three host-
23
24 433 switching events detected between *Miniopterus* spp. and *Myotis goudoti*. These species were
25
26 434 found in 38% of the same cave roost sites with multiple host species. Moreover, *Miniopterus*
27
28 435 spp. and *Myotis goudoti*, both bat taxa belonging to sister families (Miller-Butterworth et al.
29
30 436 2007) are known to occur syntopically in mixed day roost sites and in physical body contact
31
32 437 with one another (Goodman 2011). This level of direct contact of *M. goudoti* with different
33
34 438 species of *Miniopterus* might be a key element in the transmission of bacteria between non-
35
36 439 sympatric *Miniopterus*. For instance, *M. mahafaliensis*, *M. griffithsi* and *M. manavi* share the
37
38 440 same *L. kirschneri* haplotype (Fig. 1), although *M. manavi* is not living in sympatry with the
39
40 441 other two *Miniopterus* spp., but in each case with *Myotis goudoti*. Thus, as this latter is a
41
42 442 widespread species (Goodman and Ramasindrazana 2013), occurs in syntopy with different
43
44 443 *Miniopterus* spp. and does not show very pronounced patterns of genetic variation (Weyeneth
45
46 444 et al. 2010), we can hypothesize that *Myotis* plays a bridging role for *Leptospira* host-switch
47
48 445 between non-sympatric *Miniopterus* spp.
49
50
51
52
53

54 446 The host-switches are not restricted to syntopic bat species (*Miniopterus* spp. and
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 447 *Myotis goudoti*) since such events were also detected between other sympatric (Molossidae –
5
6 448 *M. goudoti*, *Rousettus madagascariensis* – Molossidae, *Triaienops menamena* – *M. goudoti*)
7
8 449 and non-sympatric species (*Hipposideros commersoni* and *Neoromicia robertsi*) (Fig. 4 and
9
10 450 see Supplementary Table 3). These findings underline that physical close contact is not a
11
12 451 prerequisite for host-switching events and there are probably other means for horizontal
13
14 452 transmission of *Leptospira*.

15
16
17 453 Beside ecological behaviour, parasite-host specificity may depend on the evolutionary
18
19 454 and natural history traits of both parasites and hosts (Poulin and Keeney 2008). On
20
21 455 Madagascar, the contemporary bat fauna is the result of at least 20 different colonization
22
23 456 events from the mid-Miocene to the modern era and mainly from Africa (Samonds et al.
24
25 457 2013). In several cases, an adaptive radiation followed successful colonization by an ancestral
26
27 458 population, as best illustrated by the genus *Miniopterus* whose initial divergence took place an
28
29 459 estimated 4.5 Mya (Christidis et al. 2014). This relatively recent radiation and the syntopic
30
31 460 behaviour displayed by several *Miniopterus* spp. can explain the absence of bacteria-host
32
33 461 specificity at the species level within the genus. Whether the ancestral *Miniopterus* brought
34
35 462 over different bacterial lineages from continental Africa or got infected following successful
36
37 463 colonization of Madagascar by phylogenetically different bat groups may be addressed
38
39 464 through a thorough investigation of *Miniopterus-Leptospira* associations in continental
40
41 465 Africa.
42
43
44
45

46 466 47 48 467 **Epidemiological implications**

49
50 468 The tight host-specificity reported here between *Leptospira* and bat species may have broad
51
52 469 implications in understanding global epidemiology of leptospirosis infection. Our study is
53
54 470 based on the PCR detection of bacterial DNA in a pool of tissue biopsies including kidney.
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 471 Although it cannot be ruled out that PCR positive animals were actually experiencing acute
5
6 472 systemic infection, we propose that the high infection rates reported herein is a signature of
7
8 473 the carrier state of the positive animals, *i.e.* their capacity to maintain a bacterial biofilm in the
9
10 474 proximal convoluted tubule of the kidney with bacteria being excreted upon urination. The
11
12 475 bacteria host-specificity pattern reported in our study might reflect the selection for an
13
14 476 appropriate bacterial genotype able to develop and be maintained in the host. Previous studies
15
16 477 hypothesized that biofilms formed by *Leptospira* play an important role in the maintenance of
17
18 478 bacteria in the kidneys of reservoir hosts (Ristow et al. 2008; Matsui et al. 2015). Further, it
19
20 479 can be suggested that some specific interactions between the tubular epithelial cell and the
21
22 480 *Leptospira* bacterial cell wall might trigger the first steps of the biofilm formation and act as
23
24 481 the selection force. As mammals can be infected by different pathogenic *Leptospira*, the
25
26 482 genotype of the selected bacteria, which defines the carrier state of the specific host, does not
27
28 483 preclude multiple infections of the same individual by different *Leptospira* species, and that at
29
30 484 a fine level are controlled by the immune responses of the host. Serological analyses are
31
32 485 warranted to provide information on the actual exposure of bats to leptospiral infection and
33
34 486 assess the decoupling between the carrier state, defining strict host specificity and the
35
36 487 infection state, which is likely less restricted with regard to infecting genotypes.
37
38
39
40
41
42
43

44 489 CONCLUSIONS

45
46 490 The data presented herein help to complete available information on *Leptospira* infection and
47
48 491 diversity in bats from different regions of the world, in this case specifically from
49
50 492 Madagascar. Our results highlight a notable level of specificity of *Leptospira* towards their
51
52 493 bat hosts, strong enough as to allow predicting the identity of the host for any of the
53
54 494 *Leptospira* taxa described herein. In other words, “*tell me who you walk with and I will tell*
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 495 *you who you are*". The present study should stimulate molecular characterizations of
5
6 496 pathogenic *Leptospira* diversity and structuration within different animal reservoirs in other
7
8 497 geographical regions. Such approaches will provide insightful data regarding the ecology of
9
10 498 *Leptospira* and the medical and/or veterinary importance of local animal reservoirs.
11
12
13 499

14 15 500 **DATA ACCESSIBILITY**

16
17
18 501 *Accession numbers:* All *cyt b* sequences obtained from bats in the frame of the present
19
20 502 work were deposited on GenBank under accession numbers KR606331 – KR606336
21
22 503 (see Supplementary Table 2). *Leptospira* sequences were deposited on GenBank under
23
24 504 accession numbers KP822572 - KP822607, KP822608 - KP822680, KP822681 -
25
26 505 KP822796, for *adk*, *secY*, *rrs2* genes, respectively (see Supplementary Table 4).

27
28
29 506 *Sequences alignment:* Sequences alignment of each gene is available on Dryad (doi:
30 507 XXXX)
31
32 508

33 34 509 **SUPPLEMENTARY DATA**

35
36 510 [Supplementary data is available at FEMSEC online.](#)
37
38
39 511

40 41 512 **FUNDING**

42
43 513 This work was supported by European Regional Development Funds ERDF-POCT; Réunion
44
45 514 projects [FSOI #31189 and LeptOI #32913]. Y.G. was supported by a scholarship from the
46
47 515 French Ministry of Higher Education and Research. M.D. and B.R. were supported by
48
49 516 postdoctoral fellowships funded by "RUN-Emerge: A Regpot European project funded by
50
51 517 European Commission under FP7 program". B.R. was also supported by The "Fonds de
52
53 518 Coopération Régionale" of the Préfecture de La Réunion and a grant from the Dr. Ralph and
54
55 519 Marian Falk Medical Research Trust to The Field Museum of Natural History, Chicago. N.
56
57
58
59
60

1
2
3
4 520 W. was funded by the German Research Foundation (DFG) [Proj. No. MI439/14-1].
5
6

7 521

8 522 *Conflict of interest.* None declared.
9

10 523

11 524 **ACKNOWLEDGMENTS**

12
13
14
15 525 We are grateful to Département de Biologie Animale, Université d'Antananarivo; Ministère
16
17 526 de l'Environnement et des Forêts, Direction du Système des Aires Protégées, Direction
18
19 527 Générale de l'Environnement et des Forêts; and Madagascar National Parks (Madagascar) for
20
21 528 kindly providing research and export permits (N°194/12/MEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCB,
22
23 529 N°032/12/MEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCBSE, N°283/11/MEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCB,
24
25 530 N°067/12/MEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCBSE, N°077/12/MEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCBSE).
26
27 531 Samples from *Pteropus rufus* were exported to La Réunion (CRVOI) with a CITES permit
28
29 532 provided by the Malagasy national authority (permit # 243C-EA06/MG12). We acknowledge
30
31 533 Jean-Michel Héraud and other members of the Institut Pasteur de Madagascar for facilitating
32
33 534 sample storage and exportation. We thank Julien Mélade and David Wilkinson for their help
34
35 535 in the laboratory. Phylogenies were performed on the University of Reunion Island
36
37 536 supercomputer facility.
38
39
40
41

42 537

43
44 538
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

539 REFERENCES

- 540 Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*
541 2010;**140**:287–96.
- 542
- 543 Agnarsson I, Zambrana-Torrel CM, Flores-Saldana NP, et al. A time-calibrated species-
544 level phylogeny of bats (Chiroptera, Mammalia). *PLoS Curr* 2011;**3**,RRN1212.
- 545 Ahmed A, Grobusch MP, Klaster PR, et al. Molecular approaches in the detection and
546 characterization of *Leptospira*. *J Bacteriol Parasitol* 2012;**3**,133.
- 547 Ahmed N, Devi SM, Valverde M de los Á, et al. Multilocus sequence typing method for
548 identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin*
549 *Microbiol Antimicrob* 2006;**5**:28.
- 550 Balbuena JA, Míguez-Lozano R, Blasco-Costa I. PACo: a novel procrustes application to
551 cophylogenetic analysis. *PLoS One* 2013;**8**:e61048.
- 552 Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance.
553 *Lancet Infect Dis* 2003;**3**:757–71.
- 554 Bourhy P, Collet L, Brisse S, et al. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of
555 the genus *Leptospira* isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014;**64**:4061–
556 7.
- 557 Bunnell JE, Hice CL, Watts DM, et al. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. infections
558 among mammals captured in the Peruvian Amazon basin region. *Am J Trop Med Hyg*
559 2000;**63**:255–8.
- 560 Calisher CH, Childs JE, Field HE, et al. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses.
561 *Clin Microbiol Rev* 2006;**19**:531–45.
- 562 Cameron CE, Zuerner RL, Raverty S, et al. Detection of pathogenic *Leptospira* bacteria in
563 pinniped populations via PCR and identification of a source of transmission for
564 zoonotic leptospirosis in the marine environment. *J Clin Microbiol* 2008;**46**:1728–33.
- 565 Charleston MA. TreeMap 3b. Available from <http://sites.google.com/site/cophylogeny>, 2011.

- 1
2
3
4 566 Chomel BB, Stuckey MJ, Boulouis H-J, et al. Bat-related zoonoses. In: Sing A (ed.).
5 567 *Zoonoses - infections affecting humans and animals*. Netherlands: Springer, 2015,
6 568 697–714.
- 9
10 569 Christidis L, Goodman SM, Naughton K, et al. Insights into the evolution of a cryptic
11 570 radiation of bats: dispersal and ecological radiation of Malagasy *Miniopterus*
12 571 (Chiroptera: Miniopteridae). *PLoS One* 2014;**9**:e92440.
- 15
16 572 Cornet A. Essai de cartographie bioclimatique à Madagascar. *Not Explic ORSTOM*
17 573 1974;**55**:1–28.
- 19
20 574 Cosson J-F, Picardeau M, Mielcarek M, et al. Epidemiology of *Leptospira* transmitted by
21 575 rodents in Southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;**8**:e2902.
- 23
24 576 Cox TE, Smythe LD, Leung LK-P. Flying foxes as carriers of pathogenic *Leptospira* species.
25 577 *J Wildl Dis* 2005;**41**:753–7.
- 27
28 578 Desvars A, Naze F, Vourc'h G et al. Similarities in *Leptospira* serogroup and species
29 579 distribution in animals and humans in the Indian Ocean island of Mayotte. *Am J Trop*
30 580 *Med Hyg* 2012;**87**:134–40.
- 32
33 581 Dietrich M, Wilkinson DA, Soarimalala V, et al. Diversification of an emerging pathogen in a
34 582 biodiversity hotspot: *Leptospira* in endemic small mammals of Madagascar. *Mol Ecol*
35 583 2014;**23**:2783-96.
- 37
38 584 Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *J Veg Sci* 2003;**14**:927–
39 585 30.
- 41
42 586 Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, et al. Geneious, version 5.4. Available from
43 587 <http://www.geneious.com>. 2011.
- 45
46 588 Duron O, Schnepapat UE, Berthomieu A, et al. Origin, acquisition and diversification of
47 589 heritable bacterial endosymbionts in louse flies and bat flies. *Mol Ecol* 2014;**23**:2105–
48 590 17.
- 50
51 591 Emanuel ML, Mackerras IM, Smith DJW. The epidemiology of leptospirosis in North

- 1
2
3
4 592 Queensland: I. General survey of animal hosts. *Epidemiol Infect* 1964;**62**:451–84.
5
6
7 593 Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform
8 594 population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour*
9 595 2010;**10**:564–7.
10
11
12 596 Fennestad KL, Borg-Petersen C. Leptospirosis in Danish wild mammals. *J Wildl Dis*
13 597 1972;**8**:343–51.
14
15
16 598 Franco Bessa TÁ, Spichler A, Berardis Chapola ÉG, et al. The contribution of bats to
17 599 leptospirosis transmission in São Paulo city, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*
18 600 2010;**82**:315–7.
19
20
21 601 Goodman SM. *Les chauves-souris de Madagascar*. Antananarivo, Madagascar : Association
22 602 Vahatra, 2011.
23
24
25 603 Goodman SM, Rakotondramanana CF, Ramasindrazana B, et al. An integrative approach to
26 604 characterize Malagasy bats of the subfamily Vespertilioninae Gray, 1821, with the
27 605 description of a new species of *Hypsugo*. *Zool J Linn Soc* 2015a;**173**:988–1018.
28
29
30 606 Goodman SM, Ramasindrazana B, Naughton KM, et al. Description of a new species of the
31 607 *Miniopterus aelleni* group (Chiroptera: Miniopteridae) from upland areas of central
32 608 and northern Madagascar. *Zootaxa* 2015b;**3936**:538–58.
33
34
35 609 Goodman SM, Ramasindrazana B. Bats or order Chiroptera. In: Goodman SM and
36 610 Raheerilalao MJ (eds.). *Atlas of Selected Land Vertebrates of Madagascar*.
37 611 Antananarivo, Madagascar: Association Vahatra, 2013, 169–209.
38
39
40 612 Hayman DTS, Bowen RA, Cryan PM, et al. Ecology of zoonotic infectious diseases in bats:
41 613 current knowledge and future directions. *Zoonoses Public Health* 2013;**60**:2–21.
42
43
44 614 Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *J Mol*
45 615 *Evol* 1991;**32**:128–44.
46
47
48 616 Koizumi N, Izumiya H, Mu J-J, et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis
49 617 of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii* isolated from small feral and
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 618 wild mammals in East Asia. *Infect Genet Evol* 2015, DOI:
5 619 10.1016/j.meegid.2015.08.013.
6
7
8 620 Kunz TH, Braun de Torrez E, Bauer D, et al. Ecosystem services provided by bats. *Ann N Y*
9 621 *Acad Sci* 2011;**1223**:1–38.
10
11
12 622 Lagadec E, Gomard Y, Guernier V, et al. Pathogenic *Leptospira* spp. in bats, Madagascar and
13 623 Union of the Comoros. *Emerg Infect Dis* 2012;**18**:1696–8.
14
15
16 624 Legendre P, Desdevises Y, Bazin E. A statistical test for host–parasite coevolution. *Syst Biol*
17 625 2002;**51**:217–34.
18
19
20 626 Lehmann JS, Matthias MA, Vinetz JM, et al. Leptospirosis pathogenomics. *Pathogens*
21 627 2014;**3**:280–308.
22
23
24 628 Lei BR, Olival KJ. Contrasting patterns in mammal–bacteria coevolution: *Bartonella* and
25 629 *Leptospira* in bats and rodents. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;**8**:e2738.
26
27
28 630 Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;**14**:296–326.
29
30
31 631 Librado P, Rozas J. DnaSP v.5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism
32 632 data. *Bioinformatics* 2009;**25**:1451–2.
33
34
35 633 Matsui M, Roche L, Soupé-Gilbert M-E, et al. Experimental hamster infection with a strain of
36 634 *Leptospira borgpetersenii* Ballum isolated from a reservoir mouse in New Caledonia.
37 635 *Am J Trop Med Hyg* 2015;**92**,982-5.
38
39
40 636 Matthias MA, Díaz MM, Campos KJ, et al. Diversity of bat-associated *Leptospira* in the
41 637 Peruvian Amazon inferred by Bayesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA
42 638 sequences. *Am J Trop Med Hyg* 2005;**73**:964–74.
43
44
45 639 Merkle D, Middendorf M, Wieseke N. A parameter-adaptive dynamic programming approach
46 640 for inferring cophylogenies. *BMC Bioinformatics* 2010;**11**:S60.
47
48
49 641 Mgode GF, Mbugi HA, Mhamphi GG, et al. Seroprevalence of *Leptospira* infection in bats
50 642 roosting in human settlements in Morogoro municipality in Tanzania. *Tanzan J Health*
51 643 *Res* 2014;**16**, DOI: 10.4314/thrb.v16i1.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure legends

Fig. 1 Phylogenetic tree based on pathogenic *Leptospira secY* (482 bp) gene. The analysis was carried out using Bayesian Inference under the HKY+I substitution model. Nodal values correspond to posterior probabilities. The letters (A to G) designate the main well-supported *Leptospira* clades. *Leptospira* haplotypes are coloured according to host family (red: Hipposideridae, blue: Miniopteridae, purple: Molossidae, orange: Pteropodidae, light blue: Rhinonycteridae and green: Vespertilionidae). Names typed in black refer to *Leptospira* (*L.*) sequences accessible from GenBank (see Supplementary Table 1). *Hi*: *Hipposideros*, *Mi*: *Miniopterus*, *Mo*: *Mormopterus*, *My*: *Myotis*, *Ne*: *Neoromicia*, *Ot*: *Otomops*, *Ro*: *Rousettus* and *Tr*: *Triaenops*.

Fig. 2 Distribution of pathogenic *Leptospira* spp. in bats sampled in different sites and bioclimatic regions (Cornet 1974) of Madagascar. *Leptospira* phylogeny is based on *secY* sequences. For details on code colours and acronyms see Figure 1 and for sampling sites (example: BET, TSP, VINT...) see Supplementary Table 3.

Fig. 3 Correlation between *Leptospira* haplotype diversity (based on the *secY* gene) and host species richness within sampling sites ($r^2 = 0.87$, $df = 12$, $P\text{-value} < 0.001$, Pearson's R correlation test). At a given sampling site, the number of host corresponds to the number of bat species from which at least one *secY* sequence was obtained.

Fig. 4 Representation of the most parsimonious co-evolutionary scenario for *Leptospira* (light grey) and bat lineages (dark grey) proposed by CoRe-Pa. *Leptospira* and bat phylogenies were based on *secY* and *cyt b*, respectively. As for *Leptospira* lineages, 17 distinct groups were defined based on the *secY* phylogeny and numbered accordingly. A given *Leptospira* can be found in different bat species and is annotated as for example: Lepto8#1 in *Miniopterus manavi* and Lepto8#2 in *Miniopterus sororculus*. Each colour corresponds to a bat family (yellow: Emballonuridae, red: Hipposideridae, blue: Miniopteridae, purple: Molossidae, orange: Pteropodidae, light blue: Rhinonycteridae and green: Vespertilionidae). *Co*: *Coleura*, *Hi*: *Hipposideros*, *Mi*: *Miniopterus*, *Mo*: *Mormopterus*, *My*: *Myotis*, *Ne*: *Neoromicia*, *Pa*: *Paratriaenops*, *Ot*: *Otomops*, *Ro*: *Rousettus*, *Sc*: *Scotophilus* and *Tr*: *Triaenops*.

