

UNIVERSITE SAAD DAHLAB BLIDA 1

Institut des Sciences Vétérinaires

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Sciences vétérinaires

Option : Épidémiologie animale

**ETUDE SERO-EPIDEMIOLOGIQUE DE LA LEPTOSPIROSE CHEZ
LE RAT DANS LA REGION DE BLIDA**

Par

Lila LEKHAL

Devant le jury composé de :

R. KAIDI	Professeur, U. Blida 1	Président
N. MENOUERI	Maitre de conférences (A), U. Blida 1	Examineur
N. AZZAG	Maitre de conférences (A), ENSV. Alger	Examinatrice
F. GHALMI	Maitre de conférences (A), ENSV. Alger	Promotrice
A. AMARA KORBA	Chargée de recherches, IPA. Alger	Invitée

Blida, Janvier 2016

RESUME

La leptospirose est une zoonose à répartition mondiale causée par des spirochètes pathogènes du genre *Leptospira*. Tous les mammifères sont susceptibles d'être réservoirs de cette bactérie en particulier le rat, qui est un réservoir naturel des leptospires, et considéré comme l'une des sources la plus importante de la leptospirose.

L'objectif de ce travail était de déterminer la fréquence de l'infection à *Leptospira* chez le rat dans la région de Blida, qui a inscrit le plus grand nombre de cas de leptospirose humaine au niveau national durant la dernière décennie.

Pour ce faire, une enquête descriptive transversale a été menée chez le rat dans la région de Blida. Au total 100 rats ont été capturés. Ces rats ont été classés en fonction du sexe, l'âge, le mois et la région de capture. Des prélèvements sanguins ont été effectués sur animal vivant, après l'euthanasie, le foie et les reins ont été prélevés dans des boîtes stériles.

Une sérologie par le test de microagglutination (MAT) a été réalisée sur les sérums des rats avec 24 différents sérovars de *Leptospira*, et une culture d'organes sur milieu Ellinghausen, McCullough, Johnson et Harris (EMJH) pour l'isolement des leptospires a été aussi réalisée.

Le MAT a mis en évidence une séroprévalence à *Leptospira* de 43%, cette séroprévalence est estimée à un seuil fixé de 1 :20, alors que la prévalence obtenue par culture bactérienne était de 8%.

Les proportions des différents sérogroupes trouvés par le MAT sont : Icterohaemorrhagiae 10% (10/100), Canicola 5% (5/100), Australis 3% (3/100), les sérogroupes Grippotyphosa, Panama, Sarmin, et Louisiana représentent 2% (2/100) chacun, et finalement les sérogroupes Automnalis, Bataviae, Sejroe, Castellonis, Mini, et shermani représentent 1% (1/100) chacun aussi.

Le séro groupe Icterohaemorrhagiae s'est montré le plus prévalent, alors que le titre le plus élevé a été enregistré pour le séro groupe Canicola.

En conclusion, l'enquête réalisée confirme le rôle du rat comme réservoir de leptospires, constituant ainsi une source d'infection pour l'homme et pour les autres animaux, et fournit des informations importantes sur l'épidémiologie de la leptospirose chez cet animal dans la région de Blida, qui n'a pas été étudiée auparavant.

Mots-clés : *Leptospira*, rat, MAT, culture, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Blida.

ABSTRACT

Leptospirosis is a widely distributed zoonotic disease caused by the pathogenic spirochetes of the *Leptospira* genus. All mammals can be reservoir of these bacteria in particular rat, which is a natural reservoir of leptospires and considered to be the most important source of leptospirosis.

The main objective of this work was to determine the frequency for *Leptospira* infection in rat in the city of Blida. This city who has registered the highest number of human leptospirosis cases at national level in this last decade.

To realize this, we performed a descriptive transversal study sampling 100 rats. The rats were classified according to sex, age, month and region of capture. They were than bled and killed, kidney and lever simple were taken.

Serology was conducted by microagglutination test (MAT) using a panel of 24 different serovars of *Leptospira*, and Supernatants of macerated kidneys and liver were cultured on Ellinghausen, McCullough, Johnson and Harris (EMJH) medium.

A reactive MAT was determined by a titer $\geq 1: 20$. From a total of 100 rats, 43% were serologically positive, and 8% were positive by culture.

The proportions of serogroups found by MAT are Icterohaemorrhagiae 10% (10/100), Canicola 5% (5/100), Australis 3% (3/100), the sérogroupss Grippytyphosa, Panama, Sarmin and Louisiana represent 2% (2/100) for each one, finally the sérogroups Automnalis, Bataviae, Sejroe, Castellonis, Mini and shermani represent for each one also 1% (1/100).

The serogroup Icterohaemorrhagiae was prevalent in the rat population of this area; however the highest titer was recorded for serogroup Canicola.

This survey confirms the role of rat as reservoir of leptospires, so they constitute a source of infection for human and animals, and provides also useful information on the epidemiology of leptospirosis in this animal, which wasn't studied before.

Keywords: *Leptospira*, rat, MAT, culture, Icterohaemorrhagiae, Canicola.

ملخص

داء اللولبيات النحيفة هو مرض حيواني المصدر منتشر في جميع انحاء العالم، كل الثدييات تستطيع ان تكون حامل للبكتيريا المسببة لهذا المرض، خاصتا الجرذان التي تعتبر المصدر الرئيسي لهذا المرض. الهدف الرئيسي من هذا العمل هو معرفة شدة انتشار هذا المرض عند الجرذان في مدينة البليدة التي سجلت اعلى نسبة اصابة بهذا المرض عند الانسان في العشر سنوات الاخيرة على المستوى الوطني. للقيام بذلك أجرينا دراسة وصفية عرضية على 100 جرذ. الجرذان الممسوكة قسمت على حسب الجنس، العمر، الشهر و موقع المسك. بعد اخذ عينة من الدم، و بعد موت الحيوان تم اخذ الأعضاء المتمثلة في الكلي و الكبد في علب معقمة.

تم إجراء الزرع البكتيري للأعضاء في وسط النقوس مأكولو جونسون و هاريس، كما تم تحليل مصل الجرذان باستعمال 24 سلالة مختلفة من اللولبيات النحيفة. إن المصل الذي أعطى في اختبار التراص المجهرى اكبر او يساوي 1:20 اعتبر ايجابي . 43 بالمائة من الجرذان كانت ايجابية في اختبار التراص المجهرى، و 8 بالمئة ايجابية بالزرع البكتيري، أما بالنسبة الى النسب المئوية للفئات البكتيرية، فلقد تحصلنا على 10 بالمئة بالنسبة للفئة اكتيروهيوموراجيا، 5 بالمئة كانيكولا، 3 بالمئة اوستراليس، 2 بالمئة بالنسبة إلى الفئات التالية: غريبوتيفوزا، باناما، سارمان، و لويزيانا، و اخيرا نسبة واحد بالمائة سجلت بالنسبة إلى اوتومناليس، باتافيا، سيجرو، كاستلوني، ميني، و شيرماني.

ان هذه الدراسة تبين أن الفئة البكتيرية اكتيروهيوموراجيا هي الأعلى نسبة عند الجرذان في المنطقة، و تؤكد ان الجرذان هي حقا حاملة لبكتيريا اللولبيات النحيفة، كما توفر معلومات مهمة عن هذا الوباء عند الجرذان الذي لم يدرس من قبل في هذه المنطقة.

الكلمات المفتاحية : اللولبيات النحيفة، الجرذان، اختبار التراص المجهرى، الزرع البكتيري، اكتيروهيوموراجيا، كانيكولا

REMERCIEMENTS

À Mademoiselle GHALMI Farida,
qui m'a encadrée et guidée lors de la réalisation de ce travail, pour ses recommandations et ses précisions.

À Madame AMARA KORBA Anissa,
Pour sa bonne formation au laboratoire, son soutien morale et physique, sa compréhension et son extrême gentillesse.

À Monsieur KAIDI Rachid,
qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury. Hommages respectueux.

À Monsieur MENOUIRI Nabil,
pour nous avoir bien formés pendant les années d'étude, et d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

À Madame AZZAG Naouelle, qui a accepté d'examiner ce travail et faire partie de mon jury. Remerciements chaleureux.

À Monsieur HARRAT Zoubir de m'avoir accepté dans son service et à toute l'équipe du laboratoire du service parasitologie à l'Institut Pasteur d'Alger. Profonds remerciements.

À tous les éléments du service d'hygiène de la commune de Blida.

Dédicaces

Je m'incline devant Dieu Tout- Puissant qui m'a ouvert la porte du savoir et m'a aidé à la franchir.

Avant tout, je dédie ce travail à mes parents, à mes frères, à mes sœurs, en particulier Meriem et Salah-Eddine, à mes cousines, en particulier Amina et sa belle famille, et à toute ma famille.

Je dédie également ce travail à mon mari docteur OUCHFOUN Ahmed, pour son amour, son soutien, et surtout sa patience.

À tou(te)s mes ami(e)s

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et à toute personne qui aura le plaisir de consulter mon mémoire.

TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENT	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX	
INTRODUCTION	16
1. BACTERIOLOGIE DES LEPTOSPIRES	18
1.1. Historique	18
1.2. Classification	19
1.3. Biologie de leptospires	23
2. POUVOIR PATHOGENE DES LEPTOSPIRES	27
2.1. Pathogénie et lésions	27
2.2. Facteurs de pathogénicité	28
2.3. Réponse immunitaire de l'hôte	32
2.4. Signes cliniques chez les espèces sensibles	33
3. DIAGNOSTIC	36
3.1. Les méthodes directes	36
3.1.1. Examen au microscope à fond noir	36
3.1.2. Mise en culture	36
3.1.3. Amplification génétique	37
3.2. Les méthodes indirectes	37
3.2.1. La sérologie	37
3.2.1.1. La sérologie par la méthode de microagglutination (MAT)	38
3.2.1.2. La sérologie par la méthode ELISA	39
3.2.1.3. Autres méthodes sérologiques	40
4. LE RAT	41
4.1. Classification	41
4.2. Données biologiques générales	41
4.3. Structure sociale (Hiérarchie)	42
4.4. Répartition des activités dans l'espace et dans le temps	43
4.5. Habitat	43

4.6. Comportement alimentaire	43
4.7. Comportement reproducteur	45
4.8. Perception de l'environnement	46
4.9. Evolution des populations	47
4.10. Migration	49
4.11. Les zoonoses des rats	49
4.12. Le rat et la leptospirose	49
5. EPIDEMIOLOGIE DE LA LEPTOSPIROSE	51
5.1. Epidémiologie descriptive	51
5.1.1. Répartition mondiale	51
5.1.2. La leptospirose humaine en Algérie	51
5.1.3. La leptospirose humaine dans la wilaya de Blida	53
5.2. Épidémiologie analytique	54
5.2.1. Notion d'hôte réservoir et d'hôte sensible	54
5.2.2. Réservoirs	55
5.2.3. Hôtes sensibles	55
5.2.4. Mode de contamination	56
5.2.5. Matières virulentes	57
6. MATERIELS ET METHODES	59
6.1. Problématique et objectifs	59
6.2. Localisation géographique de la zone d'étude	60
6.3. Population de rat étudiée	61
6.4. Définition du cas	61
6.5. Echantillonnage	61
6.6. Protocole de piégeage	61
6.7. Période de piégeage	63
6.8. Prélèvements et conservation	63
6.9 Culture bactérienne.	66
6.10 La sérologie par le MAT	67
6.11 Analyses statistiques	71
7. RESULTATS ET DISCUSSION	72
7.1. Bilan de capture	72
7.2. Structure de la population de rat	72
7.3. Etude de la séroprévalence	74

7.4. Résultats sérologiques par sérovar	82
7.5. Résultats sérologiques par sérogroupe	86
7.6. Etude des réactions de Co-agglutination qui ne permettent pas d'identifier un sérovar infectant	89
7.7. Etude de la séroprévalence en fonction des titres en anticorps	90
7.8. Résultats de la culture bactérienne	93
7.9. Comparaison entre la méthode de la culture bactérienne et la sérologie (MAT)	97
7.10. Discussion	99
CONCLUSION	109
RECOMMANDATIONS & PERSPECTIVES	110
APPENDICE	
A. MATERIEL ET REACTIFS DE LABOTATOIRE	112
B. LES ETAPES DU PRELEVEMENT	114
C. REPARTITION DES CAS DE LEPTOSPIROSE HUMAINE EN ALGERIE ENTRE 2004 ET 2014	117
D. RESULTATS DE LA CULTURE	118
E. RESULTATS DE LA SEROLOGIE	119
F. ESTIMATION DE L'AGE EN FONCTION DE LA DENTITION	121
G. LISTE DES ABREVIATIONS	122
H. RECAPITULATIF DE QUELQUES ENQUETES DE SEROPREVALENC CONDUITES CHEZ LES RATS	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	126

LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Diagramme schématique d'un spirochète illustrant la gaine de la membrane externe, le cylindre cellulaire protoplasmique et un flagelle périplasmique	24
Figure 1.2	Modèle architectural des membranes des leptospires	25
Figure 1.3	Mouvement des leptospires (A), et microscopie électronique de <i>Leptospira biflexa</i> (B)	25
Figure 2.1	Schéma pathogénique général de la leptospirose	32
Figure 4.1	Classification des Rongeurs	41
Figure 5.1	Nombre de cas de leptospirose humaine par wilaya entre 2004 et 2014	52
Figure 5.2	Nombre de cas de leptospirose humaine dans la wilaya de Blida entre 2005-2014	53
Figure 5.3	Nombre de cas de leptospirose humaine par commune dans la wilaya de Blida dans la période 2005-2014	53
Figure 5.4	Place de la leptospirose par rapport à d'autres zoonoses dans la wilaya de Blida	54
Figure 5.5	Mode de contamination de la leptospirose	57
Figure 6.1	Zone d'étude	60
Figure 6.2	Les différents sites de piégeage	60
Figure 6.3	Cages pièges à ressort	62
Figure 6.4	Piege sur site	63
Figure 6.5	Rats capturés	63
Figure 6.6	Femelle perforée	64
Figure 6.7	Femelle vierge	64
Figure 6.8	Etat de développement de la vésicule séminale	64
Figure 6.9	Sac scrotal et pénis chez un male adulte	65
Figure 6.10	Troisième molaire bien apparente	65
Figure 6.11	Troisième molaire partiellement apparente	65
Figure 6.12	Prélèvement du foie	66

Figure 6.13	Prélèvement rénal	66
Figure 6.14	Le MAT quantitatif	70
Figure 7.1	Répartition des deux sexes dans la population	72
Figure 7.2	Répartition des classes d'âge dans la population des rats	73
Figure 7.3	Répartition de la population en fonction du mois	73
Figure 7.4	Résultats sérologique en fonction du sexe	75
Figure 7.5	Résultats sérologique en fonction de l'âge	75
Figure 7.6	Résultats sérologique en fonction du lieu de capture	76
Figure 7.7	Séroprévalence en fonction du lieu de capture	77
Figure 7.8	Résultats sérologique en fonction du mois	78
Figure 7.9	Proportions des séropositifs en fonction du mois	79
Figure 7.10	Évolution de la séroprévalence en fonction de la pluviométrie par mois	80
Figure 7.11	Évolution de la séroprévalence en fonction de la pluviométrie par saison	81
Figure 7.12	Nombre de réponses positives. (Toutes les réactions positives n=94)	83
Figure 7.13	Proportions des sérovars infectants (que les réactions significatives n=32)	84
Figure 7.14	Nombre de sérums positifs par sérogroupe (seule les réactions significatives sont comptée n=32)	86
Figure 7.15	Proportions des différents sérogroupe infectants (n=32)	88
Figure 7.16	Corrélation entre les sérogroupe chez les rats et chez l'homme	89
Figure 7.17	Variation de la séroprévalance en fonction du titre	90
Figure 7.18	Régression linéaire de la séroprévalence en fonction du logarithme des titres sérologiques	91
Figure 7.19	Répartition des proportions de culture positive en fonction des organes	94
Figure 7.20	Répartition des positifs en fonction du sexe	94
Figure 7.21	Répartition des positifs en fonction de l'âge	95
Figure 7.22	Répartition des positifs dans les différents sites	96
Figure 7.23	proportions des positifs en fonction des sites	96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Sérogroupe et quelques serovars de <i>L. interrogans</i> sensu lato	21
Tableau 1.2	Classification génomique de <i>leptospira</i>	22
Tableau 4.1	Données anatomo-physiologiques du rat	42
Tableau 5.1	Résultats de l'identification des sérogroupe de l'année 2002 à 2008	52
Tableau 5.2	Hôtes réservoirs typiques des serovars communs de <i>Leptospira</i>	55
Tableau 5.3	Durée de survie des leptospires dans différents milieux de l'environnement	58
Tableau 6.1	Les serovars utilisés pour le MAT	68
Tableau 6.2	Le MAT qualitatif	70
Tableau 7.1	Répartition de la population en fonction des différents sites de capture	74
Tableau 7.2	Séroprévalence globale	74
Tableau 7.3	Répartition des proportions des séropositifs en fonction du sexe	75
Tableau 7.4	Proportion des séropositifs en fonction de l'âge	76
Tableau 7.5	Proportion des séropositifs en fonction du lieu de capture	77
Tableau 7.6	Proportions des différentes régions après regroupement	77
Tableau 7.7	Proportions des séropositifs en fonction du mois	79
Tableau 7.8	Quantité de pluie en millimètres enregistrée par mois	79
Tableau 7.9	Séropositifs par saison et quantité de pluie correspondante	81
Tableau 7.10	Résultats sérologiques en fonction des serovars testés	85
Tableau 7.11	Nombre de sérums positifs par sérogroupe (n=32)	87
Tableau 7.12	Titres minimums et maximums obtenus par MAT pour chaque sérovar	91
Tableau 7.13	Nombre de réactions positives par sérovar en fonction des titres (toutes les réactions n=94)	92
Tableau 7.14	Nombre de réactions positives par sérovar en fonction des titres (seules les réactions permettant d'identifier un sérovar infectant n=32)	92

Tableau 7.15	Les titres enregistrés pour chaque sérovar seules les réactions significatives sont comptées	93
Tableau 7.16	Prévalence de la culture bactérienne	93
Tableau 7.17	Proportions des femelles et des mâles positifs	94
Tableau 7.18	Proportions des deux classes d'âge	95
Tableau 7.19	les proportions des positifs dans les différents sites	96
Tableau 7.20	Résultats du test exact de Fisher la région B-Ach est la référence.	97
Tableau 7.21	Tableau de contingence	97

INTRODUCTION

La leptospirose est une importante zoonose à distribution mondiale, causée par des spirochètes pathogènes du genre *Leptospira*. Le rôle des rats comme réservoirs a été investigué dans quelques pays, et différentes espèces de rats ont été reportées comme réservoirs de différents sérovars pathogènes de leptospires [1]. Les hôtes de maintenance développent généralement une infection chronique des tubes rénaux à jeune âge, ils restent asymptomatiques alors qu'ils excrètent les leptospires sur une longue période [2].

L'homme ainsi que les animaux peuvent être exposés aux leptospires durant leur activité journalière, ou au travail à travers l'environnement contaminé par les urines des rats contenant des leptospires, dans les zones urbaines et rurales [3]. Les rats peuvent être aussi exposés aux urines contenant différents sérovars des autres rats cohabitant. La majorité de ces animaux reste porteurs après l'infection initiale et excrètent la bactérie dans l'eau de source et le sol [2]. La longue survie des leptospires pathogènes hors réservoir exige un environnement humide tempéré et un pH proche de la neutralité [2] [3].

Une variété de tests sérologiques a été développée pour mettre en évidence les anticorps spécifiques aux différents leptospires [1] [2]. Le MAT est sensible et spécifique, il est considéré comme le test sérologique standard pour le diagnostic de la leptospirose, il est largement utilisé pour la détection des anticorps anti-leptospire à partir du sérum [4]. Cependant La détection de leptospires par la culture est considérée comme le diagnostic définitif de la leptospirose [5].

Selon les données du Ministère de la Santé [6], la wilaya de Blida enregistre le plus grand nombre de cas de leptospirose humaine comparée aux autres wilayas, d'où notre intérêt porté pour ce site.

Nous avons aussi été motivés pour travailler sur le rat car il s'agit bien de l'animal qui a été longtemps considéré dans la littérature comme le réservoir principal des leptospires. Aucune étude n'a été entreprise auparavant chez cet

hôte dans la région. Par conséquent, il nous a semblé important d'avoir une meilleure connaissance du rôle du rat comme réservoir zoonotique de leptospires dans la région et surtout connaître les sérovars présents ainsi que des facteurs de risque de transmission de l'infection dans le but d'évaluer les risques pour l'homme et d'appliquer les mesures de contrôle.

CHAPITRE 1

BACTERIOLOGIE DES LEPTOSPIRES

1.1. Historique

On prête à Larrey la première description correcte de la "fièvre jaune" en 1812, parmi les troupes napoléoniennes à Héliopolis lors du siège du Caire en 1800 [7]. La maladie décrite par Larrey était semblable à celle déjà connue sous le nom de "typhus icterodes" par les nosologistes français et anglais, ou sous le nom de "vomito prieto" par les espagnols, et décrite comme "fièvre jaune" par Humboldt au Mexique en 1811 [7].

En 1886 à Heidelberg, Adolf Weil décrit pour la première fois un ensemble de signes et symptômes, aujourd'hui éponymiques du syndrome de Weil, forme clinique la plus connue de la leptospirose (son premier patient souffrait de saignement nasal "nasenbluten" au second jour de la maladie) [8]. Néanmoins, il semble qu'un syndrome identique ait été décrit chez un égoutier plusieurs années auparavant [9]. Inada et Ido identifièrent l'agent causal 30 ans plus tard [10].

Cependant, depuis bien longtemps en Chine et au Japon, existait une maladie qualifiée de « fièvre d'automne » présentant des symptômes analogues à ceux de la leptospirose [11].

L'agent étiologique de la leptospirose a donc été découvert "officiellement" en 1915 par deux équipes indépendantes au Japon et en Allemagne. Au Japon, Inada et Ido [12], et en Allemagne, deux équipes de médecins allemands, Uhlenhuth et Fromme, et Hubener et Reiter [7].

Peu après la découverte de l'agent de la leptospirose comme cause de la maladie de Weil au Japon, la même équipe a décrit le rôle du rat comme porteur de la bactérie [13]. Cette observation importante a permis la compréhension des principes épidémiologiques de transmission de la bactérie par un animal porteur et a ouvert la porte à la possibilité de mettre en place des mesures de contrôle de la maladie ainsi qu'à l'expérimentation sur les réservoirs animaux potentiels [7].

1.2. Classification

1.2.1. Classification historique

Les leptospires appartiennent à l'ordre des Spirochètales. Cet ordre a longtemps été assimilé aux protozoaires. Il est désormais considéré comme un ordre à part depuis le milieu du 20^{ème} siècle [14]. Cet ordre de bactéries est divisé en deux familles : les *Spirochaetaceae* et les *Leptospiraceae* :

Dans la famille des *Spirochaetaceae*, on trouve les genres *Treponema*, *Serpulina* et *Borrelia*.

Dans la famille des *Leptospiraceae*, on trouve les genres *Leptonema* et *Leptospira* [15].

Avant 1989, on distinguait classiquement dans ce genre, deux espèces regroupant divers souches :

- *Leptospira biflexa* sensu lato, regroupant des souches saprophytes, non pathogènes.
- *Leptospira interrogans* sensu lato, regroupant les souches pathogènes pour l'Homme et/ou l'animal, et donc responsables de la leptospirose [16].

Les souches pathogènes ont un temps de génération d'environ vingt heures, tandis que les souches saprophytes ont une croissance plus rapide avec un temps de génération d'environ cinq heures [7]. Ces deux groupes ont aussi des besoins nutritionnels différents et se distinguent sur d'autres caractères phénotypiques. Par exemple, la croissance des souches pathogènes est inhibée par la 8-azaguanine (un analogue de la purine) alors que les souches saprophytes croissent normalement en présence de ce composé [17].

On différencie l'espèce *Leptospira biflexa* de *Leptospira interrogans* également par sa capacité à croître à 13°C, sa résistance dans les milieux contenant de la 8-azaguanine à une concentration de 225 µg/ml et son incapacité à prendre une forme sphérique dans les milieux à 1 mol/l de Na Cl [11].

1.2.2. Classification sérologique

Il s'agit de la classification la plus ancienne, datant des années 1980, mais toujours la plus utilisée actuellement. Elle correspond à la notion de sérovars et de sérogroupes. [18].

Cette classification est le reflet de l'expression des épitopes de surface au sein des antigènes du lipopolysaccharide (LPS). Ainsi, *L. interrogans s.l.* et *L. biflexa s.l.* sont divisées en nombreux sérovars définis d'après le test d'absorption croisée avec des antigènes homologues. D'après la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé [19] :

Deux souches sont considérées comme appartenant à des types sérologiques distincts si, après absorption croisée par une quantité appropriée d'antigène hétérologue, l'antisérum de chaque souche conserve régulièrement, lorsqu'on l'éprouve de nouveau par rapport à la souche homologue, un titre au moins égal à 10% de celui qu'il accusait primitivement avec cette souche.

Plus de 60 sérovars sont décrits pour les leptospires saprophytes, et plus de 260 pour les pathogènes [5]. Les sérovars proches antigéniquement sont regroupés en sérogroupes. La classification sérologique présente néanmoins de nombreux inconvénients, l'identification est coûteuse, lourde, lente (parfois plusieurs mois pour déterminer le sérovar) et complexe, ce qui la réserve à quelques laboratoires de référence [11]. De plus, les sérogroupes et même les sérovars regroupent le plus souvent des souches appartenant à des espèces génétiquement distinctes. Néanmoins, même si les sérogroupes n'ont qu'une valeur taxonomique limitée, ils sont extrêmement utiles pour les études épidémiologiques [11].

Cette classification sérologique reste cependant très utilisée car elle est étroitement liée à la méthode de référence pour le diagnostic sérologique de leptospirose (test de microagglutination ou MAT) [20].

Tableau 1.1 : Sérogroupes et quelques serovars de *L. interrogans* sensu lato [11].

Sérogroupe(s)	Serovar(s)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, lai, Zimbabwe
Hebdomadis	Hebdomadis, Jules, Kremastos
Autumnalis	Autumnalis, Fortbragg, Bim, Weerasinghe
Pyrogenes	Pyrogenes
Bataviae	Bataviae
Grippotyphosa	Grippotyphosa, Canalzonae, Ratnapura
Canicola	Canicola
Australis	Australis, Bratislava, Lora
Pomona	Pomona
Javanica	Javanica
Sejroe	Sejroe, Saxkoebing, Hardjo
Panama	Panama, Mangus
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Sarmin	Sarmin
Mini	Mini, Georgia
Tarassovi	Tarassovi
Ballum	Ballum, Aroborea
Celledoni	Celledoni
Louisiana	Louisiana, Lanka
Ranarum	Ranarum
Manhao	Manhao
Shermani	Shermani
Hurstbridge	Hurstbridge

1.2.3. Classification génomique

La proximité des souches révélée par le MAT qui permet de définir des sérogroupe(s) ne reflète pas toujours une proximité génomique: des serovars appartenant au même sérogroupe sont dispersés au sein de plusieurs espèces, et une même espèce peut comporter de nombreux sérogroupe(s) [20].

Depuis 1987, des études d'hybridation ADN - ADN ont modifié radicalement la taxonomie des leptospires, les classant cette fois en génospecies selon des critères génétiques. Les génospecies ou espèces génomiques sont des espèces déterminées par des méthodes génétiques [21] [22].

Les leptospires sont classés en trois sous groupes : les espèces pathogènes au nombre de (9), les espèces saprophytes (6) et les espèces

intermédiaires (6). Toutes les espèces du sous groupe « pathogène » sont pathogènes, celles du sous groupe « saprophyte » sont toutes non pathogènes. Les espèces intermédiaires sont distinctes des souches pathogènes et saprophytes d'après le séquençage de leur ARN ribosomal 16S, et pour lesquelles aucune activité pathogène n'a été démontrée expérimentalement [23] [24] [25] [26].

Tableau 1.2 : Classification génomique de *leptospira*.

Classe	Espèces génomiques
Pathogènes	<i>L. interrogans sensus stricto</i>
	<i>L. noguchii</i>
	<i>L. weillii</i>
	<i>L. santarosai</i>
	<i>L. borgpetersenii</i>
	<i>L. alexanderi</i>
	<i>L. kirschneri</i>
	<i>L. alstonii</i>
	<i>L. kmetyi</i>
Intermédiaires	<i>L. fainei</i>
	<i>L. inadai</i>
	<i>L. broomii</i>
	<i>L. licerasiae</i>
	<i>L. wolffii</i>
Non pathogènes	<i>L. meyeri</i>
	<i>L. wolbachii</i>
	<i>L. biflexa sensus stricto</i>
	<i>L. vanthielii</i>
	<i>L. terpstrae</i>
	<i>L. yanagawae</i>
	<i>L. idonii</i>

La cohabitation des deux classifications ne manque pas d'entraîner des confusions. Ainsi les espèces *L. biflexa* et *L. interrogans* à la base du modèle phénotypique sont aussi des génomespécies dans le modèle génotypique. Il a donc été proposé de les différencier en employant la terminaison sensu lato (s.l.) pour citer ces souches dans le modèle phénotypique et sensu stricto (s.s.) pour les citer dans le modèle génotypique [26].

1.3. Biologie des leptospires

1.3.1. Caractéristiques morphologiques et structurales

Le mot leptospire vient du grec « *leptos* » qui veut dire fin, grêle, et « *spira* » signifie spire, tour. Les leptospires sont en effet des bactéries spiralées, hélicoïdales, extrêmement fines et flexibles [27].

Ce sont les plus petits spirochètes connus. Leurs extrémités sont pointues et, une ou les deux, sont repliées en forme de crochets distinctifs. Leur taille varie selon les souches entre 6 et 20 μm de long, parfois plus, pour environ 0.1 μm de diamètre [11] [28].

La bactérie prend ainsi la forme d'une spirale, dextre avec une trentaine de spires régulières et très serrées malgré quelques zones plus lâches. La morphologie des leptospires dépend du sérovars, par exemple, *Icterohaemorrhagiae* est plus grand qu'*Harjo*. Elle dépend également de l'âge de la culture ; Les spires bien resserrées au début, se relâchent ensuite à quelques endroits avant de donner des formes allongées, sphérulées ou amassées les unes aux autres [11] [5].

Enfin les leptospires sont indistinguables entre elles du point de vue morphologique [28].

La bactérie comprend différentes structures, un cylindre protoplasmique, une enveloppe externe et un organe locomoteur sous forme de deux flagelles internes (aussi nommées filaments axiaux). Dans l'espace périplasmique, entre la membrane peptidoglycique du cylindre protoplasmique et l'enveloppe externe, sont insérés les deux flagelles à chacune des extrémités sub-terminales du cylindre. Flagelles et cylindre sont entrelacés sur environ un tiers de la longueur de la bactérie, sans chevauchement central [26].

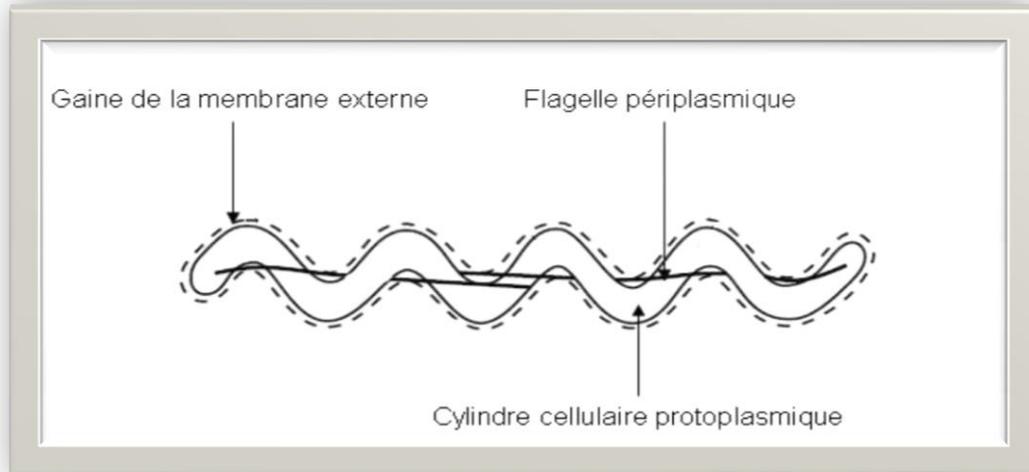


Figure 1.1 : Diagramme schématisique d'un spirochète illustrant la gaine de la membrane externe, le cylindre cellulaire protoplasmique et un flagelle périplasmique [29].

Au microscope électronique, chaque bactérie se compose d'une enveloppe externe trilamellaire, souple, élastique et peu résistante, constituée de lipopeptides, de lipopolysaccharides (LPS) et de mucopeptides antigéniques. Celle-ci engaine totalement le cylindre protoplasmique et les flagelles. L'enveloppe externe possède une grande quantité de lipoprotéines comme LipL32, LipL36, LipL41 et LipL48 fixées par l'extrémité N-terminal de leurs acides gras [30]. LipL32 aussi appelé Hap1 ou Lip32 est la lipoprotéine majeure de l'enveloppe externe [31].

Cette enveloppe recouvre une couche plus rigide de peptidoglycane elle-même accolée par sa face interne à la membrane cytoplasmique. Bien que sa composition soit proche de celle des bactéries Gram -, le peptidoglycane des leptospires gêne à la fixation de la coloration utilisée classiquement chez les bactéries. Ainsi, l'observation classique des leptospires se fait au microscope optique à fond noir. Le peptidoglycane interviendrait dans la stimulation de la phagocytose et la production de cytokines par les monocytes [32].

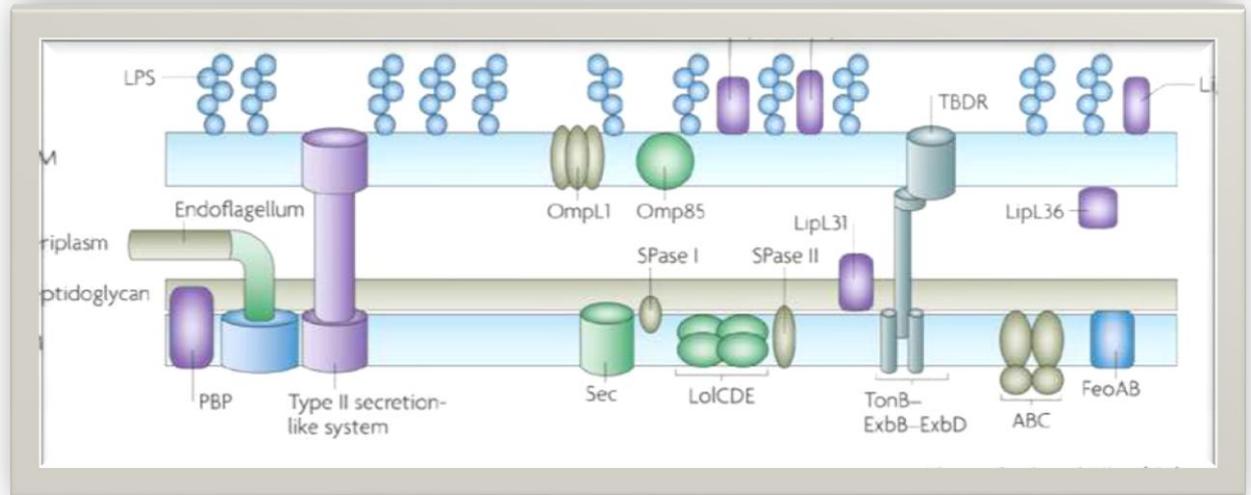


Figure 1.2 : Modèle architectural des membranes des leptospires [33].

