



Étude de la place du Ragondin (*Myocastor coypus*) dans le cycle épidémiologique de la leptospirose et dans la contamination du milieu aquatique en zones humides à partir de deux populations de l'est de la France

Julie Vein

► To cite this version:

Julie Vein. Étude de la place du Ragondin (*Myocastor coypus*) dans le cycle épidémiologique de la leptospirose et dans la contamination du milieu aquatique en zones humides à partir de deux populations de l'est de la France. Santé publique et épidémiologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10052 . tel-01082866

HAL Id: tel-01082866

<https://theses.hal.science/tel-01082866>

Submitted on 14 Nov 2014

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

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

N° d'ordre 52-2013

Année 2013

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCE-SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT (arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 15 avril 2013 à Marcy L'Etoile

par

M^{lle} Julie VEIN

**ETUDE DE LA PLACE DU RAGONDIN (*MYOCASTOR COYPUS*) DANS LE CYCLE
EPIDEMIOLOGIQUE DE LA LEPTOSPIROSE ET DANS LA CONTAMINATION DU MILIEU
AQUATIQUE EN ZONES HUMIDES A PARTIR DE DEUX POPULATIONS DE L'EST DE LA FRANCE**

Directeur de thèse : M. Philippe BERNY (*Professeur, VetAgro Sup*)

Co-directeurs de thèse : Mme Agnès LEBLOND (*Professeur, VetAgro Sup*) et M. Angeli KODJO
(*Professeur, VetAgro Sup*)

JURY : M. Jean François COSSON (*Directeur de Recherche, INRA*)
M. Bernard DAVOUST (*Docteur Vétérinaire, Aix Marseille Université*)
Mme Monique L'HOSTIS (*Professeur, ONIRIS Nantes*)
M. Dominique PEYRAMOND (*Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, UCBL*)
M. Mathieu PICARDEAU (*Directeur d'Unité, Institut Pasteur Paris*)

« On se lasse de tout excepté d'apprendre »

Virgile

A ma mère,
que de chemin parcouru depuis que tu es partie...

Je tiens à remercier très sincèrement mes directeurs de thèse les Professeurs Philippe Berny, Agnès Leblond et Angeli Kodjo et à leur exprimer ma très grande reconnaissance pour l'aide qu'ils m'ont apporté et leur disponibilité (malgré parfois des soucis indépendants de leur volonté et leurs emplois du temps chargés !). Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans chacun de vous. Encore un très grand merci pour vos conseils et votre confiance en mon travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur Monique L'Hostis et aux Docteurs Jean François Cosson et Mathieu Picardeau pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi qu'au Professeur Dominique Peyramond et au Docteur Bernard Davoust pour avoir accepté de faire partie du jury de soutenance.

Un très grand merci à toutes les personnes qui m'ont aidé pour le travail de terrain, cette thèse n'aurait pas pu se faire sans vous :

- Dans la Dombes : l'ADPA et en particulier son président M. Rousset et les piégeurs qui m'ont accompagné, M. Bonhomme, M. Lagnier, M. Rossini et M. Thévenet ; la Fondation Pierre Vérôts et en particulier M. Castanier et M. Rabatel
- Dans la Vallée de l'Ognon : la FRCFC, particulièrement Charlette Chandosne ; les Associations Départementales des Piégeurs du Doubs, du Jura et de la Haute Saône et particulièrement les piégeurs avec qui j'ai travaillé, M. Barbe, M. Corvec, M. Delavelle, M. Gomot, M. Josselin, M. Marchiset, M. Sanseigne et M. Touret ; la FREDON de Franche Comté.

Merci à toutes les équipes du Campus Vétérinaire qui m'ont aidé tout au long de ce travail

- Aux « habitants » de l'aile 1 niveau 2, merci à tous pour votre présence et votre soutien : Valérie (merci pour la logistique et surtout pour nos discussions et échanges de thés !), Danièle, Isabelle, Aurélien (Ratman), Flo, Aurélien G, Nicole (pour la biblio), Stéphane, Caroline, Bernadette, Romain
- A l'équipe de biochimie et particulièrement un grand merci Etienne et Christiane, qui m'ont formé aux méthodes génomiques.
- Au « labo Lepto », notamment Zorée, pour tes conseils et ta gentillesse, Kevin, Claire et Sandrine pour votre aide avec mes manip'
- A Patrick Belli pour m'avoir aidé avec mes premières autopsies et pour les analyses histologiques et à toute l'équipe de la salle d'autopsie, notamment M. Abelous, pour leur accueil et leur disponibilité.

Merci à toute l'équipe du LVD 25 pour leur accueil et en particulier Marc Hessemann et Natacha Woronoff.

Merci à l'AFSSET/ANSES pour le financement de ce travail.

Aux Masters, Doctorants et ex-Doctorants de VetAgro Sup ou qui y ont fait un saut : dans le désordre, Aurélie, Micka, Alex, Agnès, Jon (tu nous manques !), Julie (la p'tite), Alice, Farah, Audrey, Thibaut, Lauriane, Pierre, Loris, Abdé, Magali, Anne-Laure, Joffrey merci pour votre

présence, votre soutien (mais non t'es pas toute seule dans c'te galère), les apéros doctorants.... Je vous souhaite à tous le meilleur pour la suite !