1 **Supplementary Table 1.** Details on *Leptospira* sequences from GenBank used in the present study. NA: not available or not used in the present
 2 study.
 3

<i>Leptospira</i> species	secY	adk	rrs2	Isolation source	Site / Country
<i>Leptospira alexanderi</i>	AHMT02000039	NA	AY631880	<i>Homo sapiens</i>	China
<i>Leptospira alstoni</i>	NZ_AOHD02000041	NA	DQ991480.1	Frog	Pingchang (China)
<i>Leptospira biflexa</i>	CP000786	CP000786	NR_102883	NA	NA
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	JN683933	JN683882	JN683865	<i>Homo sapiens</i>	Mayotte (France)
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	JN683939	JN683888	JN683871	<i>Homo sapiens</i>	Mayotte (France)
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	JN683944	JN683893	JN683876	<i>Homo sapiens</i>	Mayotte (France)
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	JN683943	JN683892	JN683875	<i>Homo sapiens</i>	Mayotte (France)
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	NA	NA	AY995713	<i>Sturnira litium</i>	Peru
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	NA	NA	AY995714	<i>Sturnira tildae</i>	Peru
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	NA	NA	AY995715	<i>Desmodus rotundus</i>	Peru
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	NA	NA	AY995716	<i>Carollia perspicillata</i>	Peru
<i>Leptospira broomii</i>	AHMO02000008	AHMO02000008	AHMO02000008	<i>Homo sapiens</i>	Denmark
<i>Leptospira fainei</i>	AKWZ02000010	AKWZ02000010	AY631885	<i>Sus scrofa</i>	Australia
<i>Leptospira fainei</i>	NA	NA	AY995712	<i>Uroderma bilobatum</i>	Peru
<i>Leptospira inadai</i>	AHMM02000015	AHMM02000015	AHMM02000015	<i>Homo sapiens</i>	USA
<i>Leptospira interrogans</i>	JN683938	JN683887	JN683870	<i>Homo sapiens</i>	Mayotte (France)
<i>Leptospira interrogans</i>	JF509188	JF509328	JF509216	NA	Thailand

<i>Leptospira interrogans</i>	NA	NA	AY995729	<i>Promops nasutus</i>	Peru
<i>Leptospira kirschneri</i>	JN683930	JN683879	JN683862	<i>Homo sapiens</i>	Mayotte (France)
<i>Leptospira kirschneri</i>	JN683932	JN683881	JN683864	<i>Homo sapiens</i>	Imported from Nosy Be (Madagascar)
<i>Leptospira kirschneri</i>	NA	NA	AY995730	<i>Phyllostomus hastatus</i>	Peru
<i>Leptospira kmetyi</i>	AHMP02000003	NA	NR_041544	soil	Malaysia
<i>Leptospira licherasiae</i>	NZ_AFL001000002	NA	EF612287	<i>Philander opossum</i>	Peru
<i>Leptospira mayottensis</i>	JN683931	JN683880	JN683863	<i>Homo sapiens</i>	Mayotte (France)
<i>Leptospira mayottensis</i>	JN683934	JN683883	JN683866	<i>Homo sapiens</i>	Mayotte (France)
<i>Leptospira meyeri</i>	NZ_AKXE01000001	NZ_AKXE01000001	AY631889	<i>Homo sapiens</i>	Canada
<i>Leptospira meyeri</i>	ANIL01000018	ANIL01000018	FJ154599	<i>Rattus sp.</i>	Indonesia
<i>Leptospira noguchii</i>	NZ_AKWY02000014	NZ_AKWY02000014	AY631886	<i>Didelphis marsupialis</i>	Panama
<i>Leptospira noguchii</i>	AHMF02000105.1	NA	NA	<i>Homo sapiens</i>	Hawaii (USA)
<i>Leptospira santarosai</i>	NZ_ANNW01000041	NZ_ANNW01000041	NA	<i>Homo sapiens</i>	Iquitos, (Peru)
<i>Leptospira santarosai</i>	NZ_AOHB02000045	NZ_AOHB02000045	FJ154576	<i>Homo sapiens</i>	Iquitos, (Peru)
<i>Leptospira sp.</i>	NA	NA	AY995717	<i>Lonchophylla thomasi</i>	Peru
<i>Leptospira sp.</i>	NA	NA	AY995718	<i>Artibeus planirostris</i>	Peru
<i>Leptospira sp.</i>	NA	NA	AY995719	<i>Artibeus planirostris</i>	Peru
<i>Leptospira sp.</i>	NA	NA	AY995720	<i>Rhinophylla pumilio</i>	Peru
<i>Leptospira sp.</i>	NA	NA	AY995721	<i>Glossophaga soricina</i>	Peru
<i>Leptospira sp.</i>	NA	NA	AY995722	<i>Mimon crenulatum</i>	Peru
<i>Leptospira sp.</i>	NA	NA	AY995723	<i>Myotis riparius</i>	Peru

1	<i>Leptospira</i> sp.	NA	NA	AY995724	<i>Lonchophylla thomasi</i>	Peru
2	<i>Leptospira</i> sp.	NA	NA	AY995725	<i>Uroderma bilobatum</i>	Peru
3	<i>Leptospira</i> sp.	NA	NA	AY995726	<i>Glossophaga soricina</i>	Peru
4	<i>Leptospira</i> sp.	NA	NA	AY995727	<i>Artibeus obscurus</i>	Peru
5	<i>Leptospira</i> sp.	NA	NA	AY995728	<i>Rhinophylla pumilio</i>	Peru
6	<i>Leptospira</i> sp.	NA	NA	JQ288729	<i>Otomops madagascariensis</i>	Madagascar
7	<i>Leptospira</i> sp.	NA	NA	JQ288730	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	Madagascar
8	<i>Leptospira</i> sp.	NA	NA	JQ288731	<i>Triaeonops menamena</i>	Madagascar
9	<i>Leptospira</i> sp.	NA	NA	JQ288732	<i>Rousettus obliviosus</i>	Comoros
10	<i>Leptospira</i> sp.	NA	NA	JQ288733	<i>Rousettus obliviosus</i>	Comoros
11	<i>Leptospira</i> sp.	NA	NA	JQ288734	<i>Miniopterus griveaudi</i>	Comoros
12	<i>Leptospira</i> sp.	NA	NA	JQ302791	<i>Myotis goudoti</i>	Madagascar
13	<i>Leptospira terpstrae</i>	AOGW02000010	AOGW02000010	AY631888	NA	China
14	<i>Leptospira vanthielii</i>	NZ_AOGY02000051	NZ_AOGY02000051	AY631897	Isolated from water	Netherlands
15	<i>Leptospira weilii</i>	NZ_AHNC02000010	AFLV02000058	JQ906670	<i>Homo sapiens</i>	Laos
16	<i>Leptospira wolbachii</i>	AOGZ02000008	AOGZ02000008	ZZ1638	NA	USA
17	<i>Leptospira wolffii</i>	NZ_AKWXX02000023	NZ_AKWXX02000023	EF025496	<i>Homo sapiens</i>	Thailand
18	<i>Leptospira yanagawae</i>	NZ_AOGX02000024	NA	AY631882	Isolated from water	Brazil

4 **Supplementary Table 2.** GenBank accession number of Cytochrome b (*cyt b*) sequences
 5 from bat species used in this study, the asterisk indicates the sequences of *cyt b* generated in
 6 this study. Asterisks indicate the sequences produced in the present study.

Bat family	Bat species	Cytochrome b GenBank accession number
Emballonuridae	<i>Coleura kibomalandy</i>	JQ710748
Hipposideridae	<i>Hipposideros commersoni</i>	KR606333 *
Miniopteridae	<i>Miniopterus griffithsi</i>	JF440240
	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	FJ383166
	<i>Miniopterus majori</i>	HQ619939
	<i>Miniopterus manavi</i>	HQ619934
	<i>Miniopterus sororculus</i>	JF440282
Molossidae	<i>Mormopterus jugularis</i>	KR606332 *
	<i>Otomops madagascariensis</i>	KR606335 *
Rhinonycteridae	<i>Paratriaenops furculus</i>	KR606331 *
	<i>Triaenops menamena</i>	KR606334
Pteropodidae	<i>Rousettus madagascariensis</i>	GU228727
Vespertilionidae	<i>Myotis goudoti</i>	GU116769
	<i>Neoromicia robertsi</i>	KR606336 *
	<i>Scotophilus marovaza</i>	EU750943

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

18 **Supplementary Table 3.** Details of sampling sites: locality code, province, description, type
19 of site and number of specimens investigated at each site. (See *Supplementary Table 3 in*
20 *Excel*)
21

For Peer Review

22 **Supplementary Table 4.** Details on *Leptospira* sequences produced used in this study; GenBank accession number for three genes: *secY*, *adk*,
 23 and *rrs2*; information on the host: museum number, bat species and family and locality of sampling. For locality details see Supplementary Table
 24 3. NA: not available.
 25

Bat family	Bat species	Collection date	Museum Number	Locality	<i>Leptospira</i> isolate	GenBank accession number of <i>Leptospira</i> marker		
						<i>secY</i>	<i>adk</i>	<i>rrs2</i>
Emballonuridae	<i>Coleura kibomalandy</i>	17/09/12	FMNH 221311	CROCO	580MG	NA	NA	KP822681
Hipposideridae	<i>Hipposideros commersoni</i>	10/02/12	FMNH 217964	BEKO	43MG	KP822608	KP822572	KP822682
	<i>Hipposideros commersoni</i>	10/02/12	FMNH 217965	BEKO	44MG	NA	NA	KP822683
	<i>Hipposideros commersoni</i>	10/02/12	FMNH 217966	BEKO	45MG	KP822609	KP822573	KP822684
	<i>Hipposideros commersoni</i>	10/02/12	UADBA 32377	BEKO	46MG	NA	NA	KP822685
	<i>Hipposideros commersoni</i>	16/03/12	UADBA 50269	BEK	792MG	KP822610	KP822574	KP822686
	<i>Hipposideros commersoni</i>	16/03/12	FMNH 218015	BEK	794MG	KP822611	NA	KP822687
	<i>Hipposideros commersoni</i>	17/03/12	FMNH 218016	BEK	800MG	NA	NA	KP822688
	<i>Hipposideros commersoni</i>	17/03/12	FMNH 218018	BEK	801MG	NA	NA	KP822689
	<i>Hipposideros commersoni</i>	15/09/12	UADBA 32989	ANDRF2	562MG	KP822612	KP822575	KP822690
	<i>Hipposideros commersoni</i>	12/02/12	UADBA 32919	TANA	92MG	NA	NA	KP822757
Miniopteridae	<i>Miniopterus manavi sensu lato</i>	20/09/12	UADBA 33034	AMBT	607MG	KP822622	KP822578	KP822711
	<i>Miniopterus manavi sensu lato</i>	20/09/12	UADBA 33035	AMBT	608MG	NA	NA	KP822712
	<i>Miniopterus manavi sensu lato</i>	20/09/12	UADBA 33037	AMBT	610MG	NA	NA	KP822713
	<i>Miniopterus manavi sensu lato</i>	20/09/12	FMNH 221421	AMBT	615MG	KP822623	NA	KP822714

1		<i>Miniopterus manavi sensu lato</i>	20/09/12	FMNH 221425	AMBT	52MG	KP822624	NA	KP822715
2		<i>Miniopterus manavi sensu lato</i>	20/09/12	FMNH 221426	AMBT	616MG	KP822625	KP822579	KP822716
3		<i>Miniopterus manavi sensu lato</i>	20/09/12	FMNH 221427	AMBT	968MG	KP822626	KP822580	KP822717
4		<i>Miniopterus manavi sensu lato</i>	20/09/12	FMNH 221429	AMBT	53MG	KP822627	NA	KP822718
5		<i>Miniopterus griffithsi</i>	24/04/12	FMNH 218061	VINT	170MG	NA	KP822581	KP822719
6		<i>Miniopterus griffithsi</i>	24/04/12	FMNH 218062	VINT	174MG	KP822628	NA	KP822720
7		<i>Miniopterus griffithsi</i>	24/04/12	UADBA 50142	VINT	183MG	KP822629	NA	KP822721
8		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	10/02/12	FMNH 217957	BEKO	36MG	NA	KP822582	KP822722
9		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	12/02/12	UADBA 32355	AMB	76MG	NA	NA	KP822723
10		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	12/02/12	UADBA 32364	TANA	99MG	KP822630	KP822583	KP822724
11		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	15/02/12	FMNH 217988	ANDR	118MG	NA	NA	KP822725
12		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	15/02/12	UADBA 32371	ANDR	50MG	KP822631	NA	KP822726
13		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	15/02/12	FMNH 217990	ANDR	120MG	NA	NA	KP822727
14		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	15/02/12	FMNH 217992	ANDR	122MG	NA	NA	KP822728
15		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	15/02/12	FMNH 217993	ANDR	123MG	KP822632	KP822584	KP822729
16		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	14/03/12	UADBA 50162	ISALO1	741MG	KP822633	NA	KP822730
17		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	14/03/12	FMNH 218040	ISALO1	742MG	KP822634	NA	NA
18		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	14/03/12	FMNH 218042	ISALO1	743MG	KP822635	NA	KP822731
19		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	14/03/12	FMNH 218045	ISALO1	749MG	KP822636	KP822585	KP822732
20		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	14/03/12	UADBA 50155	ISALO1	750MG	KP822637	NA	KP822733
21		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	14/03/12	UADBA 50157	ISALO1	753MG	KP822638	KP822586	KP822734
22		<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	14/03/12	UADBA 50158	ISALO1	950MG	KP822639	KP822587	KP822735

	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	14/03/12	UADBA 50160	ISALO1	755MG	KP822640	KP822588	KP822736
	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	14/03/12	FMNH 218047	ISALO1	757MG	KP822641	NA	KP822737
	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	17/03/12	FMNH 218050	BEK	796MG	KP822642	KP822589	KP822738
	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	21/04/12	UADBA 50176	TSP	142MG	NA	NA	KP822739
	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	21/04/12	UADBA 50179	TSP	145MG	KP822643	NA	KP822740
	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	21/04/12	UADBA 50180	TSP	146MG	KP822644	NA	KP822741
	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	21/04/12	UADBA 50184	TSP	150MG	NA	NA	KP822742
	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	21/04/12	UADBA 50185	TSP	151MG	KP822645	NA	KP822743
	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	22/04/12	UADBA 50186	TSP	152MG	KP822646	NA	KP822744
	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	26/04/12	UADBA 50216	TSP	188MG	KP822647	NA	KP822745
	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	26/04/12	UADBA 50219	TSP	191MG	KP822648	NA	KP822746
	<i>Miniopterus mahafaliensis</i>	15/03/13	FMNH 222721	ISALO2	897MG	KP822649	NA	KP822747
	<i>Miniopterus majori</i>	12/03/12	FMNH 218008	FAND	728MG	KP822650	KP822590	KP822748
	<i>Miniopterus sororculus</i>	15/02/12	FMNH 217985	ANDR	115MG	KP822651	NA	KP822749
	<i>Miniopterus sororculus</i>	12/03/12	UADBA 50173	FAND	724MG	NA	NA	KP822750
	<i>Miniopterus sororculus</i>	12/03/12	FMNH 218007	FAND	736MG	KP822652	KP822591	KP822751
	<i>Miniopterus sororculus</i>	16/03/12	UADBA 50344	BEK	772MG	NA	NA	KP822752
	<i>Miniopterus sororculus</i>	16/03/12	FMNH 218033	BEK	773MG	KP822653	KP822592	KP822753
	<i>Miniopterus sororculus</i>	16/03/12	FMNH 218036	BEK	783MG	KP822654	KP822593	KP822754
	<i>Miniopterus sororculus</i>	16/03/12	FMNH 218038	BEK	785MG	NA	NA	KP822755
	<i>Miniopterus sororculus</i>	16/03/12	UADBA 50168	BEK	790MG	KP822655	KP822594	KP822756
	<i>Mormopterus jugularis</i>	08/02/12	UADBA 32335	MAKI	8MG	NA	NA	KP822758
	Molossidae							

	<i>Mormopterus jugularis</i>	08/02/12	UADBA 32339	MAKI	12MG	KP822656	KP822595	KP822759
	<i>Mormopterus jugularis</i>	08/02/12	UADBA 32340	MAKI	13MG	NA	NA	KP822760
	<i>Mormopterus jugularis</i>	08/02/12	UADBA 32342	MAKI	15MG	KP822657	NA	KP822761
	<i>Mormopterus jugularis</i>	08/02/12	UADBA 32346	MAKI	31MG	NA	NA	KP822762
	<i>Mormopterus jugularis</i>	08/02/12	FMNH 217944	MAKI	20MG	NA	NA	KP822763
	<i>Mormopterus jugularis</i>	15/02/12	FMNH 217978	ANK	108MG	KP822658	NA	KP822764
	<i>Mormopterus jugularis</i>	15/02/12	FMNH 217980	ANK	110MG	NA	NA	KP822765
	<i>Mormopterus jugularis</i>	15/03/12	UADBA 50208	ISALO1	762MG	KP822659	KP822596	KP822766
	<i>Mormopterus jugularis</i>	24/04/12	UADBA 50195	ITA	165MG	NA	NA	KP822767
	<i>Mormopterus jugularis</i>	24/04/12	UADBA 50197	VINT	172MG	KP822660	NA	KP822768
	<i>Mormopterus jugularis</i>	26/04/12	UADBA 50200	BET	204MG	NA	NA	KP822769
	<i>Mormopterus jugularis</i>	26/04/12	UADBA 50202	BET	206MG	KP822661	NA	KP822770
	<i>Mormopterus jugularis</i>	26/04/12	UADBA 50205	BET	209MG	KP822662	NA	KP822771
	<i>Mormopterus jugularis</i>	10/03/13	FMNH 222735	ANDA 1	911MG	KP822663	KP822597	KP822772
	<i>Otomops madagascariensis</i>	10/02/12	UADBA 32325	TANA	68MG	KP822664	KP822598	KP822773
	<i>Otomops madagascariensis</i>	11/02/12	UADBA 32330	TANA	71MG	NA	KP822599	KP822774
	<i>Otomops madagascariensis</i>	08/09/12	FMNH 221380	ANJHB	418MG	KP822665	KP822600	KP822775
Pteropodidae	<i>Rousettus madagascariensis</i>	07/09/12	FMNH 221362	ANJHB	407MG	NA	NA	KP822776
	<i>Rousettus madagascariensis</i>	09/09/12	FMNH 221369	ANTNM	453MG	KP822666	NA	KP822777
	<i>Rousettus madagascariensis</i>	09/09/12	FMNH 221372	ANTNM	459MG	NA	NA	KP822778
	<i>Rousettus madagascariensis</i>	14/09/12	UADBA 32970	CGS	525MG	NA	NA	KP822779
	<i>Rousettus madagascariensis</i>	14/09/12	FMNH 221300	CGS	530MG	KP822667	KP822601	KP822780

	<i>Rousettus madagascariensis</i>	14/09/12	FMNH 221301	CGS	531MG	NA	NA	KP822781
	<i>Rousettus madagascariensis</i>	14/09/12	FMNH 221302	CGS	532MG	NA	NA	KP822782
	<i>Rousettus madagascariensis</i>	06/11/12	FMNH 221431	ANJKK	632MG	KP822668	KP822602	KP822783
Rhinonycteridae	<i>Paratriaenops furculus</i>	10/02/12	FMNH 217969	BEKO	49MG	NA	NA	KP822710
	<i>Triaenops menamena</i>	10/02/12	FMNH 217968	BEKO	48MG	KP822613	NA	KP822691
	<i>Triaenops menamena</i>	12/02/12	UADBA 32383	TANA	95MG	KP822614	NA	KP822692
	<i>Triaenops menamena</i>	14/03/12	UADBA 50143	ISALO1	733MG	KP822615	KP822576	KP822693
	<i>Triaenops menamena</i>	21/04/12	UADBA 50147	TSP	133MG	NA	NA	KP822694
	<i>Triaenops menamena</i>	21/04/12	UADBA 50148	TSP	134MG	NA	NA	KP822695
	<i>Triaenops menamena</i>	21/04/12	FMNH 218540	TSP	138MG	KP822616	NA	KP822696
	<i>Triaenops menamena</i>	21/04/12	FMNH 218058	TSP	141MG	NA	NA	KP822697
	<i>Triaenops menamena</i>	23/04/12	UADBA 50331	ANDRO	157MG	NA	NA	KP822698
	<i>Triaenops menamena</i>	23/04/12	UADBA 50335	ANDRO	161MG	NA	NA	KP822699
	<i>Triaenops menamena</i>	24/04/12	UADBA 50337	VINT	176MG	NA	NA	KP822700
	<i>Triaenops menamena</i>	24/04/12	FMNH 218064	VINT	177MG	KP822617	NA	KP822701
	<i>Triaenops menamena</i>	24/04/12	FMNH 218065	VINT	178MG	NA	NA	KP822702
	<i>Triaenops menamena</i>	24/04/12	FMNH 218070	VINT	184MG	NA	NA	KP822703
	<i>Triaenops menamena</i>	24/04/12	FMNH 218071	VINT	185MG	NA	NA	KP822704
	<i>Triaenops menamena</i>	09/09/12	FMNH 221376	ANTNM	460MG	KP822618	NA	NA
	<i>Triaenops menamena</i>	09/09/12	FMNH 221377	ANTNM	461MG	NA	NA	KP822705
	<i>Triaenops menamena</i>	10/09/12	UADBA 32920	BEEN	483MG	KP822619	NA	KP822706
	<i>Triaenops menamena</i>	15/09/12	UADBA 32984	ANDRF2	566MG	KP822620	NA	KP822707

	<i>Triaenops menamena</i>	15/09/12	UADBA 32985	ANDRF2	567MG	NA	NA	NA	KP822708
	<i>Triaenops menamena</i>	15/09/12	FMNH 221310	ANDRF2	568MG	KP822621	KP822577	KP822709	KP822709
Vespertilionidae	<i>Myotis goudoti</i>	12/03/12	UADBA 50189	FAND	718MG	KP822669	KP822603	KP822784	KP822784
	<i>Myotis goudoti</i>	12/03/12	FMNH 218005	FAND	721MG	KP822670	NA	KP822785	KP822785
	<i>Myotis goudoti</i>	14/03/12	FMNH 218025	ISALO1	739MG	NA	NA	KP822786	KP822786
	<i>Myotis goudoti</i>	13/09/12	FMNH 221318	AMBB	490MG	KP822671	NA	KP822787	KP822787
	<i>Myotis goudoti</i>	13/09/12	FMNH 221319	AMBB	491MG	KP822672	NA	KP822788	KP822788
	<i>Myotis goudoti</i>	13/09/12	FMNH 221320	AMBB	492MG	KP822673	KP822604	NA	NA
	<i>Myotis goudoti</i>	13/09/12	FMNH 221321	AMBB	493MG	KP822674	KP822605	KP822789	KP822789
	<i>Myotis goudoti</i>	13/09/12	FMNH 221323	AMBB	494MG	KP822675	NA	KP822790	KP822790
	<i>Myotis goudoti</i>	13/09/12	FMNH 221324	AMBB	495MG	NA	NA	KP822791	KP822791
	<i>Myotis goudoti</i>	15/09/12	UABBA 32997	AMBB	556MG	KP822676	NA	NA	NA
	<i>Myotis goudoti</i>	15/09/12	UABBA 32999	ANDRF2	558MG	KP822677	KP822606	KP822792	KP822792
	<i>Myotis goudoti</i>	17/03/12	UABBA 33001	CROCO	594MG	KP822678	KP822607	KP822793	KP822793
	<i>Myotis goudoti</i>	20/09/12	UADBA 33043	AMBT2	55MG	KP822679	NA	KP822794	KP822794
	<i>Neoromicia robertsi</i>	19/03/13	FMNH 222729	ANJOZ1	857MG	KP822680	NA	KP822795	KP822795
	<i>Scotophilus marovaza</i>	09/09/12	FMNH 221393	ANTNM	464MG	NA	NA	KP822796	KP822796