Les leptospires possèdent deux flagelles internes situés sous l'enveloppe externe ce qui leur confère une grande mobilité [34]. Les leptospires peuvent réaliser trois types de mouvements : une rotation autour de leur axe central, une progression linéaire, des mouvements circulaires [14].

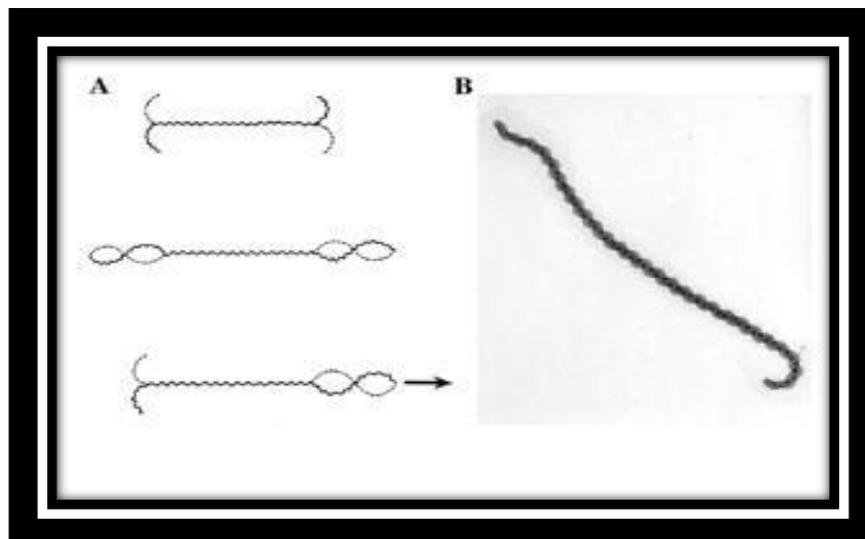


Figure 1.3 : Mouvement des leptospires (A) [29] et microscopie électronique de *Leptospira biflexa* (B) [35].

1.3.2. Caractéristiques bactériologiques : métabolisme et culture

1.3.2.1. Métabolisme des leptospires

Les leptospires sont des bactéries aérobies strictes, avec une température optimale de croissance de 28 à 30°C. Ils produisent catalase et oxydase, et se

développent dans des milieux enrichis avec des vitamines (les vitamines B2 et B12 sont des facteurs de croissance), des acides gras à longue chaîne, et des sels d'ammonium. Les acides gras à longue chaîne (et non les glucides) sont utilisés comme source unique de carbone et sont métabolisés par β oxydation [11].

Le métabolisme original des leptospires oblige le bactériologiste à utiliser des milieux de culture complexes comme le milieu EMJH (Ellinghausen-McCullough modifié par Johnson et Harris) qui est le plus utilisé pour l'isolement (incubation à 30 °C) et l'entretien des souches de leptospires [36].

1.3.2.2. Conditions de survie et de culture

Les leptospires sont très fragiles *in vitro* et sont également sensibles dans les milieux biologiques [15].

Les leptospires sont détruites par la chaleur, la dessiccation, le froid (léthal à -20°C). Elles sont également sensibles à un pH acide. Ainsi leur survie ne peut s'établir qu'à un pH neutre voire alcalin (de 6.8 à 7.4). De plus les leptospires sont très sensibles aux ultraviolets. Dans des circonstances particulières, telles qu'un milieu aqueux légèrement alcalin, il est possible d'observer de fortes résistances des leptospires pendant plusieurs mois voire plusieurs années [26].

Des conditions doivent être rassemblées pour permettre la croissance des leptospires : un pH compris entre 6,8 et 7,4 ; une protection vis-à-vis de la lumière ; une source d'azote fournie par l'ion ammonium et une source d'énergie et de carbone fournie par des acides gras à longue chaîne ; une température comprise entre 28 et 30°C. [26]. La présence d'hôtes réservoirs est indispensable à la réplication de la bactérie en milieu naturel [11].

CHAPITRE 2

POUVOIR PATHOGENE DES LEPTOSPIRES

2.1. Pathogénie et lésions

La contamination s'effectue à l'issue du passage de leptospires vivants à travers des muqueuses saines (oculaires, oro-pharyngées, nasales, génitales), mais aussi de la peau, à la faveur de micro lésions (excoriation, ou peau macérée dans l'eau) [5].

Une fois dans l'organisme, les leptospires vont migrer vers le compartiment sanguin avant d'entrer dans la phase de multiplication [26]

Après la phase de leptospirémie, les bactéries vont ensuite migrer vers les organes cibles et notamment dans les organes du système réticulo-endothélial [15].

La réplication initiale tissulaire concerne cependant essentiellement les reins et le foie. En outre, l'extension et la gravité des symptômes dépendent de la virulence de la souche et de la sensibilité de l'hôte [3]. En effet, un hôte possédant un taux d'anticorps modéré ou élevé présentera une phase de leptospirémie plus courte accompagnée d'une clinique modérée à absente [2].

Cela engendra l'apparition d'une néphrite interstitielle [37] accompagnée d'une intense infiltration cellulaire (polynucléaire) et d'une nécrose des tubes rénaux, ainsi qu'une hépatite. Les parois des tubes rénaux sont épaisses, les cellules de la bordure en brosse des tubes sont absentes ou réduites et les glomérules sont atteints, ce qui expliquerait la protéinurie observée cliniquement en cas de leptospirose [11]. Mais les porteurs chroniques n'ont généralement pas de pathologie rénale [14].

Les reins et le foie peuvent être ictériques par défaut d'élimination de la bilirubine (cholestase) et ou hémorragiques (action des hémolysines des leptospires).

Au niveau cardiaque, une myocardite interstitielle s'installe, avec infiltration lymphocytaire, inflammation des coronaires et effusions dans le péricarde [11].

Les muscles squelettiques sont également atteints d'une myosite, en particulier ceux des membres postérieurs, avec infiltrat cellulaire et parfois nécrose [11]. Enfin le cerveau peut être atteint d'un infiltrat inflammatoire périvasculaire.

Les cas d'uvéites récurrentes, fréquemment observés chez le cheval et chez certaines personnes, seraient dus à une réaction auto-immune permettant la persistance des leptospires dans l'humeur aqueuse [14].

Par la suite, la mise en place de la réponse immunitaire de l'hôte lors de l'apparition des anticorps protecteurs s'accompagne d'une disparition des leptospires dans la plupart des organes exceptés les reins dans lesquels l'agent infectieux peut persister des semaines voire des mois [38]. La leptospirémie est de ce fait de courte durée, contrairement à la leptospirurie qui peut, elle, persister pendant une longue période. Cette leptospirurie peut même exister chez des animaux n'ayant présenté aucun signe clinique [39].

2.2. Facteurs de pathogénicité

La virulence d'une bactérie est sa capacité à persister dans un organisme hôte et à contourner les systèmes de défense immunitaires pour ne pas être éliminée [40]. L'extrême mobilité des leptospires est un des éléments de leur pouvoir pathogène. Cette mobilité, qui correspond à la capacité à se développer dans des milieux de densité élevée, est aussi caractérisée par la possibilité de traverser les membranes biologiques. C'est ainsi que les leptospires sont doués de propriétés invasives. Cette mobilité est dite « en tire-bouchon » : elle leur permet de se mouvoir au niveau du point d'entrée sans créer de dégâts et de réaction inflammatoire. Leur détection à l'entrée est donc très difficile. Elle leur permet d'échapper au système immunitaire non spécifique de l'hôte notamment les monocytes [26].

Les leptospires ne sont pas des bactéries intracellulaires mais elles ont la capacité d'entrer dans les cellules hôtes [41] puis d'en ressortir sans altérer la

membrane cellulaire [42] [43]. Ce sont donc des « résidentes transitoires » des cellules hôtes, pouvant échapper à la réponse immunitaire. Plusieurs études menées sur des cellules hépatiques ou rénales d'animaux infectés se sont attachées à rechercher des facteurs d'adhésion des leptospires à la matrice extracellulaire [44]. Beaucoup étudiés mais peu connus, les facteurs de virulence des leptospires résident essentiellement dans les protéines de membranes externe (OMPs) et dans le lipopolysaccharide (LPS), bien qu'il soit moins toxique que celui des autres bactéries Gram négatif [40].

En cas d'infection par des bactéries gram négatif, le LPS de leur paroi est reconnu par le récepteur TLR4 (toll-like receptor) des cellules immunitaires humaines. Mais dans le cas de *leptospira interrogans*, le LPS échappe à ce système de reconnaissance habituel et emprunte plutôt la voie du TLR2. Cela serait dû à la particularité du lipide A qui le compose et qui est certes reconnu par les cellules de l'immunité innée des espèces de rongeurs réservoirs de leptospires, mais pas par l'homme [45]. Les rongeurs, contrairement à l'homme, ne développent donc aucune forme clinique de leptospirose grâce à leurs récepteurs TLR2 et TLR4 qui permettent de neutraliser les bactéries pénétrant dans l'organisme. Des mutants pour ces deux récepteurs développent inmanquablement une leptospirose aigüe à *L. interrogans* avec atteinte hépatique et rénale sévère et inflammatoire pulmonaire, comme ce qui est observé chez l'homme [46]. Ainsi, c'est davantage par la réaction immunitaire incomplète qu'il induit chez l'hôte que par son rôle dans l'invasion et la dissémination de l'organisme que le LPS peut être considéré comme un facteur de virulence des leptospires. Cependant sa mutation expérimentale entraîne une perte de virulence et empêcherait les leptospires de survivre plusieurs semaines dans l'environnement [47].

En revanche, les adhésines, qui font partie des OMPs, ont un rôle important dans les premières phases d'invasion de l'organisme. Un certain type d'adhésine, les endostatines, ont été étudiées pour leurs interactions avec la fibronectine et la laminine de la matrice extracellulaire d'une part, et pour leur liaison avec le facteur H du complément d'autre part, car c'est un des mécanismes de virulence des souches pathogènes [48]. La capacité des adhésines à se lier au facteur H permet d'endiguer la voie alternative d'activation du complément et protège donc les

leptospires de l'opsonisation par le complément. Ces protéines endostatine-like diffèrent selon le sérovar impliqué et présentent un mimétisme structural avec les endostatines de mammifères facilitant l'invasion de l'hôte par les bactéries. Le fait qu'elles soient absentes du génome des souches saprophytes de leptospires confirme l'hypothèse d'un avantage sélectif à posséder de telles protéines [40].

D'autres protéines parmi les OMPs permettent l'adhésion des leptospires aux parois des endothéliums et des cellules de l'hôte : les protéines de surface immunoglobuline-like (ligA, ligB, ligC), qui se lient aux composants de la matrice extracellulaire, principalement la fibronectine, la laminine, le collagène et l'élastine. La protéine LigB en particulier a la capacité de se lier au fibrinogène et de réguler la thrombose et la fibrinolyse, ce qui pourrait expliquer les symptômes observés en cas de leptospirose aiguë (hémoptysie, thrombocytopenie) [49]. Cependant ces protéines immunoglobuline-like, pourtant présentes uniquement chez les espèces pathogènes, ne sont pas indispensables à la virulence [50].

Parallèlement, la lipoprotéine de surface Loa22 (la seconde lipoprotéine la plus abondante après LipL32) a fait l'objet d'étude par mutation du gène codant chez *Leptospira interrogans* qui ont montré qu'en son absence la virulence était atténuée : absence de signes cliniques et survie de tous les cochons d'Inde testés [51]. Il s'agit d'une protéine ayant un domaine C-terminal de type OmpA, une protéine de surface d'*Escherichia coli* retrouvées chez de nombreuses bactéries Gram négatif. Agissant comme une adhésine, elle facilite les premières phases de pénétration dans l'organisme, notamment dans les vaisseaux sanguins. L'expression induite de Loa22 chez les mutants loa22 a montré des lésions nécrotiques rénales, hépatiques, pulmonaires, accompagnées de splénomégalie. Cela reproduit donc les lésions observables en cas d'infection par des souches « sauvages » de *L.interrogans* et confirme le rôle majeur de Loa22, protéine très conservée au sein des leptospires, dans la virulence des souches pathogènes ; à ce jour c'est la seule protéine réellement identifiée comme facteur de virulence chez les espèces pathogènes de leptospires. Cependant il n'a pas été démontré qu'en son absence les leptospires n'étaient pas capables d'infecter l'hôte et de pénétrer dans les tissus cibles. La protéine Loa22 étant conservée chez *L.biflexa*, il semblerait que de nombreux mécanismes de résistance (dans l'environnement ou chez l'hôte) soient communs aux espèces saprophytes et aux espèces

pathogènes de leptospires [47]. La lipoprotéine LipL 32, est quant à elle la protéine majeure de membrane externe. Elle représente 75% du complexe protéiques des OMPs. C'est la plus abondante des protéines exposées en surface [47]. La lipoprotéine LipL32 est exprimée durant l'infection des mammifères hôtes [52], en phase aigüe comme en phase chronique [53] et possède un pouvoir hautement antigénique puisque 95% des personnes atteintes de leptospirose produisent des anticorps anti-LipL32 [54], d'où son utilité dans le diagnostic par test ELISA [40]. Elle ne semble pas constituer un facteur de virulence majeur [53].

Enfin outre les OMPs et le LPS, les seules toxines répertoriées chez les leptospires sont des hémolysines, notamment des sphingomyélinases, une collagénase et des protéases. Une dernière catégorie d'hémolysines, des protéines homologues à des protéines animales jouant un rôle clé dans l'hémostase (acétylhydrolase du facteur PAF [Platelet Activating Factor], facteur Von Willebrand) ont été découvertes et expliquent les cas sévères d'hémorragie et d'hémoptyisie observés lors d'infection par *L. interrogans* [55].

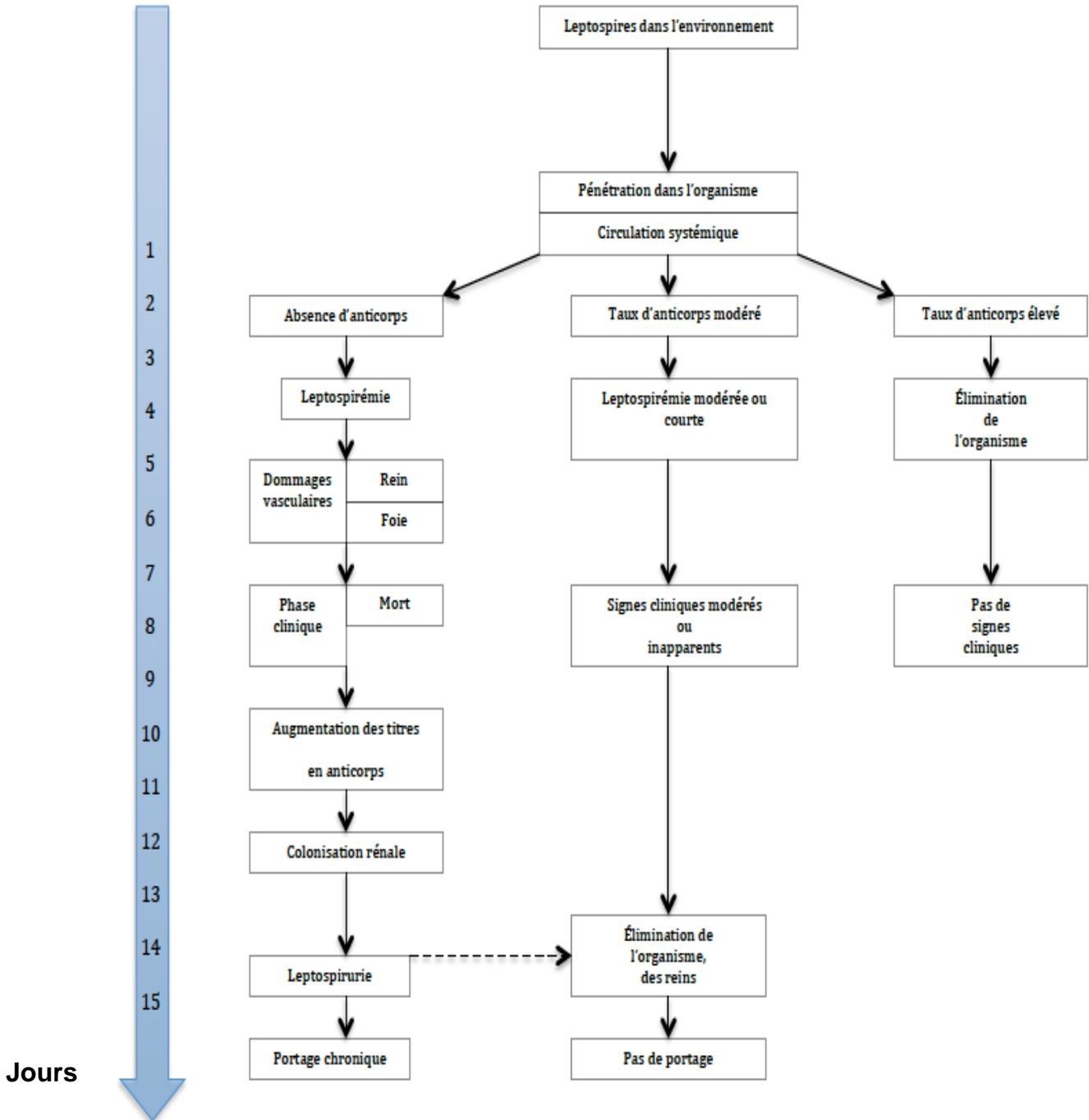


Figure 2.1 : Schéma pathogénique général de la leptospirose d'après [56].

2.3. Réponse immunitaire de l'hôte

La dose minimale infectieuse expérimentale nécessaire au déclenchement de l'infection chez le hamster varie entre 10^3 et 10^8 bactéries. Elle dépendrait de l'hôte, du sérovar et de la souche en question [57].

Lorsqu'il est infecté, un animal synthétise des anticorps qui lui permettent généralement d'éliminer la bactérie des principaux organes et du système circulatoire ("clairance") excepté les reins, où la bactérie peut se loger durablement [58] [59]. L'animal peut alors devenir porteur rénal de leptospires. S'il devient un porteur chronique ("animal réservoir"), il peut ensuite excréter la bactérie : de façon continue ou discontinue, toute sa vie ou transitoirement puis l'éliminer [59].

La réaction immunitaire à médiation humorale est caractérisée par deux vagues successives d'anticorps. La première est composée d'IgM (Immunoglobulines M) qui arrêtent la prolifération des leptospires sans cependant détruire les populations bactériennes présentes. La deuxième vague est composée d'IgG qui sont à l'origine d'une réponse immunitaire plus spécifique, et détruisent les leptospires présents [15].

Si après une première réponse immunitaire (synthèse d'anticorps) l'hôte n'est jamais recontaminé, son taux d'anticorps baisse et il peut redevenir séronégatif [60] [61] [62], alors même que ses reins peuvent être colonisés par des leptospires et qu'il peut être excréteur urinaire [63].

Lors d'une infection ultérieure due au même sérovar que celui impliqué dans la primo-infection, le taux d'anticorps vis-à-vis de ce sérovar augmente plus rapidement que lors de la primo-infection par ce sérovar (mémoire immunitaire) [64].

Si la seconde infection est due à un sérotype différent de la primo-infection, le test sérologique (MAT) peut refléter deux types de réponses immunitaires :

- Seul le titre en anticorps dirigés contre le sérotype infectant augmente.
- Le titre en anticorps dirigés contre le sérotype infectant augmente mais le/les taux d'anticorps dirigés contre le/d'autres sérotype(s) impliqué(s) dans les infections précédentes augmente(nt) aussi (réponse anamnétique) [11].

2.4. Signes cliniques chez les espèces sensibles

La leptospirose est une maladie pour laquelle les manifestations cliniques sont protéiformes et semblables à ce qui peut être observé pour beaucoup

d'autres maladies infectieuses [11]. La durée d'incubation est en moyenne d'une à deux semaines (entre deux jours et trois semaines pour les extrêmes) [65].

Il existe des formes subcliniques sans qu'aucun symptôme ne soit rapporté. Les formes cliniques habituellement décrites sont une forme ictérique possiblement, une forme anictérique et une forme chronique [40].

2.4.1. Leptospirose aigüe et subaigüe

L'expression clinique de la leptospirose aigüe est la plupart du temps biphasique, débutant par un syndrome fébrile non pathognomonique. Les manifestations qui s'ensuivent sont : maux de tête, baisse d'appétit voire anorexie, faiblesse et/ou douleur musculaire, conjonctivite, vomissements et diarrhée [11].

Ensuite, selon les organes atteints, et aussi selon l'espèce de mammifère concernée, différentes formes aigües de leptospirose sont observables :

- La thrombocytopénie est un signe caractéristique de la leptospirose avec atteinte rénale, et témoigne avec l'oligurie, de la gravité de l'insuffisance rénale aigüe.
- Des formes de méningites aseptiques sont observées chez l'homme dans 25% des cas de leptospirose, caractérisées par des maux de tête et des vomissements.
- En cas de forme fulminante de leptospirose, un syndrome fébrile prolongé s'installe, suivi d'un ictère accompagné d'hémoglobinurie (forme cliniquement : la « jaunisse »). Cette forme de la leptospirose est appelée maladie de weil, et la mortalité est de 5 à 15% chez l'homme selon la sévérité de l'atteinte [14].
- L'atteinte respiratoire serait en fait plus fréquente que ce qui est rapporté avec une incidence chez l'homme variant entre 20 et 70%. Les signes cliniques sont une dyspnée, de la toux avec hémoptysie, et une détresse respiratoire [14].
- Une atteinte cardiaque est possible mais reste le plus souvent non diagnostiquée car seul un électrocardiogramme permet d'en attester.

- L'atteinte oculaire est variable et débute par une conjonctivite. L'ictère scléral serait pathognomonique de la forme de weil. Une uvéite antérieure s'installe ensuite et peut conduire à la cécité (homme et cheval) [11].
- Des cas d'avortements sont décrits, principalement chez la vache [40].

2.4.2. Leptospirose chronique

L'infection par *Leptospira spp* sans développement de signes cliniques est possible chez l'homme ou chez les animaux domestiques dans les zones d'endémie [14].

CHAPITRE 3

DIAGNOSTIC

3.1. Les méthodes directes

3.1.1. Examen au microscope à fond noir

Pour que l'observation des leptospires soit visible du fait de leur diamètre inférieur à deux micromètres, il faut utiliser un microscope à fond noir au grossissement 250 et les observer entre lame et lamelle. Les leptospires ne sont pas visibles avec un microscope ordinaire [15]. Leur morphologie caractéristique en filament incurvé et leur mobilité par rotation, flexion et translation les rendent reconnaissables par des yeux expérimentés [15]. Cette technique a une sensibilité et une spécificité faibles [11]. Environ 10^4 leptospires / ml est le seuil de détection [66]. Le risque de faux positifs dus à une mauvaise interprétation de fibrine ou de fils de protéines, débris cellulaires et autres objets peut être élevé, même pour les experts [7] [67]. La technique souffre d'autres inconvénients, tels que des difficultés techniques avec l'obtention de spécimens appropriés (spécimens devraient être pris de manière aseptique et envoyés à un laboratoire sans retard), l'exigence d'un niveau élevé de compétence de l'opérateur, cette méthode ne fournit aucune information sur le sérovar infectant [7] [14].

Finalement cet examen direct des leptospires n'est pas un examen de certitude car peu spécifique et peu sensible, mais un examen d'orientation rapide préalable à d'autres examens [15].

3.1.2. Mise en culture

La détection de leptospires par la culture est considérée comme le diagnostic définitif de la leptospirose [5]. Cette mise en culture doit être réalisée rapidement après le prélèvement [15]. Au cours de la première semaine de la maladie, les leptospires peuvent être isolés à partir du sang, du LCR et du liquide de dialysat [68]. Pour les cas mortels chez les humains et les animaux, les leptospires peuvent être cultivés à partir d'échantillons de tissus à l'autopsie. Les tissus les plus couramment utilisés sont les reins, le foie et le cerveau [69]. Les

échantillons ne doivent pas être congelés avant la culture [14]. Les leptospires peuvent également être cultivés à partir des avortons, des mort-nés, du placenta et des produits d'avortement [7].

Un milieu couramment utilisé pour la culture est Ellinghausen- McCullough-Johnson-Harris (EMJH) qui contient 1% d'albumine de sérum bovin et du polysorbate 80 (source d'acides gras à longue chaîne) [70]. Antibiotiques 5-fluorouracile, la gentamicine, l'acide nalidixique ou rifampicine pour inhiber la contamination [7] [11]. La préparation du milieu de culture est coûteuse et techniquement difficile [14]. En raison de l'exigence d'incubation prolongée et supports spéciaux, la culture n'est pas souvent exécutée comme une méthode de diagnostic de routine [71] [72]. Cependant, elle est largement utilisée dans la recherche [7] [14]. Les Cultures doivent être incubées à 28-30 ° C et examinées chaque semaine au microscope à fond noir. Même si les conditions optimales sont fournies, les organismes peuvent se développer lentement et les cultures doivent être examinées pour un maximum de 13 semaines avant d'être considérées comme négatives [11] [14]. Un repiquage systématique des tubes de culture primaire est recommandé après une incubation de quinze jours [15]. La culture des leptospires à partir de spécimens humains et animaux peut être influencée par de nombreux facteurs, comme le type d'échantillon et l'état d'échantillon prélevé [7]. La nature de certains leptospires (par exemple *L.borgpetersenii* serovar Hardjobovis est relativement difficile à cultiver) [73].

3.1.3. Amplification génétique

La technique de polymérase chain reaction (PCR) est aujourd'hui une technique de routine pour le diagnostic précoce de la maladie. La PCR peut être "conventionnelle", c'est-à-dire suivie d'une migration sur gel d'agarose, ou en temps réel. Différents gènes peuvent être ciblés : *rrs* (ADNr 16S) [74] [75], *IS1533* [76], *lipL32/hap1* [75] [31] [77] [78], *secY* [79], ADNr 23S [80], *lfb1* [81], etc.

3.2. Les méthodes indirectes

3.2.1. La sérologie

La sérologie est la méthode de diagnostic le plus fréquemment utilisé pour la leptospirose [82]. Les tests sérologiques disponibles sont basées

principalement sur la détection de l'immunoglobuline IgM et les anticorps de classe IgG. Les modèles de réponses d'IgM et les anticorps de classe IgG trouvés dans les cas humains et des animaux sont similaires [83].

Les anticorps IgM apparaissent en premier (dès la deuxième journée de l'apparition des symptômes) au cours de l'infection, suivie par des anticorps de classe IgG [84] [85] [86]. Les deux anticorps IgM et IgG persistent généralement après l'infection, mais la persistance des anticorps IgM est généralement plus courte que les anticorps IgG [73] [87] [88] [89].

3.2.1.1. La sérologie par la méthode de microagglutination (MAT)

Le MAT reste la méthode de référence pour le diagnostic sérologique de la leptospirose pour les humains et les animaux [90] [91]. Au cours de cette procédure, les sérums sont titrés avec des suspensions d'antigènes vivants de sérotypes de leptospires et inspectés pour la recherche d'agglutination avec la microscopie à fond noir [69].

La détermination optimale du cut-off pour ce diagnostic présomptif dépend de la prévalence de la maladie dans la population d'intérêt [11].

Le critère global contemporain est l'utilisation d'un seul titre ≥ 400 pour la confirmation au laboratoire d'une infection actuelle à *Leptospira* [92]. Pour un même échantillon prélevé sur un animal cliniquement normal, un titre ≥ 100 est souvent considéré comme indicatif d'une infection [93]. Il est suggéré qu'un titre cut-off de 50 devrait être utilisé pour indiquer l'exposition à *Leptospira spp.*, à la fois pour les animaux et pour l'homme [94] [7] [95]. Comme le MAT détecte à la fois les IgM et les IgG, les anticorps peuvent être détectés pendant une période prolongée après la récupération [96].

Bien que le MAT soit couramment utilisé pour le diagnostic de la leptospirose chez les animaux, ce test détecte les anticorps dans le sérum, plutôt que la présence de leptospires directement dans l'urine et les reins, et donc ne reflète pas le statut de porteur de l'hôte [97] [98]. La corrélation entre le statut sérologique d'un animal et de son statut de porteur est signalée d'être pauvre [99].

Le MAT peut donner une impression générale des sérogroupes / sérotypes circulant au sein d'une population, et considéré comme le test le plus approprié d'utiliser dans des enquêtes séro-épidémiologiques [11].

Si le MAT peut fournir un guide précis du séro groupe / sérotypes infectant de *Leptospira*, il dépend aussi de la couverture adéquate des sérotypes circulant localement dans la batterie d'antigènes [100]. Les laboratoires utilisent couramment un minimum de six à 15 sérotypes qui sont représentatives des sérogroupes localement enzootique et endémiques [7].

La performance du MAT nécessite le maintien d'une collection de souches vivantes [93]. La subculture répétée d'un grand nombre de souches présente des risques pour le personnel de laboratoire [68]. Autres problèmes potentiels associés à l'entretien des cultures antigène sont la contamination de souche et les erreurs d'étiquetage ou d'échange de souches. Cependant, ces problèmes sont plus susceptibles de se produire dans les laboratoires pour lesquels la capacité de contrôle de la qualité et du stockage à long terme des collections de cultures est limitée [101]. En outre, en raison de l'effet subjectif de variation d'observateur, les résultats du MAT sont couramment variés entre les laboratoires [11] [102].

En fin une réaction sera considérée comme positive si, à une dilution donnée et pour l'antigène testé, au moins 50% des leptospires sont agglutinés (la lecture est assurée par comparaison avec un antigène témoin qui fixe le seuil de positivité [26].

3.2.1.2. La sérologie par la méthode ELISA

La complexité de la réalisation du MAT a conduit au développement de tests qui donnent des résultats rapides, sans la nécessité d'une culture ou d'un MAT [14]. L'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) est souvent utilisé comme une alternative pour le dépistage de la leptospirose chez l'homme comme chez les animaux [103] [104].

En plus d'être facile à réaliser, l'ELISA est peu coûteux, sûr (car il utilise l'antigène tué et donc réduit le risque d'infection pour le personnel de laboratoire), et donne un résultat moins subjectif que le MAT [105] [106].

Un autre avantage de l'ELISA sur le MAT est que la réponse sérologique des IgM et IgG peut être détectée séparément [93].

La plupart des tests ELISA utilisent des lysats de cellules entières, habituellement la souche saprophyte *L.biflexa* sérovar Patoc comme antigène, qui partage plusieurs antigènes de surface avec les souches pathogènes [91]. Cela a entraîné une faible spécificité tels que déclarés pour la cellule entière dans certaines études [107] [108]. Récemment, des tests ELISA lipoprotein-based recombinants ont été consultés (accédés), avec une meilleure spécificité et reproductibilité [5].

3.2.1.3. Autres méthodes sérologiques

Plusieurs autres tests sérologiques ont été utilisés comme tests de dépistage pour les anticorps, y compris macro-agglutination [109], la réaction de fixation du complément [110], l'immunofluorescence indirecte [111], l'hémagglutination indirecte [112], et l'agglutination au latex [113]. Néanmoins, ces tests sont rarement utilisés en raison de leur manque de sensibilité ou de la spécificité [91].

Un test lepto de bandelette a été développé comme un test rapide sur le terrain de la leptospirose qui ne nécessite pas d'équipement de laboratoire spécial et de personnel qualifié [114]. La présence d'anticorps IgM spécifique de *Leptospira* dans le sérum est testée par la lecture de la coloration sur bandelette à antigène, par comparaison à une bandelette de référence marquée de 0 à 4 [115].

CHAPITRE 4

LE RAT

4.1. Classification

Les rats sont abondants dans la nature et représentent plus de 42% des espèces de mammifères connues [116]. Ils appartiennent à la Famille des *Muridés*, caractérisés par 3 dents jugales tuberculées, des membres postérieurs non palmés, une queue nue ou peu velue [117], ils sont caractérisés par la présence de 4 incisives à croissance continue, par l'absence de canines et un long diastème qui sépare les incisives des dents jugales [117].

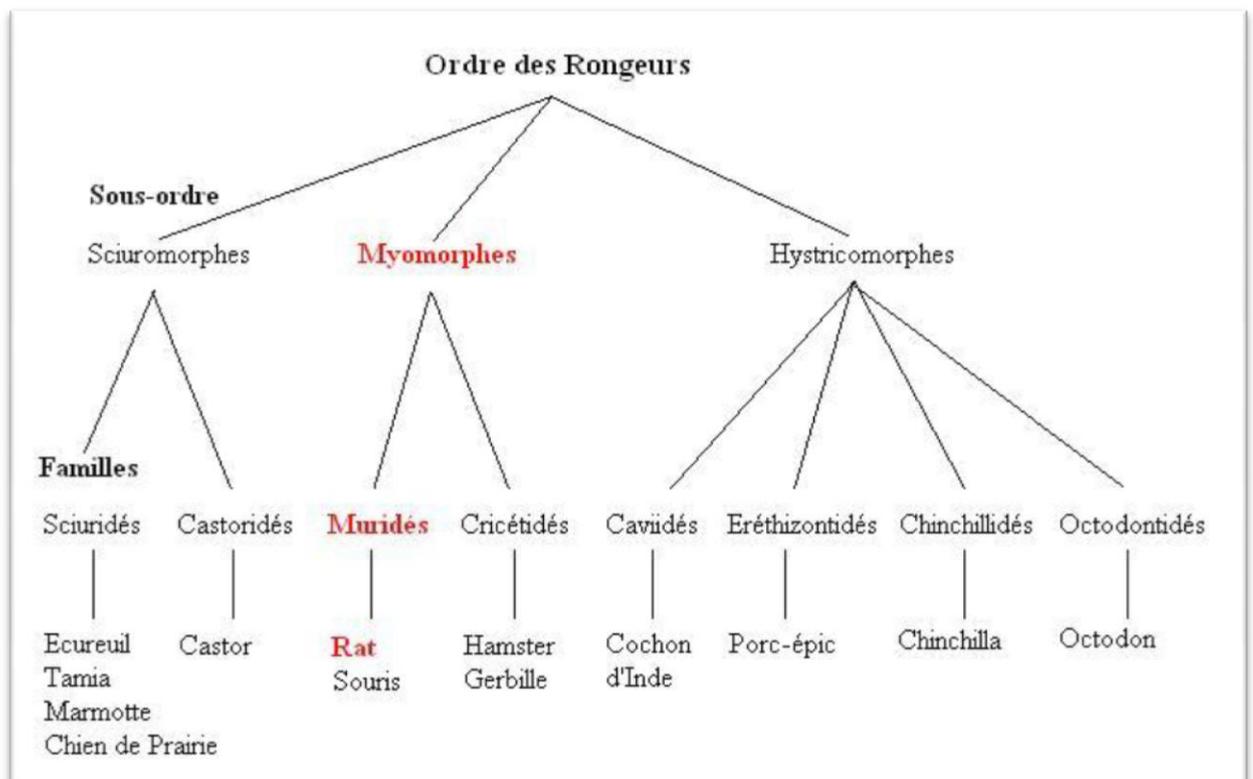


Figure 4.1: Classification des Rongeurs [118].

4.2. Données biologiques générales

Les principales données biologiques du rat sont rassemblées dans le tableau suivant :

Tableau 4.1: Données anatomo-physiologiques du rat [119] [120] [118].