26

27

28

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

29

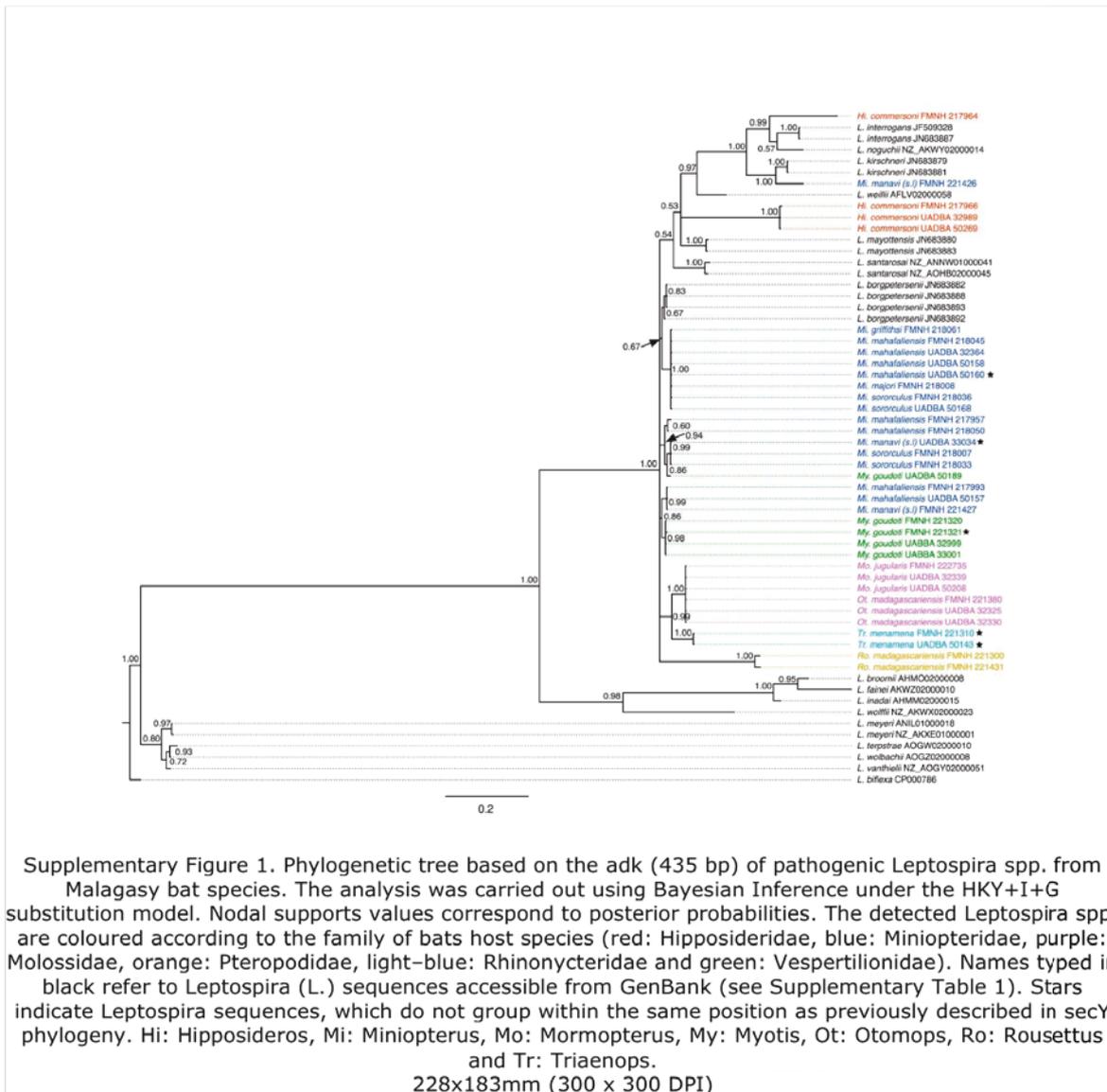
For Peer Review

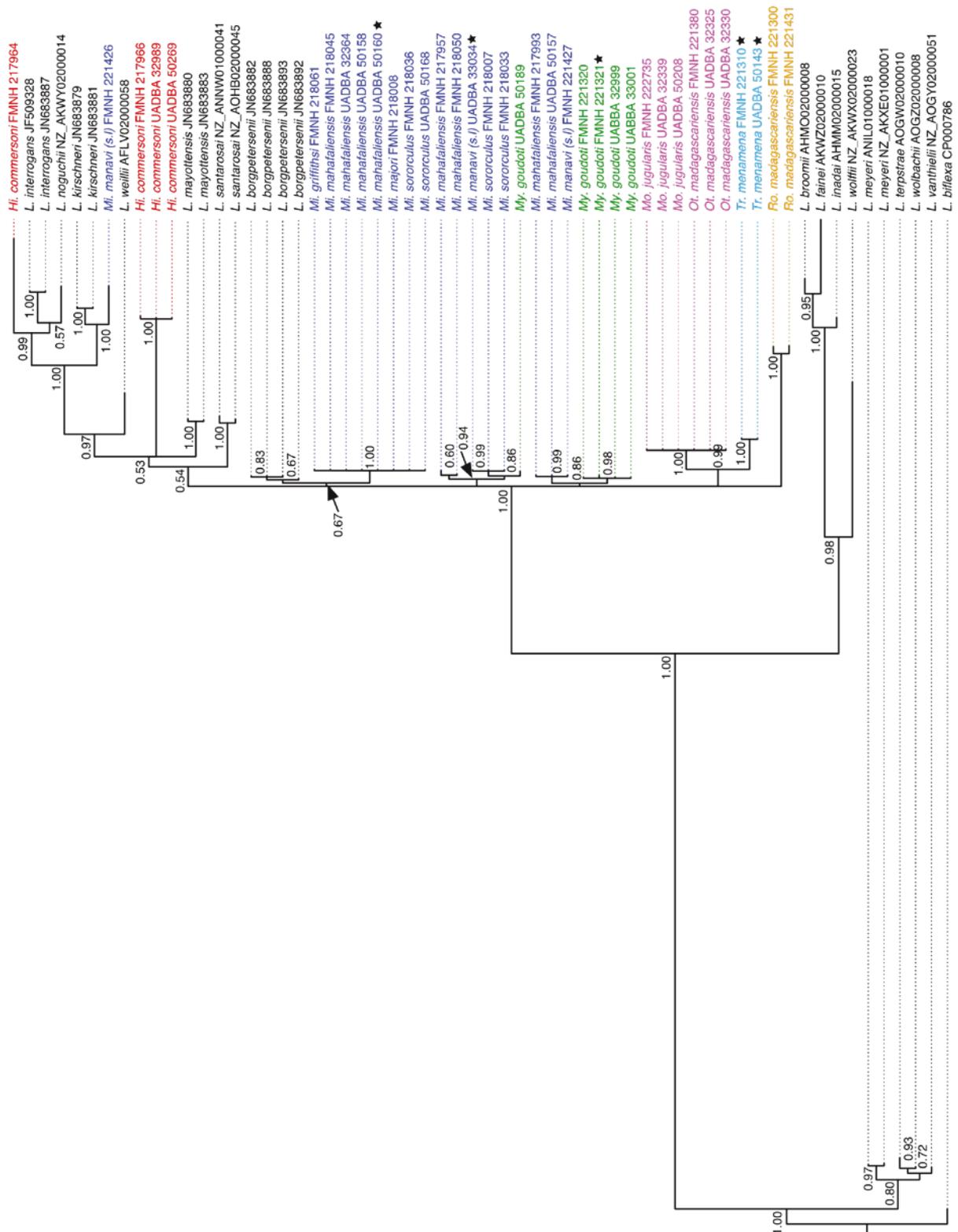
Supplementary figure legends

Supplementary Figure 1. Phylogenetic tree based on the *adk* (435 bp) of pathogenic *Leptospira* spp. from Malagasy bat species. The analysis was carried out using Bayesian Inference under the HKY+I+G substitution model. Nodal supports values correspond to posterior probabilities. The detected *Leptospira* spp. are coloured according to the family of bats host species (red: Hipposideridae, blue: Miniopteridae, purple: Molossidae, orange: Pteropodidae, light-blue: Rhinonycteridae and green: Vespertilionidae). Names typed in black refer to *Leptospira* (*L.*) sequences accessible from GenBank (see Supplementary Table 1). Stars indicate *Leptospira* sequences, which do not group within the same position as previously described in *secY* phylogeny. *Hi*: *Hipposideros*, *Mi*: *Miniopterus*, *Mo*: *Mormopterus*, *My*: *Myotis*, *Ot*: *Otomops*, *Ro*: *Rousettus* and *Tr*: *Triaenops*.

Supplementary Figure 2. Phylogeny based on *Leptospira* spp. *rrs2* sequences (456 bp) from Malagasy bat species. The analysis was carried out using Bayesian Inference under the K2P+I+G substitution model. Nodal supports values correspond to posterior probabilities. The detected *Leptospira* spp. are coloured according to the family of bats host species (yellow: Emballonuridae, red: Hipposideridae, blue: Miniopteridae, purple: Molossidae, orange: Pteropodidae, light-blue: Rhinonycteridae and green: Vespertilionidae). Names typed in black refer to *Leptospira* (*L.*) sequences accessible from GenBank (see Supplementary Table 1). *Co*: *Coleura*, *Hi*: *Hipposideros*, *Mi*: *Miniopterus*, *Mo*: *Mormopterus*, *My*: *Myotis*, *Ne*: *Neoromicia*, *Pa*: *Paratriaenops*, *Ot*: *Otomops*, *Ro*: *Rousettus*, *Sc*: *Scotophilus* and *Tr*: *Triaenops*.

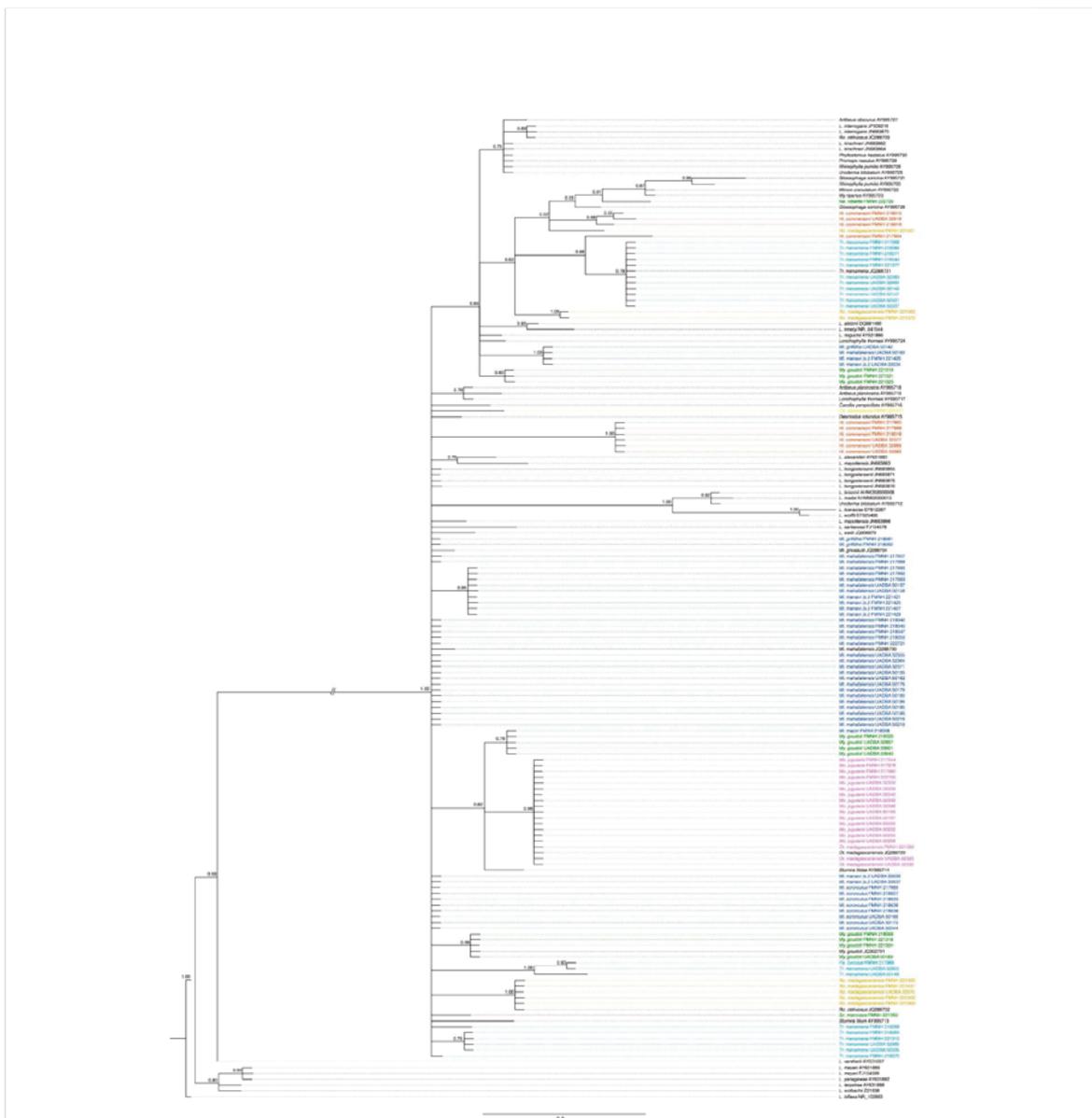
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60





0.2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Supplementary Figure 2. Phylogeny based on *Leptospira* spp. *rrs2* sequences (456 bp) from Malagasy bat species. The analysis was carried out using Bayesian Inference under the K2P+I+G substitution model. Nodal supports values correspond to posterior probabilities. The detected *Leptospira* spp. are coloured according to the family of bats host species (yellow: Emballonuridae, red: Hipposideridae, blue: Miopteridae, purple: Molossidae, orange: Pteropodidae, light-blue: Rhinonycteridae and green: Vespertilionidae). Names typed in black refer to *Leptospira* (L.) sequences accessible from GenBank (see Supplementary Table 1). Co: Coleura, Hi: Hipposideros, Mi: Miopterus, Mo: Mormopterus, My: Myotis, Ne: Neoromicia, Pa: Paratriaenops, Ot: Otomops, Ro: Rousettus, Sc: Scotophilus and Tr: Triaenops.
300x396mm (300 x 300 DPI)

3. Résultats majeurs

Cette étude a mis en évidence **une diversité remarquable des leptospires pathogènes dans les chauves-souris de Madagascar**, confirmant les études présentées dans le chapitre I. De plus, cette étude révèle que la diversité bactérienne est structurée par **une forte spécificité** des leptospires pour leurs **hôtes chiroptères**. En l'**absence de structuration géographique**, **la communauté bactérienne détectée sur un site dépend de l'assemblage des espèces hôtes occupant ce site**. **Le signal de co-évolution** entre les chauves-souris et les leptospires **dépend des marqueurs utilisés**. **La diversité des leptospires** au sein des chauves-souris malgaches résulte **de différents évènements évolutifs** tels que host-switch ou co-spéciation, dont certains ont vraisemblablement été favorisés par l'écologie de ces hôtes mammifères.

Chapitre IV :
Implication des leptospires
de la faune de Mayotte dans
l'épidémiologie de la leptospirose
humaine

1. La leptospirose à Mayotte

L'étude présentée dans ce chapitre intègre la majeure partie des conclusions de cette thèse, à savoir (i) la présence d'une diversité remarquable de leptospires dans la faune régionale résultant de la radiation des mammifères hôtes et (ii) une épidémiologie de la leptospirose humaine particulière dans l'archipel des Comores. **Nous faisons l'hypothèse que cette épidémiologie humaine particulière découle au moins en partie de la présence dans la région d'une diversité de leptospires autochtones voire endémiques et d'origine malgache.**

La leptospirose humaine à Mayotte est caractérisée par une diversité bactérienne importante comprenant au moins quatre espèces de leptospires distinctes : *Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri* et *L. mayottensis*. En se basant sur une partie de la séquence du gène *rrs2*, Amélie Desvars et ses collaborateurs ont montré que *Rattus rattus* (rat noir) était le réservoir des quatre espèces de leptospires à l'origine des cas cliniques à Mayotte (Desvars *et al.* 2012). En cohérence avec les résultats présentés au chapitre III, une étude récente menée sur les petits mammifères terrestres malgaches a révélé une grande diversité de leptospires avec une spécificité d'hôte importante (Dietrich *et al.* 2014). Plus spécifiquement, ce travail démontrait que *L. mayottensis*, détectée jusqu'alors uniquement dans les cas cliniques de Mayotte, résultait de la radiation des espèces de la famille des Tenrecidae sur la grande île (Dietrich *et al.* 2014). Dans ce contexte, nous avons mené une étude sur la faune sauvage endémique et introduite de Mayotte afin d'évaluer le rôle de la faune locale, comportant des taxons d'origine malgache, dans l'épidémiologie humaine de la leptospirose sur l'archipel comorien.

L'article qui suit, soumis à la revue mBio, présente une étude moléculaire sur les leptospires hébergés par la faune mahoraise autochtone et introduite. Afin d'avoir une identification complète, nous avons réalisé une mise en culture des leptospires isolés à partir de reins d'animaux qui ont été ensuite utilisés pour réaliser un génotypage à l'aide de tous les marqueurs d'un schéma Multi Locus Sequences Typing (MLST) précédemment décrit (Ahmed *et al.* 2006 ; Dietrich *et al.* 2014). L'étude a été réalisée sur *R. rattus*, les chiens (*Canis lupus*), les chauves-souris frugivores (*Pteropus seychellensis*) et insectivores (*Chaerephon* sp.), et deux espèces mammifères consommées localement par la population : le zébu (*Bos indica*) et le tangué (*Tenrec ecaudatus*). Rappelons que cette dernière espèce, introduite de Madagascar comme viande de brousse, appartient à la famille des Tenrecidae dont Muriel Dietrich et ses collaborateurs ont montré qu'elle constituait à Madagascar le

réservoir de *L. mayottensis* (Dietrich *et al.* 2014).

2. Article 4

An introduced wild mammal species (*Tenrec*: Tenrecidae) to Mayotte Island, western Indian Ocean, is an important reservoir of the human pathogenic *Leptospira mayottensis*

Lagadec E, **Gomard Y**, Le Minter G, Cordonin C, Cardinale E, Ramasindrazana B, Dietrich M, Goodman S M, Tortosa P and Dellagi K.

Soumis à la revue mBio.

An introduced wild mammal species (*Tenrec*: Tenrecidae) to Mayotte Island, western Indian Ocean, is an important reservoir of the human pathogenic *Leptospira mayottensis*

Running title : Mammal sp. introduction leads to *Leptospira* emergence.

Erwan Lagadec^{1,2}, Yann Gomard^{1,2}, Gildas Le Minter^{1,2}, Colette Cordonin^{1,2}, Eric Cardinale^{1,3}, Beza Ramasindrazana^{1,2}, Muriel Dietrich^{1,4}, Steven M Goodman^{5,6}, Pablo Tortosa^{1,2} and Koussay Dellagi^{1,2*}

¹ Centre de Recherche et de Veille sur les Maladies Emergentes dans l'Océan Indien (CRVOI), Plateforme de Recherche CYROI, 97490 Sainte Clotilde, La Réunion, France.

² Université de La Réunion, UMR PIMIT «Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical», INSERM U 1187, CNRS 9192, IRD 249. Plateforme de Recherche CYROI, 97490 Sainte Clotilde, La Réunion, France.

³ UMR CMAEE « Contrôle des maladies animales, exotiques et émergentes », Plateforme de recherche CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Sainte Clotilde, La Réunion, France.

⁴ Department of Microbiology and Plant Pathology, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria, Pretoria 0002, South Africa.

⁵Field Museum of Natural History, 1400 South Lake Shore Drive, Chicago, IL 60605-2496, United States of America.

⁶Association Vahatra, BP 3972, Antananarivo 101, Madagascar.

***Correspondence to:** Koussay Dellagi, CRVOI, Plateforme de recherche CYROI, 2 rue Maxime Rivière, 97490 Ste Clotilde, France. Email: koussay.dellagi@ird.fr

Abstract

Leptospirosis is a bacterial zoonosis of major concern on tropical islands. Human populations on western Indian Ocean islands are strongly affected by the disease although distinct archipelagos express contrasting epidemiology. For instance, Mayotte, part of the Comoros archipelago, differs from the other neighbouring islands by a high diversity of *Leptospira* species infecting humans that includes *Leptospira mayottensis*, a species thought to be unique to this island. Using Polymerase Chain Reaction, bacterial culture and molecular typing, the present study explored the wild and domestic local fauna for renal carriage of *Leptospira*, characterized the genetic relationships of the infecting strains with local clinical isolates and with *Leptospira* strains hosted by mammal species endemic to nearby Madagascar. *Tenrec ecaudatus* (Family Tenrecidae), a terrestrial mammal introduced from Madagascar, is identified as the exclusive reservoir of *L. mayottensis*. All isolated *L. mayottensis* haplotypes form a monophyletic clade that includes *Leptospira* infecting humans and tenrecs on Mayotte, as well as two other Malagasy endemic tenrecid species of the genus *Microgale*. The lower diversity of *L. mayottensis* in tenrecs from Mayotte, compared to that occurring in Madagascar, suggests that *L. mayottensis* has indeed a Malagasy origin. We also show that introduced rats (*Rattus*) and dogs (*Canis*) are the main reservoirs of *Leptospira borgpetersenii* and *Leptospira kirschneri*, both bacteria being prevalent in local clinical cases. Data emphasize the epidemiological link between the two neighbouring islands and the role played by introduced small mammals in shaping the local epidemiology of leptospirosis.

Importance

Islands are exceptionally prone to species introduction, including pathogens with detrimental public health consequences brought by the establishment of aliens. Our study shows how the local non-native mammal fauna of Mayotte Island have been associated with the introduction and epidemiology of human leptospirosis, a zoonosis strongly affecting tropical islands. Data presented herein identify *Tenrec ecaudatus* (Family Tenrecidae), an insectivorous species introduced from neighbouring Madagascar, as the single reservoir of the recently named *Leptospira mayottensis*. Further, we provide evidence for a Malagasy origin of *L. mayottensis*, which occurs naturally within the Tenrecidae radiation endemic to Madagascar. Altogether, our study highlights the impact of species introduction on human health and further suggests that the biogeography of microorganisms in insular ecosystems, including pathogenic endemic lineages, should be considered from evolutionary and medical perspectives.

Introduction

Leptospirosis is a bacterial zoonosis caused by pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira*. Human infection is common in tropical countries where warm and humid conditions favour the survival of *Leptospira* in water and soil. Human populations living in rural areas or in impoverished urban zones with inadequate sanitation can be exposed to the infection via the contaminated environment. A wide variety of mammal species can be infected by *Leptospira* but not all act as reservoirs. Following infection, animal reservoirs support the chronic colonization of their renal tubules by a bacterial biofilm and are able to release viable *Leptospira* in their urine. In the absence of renal colonization, infected hosts (including humans) are considered as dead ends and do not play any significant role in the transmission cycle. Rodents and particularly rats (e.g. *Rattus*) are considered as the principal reservoir of *Leptospira* and the main source of human infection, a role likely favored by the worldwide distribution and commensal behaviour of some of these invasive species.

Two methods are currently used to group *Leptospira*: a phenotypic classification based on the microscopic agglutination test (MAT) that recognizes over 25 serogroups and 300 serovars (1) and a more recently introduced genetic classification based on bacterial DNA sequences that allows the identification of 20 *Leptospira* species including nine being pathogenic (2). Genotyping through Multiple Locus Sequence Typing (MLST) based on a selected set of housekeeping genes (3) has become a method of choice to identify *Leptospira* at the inter- and intra-species level. Indeed, molecular typing allows deciphering the molecular epidemiology of the disease, sharing data among laboratories investigating distant geographic regions and analyzing the evolution of host-parasite relationships using robust molecular characters (4).

The incidence of human leptospirosis has been reported to be highest in tropical islands and this observation holds true for the southwestern Indian Ocean (SWIO) region (5). Poorly documented on Mauritius and Madagascar, the incidence of the disease on Seychelles

ranks first worldwide among surveyed countries (5) while on Reunion Island, a French overseas department, the rate of human leptospirosis has been reported to be nearly 20 times higher than in continental France (6).

Mayotte, the most southern island of the Comoros Archipelago is a French overseas department located in the northern entrance of the Mozambique Channel of about 375 km² and about 300 km off the northwestern coast of Madagascar. Human leptospirosis is highly prevalent on the island with an annual incidence in 2013 estimated at 35 per 100 000 (6). Most interestingly, *Leptospira* strains isolated from human patients showed a much wider species diversity on Mayotte than on Reunion (7), with at least 16 different haplotypes or “sequence types” (STs) identified by MLST (8). Prevalent species in acute human cases were identified as *Leptospira interrogans*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira kirschneri* and members of a previously undefined phylogroup that has recently been named as *Leptospira mayottensis* (9). This diversity, unique so far to the SWIO region, likely reflects local eco-epidemiologic specificities of the animal reservoirs. With the exception of bats, no native small mammals occur on Mayotte. Although one study has previously investigated animal reservoirs on Mayotte (10), it targeted only introduced *Rattus* for kidney carriage of *Leptospira*, whereas other species of the local wild and domestic fauna were screened by MAT, a serological test that provides evidence of previous infections but does not assess the actual carrier state of the investigated animals. Thus, the actual reservoir of *L. mayottensis* remains to be identified. Of importance to the present study, *L. mayottensis* has been recently detected in small mammals endemic to the neighbouring Madagascar (4) and it can be hypothesized that the geographic proximity and different socio-economic exchanges between these two islands could have facilitated the introduction of this bacterial species and its associated introduced mammal reservoirs to Mayotte.

Hence, the aim of the present study was to investigate the wild (native and introduced)

and domestic mammalian fauna on Mayotte in order to assess whether a specific reservoir of *L. mayottensis* could be locally identified and to further highlight the local specificities leading to the peculiar epidemiology of human leptospirosis on the island.

Materials and methods

Ethical Statement. All animal procedures carried out in this study were performed in accordance with the European Union legislation for the protection of animals used for scientific purposes (Directive 2010/63/EU). The ethical terms of the research protocol were approved by the CYROI institutional ethical committee (Comité d’Ethique du CYROI n° 114).

Animal sampling. Introduced black rats (*Rattus rattus*, Family Muridae) and tenrecs (*Tenrec ecaudatus*, Family Tenrecidae, Subfamily Tenrecinae) as well as native insectivorous (*Chaerephon* sp., Family Molossidae) and frugivorous bats (*Pteropus seychellensis comorensis*, Family Pteropodidae) were trapped on Mayotte during three field sessions carried out from July 2012 to December 2014. Terrestrial small mammals were captured using live traps baited with grilled coconut and placed in natural or urban sites at eight localities for rats and at five localities for tenrecs. Rats and tenrecs were sacrificed by cervical dislocation or percussion of the cranial box and, for each individual, tissue was quickly collected from kidney, lung and spleen, pooled together and immediately stored at -80°C. *Chaerephon* bats were captured at dusk or at night using mist nets placed either in the vicinity of synanthropic roost sites or across flyways, while *Pteropus* bats were captured at night using mist nets set around fruiting trees. Captured bats were individually kept in clean cloth bags and brought back to a local laboratory. Blood samples were collected from the brachial vein and centrifuged to obtain serum. In many cases after their removal from holding bags, animals spontaneously urinated and samples were collected. Bats were subsequently released at dusk

at the initial capture site. Dogs (*Canis lupus familiaris*) were exclusively manipulated and sampled by a local veterinary. Kidneys were obtained from animals that were euthanized for medical purposes, and/or urine collected from these same animals whenever possible. In addition, urine samples were obtained from non-euthanized dogs through aseptic vesicle catheterization. Kidneys from zebus (*Bos indica*) were purchased at the slaughterhouse of Mayotte (Kaweni) or obtained during traditional butchering.

***Leptospira* isolation.** A few urine drops and/or a small piece of the freshly sampled kidney crushed under sterile conditions were used to inoculate three distinct culture media: (i) Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) liquid medium (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with Albumin Fatty Acid Supplement (AFAS; Royal Tropical Institute, Amsterdam, Netherlands) (11); (ii) EMJH liquid medium supplemented with AFAS, rabbit serum and fetal calf serum (1% each); and (iii) semisolid Fletcher medium (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with rabbit serum (8%). All media were supplemented with 5-fluorouracil (5-FU) at a final concentration of 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cultures were incubated at 28°C, visually checked for the presence of *Leptospira* growth using a dark field microscope once a week for four months and positive cultures were further sub-cultured in fresh EMJH liquid medium deprived of 5-FU. DNA was extracted from 1 mL of each positive culture using the EZ1 Biorobot with Qiagen EZ1 DNA Tissue kits (Qiagen, Les Ulis, France).

Detection of pathogenic *Leptospira*. Approximately 1 mm³ of pooled organs (kidney, lung and spleen) from each rat and tenrec specimen and only kidney from dogs and cows were dissected on sterile ice and further processed as previously described (12). Thirty microliters of urine from bats and dogs were combined with 120 μL of Dulbecco's modified medium (GIBCO, Grand Island, NY, USA) and 50 μL of ATL buffer (Qiagen, Les Ulis, France).

Subsequently, total nucleic acids were extracted from urine or homogenized tissues by using EZ1 extraction robot and the EZ1 Virus Mini Kit version 2.0. A reverse transcription step was performed on total nucleic acids with GoScript Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) in order to obtain cDNA. Then, *Leptospira* detection was carried out on 5 μ L of cDNA using a probe-specific real-time Polymerase Chain Reaction system (RT-PCR) targeting a fragment of the 16S rRNA gene (13).

***Leptospira* genotyping.** *Leptospira* in samples testing positive by RT-PCR and/or culture were genotyped using a previously described MLST scheme encompassing 6 genes: *secY*, *adk*, *rrs2*, *icdA*, *lipL32* and *lipL41* (14), and recently optimized to improve the amplification of SWIO lineages (4). In an attempt to further characterize *Leptospira* from positive samples failing to produce MLST data, we used an alternative primer set (LA-LB) targeting *rrs2* (18). The amplification of each marker was realized with GoTaq Hot Start Green Master Mix 2X (Promega, Madison, WI, USA) and further sequenced on both strands by direct Sanger sequencing (Genoscreen, Lille, France) using the same amplification primer sets. All sequences were deposited on GenBank under the following accession numbers: KT338823-KT338942 and KT725237-KT725243.

Phylogenetic analyses and genetic diversity. Accessible sequences from clinical *Leptospira* isolates from Mayotte were included in the study (7). Since *icdA* sequences were not provided for these clinical isolates, we used five out of the six markers of the MLST scheme in our analyses. In addition, we added to the study *Leptospira* sequences obtained from endemic terrestrial small mammals from Madagascar, *i.e.* *Microgale cowani*, *M. dobsoni*, *M. majori*, *M. longicaudata* and *M. principula* (Family Tenrecidae, Subfamily Oryzoricinae). The complete MLST of these *Leptospira* was produced in a previous study (4) and from cultures realized during field missions carried out in the Central Highlands of

Madagascar, Réserve Spéciale d'Ambohitantely, in March and October 2014. Sequence alignments are freely accessible on Dryad (XXXX).

Phylogenetic analyses were performed on each gene separately and subsequently on concatenated sequences using the best model of sequence evolution determined by jModelTest v.0.1.1 (15) for each dataset. Bayesian analyses were performed with MrBayes 3.1.2 (16) and consisted of two independent runs of four incrementally heated Metropolis Coupled Markov Chain Monte Carlo (MCMCMC) starting from a random tree. MCMCMC was run for 10,000,000 generations with trees and associated model parameters sampled every 100 generations. The convergence level of each phylogeny was validated by an average standard deviation of split frequencies inferior to 0.05. The initial 10% of trees from each run were discarded as burn-in and the consensus phylogeny along with posterior probabilities were obtained from the remaining trees. Bayesian trees were visualized and rooted to midpoint with FigTree v.1.3.1 (Andrew Rambaut, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, 2006 to 2009; <http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

Genetic diversity was compared between the identified clades in the multilocus phylogeny by estimating the nucleotide diversity (π) within each clade from the concatenated sequences using DNASP v.5.10.01 (17).

Results

Altogether, 486 samples of tissue and/or urine collected on Mayotte from 289 *Rattus rattus*, 37 *Tenrec ecaudatus*, 53 *Canis lupus familiaris*, 18 *Bos indica*, 69 *Chaerephon* sp. and 20 *Pteropus seychellensis comorensis* were screened for *Leptospira* by RT-PCR and/or culture. The results are summarized on Table 1.

449 **TABLE 1** Animals from the wild and domestic fauna of Mayotte tested for renal carriage of *Leptospira* by RT-PCR, culture, and

450 genotyping. *Lb*: *L. borgpetersenii*, *Lm*: *L. mayottensis*, *Li*: *L. interrogans*, *Lk*: *L. kirschneri*.

451 ^a OP: organ pool, K: kidney, U: urine. ^b Number of animals with paired sampling (OP/K+U).

Species	Number of animals tested by RT-PCR (OP/K, U) ^a	Number of animals tested by culture (OP/K, U) ^a	Number of <i>Leptospira</i> positive animals (%)	Number of typed <i>Leptospira</i> among positive samples	<i>Leptospira</i> species			
					<i>Lb</i>	<i>Lm</i>	<i>Li</i>	<i>Lk</i>
<i>Rattus rattus</i>	289 (OP = 289)	81 (OP/K = 81)	46 (15.9)	21	13	-	3	5
<i>Tenrec ecaudatus</i>	37 (OP/K = 37)	36 (OP/K = 36, U=17) (17b)	10 (27.0)	8	-	8	-	-
<i>Bos indica</i>	18 (K = 18)	-	1 (5.6)	0	-	-	-	-
<i>Canis lupus familiaris</i>	53 (OP/K = 38, U = 45) (30 ^b)	-	7 (13.2)	6	3	-	-	3
<i>Chacærephon</i> sp.	69 (U = 69)	69 (U = 69)	0	-	-	-	-	-
<i>Pteropus seychellensis comorensis</i>	20 (U=20)	20 (U=20)	2 (10.0)	1	-	-	-	1

***Leptospira* detection by RT-PCR and culture.** *Leptospira* were detected by RT-PCR in 27.0% of tenrecs, 15.9% of rats, 13.2% of dogs, 10.0% of frugivorous bats, and 5.6% of zebus. All urine samples from insectivorous bats tested negative by RT-PCR. Bacterial cultures were attempted using kidney homogenates and/or urine samples from 117 and 94 animals, respectively. Overall, *Leptospira* culture was successful for samples testing positive through RT-PCR only. Positive cultures were obtained for eight of the 14 RT-PCR-positive rat samples (57.1%) and for eight of the 10 RT-PCR-positive tenrec samples (80%). Two tenrecs (MDI295 and MDI321) yielded positive culture from both urine and kidney samples. Lastly, no isolate grew in cultures from RT-PCR positive *P. seychellensis comorensis* samples.

***Leptospira* species diversity in wild and domestic mammals.** We were able to PCR amplify all six loci of the MLST scheme using DNA extracted from all 16 *Leptospira* cultures, obtained from eight *Rattus* and eight *Tenrec* samples. As expected, PCR was more arduous when using DNA extracted from tissue and urine of PCR-positive samples for which culture had failed. For instance, no successful PCR was recorded for the two RT-PCR positive *Tenrec* failing to yield positive culture. Using the MLST scheme, only *rrs2* locus was amplified from four PCR-positive *Rattus*, while two loci (*secY* and *rrs2*) were amplified from two other *Rattus*. Similarly, only *rrs2* was amplified from six out of the seven RT-PCR-positive dog samples and from one out of the two RT-PCR-positive *Pteropus* bat samples. Lastly, no sequence could be obtained from the single zebu sample testing positive by RT-PCR. In addition, for seven PCR-positive *Rattus* samples failing to produce any data using the MLST scheme, we successfully amplified and sequenced the *rrs2* gene using an alternative primer set (LA-LB). Altogether, we could identify *Leptospira* at the species level for 21 rats, eight *Tenrec*, six dogs and one frugivorous bat from Mayotte (see Table 1). *Rattus*-borne *Leptospira* appeared genetically diverse as *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri* and *L. interrogans* were identified for 13, five and three samples, respectively. The sequencing of *rrs2* locus in

dog samples identified the infecting *Leptospira* as *L. borgpetersenii* (n = 3) and *L. kirschneri* (n = 3). We also identified one of the two PCR-positive frugivorous bats as infected by *L. kirschneri*. Most importantly, all *Leptospira* isolated and/or genotyped from *Tenrec* samples were identified as *L. mayottensis*.

***Leptospira* phylogenetic analyses.** We constructed a concatenated phylogeny (2215 bp) using sequence data from the 16 animal *Leptospira* isolates from Mayotte, 17 previously described clinical isolates from Mayotte (7) and nine fully typed *Leptospira* infecting Malagasy endemic Tenrecidae, including six previously published haplotypes (4) and haplotypes obtained from three animals sampled in Réserve Spéciale d'Ambohitantely. The phylogeny presented on figure 1 shows that all *Leptospira* sequences obtained from *T. ecaudatus* clustered into the monophyletic well-supported *L. mayottensis* clade (P.P = 1.00) that includes two clinical *L. mayottensis* isolates (str. 200901116 and str. 200901122) as well as *Leptospira* haplotypes obtained from *Microgale cowani* and *M. dobsoni*, these latter species being tenrecids endemic to Madagascar. Out of the eight sequences obtained from *T. ecaudatus* in Mayotte, seven were identical to clinical *L. mayottensis* str. 200901122 (100% of pairwise identity based on 2215 bp) and the last one (MDI272) was closely related to the clinical *L. mayottensis* str. 200901116 (99.70% of pairwise identity based on 2215 bp). Of note, the couple of kidney/urine cultures obtained from two *Tenrec* individuals (MDI295 and MDI321) yielded identical genotypes. *Leptospira mayottensis* infecting Malagasy *Microgale* spp displayed a 27-fold higher nucleotide diversity ($\pi=0.00298$) compared to *Leptospira* infecting *T. ecaudatus* from Mayotte ($\pi=0.00011$). The full MLST-based phylogeny confirmed *Rattus* as carriers of *L. interrogans* and *L. borgpetersenii*. The *L. interrogans* clade included two identical haplotypes, one corresponding to a *Rattus*-borne *Leptospira* and one from a *L. interrogans* clinical isolate (str. 200901482). The *L. borgpetersenii* clade included

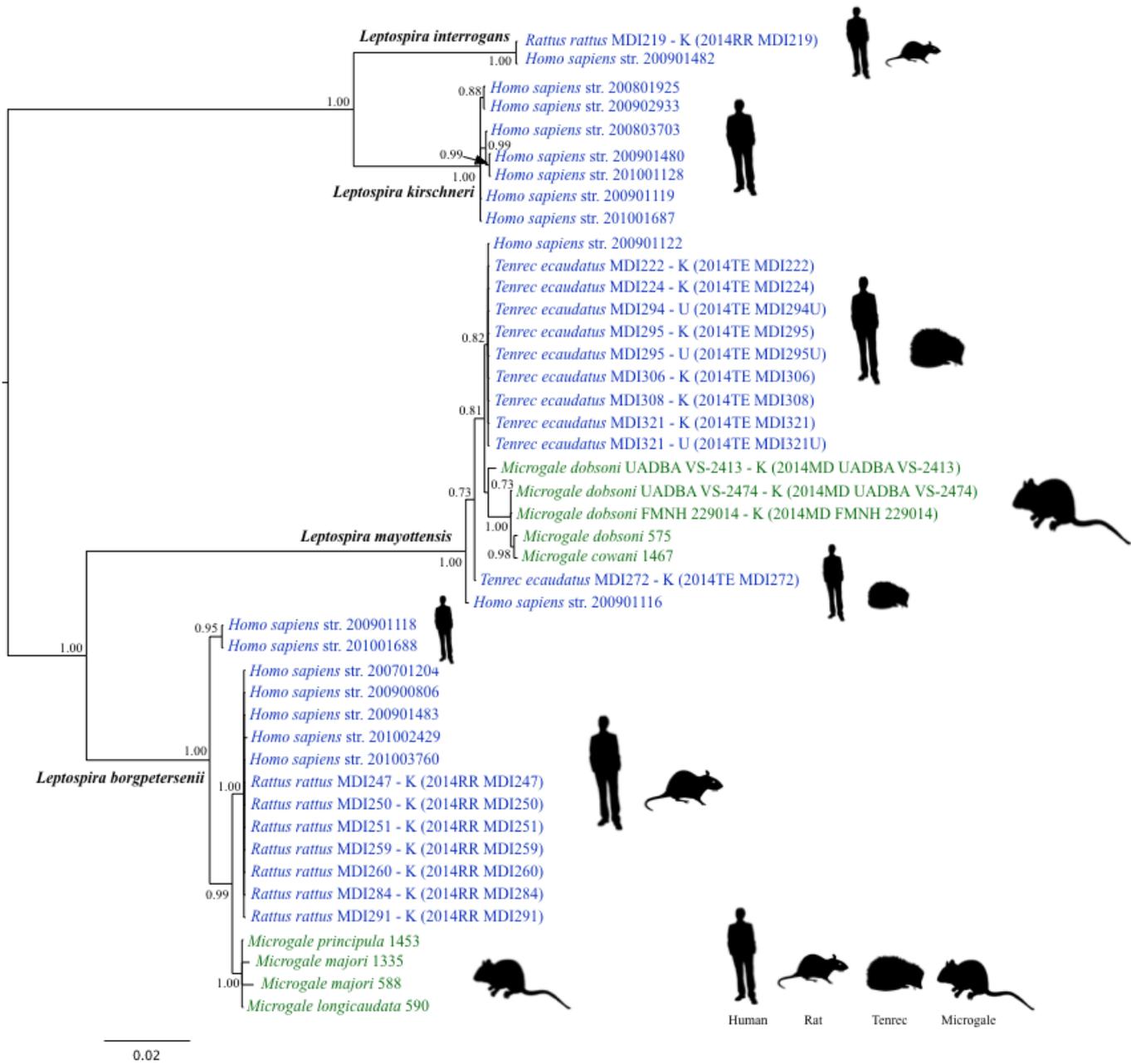


FIG 1 Bayesian phylogenetic tree of pathogenic *Leptospira* from Mayotte and Madagascar based on concatenated sequences of five genes (*secY*, *adk*, *lipL32*, *LipL41* and *rrs2*, total size: 2215 bp). The analysis was carried out using Bayesian Inference under the GTR+I substitution model. Nodal values correspond to the posterior probabilities. Sequences from Mayotte and Madagascar are indicated in blue and green colour, respectively. The letters “K” and “U” designate the sequences obtained from cultures of kidney or urine, respectively. For cultures, produced in the present study, the strain numbers are indicated in brackets. Note that two sequences obtained respectively from urine and kidney of the same individual are presented for samples of *Rattus rattus* MDI295 and MDI321. Specimen system: MDI = CRVOI specimen catalogue during field trips to Mayotte; FMNH = Field Museum of Natural History, Chicago; UADBA = Université d’Antananarivo, Département de Biologie Animale Antananarivo, Madagascar; for the other bacterial sequences from *Homo sapiens* and *Microgale* spp. see Bourhy *et al.* (7) and Dietrich *et al.* (4), respectively.

seven sequences obtained from *Rattus* that were almost identical (99.99% pairwise identity, 2215 bp) to five previously described clinical *L. borgpetersenii* isolates. Noteworthy, sequences embedded in this clade were clearly distinct (PP=0.99) from *L. borgpetersenii* sequences obtained from Malagasy tenrecids. The nucleotide diversity of *L. borgpetersenii* from Malagasy tenrecids ($\pi=0.00181$) was higher than that found in *Rattus* from Mayotte ($\pi=0$, one single haplotype).

Although full MLST was not successful for bats, dogs and for some of the *Rattus*, we further attempted to obtain *rrs2* sequences in order to produce data allowing disentangling the role of these animals in human leptospirosis on Mayotte. For instance, the single leptospiral *rrs2* (MLST scheme primers) sequence obtained from a frugivorous bat (*Pteropus*) was genetically related to clinical *L. kirschneri* isolates (98.70% pairwise identity, based on 452 bp) although nucleotide divergence together with PCR failure on all other loci suggested that *L. kirschneri* detected in frugivorous bats was actually divergent from clinical samples (see Fig. S1). Sequences obtained from dogs revealed perfect identity (based on 452 bp) with *L. borgpetersenii* (n=3) and *L. kirschneri* (n=2) clinical isolates from Mayotte. Lastly, *rrs2* (using LA-LB primers) sequencing on *rRattus* samples revealed five identical *L. kirschneri* sequences diverging from clinical isolates (3 mismatches out of 245 bp), thus in favour of a predominant role of dogs in *L. kirschneri* transmission to humans.

Discussion and conclusion

Recent reports of human leptospirosis in the SWIO have stressed two specificities that singularize Mayotte from the other islands of the region. On the one hand, *Leptospira* spp infecting humans on Mayotte are diverse and belong to four bacterial species (*L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri* and *L. mayottensis*), which is rather distinct from

the situation in the Seychelles and Reunion Island where investigations clearly demonstrate a large predominance of *L. interrogans* infecting humans ((19), Biscornet *et al.*, Guernier *et al.*, unpublished data). On the other hand, the high leptospiral diversity described on Mayotte includes a recently described *Leptospira* species, *L. mayottensis*, thought to be unique to the island (8).

Our screening of the local fauna allowed characterizing 36 *Leptospira* samples at the species level. *Leptospira* were identified as *L. borgpetersenii*, *L. mayottensis*, *L. interrogans*, and *L. kirschneri*. We revealed perfect or nearly perfect identity between (i) *L. interrogans* haplotypes obtained from patients and *Rattus rattus*, (ii) one *L. borgpetersenii* haplotype obtained from patients and *R. rattus*, and (iii) all *L. mayottensis* haplotypes obtained from patients and *Tenrec ecaudatus*. The sequencing of *rrs2* locus suggests that *L. kirschneri* reported in clinical cases originates from dogs. Finally, local bat species do not appear to play a significant epidemiological role in the transmission of leptospirosis, as all urine samples from the most common insectivorous bat species, *Chaerephon* sp., tested negative for *Leptospira*, this follows the results of low infection rates previously reported for this same bat genus on the neighbouring island of Anjouan. In addition, the single *L. kirschneri rrs2* haplotype obtained from a *Pteropus seychellensis comorensis* specimen was clearly distinct from the lineages involved in human disease.