Longévité	2 à 7 ans, 3 ans en moyenne
Poids adulte femelle, mâle	225 à 350g ; 267 à 520g
Poids à la naissance	5 à 6g
Longueur du corps	35 à 50 cm
Longueur de la queue	17 à 23 cm
Température corporelle	35,9 à 38,0°C
Fréquence cardiaque	250 à 495 battements / min
Fréquence respiratoire	70 à 145 mouvements / min
Consommation quotidienne d'aliment pour un adulte	15 à 20g
Consommation quotidienne d'eau pour un adulte	22 à 33mL
Production quotidienne de fèces	9 à 15g
Diurèse quotidienne	13 à 23mL

Les conditions de vie des rats sont de 18 à 27°C pour la température avec un optimal à 22°C, et une hygrométrie de 30 à 70% [120]. En effet, les rats ne possèdent pas de glandes sudoripares, ils ne transpirent donc pas et régulent leur température en ouvrant la bouche. Il ne faut donc pas les exposer à des températures trop élevées [119].

4.3. Structure sociale (Hiérarchie)

Les rats sont des animaux sociaux. Ils ont donc besoin de la compagnie de leurs congénères, et l'isolement forcé leur procure un stress qui affecte leur bien-être [121].

Dans leur habitat naturel, si l'environnement est pauvre, la densité de rats reste faible, un mâle alpha monopolisant seul le terrier et les femelles. La structure est alors polygyne et le rat se montre territorial [122].

Dans les environnements plus riches, urbains notamment, la densité en rats augmente. Ils s'organisent alors en clans multimâles et multifemelles, sans territorialité stricte. Une hiérarchie peut se mettre en place entre les mâles qui entrent en compétition pour les femelles en œstrus [122].

Des interactions agonistiques s'observent majoritairement chez les rats lors de la mise en place de la hiérarchie dans les colonies multimâles-multifemelles, que ce soit lors de l'arrivée à maturité des jeunes rats ou lors de l'introduction d'un

nouveau congénère [123] [124]. Cette hiérarchie est très importante dans la vie de la colonie, car les individus dominants bénéficient d'un accès privilégié à la nourriture, et d'un nombre plus élevé de copulations [123].

4.4. Répartition des activités dans l'espace et dans le temps

Le sommeil occupe la place la plus importante, ils y consacrent plus de 60% de leur temps [125].

Le comportement de toilettage fait de même partie des comportements essentiels du rat. Il s'y adonne près de 40 % de son temps d'éveil [126] [127].

Bien que fractionnée en petites séquences tout au long de la journée et de la nuit, l'alimentation peut représenter près de 15 % du temps [128].

Le rat occupe également ses journées en explorant régulièrement tous les recoins du milieu de vie qui lui est proposé. Il passe environ 5 % de son temps à explorer son milieu et à s'y déplacer [125].

4.5. Habitat

Le rat fait partie des six espèces de rongeurs catégorisées en tant qu'authentiques rongeurs commensaux. Ce terme trouvé dans la littérature scientifique vise à désigner la relation de dépendance des rats envers les humains pour satisfaire leurs besoins alimentaires. Toutefois, comme une relation de commensalisme véritable implique qu'une espèce tire profit d'une autre sans lui causer préjudice, le terme kleptoparasitisme serait plus approprié pour caractériser l'association existant entre les rats et les humains [129]. Effectivement, la relation entre les deux espèces se produit au détriment de l'humain puisqu'elle entraîne pour lui des impacts négatifs importants au niveau social et économique [130].

4.6. Comportement alimentaire

Les rats sont des rongeurs myomorphes monogastriques qui pratiquent la coprophagie. Ce sont des omnivores opportunistes, qui dans leur environnement naturel peuvent à la fois se servir dans les restes ou dans les stocks de nourriture

destinés à la consommation humaine et se nourrir d'herbe, de graines, de fruits, de racines, d'œufs et même parfois de petits invertébrés [131].

L'estomac du rat est de petite taille, ce qui le force, comme les autres rongeurs, à fractionner ses repas et à en augmenter la fréquence. De plus, l'estomac des rongeurs possède une crête qui sépare la partie glandulaire de la partie aglandulaire, que les aliments ne peuvent franchir facilement que dans un sens. Cette particularité, en plus d'une pression oesophagienne élevée et d'un cardia résistant, ne permettent pas à ces espèces de vomir [131].

La formule dentaire du rat est la suivante : I : 1/1, C : 0/0, P : 0/0, M : 3/3. Il possède donc 16 dents, qui ont une couleur jaunâtre de façon physiologique. Les rats sont myomorphes, ce qui implique que seules leurs incisives sont hypsodontes et poussent continuellement [131].

Barnett (1975) [132] suggéra que dans les conditions naturelles, le choix de la nourriture n'est pas influencé socialement. Il n'y a pas non plus de preuve d'une réelle imitation et/ou d'un apprentissage par l'observation par les jeunes rats. Le choix de nourriture n'est pas appris des parents mais semble être une question d'habitude, néanmoins il peut exister des traditions familiales [129].

Les rats ont tendance à consommer une petite quantité de quelque chose de non familier et attendent de voir ce qui arrive, puis ils augmentent progressivement leur consommation jusqu'à se libérer totalement de leur néophobie [129]. Cependant des recherches de laboratoire ont montré que les rats peuvent être influencés par l'odeur d'un rat ayant ingéré une nourriture particulière [133] [134], en effet, un aliment senti par un rat dans l'haleine d'un de ses congénères n'est plus considéré comme un aliment inconnu. De plus, Galef et al. (1988) [135] ont montré que le disulfure de carbone présent dans l'haleine des rats était responsable de cet apprentissage social. Aussi l'information au sujet de la nourriture, comme le goût ou la toxicité, peut être transférée de la mère aux petits, même par le biais du lait maternel [136] [137] [138].

D'une façon générale dans leurs déplacements journaliers à la recherche d'eau et de nourriture, les rats utilisent les mêmes chemins, par souci de sécurité. Ils choisissent autant que possible des parcours couverts, préférant longer les

murs plutôt que s'aventurer au milieu d'une pièce ; un piège placé au milieu d'une chambre a ainsi peu de chances d'attirer les rats. Par contre, le rat passera par-dessus un piège, même non appâté, adossé à un mur, plutôt que de s'en écarter pour le contourner [139].

La néophobie s'étend également aux objets apparaissant subitement dans l'environnement, ce qui cause l'évitement des boîtes d'amorçage et des pièges. Et même après accoutumance, il ne s'agit la plupart du temps que jeunes individus ou d'adultes de bas rang social qui sont pris [140], puisque ce sont ces individus qui sont forcés d'aller chercher leurs moyens de subsistance dans des places alternatives. Ce faisant les individus les plus dominants survivent et repeuplent aisément la colonie par la voie de la reproduction [129].

A l'inverse, dans un environnement instable [141] les rats semblent développer un comportement de néophilie en grignotant des objets inhabituels afin de faire connaissance avec leur nouvel environnement [129].

Comme la majorité des rongeurs, le rat pratique la coprophagie. Elle permet de compenser l'absence d'un système enzymatique capable de digérer les fibres en exploitant la valeur nutritive issue de la fermentation réalisée dans le caecum et le côlon. De plus, elle permet au rat d'avoir un apport constant en vitamines du groupe B, synthétisées par les microorganismes du tractus intestinal inférieur [127].

4.7. Comportement reproducteur

Une histoire dans un bulletin hebdomadaire de l'agrobusiness aux Etats-Unis a suggéré qu'un seul couple de rat pourrait être responsable de la naissance de plus de 3,5 millions de rats en trois ans [129].

Aussi selon Hinds et al. (2003) [142], presque des millions de rats sont nés tous les jours dans les pays en développement. L'augmentation de la population des rats pose un risque pour la santé humaine et pour les animaux domestiques puisque ils ont tendance de vivre à proximité d'eux [116].

4.7.1. Comportement sexuel du mâle

La puberté est atteinte entre 45 et 75 jours d'âge chez le rat mâle. Il a de plus été prouvé que 25 % des rats âgés perdaient leur capacité à éjaculer, sans que la testostéronémie ne diminue [143] [144].

4.7.2. Comportement sexuel de la femelle

La puberté survient chez la femelle au même moment que chez le mâle. Son cycle dure environ 4 à 5 jours, et est composé de 2 jours de dioestrus, 12 à 18 heures de prooestrus, puis 24 à 36 heures d'oestrus. La réceptivité sexuelle dure environ 12 à 20 heures à partir de l'ovulation, qui a lieu environ 4 à 6 heures après la fin du prooestrus [127].

Deux particularités sont à noter : tout d'abord, l'effet Whitton existe chez les rattes : il s'agit de synchronisation des cycles des femelles en présence d'un seul mâle.

De plus, le cycle des femelles est dépendant de la lumière, il dure 4 à 5 jours, mais si la lumière est permanente, les femelles peuvent être en oestrus permanent et présentent alors des ovaires polykystiques [145]. Mais les femelles sont normalement polyoestriennes à ovulation spontanée [119].

4.8. Perception de l'environnement

4.8.1. Rôle de la vue

Les rats sont des animaux nocturne, leurs activité est plutôt nocturne ou crépusculaire [145].

La vision des rats est dichromatique, ils ne distinguent que le vert et le bleu dans le spectre visible. En revanche, ils sont capables de percevoir les ultraviolets, ce qui pourrait leur servir à distinguer les marquages urinaires en plus de les sentir [146] [147] [127]. En tant qu'espèce nocturne, ils sont très sensibles à la lumière, en particulier les rats albinos, à tel point que la lumière artificielle peut parfois même leur causer une dégénérescence rétinienne en détruisant leurs photorécepteurs [148] [149] [150].

L'acuité visuelle des rats n'est pas très bonne. Ils ne peuvent donc pas distinguer les détails à longue distance, mais voient très bien les objets de près [127].

4.8.2. Rôle de l'ouïe

Le sens de l'ouïe est très développé chez le rat, comme chez un grand nombre de mammifères. Il peut percevoir des sons de 250 à 70-80 kHz, avec une sensibilité particulière pour les sons entre 8 et 32 kHz [147].

La communication vocale est très présente chez le rat. Il émet de nombreux sons, dont certains font partie des ultrasons et ne sont donc pas audibles pour l'être humain [127] [151].

4.8.3. Rôle de l'odorat

L'odorat des rats est très sensible. Il leur permet de tenir compte d'informations que les humains sont incapables de percevoir. L'urine et ses phéromones, l'odeur des glandes sébacées et l'haleine jouent un rôle dans la communication olfactive du rat [147] [152] [127].

Chez le rat, les glandes sébacées de marquage sont les glandes préputiales, qu'il frotte au sol après avoir fait ses besoins. L'urine et les phéromones qu'elle contient servent également au marquage olfactif. Le rat, en particulier le mâle adulte, peut déposer des petits jets d'urine sur les objets de son environnement et sur ses congénères. Il s'agit parfois d'un avertissement sexuel, venant de la part d'un mâle comme d'une femelle prête à ovuler, ou d'un marquage qui l'aide à se repérer dans son environnement et à rassurer ses congénères [153] [154] [127] [151]. De ces deux odeurs, le rat peut tirer des informations sur le sexe, l'âge, le statut sexuel, l'identité individuelle, la familiarité, le statut social et le niveau de stress de l'animal qui a marqué [127] [151].

4.9. Évolution des populations

Dans certaines grandes villes, notamment en Asie, on évalue la population à 10 rats par habitants. Celle-ci a été réduite à 1 rat pour 400 habitants à Budapest après 10 ans de dératisation. En France métropolitaine, la moyenne est de 1 rat par habitant, voire 5 rats par habitant à la Réunion [155].

Au départ, on pensait que seuls deux facteurs régulaient la taille maximale d'une colonie de rongeurs : la taille de l'habitat et la nourriture disponibles, cependant en milieu urbain la situation est certainement bien plus complexe que ça [129].

Habituellement les populations de rongeurs atteignent l'équilibre quand les morts sont contrées par les naissances jusqu'à (ou à moins) qu'il n'y ait un changement dans l'habitat ou les ressources alimentaires. Une fois l'équilibre atteint, il peut être rompu par diminution voire disparition d'une des 2 ressources majeures, auquel cas il y a migration [156].

Selon Barnett (2001) [141], il n'est pas possible d'observer une diminution linéaire de la démographie en exerçant une pression sur un unique facteur. Il est donc indispensable d'agir sur l'ensemble des facteurs pour s'assurer de la réussite de la manœuvre [129].

Le rang social joue dans le comportement individuel de chaque rat, ainsi se trouvent refoulés les jeunes rats fuyant les agressions, et ce sont ceux la mêmes qui sont plus à même d'être piégés [140]. Les jeunes rats fuient ainsi les environnements les plus favorables et peuvent être responsables d'une contamination plus de surface [129].

Une extermination incomplète d'une population de rats peut même provoquer une augmentation temporaire de la taille de la colonie due à une reproduction de compensation massive [157] [132].

Bien que la prédation ait un effet sur le comportement des rats [158], elle ne semble pas avoir d'effet significatif sur la démographie [140]. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, les chiens et chats présents dans les habitations ou dans les rues sont plus synonymes de forte infestation car ils sont le plus souvent responsables d'une présence de nourriture et d'abri pour les rongeurs [159].

De plus, une étude menée en Grande Bretagne a montré que la mortalité annuelle des populations de rats était de 91 à 97% en ville : la population se renouvelle donc très rapidement [160].

4.10. Migration

Les rats, particulièrement le rat surmulot, ne se déplacent pas sur de longues distances, notamment en milieu urbain dans lequel les rues jouent le rôle de barrière [156]. Ceci n'est pas vrai dans le milieu rural, où ils peuvent se déplacer jusqu'à 3.3 Km à la vitesse de 0.5 à 1.1km/h en une nuit [161]. De plus il existe des déplacements involontaires au cours de transports de biens. La destruction de leur environnement donne également l'occasion de migrations [129].

4.11. Les zoonoses des rats

Des recherches ont démontré que ces mammifères peuvent être associés à la transmission de plus de 40 maladies par la propagation d'ectoparasites, d'endoparasites, de bactéries et de virus contenus dans leurs fèces, leur pelage, leur urine, leur salive, leur sang ou sur leurs pieds [162]. Les maladies qui peuvent être transmises par le rat sont, entre autres, la bilharziose, le typhus murin, la salmonellose, la leptospirose, la trichinellose, la fièvre par morsure du rat et la peste bubonique. La mortalité associée à la transmission des maladies par le rat est importante. On estime qu'au cours des 10 derniers siècles, ces maladies ont causé plus de morts que l'ensemble des guerres qui ont eu lieu sur la planète. Plus récemment, jusqu'à 10 millions de décès qui ont été attribuables au rat, et ce seulement au cours du dernier siècle [129].

4.12. Le rat et la leptospirose

Les espèces à urine acide telles que le chien auront une efficacité épidémiologique plus limitée que celles à urine plutôt basique telles que les rongeurs [26]. L'habitat primaire des espèces pathogènes de leptospires sont les tubules distaux du rein de rongeurs. [163].

Le rat est une espèce envahissante, généraliste et prolifique, qui se développe dans des environnements aussi bien anthropisés que naturels [164]. Par ailleurs, les rats sont souvent la source des cas humains de leptospirose, car réservoirs principaux du sérotype Icterohaemorrhagiae, le plus fréquemment retrouvé dans les cas humains [165] [166] [167] [168].

L'infection du rat est connue et telle qu'elle a conduit la leptospirose à être dénommée la « maladie des égoutiers ». En effet, le contact avec un rat quelle que soit son espèce zoologique constitue un risque épidémiologique de la maladie [15].

Les leptospires pénètrent dans l'organisme d'un rat, restent un temps variable dans son système sanguin, puis gagnent le rein qui est l'organe cible [15], Cliniquement le rat ne présente aucun symptôme alors que les bactéries sont régulièrement éliminées et disséminées dans les urines [15], donc un rat peut rester infecté de longs mois voire toute sa vie. Il constitue ainsi un très bon réservoir [15], Les rats sont donc considérés comme l'une des sources les plus importantes de la leptospirose comme ils sont présents en abondance dans de nombreux environnements [116].

Les rats ont été longtemps rapportés comme réservoir de leptospires pathogènes, isolés pour la première fois à partir de rats sauvages par Noguchi (1917) causant la mort après inoculation à un cobaye. Depuis la première isolation, de nombreuses études ont été menées pour investiguer le rôle des rats dans la leptospirose humaine [169] [170].

La présence de rats autour du domicile [171] [166] [172] est retrouvée comme facteur de risque chez les patients séropositifs. Les fluctuations dans les populations de rongeurs peuvent influencer la saisonnalité de la leptospirose [173]. Les variations dans l'incidence des cas peuvent être localement corrélées à la saison de reproduction des rongeurs [174] : à la saison des mises-bas, un grand nombre de jeunes de l'année, indemnes, peuvent s'infecter et excréter de grandes quantités de leptospires, ce qui induit une période de forte transmission de la bactérie dans la population de rongeurs, puis un pic dans l'incidence des cas humains [173].

CHAPITRE 5

EPIDEMIOLOGIE DE LA LEPTOSPIROSE

5.1. Épidémiologie descriptive

5.1.1. Répartition mondiale

La leptospirose a une répartition mondiale, touchant à la fois les pays industrialisés et ceux en voie de développement. L'incidence de la maladie est cependant plus élevée dans les régions tropicales où l'environnement est plus chaud et humide, propice à la survie des leptospires dans le milieu [175]. Selon l'OMS, l'incidence de la leptospirose chez l'homme n'est pas bien connue dans le monde. Elle se situe probablement entre 0,1 à 1 pour 100 000 habitants par an dans les climats tempérés et 10 ou plus pour 100 000 habitants par an dans les climats tropicaux et humides. Pendant les flambées épidémiques et dans les groupes à haut risque, 100 personnes ou plus pour 100 000 peuvent être infectées [14].

La plupart des cas de leptospirose chez les humains passent inaperçus, car les symptômes sont très peu spécifiques. La période d'incubation est de cinq à quatorze jours, mais peut s'étendre de deux à trente jours. La maladie évolue habituellement de façon biphasique, la première phase étant la phase septicémique et la seconde, la phase immune. Quant à la durée, elle s'étend d'une semaine à plusieurs mois [176]. La majorité des cas diagnostiqués présentent des manifestations sévères, pour lesquelles la mortalité atteint voire dépasse 10% [177].

5.1.2. La leptospirose humaine en Algérie

Selon le figure ci-dessous, nous remarquons que le nombre de cas le plus élevé est enregistré dans la wilaya de Blida.

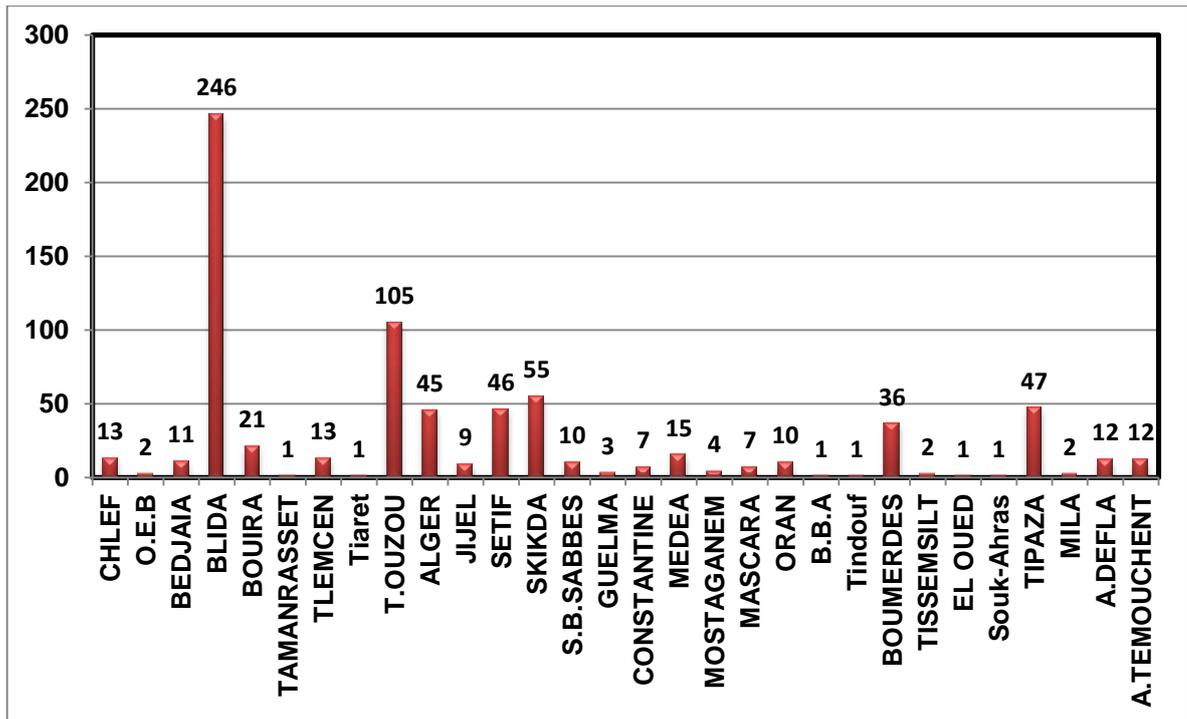


Figure 5.1 : Nombre de cas de leptospirose humaine par wilaya entre 2004 et 2014 [6].

Les sérogroupes identifiés à partir des sérums positifs par la technique de micro agglutination réalisée à l'Institut Pasteur d'Algérie de l'année 2002 à 2008 sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 5.1 : Résultats de l'identification des sérogroupes de l'année 2002 à 2008 [178].

Sérogroupe	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	Total
Australis	01	04	01	12	-	-	-	ND	ND	18
Grippytyphosa	-	-	-	-	01	07	02	ND	ND	10
Canicola	02	02	05	-	23	07	03	ND	ND	42
Cynopteri	01	06	-	01	02	02	-	ND	ND	12
Hebdomadis	02	04	-	-	08	-	-	ND	ND	14
Icterohaemorrhagiae	-	03	05	08	36	89	26	ND	ND	167
Pomona	01	01	-	-	-	-	-	ND	ND	02
Sejroe (sejroe)	-	-	01	14	03	04	05	ND	ND	27
Sejroe (hardjobovis)	01	-	-	01	-	06	03	ND	ND	11
Panama	01	-	05	-	07	-	01	ND	ND	14
pyrogenes	-	-	-	04	02	05	-	ND	ND	11
Tarassovi	-	-	-	04	-	01	01	ND	ND	06
Bataviae	01	-	-	04	03	03	03	ND	ND	14
Coagglutinines	01	27	27	64	94	124	-	ND	ND	337

ND : Non Déterminé

Coagglutinines : réactions croisées sans séro groupe dominant.

5.1.3 La leptospirose humaine dans la wilaya de Blida

Dans la wilaya de Blida, le nombre de cas de leptospirose humaine est compris entre 7 et 27 dans la période 2005-2014, avec un pic observé en 2011, et 2012 (41 cas), (figure 5.2).

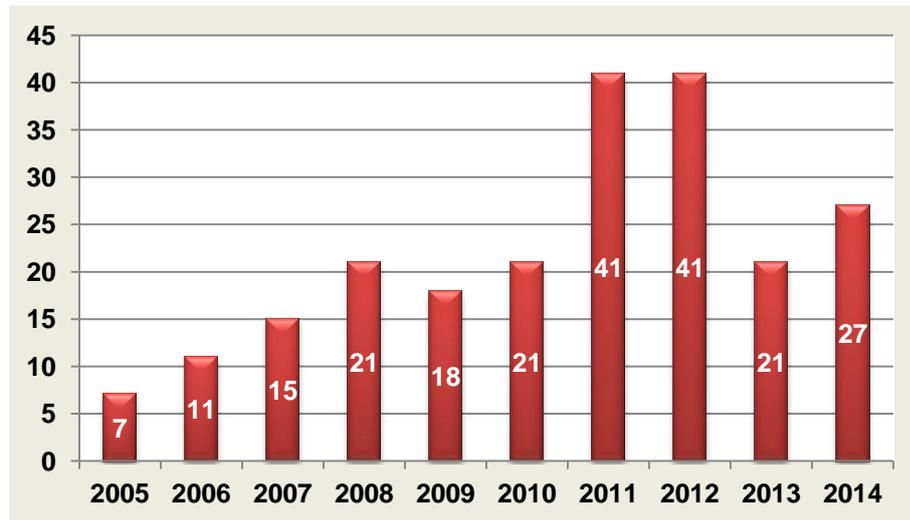


Figure 5.2 : Nombre de cas de leptospirose humaine dans la wilaya de Blida entre 2005-2014 [179].

Toujours dans la wilaya de Blida, en fonction de commune, c'est la commune de Blida qui a enregistré le plus grand nombre de cas de leptospirose humaine entre 2005 et 2014, suivie par la commune de Boufarik, et la commune d'Oued El Alleug (figure 5.3).

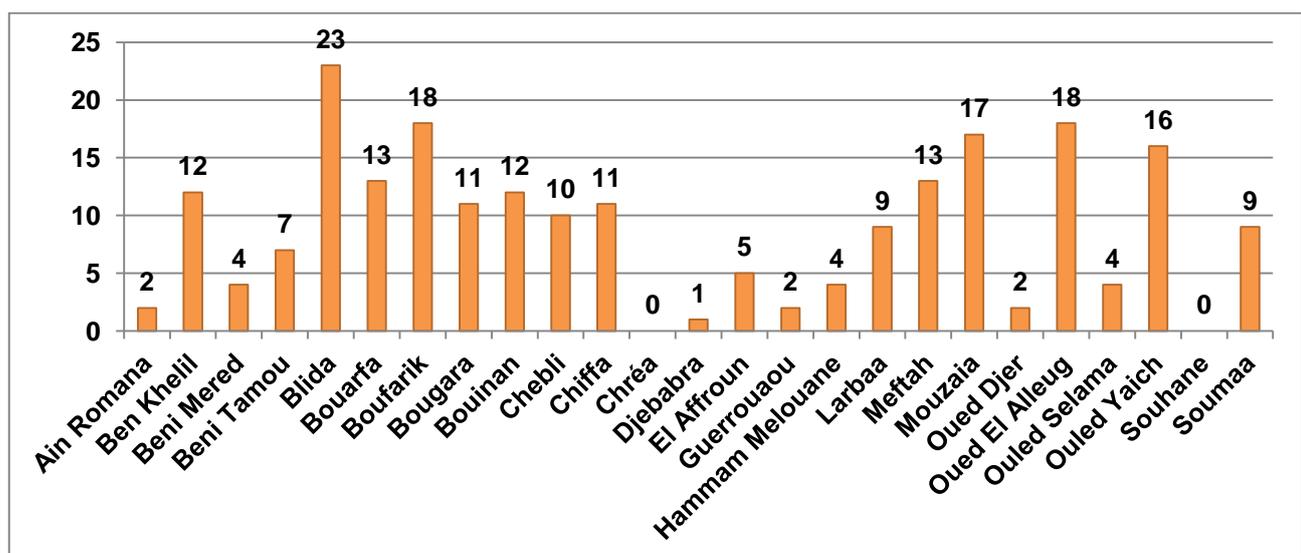


Figure 5.3 : Nombre de cas de leptospirose humaine par commune dans la wilaya de Blida dans la période 2005-2014 [179].

La leptospirose a occupé à peu près le un tiers des cas des zoonoses surveillées dans la wilaya de Blida ente 2005 et 2014 chez l'homme, (figure 5.4).

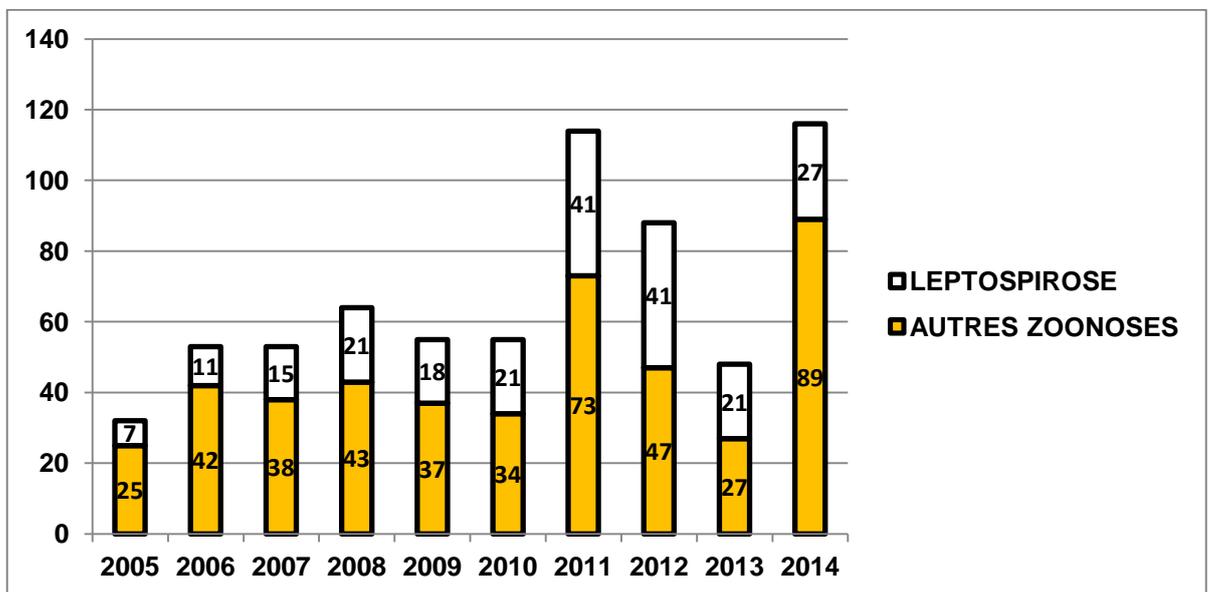


Figure 5.4 : Place de la leptospirose par rapport à d'autres zoonoses dans la wilaya de Blida [179].

Les autres zoonoses sont : la rage, la brucellose, la fièvre boutonneuse, la leishmaniose, et le kyste hydatique.

5.2. Épidémiologie analytique

5.2.1. Notion d'hôte réservoir et hôte sensible

On distingue généralement deux catégories d'hôtes animaux (Homme y compris) dans l'épidémiologie de la leptospirose :

- Les hôtes accidentels, sensibles, avec des signes cliniques allant de bénins à mortels.
- Les hôtes réservoirs, que l'on peut qualifier de "tolérants" car la bactérie a un impact mineur sur eux. Chez ces hôtes asymptomatiques, il s'établit un "équilibre" biologique avec *Leptospira* [180].

La plupart des mammifères peuvent être infectés par des leptospires pathogènes [181]. Différents sérovars de *Leptospira* sont "associés" à un ou plusieurs "hôtes de maintien", dont les populations servent de réservoirs sur le long terme [14].

Tableau 5.2 : Hôtes réservoirs typiques des sérovars communs de *Leptospira* [14][182].

Hôte réservoir	Sérovar(s)
Porc	Pomona, Tarassovi
Bovin	Hardjo, Pomona
Cheval	Bratislava
Chien	Canicola
Mouton	Hardjo
Cerfs	Hardjo
Raton laveur	Grippotyphosa
Rat	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Souris	Ballum, Arborea, Bim
Marsupial	Grippotyphosa
Chauve-souris	Cynopteri, Wolffi

La relation entre un hôte de maintien et le sérovar est caractérisée par une transmission efficace, une forte séroprévalence (supérieure à 50%), et un portage rénal asymptomatique et chronique [182].

5.2.2. Réservoirs

Le réservoir des leptospires pathogènes est essentiellement animal, mais se prolonge dans l'environnement. Il peut s'agir d'animaux infectés, malades ou non (porteurs chroniques), ou de leurs cadavres ou dépouilles (survie cependant limitée dans le temps). Les animaux infectés excrètent par leurs urines de grandes quantités de leptospires pendant de longues durées (années), contaminant ainsi l'environnement [183] [11].

Il s'agit principalement des rongeurs (rats, souris, campagnols, ragondins...), insectivores (hérissons, musaraignes), les renards, chiens, chauves-souris, cerfs, lièvres, le bétail tel que les chevaux, bovins, porcs, chèvres, mais aussi les grenouilles et poissons [183] [184] [185]. Le contact avec ces animaux est connu comme facteur de risque [185].

5.2.3. Hôtes sensibles

Les hôtes sensibles à la leptospirose sont les mammifères, dont l'homme, le chien, les bovins, le cheval, le porc ; cette sensibilité est dépendante du sérovar en question [11] [186].

5.2.4. Mode de contamination

Les animaux et l'homme sont infectés par contact direct avec des animaux, des tissus d'animaux, les fluides corporels (notamment d'urine), ou par contact indirect avec l'environnement contaminé (par exemple, du sol ou de l'eau contaminée par l'urine d'animaux porteurs) [14] [187].

Les leptospires pénètrent dans l'organisme humain par les muqueuses intactes telles la conjonctive, la muqueuse nasopharyngée, ou les poumons, en cas d'inhalation d'eau, et à la faveur de plaies ou d'excoriations de la peau parfois minimes [6] (peau saine macérée, ou ramollie par l'eau) [188].

Chez les animaux, les mêmes voies de contaminations sont fonctionnelles mais peut s'y ajouter, chez le bétail et notamment les porcs, une transmission vénérienne ou congénitale. La transmission interhumaine est exceptionnelle, que ce soit par voie urinaire, sexuelle, d'allaitement ou transplacentaire [189].

L'Homme se contamine le plus souvent par exposition à un environnement contaminé, lors d'activités nautiques et de baignade en eau douce. Les vétérinaires, éleveurs, inspecteurs d'abattoirs, et d'autres professions qui nécessitent le contact avec les animaux, et au cours des quelles la contamination se fait principalement de manière directe [11].

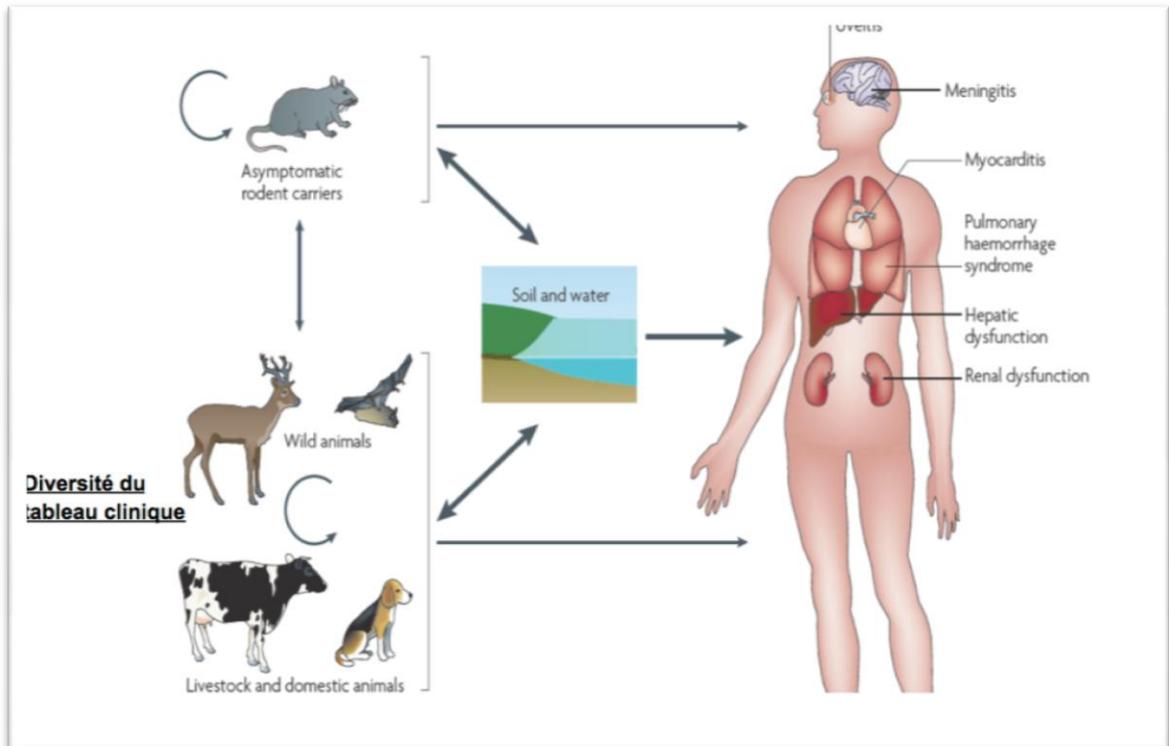


Figure 5.5 : Mode de contamination de la leptospirose [23].

5.2.5. Matières virulentes

De nombreuses espèces de mammifères sont des réservoirs naturels (hôtes de maintenance) de leptospires pathogènes, y compris les animaux sauvages, de ferme et de compagnie [7] [11]. Les animaux infectés peuvent avoir des leptospires colonisant de façon persistante les tubules rénaux proximaux et excrètent l'organisme par intermittence pendant des mois, des années, ou même à vie [7]. Les humains sont des hôtes accidentels pour *Leptospira spp* [23]. Même si l'excrétion des leptospires dans l'urine humaine pendant des semaines, ou rarement, des mois a été rapportée, les humains ne sont pas considérés comme une source de transmission [14].

La survie des leptospires dépend du pH, de la température, de la présence éventuelle de composés inhibiteurs et de rayonnements ultra-violet (lumière solaire directe). Ainsi ces bactéries peuvent survivre jusqu'à trois semaines dans un sol détrempé après une saison des pluies. Sur un sol contaminé par de l'urine de rat infecté, elles peuvent survivre jusqu'à deux semaines [11].

Tableau 5.3 : Durée de survie des leptospires dans différents milieux de l'environnement [188]

Eau de robinet, PH 5	2 jours
Eau de robinet, pH 7	28 jours
Eau de mer	18-24h
Ordures	10 jours
Sol mouille	35 jours
Sol sature d'urines	6 mois

Les hôtes réservoirs jouent un rôle important dans la dynamique de transmission des leptospires [190]. Par conséquence, il semble important de connaître les sérovars présents dans la région et leurs hôtes réservoirs associés dans le but d'évaluer les risques pour l'homme et d'appliquer les mesures de contrôle [191], et comme les rats sont des réservoirs naturels de leptospires et sont considérés comme l'une des sources la plus importante de leptospirose puisqu'ils sont présents en abondance dans plusieurs environnements [116]. Il semble donc intéressant de connaître leurs importances comme réservoirs de leptospires, et de mettre en évidence les sérovars circulant au sein de la population de rat.

CHAPITRE 6

MATERIELS ET METHODES

6.1. Problématique et Objectifs

Selon les données du Ministère de la santé, la région de Blida semble être la zone la plus exposée aux cas de leptosporose humaine d'où notre intérêt porté pour ce site. Dans cette étude, le rat longtemps considéré dans la littérature comme le réservoir principal des leptospires, a été l'animal sélectionné pour faire l'objet de notre recherche.

Au départ de cette étude, rien n'est connu sur la situation de la leptospirose chez le rat en Algérie. Ce travail avait donc pour objectif principal d'étudier le degré d'importance du rat comme réservoir potentiel zoonotique de leptospires dans la région.

En outre, il serait intéressant d'apporter une contribution originale à la connaissance des serovars circulants de *Leptospira spp* chez le rat dans la région ainsi que les facteurs de risque de transmission et d'infection chez cet animal.

Pour cela, une enquête transversale descriptive sur la leptospirose chez le rat a été réalisée sur terrain dans la région de Blida, dont les objectifs sont :

- Estimer la séroprévalence et l'étudier vis-à-vis de certains serovars de *Leptospira* chez le rat.
- Déterminer les indicateurs ou facteurs de risque susceptibles de favoriser la transmission de cette infection chez le rat.
- Isoler la bactérie (les leptospires) par culture, pour une ultérieure identification.
- Evaluer les performances de la culture bactérienne en la comparant avec le test sérologique MAT.

6.2. Localisation géographique de la zone d'étude

Il était impossible de couvrir toute la wilaya de Blida, donc nous avons travaillé sur une région de la wilaya (figure 6.1).



Figure 6.1 : Zone d'étude.

Les sites choisis pour placer les pièges sont : Route de chréa (R-C), Bouarfa (B-A), Maramen (M-M), Route d'Oued Alleug (R-Alg), Sidi Yaakoub (S-Y), Centre ville de Blida (C-V), Ben Achour (B-Ach), Ouled Yaich (O-Y).



■ R-C
 ■ B-A
 ■ M-M
 ■ R-Alg
 ■ S-Y
 ■ C-V
 ■ B-Ach
 ■ O-Y

Figure 6.2 : Les différents sites de piégeage.

6.3. Population de rats étudiée

Population de rats des deux sexes et de tout âge existante dans la région de Blida pendant la période d'étude.

6.4. Définition du cas

Tout rat capturé présentant une culture positive, et/ou un titre en anticorps $\geq 1:20$ à au moins un sérotype par la technique MAT.

6.5. Echantillonnage

Echantillonnage aléatoire simple :

$$n = 3.84 \cdot q/p \cdot Pr^2 \quad [192].$$

z_{α} est le quantile de la loi normale centrée réduite correspondant à la probabilité $1-\alpha$. Le risque α correspond à la probabilité que la fréquence réelle de la population ne se trouve pas dans l'intervalle de confiance.

$$\alpha = 0.05, z_{\alpha} = 1.96$$

$$3.84 = z_{\alpha}^2, q = 1-p, p = \text{prévalence attendue}, Pr = \text{précision relative}$$

Si nous prenons comme $p = 7.3$, une séroprévalence trouvée en Tunisie en 1962 [193], $q = 92.7$, $Pr = 70$, donc $n = 100$.

6.6. Protocole de piégeage

6.6.1. Le choix des sites d'étude

Le choix des sites est guidé par les critères d'appréciations suivants :

- Accessibilité facile, et sécurité.
- Recevabilité des personnes et aide.
- Présence confirmée de rat.

6.6.2. Matériels de piégeage

Le choix s'est porté sur l'utilisation de cages piège à ressort, permettant une capture des animaux vivants, elles sont peu traumatisantes pour les animaux et ne présentent aucun danger lors de manipulation. Ces cages sont métalliques, leurs dimensions (environ $30 \times 15 \times 15$ cm), et sont adaptées aux rats. Pendant la période de piégeage 60 cages pièges ont été utilisées.

L'inconvénient de ce type de pièges, et qu'ils peuvent capturer d'autres petits animaux. Ils sont très sensibles et se ferment sous l'effet du vent. Ils coûtent chers, et ils risquent d'être dérobés lorsqu'ils sont placés dans des régions isolées.

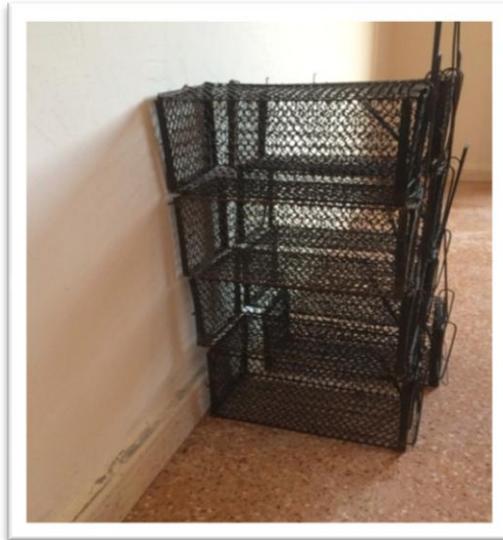


Figure 6.3 : Cages pièges à ressort (photo. Personelle).

6.6.3. Principes de piégeage et pose de pièges

- Les pièges ont été posés à la fréquence de 3 à 5 par maison ou par site.
- Les pièges doivent être installés à angle droit par rapport au mur, en veillant à ce que l'extrémité portant l'appât soit la plus rapprochée du mur.
- Les pièges sont déposés à la fréquence d'un piège par mètre le long des murs.
- Les pièges ont été laissés sur site pendant 3 ou 4 jours pour laisser le temps aux rats de s'habituer.
- Nous avons utilisé comme appât : le pain, le fromage, et le cachir.
- Les pièges ont été nettoyés après chaque capture avant d'être réutilisés.



Figure 6.4 : Piège sur site
(photo. Personelle).



Figure 6.5 : Rats capturés
(photo. Personelle).

6.7. Période de piégeage

Les captures ont débuté au mois de Septembre 2014 jusqu'au mois de Mai 2015.

6.8. Prélèvements et conservation

Les pièges ont été contrôlés chaque matin, et les rats capturés ont été transportés jusqu'au lieu d'examen avec un maximum de protection.

6.8.1. Anesthésie

Les rats sont anesthésiés par l'éther : la cage contenant le rat est mise dans un sachet avec un morceau du coton imbibé dans l'éther et bien fermé. Après 15 minutes environ l'animal perd conscience, à la sortie de la cage, il est d'abord pesé à l'aide d'une balance électronique en grammes, puis déposé face dorsale sur une planche à dissection, les membres étendus et épinglés.

6.8.2. Identification du sexe et de l'âge

Le sexe est déterminé par examen externe de l'animal, notamment par la position des orifices génitaux par rapport à l'anus. La femelle possède un clitoris développé et une fente génitale au dessus de l'anus. Par contre, chez les mâles le

pénis est nettement plus éloigné de l'anus. A noter que le scrotum couvre les testicules chez les mâles adultes. Néanmoins, les jeunes mâles ont leurs testicules à l'intérieur du corps et peuvent être confondus avec les jeunes femelles. La différenciation peut se faire en observant la distance entre l'anus et les organes génitaux, qui est plus grande chez les mâles que chez les femelles. Si l'identification ne peut être faite en utilisant des caractéristiques morphologiques externes, les organes sexuels internes doivent être observés à la fin de la dissection [194]. Il est à noter que dans le cas d'une femelle, s'il y'a présence d'une perforation à l'entrée du canal vaginal.



Figure 6.6 : Femelle perforée (photo. Personelle).



Figure 6.7 : Femelle vierge (photo. Personelle).

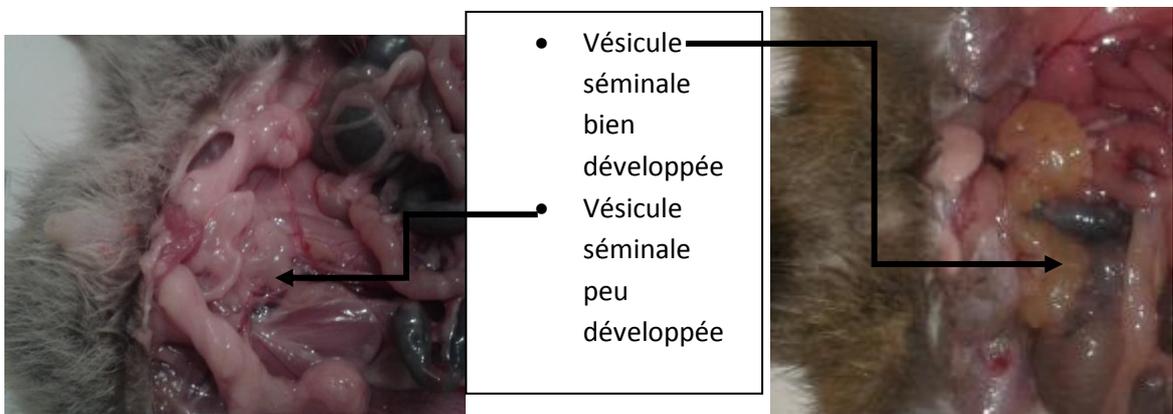


Figure 6.8 : Etat de développement de la vésicule séminale (photo. Personelle).



Figure 6.9 : Sac scrotal et pénis chez un mâle adulte (photo. Personelle).

L'estimation de l'âge est basée sur la croissance de la troisième molaire, et la perforation ou non de l'entrée vaginale chez la femelle, et l'état de croissance de la vésicule séminale chez le mâle.



Figure 6.10: Troisième molaire bien apparente (photo. Personelle).



Figure 6.11 : Troisième molaire partiellement apparente (photo. Personelle).

6.8.3. Prélèvement sanguin

Nous avons effectué un prélèvement de sang par ponction cardiaque avec seringue de 5cc pour les grands rats et de 2cc pour les rats petits sur tube sec sous vide numéroté, les tubes de sang ont été laissés à température ambiante de 6 à 10 heures afin d'obtenir une bonne rétraction du caillot puis centrifugés à 3000/min pendant 5mn. Les sérums ont été récupérés à la pipette et congelés à -20°C jusqu'à l'analyse.

6.8.4. Prélèvement d'organes

Après avoir désinfecté la région ventrale par l'alcool, la peau est soulevée au dessus de l'orifice urinaire et incisée avec des ciseaux, le foie et les reins sont récupérés dans des boites stériles, et acheminés au laboratoire (Institut Pasteur d'Alger) dans une glaçière.



Figure 6.12 : Prélèvement du foie
(photo. Personelle).



Figure 6.13 : Prélèvement rénal
(photo. Personelle).

6.9. Culture bactérienne

Nous avons choisi de faire la culture des deux organes (rein et foie) puisque la bactérie peut coloniser de façon préférentielle ces deux organes.

Le milieu utilisé dans notre étude est le milieu Ellinghausen-McCullough modifié par Johnson et Harris (EMJH) qui est le plus utilisé pour l'isolement et l'entretien de leptospires.

- Une partie de l'organe a été coupée stérilement en petits morceaux avec le bistouri dans une boite à pétri.

- Une petite quantité de chaque organe a étéensemencée dans un tube d'EMJH.
- Une dilution décimale de chaque tube a été effectuée.
- L'incubation est faite à 28-30°C à l'obscurité en raison de la sensibilité des leptospires à la lumière.
- Une observation hebdomadaire des cultures au microscope à fond noir au grossissement ($\times 10$) a été effectuée.
- Une goutte de culture sur lame sous microscope à fond noir a permis de reconnaître les leptospires par leur morphologie (filaments fins), et surtout grâce à leur mobilité (rotation, flexion, translation).
- Les cultures contaminées sont filtrées sur membranes de porosité 0.45 μm et 0.22 μm avant d'être repiquées sur milieu EMJH.
- Les cultures positives sont reconnues par la présence d'un trouble vu à l'œil nu mais obligatoirement confirmées par une observation au microscope à fond noir.
- Si des leptospires sont présents, un repiquage de la culture a été effectué.
- Un délai d'observation de deux mois est nécessaire avant de conclure la négativité de la culture.

6.10. La sérologie par le MAT

La présence d'anticorps sériques anti-*Leptospira* a été recherchée par la procédure standard du test d'agglutination microscopique (MAT).

Les tests sérologiques ont été réalisés au laboratoire des Leptospires à l'Institut Pasteur d'Alger, par le test d'agglutination microscopique. Un total de 24 souches de leptospires correspondant à 23 souches vivantes de leptospires pathogènes de référence et 1 souche saprophyte (*L. biflexa* sérovar patoc) est utilisé comme antigène pour l'analyse MAT.

Tableau 6.1 : Les sérovars utilisés pour le MAT.

sérogroupe	sérovars	Abréviation
Australis	Australis	Aust
Autumnalis	Autumnalis	Autu
Bataviae	Bataviae	Bat
Canicola	Canicola	Can
Ballum	Castellonis	Cast
Cynopteri	Cynopteri	Cyno
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Grip
Hebdomadis	Hebdomadis	Heb
Sejroe	Sejroe Hardjo	Sej Hardj
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae verdun	Ict Ihv
Panama	Panama	Pan
Louisiana	Louisiana	Loui
Pomona	Pomona	Pom
Pyrogenes	Pyrogenes	Pyr
Tarassovi	Tarassovi	Tar
Celledoni	Celledoni	Cell
Djasiman	Djasiman	Dja
Mini	Mini	Mini
Sarmin	Sarmin	Sar
Shermani	Shermani	Sher
Javanica	Javanica	Jav
Hebdomadis	Hebdomadis	Heb
Semarang	Patoc	Pat

Les critères d'interprétation sont les suivants :

Le seuil de positivité a été fixé de 1 :20.

Le titre obtenu pour chaque sérovar correspond à l'inverse de la dernière dilution agglutinant encore 50% des leptospires. La dilution de base pour le sérum est au 1/10^{ème} soit au 1/20^{ème} après rajout de la souche testée.

Les titres inférieurs d'au moins 2 dilutions à la plus forte dilution positive ont été considérés comme des réactions de coagglutination.

Donc nous définissons un sérovar comme infectant s'il est le seul contre lequel le sérum testé a réagi, ou lorsqu'il s'agit du sérovar pour lequel le titre d'anticorps est le plus élevé, avec au moins deux dilutions d'écart.

Les souches ont été cultivées en milieu Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) à 30°C, à l'obscurité et utilisées comme antigènes lorsque les

cultures étaient âgées de 4-10 jours, et la densité est de $2-4 \times 10^8$ leptospires/ml, (cette densité est évaluée au microscope à fond noir). Avant utilisation les souches ont été diluées à 1/2 pour avoir une densité de $1-2 \times 10^8$ leptospires/ml.

Dans un premier temps nous avons fait un screening des sérums à la dilution de 1:20. Les sérums montrant une agglutination à cette dilution ont ensuite été dilués au demi et testés pour des dilutions allant de 1:40 à 1:5120. Les sérums sont dilués avec une solution tampon Sorensen.

La méthode consiste à mélanger des volumes égaux d'une série de dilutions de sérum avec une culture de leptospire.

Le MAT s'est déroulé donc en deux étapes : le groupage (ou MAT qualitatif) et le titrage (MAT quantitatif).

La première étape du MAT est le groupage :

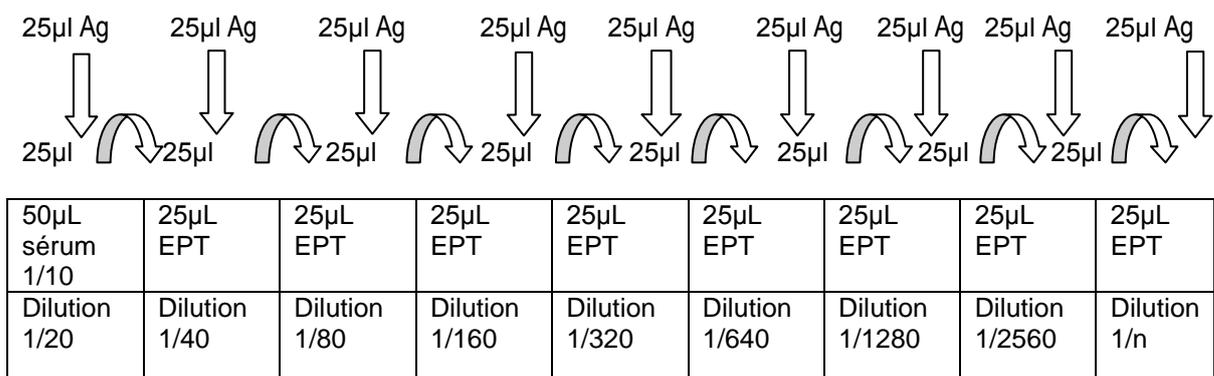
- 1) Un témoin négatif est réalisé pour chaque sérovar, avec 25 μ L de l'eau physiologique tamponnée.
- 2) 25 μ L des sérums dilués au 1 :10^{ème} sont placés dans les puits des plaques identifiées en lignes.
- 3) Dans chaque puits, 25 μ L des différentes souches de leptospires à tester sont déposés dans les colonnes correspondantes. Les sérums testés sont ainsi dilués au 1 :20^{ème}.
- 4) Les plaques sont ensuite agitées quelques secondes, puis placées en incubation pendant 1h à 37°C.
- 5) Les plaques sont ensuite lues au microscope à fond noir. Chaque sérum testé est comparé au témoin négatif. Un sérum est considéré comme étant positif pour un sérovar si au moins 50% d'agglutination est observée pour ce sérovar.

Tableau 6.2 : Le MAT qualitatif.

	Antigène 1 (Ag1)	Antigène 2 (Ag2)	Antigène 3 (Ag3)	Antigène n (Ag n)
Antigène Control	25µLEPT+25µLAg1	25µLEPT+25µLAg2	25µLEPT+25µLAg3	25µLEPT+25µLAgn
Sérum 1	25µLAg1+25µsérum 1	25µLAg2+25µsérum 1	25µLAg3+25µsérum 1	25µLAgn+25µsérum 1
Sérum 2	25µLAg1+25µsérum 2	25µLAg2+25µsérum 2	25µLAg3+25µsérum 2	25µLAgn+25µsérum 2
Sérum 3	25µLAg1+25µsérum 3	25µLAg2+25µsérum 3	25µLAg3+25µsérum 3	25µLAgn+25µsérum 3
Sérum 4	25µLAg1+25µsérum 4	25µLAg2+25µsérum 4	25µLAg3+25µsérum 4	25µLAgn+25µsérum 4
Sérum x	25µLAg1+25µsérum x	25µLAg2+25µsérum x	25µLAg3+25µsérum x	25µLAgn+25µsérum x

La seconde étape du MAT est le titrage. Il n'est réalisé que pour les sérums positifs lors du groupage :

Chaque sérum subit une dilution en cascade dans une microplaque : plusieurs dilutions successives sont réalisées à partir du sérum dilué au 1 :10^{ème}. Chacune des dilutions des sérums à titrer sont mises en contact avec les sérovars pour lesquels ils étaient positifs lors du groupage. Les plaques sont ensuite placées à 37°C pendant 1h, puis sont lues au microscope à fond noir.

**Figure 6.14 : Le MAT quantitatif.**

6.11. Analyses statistiques

Différents facteurs de risque ont été testés en fonction des résultats obtenus.

- Sexe,
- Catégorie d'âge,
- Lieu de capture,
- Mois, saisons.

Le calcul de l'intervalle de confiance : $IC = P \pm Z_{\alpha} \sqrt{P Q/N}$

Avec P est la fréquence observée, $Q = 1-P$, N est l'effectif de l'échantillon, le risque α est fixé à 5%, $Z_{\alpha} = 1.96$

-Le risque α est fixé à 5% lors de l'utilisation des tests statistiques (test du Kh2, test exact de Fisher, la régression logistique, et l'estimation de l'intervalle de confiance).

L'ensemble des données a été traité sous Excel® 2010. La concordance entre les différentes variables a été évaluée par la réalisation du test statistique Chi² de Pearson, et le test exact de Fisher à l'aide du logiciel STATISTICA (StatSoft®), version 6.

CHAPITRE 7

RESULTATS ET DISCUSSION

7.1. Bilan de capture

100 rats ont été capturés au cours de la période de piégeage, ces animaux ont été pesés, sexés et prélevés.

7.2. Structure de la population de rat

7. 2.1. Etude du sexe-ratio

Sur les 100 rats sexés de l'échantillon, 47 sont des mâles et 53 sont des femelles, ce qui donne un sexe ratio de 0.887 mâles/femelles.

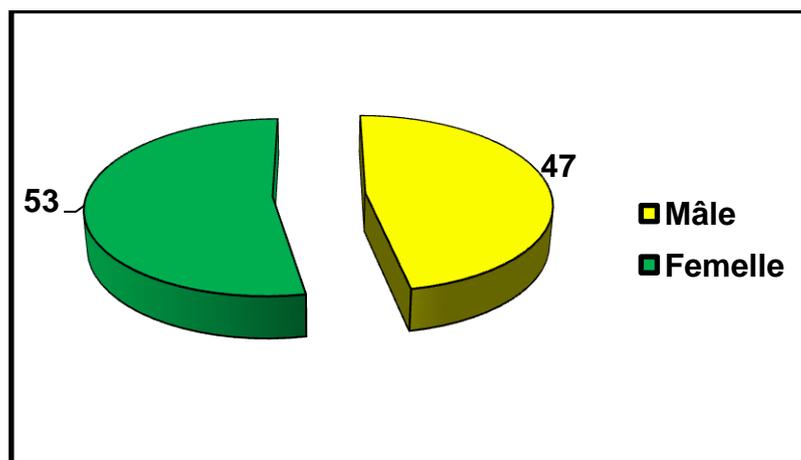


Figure 7.1 : Répartition des deux sexes dans la population.

7.2.2. Distribution de la population en fonction de l'âge

Parmi les 100 rats capturés 73 sont des adultes et 27 des subadultes. Parmi les adultes 40 sont des femelles et 33 des mâles. Parmi les subadultes 14 sont des femelles et 13 sont des mâles.

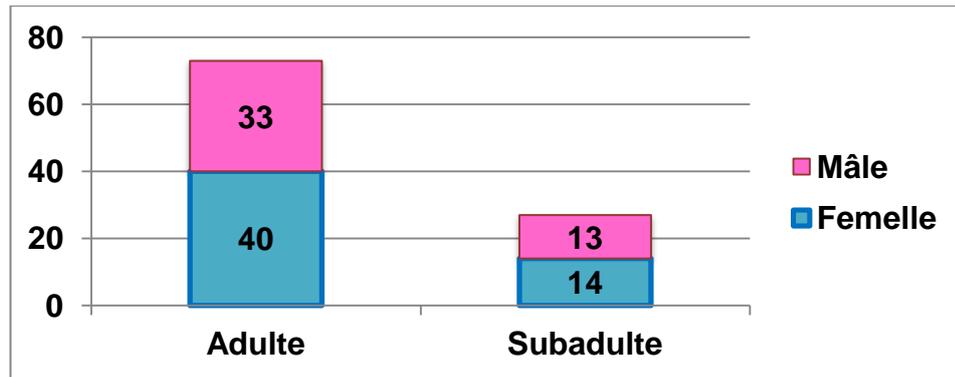


Figure 7.2 : Répartition des classes d'âge dans la population des rats.

7.2.3. Distribution de la population en fonction du mois

Le nombre de rats capturés est différent en fonction du mois, 13 rats ont été capturés en mois de septembre, 11 en mois d'octobre, 5 en novembre, 12 en décembre, 8 en janvier, 6 en février, 16 en mars, 25 en mois d'avri, et finalement, 4 en mois de mai.

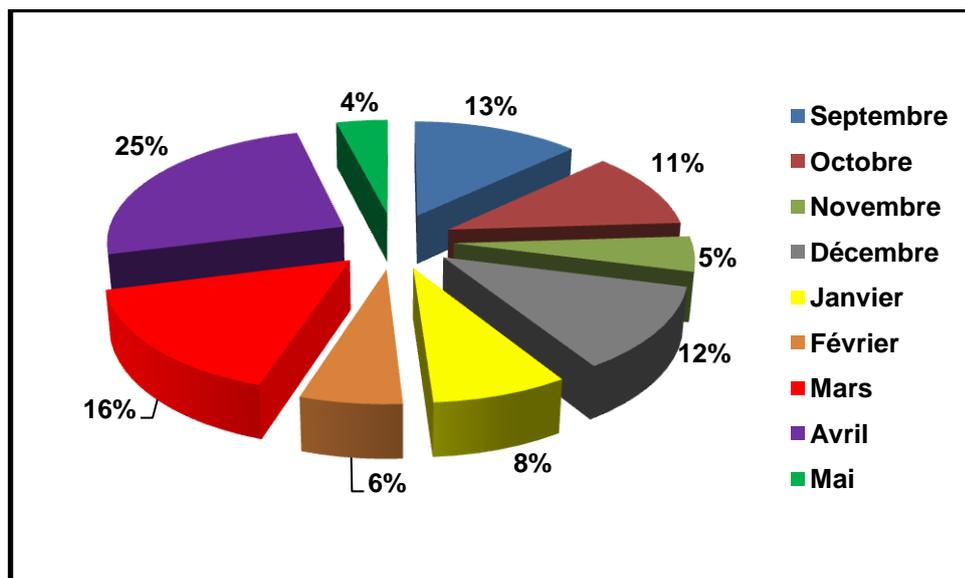


Figure 7.3 : Répartition de la population en fonction du mois.

7.2.4. Distribution de la population en fonction du lieu de capture

Dans la région de Bouarfa, 21 rats ont été capturés, à Maramen, 10 rats ont été capturés, 12 rats dans la région de Route de chréa, 5 au Centre ville de Blida, 7 autres à Sidi Yaakoub, 29 à Ben Achour, 6 à Route d'Oued Alleug, et finalement 10 à Ouled Yaich.

Tableau 7.1 : Répartition de la population en fonction des différents sites de capture.

Lieu	B-A	MM	R-C	C-V	S-Y	B- Ach	R-Alg	O-Y
Rats capturés	21	10	12	5	7	29	6	10
Pourcentage	21%	10%	12%	5%	7%	29%	6%	10%

B-A : Bou Arfa, MM : Maramen, R-C : Route de Chréa, C-V : Centre Ville, S-Y : Sidi Yaakoub, B-Ach : Ben Achour, R-Alg : Route de Oued Alleug, O-Y : Ouled Yaich.

7.3. Etude de la séroprévalence

7.3.1. Séroprévalence globale

Les analyses sérologiques réalisées ont montré que 43 animaux sur 100 se sont révélés positifs pour au moins un des sérovars de *Leptospira* testés à partir d'un titre seuil de 1 :20, ce qui correspondait à une séroprévalence globale de 43% (tableau 7.2).

Les réactions positives étaient souvent nombreuses pour chaque sérum, au total 94 réactions positives ont été relevées.

Tableau 7.2 : Séroprévalence globale.

N	N positifs	Séroprévalence (%)	IC95% de la séroprévalence
100	43	43%	33.3-52.7

N : effectif de l'échantillon. IC : Intervalle de Confiance

7.3.1.1. Résultats sérologiques en fonction du sexe

Sur les 43 rats séropositifs, 22 rats sont des femelles, 21 sont des mâles, les mâles semblaient donc aussi touchés que les femelles.

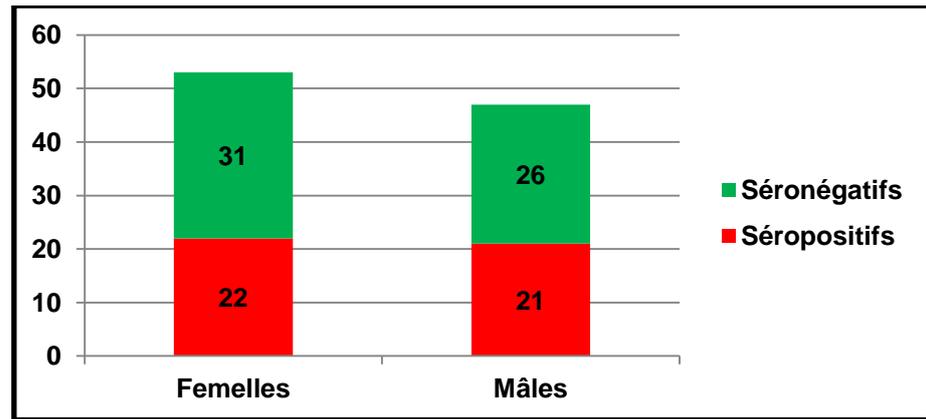


Figure 7.4 : Résultats sérologique en fonction du sexe.

La proportion dans le lot des femelles était de 41.51% (22/53) contre 44.68% (21/47) pour le lot mâle.

Tableau 7.3 : Répartition des proportions des séropositifs en fonction du sexe.

	N	Positifs	Négatifs	Proportions (%)
Femelle	53	22	31	41.51%
Mâle	47	21	26	44.68%

Le test Chi² de Pearson donne un $p = 0,749182$, donc il n'existe pas une relation significative entre la séropositivité et le sexe.

7.3.1.2. Résultats sérologiques en fonction de l'âge

L'infection en fonction de l'âge est étudiée en calculant la proportion parmi les deux classes d'âge identifiée, elle est de 43.83% (32/73) pour la classe des adultes, et de 40.74% (11/27) pour la classe des subadultes.

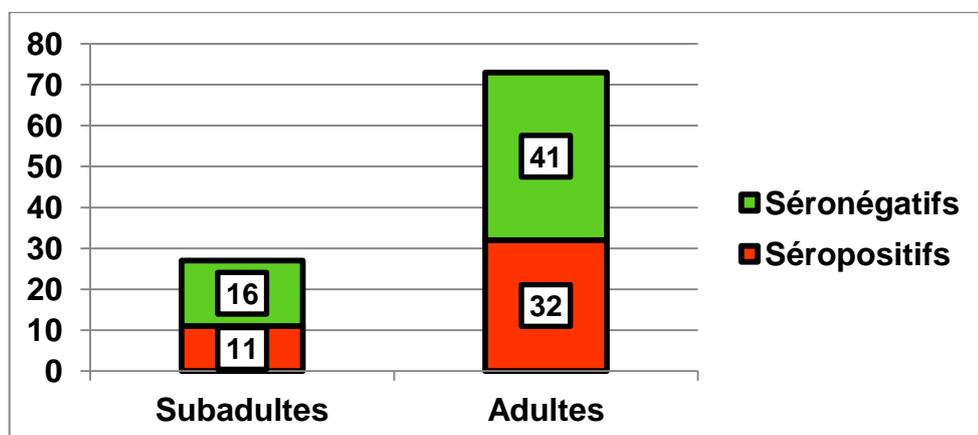


Figure 7.5 : Résultats sérologique en fonction de l'âge.

Le test Chi² de Pearson réalisé à partir des résultats ci-dessus ne montre pas d'influence significative de l'âge sur la séropositivité des rats ($p=0,781371$).

Tableau 7.4 : Proportions des séropositifs en fonction de l'âge.

	N	Séropositifs	Séronégatifs	Proportions(%)
Subadulte	27	11	16	40.74%
Adulte	73	32	41	43.83%

7.3.1.3. Résultats sérologiques en fonction du lieu de capture

Sur les 43 rats séropositifs, 6 provenaient de la région de Bouarfa, 5 de Maramen, 9 de la région de Route de chréa, 3 du Centre ville de Blida, 3 autres de Sidi Yaakoub, 10 de Ben Achour, et finalement 7 de la région d'Ouled Yaich.

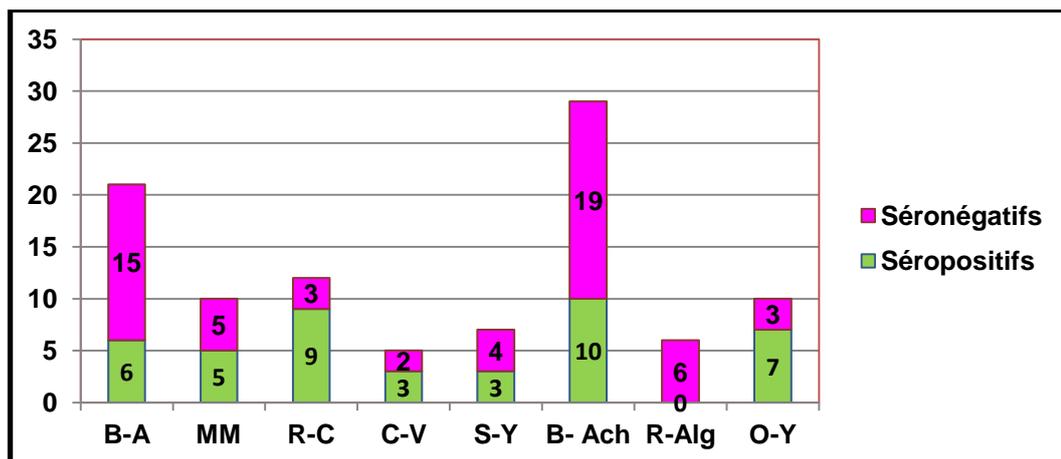
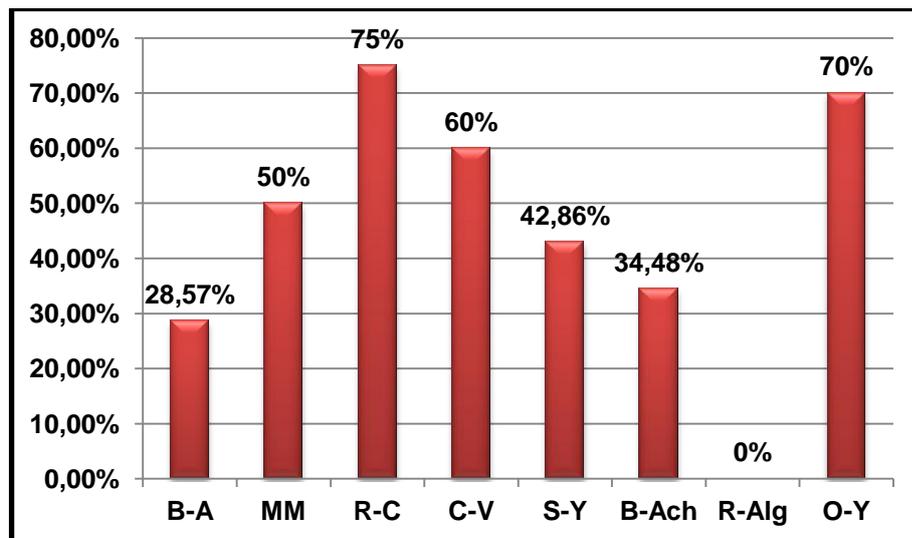


Figure 7.6 : Résultats sérologique en fonction du lieu de capture.