Altogether, these results highlight the role of introduced wild and domestic small mammal species in the epidemiology of leptospirosis on Mayotte.

Firstly, *T. ecaudatus* is the reservoir of *L. mayottensis* as this species was detected only in this host and, in parallel, all *Leptospira* infecting these animals on Mayotte were strictly typed as *L. mayottensis*. Although the infection rate in *T. ecaudatus* was high (27.0%), it is likely to reach much higher levels during the rainy season. Indeed, three out of the four *Tenrec* captured during the end of the rainy season were positive, while only seven out of the 33

animals caught at the end of the dry season tested positive. In contrast to the previous report of Desvars *et al.* (10) who detected what would be subsequently named as *L. mayottensis* in two out of 20 positive *R. rattus*, we did not detect *L. mayottensis* infecting any of *R. rattus* investigated herein despite these animals being sampled in the present study during both dry (July 2012) and rainy (April 2014) seasons. Moreover, as our study included kidney sample cultures, the remarkably high success rate of *L. mayottensis* growth (80%) in culture should have biased results towards *L. mayottensis* detection in *R. rattus*. Hence, our results indicate at the very least that rats are not a significant reservoir of *L. mayottensis*.

Secondly, the genetic diversity of *L. mayottensis* in *T. ecaudatus* on Mayotte is narrow and corresponds to the same narrow diversity detected in humans, stressing the direct epidemiologic link between this animal reservoir and human disease. Other than general release of living *Leptospira* bacteria into the environment via urine, amongst portions of the local Maore cultural group living on Mayotte, *Tenrec* are widely exploited as bush meat, which would provide an additional interface for human contact with these animals during capture and slaughter.

Thirdly, the phylogenetic analysis supports that *L. mayottensis* likely originates from neighbouring Madagascar. Indeed, all *L. mayottensis* sequences cluster into a monophyletic well-supported clade including sequences obtained from three terrestrial small mammal species, namely *T. ecaudatus*, *Microgale dobsoni* and *M. cowani*, all belonging to the highly diversified Tenrecidae family representing an adaptive radiation of at least 32 endemic species, which colonized Madagascar some 25-30 million years ago (20). Interestingly, the sites where the positive animals were captured on Madagascar are several hundred kilometres apart, stressing the elective susceptibility of Tenrecidae to *L. mayottensis* infection.

Fourthly, *R. rattus* is a major reservoir of *Leptospira* on Mayotte as also reported worldwide. However and in contrast with data available from the other islands of the SWOI

region, where *R. rattus* are massively infected with *L. interrogans*, bacterial species infecting *R. rattus* on Mayotte were identified in most cases as *L. borgpetersenii* (61.9%, 13/21). Noteworthy, all *L. borgpetersenii* and *L. interrogans* obtained from *R. rattus*, showed perfect identity with human isolates based on the multilocus analysis. It appears that *R. rattus* on Mayotte are only marginally infected by *L. interrogans* despite the elective sensitivity of *R. rattus* to this *Leptospira* species worldwide, including on neighbouring Madagascar (21). This observation supports a massive contamination of the environment on Mayotte by *Leptospira* species other than *L. interrogans*, notably *L. borgpetersenii*. Although we identified *L. kirschneri* in five *Rattus*, sequence analyses (*rrs2*) suggest a predominant role of dogs in the human leptospirosis epidemiology. However, the absence of successful culture did not allow full genotyping of dog-hosted *Leptospira* and their implication in human transmission needs further investigations.

Fifthly, *L. borgpetersenii* haplotypes isolated from acute human cases on Mayotte group with two clearly distinct clades. The first lineage can be traced to *R. rattus* and is interestingly also closely related to a clade previously described as associated with endemic Malagasy *Microgale* (4), indicating a possible host shift from endemic to introduced mammals. The second *L. borgpetersenii* lineage, represented by two human isolates, appears related to *L. borgpetersenii* lineages reported worldwide, e.g. Denmark, China, and Slovakia (4), but not in any wild and domestic animals sampled herein. This cosmopolite lineage may have been introduced through a reservoir, which is yet to be identified.

Finally, the remarkably high success rate to grow in culture *L. mayottensis* from *T. ecaudatus* (8/10, 80%) and *L. borgpetersenii* from *R. rattus* (7/13, 53.8%) indicates some specific biological peculiarities of these strains on Mayotte. Indeed, using the same protocol, we have regularly failed to grow in culture any *Leptospira* from kidney extracts from terrestrial Malagasy wild mammals (Gomard *et al.*, unpublished data), except for the three

strains of *L. mayottensis* obtained from *M. dobsoni* and included on Figure 1. Hence, this property to readily grow on liquid culture medium may confer to these local lineages some adaptive advantage to survive and/or multiply in the environment. In fact, *L. mayottensis* was reported to grow over a wide range of temperature including 11°C and 37°C in contrast to other pathogenic strains (9).

Mayotte is a volcanic island that has emerged *de novo* some 5 million years ago. Its introduced terrestrial mammal fauna is derived from introductions different areas of the Old World, such as *R. rattus*, and more precisely the neighbouring biodiversity hotspot of Madagascar (22), specifically *T. ecaudatus*. The remarkable current terrestrial mammal richness is proposed to have derived from only four mammal colonization events (23), leading to the extraordinary diversity of primates, carnivorans, rodents and, of importance for the present work, tenrecids. Our data strongly supports that *L. mayottensis* has indeed diversified deep in geological time during the course of Tenrecidae evolution on Madagascar. The general apparent restriction of *L. mayottensis* to natural or introduced Tenrecidae hosts is a further evidence of co-divergence between *Leptospira* and reservoir host species as previously shown in Malagasy endemic small mammals (4).

Islands are considered as exceptionally prone to the successful introduction and subsequent invasive nature of exotic animals and plants (24) and have been studied in detail because of adaptive features of species in insular contexts. Our data document that a pathogen most certainly originally endemic to Madagascar has been introduced to the small island of Mayotte where it expanded to become a significant emerging human pathogen. From an evolutionary perspective, our study highlights that beside macro-organism diversity, the associated micro-biodiversity, including endemic microbial lineages, deserves to be included in studies of invasive biology in the context of island biogeography.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by funds from ERDF-POCT Réunion, LeptOI (#32913), ParamyxOI (#33857), ECOSAN/CNRS-INEE “BatMan” and Agence Régionale de la Santé Ocean Indien (ARS-OI). Permits were issued by Direction de l’Environnement, de l’Aménagement et du Logement (DEAL) of Mayotte. We thank Office National des Forêts, Conseil Général of Mayotte and Association Naturalistes Environnement et Patrimoine de Mayotte for allowing animal capture on conservation sites. For Madagascar samples, permits were provided by Malagasy national authorities: Ministère de l’Environnement et des Forêts, Madagascar National Parks and the Département de Biologie Animale of the Université d’Antananarivo (N°238/14/MEEF/SG/DGF/DCB.SAP/SCB). We are also grateful to Catherine Dioniso in helping to locate some bat roost sites. COOPADEM provided the field group laboratory space on Mayotte and we would like to thank Marion Pannequin and Laure Dommergues particularly. We also thank Voahangy Soarimalala for helping in preparation of samples at Réserve Spéciale Ambohitantely. We deeply think Dr Bénédicte Contamin and Fondation Mérieux in Madagascar for providing logistical supports. Computations were performed on the “Université de La Réunion” supercomputer facility.

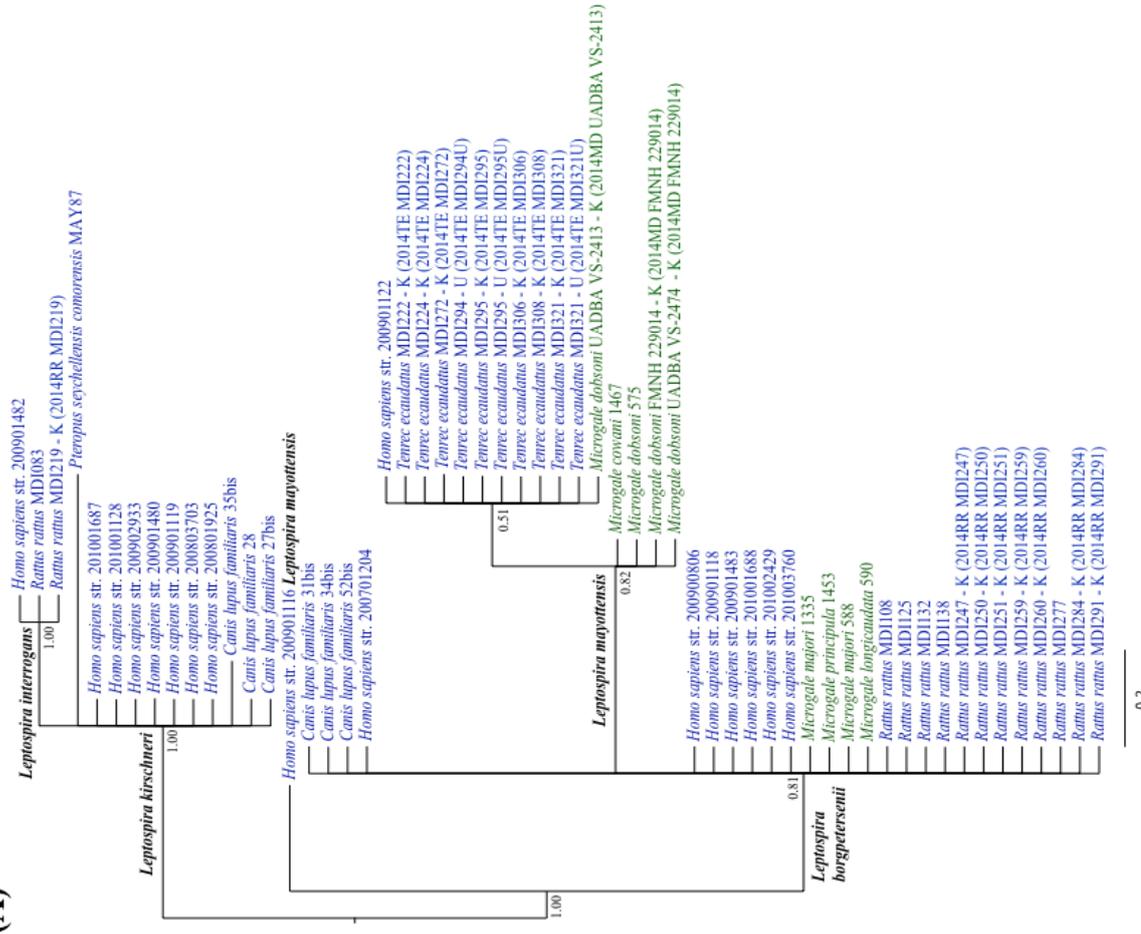
REFERENCES

1. **Levett PN.** 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* **14**:296–326.
2. **Cerqueira GM, Picardeau M.** 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* **9**:760–768.
3. **Ahmed A, Thaipadungpanit J, Boonsilp S, Wuthiekanun V, Nalam K, Spratt BG, Aanensen DM, Smythe LD, Ahmed N, Feil EJ, Hartskeerl RA, Peacock SJ.** 2011. Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis* **5**:e1374.
4. **Dietrich M, Wilkinson DA, Soarimalala V, Goodman SM, Dellagi K, Tortosa P.** 2014. Diversification of an emerging pathogen in a biodiversity hotspot: *Leptospira* in endemic small mammals of Madagascar. *Mol Ecol* **23**:2783–2796.
5. **Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N.** 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis* **12**:351–357.
6. **Picardeau M, Bourhy P.** 2014. Annual activity report. National Reference Center for Leptospirosis. Institut Pasteur.
7. **Bourhy P, Collet L, Lernout T, Zinini F, Hartskeerl RA, Linden H van der, Thiberge JM, Diancourt L, Brisse S, Giry C, Pettinelli F, Picardeau M.** 2012. Human *Leptospira* isolates circulating in Mayotte (Indian Ocean) have unique serological and molecular features. *J Clin Microbiol* **50**:307–311.
8. **Bourhy P, Collet L, Clément S, Huerre M, Ave P, Giry C, Pettinelli F, Picardeau M.** 2010. Isolation and characterization of new *Leptospira* genotypes from patients in Mayotte (Indian Ocean). *PLoS Negl Trop Dis* **4**:e724.
9. **Bourhy P, Collet L, Brisse S, Picardeau M.** 2014. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic *Leptospira* species isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014 Dec;64(Pt 12):4061-7. doi: 10.1099/ij.s.0.066597-0. Epub 2014 Sep 23.

10. **Desvars A, Naze F, Vourc'h G, Cardinale E, Picardeau M, Michault A, Bourhy P.** 2012. Similarities in *Leptospira* serogroup and species distribution in animals and humans in the Indian ocean island of Mayotte. *Am J Trop Med Hyg* **87**:134–140.
11. **Ellinghausen HC, McCullough WG.** 1965. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumine and polysorbate 80. *Am J Vet Res* **26**:45–51.
12. **Wilkinson DA, Temmam S, Lebarbenchon C, Lagadec E, Chotte J, Guillebaud J, Ramasindrazana B, Héraud J-M, de Lamballerie X, Goodman SM, Dellagi K, Pascalis H.** 2012. Identification of novel paramyxoviruses in insectivorous bats of the southwest Indian Ocean. *Virus Res* **170**:159–163.
13. **Smythe LD, Smith IL, Smith GA, Dohnt MF, Symonds ML, Barnett LJ, McKay DB.** 2002. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis* **2**:13.
14. **Ahmed N, Devi SM, Valverde M de los Á, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA.** 2006. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **5**:28.
15. **Posada D.** 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol* **25**:1253–1256.
16. **Ronquist F, Huelsenbeck JP.** 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**:1572–1574.
17. **Librado P, Rozas J.** 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**:1451–1452.

18. **Lourdault K, Aviat F, Picardeau M.** 2009. Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. *J Med Microbiol* **58**:648–655.
19. **Naze F, Desvars A, Picardeau M, Bourhy P, Michault A.** 2015. Use of a new high resolution melting method for genotyping pathogenic *Leptospira* spp. *PloS One* **10**:e0127430.
20. **Olson LE.** 2013. Tenrecs. *Curr Biol* **23**:R5–R8.
21. **Rahelinirina S, Léon A, Harstskeerl RA, Sertour N, Ahmed A, Raharimanana C, Ferquel E, Garnier M, Chartier L, Duplantier J-M, Rahalison L, Cornet M.** 2010. First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. *PloS One* **5**:e14111.
22. **Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**:853–858.
23. **Poux C, Madsen O, Marquard E, Vieites DR, de Jong WW, Vences M.** 2005. Asynchronous colonization of Madagascar by the four endemic clades of primates, tenrecs, carnivores, and rodents as inferred from nuclear genes. *Syst Biol* **54**:719–730.
24. **Elton CS.** 2000. *The ecology of invasions by animals and plants.* University Of Chicago Press.

(A)



(B)

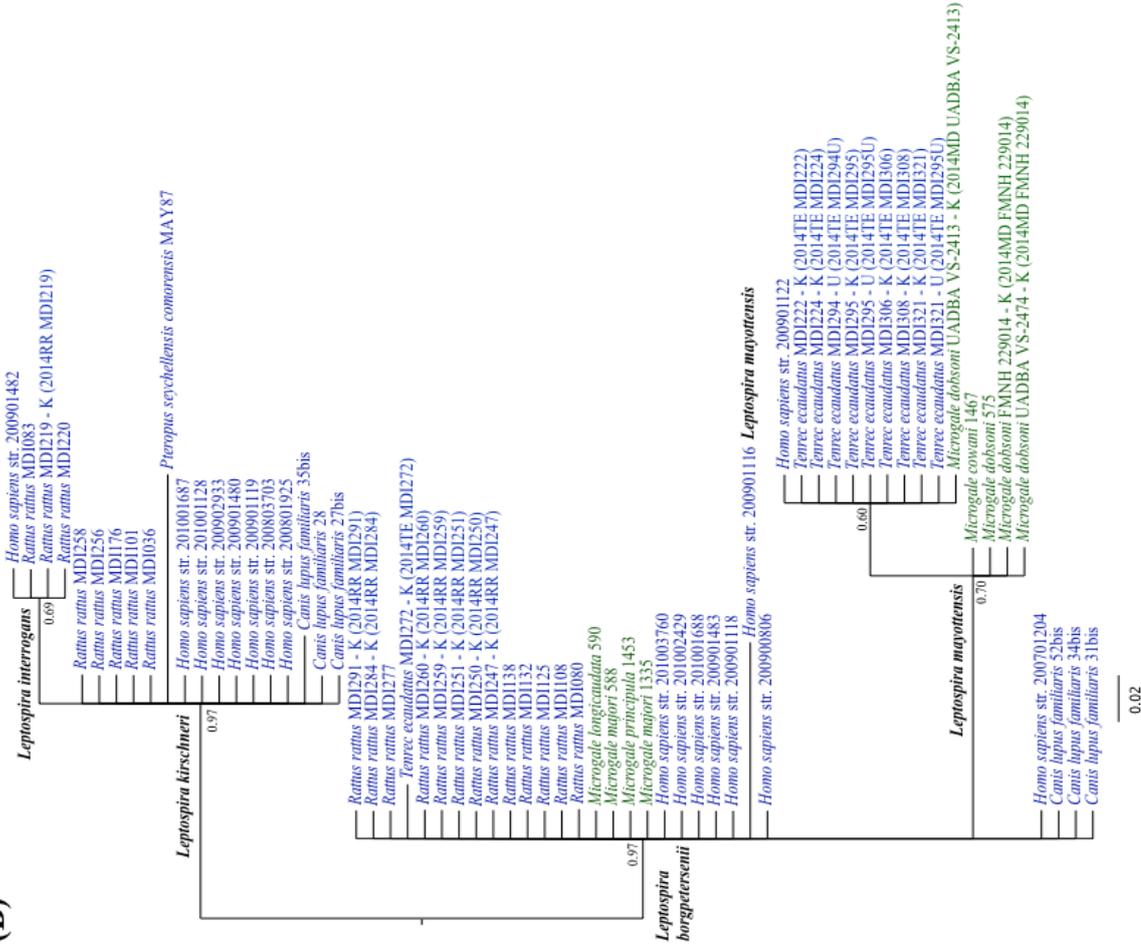


FIG S1 The figures A and B display Bayesian phylogenetic trees of pathogenic *Leptospira* from Mayotte and Madagascar based on 452 bp (57 taxa, HKY+I+G) and 245 bp (64 taxa, HKY+I+G) of the *rrs2* gene, respectively. Sequences from Mayotte and Madagascar are indicated in blue and green colour, respectively. The letters “K” and “U” designate sequences obtained from cultures of kidney or urine, respectively. For cultures, produced in the present study, the strain numbers are indicated in brackets. Note that two sequences obtained respectively from urine and kidney of the same individual are presented for samples of *Rattus rattus* MDI295 and MDI321. Specimen system: MDI and MAY = CRVOI specimen catalogue during field trips to Mayotte; All *Canis lupus familiaris* were sampled during field trips to Mayotte; FMNH = Field Museum of Natural History, Chicago; UADBA = Université d’Antananarivo, Département de Biologie Animale Antananarivo, Madagascar; for the other bacterial sequences from *Homo sapiens* and *Microgale* spp. see Bourthy *et al.* (7) and Dietrich *et al.* (4) respectively.

3. Résultats majeurs

Cette étude montre qu'à Mayotte l'épidémiologie humaine de la leptospirose implique **au moins deux réservoirs majeurs à savoir : *Rattus rattus* et *Tenrec ecaudatus* (Tenrecidae)**. Nous montrons que **le rat noir est le réservoir** de deux espèces de leptospires responsables de cas humains : *Leptospira interrogans* et *L. borgpetersenii*. Nous montrons que *T. ecaudatus* est le réservoir de *L. mayottensis* et que les chiens sont aussi vraisemblablement impliqués dans la maladie humaine sur l'île.

Cette étude confirme que *L. mayottensis* est spécifique des espèces de la famille des **Tenrecidae** (Dietrich *et al.* 2014). Pris dans son ensemble, ce travail montre que l'épidémiologie particulière de la leptospirose à Mayotte résulte d'une **diversité de leptospires dont au moins une partie est endémique de la région**.

Discussion, conclusions et perspectives

Discussion et conclusions

La compréhension générale d'une zoonose et l'identification des facteurs favorisant sa survenue nécessitent *a minima* une investigation de chacun des compartiments impliqués, à savoir l'Homme, qui constitue un hôte accidentel, les pathogènes et leurs réservoirs (ainsi que les vecteurs arthropodes dans le cas d'arbovirus) en interaction dans leur(s) environnement(s). C'est cette démarche que nous avons adoptée en prenant comme modèle la leptospirose, une zoonose d'intérêt médical majeur dans la région du Sud-ouest de l'Océan Indien (SOOI). Des études antérieures, même si elles étaient incomplètes et difficilement comparables en raison des méthodologies hétérogènes mises en œuvre, suggéraient fortement que les différentes îles de la région montraient une épidémiologie contrastée. **L'objectif général de cette thèse était d'identifier certains des déterminants de cette épidémiologie contrastée entre les îles du SOOI.** Pour cela nous avons dans un premier temps produit des données humaines en Union des Comores, pays n'ayant jamais à notre connaissance rapporté de cas de transmission autochtone de leptospirose (**chapitre I**). Puis nous nous sommes intéressés à la faune endémique pour y décrire la diversité des leptospires et les associations hôtes-leptospires (**chapitre II et III**). Plus spécifiquement, nous avons utilisé la remarquable diversité de chauves-souris malgaches pour explorer les événements évolutifs ayant conduit à la diversité bactérienne hébergée par ces mammifères volants (**chapitre III**). Dans le dernier chapitre, nous avons intégré les conclusions principales de cette thèse aux travaux menés au sein de notre équipe pour améliorer notre compréhension de l'épidémiologie de la leptospirose humaine sur l'île de Mayotte (**chapitre IV**).