La proportion la plus élevée est enregistrée dans la région de Route de Chréa 75% (9/12), suivie par la région d'Ouled Yaich 70% (7/10), Centre Ville 60% (3/5), Maramen 50% (5/10), Sidi Yaakoub 42.86% (3/7), Ben Achour 34.48% (10/29), Bouarfa 28.57% (6/21), et enfin la Route de Oued Alleug 0% (0/6), (figure 7.7).

Tableau 7.5 : Proportions des séropositifs en fonction du lieu de capture.

Lieu de capture	B-A	MM	R-C	C-V	S-Y	B-Ach	R-Alg	O-Y
Total	21	10	12	5	7	29	6	10
Séropositifs	6	5	9	3	3	10	0	7
Séronégatifs	15	5	3	2	4	19	6	3
Proportions %	28.57	50	75	60	42.86	34.48	0	70

**Figure 7.7** : Séroprévalence en fonction du lieu de capture.

Pour avoir des résultats interprétables (au moins 80% des cellules où les effectifs théoriques sont ≥ 5), et une bonne comparaison entre les régions, les régions qui sont proches ont été groupées dans une seule classe, il s'agit de la région de Sidi yaakoub avec le Centre Ville, et la région de Maramen avec Route de Oued Alleug (tableau 7.6).

Tableau 7.6 : Proportions des différentes régions après regroupement.

Régions	B-A	MM+RAlg	R-C	C-V+S-Y	B-Ach	O-Y
Séropositifs	6	5	9	6	10	7
Séronégatifs	15	11	3	6	19	3
Total	21	16	12	12	29	10
Proportions%	28.57%	31.25%	75%	50%	34.48%	70%

Le test de χ^2 donne un $p=0.038$, montrant une différence significative de séropositivité entre les régions.

La régression logistique, avec un modèle de référence créé à partir de la région de Ben Achour qui compte le plus d'échantillon et dont la séroprévalence (34.48%) est comprise dans l'intervalle de confiance de l'estimation de la séroprévalence de la population étudiée, nous a confirmé cette différence, et que la région de Route de Chréa compte le plus d'animaux infectés, $p=0.024$ et $OR=5.7$; $IC\ 95\% [1.25-25.92]$.

7.3.1.4. Résultats sérologiques en fonction du mois de prélèvement

Sur les 43 sérums positifs, 4 provenaient des animaux capturés en mois de septembre, 4 en mois d'octobre, 1 en novembre, 12 en décembre, 5 en janvier, 1 en février, 9 en mars, et finalement 7 en mois d'avril.

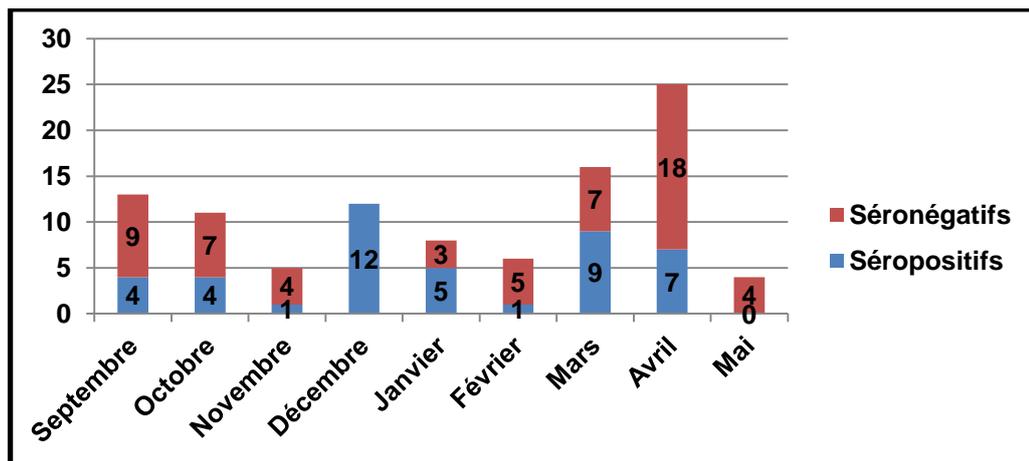
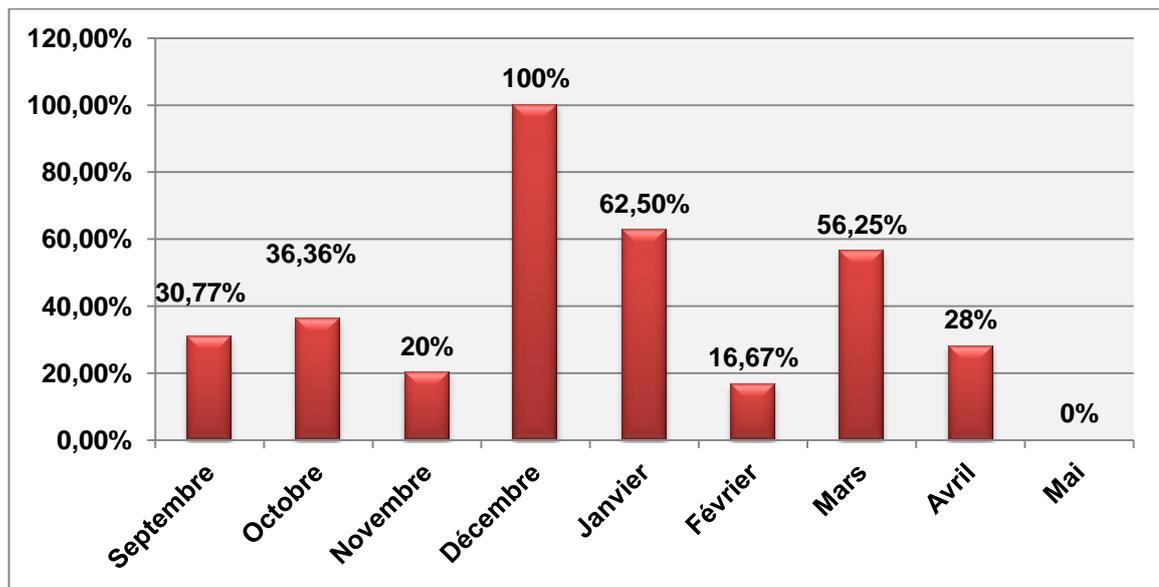


Figure 7.8 : Résultats sérologique en fonction du mois.

La proportion la plus élevée est enregistrée au cours du mois de décembre 100% (12/12), suivie par le mois de janvier 62.5% (5/8), mars 56.25% (9/16), octobre 36.36% (4/11), septembre 30.77% (4/13), avril 28% (7/25), novembre 20% (1/5), février 16.67% (1/6), et enfin le mois mai 0% (0/4), (figure 7.9).

Tableau 7.7 : Proportions des séropositifs en fonction du mois.

Mois	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai
Séropositifs	4	4	1	12	5	1	9	7	0
Séronégatifs	9	7	4	0	3	5	7	18	4
Total	13	11	5	12	8	6	16	25	4
Proportion%	30,77	36,36	20	100	62,5	16,67	56,25	28	0

**Figure 7.9** : Proportions des positifs en fonction des mois.

La quantité de pluie la plus élevée a été enregistrée en mois de décembre (156 mlm), et la plus faible en mois de mai (0 mlm).

Tableau 7.8 : Quantité de pluie en millimètres enregistrée par mois [195].

Mois	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai
2014/2015	34,8	33,3	54,2	156	118,7	86,3	96,7	0	21,1

Le test de corrélation donne un $r=0.637 \neq 1$ (figure 7.10), la séroprévalence est moyennement corrélée avec la pluviométrie par mois.

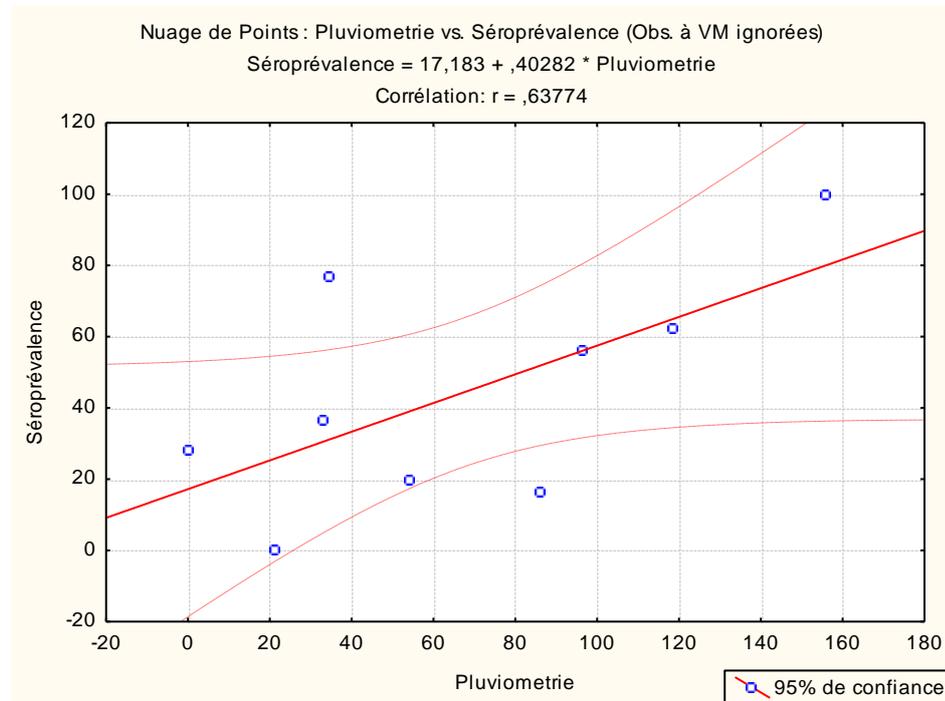


Figure 7.10 : Évolution de la séroprévalence en fonction de la pluviométrie par mois.

En revanche si nous regroupons les mois, et travaillons par saison (figure 7.11), une très bonne corrélation est enregistrée entre la séroprévalence et la pluviométrie $r=0.992 \approx 1$.

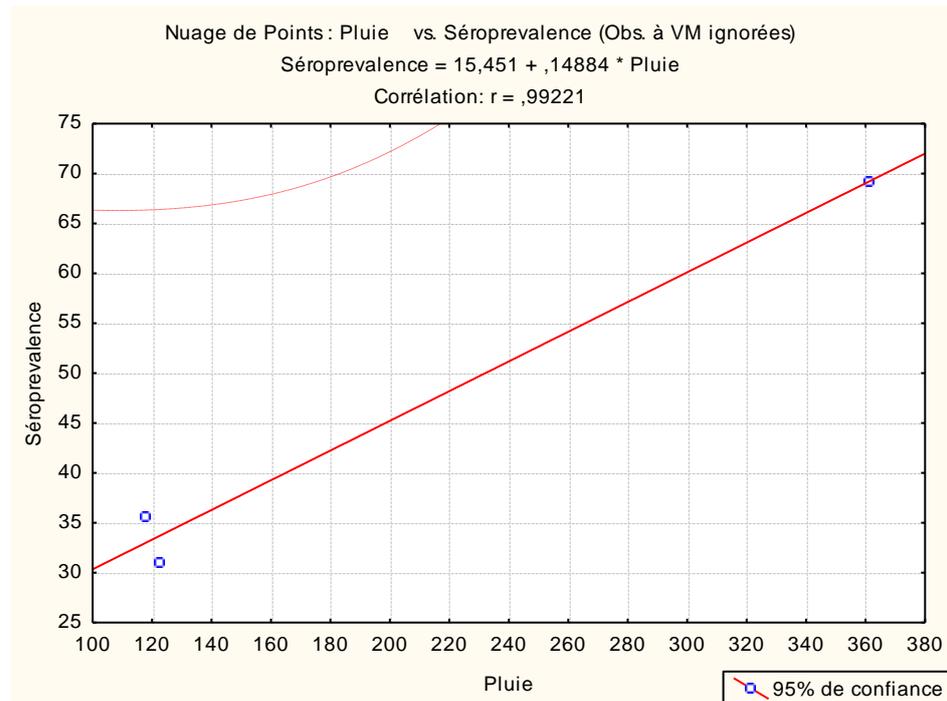


FIGURE 7.11 : Évolution de la séroprévalence en fonction de la pluviométrie par saison.

Le test Chi² de Pearson réalisé donne un $p= 0.0067$, une différence dite significative entre les trois saisons est donc enregistrée. Par ailleurs, la régression logistique montre en prenant le printemps comme référence, qu'il y'a une différence entre le printemps et l'hiver $p=0.0076$, $OR=4.07$; IC 95% [1.45-11.45], cela signifie que pendant l'hiver les animaux étaient 4 fois plus infectés qu'au printemps, alors qu'aucune différence n'a été enregistré entre l'automne et le printemps $p=0.69$, $OR= 0.81$; IC 95% [0.3-2.21].

Tableau 7.9 : Séropositifs par saison et quantité de pluie correspondante.

	Septembre+ Octobre+Novembre (Automne)	Decembre+ Janvier+Février (Hiver)	Mars+ Avril+Mai (Printemps)
Séropositifs	9	18	16
Séronégatifs	20	8	29
Total	29	26	45
Proportions %	31.03%	69.23%	35.56%
Quantité de pluie (mlm)	122.3	361	117.8

7.4. Résultats sérologiques par sérovar

L'étude par sérovar a permis de mettre en évidence plusieurs cas de figures : les sérums positifs à un seul et unique sérovar, les sérums positifs à plusieurs sérovars mais avec la présence d'un sérovar dominant, et les sérums positifs à plusieurs sérovars sans pouvoir identifier un sérovar dominant.

Parmi les 43 séropositifs, 20 rats réagissaient contre un seul et unique sérovar (soit $20/43=46.5\%$) : 3 rats pour Australis, 3 rats pour Icterohaemorrhagiae verdun, 2 rats pour Icterohaemorrhagiae, 2 rats pour Grippytyphosa, 2 rats pour Sarmin, 2 rats pour Panama, un rat pour Autumnalis, un rat pour Bataviae, 1 rat pour Castellonis, un rat pour Mini, un rat pour Shermani, et enfin un rat pour Louisiana.

Nous avons identifié 12 rats réagissant positivement à plusieurs sérovars avec sérovar dominant (soit $12/43=27.9\%$) : 5 rats pour Icterohaemorrhagiae verdun, 5 rats pour Canicola, un rat pour Louisiana, et un rat pour Sejroe.

Enfin, 11 rats dont les sérums contenaient des anticorps dirigés contre plusieurs sérovars à des titres ne permettant pas de déterminer un sérovar prédominant (soit $11/43=25.6\%$).

Sur l'ensemble des 94 réactions positives obtenues avec le test MAT, il était possible d'obtenir la proportion par sérovar. Le sérovar Icterohaemorrhagiae verdun représentait 14.89% ($14/94$) des réactions positives, le sérovar Canicola 9.57% ($9/94$), les sérovars Sarmin et Panama représentaient chacun 8.51% ($8/94$) des réactions positives, le sérovar Icterohaemorrhagiae 7.45% ($7/94$), les sérovars Bataviaie et Mini chacun 6.38% ($6/94$), les sérovars Grippytyphosa, Pomona, Pyrogenes, Sejroe et Tarassovi représentaient chacun 4.25% ($4/94$), les sérovars Australis, Louisiana et Patoc chacun 3.2% ($3/94$), les sérovars Cynopteri Shermani et Automnalis chacun 2.13% ($2/94$), et enfin le sérovar Castellonis représente 1.06% .

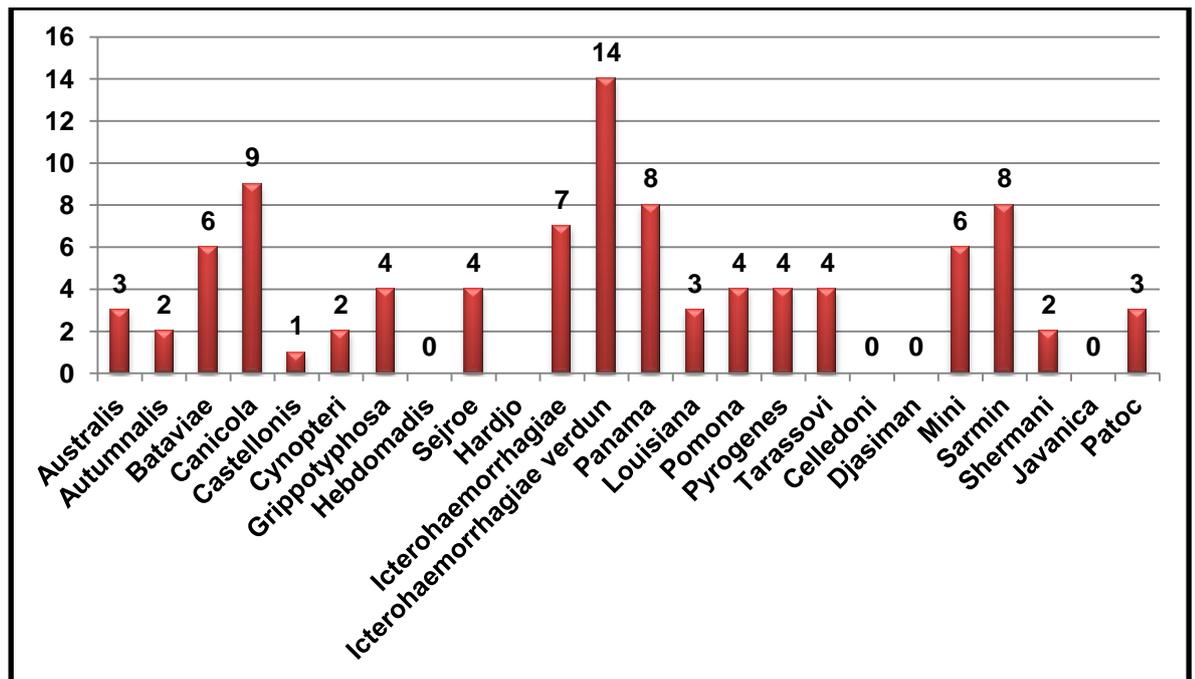


Figure 7.12 : Nombre de réponses positives. (Pour toutes les réactions positives n=94).

Il était parfois possible d'identifier un sérovar infectant. On définit un sérovar comme infectant s'il est le seul contre le quel le sérum testé a réagi, ou lorsqu'il s'agit du sérovar pour le quel le titre d'anticorps était le plus élevé, avec au moins deux dilutions d'écart.

Au total, sur les 43 rats séropositifs, 74.4% (n=32) présentaient un sérovar infectant identifié. En rapportant ces données à la population totale des rats étudiés (n=100), nous trouvons un sérovar infectant chez 32% des rats (n=32).

Parmi les 32 sérums positives permettant d'identifier un sérovar infectant, les proportions des sérovares étaient : Icterohaemorrhagiae verdun 25% (8/32), Canicola 15.625% (5/32), Australis 9.4% (3/32), les sérovares Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Panama, Sarmin, et Louisiana représentaient chacun 6.25% (2/32), enfin les sérovares Autumnalis, Bataviae, Sejroe, Castellonis, Mini, et shermani représentaient aussi chacun 3.125% (1/32).

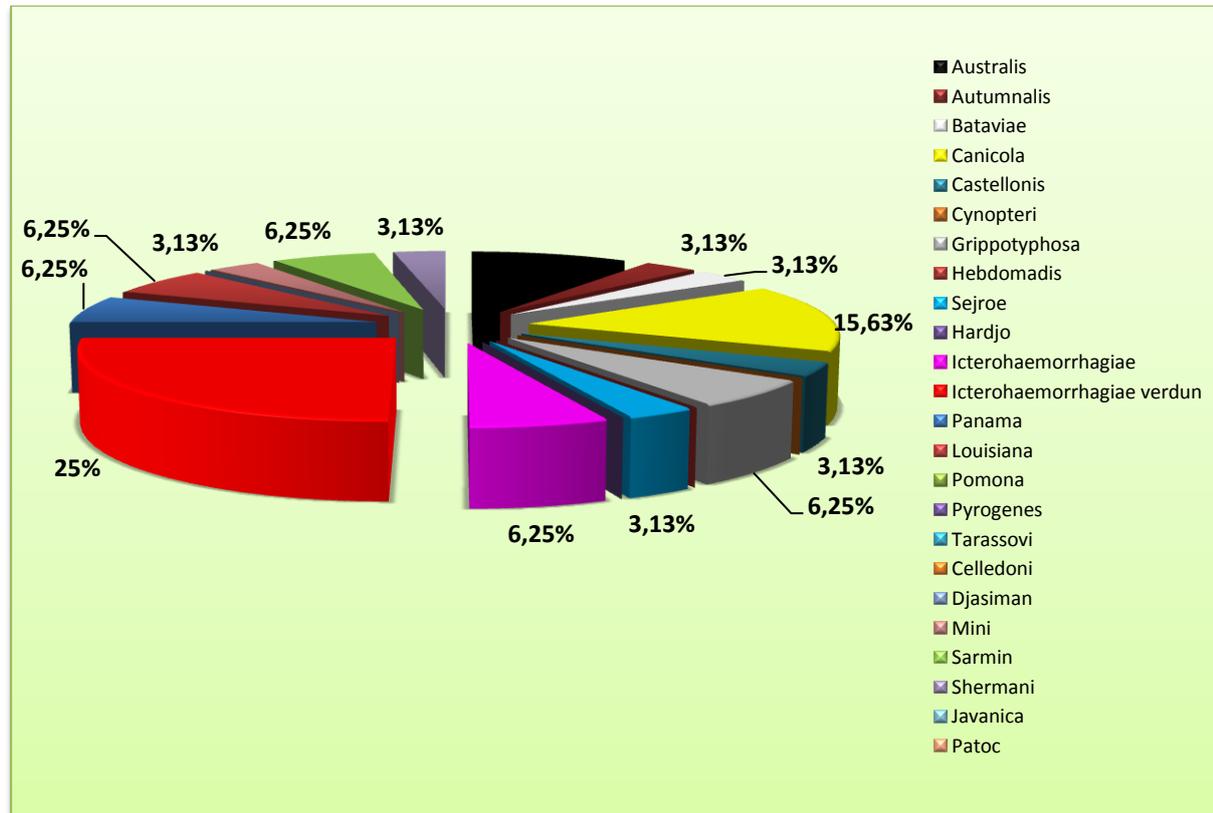


Figure 7.13 : Proportions des sérovats infectants (Pour les réactions significatives n=32).

En rapportant ces résultats à l'ensemble de la population testée (n=100), nous trouvons les proportions des sérovats comme suivant : Icterohaemorrhagiae verdun 8% (8/100), Canicola 5% (5/100), Australis 3% (3/100), les sérovats Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Panama, Sarmin, et Louisiana représentaient chacun 2% (2/100), enfin les sérovats Autumnalis, Bataviae, Sejroe, Castellonis, Mini, et shermani représentaient chacun aussi 1% (1/100).

Tableau 7.10 : Résultats sérologiques en fonction des sérovars testés.

Sérogroupe	Sérovar	Total des réponses positives	Taux globaux par sérovar*	Total des réponses dominantes	Taux des sérovars infectants**
Australis	Australis	3	3.2	3	9.4
Autumnalis	Autumnalis	2	2.13	1	3.125
Bataviae	Bataviae	6	6.38	1	3.125
Canicola	Canicola	9	9.57	5	15.625
Ballum	Castellonis	1	1.06	1	3.125
Cynopteri	Cynopteri	2	2.13	0	0
Grippotyphosa	Grippotyphosa	4	4.25	2	6.25
Hebdomadis	Hebdomadis	0	0		
Sejroe	Sejroe	4	4.25	1	3.125
	Hardjo	0	0	0	0
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	7	7.45	2	6.25
	Icterohaemorrhagiae verdun	14	14.89	8	25
Panama	Panama	8	8.51	2	6.25
Louisiana	Louisiana	3	3.2	2	6.25
Pomona	Pomona	4	4.25	0	0
Pyrogenes	Pyrogenes	4	4.25	0	0
Tarassovi	Tarassovi	4	4.25	0	0
Celledoni	Celledoni	0	0	0	0
Djasiman	Djasiman	0	0	0	0
Mini	Mini	6	6.38	1	3.125
Sarmin	Sarmin	8	8.51	2	6.25
Shermani	Shermani	2	2.13	1	3.125
Javanica	Javanica	0	0	0	0
Semarang	Patoc	3	3.2	0	0

* : calculé en divisant le nombre total de réactions positives pour le sérovar par le nombre total de réactions positives (n=94).

** : réactions positives à un seul sérovar, ou à plusieurs sérovars avec un écart de deux dilutions entre deux sérovars.

*** : calculé en divisant le nombre de réponses dominantes pour le sérovar par le nombre total de réponses positives avec un sérovar dominant (n=32)

7.5. Résultats sérologiques par séro groupe

Parmi les 43 rats séropositifs, 32 rats 74.4% (n=32) présentaient un séro groupe infectant identifié. En rapportant ces données à la population totale des rats étudiés (n=100), nous avons trouvé un séro groupe infectant chez 32% des rats (n=32).

Parmi ces 32 sérums, 31.25% (10/32) réagissaient contre le séro groupe Icterohaemorrhagiae, soit 23.26% du total des sérums positifs (n=43), et 10% sur l'ensemble de la population testée (n=100). 15.625% (5/32) de ces sérums réagissaient contre le séro groupe Canicola, soit 11.23% du total des sérums positifs, et 5% sur l'ensemble de la population testée. Le séro groupe Australis représentait 9.4% des sérums présentant un séro groupe infectant (3/32), soit 6.98% du total des résultats positifs (3/43), et 3% (3/100) de la population testée. Les séro groupes Grippytyphosa, Panama, Sarmin, et Louisiana représentaient chacun 6.25% (2/32) des sérums significatives, soit 4.65% des résultats positifs totales (n=43), et 2% sur l'ensemble de la population testée (n=100), enfin les sérovars Automnalis, Bataviae, Sejroe, Ballum, Mini, et shermani représentaient chacun 3.125% (1/32) des résultats significatives, et 2.32% du total des sérums positives et 1% (1/100) du total de la population testée.

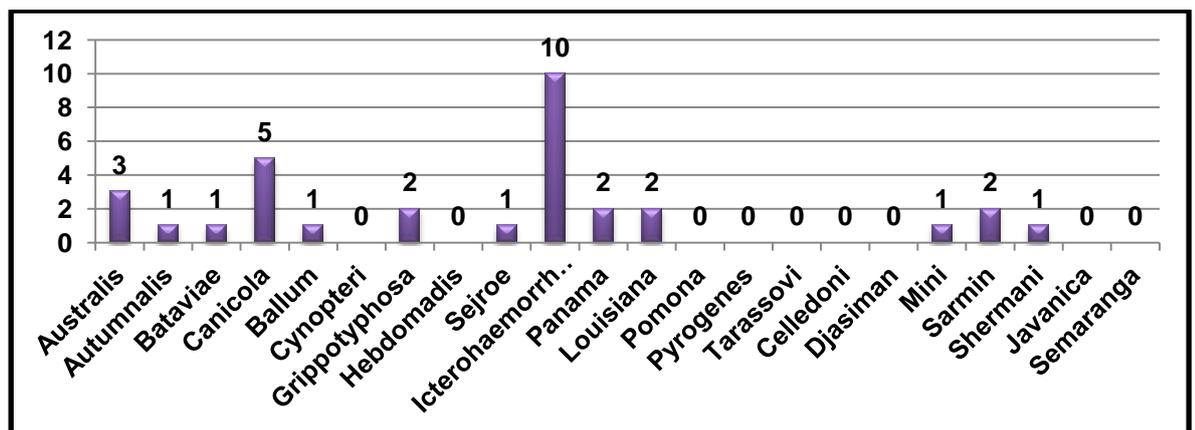


Figure 7.14 : Nombre de sérums positifs par séro groupe (seules les réactions significatives sont comptées n=32).

Le tableau suivant nous indique le nombre de sérums positifs en MAT, seules les réactions permettant d'identifier un sérotype infectant sont prises en considération.

Tableau 7.11 : Nombre de sérums positifs par sérotype (n=32).

Sérotype	Nombre de sérums positifs	Taux des sérotypes infectants*
Australis	3	9.4
Autumnalis	1	3.125
Bataviae	1	3.125
Canicola	5	15.625
Ballum	1	3.125
Cynopteri	0	0
Grippotyphosa	2	6.25
Hebdomadis	0	0
Sejroe	1	3.125
Icterohaemorrhagiae	10	31.25
Panama	2	6.25
Louisiana	2	6.25
Pomona	0	0
Pyrogenes	0	0
Tarassovi	0	0
Celledoni	0	0
Djasiman	0	0
Mini	1	3.125
Sarmin	2	6.25
Shermani	1	3.125
Javanica	0	0
Semarang	0	0

* : en divisant le nombre de réponses significatives pour le sérotype sur le nombre total de réponses positives avec un sérotype dominant (n=32).

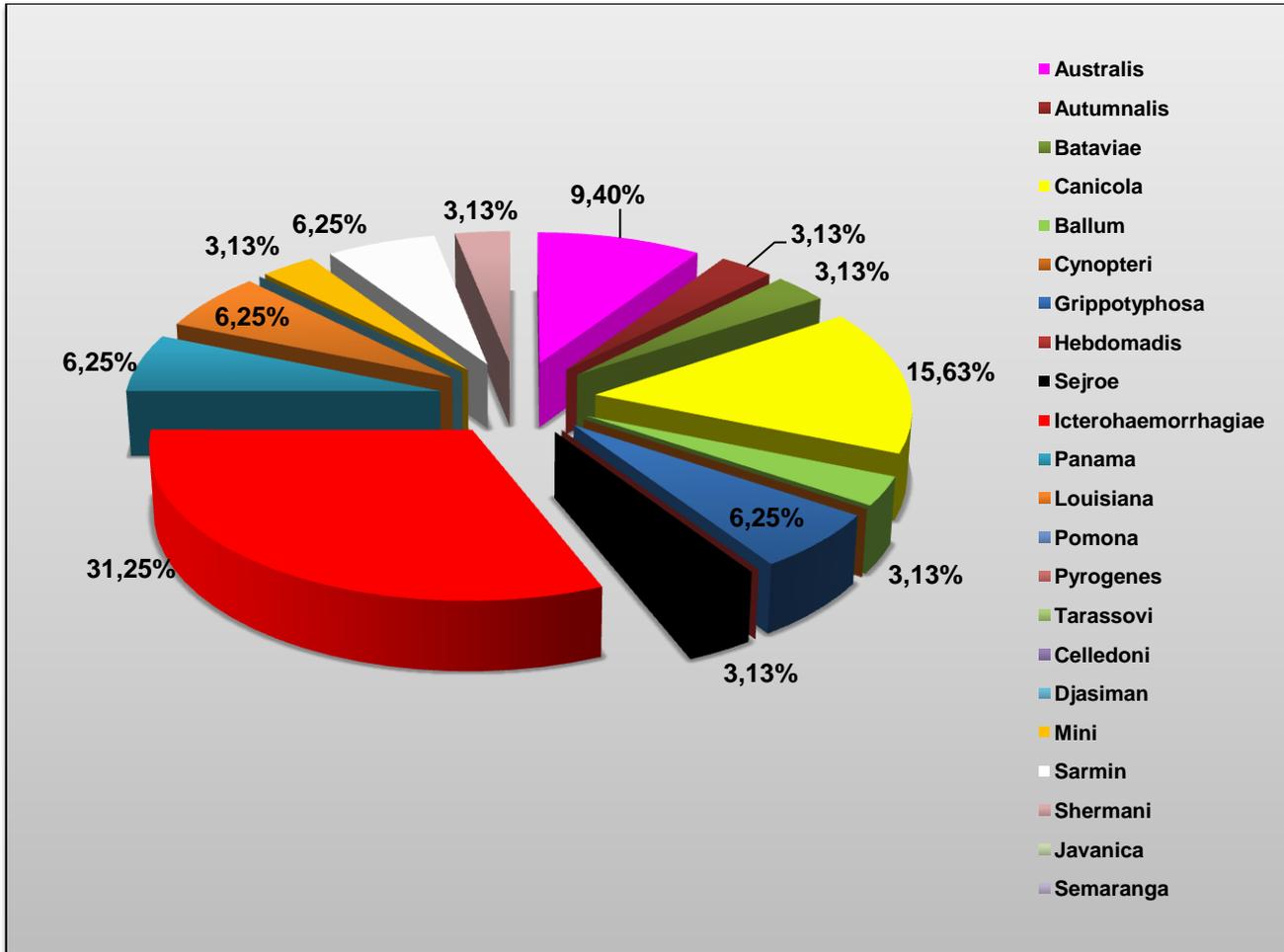


Figure 7.15 : Proportions des différents sérogroupes infectants (n=32).

Le test de corrélation effectué entre les résultats du MAT par séroroupe chez les rats, et les résultats du MAT par séroroupe chez les humains (Tableau 5.2 [179]), montre une bonne corrélation, $r = 0.9 \approx 1$ (figure 7.16).

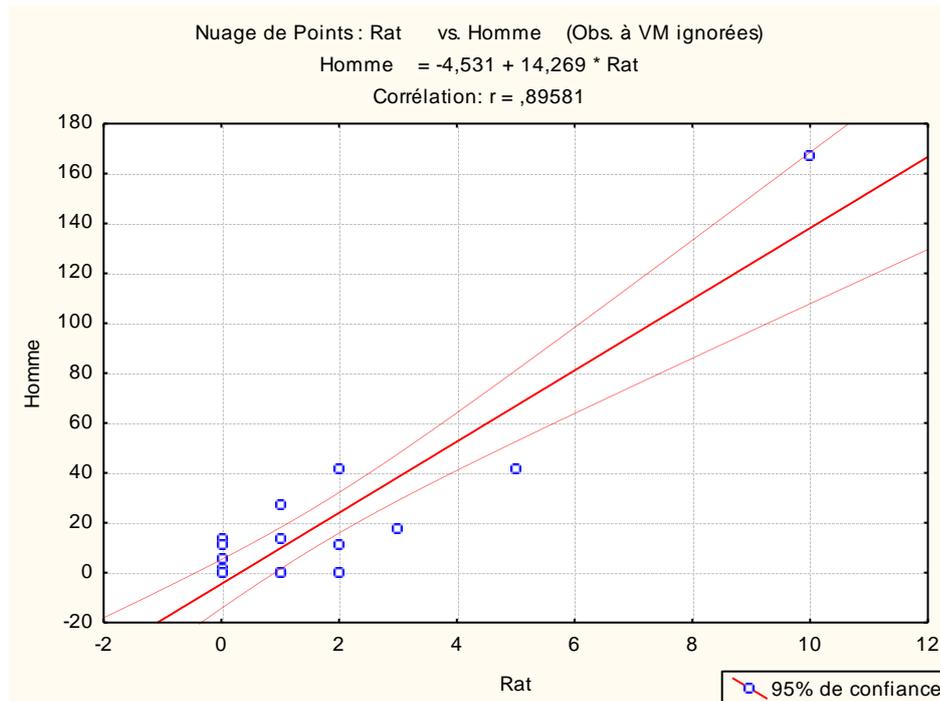


Figure 7.16 : Corrélation entre les sérogroupes chez les rats et chez l'homme.

7.6. Etude des réactions de Co-agglutination qui ne permettent pas d'identifier un sérovar infectant

La prise en considération des titres maximaux à deux dilutions d'intervalle n'était pas suffisante pour éliminer toutes les réactions de coagglutination, et la détermination de la souche infectante est restée alors impossible.

Les résultats sérologiques par le MAT obtenus sur les 100 sérums analysés ont mis en évidence 94 réactions positives au total, ce qui correspondait à 43 rats. Certains sérums testés lors du MAT présentaient des réactions d'agglutinations avec plusieurs sérovirs à des titres ne permettant pas d'identifier un sérovar infectant (32 réactions positives sur 94), correspondant à 11 rats.

Parmi les 32 réactions positives présentant des titres ne permettant pas d'identifier un sérovar infectant, les sérovirs Icterohaemorrhagiae verdun, Canicola et Panama sont mis en évidence dans 4 réactions chacun, les sérovirs Mini et Sarmin sont aussi mis en évidence dans 3 réactions chacun, les sérovirs Bataviae, Cynopteri, Grippotyphosa, Patoc et pomona dans 2 réactions chacun, et enfin les sérovirs Autumnalis, Pyrogenes, Tarassovi, et Louisiana dans 1 seule réaction chacun.

Les réactions positives pour un ou plusieurs sérogroupes sur un même animal signent soit la présence de coagglutinines, soit l'existence de plusieurs infections par différentes souches de leptospires, simultanément ou au cours de la vie de l'animal.

7.7. Etude de la séroprévalence en fonction des titres en anticorps

7.7.1. Changement de la séroprévalence en fonction du seuil choisis

Parmi les rats séropositifs, les titres en anticorps étaient compris entre 1 :20 et 1 :2560. La séroprévalence peut changer en fonction du titre seuil choisis, ainsi si on fixe un titre seuil de 1 :40 la séroprévalence obtenue est de 30%, si on augmente le titre à 1 :80 la séroprévalence est 20%, si on augmente encore le seuil à 1 :160, la séroprévalence est 16%, donc si on choisit un seuil de 1 :100, la séroprévalence est donc comprise entre 20% et 16%.

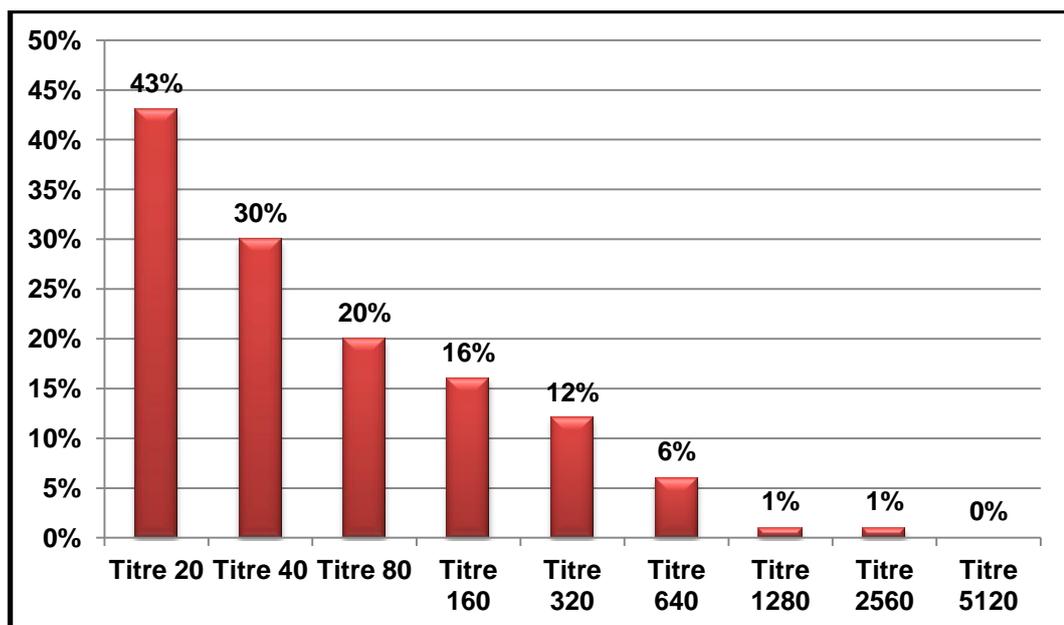


Figure 7.17 : Variation de la séroprévalence en fonction du titre.

Il est également possible d'obtenir une séroprévalence hypothétique avec un autre seuil en réalisant une régression linéaire des logarithmes des titres obtenus dans notre étude. Il est possible d'obtenir une fonction linéaire de la séroprévalence cumulative en fonction du logarithme des titres sérologiques (figure 7.17). En utilisant cette méthode, la séroprévalence calculée pour un titre seuil de 1 : 50 est de 28%, à titre seuil 1 : 100 elle est de 22.92%, et de 17.8% pour un titre seuil de 1 : 200.

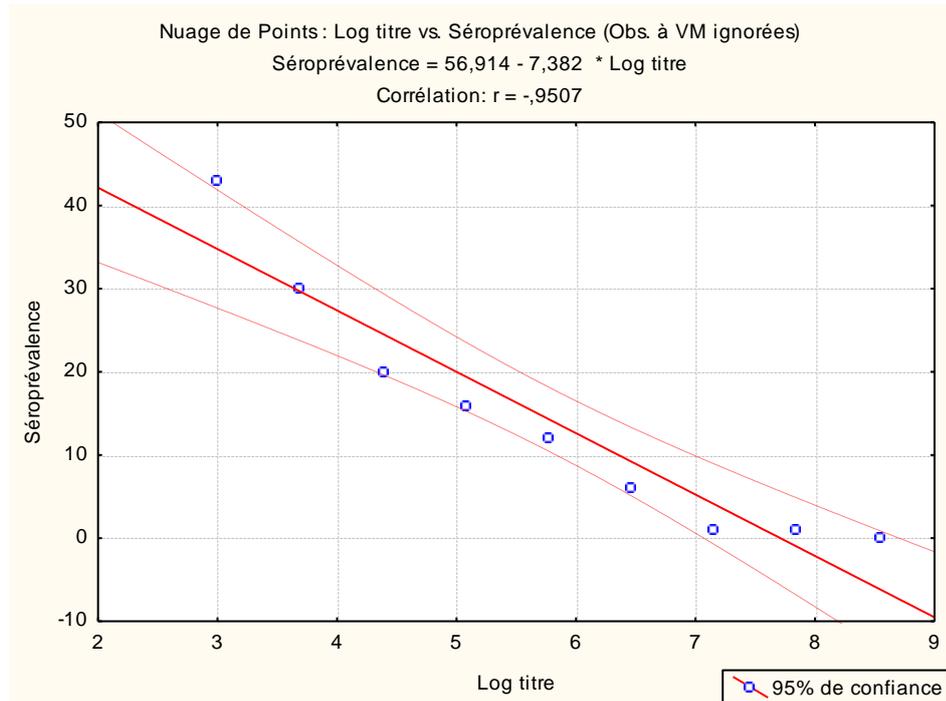


Figure 7.18 : Régression linéaire de la séroprévalence en fonction du logarithme des titres en anticorps.

7.7.2. Répartition des titres sérologiques parmi les rats séropositifs

Nous remarquons que les titres les plus élevés sont enregistrés pour le sérovar Canicola, Icterohaemorrhagiae verdun, et louisiana, (tableau 7.12).

Tableau 7.12 : Titres en anticorps minimums et maximums obtenus par MAT pour chaque sérovar.

Sérovar	Titres Min-Max
Icterohaemorrhagiae verdun	20-640
Canicola	160-2560
Australis	40-320
Grippotyphosa	40
Icterohaemorrhagiae	20
Panama	20-40
Sarmin	20
Louisiana	20-640
Automnalis	40
Bataviae	20
Sejroe	320
Castellonis	20
Mini	80
Shermani	40

Nous observons que de nombreuses réactions sont enregistrées pour les titres les plus faibles à savoir 20-40 et 80, (tableau 7.13).

Tableau 7.13 : Nombre de réactions positives par sérovar en fonction des titres en anticorps (toutes les réactions n=94).

Titres	Nombre de réactions
20	41
40	23
80	13
160	5
320	6
640	5
1280	0
2560	1
5120	0

Aucun sérum n'a donné une réponse positive à un titre (5120), par contre beaucoup de sérovars ont été identifiés à des titres faibles, (tableau 7.14).

Tableau 7.14 : Nombre de réactions positives par sérovar en fonction des titres en anticorps (seules les réactions permettant d'identifier un sérovar infectant n=32).

Titre	Nombre de réactions
20	9
40	7
80	1
160	3
320	6
640	5
1280	0
2560	1
5120	0

Un seul sérum sur le 43 positifs a réagit à un titre le plus élevé (2560), correspondant ainsi au sérovar Canicola, alors que beaucoup de sérums ont réagit à des titres les plus faibles (20), correspondant ainsi aux différents sérovars, (tableau 7.15).

Tableau 7.15 : Les titres en anticorps enregistrés pour chaque sérovar seules les significatives sont comptabilisées.

Titre \ Sérovar	20	40	80	160	320	640	1280	2560
Icterohaemorrhagiae verdun	1			2	2	3		
Canicola				1	2	1		1
Australis		2			1			
Grippotyphosa		2						
Icterohaemorrhagiae	2							
Panama	1	1						
Sarmin	2							
Louisiana	1					1		
Automnalis	1							
Bataviae	1							
Sejroe					1			
Castellonis	1							
Mini			1					
Shermani		1						

7.8. Résultats de la culture bactérienne

7.8.1 Prévalence de *Leptospira spp* par culture bactérienne

Sur les 100 cultures (100 reins et 100 foies), 8 rats ont donné des réponses vis-à-vis de *Leptospira spp* positives, soit une prévalence de 8%.

Tableau 7.16 : Prévalence de la culture bactérienne.

N	N positifs	Prévalence %	Intervalle de confiance à 95%
100	8	8%	2.68-13.32

Parmi ces cultures positives aux leptospies, 4 ont été obtenues à partir des reins correspondants à 50% des cultures positives (4/8), 2 cultures du foie, correspondant à 25% (2/8) des cultures positives, et 2 cultures du rein et du foie correspondant à 25% des cultures positives.

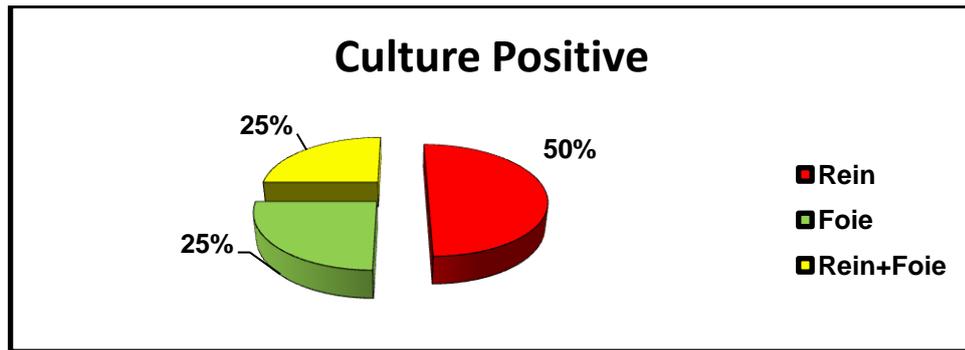


Figure 7.19 : Répartition des cultures positives aux leptospires (%) en fonction des organes.

7.8.2. Prévalence bactériologique en fonction du sexe

Sur les 8 cultures positives aux leptospires, 5 étaient des femelles, et 3 étaient des mâles.

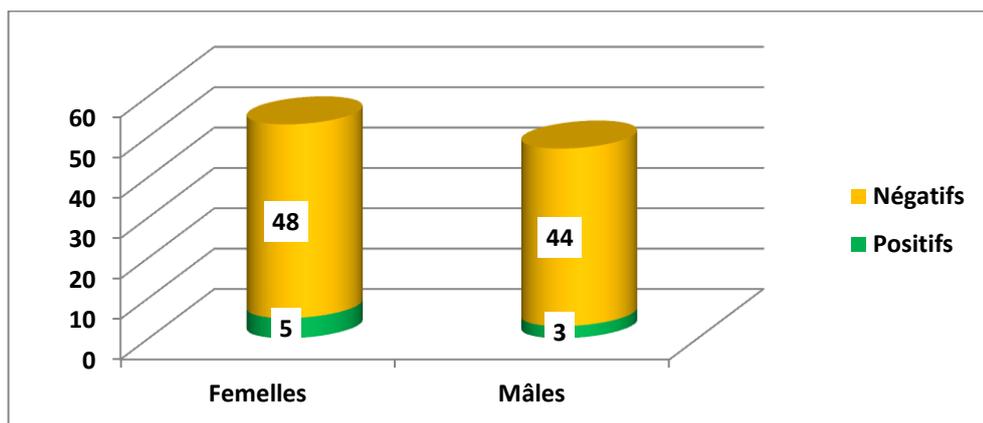


Figure 7.20 : Répartition des cas positifs aux leptospires en fonction du sexe.

Nous observons une proportion de 9.43% (5/53), chez les femelles, et de 6.38% (3/47), chez les mâles.

Tableau 7.17 : Proportions des femelles et des mâles positifs.

	N	Positifs	Négatifs	Proportions
Femelle	53	5	48	9.43%
Mâle	47	3	44	6.38%

Le test exact de Fisher donne une $p = 0.4271 > 0.05$, donc aucune influence du sexe sur les résultats bactériologique n'a été constatée, les femelles sont autant infectées que les mâles.

7.8.3. Prévalence des leptospires par culture bactérienne en fonction de l'âge

Sur les 8 cultures positives, 6 sont des cultures d'organes prélevés des animaux adultes, alors que 2 sont des cultures d'organes d'animaux subadultes.

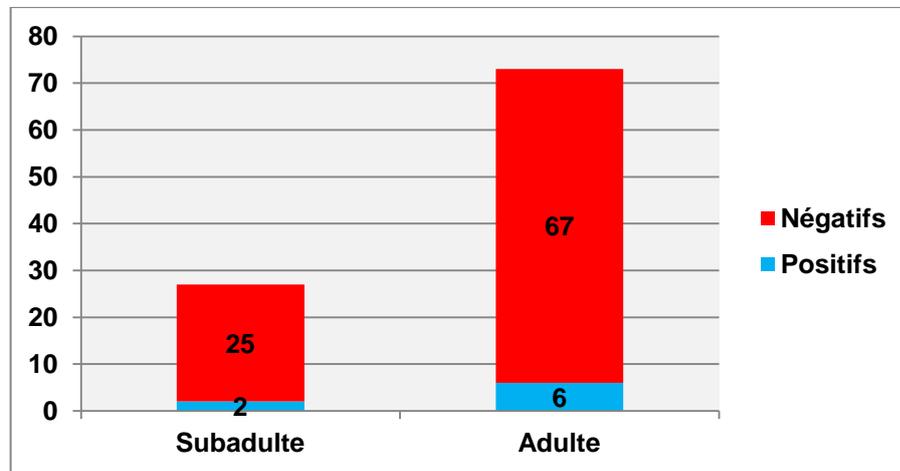


Figure 7.21 : Répartition des cas positifs aux leptospires en fonction de l'âge.

La proportion est de 7.41% (2/27) pour les subadultes, et de 8.22% (6/73) pour les adultes.

Tableau 7.18 : Proportions des deux classes d'âge.

	N	Positifs	Négatifs	Proportions%
Subadultes	27	2	25	7.41%
Adulte	73	6	67	8.22%

Le test exact de Fisher donne une $p = 0.6297 > 0.05$. Les adultes sont autant infectés que les subadultes.

7.8.4. Prévalence des leptospires par culture bactérienne en fonction du lieu de capture

Sur les 8 cultures positives, 5 sont des cultures d'organes de rats capturés dans la région de Route de chréa, une de la région de Maramen, une de Ben Achour, et finalement une d'organes de rat capturé dans la région de Route d'Oued El Alleug.

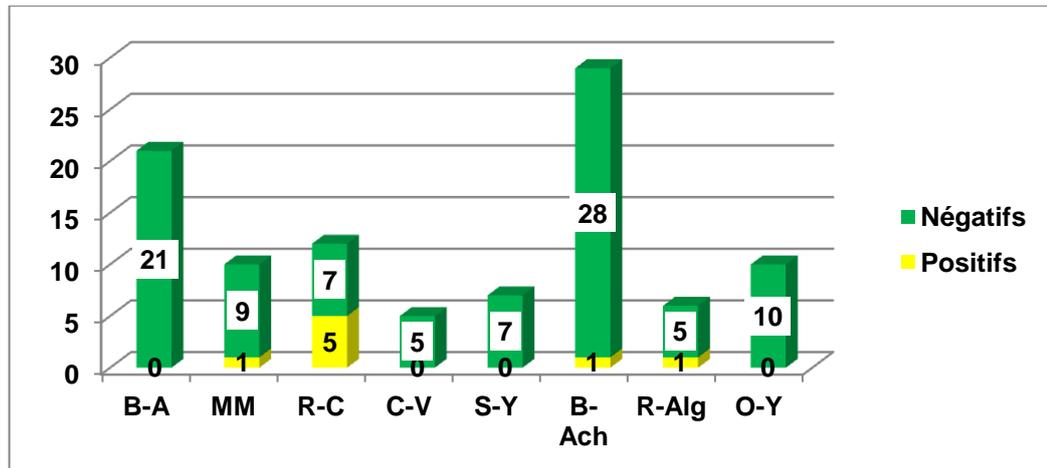


Figure 7.22 : Répartition des cas positifs aux leptospires dans les différents sites.

Tableau 7.19 : les proportions des positifs dans les différents sites.

Lieu de capture	B-A	MM	R-C	C-V	S-Y	B-Ach	R-Alg	O-Y
Positifs	0	1	5	0	0	1	1	0
Négatifs	21	9	7	5	7	28	5	10
Total	21	10	12	5	7	29	6	10
Proportion%	0%	10%	41.67%	0%	0%	3.45%	16.67%	0%

Les proportions en fonction des différents lieux de capture sont de : 0% (0/21) pour la région de Bouarfa, 10% (1/10) à Maramen, 41.67% (5/12) à la Route de Chréa, 0% (0/5) au Centre Ville, 0% (0/7) à Sidi Yaakoub, 3.45% (1/29) à Ben Achour, 16.67% (1/6) à la Route de Oued Alleug, 0% (0/10) à Ouled Yaich.

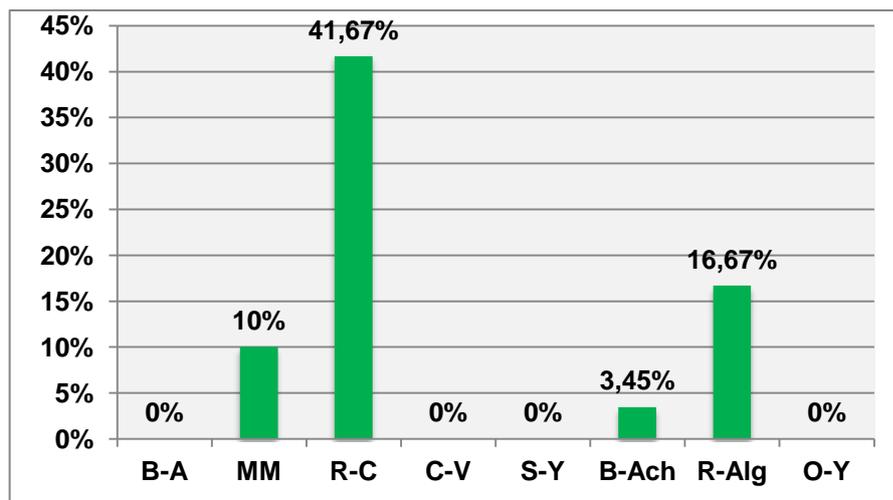


Figure 7.23 : proportions des cas positifs aux leptospires en fonction des sites de prélèvements.

La région de Ben Achour est prise comme référence puisqu'elle compte le plus grand nombre d'animaux. Une différence significative est observée entre cette région et la région de R-C ($p= 0.0053$) (tableau 7.20), par contre aucune différence significative n'a été observée entre la même région (B-Ach) et les autres régions.

Tableau 7.20 : Résultats du test exact de Fisher avec la région B-Ach comme référence.

Région	B-A	MM	R-C	C-V	S-Y	R-Alg	O-Y
P de Fisher	0.58	0.45	0.0053	0.8529	0.806	0.318	0.744

7.9. Comparaison entre la méthode de la culture bactérienne et la sérologie (MAT)

Les performances de la culture bactérienne ont été évaluées en prenant comme test de référence le MAT (tableau 7.21).

Nous avons calculé pour la culture bactérienne, la sensibilité, la spécificité, le coefficient kappa de Cohen, et le coefficient de concordance (Cc) par rapport au test MAT pris comme test de référence. Nous avons constaté que pour la culture bactérienne, la sensibilité était de 11.28%, la spécificité était de 94.74%.

Tableau 7.21 : Tableau de contingence.

	Séropositifs	Séronégatifs	Total
Culture positive	5 (a)	3 (b)	8 (t_1)
Culture négative	38 (c)	54 (d)	92(t_2)
Total	43(n_1)	57(n_2)	100(N)

Le calcul de la concordance entre les deux méthodes par l'utilisation du test de Kappa de Cohen a montré un coefficient $k=0.068$, ce qui correspond à une mauvaise concordance entre les deux méthodes.

Différents paramètres sont calculés :

➤ **La sensibilité (Se) :**

La sensibilité= $(a/a+c)*100$.

Se= $(5/5+38)*100=11.28\%$.

Se=11.28%.

➤ **La spécificité (Sp):**

La spécificité= $(d/b+d)*100$.

Sp= $(54/57)*100=94.74\%$.

Sp=94.74%

➤ **Le coefficient de concordance (Cc) :**

Cc= $(a+d/a+b+c+d)*100$.

Cc= $(5+54/5+3+38+54)*100$.

Cc=59%.

➤ **Le coefficient Kappa (K) :**

On calcule tout d'abord la concordance attendue (**Ca**) :

Ca= $t_1*n_1+t_2*n_2+.....t_i*n_i/N^2$.

Ca= $8*43+92*57/100^2$.

Ca=0.56.

K=Cc-Ca/1-Ca.

K= $0.59-0.56/1-0.56=0.068$

K=6.8%.

7.10. Discussion

7.10.1. Qualité de l'échantillon

Les calculs basés sur l'échantillonnage aléatoire supposent la possibilité de tirer des individus au hasard dans la population. Dans le cas de la faune sauvage, les individus ne peuvent pas être réellement choisis au hasard : d'une part, la population n'est généralement pas assez accessible pour constituer une liste d'individus dans laquelle on pourrait effectuer un tirage, et d'autre part, quelle que soit la méthode de récolte employée, il existe des biais de sélection, c'est-à-dire que les techniques d'échantillonnage sélectionnent certains individus plutôt que d'autres [196]. L'échantillon doit inclure suffisamment d'individus provenant des strates les plus difficiles à échantillonner. Or au prix du même effort, on peut obtenir beaucoup d'individus « tout venant » ou peu d'individus plus difficiles à obtenir [197]. En effet nous avons rencontré plusieurs difficultés sur le terrain qui ont affecté la représentativité de notre échantillon : l'insécurité dans certains sites (vole ou destruction des pièges), le refus d'aide de certaines personnes, le coût des pièges élevé, l'absence de véhicule, ajouter à tout ça la difficulté de piéger le rat puisque c'est un animal connu par sa grande prudence. Tous ces facteurs nous ont obligé de travailler là où il y'a plus de sécurité et de l'aide, et n'ont pas permis donc la couverture de toute la région, ces facteurs ont aussi influencé sur la fréquence de captage des rats « il y'a des sites où nous avons pu attraper plus de rats que d'autres ».

7.10.2. Population animale étudiée

Notre travail avait pour but d'évaluer la séroprévalence de la leptospirose ainsi que la mise en évidence de la bactérie par culture chez le rat dans la région de Blida. Notre étude inclut 100 rats. A ce jour, cette étude reste la première en Algérie.

7.10.3. Séroprévalence vis-à-vis *Leptospira spp* par utilisation du MAT

Le procédé le plus couramment utilisé pour le diagnostic d'une infection à leptospire chez les animaux et les humains est la détection d'anticorps spécifiques dans le sérum en utilisant le test de microagglutination (MAT).

Le MAT est "spécifique" de séro groupe [11]. Il est communément admis que le séro groupe pour lequel on observe le plus fort titre d'anticorps lors du MAT est considéré comme le séro groupe infectant, Or les réactions croisées entre séro groupes sont fréquentes et il existe de nombreux exemples de réactions paradoxales dans lesquelles des anticorps hétérologues, dirigés contre d'autres séro groupes que le séro groupe infectant, apparaissent pendant la phase initiale de la réponse immunitaire [11] [198]. Des études ont montré que la prédiction du sérovar infectant ne se révélait exacte que dans 50% des cas [198]. D'après Levett [198] la sensibilité du MAT pour la prédiction du séro groupe infectant (définie comme la proportion d'isolats identifiés par culture dont le séro groupe correspond au séro groupe prédominant identifié en sérologie) est d'environ 45%, tandis que sa spécificité (définie comme la proportion de patients avec un séro groupe prédominant sérologiquement et dont l'isolat appartient au sérovar correspondant) est d'environ 65%.

De plus Le MAT est une technique "observateur-dépendante", c'est-à-dire que son résultat peut varier en fonction du manipulateur [11]. En outre les anticorps circulants ne correspondent pas toujours à la souche présente dans les reins [199].

Dans notre travail, nous avons tenté de réduire la subjectivité du test par une deuxième observation par un second manipulateur, par contre nous n'avons pas pu identifier un sérovar infectant pour tous les sérums positifs en prenant une marge de deux dilutions d'écart. Ce grand nombre de réactions croisées observé dans notre étude pourrait s'expliquer par l'origine des souches de référence utilisées comme antigènes, qui ne sont pas isolées localement, donc elles se sont montrées moins sensibles.

En conclusion, on n'obtiendra pas avec ce test un résultat positif ou un résultat négatif mais un profil sérologique plus ou moins en faveur d'une infection leptospirosique [15].

En raison de l'originalité du travail dans la région, le titre 1 :20 a été retenu dans notre étude afin d'augmenter la sensibilité du test, c'est aussi un seuil le plus souvent utilisé chez les rongeurs [200].

Dans notre étude, des analyses sérologiques ont été réalisées en utilisant le test MAT sur 100 sérums de rats, les résultats ont montré que 43 animaux se sont révélés positifs à un titre seuil de 1 :20, soit une séroprévalence de 43%.

La comparaison directe de nos résultats avec d'autres travaux similaires doit se faire avec prudence, car des procédures différentes peuvent être adoptées: des techniques différentes, des valeurs seuils différentes ou encore des échantillons de taille différente.

De nombreuses études de séroprévalence ont été réalisées dans le monde chez le rat et des différences considérables parmi les pays ont été rapportées.

Si on se réfère aux travaux publiés sur la séroprévalence de *Leptospira* chez le rat en utilisant le MAT comme test de référence à un titre en anticorps de 1 :20, notre séroprévalence globale est plus élevée comparée à celle obtenue en Tunisie (7,3%) [193], et celle obtenue au Vietnam (18,3%) [201]. En revanche, elle semble bien plus faible que celle rapportée aux Philippines (92%) [199].

Afin de comparer nos résultats avec les études sérologiques de leptospirose chez le rat réalisées dans le monde, utilisant d'autres seuils de positivité, nous avons extrapolé nos résultats, et calculer la séroprévalence dans la région en prenant d'autres titres seuils, la séroprévalence dans notre étude à un seuil 1 :50 est donc de 28%. En Egypte (Mahala), à un même titre seuil, la séroprévalence était plus faible de l'ordre de 14% [202]. En revanche, en Colombie, à un titre seuil similaire, la séroprévalence était comparable à celle estimée dans notre étude (25%) [203]. Si nous considérons le titre seuil à 1 :100, on obtient une séroprévalence de 22.92%, un taux largement plus élevé à celui obtenu en Iran (3,33%) [4] et en Turquie (8,4%) [204] utilisant le même titre seuil. À un seuil de 1 :200, la séroprévalence a montré une valeur de 17,8%, nettement plus faible que celle obtenue en Egypte (75,9%) utilisant le même titre seuil [205].

Nos résultats diffèrent de ceux de la littérature du fait de la grande variabilité des protocoles, des objectifs, du climat, de la géographie, ainsi que des espèces de rats présentes dans chaque région.

Les titres obtenus parmi les rats positifs sont compris entre 1 :20 et 1 :2560. Beaucoup de réactions sont enregistrées à des titres faibles, ces faibles taux

d'anticorps peuvent correspondre à des infections anciennes, ou correspondre à des réactions croisées avec d'autres sérovars. Afin de déterminer si ce faible taux d'anticorps correspond à des infections anciennes, la réalisation d'une cinétique d'anticorps est de mise : deux prises de sang doivent être réalisées à 10 jours d'intervalle, Ceci était impossible à envisager chez les animaux sauvages étant donné qu'ils étaient euthanasiés au moment des prélèvements.

Dans notre étude, les sérogroupes les plus souvent identifiés sont : Icterohaemorrhagiae 10/100 (10%), Canicola 5/100 (5%), et Australis 3/100 (3%), les sérogroupes Grippotyphosa, Panama, Sarmin, et Louisiana représentent chacun (2%) 2/100, finalement, les sérovars Automnalis, Bataviae, Sejroe, Ballum, Mini, et shermani représentent chacun (1%) 1/100.

Le séroroupe Icterohaemorrhagiae est le plus retrouvé chez le rat, confirmant ainsi qu'il soit effectivement un réservoir de ce séroroupe [14] [182], Ce résultat conforte les résultats d'autres études qui montrent que le rat est le réservoir de ce séroroupe, [193] [203], Cependant, une étude menée en Iran [4] a identifié plutôt le sérovac Griptyphosa chez les rats.

Le séroroupe Canicola est le deuxième retrouvé chez le rat dans notre étude, à des titres même bien élevés, ces titres élevés, témoignent des réponses sérologiques récentes ou entretenues par des réinfections. Les leptospires pouvaient donc circuler au sein des populations des rats via l'environnement ou les individus infectés. Ce séroroupe (Canicola) dont le chien est généralement considéré comme son réservoir [7] [14] nous laisse supposer que les rats pouvaient être en contact proche avec cet animal. En effet dans la région d'étude, les chiens errants constituent un problème pour les municipales, et plusieurs campagnes d'éradications des chiens errants ont été effectuées au cours de ces dernières années. Dans la commune de Blida seulement, 525 chiens ont été éradiqués en 2011, 153 autres en 2013, et 945 dans l'année 2014 [206].

Ces sérogroupes (Icterohaemorrhagiae et Canicola) sont aussi les sérogroupes les plus retrouvés et enregistrés à l'Institut Pasteur d'Alger [178], ils semblent donc être particulièrement les plus pathogènes pour l'homme.

Autres sérogroupes qu'*Icterohaemorrhagiae* ont été trouvés chez le rat, comme c'est le cas pour d'autres travaux réalisés dans d'autres régions dans le monde [198] [193] [201] [202] [203] [204], cela pourrait être la conséquence d'une contamination à partir de l'environnement ou à une cohabitations avec d'autres animaux.

Les réactions d'agglutinations significatives pour un même sérum sont souvent nombreuses. L'interprétation de ce phénomène de co-agglutination est difficile à établir. La présence de nombreux sérogroupes peut correspondre à de nombreuses réponses immunitaires à des infections passées, récentes, simultanées, ou au cours de la vie de l'animal. Il peut également s'agir de réactions croisées.

Une bonne corrélation a été relevée entre les sérogroupes détectés pour les cas cliniques humains de leptospirose enregistrés entre 2004 et 2010 à l'Institut Pasteur d'Alger [178], et les sérogroupes retrouvés chez les rats dans notre étude, cependant ce constat manque de précision car les données ne sont pas actualisées et concernent tout le pays pas uniquement la région d'étude. Il est tout de même intéressant de prendre ces résultats en considération.

Un autre aspect dans notre travail a été d'étudier les facteurs de risque de la séropositivité vis-à-vis de *Leptospira* chez le rat, les résultats ont montré ce qui suit :

7.10.3.1. Séroprévalence en fonction du sexe

Notre population contenait 53 femelles et 47 mâles. Parmi les 43 rats positifs, 22 étaient des femelles, soit une proportion de 51.16% (22/43), et 21 étaient des mâles, avec une proportion de 48.84% (21/43).

Les tests statistiques réalisés montrent que la séroprévalence n'est pas significativement différente entre les deux sexes. Résultats comparables à ceux obtenus au Vietnam, et en Iran [201] [4].

7.10.3.2. Séroprévalence en fonction de l'âge

Notre population était constituée de 27 rats subadultes, et 73 adultes. Sur les 43 rats positifs, 11 étaient des subadultes, soit une proportion d'infection à

Leptospira de 25.58% (11/43), et 32 adultes, correspondant à une proportion de 74.42% (32/43). Même si la proportion des adultes semblait être la plus élevée, le test de Kh2 ne montre aucune différence significative entre les deux classes d'âge.

Comme notre échantillon ne contenait pas d'individus jeunes, (faute possible de pièges ne permettant pas de capturer les jeunes rats en raison de leur petite taille, ou parfois juste du au hasard !) nous n'avons pas pu conclure sur le facteur âge.

7.10.3.3. Séroprévalence en fonction du lieu de capture

Sur les 43 rats séropositifs, 23.25% (10/43) provenaient de la région de Ben Achour, 20.93% (9/43), de la région de Route de Chréa, 16.28% (7/43), de la région Ouled yaich, 13.95% (6/43) de la région de Bouarfa, 11.63% (5/43), de la région Maramen, et enfin 6.98% au centre ville, et aussi a sidi yakoub. Aucun cas positif n'a été retrouvé dans la région de Route de Oued Alleug.

Si nous considérons les taux d'infection par région, la plus élevée est enregistrée dans la région de Route de Chréa (75%), suivie par la région d'Ouled Yaich (70%), Centre Ville (60%), maramen (50%), Sidi Yaakoub (42.86%), Ben Achour (34.48%), Bouarfa (28.57%), et finalement, Route de Oued Alleug (0%).

Le test de Kh2 réalisée après regroupement de quelques régions (MM+RAI_g), (CV+SY), montre une différence significative dans les taux d'infection à *Leptospira* entre les régions. La régression logistique confirme cette différence.

Cette différence observée entre les régions pourrait s'expliquer par des facteurs de transmissions variables selon les régions, donc les probabilités de contact entre animaux ou entre animal et un lieu contaminé sont variables entre les régions.