1. La leptospirose en Union des Comores

Nos travaux montrent **qu'en Union des Comores, les populations humaines sont exposées à la leptospirose, et que le profil sérologique de la maladie est comparable à celui de Mayotte (chapitre I).** A l'échelle locale, ces données devraient stimuler la prise de mesures sanitaires pour la protection des populations vis à vis de cette zoonose. Notre investigation a été réalisée sur des excès de sérum de patients, majoritairement fébriles, collectés par différents laboratoires d'analyses et utilisés dans l'investigation des arboviroses en Union des Comores. Notre échantillon est clairement biaisé et les prévalences mesurées ne rendent donc pas compte du niveau d'exposition de la population générale. Il est donc nécessaire de mettre en place au niveau local une enquête épidémiologique ciblée permettant de mesurer précisément le niveau de séroprévalence de la population comorienne. Cette limite

dans l'échantillonnage résulte de la difficulté d'investigation de maladies infectieuses dans des pays comme l'Union des Comores où la leptospirose n'est pas connue même par les praticiens locaux et où d'autres problèmes sanitaires mais aussi socio-économiques compliquent singulièrement la mise en place de protocoles spécifiques. Néanmoins, les Tests de Micro Agglutination réalisés révèlent l'absence du sérotype Icterohaemorrhagiae pourtant majoritaire à La Réunion et aux Seychelles, la présence du sérotype Mini jusque là limitée dans la région à la seule île de Mayotte et enfin la présence de plusieurs sérotypes également rapportés sur l'île de Mayotte, tels que Pyrogenes, Grippyphosa et Pomona. Ces résultats, couplés aux études précédemment menées à Mayotte (Bourhy *et al.* 2012), montrent que l'absence de données humaines dans la région est au moins en partie imputable à l'absence d'investigation. Par ailleurs, la diversité des sérotypes mise en évidence dans l'archipel des Comores suggère que la leptospirose humaine dans cet archipel résulte d'une diversité génomique de leptospires potentiellement comparable à celle décrite sur l'île de Mayotte.

2. Diversité et structuration des leptospires pathogènes chez les chiroptères.

Le profil de la leptospirose humaine dépend, entre autre, des leptospires présents dans l'environnement et, en amont, des espèces réservoirs qui maintiennent et excrètent ces pathogènes dans ce même environnement (Levett 2001 ; Bharti *et al.* 2003). Il est donc pertinent d'une part **de caractériser les espèces de leptospires présents dans un environnement et en particulier dans les hôtes mammifères réservoirs, et d'autre part de chercher à comprendre comment est structurée cette diversité dans l'espace.**

2.1. Diversité d'espèces hôtes et diversité de leptospires

Les îles du SOOI appartiennent à un des 25 hotspots de biodiversité terrestres, et Madagascar est même considérée comme un des cinq hotspots leaders (Myers *et al.* 2000). Si cette classification, arbitraire, prend en compte les dangers d'extinction, il n'en reste pas moins que Madagascar abrite une diversité de mammifères tout à fait remarquable et, de manière importante ici, bien décrite notamment grâce aux travaux menés par nos collaborateurs de l'Association Vahatra et du Département de Biologie Animale de l'Université d'Antananarivo (Goodman 2011 ; Soarimalala & Goodman 2011 ; Goodman & Raheirilao 2013). Dans ce contexte, nous avons proposé que cette faune essentiellement endémique héberge une diversité importante et originale de micro organismes, dont certains à

potentiel de transmission à l'homme. Nos investigations dans la région du SOOI supportent cette hypothèse et notamment pour ce qui concerne les leptospires pathogènes qui sont au cœur du travail présenté ici. **La diversité des leptospires dans les chauves-souris de la région est corrélée à la diversité de leurs hôtes.** Ainsi la richesse de leptospires à un site d'échantillonnage dépend de la richesse spécifique des chauves-souris occupant ce site (**chapitre II et III**). Au delà d'une importante diversité bactérienne, certains des leptospires de chauves-souris apparaissent comme étant clairement distincts de lignées/espèces précédemment décrites et ne peuvent être assignés à aucune espèce de leptospire connue (**chapitre III**). Cette diversité de leptospires dans les chauves-souris (insectivores et frugivores) et leur caractère unique ont été rapportés récemment par Dietrich *et al.* (2014) à Madagascar mais aussi en Afrique continentale (Ogawa *et al.* 2015) et en Amérique du Sud (Matthias *et al.* 2005). Il est intéressant de noter qu'au Danemark, en utilisant des approches d'infections expérimentales, les chercheurs K. L. Fennestad et C. Borg-Petersen soulignaient il y a plusieurs décennies déjà que les leptospires des chiroptères étaient très particuliers du point de vue de leur pathogénicité et probablement de leur composition antigénique (Fennestad & Borg-Petersen 1972).

2.2. Structuration des leptospires par espèces hôtes

Après avoir caractérisé la diversité de leptospires associés aux chauves-souris malgaches, essentiellement endémiques, nous avons cherché à identifier les déterminants impliqués dans la structuration de cette diversité bactérienne. **Nous pouvons formuler les hypothèses (i) que la diversité des leptospires est structurée par les communautés des espèces hôtes, ou alternativement (ii) par des contraintes abiotiques qui favoriseraient une structuration géographique.** La première hypothèse peut être facilitée par une forte spécificité d'hôte. Dans ce cas, la distribution du pathogène pourra se superposer à celle des hôtes. La capacité de certains leptospires à se maintenir de façon prolongée dans l'environnement favoriserait au contraire le partage d'une même communauté de leptospires par des espèces hôtes vivant dans un même environnement, tel que proposé récemment par Lei & Olival (2014).

Pour tester ces hypothèses, nous avons utilisé les chauves-souris malgaches comme modèle biologique en raison de leur importante diversité (45 espèces dont 80% endémiques), de leur distribution géographique (large ou limitée selon les espèces) et des assemblages d'espèces distincts existant sur les différents sites d'échantillonnage. La détection par PCR et le séquençage de trois *loci* bactériens (*secY*, *adk* et *rrs2*) révèlent **une forte spécificité des**

leptospires pour leur hôte mammifère (chapitre III). Cette spécificité d'hôte, remarquable, corrobore les quelques études moléculaires précédentes dont certaines réalisées en Afrique et à Madagascar (Dietrich *et al.* 2014 ; Ogawa *et al.* 2015). Cette spécificité d'hôtes stricte implique que la communauté de leptospires de chauves-souris dans un site donné dépend des espèces hôtes présentes sur ce site. **L'absence de structuration géographique et la spécificité d'hôte stringente** que nous mettons en évidence nous permettent de rejeter, pour notre modèle d'étude, l'hypothèse proposée par Lei & Olival (2014) à savoir une structuration géographique des communautés des leptospires.

La spécificité d'hôte des leptospires peut être plus relâchée que dans notre modèle biologique des chauves-souris. C'est ce que nous montrons à Mayotte mais uniquement sur des espèces mammifères introduites. Ainsi, les rats noirs et les chiens peuvent être infectés par différentes espèces de leptospires (*Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii* et *L. kirschneri*) (**chapitre III**). De manière symétrique, il est également possible que certaines espèces de leptospires aient un large spectre d'hôte. Ainsi, des études récentes montrent que certaines espèces génomiques de leptospires infectent des espèces de mammifères de familles ou d'ordres différents (Cosson *et al.* 2014 ; Koizumi *et al.* 2015).

L'étude réalisée sur les petits mammifères terrestres endémiques de Madagascar montre également une forte spécificité d'hôte des leptospires (Dietrich *et al.* 2014). Les données présentées ici sur le modèle des chauves-souris complètent les travaux menés sur les petits mammifères terrestres endémiques (Dietrich *et al.* 2014) ou introduits (Guernier *et al.* en préparation) et **révèlent une forte spécificité d'hôte pour les leptospires inféodés à la faune mammifère autochtone, et une spécificité plus relâchée pour des leptospires hébergés par les mammifères introduits.** Ce patron peut s'expliquer par une survie différentes des leptospires endémiques et introduites après excrétion dans l'environnement. Ainsi, une survie supérieure des bactéries introduites (telles que *L. interrogans*) favoriserait une transmission indirecte entre espèces hôtes distinctes et sympatriques. Une survie limitée des bactéries autochtones faciliterait au contraire une transmission directe (par contact) entre hôtes d'une même espèce et favoriserait une spécialisation des leptospires pour leurs espèces hôtes. Au delà de ces questions d'importance et qui pourront être explorées par des approches expérimentales et/ou génomiques, la forte spécificité d'hôte révélée par nos travaux suggère que l'histoire évolutive des leptospires de chauves-souris est intimement liée à celle de leurs hôtes.

3. Evolution des leptospires au sein de leurs hôtes : le cas des leptospires des chiroptères de Madagascar

L'accumulation d'études moléculaires et phylogénétiques a permis de proposer que l'actuelle diversité des mammifères endémiques terrestres de Madagascar résulte d'évènements de radiation ayant succédé à quatre colonisations indépendantes depuis l'Afrique continentale par les ancêtres des lémuriens (ordre des Primates), des tenrecs (ordre des Afrosoricida), des rongeurs (ordre des Rodentia, famille des Nesomyidae) et des carnivores (ordre des Carnivora) (Poux *et al.* 2005 ; Yoder & Nowak 2006 ; Krause 2010). Les datations estimées des différents évènements de colonisation sont présentées sur la (Figure 23) (Poux *et al.* 2005 ; Krause 2010). Cette connaissance exceptionnelle des histoires évolutives des hôtes couplée à la grande diversité des mammifères terrestres endémiques malgaches fournit un terrain d'étude exceptionnel pour explorer l'évolution des parasites au sein de ces hôtes.

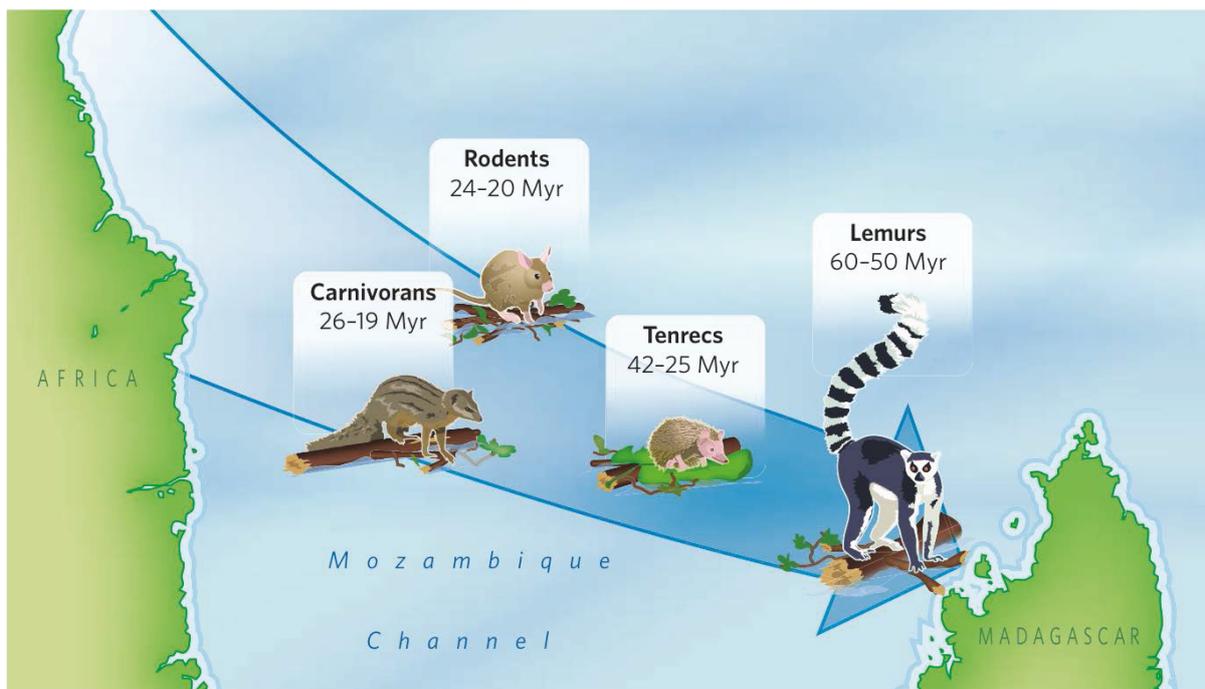


Figure 12. Les évènements uniques de colonisation des 4 ancêtres de mammifères placentaires à l'origine de la diversité des mammifères terrestres endémiques de Madagascar : les lémuriens, les tenrecs, les rongeurs et les carnivores (figure d'après Krause 2010). *Myr* : millions d'années.

Dans les cas des chauves-souris, les histoires de colonisations sont différentes mais la majorité des espèces ont une origine africaine et certaines d'entre elles sont issues d'une radiation récente (moins de 4,5 millions d'années); c'est le cas des espèces de *Miniopterus* (Miniopteridae) (Eger & Mitchell 2006 ; Goodman 2011 ; Christidis *et al.* 2014). Nous avons ici utilisé l'importante diversité de leptospires détectée dans les chauves-souris malgaches

pour identifier les processus évolutifs les plus probables à l'origine de la diversité des leptospires au sein des espèces et populations hôtes.

L'absence globale de signal de co-évolution entre les leptospires et les chauves-souris révélée par notre analyse pourrait s'expliquer par une succession de transferts horizontaux de gènes ou par un nombre de séquences trop limité et/ou par la faible résolution des marqueurs utilisés. Ainsi, les *loci* analysés (*adk*, *secY* et *rrs2*) conduisent à des conclusions opposées quant à la présence ou à l'absence de signal de co-évolution. Une étude comparable réalisée sur le modèle chauves-souris/*Bartonella* souligne aussi ces limites (Lei & Olival 2014). L'utilisation de génomes complets obtenus à partir de leptospires isolés de chauves-souris permettra de pallier à ces limites. Néanmoins, la mise en culture de leptospires de chauves-souris est aléatoire, et nous ne l'avons réussi à ce jour que sur un nombre limité d'espèces hôtes.

Malgré l'absence globale de signal de co-évolution, nos analyses nous renseignent sur les déterminants de la diversification des leptospires hébergés par les chauves-souris malgaches. Nous mettons en évidence **l'importance des relations phylogénétiques des hôtes** puisque des espèces hôtes phylogénétiquement proches hébergent des leptospires également phylogénétiquement proches. C'est le cas de la famille des Molossidae dans laquelle nous avons mis en évidence un scénario de co-spéciation entre plusieurs couples hôtes-parasites (**chapitre III**). Des événements de host-switch sont détectés entre des espèces appartenant à deux familles différentes : *Miniopterus* spp. (Miniopteridae) spp. et *Myotis goudoti* (Vespertilionidae). Ces chauves-souris sont singulières car elles ont la capacité de former des colonies dans lesquelles elles établissent des contacts physiques entre espèces (syntonie). Un tel comportement pourrait avoir facilité des transmissions de leptospires entre *Miniopterus* spp. et *Myotis goudoti* qui sont impliquées dans quatre des sept événements de host-switch proposés par nos analyses. De manière comparable, les analyses d'histoire évolutive des acariens de chauves-souris européennes ont révélé des événements de host-switch entre espèces appartenant à deux familles différentes (Miniopteridae et Rhinolophidae) favorisés, selon les auteurs, par le regroupement des femelles de ces deux espèces durant la période de mise bas (Bruyndonckx *et al.* 2009). Notre étude montre l'importance de la phylogénie ainsi que de l'écologie des hôtes dans la diversification et la structuration des leptospires.

Nous avons étudié ici les mécanismes évolutifs impliqués dans la diversification des leptospires au sein d'animaux très particuliers que sont les chauves-souris. Des caractéristiques uniques à cet ordre de mammifères, telles que l'aptitude au vol ou le repos

suspendu à des supports, limitant les contacts avec le sol, pourraient préserver les chauves-souris de contacts avec la faune micro mammifère terrestre. Les analyses réalisées sur les petits mammifères terrestres de Madagascar montrent également une importante diversité de leptospires et une spécificité d'hôte importante (Dietrich *et al.* 2014). En Australie une étude a suggéré des transmissions de leptospires de chauves-souris frugivores vers les rongeurs par le biais de l'urine infectée (Tulsiani *et al.* 2011). Des analyses de co-évolution intégrant les leptospires des chauves-souris et de petits mammifères terrestres permettraient d'apporter des éléments de réponse quand aux potentiels évènements de host-switch unidirectionnels des chauves-souris vers les petits mammifères à Madagascar.

4. Epidémiologie de la leptospirose humaine dans le SOOI

En conclusion, dans le cadre de l'investigation de la leptospirose dans le SOOI, une partie de nos travaux a consisté à décrire et à étudier l'évolution des leptospires hébergés par des réservoirs endémiques. Les résultats majeurs apportés par les données MLST confirment la puissance de cette méthode de génotypage dans l'investigation moléculaire de l'épidémiologie de la leptospirose humaine et animale (Levett 2007 ; Thaipadungpanit *et al.* 2007 ; Bourhy *et al.* 2010 ; Zhang *et al.* 2015). Toutefois, même si ce typage peut se réaliser sur des matrices d'ADN extraites de tissus d'animaux (Dietrich *et al.* 2014), de faibles charges bactériennes peuvent limiter voire empêcher un génotypage complet. L'obtention de cultures bactériennes constitue une alternative intéressante même si l'isolement de ces bactéries est fastidieux, nécessite des conditions de stérilité souvent incompatibles avec les contraintes de terrain, et présente des biais inhérents à toute technique. Au cours de nos travaux, nous avons fait le choix de réaliser des isollements de bactéries lorsque c'était possible, d'essayer d'obtenir un maximum de séquences des *loci* du MLST sur des matrices extraites de tissus, et lorsque ces deux approches n'étaient pas possibles, nous avons concentré nos efforts sur le séquençage au *locus secY*. Ce *locus* présente le double avantage d'être particulièrement polymorphe (Ahmed *et al.* 2006 ; Dietrich *et al.* 2014) et d'avoir déjà été utilisé dans différentes études qui ont abondamment renseigné les bases de données facilitant ainsi l'analyse des séquences obtenues à une échelle mondiale (Nalam *et al.* 2010 ; Bourhy *et al.* 2012, 2013 ; Cosson *et al.* 2014 ; Dietrich *et al.* 2014).

Nos études révèlent une importante diversité des leptospires et une structuration résultant d'associations hôtes-leptospires strictes. En combinant nos travaux aux études récentes réalisées par notre équipe, et en les superposant aux données épidémiologiques humaines que

nous avons contribué à enrichir (**chapitre I**), nous avons pu déterminer les réservoirs majeurs de leptospires sur l'île de Mayotte et nous apportons quelques éléments permettant d'éclairer l'épidémiologie contrastée de la leptospirose dans les îles de la région. L'épidémiologie de la leptospirose dans la région est diverse. Elle implique une diversité de leptospires importante à Mayotte, et potentiellement sur l'ensemble de l'archipel des Comores, incluant des lignées d'origine régionale, et essentiellement l'espèce *L. interrogans* à La Réunion et aux Seychelles (Figure 25). Le nombre extrêmement limité d'haplotypes de *L. interrogans* par ailleurs identiques à des haplotypes rapportés dans d'autres régions du monde est compatible avec une introduction récente.

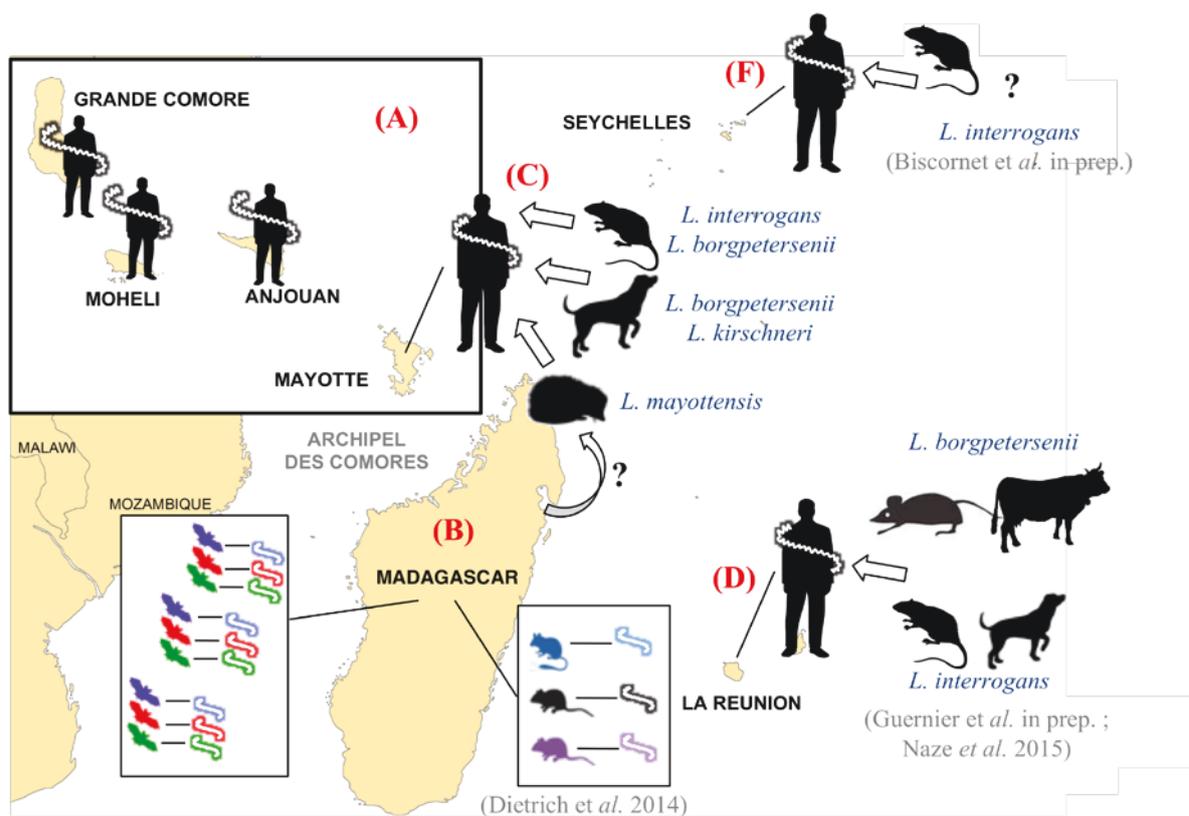


Figure 13. Synthèse des données produites permettant de comprendre en partie l'épidémiologie de la leptospirose dans les îles du Sud-ouest de l'Océan Indien : (A) En Union des Comores : exposition des populations humaines à des leptospires pathogènes ; (B, C et D) Différents types d'associations hôtes-leptospires (ex : spécificité d'hôtes des leptospires dans les petits mammifères, majoritairement endémiques, de Madagascar) ; (C) Identification des principaux réservoirs impliqués dans les cas cliniques de leptospirose à Mayotte ; (C, D et F) Différences dans la composition des espèces de leptospires présentes d'une part à Mayotte et d'autre part à La Réunion et aux Seychelles. Les données sont issues de la présente thèse, des études de notre équipe et de divers travaux menés dans la région (Yersin *et al.* 1998 ; Bourhy *et al.* 2010, 2012 ; Desvars *et al.* 2012 ; Pagès *et al.* 2014 ; Dietrich *et al.* 2014 ; Naze *et al.* 2015 ; Biscornet *et al.* en préparation ; Guernier *et al.* en préparation).