Dans notre étude, les rats de la région de Route de Chréa sont les plus infectés par rapport aux autres régions, cette région qui se situe à la périphérie de la zone urbaine constitue une zone intermédiaire entre la zone urbaine et la zone des forêts (Chréa). La forte infection d'animaux dans cette région pourrait s'expliquer par la forte densité d'animaux (rats) favorisant ainsi un contact étroit

entre ces animaux puisqu'ils vivent en groupe. On pourrait expliquer aussi ce constat par la nature de cette zone qui permet aux rats de parcourir de grandes distances contaminant ainsi plus l'environnement, ou bien encore par le contact des rats avec d'autres espèces d'animaux infectés provenant de la faune sauvage.

7.10.3.4. Séroprévalence en fonction du mois de prélèvement

Le taux d'infection le plus élevé est enregistré en mois de Décembre, C'est durant cette période où la plus grande quantité de pluie est inscrite. Cependant, le test de corrélation effectué entre les proportions des séropositifs et la quantité de pluie enregistrée par mois n'est pas significatif. Ce résultat peut manquer de précision, car si on répartit l'échantillon ce dernier devient faible.

En revanche, une bonne corrélation est observée entre la quantité de pluie et les proportions des séropositifs par saison. Cette corrélation paraît logique étant donné que les leptospires sont des bactéries inféodées aux zones humides.

Le test de KH2, montre une différence significative entre les proportions de séropositifs par saison, la régression logistique confirme cette différence aussi, et montre que les animaux sont plus infectés en hiver qu'en automne et en printemps. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus au Vietnam [201], qui montrent une différence significative entre la saison des pluies et la saison sèche.

Une hypothèse peut être envisagée pour relier la pluviométrie et la circulation des leptospires, les fortes pluies libèrent les leptospires des zones d'eau stagnantes où elles survivaient, par lessivage des sols ; les rats ont alors plus de chance d'être infectés quelque soit leurs habitats. Cela est confirmé chez l'homme par de nombreuses données publiées où des épidémies de leptospirose sévissent après de grands épisodes de crues et d'inondations en période des pluies [207].

7.10.4. Culture bactérienne

La culture peut donner une identification définitive du sérovar infectant [194]. L'isolement de souches locales est très important pour l'étude épidémiologique de la maladie à l'échelle locale et peut par la suite servir au

diagnostic sérologique puisque les souches isolées localement montrent une sensibilité plus élevée que les souches de référence pour l'agglutination [11]. Une ultérieure identification moléculaire des souches identifiées par culture est donc indispensable.

Dans notre étude, peu de cultures se sont révélées positives alors que de nombreux rats sont positifs par le test sérologique. Ceci est dû probablement aux contaminations de nombreuses cultures, « Au sein du milieu de culture, riche en nutriments, les spores fongiques et les bactéries entrent en compétition avec les leptospires [7] ». En effet dans nos milieux de cultures nous avons choisi de ne pas ajouter ni d'antibiotiques ni d'inhibiteurs spécifiques, Comme ces substances sont également susceptibles de réduire la croissance des leptospires, [208] ce choix s'est avéré être discutable puisque des contaminants se sont développés dans la plupart de nos cultures. De plus, pour un meilleur taux de réussite de la culture, il est recommandé pour chaque échantillon de faire plusieurs cultures [11], ainsi que des dilutions de la culture initiale au 1/10, 1/100 et 1/1000 [208]. De plus deux types de culture devaient être réalisés, l'une avec ces additifs et l'autre sans [15].

Un tel protocole était trop lourd à mettre en place techniquement et financièrement.

Nous avons augmenté la chance d'avoir plus de culture positive en mettant en culture à la fois les reins et les foies. Sur les 100 rats prélevés, 8 ont donné des cultures positives, soit un taux de 8% (8/100).

Basée sur les résultats de l'étude de la prévalence par culture bactérienne, nous avons étudié certains facteurs qui semblent augmenter le risque de la positivité vis-à-vis de *Leptospira* chez le rat.

7.10.4.1. Prévalence de *Leptospira* par culture bactérienne en fonction du sexe

Sur les 8 cultures positives, 5 provenaient des femelles, soit une proportion de 62.5% (5/8), et 3 cultures positives appartenaient à des mâles, soit une proportion de 37.5% (3/8), le test statistique exact de Fisher ne montre aucune différence significative entre les deux sexes, il n'y'a pas d'influence du sexe sur la positivité de la culture.

7.10.4.2. Prévalence de *Leptospira* par culture bactérienne en fonction de l'âge

Même constat pour l'âge, malgré que la proportion des adultes positifs par culture ($6/8=75\%$), soit nettement supérieure à celle des rats subadultes 25% ($2/8$), le test exact de Fisher ne montre aucune différence significative entre les deux classes d'âge, Toutefois, ce résultat est à interpréter avec prudence car notre population ne contenait pas des jeunes rats.

7.10.4.3. Prévalence de *Leptospira* par culture bactérienne en fonction du lieu de capture

Pour les régions de Bouarfa, Centre ville, Sidi Yaakoub, et Ouled Yaich, aucun rat n'a donné une culture positive, pour les autres régions, les proportions d'infection à *Leptospira* sont de 12.5% à Maramen, Ben Achour et Route de Oued Alleug ($1/8$), et de 62.5% ($5/8$) pour la région de Route de Chréa, la proportion au niveau de cette dernière zone semble la plus importante.

Le test exact de Fisher montre qu'il y'a réellement une différence significative dans la distribution des positifs entre les régions. Cette différence est marquée seulement pour la région de Route de Chréa, cette région compte la majorité des cultures positives, donc c'est celle qui héberge le plus d'animaux porteurs de leptospires.

7.10.5. Étude de la comparaison du MAT avec la culture bactérienne

Enfin, dans ce travail, les performances de la culture bactérienne ont été évaluées en prenant comme test de référence le MAT pour la mise en évidence des anticorps spécifiques de *Leptospira*.

Nous avons d'abord calculé la sensibilité, la spécificité, le coefficient kappa de Cohen. Nous avons constaté que pour la culture bactérienne, la sensibilité était de 11.28%, la spécificité était de 94.74% .Le calcul de la concordance entre les deux méthodes par l'utilisation du test de Kappa de Cohen a montré un coefficient $k=0.068$ (6.8%), ce qui correspond à une très faible concordance entre les deux méthodes.

Au vue des résultats de sensibilité et de spécificité obtenus pour la culture bactérienne, il convient d'indiquer que l'isolement de *Leptospira* est très peu

sensible comparé à la sérologie par le MAT, cependant, la spécificité de la culture s'est montrée élevée. Le faible taux de réussite des cultures à partir de prélèvements est constaté dans de nombreuses études [191] [209] [210].

Conclusion

Le suivi sanitaire réalisé sur les animaux capturés a permis d'évaluer l'infection par les leptospires chez le rat dans la zone d'étude, d'une part par une étude sérologique sur les prélèvements sanguins, et d'autre part par culture bactérienne sur des prélèvements tissulaires ; rénal et hépatique. Ces deux techniques ont été appliquées sur l'ensemble de la population (N=100).

Quarante trois rats étaient séropositifs par la technique sérologique de microagglutination, (MAT), (soit une séroprévalence de 43%). Sur l'ensemble de la population de rat, le sérogroupe Icterohaemorrhagiae, le sérogroupe Canicola, et le sérogroupe Australis, sont les plus représentés avec respectivement les taux suivants : 10%, 5%, et 3%.

Le taux d'infection par le sérogroupe Icterohaemorrhagiae est le plus élevé, un sérogroupe retrouvé comme pathogène pour l'homme, suivi par le sérogroupe Canicola.

Les résultats de la culture bactérienne montrent que 8 sur 100 rats sont positifs. Parmi ces 8 rats, 6 montraient un portage rénal de leptospires, pouvant excréter la bactérie dans l'environnement par le biais des urines, favorisant ainsi la contamination d'autres animaux y compris l'homme.

En conclusion, les résultats de notre étude mettent en évidence pour la première fois l'importance du rat comme réservoir de leptospires dans la région de Blida, et son rôle crucial dans l'épidémiologie de cette infection dans la région, constituant à la fois une source d'infection pour l'homme et pour les autres animaux.

RECOMMANDATIONS & PERSPECTIVES

La lutte contre les rongeurs semble la solution de choix pour lutter contre la leptospirose. Néanmoins, la grande adaptabilité de ces espèces à différents environnements ainsi que la grande capacité de reproduction rend la lutte en milieu riche en ressources alimentaires, très difficile.

Toutefois, quelques actes peuvent être envisagés.

Une sensibilisation au près des responsables de la santé dans la région doit être entreprise, afin de bien mettre sous lumière l'importance du rat comme réservoir de leptospires dans la région, et pour procéder à un bon programme de lutte contre ce rongeur.

Standardisation d'un questionnaire adéquat au près de la santé publique, pour une bonne connaissance des facteurs de risques de la leptospirose humaine.

Une sensibilisation au près des médecins privés et étatiques de la région de Blida, sur l'importance de la leptospirose afin de la prendre en considération lors du diagnostic puisque cette maladie peut prendre plusieurs formes cliniques.

Une sensibilisation des citoyens, dans le but de réduire les niches écologiques des rats (ramasser les ordures et éliminer les sources d'alimentation des rats).

Un bon contrôle de la population des animaux errants est recommandé, en particulier les chiens.

Impliquer un nombre plus important de rat, et réaliser une étude prolongée sur plusieurs années couvrant les quatre saisons pour mieux expliquer la différence entre les sites, et les saisons.

D'autres techniques de laboratoire sont recommandés pour des études ultérieures, en particulier, une identification moléculaire surtout des souches isolées par culture bactérienne, qui peuvent être utilisées comme antigènes lors du diagnostic sérologique puisque elles montrent une sensibilité plus élevée.

Des recherches doivent être menées sur la leptospirose, visant éventuellement d'autres animaux, afin de mieux comprendre l'épidémiologie de cette infection dans la région. Les résultats de notre étude peuvent constituer ainsi une plateforme pour ces recherches.

APPENDICE A

MATERIEL ET REACTIFS DE LABOTATOIRE

Matériels :

- Microplaques en plastique à 96 puits à fond plat ;
- Microscope à fond noir ;
- Multi pette plus EPPENORF (micropipette à réservoir), Peptus*.
- Pipette jetable 1 ml.
- Micropipette 200ml et 1000 ;
- Pipette multicanaux ;
- Filtres à usage unique de porosité de 0,45µm et/ou 0,22µm ;
- Seringue jetable 2ml et 5 ml.
- Etuves 28°C et 37°C ;
- Lame en verre de qualité supérieure ;
- Embouts en plastique à usage unique
- Centrifugeuse.
- Agitateur rotatif.
- Lames et lamelles.
- La poire.
- Bec bunsen.

Réactifs :

- Eau physiologique tamponnée PH = 7,6 ;
- Souche de leptospire contrôlée (appelées également antigènes vivant) ;
- Milieu EMJH (milieu de Ellinghausen-McCullough modifié par Johnson et Harris) ;

Eau physiologique tamponnée PH=7,6

Elle est composée de :

Tampon Sörensen ----- 160 ml

Eau physiologique à 0,85% ----- 1840 ml

Tampon Sörensen:

$\text{Na}_2 \text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ ----- 8,33 g

$\text{KH}_2 \text{PO}_4$ -----1,09 g

H_2O qsp -----11

Ce tampon est autoclavé 20 minutes à 110°C et conservé à +4°C.

APPENDICE B

LES ETAPES DU PRELEVEMENT



L'animal dans sa cage dans un sachet



Ajout d'un coton imbibé de l'ither



Sachet Bien fermé



Pesée en gramme



Animal fixé sur le dos



Prélevement sanguin intracardiaque



Incision de la peau



Prélevement du foie



Prélevement d'un rein.

APPENDICE C

**REPARTITION DES CAS DE LEPTOSPIROSE HUMAINE EN ALGERIE ENTRE
2004 ET 2014 [6]**

Wilaya	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
CHLEF	1	2	0	0	2	2	3	0	0	3	0
O.E.B	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
BEDJAIA	0	0	2	0	2	2	0	1	0	3	1
BLIDA	11	7	18	16	21	18	21	42	41	21	30
BOUIRA	3	1	1	1	1	2	1	3	1	6	1
TAMANRASSET	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TLEMCEN	1	1	1	1	2	1	1	0	0	3	2
Tiaret	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
T.OUZOU	7	5	43	11	7	1	6	6	14	1	4
ALGER	8	4	6	8	9	0	0	0	0	8	2
JIJEL	1	1	0	4	0	1	1	0	1	0	0
SETIF	0	0	0	2	3	0	37	0	0	1	3
SKIKDA	9	6	4	9	4	8	0	5	1	4	5
S.B.SABRES	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
GUELMA	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0
CONSTANTINE	0	0	1	2	0	0	0	0	3	0	1
MEDEA	0	0	0	1	0	3	0	0	4	5	2
MOSTAGANEM	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3
MASCARA	2	0	0	2	1	0	0	0	1	0	1
ORAN	0	0	8	0	0	0	0	0	0	2	0
B.B.A	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Tindouf	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
BOUMERDES	3	4	4	7	9	1	2	0	0	3	3
TISSEMSILT	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
EL OUED	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Souk-Ahras	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
TIPAZA	0	3	1	4	4	4	1	5	9	11	5
MILA	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
A.DEFLA	0	1	4	0	0	0	2	0	1	4	0
A.TEMOUCHENT	0	0	4	1	3	1	2	1	0	0	0

APPENDICE D

RESULTATS DE LA CULTURE

QUE LES RESULTATS POSITIFS

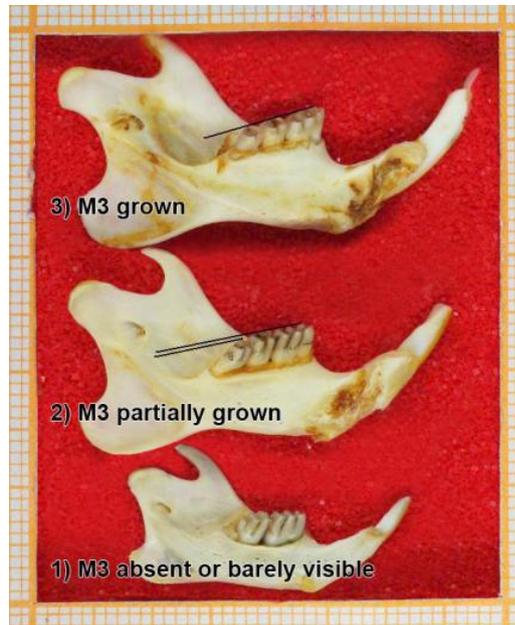
Numéro DU RAT	Date de prélèvement	Origine de l'animal	organe	1 ^e S	2 ^e S	3 ^e S	4 ^e S	5 ^e S	6 ^e S	7 ^e S	8 ^e S	conclusion
Rat : 26	08/11/2014	Maramen	Rein	-	-	-	-	-	-	+	+	+
			Foie	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rat : 31	06/12/2014	Route de Chrèa	Rein	-	-	-	+	+	+	+	+	+
			Foie	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rat : 56	04/03/2015	Route de Chrèa	Rein	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Foie			+	+	+	+	+	+	+
Rat : 57	04/03/2015	Route de Chrèa	Rein	-	-	+	+	+	+	+	+	+
			Foie	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Rat : 58	04/03/2015	Route de Chrèa	Rein	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Foie	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Rat : 60	17/03/2015	Route de Chrèa	Rein	-	-	+	+	+	+	+	+	+
			Foie	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rat : 91	24/04/2015	Ben Achour	Rein	-	-	-	-	+	+	+	+	+
			Foie	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Rat : 95	24/04/2015	Route Oued Alleug	Rein	-	-	-	-	+	+	+	+	+
			Foie	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S : Semaine

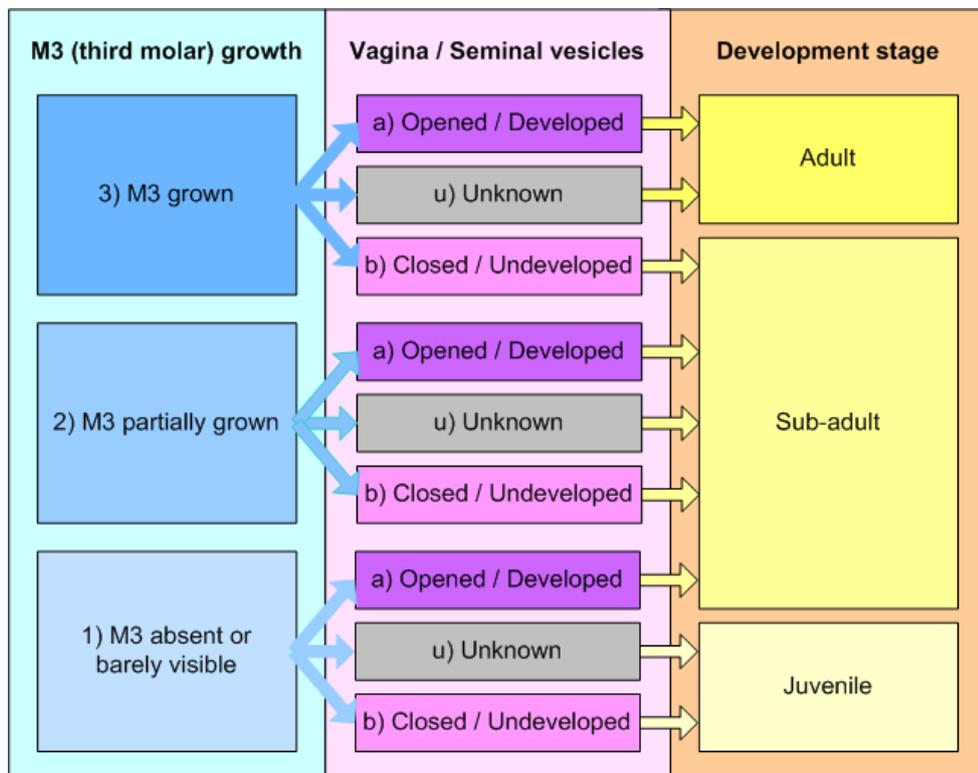
		40			640							
43			40									160
		80			640							
44												
		80	40		640							
46												20
49												80
												640
54												
										40		
56												
					320							
57												
								80				
58										20		
60			20	20								
62				640						80		
	40		20	20	20			80	20			
63											20	
64		20		80								80
					80			40	20			
68												
				80	160							
71	40											
72		40										
73			40			20					20	80
	40											
75											20	
					20				20			
79				20								
									20			
81												
					20							
82											40	
					320			20				
85										40		
					160							

APPENDICE F

ESTIMATION DE L'AGE EN FONCTION DE LA DENTITION [194]



Les différentes étapes de la croissance de la troisième molaire (M3)



Arbre de décision pour déterminer la maturité d'un rongeur, par l'examen de la croissance de la troisième molaire et les organes sexuels externes.

APPENDICE G

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
B-A	: Bou Arfa
B-Ach	: Ben Achour
C	: Canine
Ca	: coefficient Kappa
Cc	: coefficient de concordance
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMJH	: Ellinghausen- McCullough modifié par Johnson et Harris
EPT	: Eau physiologique teponnée
I	: Insicive
IgG	: Immunoglobulines G
IgM	: Immunoglobulines M
IC	: Intervalle de Confiance
<i>L.biflexa</i>	: <i>Liptospira biflexa</i>
LCR	: Liquide Céphalo-Rachidien
<i>L. interrogans</i>	: <i>Liptospira interrogans</i>
Lip	: lipoprotéine
LPS	: lipopolysaccharide
M	: Molaire
MAT	: Macroscopique Agglutination Test
ml	: millilitre
mm	: millimètre
MM	: Maramen
mn	: Minute
M3	: troisième molaire
OMPs	: Outer Membran Protein
OR	: Odds Ratio
O-Y	: Ouled Yaich

P	: Pré molaire
PCR	: polymerase chain reaction
ph. Perso	: Photo personnelle
R-Alg	: Route de Oued Alleug
R-C	: Route de Chréa
Se	: Sensibilité
s.l.	: sensu lato
Sp	: Spécificité
s.s.	: sensu stricto
S-Y	: Sidi Yaakoub
TLR	: Tol like receptor
µm	: micromètre

APPENDICE H
RECAPITULATIF DE QUELQUES ENQUETES DE SEROPREVALENCE
CONDUITES CHEZ LES RATS

Etude Année de publication	Lieu et période d'étude	Effectif prélevé	Seuil de positivité pour le MAT	Techniques d'identifications	Prévalence %	sérovars isolés par le MAT
Ahmed Samir et al 2015	Égypte	270	≥1:200	CULTURE PCR MAT	6.9% 24% 75.9%	Icterohaemorrhagiae Pomona Canicola Gripotyphosa Celledoni
Felt S A et al 2011	Égypte Septembre 2006 et October 2007	100	≥ 1:50	CULTURE PCR MAT	7% 19% 14%	Gripotyphosa Patoc Ecterohaemorrhagiae, Australis, Hardjo, Hebdomadis
Lazuga K and Bonnefous S 1962	Tunisie Sur une année	1746 totaux 986c 1532s	≥ 1:20	CULTURE SEROLOGIE	5.8% 7.3%	Icterohaemorrhagiae Hebdomadis Automnalis Bataviae Poi Mitis
Sunbul M et al 2001	Turkie Juillet 1998 and Mars 1999	59	≥ 1:100	PCR MAT	27.1% 8.4%	Icterohaemorrhagiae Hardjo Bratislava Automnalis
Loan H K et al 2015	Vietnam Octobre, 2012 (rats achetés) Fevrier, Mars, 2013 (rats captures)	275	≥ 1:20	PCR MAT	5.8% 18.3%	Javanica Lousiana Copenageni Cynopterie Pomona Icterohaemorrhagiae
Mosallanejad B et al 2013	Iran Octobre 2009 - Novembre 2011.	120	≥ 1:100	MAT	3.33%	Gripotyphosa
Villanueva S Y A M et al 2010	Philippines Aout 2006–Mai 2007.	106	≥ 1:20	MAT CULTURE	92% 43%	Manilae Hebdomadis Losbanos

Agudelo-Flórez P et al 2009	Colombia	254	$\geq 1:50$	MAT CULTURE	25% 20%	Grippotyphosa Icterohaemorrhagiae Canicola, Bratislava Hardjo, Pomona Ballum, Shermani Tarassovi, Pyrogenes Australis
-----------------------------	----------	-----	-------------	-------------	------------	---

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Tilley, L.P., Smith, Jr. and Francis, W.K., "The 5-minute veterinary consult", third edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, (2004), 1472p
2. Green, C.E., Sykes, J.E., Brown, C.A. and Hartmann, K., "Infectious diseases of the dog and cat", Green CE editor, Philadelphia, USA: Saunders, (2006), 402-417.
3. Hartmann, K. and Greene, C.E., (2005) "Diseases caused by systemic bacterial", In: Textbook of Veterinary Medicine, (6^{ème} edition), Ettinger, S.J. and Feldman, E.C, Elsevier Saunders, 616-630.
4. Bahman, M., Masoud, G.N., Reza, A. and Gholamreza, A., "A Serological Survey on Leptospiral Infection Among Wild Rats (*Rattus rattus*) of Ahvaz District, Southwest of Iran: A Preliminary Study", Jundishapur J Microbiol, V. 6, n° 10, (December 2013), e8333.
5. Adler, B. and de la Peña Moctezuma, A., "Leptospira and leptospirosis", Veterinary Microbiology, V. 140, n° 3-4, (Janvier 2010), 287-296.
6. Ministère de la santé et de la population et de la réforme hospitalière, Direction générale de la prévention.
7. Faine, S., Adler B., Bolin, C. and Pérolat, P., "Leptospira and leptospirosis", Melbourne, Australia: MediSci, (1999), 272 p.
8. Weil, A., "Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus and Nephritis einhergehende, acute Infectionskrankheit", Deutsches Archiv für klinische Medizin, V. 39, (1886), 209-232.
9. Landouzy, L.T.J., "Typhus hépatique", Gazette des hôpitaux civils et militaires, V. 56, (1883), 913-914.

10. Kobayashi, Y., "Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view", *Journal of Infection and Chemotherapy*, V. 7, n°1, (Mars 2001), 10-15.
11. Levett, P.N., "Leptospirosis", *Clinical Microbiology Reviews*, V. 14, n°2, (Avril 2001), 296-326.
12. Inada, R., Ido, Y., Hoki, R., Kaneko, R. and Ito, H., "The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica)", V. 23, n°3, (Mars 1916), 377-402.
13. Ido, Y., Hoki, R., Ito, H. and Wani H., "The rat as a carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Weil's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*)", *J Exp Med*, V 26, n° 3, (Septembre 1917), 341-353.
14. Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E. and Vinetz, J.M. on behalf of the Peru–United States Leptospirosis Consortium., "Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance", *the Lancet infectious disease*, V 3, n° 12, (December 2003), 57-771.
15. KOSOSSEY-VRAIN, C., " La leptospirose canine: revue bibliographique ", *Med. Vét. ENVA*, N°135, (2004), 150p.
16. INSTITUT PASTEUR, Site de l'Institut Pasteur, introduction, visité 10/02/2014, <http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/LepF.html>.
17. Johnson, R.C. and Rogers, P., "Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire with 8-azaguanine", *J Bacteriol*, V 88, n° 6, (December 1964), 1618-1623.
18. Bontemps, M., "La leptospirose humaine en exercice vétérinaire ; point actuel du risque", *Thèse Med. Pharmacie*, Université Claude-Bernard - Lyon I, n°063, (2012), 123p.
19. Serie de rapports techniques N°113, Organisation Mondiale de la Santé, Genève, (1956), 13p.

20. Desvars, A., "Epidémiologie d'une zoonose, la Leptospirose, dans deux îles de l'Océan Indien, la Réunion et Mayotte : étude comparée du rôle de différentes espèces sauvages et domestiques", Thèse de doctorat : Sciences technologies santé. Epidémiologie, Université de la Réunion, (2012), 340p.
21. Brenner, D.J., Kaufmann, A.F., Sulzer, K.R., Steigerwalt, A.G., Rogers, F.C. and Weyant, R., "Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies", International Journal of Systematic Bacteriology, V. 49, n° Pt 2, (April 1999), 839-858.
22. Wangroongsarb, P., Chanket, T., Gunlabun, K., Long, D.H., Satheanmethakul, P., Jetanadee, S., Thaipadungpanit, J., Wutheikanun, V., Peacock, S.J., Blacksell, S. D., Smythe, L.D., Bulach, D. M. and Kalambaheti, T., "Molecular typing of *Leptospira* spp. based on putative O-antigen polymerase gene (*wzy*), the benefit over 16S rRNA gene sequence", Federation of European Microbiological Societies, FEMS Microbiol Lett, V. 217 n° 2, (Jun 2007), 170-179.
23. Ko, A.L., Goarant, C. and Picardeau, M., "*Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen", Nature Reviews Microbiology, V. 7, n° 10, (October 2009), 736-747.
24. Cerqueira, G.M. and Picardeau, M., "A century of *Leptospira* strain typing", Infection, Genetics and Evolution, V. 9, n°5, (September 2009), 760-768.
25. Saito, M., Villanueva, S.Y., Kawamura, Y., Iida, K., Tomida, J., Kanemaru, T., Kohno, E., Miyahara, S., Umeda, A., Amako, K., Gloriani, N.G. and Yoshida, S., "*Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water", Int. J. Syst. Evol. Microbiol, V.63, n° PT 7, (July 2013), 2457-2462.
26. Legrand, E., "La leptospirose bovine", Thèse d'exercice vétérinaire, Doctorat Vétérinaire Faculté De Médecine De Creteil, Alfort, (2007).
27. Goldstein, R.E., "Canine Leptospirosis", Vet Clin Small Anim Pract, V. 40, n° 6, (November 2010), 1091-1101.
28. Faine, S. and Stallman, N.D., "Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the Species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L.*

biflexa (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918”, International Journal of Systematic Bacteriology, V. 32, n° 4, (October 1982), 461-463.

29. Charon, N.W. and Goldstein S.F., “Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The Spirochetes”, Annu Rev Genet, V. 36, (Jun 2002), 47-73.

30. Cullen, P.A., Cordwell, S.J., Bulach, D.M., Haake, D.A. and Adler, B., “Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai”, Infect. Immun, V. 70, n° 5, (May 2002), 2311-2318.

31. Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., Chevallier, B. and Andre-Fontaine, G., “Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1”, FEMS Microbiology Letters, V. 243, n° 2, (February 2005), 437-445.

32. Cinco, M., Vecile, E., Murqia, R., Dobrina, P. and Dobrina, A., “*Leptospira interrogans* and *Leptospira peptidoglycans* induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes”, FEMS Microbiol. Lett, V. 38, n° (2-3), (May 1996), 211-214.

33. Ko, A.I., Goarant, C. and Picardeau, M., Nature Reviews Microbiology, 2009, schéma de la paroi des leptospires, (12/02/2015) [en ligne], http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n10/fig_tab/nrmicro2208_F4.html

34. Hovind-Hougen, K., “Morphologie des leptospires”, Médecine et Maladies Infectieuses, V. 11, n° 2, (February 1981), 60-70.

35. INSTITUT PASTEUR : (page consultée le 11/02/2015). <http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Leptospira.html>.

36. Merien, F. et Berlioz-Arthaud, A., “La leptospirose: une zoonose sous surveillance en nouvelle-caledonie et dans le pacifique”, Revue Francophone des Laboratoires, V. 2005, n° 374, (June-July 2005), 45-50.

37. Yang, C.M., Wu, M.S., Pan, M.J., Hsieh, W.J., Vandewalle, A. and Huang, C.C., “The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial

nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells”, J Am Soc Nephrol, V. 13, n° 8, (August 2002), 2037-2045.

38. Hanson, L.E., “Pathogenesis of leptospirosis”, In: Russell, C. J., The biology of parasitic spirochetes, Academic Press, (1976), 295-306.

39. Harkin, K.R., Roshto, Y.M., Sullivan, J.T., Purvis, T.J. and Chengappa, M.M., “Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospire in dogs”, J. Am. Vet. Med. Assoc, V. 222, n° 9, (May 2003), 1230-1233.

40. Mielcark, M., “Diversité des Rongeurs et des Leptospires en Asie du Sud-Est”, Editions Universitaires Européennes, Allemagne, (Mars 2012), 156 p.

41. Merien, F., Baranton, G. and Perolat, P., “Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence”, Infect. Immun, V. 65, n° 2, (February 1997), 729-738.

42. Barocchi, M.A., Ko, A.I., Reis, M.G., McDonald, K.L. and Riley, L.W., “Rapid translocation of polarized MD-CK cells monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but non intracellulaire pathogen”, Infect Immun, V. 70, n° 12, (December 2002), 6926-6932.

43. Thomas, D.D. and Higbie, L.M., “In vitro association of *Leptospire* with host cells”, Infect Immun, V. 58, n° 3, (Mars 1990), 581-585.

44. Merien, F., Truccolo, J., Raugier, Y., Baranton, G. and Perolat, P., “ In vivo apoptosis of hepatocytes in guinea pigs infected with *Leptospira interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae*”, FEMS Microbiol Lett, V. 169, n° 1, (December 1998), 95-102.

45. Nahori, M.A., Fournié-Amazouz, E., Que-Gewirth, N.S., Balloy, V., Chignard, M., Raetz, C.R., Saint Girons, I. and Werts, C., “Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells”, The journal of Immunology, V. 175, n° 9, (November 2005), 6022-6031.

46. Chassin, C., Picardeau, M., Goujon, J.M., Bourhy, P., Quellard, N., Darce, S., Badell, E., D'andon, M.F., Winter, N., Lacroix-Lamandé, S., Buzoni-Gatel, D.,

Vandewalle, A. and werts, C., "TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*", *The journal of Immunology*, V. 183, n° 4, (August 2009), 2669-2677.

47. Haake, D.A. and Matsnaga, J., "Leptospira: a spirochaete with a hybrid outer membrane", *Molecular Microbiology*, V. 77, n° 4, (Jun 2010), 805-814.

48. Stevenson, B., Choy, H.A., Pinne, M., Rotondja, M.L., Miller, M.C., Demoll, E., Kraicy, P., Cooley, A.E., Creamer, T.P., Suchard, M.A., Brissette, C.A., Verma, A. and Haake, D.A., "*Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement", *PloS One*, V. 2, n° 11, (November 2007), e1188.

49. Lin, Y.P., McDonough, S.P., Sharma, Y. and Chang, Y.F., "Leptospira immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen α C domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation", *Mol Microbiol*, V. 79, n° 4, (February 2011), 1063-1076.

50. Adler, B., Lo, M., Seemann, T. and Murray, G.L., "Pathogenesis of leptospirosis: the influence of genomics", *Vet Microbiol*, V. 153, n° 1-2, (November 2011), 73-81.

51. Ristow, P., Bourhy, P., Da Cruz McBride, F.W., Figueira, C.P., Huerre, M., Ave, P., Girons, I.S., Ko, A.I. and Picardeau, M., "The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence", *Plos Pathog*, V. 3, n° 7, (July 2007b), e97.

52. Haake, D.A., Chao, G., Zuerner, R.L., Barnett, J.K., Barnett, D., Mazel, M., Matsunaga, J., Levett, P.N. and Bolin, C.A., "The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection", *Infect Immun*, V. 68, n° 4, (April 2000), 2276-2285.

53. Murray, G.L., Srikram, A., Hoke, D.E., Wunder, E.A jr., Henry, R., Lo, M., Zhang, K., Sermswan, R.W, Ko, A.I. and Adler, B., "Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*", *Infect Immun*, V. 77, n° 3, (Mars 2009), 952-958.

54. Guerreiro, H., Croda, J., Flannery, B., Mazel, M., Matsunaga, J., Galvão, Reis, M., Levett, P.N., Ko, A.I. and Haake, D.A., "Leptospiral proteins recognized during

the humoral immune response to leptospirosis in humans”, *Infect Immun*, V. 69, n° 8, (August 2001), 4958-68.

55. Ren, S.X., Fu, G., Jiang, X.G., Zeng, R., Miao, Y.G., Xu, H., Zhang, Y.X., Xiong, H., Lu, G., Lu, L.F., Jiang, H.Q., Jia, J., Tu, Y.F., Jiang, J.X., Gu, W.Y., Zhang, Y.Q., Cai, Z., Sheng, H.H., Yin, H.F., Zhang, Y., Zhu, G.F., Wan, M., Huang, H.L., Qian, Z., Wang, S.Y., Ma, W., Yao, Z.J., Shen, Y., Qiang, B.Q., Xia, Q.C., Guo, X.K., Danchin, A., Saint Girons, I., Somerville, R.L., Wen, Y.M., Shi, M.H., Chen, Z., Xu, J.G. and Zhao, G.P., “Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing”, *Nature*, V. 422, n° 6934, (April 2003), 888-893.

56. Greene, C.E., “Leptospirosis In: Infectious diseases of dog and cat”, GREENE CE Editor, Fourth Edition, Elsevier Saunders, St Louis, Missouri, (2012), 431-447.

57. Silva, E.F., Santos, C.S., Athanazio, D.A., Sevfert, N., Seixas, F.K., Cerueira, G.M, Faguandes, M.Q., Brod, C.S., Reis, M.G., Dellagostin, O.A. and Ko, A.L., ” Characterization of virulence of *Leptospira* isolates in hamster model. Vaccine”, *Vaccine*, V. 26, n° 31, (Julay 2008), 3892-3896.

58. Monahan, A.M., Callanan, J.J. and Nally, J.E., “Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis”, *Vet Pathol*, V. 46, n° 5, (September 2009), 792-799.

59. Thiermann, A.B., “The Norway rat as a selective chronic carrier of *Leptospira Icterohaemorrhagiae*”, *J Wildl Dis*, V. 17, n° 1, (January 1981), 39-43.