A **Mayotte**, les cas cliniques sont causés par quatre espèces de leptospires : *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri* et *L. mayottensis* (Bourhy *et al.* 2012). Notre étude basée sur un génotypage MLST, incluant 5 *loci*, révèle **que le rat noir (*Rattus rattus*) est le réservoir de deux des quatre espèces retrouvées chez les cas cliniques (*L. interrogans* et *L. borgpetersenii*), le tangué (*Tenrec ecaudatus*) étant le principal si ce n'est l'unique réservoir de *L. mayottensis*** (Figure 25). Le génotypage montre également que seul l'un des deux haplotypes de *L. borgpetersenii* mis en évidence chez les cas cliniques est retrouvé chez les rats noirs. *Leptospira kirschneri* est retrouvé dans une chauve-souris frugivore mais l'haplotype est différent de celui détecté dans les cas humains avec 98,7% de similarité entre les haplotypes en se basant sur 452 bp du *locus rrs2*. De même, chez cinq rats noirs, nous avons détecté un unique haplotype de *L. kirschneri* différent de ceux isolés des cas cliniques (3 nucléotides de différence sur 245 bp du *rrs2*). Cela suggère que les rats noirs et les chauves-souris frugivores ne sont pas impliqués dans la transmission de *L. kirschneri* à l'Homme. En revanche, **les chiens apparaissent impliqués dans l'épidémiologie de la leptospirose humaine** en hébergeant les mêmes haplotypes de leptospires *L. kirschneri* et *L. borgpetersenii* que ceux des cas cliniques (100 % de similarité pour les séquences *rrs2* sur 452 bp). Ne disposant que de séquences *rrs2*, nous ne pouvons toutefois pas confirmer définitivement le rôle des chiens dans la leptospirose humaine. Des investigations incluant des mises en culture sont nécessaires pour évaluer l'importance épidémiologique des chiens qui constituent une source d'infection de leptospires connue pour l'Homme (Levett 2001), notamment en milieu insulaire (Everard & Everard 1993 ; Weekes *et al.* 1997).

La situation épidémiologique de la leptospirose décrite ci-dessus à Mayotte pourrait s'appliquer aux autres îles de l'archipel des Comores. Cette hypothèse est soutenue par (i) une exposition des populations humaines aux mêmes sérogroupes de leptospires au sein de l'archipel (**chapitre I**), (ii) une origine géologique commune de toutes les îles et des conditions environnementales comparables, (iii) des échanges humains et animaux inter îles pouvant favoriser les transmissions de leptospires et (iv) une faune comparable sur les îles incluant notamment la présence de *T. ecaudatus* (Louette *et al.* 2004). La situation très singulière de l'épidémiologie au sein de cet archipel peut s'expliquer par sa localisation géographique entre l'Afrique et Madagascar tel que précédemment proposée Desvars (2012). L'introduction des micro organismes pathogènes d'origine africaine dans l'archipel des Comores a été récemment documentée (Deken *et al.* 2007 ; Yssouf *et al.* 2011 ; Roger *et al.* 2014). Si les résultats de la présente thèse (**chapitre IV**) et ceux des études précédentes

(Dietrich *et al.* 2014) supportent une origine malgache de *L. mayottensis*, une origine africaine d'autres lignées retrouvées chez les cas cliniques de Mayotte devra être explorée par le typage de leptospires de la faune africaine continentale.

A La Réunion et aux Seychelles, les leptospires responsables des cas cliniques appartiennent tous quasi exclusivement à l'espèce *L. interrogans* (Biscornet *et al.* en préparation ; Guernier *et al.* en préparation) (Figure 25). *Leptospira interrogans* est représentée à La Réunion par deux haplotypes dont l'un, majoritaire, a été à l'origine d'une épidémie en Thaïlande (Thaipadungpanit *et al.* 2007). A La Réunion et aux Seychelles, les réservoirs majeurs sont les rats (ainsi que les chiens à La Réunion) (Guernier *et al.* en préparation ; Biscornet *et al.* en préparation). Globalement, la quasi absence de diversité intra spécifique des leptospires identifiés chez les cas cliniques et la présence d'un haplotype dominant décrit dans d'autres régions du monde supportent une introduction récente de ces leptospires sur ces îles.

Au final on peut distinguer une leptospirose introduite à La Réunion et aux Seychelles, liée à des haplotypes bactériens que l'on peut qualifier de cosmopolites, et une leptospirose autochtone dans l'archipel des Comores (Figure 25). Ce patron pourrait trouver son origine dans l'histoire d'introduction des rongeurs sur les îles de l'Océan Indien. Si quelques études ont exploré l'origine des invasions de rats à l'échelle de l'Océan Indien (Tollenaere *et al.* 2010 ; Brouat *et al.* 2014), une étude plus complète permettra de préciser la structuration des populations de rats dans les îles du SOOI et pourra être superposée à la structuration géographique des leptospires pathogènes.

Perspectives

Cette thèse a apporté des éléments nouveaux concernant **(i)** la spécificité d'hôte des leptospires pathogènes, **(ii)** les processus évolutifs ayant contribué à leur diversification au sein de la région et **(iii)** la compréhension de l'épidémiologie contrastée de la leptospirose dans les îles de la région. Nous avons, dans le cadre de ces travaux, pu isoler un certain nombre de leptospires à partir de chauves-souris, de petits mammifères terrestres et introduits de la région. Cette biobanque constitue un matériel précieux qui permettra de poursuivre l'étude de la leptospirose par des approches expérimentales et génomiques. Pour la suite de ce travail nous proposons quelques perspectives :

Spécificité d'hôte et virulence des leptospires autochtones

L'un des résultats majeurs de ce travail est la mise en évidence de la spécificité extrême des leptospires pathogènes pour leurs hôtes endémiques. Néanmoins, nous ne savons pas si ce patron est contrôlé par la phylogénie ou, alternativement, l'écologie des espèces hôtes. Nous pourrions explorer cela par des expériences d'infection expérimentale utilisant un modèle animal réservoir tel que le rat qui permettra d'évaluer l'aptitude de ces leptospires autochtones/endémiques à coloniser les reins d'hôtes introduits. Symétriquement, il serait intéressant d'infecter des hôtes autochtones tels que les tangués ou les chauves-souris par des leptospires cosmopolites. Ce type d'infection est délicat car il nécessite d'avoir accès à une colonie de chauves-souris et de tangués. Il est prévu d'utiliser une colonie de *Rousettus aegyptiacus* (Pteropodidae, frugivore) maintenue en Afrique du Sud par l'équipe du Professeur Wanda Markotter (Université de Pretoria) partenaire scientifique de notre Unité. De même, des élevages de tangués ont été mis en place notamment dans des zoos américains mais également, de manière plus artisanale, à La Réunion. Il est envisageable de mettre en place un élevage mais il faudra veiller à réaliser des infections en milieu contrôlé de manière à éviter toute possibilité de contamination de l'environnement réunionnais par *L. mayottensis*, notamment. Par ailleurs, des données de surveillance épidémiologique indiquent des différences significatives dans la sévérité des cas hospitalisés à Mayotte d'une part et à La Réunion et aux Seychelles d'autre part. Ainsi, les Mascareignes et les Seychelles sont caractérisées par des taux de mortalité plus importants (3-8%) qu'à Mayotte (0,4%), de même, un tiers des patients sont admis en réanimation à La Réunion et aucun à Mayotte (Pagès, communication personnelle). Il est donc possible que les leptospires autochtones induisent des formes cliniques moins sévères que les leptospires cosmopolites. Cela pourra également être investigué par des infections expérimentales sur hamster utilisé comme modèle animal d'infection aigüe (Silva *et al.* 2008). Enfin, ces infections expérimentales devront être couplées à une étude génomique qui pourra permettre de révéler des régions génomiques impliquées dans la spécificité d'hôte et la virulence. Ces approches sont actuellement en cours dans la nouvelle unité PIMIT et font l'objet d'une thèse récemment initiée.

Etudes multi-parasites

Les chauves-souris sont considérées comme des réservoirs majeurs de parasites, potentiellement en raison de leur comportement grégaire, un métabolisme et/ou un système immunitaire particuliers (Calisher *et al.* 2006). En dehors du volet bactérien présenté ici, notre

Unité a eu l'opportunité d'explorer la diversité et la prévalence d'infection de différents parasites (virus, protozoaires, filaires et ectoparasites) sur ce même échantillon de chauves-souris malgaches (Wilkinson *et al.* 2012, 2014 ; Tortosa *et al.* 2013 ; Dietrich *et al.* 2014). Aujourd'hui, toutes ces données sont accessibles et compilées dans une même base de données. Il sera donc possible d'utiliser ces informations pour mettre en évidence des interactions entre différents parasites ou déterminer les facteurs influençant la richesse spécifique en parasite comme cela a été fait pour les parasites de chauves-souris du Sud-est de l'Asie (Gay *et al.* 2014).

Biogéographie microbienne

La famille des Tenrecidae est extrêmement diversifiée et constitue un exemple remarquable de radiation de mammifères ayant succédé à un événement de colonisation fondateur qui remonterait à 25-42 millions d'années (Poux *et al.* 2005). Cette famille est composée à Madagascar de pas moins de 32 espèces regroupées en 3 sous-familles (Tenrecinae, Geogalinae et Oryzorictinae) (Soarimalala & Goodman 2011). En Afrique uniquement 3 espèces appartenant aux genres *Micropotamogale* et *Potamogale* de la sous-famille des Potamogalinae sont présentes. Cette famille limitée à la région afro-malgache constitue un modèle intéressant pour des études de biogéographie de mammifères et microbienne. Nous avons approché le Professeur Link Olson (Université d'Alaska Museum of the North), un des spécialistes mondiaux de l'évolution de cette famille (Olson *et al.* 2004 ; Olson & Goodman 2006 ; Olson 2013), lors d'une conférence qui s'est tenue il y a quelques mois à Madagascar. Nous avons convenu qu'il serait intéressant de réaliser des études de génétique de populations fines permettant de déterminer l'origine géographique des tangués introduits dans les différentes îles de l'Océan Indien. Cela permettrait aussi de comprendre la présence et l'absence de *L. mayottensis* dans les différentes îles de la région. En effet, l'absence de *L. mayottensis* chez les cas cliniques en dehors de Mayotte, et l'absence d'infection chez les tangués réunionnais appellent des investigations complémentaires. Il serait en particulier intéressant d'échantillonner les tangués dans différentes régions de Madagascar, de déterminer leur statut d'infection, et de superposer ces données aux données de génétique des populations. Nous pourrions ainsi tester une hypothèse selon laquelle les tangués introduits à Mayotte proviennent d'une région où les populations sont particulièrement infectées. Par ailleurs, nous avons au laboratoire des cultures de *L. mayottensis* provenant de différentes espèces de la famille des Tenrecidae à savoir *T. ecaudatus* (sous-famille Tenrecinae) et deux

espèces de *Microgale* (sous-famille Oryzoricinae) : *Microgale cowani* et *M. dobsoni*. Ce matériel biologique pourrait permettre de superposer l'histoire de la radiation des Tenrecidae (en cours de résolution par le Pr. Link Olson) à celle des leptospires pathogènes. Si les deux histoires évolutives sont compatibles, ce modèle fournirait une opportunité exceptionnelle de calibrer l'horloge moléculaire des leptospires. Au delà des spirochètes, une telle approche génomique fournirait des données importantes quant aux études évolutives des procaryotes en général (Ochman *et al.* 1999 ; Dietrich *et al.* 2014).

Références bibliographiques

- Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and Leptospirosis. *Vet Microbiol* 2010;**140**:287–96.
- Ahmed A, Engelberts MFM, Boer KR *et al.* Development and validation of a Real-Time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS ONE* 2009;**4**:e7093.
- Ahmed N, Devi SM, Valverde M de los Á *et al.* Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006;**5**:28.
- Angelini R, Finarelli AC, Angelini P *et al.* An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 2007a;**12**:E070906.1.
- Angelini R, Finarelli AC, Angelini P *et al.* Chikungunya in north-eastern Italy: a summing up of the outbreak. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 2007b;**12**:E071122.2.
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 2003;**3**:757–71.
- Bourhy P, Collet L, Brisse S *et al.* *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic *Leptospira* species isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014:ijs.0.066597–0.
- Bourhy P, Collet L, Clément S *et al.* Isolation and characterization of new *Leptospira* genotypes from patients in Mayotte (Indian Ocean). *PLoS Negl Trop Dis* 2010;**4**:e724.
- Bourhy P, Collet L, Lernout T *et al.* Human *Leptospira* isolates circulating in Mayotte (Indian Ocean) have unique serological and molecular features. *J Clin Microbiol* 2012;**50**:307–11.
- Bourhy P, Herrmann Storck C, Theodose R *et al.* Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;**7**:e2114.
- Brouat C, Tollenaere C, Estoup A *et al.* Invasion genetics of a human commensal rodent: the black rat *Rattus rattus* in Madagascar. *Mol Ecol* 2014;**23**:4153–67.
- Bruyndonckx N, Dubey S, Ruedi M *et al.* Molecular cophylogenetic relationships between European bats and their ectoparasitic mites (Acari, Spinturnicidae). *Mol Phylogenet Evol* 2009;**51**:227–37.
- Bulach DM, Zuerner RL, Wilson P *et al.* Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci* 2006;**103**:14560–5.
- Calisher CH, Childs JE, Field HE *et al.* Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev* 2006;**19**:531–45.

- Cameron CE. Leptospiral structure, physiology, and metabolism. In: Adler B (ed.). *Leptospira and Leptospirosis*. Springer Berlin, Heidelberg, 2015, 21–41.
- Cameron CE, Zuerner RL, Raverty S *et al.* Detection of pathogenic *Leptospira* bacteria in pinniped populations via PCR and Identification of a source of transmission for zoonotic leptospirosis in the marine environment. *J Clin Microbiol* 2008;**46**:1728–33.
- Casjens S. *Borrelia* genomes in the year 2000. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000;**2**:401–10.
- Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 2009;**9**:760–8.
- Chang SL, Buckingham M, Taylor MP. Studies on *Leptospira Icterohaemorrhagiae*: IV. Survival in water and sewage: destruction in water by halogen compounds, synthetic detergents, and heat. *J Infect Dis* 1948;**82**:256–66.
- Charon NW, Goldstein SF. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the Spirochetes. *Annu Rev Genet* 2002;**36**:47–73.
- Chomel BB, Stuckey MJ, Boulouis H-J *et al.* bat-related zoonoses. In: Sing A (ed.). *Zoonoses - Infections Affecting Humans and Animals*. Springer, Dordrecht, 2015, 697–714.
- Christidis L, Goodman SM, Naughton K *et al.* Insights into the evolution of a cryptic radiation of bats: dispersal and ecological radiation of Malagasy *Miniopterus* (Chiroptera: Miniopteridae). *PLoS ONE* 2014;**9**:e92440.
- Cohen ML. Changing patterns of infectious disease. *Nature* 2000;**406**:762–7.
- Combes C. *Parasitism: The Ecology and Evolution of Intimate Interactions*. The University of Chicago Press, Chicago, 2001.
- Cosson J-F, Picardeau M, Mielcarek M *et al.* Epidemiology of *Leptospira* transmitted by rodents in Southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;**8**:e2902.
- Costa F, Hagan JE, Calcagno J *et al.* Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;**9**:e0003898.
- Cox TE, Smythe LD, Leung LK-P. Flying foxes as carriers of pathogenic *Leptospira* species. *J Wildl Dis* 2005;**41**:753–7.
- D'Aoust L, Mundodh P, Sookram C *et al.* Status report on public health in Mauritius in 2009. *Med Trop* 2010;**70**:229–38.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging infectious diseases of wildlife-- Threats to biodiversity and Human health. *Science* 2000;**287**:443–9.
- Deken R de, Martin V, Saido A *et al.* An outbreak of East Coast Fever on the Comoros: a consequence of the import of immunised cattle from Tanzania? *Vet Parasitol* 2007;**143**:245–53.

- Derne BT, Fearnley EJ, Lau CL *et al.* Biodiversity and leptospirosis risk: a case of pathogen regulation? *Med Hypotheses* 2011;**77**:339–44.
- Desvars A. Epidémiologie d'une zoonose, la Leptospirose, dans deux îles de l'Océan Indien, La Réunion et Mayotte - Etude comparée du rôle de différentes espèces sauvages et domestiques - Thèse, Université de La Réunion 2012.
- Desvars A, Cardinale E, Michault A. Animal leptospirosis in small tropical areas. *Epidemiol Infect* 2011;**139**:167–88.
- Desvars A, Michault A, Bourhy P. Leptospirosis in the western Indian Ocean islands: what is known so far? *Vet Res* 2013a;**44**:80.
- Desvars A, Naze F, Benneveau A *et al.* Endemicity of leptospirosis in domestic and wild animal species from Reunion Island (Indian Ocean). *Epidemiol Infect* 2013b;**141**:1154–65.
- Desvars A, Naze F, Vourc'h G *et al.* Similarities in *Leptospira* serogroup and species distribution in animals and humans in the Indian Ocean Island of Mayotte. *Am J Trop Med Hyg* 2012;**87**:134–40.
- Dietrich M, Mühlendorfer K, Tortosa P, Markotter W. *Leptospira* and bats : story of an emerging friendship. PLoS Pathog, in press.
- Dietrich M, Wilkinson DA, Benlali A *et al.* *Leptospira* and *Paramyxovirus* infection dynamics in a bat maternity enlightens pathogen maintenance in wildlife. *Environ Microbiol* 2015, DOI: 10.1111/1462-2920.12766.
- Dietrich M, Wilkinson DA, Soarimalala V *et al.* Diversification of an emerging pathogen in a biodiversity hotspot: *Leptospira* in endemic small mammals of Madagascar. *Mol Ecol* 2014;**23**:2783–96.
- Drexler JF, Corman VM, Müller MA *et al.* Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun* 2012;**3**:796.
- Eger JL, Mitchell L. Chiroptera, Bats. In: Goodman SM, Benstead JP (eds.). *The Natural History of Madagascar*. The University of Chicago Press, Chigago, 2006, 1287–98.
- Ellinghausen HC, Mccullough WG. Nutrition of *Leptospira* Pomona and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res* 1965;**26**:45–51.
- Ellis WA. Animal Leptospirosis. In: Adler B (ed.). *Leptospira and Leptospirosis*. Springer Berlin, Heidelberg, 2015, 99–137.
- Emerson BC. Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. *Mol Ecol* 2002;**11**:951–66.
- Enserink M. Breakthrough of the year. SARS: a pandemic prevented. *Science* 2003;**302**:2045.
- Everard JD, Everard COR. Leptospirosis in the Caribbean. *Rev Med Microbiol* 1993;**4**.

- Faine S, Adler B, Bolin C *et al.* *Leptospira* and Leptospirosis. Second edition. MediSci, Melbourne, 1999.
- Fennestad KL, Borg-Petersen C. Leptospirosis in Danish wild mammals. *J Wildl Dis* 1972;**8**:343–51.
- Foley NM, Thong VD, Soisook P *et al.* How and why overcome the impediments to resolution: lessons from rhinolophid and hipposiderid bats. *Mol Biol Evol* 2015;**32**:313–33.
- Ganoza CA, Matthias MA, Collins-Richards D *et al.* Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med* 2006;**3**:e308.
- Ganoza CA, Matthias MA, Saito M *et al.* Asymptomatic renal colonization of humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;**4**:e612.
- Gay N, Olival KJ, Bumrungsri S *et al.* Parasite and viral species richness of Southeast Asian bats: fragmentation of area distribution matters. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 2014;**3**:161–70.
- Gomard Y, Silai R, Hoarau G *et al.* Serologic evidence of leptospirosis in humans, Union of the Comoros, 2011. *Emerg Infect Dis* 2014;**20**:720–2.
- Goodman SM. *Les chauves-souris de Madagascar*. Association Vahatra, Antananarivo, 2011.
- Goodman SM, Benstead JP (eds.). *The Natural History of Madagascar*. The University of Chicago Press, Chicago, 2003.
- Goodman SM, Ramasindrazana B. Bats or order Chiroptera. In: Goodman SM & Raheirilalao MJ (eds.). *Atlas of Selected Land Vertebrates of Madagascar*. Association Vahatra, Antananarivo, 2013, 169–209.
- Goodman SM, Soarimalala V, Raheiarisena M *et al.* Small mammals or tenrecs (Tenrecidae) and Rodents (Nesomyidae). In: Goodman SM & Raheirilalao MJ (eds.). *Atlas of Selected Land Vertebrates of Madagascar*. Association Vahatra, Antananarivo, 2013, 211–69.
- Goodman SM, Raheirilalao MJ (eds.). *Atlas of selected land vertebrates of Madagascar*. Association Vahatra, Antananarivo, 2013.
- Gould EA, Gallian P, De Lamballerie X *et al.* First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clin Microbiol Infect* 2010;**16**:1702–4.
- Grandadam M, Caro V, Plumet S *et al.* Chikungunya virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis* 2011;**17**:910–3.
- Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995;**1**:55–7.
- Guernier V, Hochberg ME, Guégan J-F. Ecology drives the worldwide distribution of human

- diseases. *PLoS Biol* 2004;**2**:e141.
- Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in humans. In: Adler B (ed.). *Leptospira and Leptospirosis*. Springer Berlin, Heidelberg, 2015, 65–97.
- Halliday JEB, Allan KJ, Ekwem D *et al*. Endemic zoonoses in the tropics: a public health problem hiding in plain sight. *Vet Rec* 2015;**176**:220–5.
- Hamond C, Pinna A, Martins G *et al*. The role of leptospirosis in reproductive disorders in horses. *Trop Anim Health Prod* 2014;**46**:1–10.
- Hayman DTS, Bowen RA, Cryan PM *et al*. Ecology of zoonotic infectious diseases in bats: current knowledge and future directions. *Zoonoses Public Health* 2013;**60**:2–21.
- Johnson RC, Harris VG. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire I. Growth at low temperatures. *J Bacteriol* 1967;**94**:27–31.
- Jones KE, Patel NG, Levy MA *et al*. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008;**451**:990–3.
- Katz AR, Buchholz AE, Hinson K *et al*. Leptospirosis in Hawaii, USA, 1999–2008. *Emerg Infect Dis* 2011;**17**:221–6.
- Keesing F, Belden LK, Daszak P *et al*. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 2010;**468**:647–52.
- Khasnis AA, Nettleman MD. Global warming and infectious disease. *Arch Med Res* 2005;**36**:689–96.
- Kilpatrick AM, Randolph SE. Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *The Lancet* 2012;**380**:1946–55.
- Kleinman A, Watson JL. *SARS in China: Prelude to Pandemic?* Stanford University Press, Stanford, 2006.
- Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009;**7**:736–47.
- Koizumi N, Izumiya H, Mu J-J *et al*. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Leptospira interrogans* and *Leptospira borgpetersenii* isolated from small feral and wild mammals in East Asia. *Infect Genet Evol* 2015, DOI: 10.1016/j.meegid.2015.08.013
- Kolochine-Erber B, Brygoo ER. Research on leptospirosis in Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot Ses Fil* 1956;**49**:686–98.
- Krause DW. Biogeography: Washed up in Madagascar. *Nature* 2010;**463**:613–4.
- Kumar KV, Lall C, Raj RV *et al*. Coexistence and survival of pathogenic leptospire by formation of biofilm with *Azospirillum*. *FEMS Microbiol Ecol* 2015;**91**:fiv051.
- Kwong JC, Druce JD, Leder K. Zika virus infection acquired during brief travel to Indonesia.