60. Ganoza, C.A., Mathias, M.A., Saito, M., Cespedes, M., Gotuzzo, E. and Vinetz, J.M., “Asymptomatic renal colonization of humans in the Peruvian Amazon by *Leptospira*”, *PLoS Negl Trop Dis*, V. 4, n° 2, (Februray 2010), e612.

61. Villanueva, S.Y., Ezoë, H., Baterna, R.A., Yanagihara, Y., Muto, M., Koizumi, N., Fukui, T., Okamoto, Y., Masuzawa, T., Cavinta, L.L., Gloriani, N.G. and Yoshida, S., “Serologic and molecular studies of *Leptospira* and leptospirosis among rats in the Philippines”, *Am J Trop Med Hyg*, V. 82, n° 5, (May 2010), 889--898.

62. Thiermann, A.B., "Incidence of leptospirosis in the Detroit rat population", *Am J Trop Med Hyg*, V. 26, n° 5 Pt 1, (September 1977), 970-974.
63. de Faria, M.T., Calderwood, M.S., Athanazio, D.A., McBride, A.J., Hartskeerl, R.A., Pereira, M.M., Ko, A.I. and Reis, M.G., "Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil", *Acta Trop*, V. 108, n° 1, (October 2008), 1-5.
64. Abdulkader, R.C., Daher, E.F., Camargo, E.D., Spinosa, C. and Da Silva, M.V., "Leptospirosis severity may be associated with the intensity of humoral immune response", *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, V. 44, n° 2, (Mars-April 2002), 79-83.
65. Guerra, M.A., "Leptospirosis", *Journal of American Veterinary Medical Association*, V. 234, n° 4, (February 2009), 472-478.
66. Turner, L.H., "Leptospirosis III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospire", *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, V. 64, n° 4, (1970), 623-646.
67. Vijayachari, P., Sugunan, A.P., Umapathi, T. and Sehgal, S.C., "Evaluation of darkground microscopy as a rapid diagnostic procedure in leptospirosis", *The Indian Journal of Medical Research*, V. 114, (August 2001), 54-58.
68. Ahmad, S.N., Shah, S. and Ahmad F.M.H., "Laboratory diagnosis of leptospirosis", *Journal of Postgraduate Medicine*, V. 51, n° 3, (July-September 2005), 195-200.
69. Faine, S., "Guidelines for leptospirosis control", World Health Organization, Geneva, (1982). 171p.
70. Ellinghausen, H.C. Jr. and McCullough, W.G., "Nutrition of *Leptospira Pomona* and Growth of 13 Other Serotypes: Fractionation of Oleic Albumin Complex and a Medium of Bovine Albumin and Polysorbate 80", *American Journal of Veterinary Research*, V. 26, (January 1965), 45-51.
71. Levett, P.N. and Branch, S.L., "Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in

acute leptospirosis”, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, V. 66, n°6,(Jun 2002), 745-748.

72. Villumsen, S., Pedersen, R., Borre, M.B., Ahrens, P., Jensen, J.S. and Kroghfelt, K.A., “Novel TaqMan® PCR for detection of *Leptospira* species in urine and blood: Pit-falls of in silico validation”, *Journal of Microbiological Methods*, V. 91, n° 1, (October 2012), 184-190.

73. Cousins, D.V., Robertson, G.M. and Hustas, L., “The use of the enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody-response to *Leptospira interrogans* serovars *Hardjo*, *Pomona* and *Tarassovi* in cattle”, *Veterinary Microbiology*, V. 10, n° 5, (August 1985), 439-450.

74. Mérien, F., Amouriaux, P., Pérolat, P., Baranton, G. and Saint-Girons, I., “Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical sample”, *J Clin Microbiol*, V. 30, n° 9, (September 1992), 2219-2224.

75. Thaipadunpanit, J., Chierakul, W., Wuthiekanun, V., Limmathurotsakul, D., Amornchai, P., Boonslip, S., Smythe, L.D., Limpaboon, R., Hoffmaster, A.R., Day, N.P. and Peacock, S.J., “Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and *lipL32* genes for human leptospirosis in Thailand: A case-control study”, *PLoS ONE*, V. 6, n° 1, (January 2011), e16236.

76. Zuerner, R.L., Alt, D.P. and Bolin, C.A., “IS 1533-based assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars”, *J Clin Microbiol*, V. 33, n° 12, (December 1995), 3284-3289.

77. Levett, P.N., Morey, R.E., Galloway, R.L., Turner, D.E., Steigerwalt, A.G. and Mayer, L.W., “Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR”, *J Med Microbiol*, V. 54, n° Pt 1, (January 2005), 45-49.

78. Stoddard, R.A., Gee, J.E., Wilkins, P.P., McCaustland, K. and Hoffmaster, A.R., “Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *LipL32* gene”, *Diagn Microbiol Infect Dis*, V. 64, n° 3, (July 2009), 247-255.

79. Ahmed, A., Engelberts, M.F., Boer, K.R., Ahmed, N. and Hartskeerl, R.A., "Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials", *Plos One*, V. 4, n° 9, (September 2009), e7093.
80. Kositanont, U., Rugsasuk, S., Leelaporn, A., Phulsuksombati, D., Tantitanawat, S. and Nigowit, P., "Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. by multiplex polymerase chain reaction", *Diagn Microbiol Infect Dis*, V. 57, n° 2, (February 2007), 117-122.
81. Merien, F., Portnoi, D., Bourhy, P., Charavay, F., Berlioz-Athaud, A. and Baranton, G., "A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis", *FEMS Microbiology Letters*, V. 249, n° 1, (August 2005), 139-147.
82. Toyokawa, T., Ohnishi, M. and Koizumi, N., "Diagnosis of acute leptospirosis", *Expert Review of Anti-infective Therapy*, V. 9, n° 1, (January 2011), 111-1210.
83. Adler, B., Murphy, A.M., Locarnini, S.A. and Faine, S., "Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay", *Journal of Clinical Microbiology*, V. 11, n° 5, (May 1980), 452-457.
84. Chernukha, Y.G., Shishkina, Z.S., Baryshev, P.M. and Kokovin, I.L., "The dynamics of IgM-and IgG-antibodies in leptospiral infection in man", *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, V. 236, n° 2-3, (November 1976), 336-343.
85. Adler, B., Cousins, D.V., Faine, S. and Robertson, G.M., "Bovine IgM and IgG response to *Leptospira interrogans* serovar hardjo as measured by enzyme immunoassay", *Veterinary Microbiology*, V. 7, n° 6, (December 1982), 577-585.
86. Silva, M.V., Camargo, E.D., Batista, L., Vaz, A.J., Brandão, A.P., Nakamura, P.M. and Negrão, J.M., "Behaviour of specific IgM, IgG and IgA class antibodies in human leptospirosis during the acute phase of the disease and during

convalescence”, *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, V. 98, n° 4, (August 1995), 268-272.

87. Terpstra, W.J., Ligthart, G.S. and Schoone, G.J., “ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis”, *Journal of General Microbiology*, V. 131, n° 2, (February 1985), 377-385.

88. da Silva, M.V., Nakamura, P.M., Camargo, E.D., Batista, L., Vaz, A.J., Romero, E.C. and Brandao, A.P., “Immunodiagnosis of human leptospirosis by dot-ELISA for the detection of IgM, IgG, and IgA antibodies”, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, V. 56, n° 6, (Jun 1997), , 650-655.

89. Cumberland, P., Everard, C.O., Wheeler, J.G. and Levet, P.N., “Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979–1989”, *European Journal of Epidemiology*, V. 17, n°7, (2001), 601-608.

90. Subharat, S., Wilson, P.R., Heuer, C. and Collins-Emerson, J.M., “Evaluation of a SYTO9 real-time polymerase chain reaction assay to detect and identify pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue and urine of New Zealand farmed deer”, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, V. 23, n°4 ,(July 2011), 743-752.

91. Picardeau, M., “Diagnosis and epidemiology of leptospirosis”, *Médecine et Maladies Infectieuses* V. 43, n°1, (Janvier 2013), 1-9.

92. World Health Organization, Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group, Geneva, (2011).
http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=19163&Itemid, (consulté 08/04/2015),

93. O’Keefe, J.S., “A brief review on the laboratory diagnosis of leptospirosis”, *New Zealand Veterinary Journal*, V. 50, n°1, (February 2002), 9-13.

94. Blackmore, D.K., Bahaman, A.R. and Marshall, R.B., “The epidemiological interpretation of serological responses to leptospiral serovars in sheep”, *New Zealand Veterinary Journal*, V. 30, n° 4, (April 1982), 38-42.

95. Shivakumar, S. and Krishnakumar, B., "Diagnosis of Leptospirosis-Role of MAT", Journal of Association of Physicians of India, V. 54, (April 2006), 338-339.
96. Cumberland, P., Everard, C.O. and Levett, P.N., "Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis", American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, V. 61, n° 5, (November 1999), 731-734.
97. Cole, J.R. Jr., Sulzer, C.R. and Pursell, A.R., "Improved microtechnique for the leptospiral microscopic agglutination test", Applied Microbiology, V. 25, n° 6, (Jun1973), 976-80.
98. Thiermann, A.B., "Isolation of leptospire in diagnosis of leptospirosis", Modern Veterinary Practic, V. 65, n° 10, (October 1984), 758-759.
99. Ellis, W.A., O'brien, J.J. and Cassells, J., "Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype *hardjo* infection in Northern Ireland", Veterinary Record, V. 108, n° 26, (Jun 1981), 555-557.
100. Katz, A.R., Effler, P.V. and Ansdell, VE., "Comparison of serology and isolates for the identification of infecting leptospiral serogroups in Hawaii", 1979-1998. Tropical Medicine & International Health, V. 8, n° 7, (July 2003), 639-642.
101. Cerqueira, G.M., McBride, AJ., Queiroz, A., Pinto, L.S., Silva, E.F., Hartskeerl, R.A., Reis, M.G., Ko, A.I. and Dellagostin, O.A. "Monitoring *Leptospira* strain collections: the need for quality control", The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, V. 82, n° 1, (January 2010b), 83-87.
102. Chappel, R.J., Goris, M., Palmer, M.F. and Hartskeerl, R.A., "Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis", Journal of Clinical Microbiology, V. 42, n° 12, (December 2004), 5484-5488.
103. Winslow, W.E., Merry, D.J., Pirc, M.L. and Devine, P.L., "Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin M antibody in diagnosis of human leptospiral infection", Journal of Clinical Microbiology, V. 35, n° 8, (August 1997), 1938-1942.

104. Aslantaş, Ö., “Determination of the Seroprevalence of Leptospirosis in Cattle by MAT and ELISA in Hatay, Turkey”, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, V. 29, n° 4, (July 2005), 1019-1024.
105. Brandão, A.P., Camargo, E.D., da Silva, E.D., Silva, M.V. and Abrão, R.V., “Macroscopic agglutination test for rapid diagnosis of human leptospirosis”, *Journal of Clinical Microbiology*, V. 36, n° 11, (November 1998), 3138-3142.
106. Sakhaee, E., Abdollahpour, Gh.R., Bolourchi, M., Hasani Tabatabayi, A.M. and Sattari Tabrizi, S., “Serologic and bacteriologic diagnosis of bovine leptospirosis in Tehran suburb dairy farms”, *Iranian Journal of Veterinary Research*, University of Shiraz, V 8, n° 4, (November 2007), 325-332.
107. Vijayachari, P., Sugunan, A.P. and Sehgal, S.C., “Evaluation of Lepto Dri Dot as a rapid test for the diagnosis of leptospirosis”, *Epidemiology and Infection*, V. 129, n° 3, (December 2002), 617-621.
108. Blacksell, S.D., Smythe, L., Phetsouvanh, R., Dohnt, M., Hartskeerl, R., Symonds, M., Slack, A., Vongsouvath, M., Davong, V., Lattana, O., Phongmany, S., Keolouangkot, V., White, N.J., Day, N.P. and Newton, .PN., “Limited diagnostic capacities of two commercial assays for the detection of *Leptospira* immunoglobulin M antibodies in Laos”, *Clinical and Vaccine Immunology*, V. 13, n° 10, (October 2006), 1166-1169.
109. Arimitsu, Y., Kmety, E., Ananyina, Y.V., Baranton, G., Ferguson, I.R., Smythe, L. and Terpstra, W.J., “Evaluation of the one-point microcapsule agglutination test for diagnosis of leptospirosis”, *Bulletin of the World Health Organization* 72, n° 3, (1994), 395-399.
110. Terzin, A.L., “Leptospiral Antigens for Use in Complement Fixation Boiling of the Cultures and Acetone Treatment”, *The Journal of Immunology*, V. 76, n° , (May 1956), 366-372.
111. Appassakij, H., Silpapojakul, K., Wansit, R. and Woodtayakorn, J., “Evaluation of the immunofluorescent antibody test for the diagnosis of human leptospirosis”, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, V. 52, n° 4, (April 1995), 340-343.

112. Sulzer, C.R., Glosser, J.W., Rogers, F., Jones, W.L. and Frix, M., "Evaluation of an indirect hemagglutination test for the diagnosis of human leptospirosis", *Journal of Clinical Microbiology*, V. 2, n° 3, (September 1975), 218-221.
113. Ramadass, P., Samuel, B. and Nachimuthu, K., "A rapid latex agglutination test for detection of leptospiral antibodies", *Veterinary Microbiology*, V. 70, n° (1-2), (October 1999), 137-140.
114. Smits, H.L., Ananyina, Y.V., Chereshtsky, A., Dancel, L., Lai-A-Fat, R.F., Chee, H.D., Levett, P.N., Masuzawa, T., Yanagihara, Y., Muthusethupathi, M.A., Sanders, E.J., Sasaki, D.M., Domen, H., Yersin, C., Aye, T., Bragg, S.L., Gussenhoven, G.C., Goris, M.G., Terpstra, W.J. and Hartskeerl, R.A., "International Multicenter Evaluation of the Clinical Utility of a Dipstick Assay for Detection of *Leptospira*-Specific Immunoglobulin M Antibodies in Human Serum Specimens", *Journal of Clinical Microbiology*, V. 37, n° 9, (September 1999), 2904-2909.
115. Plank, R. and Dean, D., "Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans", *Microbes and Infection*, V. 2, n° 10, (August 2000), 1265-1276.
116. Mohamed-Hassan, S.N., Bahaman, A.R. Mutalib and Khairani-Bejo, S., "Prevalence of Pathogenic Leptospire in Rats from Selected Locations in Peninsular Malaysia", *Research Journal of Animal Sciences*, V. 6, n°1, (2012), 12-25.
117. Saint Girons, M.C., "Les Mammifères de France et du Benelux", (Faune Marine Exceptée), Doin, Paris, (1973), 481p.
118. Tremblay, M., "Le Rat", Le jour éditeur, Québec (Collection : Nos amis les animaux), (2001), 175p.
119. Bauck, L. and Bihun, C., "Basic Anatomy, Physiology, Husbandry, and Clinical Techniques" In: Quesenberry K.E., Carpenter J.W. (Eds). "Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery", Second Edition, Saunders, St Louis, (2004), 286-298.

120. Harkness, J.E. and Wagner, J.E., "The biology and medicine of rabbits and rodents", 4th edition Williams & Wilkins compagny, Baltimore, (1995), 372p.
121. Anna, I., Olsson, S. and Westlund, K., "More than numbers matter: The effect of social factors on behavior and welfare of laboratory rodents and non-human primates". *Appl Anim Behav Sci*, V. 103, n° 3-4, (Mars 2007) 229-254.
122. Berdroy, M. and DrickAmmer, L., "Comparative social organization and life history of Rattus and Mus". In: Wolff, J. and Sherman, P., (editors). "Rodent Societies: An Ecological and Evolutionary Perspective", the University of Chicago Press, Chicago, (2007), 610p.
123. Berdroy, M., Smith, P. and MacDonad, D., "Stability of Social Status in Wild Rats: Age and the Role of Settles Dominance", *Behaviour*, V. 132, n° (3-4), (1995), 193-212.
124. Wurbel, H., Burn, C. and Latham, N., "The Behavior of Laboratory Mice and Rats". In: Jensen, P (editor). "The ethology of domestic animals" 2nd edition: an introductory text. CABI, Cambridge, (2009), 246 p.
125. Hurst, J., Bernard, C.J., Hare, R., Whelldon, E.B. and West, C.D., "Housing and welfare in laboratory rats: time-budgeting and pathophysiology in single-sex groups". *Animal Behaviour*, V. 52, n°2, (August 1996), 335-360.
126. Bolles, R., "Grooming behavior in the rat", *J.Comp. Physiol. Psychol*, V. 53, n°3, (Jun 1960), 306-310.
127. Fullerton, H. A. and Berdroy, M., "Rats", In: Tynes V (editor). "Behavior of Exotic Pets". Blackwell Publishing, Cambridge, (August 2010), 104-116, 248 p.
128. Heinrichs, S., "Mouse feeding behavior: ethology, regulatory mechanisms and utility for mutant phenotyping". *Behav Brain Res*, V. 125, n° 1-2, (November 2001), 81-88.
129. Battersby, S., Hirschhorn, B.R. and Amman, R.B., "Commensal rodents". In Bonnefoy, X., Kampen, H. et Sweeney, K., "Public health significance of urban pests", Copenhagen, World Health Organization. (2008), 387-419.

130. Meyer, A., "Urban commensal rodent control: fact or fiction?" In Singleton, R.G., Hinds, A.L., Krebs, J.C., Spratt, M.D. (éd), "Rats, mice and people: rodent biology and management", Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research, (2003), 446-450.
131. Lennox, A. and Bauck, L., "Small rodents". In: Quesenberry, K. et Carpenter, J., (editors). "Ferrets, Rabbits and Rodents Clinical Medicine and Surgery", 3rd edition. Elsevier, St Louis, (2011), 608 p.
132. Barnett, S.A., "The rat: a study in behavior". Chicago, University of Chicago Press, (1975).
133. Galef, B.G. Jr. and Wigmore, S.W., (1983) "Transfer of information concerning distant foods": a laboratory investigation of the "information centre" hypothesis. *Animal Behaviour*, V. 31, n°3, (August 1983), 748–758.
134. Posadas-Andrews, A. and Roper, T.J., "Social transmission of food preferences in adult rats", *Animal Behaviour*, V. 31, n°3, (February 1983), 265–271.
135. Galef, B., Mason, J., Preti, G. and Bean, N., "Carbon Disulfide: A Semiochemical Mediating Socially-Induced Diet Choice in Rats". *Physiol Behav*, V. 42, n°2, (1988), 119-124.
136. Galef, B.G. Jr. and Clark, M.M., "Mother's milk and adult presence: two factors determining initial dietary selection by weanling rats", *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, V. 78, n°2, (February 1972), 220–225.
137. Bond, N.W., "The poisoned partner effect in rats: some parametric considerations". *Animal Learning and Behaviour*, V. 12, n°1, (March 1984), 89–96.
138. Hepper, P.G., "Fetal olfaction". In: MacDonald DW, Muller-Schwarze D, Natynczuk SE, eds. "Chemical signals in vertebrates". Oxford, Oxford University Press: (1990), 282–287.
139. Lanoix J. N. and Roy M. L., "Manuel du technicien sanitaire", organisation mondiale de la santé, Genève, (1976), 193p.

140. Calhoun, J.B., "The ecology and sociology of the Norway rat". Bethesda, MD, United States Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service (document no.1008), (1962).
141. Barnett, S.A., "The Story of rats – their impact on us and our impact on them". Crows Nest, New South Wales, Allen & Unwin. (2001), 213p.
142. Hinds, L.A., Hardy, C.M., Lawson, M.A. and Singleton, G.R., "Developments in Fertility Control For Pest Animal Management. In: Rats, Mice and People: Rodent Biology and Management, Singleton, G.R., Hinds, C.J. Krebs and Spratt, D.M., (Eds), ACIAR Monograph, Australia (2003), 31-36.
143. Chambers, K., Thornton, J. and Roselli, C., "Age-related deficits in brain androgen binding and metabolism, testosterone, and sexual behavior of male rats", *Neurobiol.Aging*, V. 12, n° 2, (Mar-Apr1991), 123-130.
144. Wu, D. and Gore, A., "Changes in androgen receptor, estrogen receptor alpha, and sexual behavior with aging and testosterone in male rats", *Horm Behav*, V. 58, n° 2, (July 2010), 306-316.
145. Sharp, P.E., La Regina, M.C. and Suckow, M.A., "The Laboratory Rat", CRC Press, Boca Raton (collection: The Laboratory Animal Pocket Reference Series), (1998), 214p.
146. Jacobs, G., Fenwick, J. and Williams, G., "Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights". *J Exp Biol*, V. 204, n°14, (July 2001), 2439-2446.
147. Kohn, D. and Clifford, C., "Biology and diseases of rats". In: Fox, J., Anderson, L., Loew, F. and Quimby, F., (editors). "Laboratory Animal Medicine", 2nd Edition. Elsevier, San Diego, (2002), 900 p.
148. Lavail, M., "Survival of some photoreceptor cells in albino rats following long-term exposure to continuous light". *Invest Ophtalmol*, V. 15, n°1, (January 1976), 64-70.
149. Fallon, M., "Rats and Mice". In: Laber-Laid, K, Swindle, M. and Flecknell, P., (editors), "Handbook of rodent and rabbit medicine", Pergamon, (1996), 1-7, 278 p.

150. Burn, C., "What is it like to be a rat? Rat sensory perception and its implications for experimental design and rat welfare?", *Appl. Anim. Behav. Sci.*, V. 112, n°1-2, (July 2008), 1-32.
151. Hanson, A., "Norway Rat Behavior Repertoire", (En ligne), [<http://www.ratbehavior.org>], Mise à jour en 2012, (Accès le 5/08/2015).
152. Evans, E., "Comportement des petits rongeurs". In: BOBU D (editor). "Comprendre le comportement des NAC", Elsevier Masson SAS, Issy-les-Moulineaux, (2008), 283-310, 407 p.
153. Wallace, D., Gorny, B, and Wishaw, I., "Rats can track odors, other rats, and themselves: implications for the study of spatial behavior", *Behav Brain Res.*, V. 131, n° 1-2, (April 2002), 185-192.
154. Zfang, J., Sun, L., Zhang, J. and Feng, Z., "Sex- and Gonad-Affecting Scent Compounds and 3 Male Pheromones in the Rat", *Chem Senses*, V. 33, n° 7, (September 2008), 611-621.
155. Bridier, E., Aure, F., Mottier, F., Nivet, A., Lai-Man, G. and Boyer, N., "Les rongeurs à la Réunion, sources de nombreux fléaux", *Phytoma Déf. Vég.*, V. 595, (July 2006), 9-12.
156. Twigg, G., *The brown rat*. Devon, David & Charles (Holdings) Ltd, (1975), 150p.
157. Greaves, J.H., Hammond, L.E. and Bathard, A.H., "The control of re-invasion by rats of part of a sewer network", *The Annals of Applied Biology*, V. 62, n°2, (October 1968), 341–351.
158. MacDonald, D.W, Mathews, F. and Berdoy, M., "The behavior and ecology of *Rattus norvegicus*: from opportunism to kamikaze tendencies". In: Singleton GR et al., eds, "Ecologybased rodent management", Monograph No. 59. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research (1999), 49–80.
159. Langton, S.D., Cowan, D.P. and Meyer, A.N., "The occurrence of commensal rodents in dwellings as revealed by the 1996 English House Condition Survey", *Journal of Applied Ecology*, V. 38, n°4, (August 2001), 699–709.

160. Davis, D.E., "The Characteristics of Rat Populations", *Quart. Rev. Biol*, V. 28, n°4, (December 1953), 373-401.
161. Taylor, K.D. and Quy, R.J., "Long distance movements of a common rat (*Rattus norvegicus*) revealed by radio tracking". *Mammalia*, V. 42, n°1, (January 1978), 63–71.
162. Corrigan, M.R., "Rodent control: A practical guide for pest management professionals", Moreland, D. édition, Cleveland, GIE Media,. (Collection Pest control technology), (2001), 355 p.
163. Sehgal, S.C., "Epidemiological pattern of leptospirosis", *Indian J Med Microbiol*, V. 24, n°4, (October 2006), 310-311.
164. Howald, G., Donlan, C.J., Galvan, J.P., Russell, J.C., Parkes J, Samaniego, A., Wang, Y., Veitch, D., Genovesi, P., Pascal, M, Saunders, A. and Tershy, B., "Invasive rodent eradication on islands", *Conserv Biol*, V. 21, n° 5, (October 2007), 1258-1268.
165. Hermann Storck, C., Postic, D., Lamaury, I. and Perez, J.M., "Changes in epidemiology of leptospirosis in 2003–2004, a two El Nino southern oscillation period, Guadeloupe archipelago", *French West Indies. Epidemiol Infect*, V. 136, n° 10, (October 2008), 1407-1415.
166. Reis, R.B., Ribeiro, G.S., Felzemburgh, R.D.M., Santana, F.S., Mohr, S., Astrid, X.T.O.M, Queiroz, A., Santos, A.C., Ravines, R.R., Tassinari, W.S., Carvalho, M.S., Reis, M.G. and Ko, A.I., "Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums". *PLoS Negl Trop Dis*, V. 2, n° 4, (April 2008), e228.
167. Lhomme, V., Grolier-Bois, L., Jouannelle, J. and Elisabeth, L., "Leptospirosis in Martinique from 1987 to 1992: results of an epidemiological, clinical and biological study", *Med Mal Infect*, V. 26, n° 2, (1996), 94-98.
168. Berlioz-Arthaud, A., Kiedrzyński, T., Singh, N., Yvon, J-F., Roualen, G., Coudert, C. and Uliviti, V., "Multicentre survey of incidence and public health impact of leptospirosis in the Western Pacific". *Trans R Soc Trop Med Hyg*, V. 101, n°7, (July 2007), 714-721.

169. Mathias, M.A., Ricaldi, M., Cespedes, M., Diaz., M.M., Galloway, R.L., Saito.M., Steigerwalt, A.G., Patra, K.P., Ore, C.V., Gotuzzo, E., Gilman, R.H., Levett, P.N. and Vinetz, J.M., "Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon", PLoS.Dis, V. 2, n° 4, (Apr 2008), 1-12.
170. Vintz, J.M., G.E. Glass, C.E. Flexner, P. Mueller and D.C. Kaslow, "Sporadic urban leptospirosis", Ann.Intern.Med, V. 125, n° 10, (November 1996), 794-798.
171. Sarkar, U., Nascimento, S., Barbosa, R., Martins, R., Nuevo, H., Kalofonos, I., Grunstein, I., Flannery, B., Dias, J., Riley, L.W., Reis, M.G. and Ko, A.I., "Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic", Am J Trop Med Hyg, V. 66, n°5 , (May 2002), 605-610.
172. Barcellos, C., Lammerhirt, C.B., de Almeida, M.A.B. and dos Santos, E., "Spatial distribution of leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: recovering the ecology of ecological studies", Cad Saude Publica, V. 19, n° 5, (Sept-Oct 2003), 1283-1292.
173. Davis, S., Calvet, E. and Leirs, H., "Fluctuating rodent populations and risk to humans from rodent-borne zoonoses", Vect Borne Zoo Dis, V. 5, n°4, (Winter 2005), 305-314.
174. Holt, J., Davis, S. and Leirs, H., "A model of leptospirosis infection in an African rodent to determine risk to humans: seasonal fluctuations and the impact of rodent control", Acta Trop, V. 99, n° (2-3), (October 2006), 218-225.
175. Barmettler, R., Schweighauser, A., Bigler, S., Grooters, A.M. and Francey, T., "Assessment of exposure to *Leptospira* serovars in veterinary staff and dog owners in contact with infected dogs", J Am Vet Med Assoc, V. 238, n° 2, (January 2011), 183-188.
176. Brown, K. and Prescott, J., "Leptospirosis in the family dog: a public health perspective", Cmaj, V. 178, n°4, (Februray 2008), 399-401.
- .

177. World Health Organization, "Report of the first meeting of the Leptospirosis burden Epidemiology Reference Group (LERG)". Geneva, Switzerland: World Health Organization, (2010), 40 p.
178. Amara-Korba, A., Communication Libre, "Leptospiroses actualité en Algérie", Journée Scientifique Initiation aux méthodes de la systematiques des des mammifères du terrain aux analyses moléculaire-Programme PHC Tassili-IPA et le Museum National de Paris du 16/10/2011 au 20/06/2011.
179. Données de la direction de la santé et de la population de la wilaya de Blida.
180. Monahan, A.M., Callanan, J.J. and Nally, J.E., Review paper: "Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis", *Vet Pathol* V. 46, n° 5, (September 2009), 792-799.
181. Baranton, G. and Old, I.G., "The Spirochaetes: a different way of life", *Bull Inst Pasteur*, V. 93, n°2, (1995) 63-95.
182. Vinetz, J.M., Wilcock, B.A., Aguirre, A., Gollin, L.X., Katz, A.R., Fujioka RS., Maly, K., Horwitz, P. and Chang, H., "Beyond disciplinary boundaries: leptospirosis as a model of incorporating transdisciplinary approaches to understand infectious disease emergence", *EcoHealth*, V. 2, (November 2005) 291-306.
183. World Health Organization., "Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control", (2003), 122p.
184. Levillain, A., "La leptospirose aux Antilles", Mémoire de l'Ecole Nationale de la Sante Publique, France, (2001), 49p.
185. Nardone, A., Campese, C. and Capek, I., "Les facteurs de risques de leptospirose en France métropolitaine Une étude cas-témoin", Rapport de l'institut national de médecine agricole et l'institut de veille sanitaire français, (2000), 54p.
186. Ristow, P., "La leptospirose: les défis actuels d'une ancienne maladie", *Bull. Acad. Vét. France*, V. 160, n° 4, (2007a).
187. Sharma, M. and Yadav, A., "Leptospirosis: Epidemiology, Diagnosis, and Control", *Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents*, V. 25, (May-August 2008), 93-103.

188. Catalina, P., "Leptospirose et entreprises. Conduite à tenir" (2004), 5p.
189. Houpikian, P., Perolat, P., Baranton, G. and Brouqui, P., "Leptospiroses", *Encycl Med Chir (Editions Scientifiques et Medicales Elsevier SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8-039-Q-10, (2002), 14 p.*
190. Goldstein, R.E., "Canine leptospirosis", *Vet. Clin. Small. Anim. V. 40, (2010), 1091-1101.*
191. Prabhu, N., Natarajaseenivasan, K. and Joseph, Pushpa Innocent, D., "Survey of leptospiral pathogens carried by rodents at different areas of Tiruchirapalli, India", *International Journal of Extensive Research, V. 6, (2015), 26-31.*
192. Toma, B., Dufour, B., Sanaa, M., Benet, J.J., Shaw, A., Mouton, F. and Louza, A., "Epidemiologie Appliquée à la lutte contre les maladies animales transmissibles majeures", deuxième édition, France, (2001), p 693.
193. Lazuga, K. et Bonnefous, S., "Contribution a l'étude de la leptospirose chez les rats de la ville de Tunis", *Archive Institut Pasteur Tunis, V.39, (Mars 1962), 49-65.*
194. Auffray, J.C., Blasdell, K., Bordes, F., Chabé, M., Chaisiri, K., Charbonnel, N., Chaval, Y., Claude, J., Cosson, J.F., Dei-Cas8. E., Desquesnes, M., Dobigny, G., Douangboupha, B., Galan, M., Haukisalmi, V., Henttonen, H., Herbreteau, V., Hugot, J.P., Jiyipong, T., Latinne, A., Michaux, J., Milocco, C., Morand, S., Pagès, M., Phoophitpong, D., Pumhom, P., Salvador, A.R., Soonchan, S., Suputtamongkol, Y., Waengsothorn, S., Waywa, D. and Xuéreb, A., "Protocols for field and laboratory rodent studies ", *Kasetsart University Press, (2011), 46p.*
195. Office National des Ressources Hydrique, Route de Soumaa.
196. Wobeser, G., "Investigation and management of disease in wild animals", Ed. Plenum Press, New York, (1994), 265p.
197. Fromont, E. et Sophie Rossi, S., "Echantillonnage en faune sauvage : Quelques questions sur la taille d'échantillon", *Epidémiol. et santé anim, V. 37, (2000), 11-19.*

198. Levett, P.N., "Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis", *Clin Infect Dis*, V 36, n°4 (February 2003), 447-452.
199. Villanueva, S., Ezoë, H., Baterna, R.A., Yanagihara, Y., Muto, M., Koizumi, N., Fukui, T., Okamoto, Y., Masuzawa, T, Cavinta, L.L., Gloriani, N.G. Yoshida, S., "Serologic and molecular studies of *Leptospira* and leptospirosis among rats in the Philippines", *Am J Trop Med Hyg*, V. 82, n° 5, (May2010), 889-898.
200. Vanasco, N.B., Lottersberger, J., Sequeira, M.D. and Tarabla, H., "Development and validation of an ELISA for the detection of leptospire-specific antibodies in rodents", *Vet Microbiol*, V. 82, n° 4 (October 2001), 321–330.
201. Loan, H.K., Cuong, N.V., Takhampunya, R., Kiet, B.T., Campbell, J., Them, L.N., Bryant, J.E., Tippayachai, B., Hoang, N.V., Morand, S., Hien,V.B. and Carrique-Mas, J.J., "How Important Are Rats As Vectors of Leptospirosis in the Mekong Delta of Vietnam?", *vector-borne and zoonotic diseases*, V. 15, n°1, (January 2015), 56-64.
202. Felt , S.A., Wasfy , M.O., El-Tras , W.F., Samir , A., Abdel Rahaman , B., Boshra , M., Parker , T.M., Hatem , M.E., El-Bassiouny , A.A., Murray , C.K. Pimentel, G., "Cross-Species Surveillance of *Leptospira* in Domestic and Peri-Domestic Animals in Mahalla City, Gharbeya Governorate, Egypt", V. 83, n°3, (March 2011), 420-425.
203. Agudelo-Flórez , P., Londoño ,A.F. , Quiroz , V.H., Ángel ,J.C., Moreno , N., Loaiza , E.T., Muñoz , L.F. and Rodas, J.D., "Prevalence of *Leptospira* spp. in Urban Rodents from a Groceries Trade Center of Medellín, Colombia", *Am. J. Trop. Med. Hyg*, V. 81, n°5, (November 2009), 906-910.
204. Sunbul, M., ESEN, S., Leblebicioglu, H., Hokelek, M., Pekbay, A. and Eroglu, C., "Rattus Norvegicus Acting as Reservoir of *Leptospira interrogans* in the Middle Black Sea Region of Turkey, as Evidenced by PCR and Presence of Serum Antibodies to *Leptospira* Strain", *Scand J Infect*, V. 33, (2001), 896-898.
205. Samir, A., Soliman, R.K., El-Hariri, M., Abdel-Moein, K. and Essam Hatem, M., "Leptospirosis in animals and human contacts in Egypt: broad range

surveillance”, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, V. 48, n°3, (May-Jun, 2015), 272-277.

206. Archives, Service d’hygiène de la commune de Blida.

207. Niwetpathomwat, A., Niwatayakul, K. and Doungchawee, G., “Surveillance of leptospirosis after flooding at Loei Province, Thailand by year 2002”, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, V. 36, (2005), 202-205.

208. World Health Organization, (WHO), “Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control”, Geneva: WHO; 2003. (Cited 2015 April). Available at: http://www.who.int/csr/don/en/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.23.pdf

209. Esfandiari, B., Pourshafie, M.R., Gouya , M.M., Khaki, P., Mostafavi, E., Darvish, D, Bidhendi, S.M., Hanifi,H. and Nahrevanian, H., “ An epidemiological comparative study on diagnosis of rodent leptospirosis in Mazandaran Province, northern Iran”, *Epidemiology and Health*, V. 37, n° e2015012, (February 2015), 9p.

210. Hartskeerl, R. A., Collares-Pereira, M. and W. A. Ellis., “Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world”, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, V. 17, (2011), 494–501.