- Am J Trop Med Hyg* 2013;**89**:516–7.
- Mérien F, Amouriaux P, Perolat P *et al.* Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1992;**30**:2219–24.
- Lafferty KD, Wood CL. It's a myth that protection against disease is a strong and general service of biodiversity conservation: response to Ostfeld and Keesing. *Trends Ecol Evol* 2013;**28**:503–4.
- Laporte A, Michault A, Galtier J *et al.* Leptospirosis in Mayotte. *Bull Soc Pathol Exot* 1990;**83**:637–41.
- Lau CL, Skelly C, Dohnt M *et al.* The emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea in Queensland, Australia, 2001 to 2013. *BMC Infect Dis* 2015;**15**:230.
- Lau CL, Skelly C, Smythe LD *et al.* Emergence of new leptospiral serovars in American Samoa - ascertainment or ecological change? *BMC Infect Dis* 2012;**12**:19.
- Lehmann JS, Fouts DE, Haft DH *et al.* Pathogenomic inference of virulence-associated Genes in *Leptospira interrogans*. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;**7**:e2468.
- Lehmann JS, Matthias MA, Vinetz JM *et al.* Leptospiral pathogenomics. *Pathogens* 2014;**3**:280–308.
- Lei BR, Olival KJ. Contrasting patterns in mammal–bacteria coevolution: *Bartonella* and *Leptospira* in bats and rodents. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;**8**:e2738.
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 2001;**14**:296–326.
- Levett PN. Sequence-based typing of *Leptospira*: epidemiology in the genomic era. *PLoS Negl Trop Dis* 2007;**1**:e120.
- Levett PN. Systematics of Leptospiraceae. In: Adler B (ed.). *Leptospira and Leptospirosis*. Springer Berlin, Heidelberg, 2015, 11–20.
- Lhuillier M. Leptospiroses in Madagascar. Bacteriological and serological study. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 1978;**46**:429–39.
- LoGiudice K, Ostfeld RS, Schmidt KA *et al.* The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proc Natl Acad Sci* 2003;**100**:567–71.
- Louette M, Meirte D, Jocque R (eds.). *La faune terrestre de l'archipel des Comores*. *Studies in Afrotropical Zoology* 2004;**293**:1–456.
- Luis AD, Hayman DTS, O'Shea TJ *et al.* A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc R Soc B Biol Sci* 2013;**280**:20122753.
- MacArthur RH, Wilson EO. *The Theory of Island Biogeography*. Princeton University Press, 1967.
- Martin L, Pettit A. Sero-diagnostic de la spirochaetose ictero-haémorragique. *Bull Mém*

Société Médicale Hôp Paris 1918.

- Matthias MA, Díaz MM, Campos KJ *et al.* Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by Bayesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences. *Am J Trop Med Hyg* 2005;**73**:964–74.
- Matthias MA, Ricaldi JN, Cespedes M *et al.* Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;**2**:e213.
- McBride AJA, Athanazio DA, Reis MG *et al.* Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 2005;**18**:376–86.
- Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 2004;**430**:242–9.
- Morse SS, Mazet JA, Woolhouse M *et al.* Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. *The Lancet* 2012;**380**:1956–65.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 2000;**403**:853–8.
- Nalam K, Ahmed A, Devi SM *et al.* Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: implications for strain identification and molecular epidemiology. *PLoS ONE* 2010;**5**:e12637.
- Nascimento ALTO, Ko AI, Martins E a. L *et al.* Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol* 2004;**186**:2164–72.
- Naze F, Desvars A, Picardeau M *et al.* Use of a new high resolution melting method for genotyping pathogenic *Leptospira* spp. *PloS One* 2015;**10**:e0127430.
- Ochman H, Elwyn S, Moran NA. Calibrating bacterial evolution. *Proc Natl Acad Sci* 1999;**96**:12638–43.
- Ogawa H, Koizumi N, Ohnuma A *et al.* Molecular epidemiology of pathogenic *Leptospira* spp. in the straw-colored fruit bat (*Eidolon helvum*) migrating to Zambia from the Democratic Republic of Congo. *Infect Genet Evol* 2015;**32**:143–7.
- Okazaki W, Ringen LM. Some effects of various environmental conditions on the survival of *Leptospira pomona*. *Am J Vet Res* 1957;**18**:219–23.
- Olson LE. Tenrecs. *Curr Biol* 2013;**23**:R5–8.
- Olson LE, Goodman SM. Phylogeny and biogeography of the tenrecs. In: Goodman SM, Benstead JP (eds.). *The Natural History of Madagascar*. Chicago, Ill.; Bristol: University of Chicago Press ; University Presses Marketing, 2006, 1235–40.
- Olson LE, Goodman SM, Yoder AD. Illumination of cryptic species boundaries in long-tailed shrew tenrecs (Mammalia: Tenrecidae; *Microgale*), with new insights into geographic variation and distributional constraints. *Biol J Linn Soc* 2004;**83**:1–22.

- Ostfeld RS. A Candidé response to Panglossian accusations by Randolph and Dobson: biodiversity buffers disease. *Parasitology* 2013;**140**:1196–8.
- Ostfeld RS, Keesing F. Effects of host diversity on infectious disease. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 2012;**43**:157–82.
- Ostfeld RS, Keesing F. Straw men don't get Lyme disease: response to Wood and Lafferty. *Trends Ecol Evol* 2013;**28**:502–3.
- Pagès F, Kuli B, Moiton M-P *et al.* Leptospirosis after a stay in Madagascar. *J Travel Med* 2015a;**22**:136–9.
- Pagès F, Larrieu S, Simoes J *et al.* Investigation of a leptospirosis outbreak in triathlon participants, Réunion Island, 2013. *Epidemiol Infect* 2015b:1–9.
- Pagès F, Polycarpe D, Dehecq J-S *et al.* Human leptospirosis on Reunion Island: past and current burden. *Int J Environ Res Public Health* 2014;**11**:968–82.
- Pappas CJ, Benaroudj N, Picardeau M. A replicative plasmid vector allows efficient complementation of pathogenic *Leptospira* strains. *Appl Environ Microbiol* 2015:AEM.00173–15.
- Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V *et al.* The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis* 2008;**12**:351–7.
- Parte AC. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2013:gkt1111. [Internet source] <http://www.bacterio.net/leptospira.html>. Consulté le 12/10/15.
- Paterson AM, Gray RD. Host-parasite co-speciation, host switching, and missing the boat. In: Clayton DH, Moore J (eds.). *Host-Parasite Evolution: General Principles and Avian Models*. 1 edition. Oxford ; New York: Oxford University Press, 1997, 236–50.
- Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine Mal Infect* 2013;**43**:1–9.
- Picardeau M. Genomics, Proteomics, and genetics of *Leptospira*. In: Adler B (ed.). *Leptospira and Leptospirosis*. Springer Berlin, Heidelberg, 2015, 43–63.
- Picardeau M, Bulach DM, Bouchier C *et al.* Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* 2008;**3**:e1607.
- Poux C, Madsen O, Marquard E *et al.* Asynchronous colonization of Madagascar by the four endemic clades of Primates, Tenrecs, Carnivores, and Rodents as inferred from nuclear genes. *Syst Biol* 2005;**54**:719–30.
- Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect* 2000;**2**:1265–76.
- Rahelinirina S, Léon A, Harstskerl RA *et al.* First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. *PLoS ONE* 2010;**5**:e14111.

- Randolph SE, Dobson ADM. Pangloss revisited: a critique of the dilution effect and the biodiversity-buffers-disease paradigm. *Parasitology* 2012;**139**:847–63.
- Ratsitorahina M, Rahelinirina S, Michault A *et al.* Has Madagascar lost its exceptional leptospirosis free-like status? *PLoS ONE* 2015;**10**:e0122683.
- Ren S-X, Fu G, Jiang X-G *et al.* Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2003;**422**:888–93.
- Ricaldi JN, Fouts DE, Selengut JD *et al.* Whole genome analysis of *Leptospira licerasiae* provides insight into leptospiral evolution and pathogenicity. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;**6**:e1853.
- Riley S, Fraser C, Donnelly CA *et al.* Transmission dynamics of the etiological agent of SARS in Hong Kong: impact of public health interventions. *Science* 2003;**300**:1961–6.
- Roger M, Beral M, Licciardi S *et al.* Evidence for circulation of the Rift Valley Fever Virus among livestock in the Union of Comoros. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;**8**:e3045.
- Ruan Y, Wei CL, Ling AE *et al.* Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *The Lancet* 2003;**361**:1779–85.
- Saier MH. Spirochetes: Evolution, genome analyses and physiology. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2000;**2**(4):339.
- Saito M, Villanueva SYAM, Kawamura Y *et al.* *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013;**63**:2457–62.
- Schmidt KA, Ostfeld RS. Biodiversity and the dilution effect in disease ecology. *Ecology* 2001;**82**:609–19.
- Silva ÉF, Santos CS, Athanzio DA *et al.* Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in a hamster model. *Vaccine* 2008;**26**:3892–6.
- Simmons NB. Order Chiroptera. In: Wilson DE & Reeder DM (eds.). *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference, 3rd Edition*. Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, 2005, 312–529.
- Simon F, Morand G, Roche C *et al.* Leptospirosis in a French traveler returning from Mauritius. *J Travel Med* 2012;**19**:69–71.
- Slack AT, Khairani-Bejo S, Symonds ML *et al.* *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009;**59**:705–8.
- Smythe LD, Smith IL, Smith GA *et al.* A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis* 2002;**2**:13.
- Soarimalala V, Goodman SM. *Les Petits Mammifères de Madagascar*. Antananarivo, Madagascar : Association Vahatra, 2011.

- Socolovschi C, Angelakis E, Renvoisé A *et al.* Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. *Int J Infect Dis* 2011;**15**:e710–5.
- Taraschewski H. Hosts and parasites as aliens. *J Helminthol* 2006;**80**:99–128.
- Teeling EC, Springer MS, Madsen O *et al.* A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* 2005;**307**:580–4.
- Thaipadunpanit J, Chierakul W, Wuthiekanun V *et al.* Diagnostic accuracy of Real-Time PCR assays targeting 16S rRNA and lipI32 genes for human leptospirosis in Thailand: A Case-Control Study. *PLoS ONE* 2011;**6**:e16236.
- Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W *et al.* A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis* 2007;**1**:e56.
- Tollenaere C, Brouat C, Duplantier J *et al.* Phylogeography of the introduced species *Rattus rattus* in the western Indian Ocean, with special emphasis on the colonization history of Madagascar. *J Biogeogr* 2010;**37**:398–410.
- Tortosa P, Dsouli N, Gomard Y *et al.* Evolutionary history of Indian Ocean Nycteribiid bat flies mirroring the ecology of their hosts. *PLoS ONE* 2013;**8**:e75215.
- Tortosa P, Pascalis H, Guernier V *et al.* Deciphering arboviral emergence within insular ecosystems. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 2012, DOI: 10.1016/j.meegid.2012.03.024.
- Trueba G, Zapata S, Madrid K *et al.* Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol* 2004;**7**:35–40.
- Tulsiani SM, Cobbold RN, Graham GC *et al.* The role of fruit bats in the transmission of pathogenic leptospires in Australia. *Ann Trop Med Parasitol* 2011;**105**:71–84.
- Vinetz JM, Wilcox BA, Aguirre A *et al.* Beyond disciplinary boundaries: leptospirosis as a model of incorporating transdisciplinary approaches to understand infectious disease emergence. *EcoHealth* 2005;**2**:291–306.
- United Nations. *World Populations Prospects : The 2015 Revision*. United Nations Department of Economic and Social Affairs, Populations Division. United Nations Department of public Information. [Internet source] http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsID=51526#.VjMxRaQbK_k. Consulté le 10/10/15.
- Vittecoq M, Roche B, Prugnolle F *et al.* *Les maladies infectieuses*. Paris: SOLAL, 2015.
- Warren BH, Bermingham E, Prys-Jones RP *et al.* Tracking island colonization history and phenotypic shifts in Indian Ocean bulbuls (Hypsipetes: Pycnonotidae). *Biol J Linn Soc* 2005;**85**:271–87.
- Weekes CC, Everard COR, Levett PN. Seroepidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados. *Vet Microbiol* 1997;**57**:215–22.

- WHO. SRAS: Interruption des chaînes de transmission, 2003. [Internet source] <http://www.who.int/features/2003/07/fr/>. Consulté le 10/10/15.
- WHO. Leptospirosis worldwide. *Wkly Epidemiol Rec* 1999;74:237–44. [Internet source] <http://www.who.int/docstore/wer/pdf/1999/wer7429.pdf>. Consulté le 08/10/15.
- Widmann M. Impact of large-scale environmental features changes on host-parasite interaction in marine and freshwater ecosystems. *Biosci Master Rev Dép Biol Ecole Norm Supér Lyon* 2012.
- Wilkinson DA, Melade J, Dietrich M *et al.* Highly diverse Morbillivirus-Related Paramyxoviruses in wild fauna of the Southwestern Indian Ocean islands: evidence of exchange between introduced and endemic small mammals. *J Virol* 2014;**88**:8268–77.
- Wilkinson DA, Temmam S, Lebarbenchon C *et al.* Identification of novel paramyxoviruses in insectivorous bats of the Southwest Indian Ocean. *Virus Res* 2012;**170**:159–63.
- Wilson ME. Travel and the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 1995;**1**:39–46.
- Wolfe ND, Dunavan CP, Diamond J. Origins of major human infectious diseases. *Nature* 2007;**447**:279–83.
- Wong M, Katz AR, Li D *et al.* *Leptospira* infection prevalence in small mammal host populations on three Hawaiian islands. *Am J Trop Med Hyg* 2012;**87**:337–41.
- Wong S, Lau S, Woo P *et al.* Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev Med Virol* 2007;**17**:67–91.
- Wood CL, Lafferty KD. Biodiversity and disease: a synthesis of ecological perspectives on Lyme disease transmission. *Trends Ecol Evol* 2013;**28**:239–47.
- Wood JLN, Leach M, Waldman L *et al.* A framework for the study of zoonotic disease emergence and its drivers: spillover of bat pathogens as a case study. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2012;**367**:2881–92.
- Woolhouse MEJ, Gowtage-Sequeria S. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis* 2005;**11**:1842–7.
- Woolhouse MEJ, Taylor LH, Haydon DT. Population biology of multihost pathogens. *Science* 2001;**292**:1109–12.
- Yersin C, Bovet P, Mérien F *et al.* Human leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): a population-based study. *Am J Trop Med Hyg* 1998;**59**:933–40.
- Yoder AD, Nowak MD. Has vicariance or dispersal been the predominant biogeographic force in Madagascar? Only time will tell. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 2006;**37**:405–31.
- Yssouf A, Lagadec E, Bakari A *et al.* Colonization of Grande Comore Island by a lineage of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Parasit Vectors* 2011;**4**:38.
- Zhang C, Yang H, Li X *et al.* Molecular typing of pathogenic *Leptospira* serogroup Icterohaemorrhagiae strains circulating in China during the past 50 Years. *PLoS Negl*

Trop Dis 2015;**9**:e0003762.

Zuerner RL. Physical map of chromosomal and plasmid DNA comprising the genome of *Leptospira interrogans*. *Nucleic Acids Res* 1991;**19**:4857–60.

Valorisations scientifiques

1. Publications utilisées dans ce manuscrit

Article 1 : Gomard Y, Silai R, Hoarau G, Bon K, Gonneau F, Yssouf A, Michault A, Dellagi K and Tortosa P. (2014) Serologic evidence of Leptospirosis in humans, Union of the Comoros, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, 20, 720–722.

Article 2 : Lagadec E*, Gomard Y*, Guernier V, Dietrich M, Pascalis H, Temmam S, Ramasindrazana B, Goodman S M, Tortosa P and Dellagi K. (2012) Pathogenic *Leptospira* spp. in bats, Madagascar and Union of the Comoros. *Emerging Infectious Diseases*, 18, 1696–1698. * Co-premiers auteurs

Article 3 : Gomard Y, Dietrich M, Wieseke N, Ramasindrazana B, Lagadec E, Goodman S M, Dellagi K and Tortosa P. (2015) Malagasy bats shelter a considerable diversity of pathogenic *Leptospira* displaying a strong host-specificity. *En révision dans la revue FEMS Microbiology Ecology*.

Article 4 : Lagadec E, Gomard Y, Le Minter G, Cordonin C, Cardinale E, Ramasindrazana B, Dietrich M, Goodman S M, Tortosa P and Dellagi K. (2015) A wild small introduced mammal species (*Tenrec*: Tenrecidae) to Mayotte Island, western Indian Ocean, is an important reservoir of the human pathogenic *Leptospira mayottensis*. *Soumis à la revue mBio*.

2. Autres publications en rapport avec la thèse

Pagès F, Larrieu S, Simoes J, Lenabat P, Kurtkowiak B, Guernier V, Le Minter G, Lagadec E, Gomard Y, Michault A, Jaffar-Bandjee M-C, Dellagi K, Picardeau M, Tortosa P and Filleul L. (2015) Investigation of a leptospirosis outbreak in triathlon participants, Réunion Island, 2013. *Epidemiology and Infection*, 1–9.

Dietrich M, Gomard Y, Lagadec E, Ramasindrazana B, Le Minter G, Guernier V, Benlali A, Rocamora G, Markotter W, Goodman S M, Dellagi K, Tortosa P. Interplay of host specificity and biogeography in *Leptospira* diversity in wild animals occurring in the western Indian Ocean region. *En préparation pour soumission à PloS Neglected Tropical Disease*.

Guernier V, Lagadec E, Cordonin C, Le Minter G, **Gomard Y**, Pagès F, Jaffar-Bandjee M-C, Michault A, Tortosa P, Dellagi K. Human leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: are rodents the (only) ones to blame?
En préparation pour soumission à PLoS Neglected Tropical Disease.

3. Autres publications

Mélade J, Wieseke N, Ramazindrasana B, Flores O, Lagadec E, **Gomard Y**, Goodman S M, Dellagi K and Pascalis H. An eco-epidemiological study of Morbilli-related paramyxovirus infection in Madagascar bats reveals host-switching as the dominant macro-evolutionary mechanism.
Soumis à Scientific Reports - Nature.

Wilkinson D A, Duron O, Cordonin C, **Gomard Y**, Ramasindrazana B, Mavingui P, Goodman S M, Dellagi K and Tortosa P. The bacteriome of bat flies (Nycteribiidae) from the Malagasy region: a community shaped by host-ecology, bacterial transmission mode, and host-vector specificity.
Soumis à Applied and Environmental Microbiology.

Larsen P A, Hayes C E, Wilkins M A, **Gomard Y**, Sookhareea R, Yoder A D and Goodman S M. (2014) Population genetics of the Mauritian Flying Fox, *Pteropus niger*. *Acta Chiropterologica*, 16, 293–300.

Tortosa P, Dsouli N, **Gomard Y**, Ramasindrazana B, Dick C.W and Goodman S.M. (2013) Evolutionary history of Indian Ocean nycteribiid bat flies mirroring the ecology of their hosts. *PLoS ONE*, 8, e75215.

4. Congrès nationaux et internationaux

Scientific Days on Emerging Infectious Diseases in the South-Western Indian Ocean de Run-Emerge, 7-8 November 2013, University of La Réunion, France.

Serological evidence of *Leptospira* infection in human populations in the Union of The Comoros. **Yann Gomard**, Rahamatou Silai, Géraldine Hoarau, Ketty Bon, Florelle Gonneau, Amina Yssouf, Alain Michault, Koussay Dellagi and Pablo Tortosa.

The 12th African Small Mammal Symposium, 12 to 17 April, Mantasoa, Madagascar.

Pathogenic *Leptospira* (Spirochaetales, Leptospiraceae) show a strict host specificity for Malagasy bat species. **Yann Gomard**, Muriel Dietrich, Nicolas Wieseke, Beza Ramasindrazana, Erwan Lagadec, Steven M. Goodman, Koussay Dellagi and Pablo Tortosa.

Séminaire de restitution du POE 2.10 PCOT FED-FEDER Biodiversité, du 2 au 5 Juin 2015, Université de La Réunion, France.

Diversity of pathogenic *Leptospira* in bats from Madagascar. **Yann Gomard**, Muriel Dietrich, Nicolas Wieseke, Beza Ramasindrazana, Erwan Lagadec, Steven M. Goodman, Koussay Dellagi and Pablo Tortosa.

The 9th Scientific Meeting of International Leptospirosis Society, 7-10 October 2015, Semarang, Indonesia.

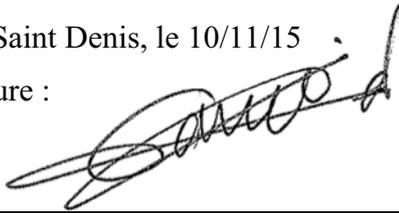
Pathogenic *Leptospira* sheltered by Malagasy bats display stringent host-specificity. **Yann Gomard**, Muriel Dietrich, Nicolas Wieseke, Beza Ramasindrazana, Erwan Lagadec, Steven M. Goodman, Koussay Dellagi and Pablo Tortosa.

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné **Yann GOMARD**, en ma qualité de doctorant de l'Université de La Réunion, déclare être conscient que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint Denis, le 10/11/15

Signature :



Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de ces droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.