A mon père, pour sa patience, son soutien, sa compréhension, son aide et surtout son affection en toutes circonstances. A ma sœur Fanny, pour nos moments de complicité et tout ce qu'on a partagé pendant ces années. A toute ma famille. A Christiane, Roland et Tom ma deuxième famille.

A tous mes amis de France ou d'ailleurs. Vétos, Cavaliers, Naturalistes, Rôlistes et tous les autres..... Mes amis quoi ! Vous vous reconnaitrez j'en suis sûre. Pour m'avoir soutenu et aidé. En souvenir de tous les excellents moments qu'on a partagé par le passé et en espérant que cela continue encore très longtemps....

A toutes celles et tous ceux qui ont un jour croisé ma route et qui font chaque jour que ma vie est ce qu'elle est.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES ANNEXES	17
1^{ère} PARTIE : CONTEXTE GENERAL	19
I. INTRODUCTION.....	21
II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	23
A. A propos des leptospires et de la leptospirose	23
1. Présentation du genre <i>Leptospira</i>	23
1.1 Morphologie et caractéristiques bactériologiques.....	23
1.2 Systématique	25
1.2.1 Classification sérologique.....	25
1.2.2 Classification génomique.....	26
1.3 Milieu de vie	27
2. La leptospirose	28
2.1 Situation épidémiologique humaine	28
2.2 Formes cliniques chez l'Homme et les animaux domestiques	29
2.2.1 Pathogénie et facteurs de virulence	29
2.2.2 La leptospirose humaine	32
2.2.3 Les leptospires chez les animaux domestiques	33
2.3 Méthodes de diagnostic chez l'Homme et les animaux.....	34
2.3.1 La culture	34
2.3.2 Les techniques sérologiques	34
2.3.3 Les techniques génomiques	35
3. Le cycle épidémiologique de la leptospirose.....	36
3.1 Modalités de transmission	36
3.2 La notion d'hôte-réservoir.....	37
3.3 Des espèces animales avec des situations contrastées	38
B. A propos du Ragondin (<i>Myocastor coypus</i>)	41
1. Présentation de l'espèce	41
1.1 Systématique	41

1.2 Aire de distribution et statut juridique.....	41
1.2.1 Aire de répartition originelle	41
1.2.2 Zones d'introduction	42
1.3 Morphologie	43
2. Biologie et écologie dans ses zones d'introduction.....	44
2.1 Habitat.....	44
2.2 Régime alimentaire.....	44
2.3 Reproduction.....	45
2.4 Paramètres démographiques.....	45
3. Problèmes liés à l'introduction du Ragondin dans un écosystème européen.....	46
4. Le Ragondin et la Leptospirose.....	49
III. OBJECTIFS GENERAUX	51
2^{ème} PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE.....	53
I. MATERIEL ET METHODES	55
A. Sites d'étude.....	55
B. Collecte des échantillons et des données	57
1. Animaux piégés.....	57
2. Prélèvements d'eau.....	58
3. Données environnementales	58
C. Analyses réalisées.....	59
1. Autopsies	59
2. Histologie	60
3. Sérologie.....	60
4. Mise en culture et isolement.....	61
5. QPCR sur les reins.....	62
6. Détection des leptospires dans l'eau	62
7. Analyses statistiques.....	63
8. Cartographie.....	63
II. SUIVI DE LA CONTAMINATION DES POPULATIONS DE RAGONDIN DANS DEUX ZONES HUMIDES	64
A. Présentation des résultats de piégeage et de contamination.....	64
B. Place du Ragondin dans le cycle épidémiologique de la leptospirose.....	72
III. MISE EN PLACE D'UN OUTIL DE SUIVI DE LA CONTAMINATION ENVIRONNEMENTALE.....	100
3^{ème} PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	109
I. DISCUSSION	111

A. Discussion méthodologique	111
B. Discussion des principaux résultats.....	114
II. PERSPECTIVES	119
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123
ANNEXES	141
ABSTRACT	183
RESUME	186

LISTE DES ABBREVIATIONS

- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **AVMA** : American Veterinary Medical Association
- **CAAT** : Cross Agglutination Absorption Test
- **CNR** : Centre National de Référence
- **ELISA** : Enzyme-linked immunosorbent assay
- **Milieu EMJH** : milieu crée par Ellinghausen et McCullough modifié par Johnson et Harris
- **GPS** : Global Positioning System
- **IC 95 %** : intervalle de confiance à 95 %
- **InVS** : Institut de Veille Sanitaire
- **LPS** : Lipopolysaccharide
- **MAT** : Micro-Agglutination Test
- **MLST** : Multi Locus Sequence Typing
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **PSM** : Poste de Sécurité Microbiologique
- **QPCR** : Quantitative Polymerase Chain Reaction
- **UICN** : Union Internationale de Conservation de la Nature
- **VNTR** : Variable Number Tandem Repeat
- **WHO / OMS** : World Health Organization / Organisation Mondiale de la Santé

LISTE DES FIGURES

• Figure 1 : Micrographie électronique d'un leptospire	23
• Figure 2 : Schéma de la double membrane d'un leptospire	24
• Figure 3 : Pathogénie de la leptospirose	30
• Figure 4 : Cycle épidémiologique de la leptospirose	37
• Figure 5 : Localisation des deux zones d'étude	56
• Figure 6a : Nombre de ragondins piégés en fonction du site dans la Basse Vallée de l'Ognon	65
• Figure 6b : Nombre de ragondins piégés en fonction du site dans la Dombes	66
• Figure 7a : Répartition des résultats des tests sérologiques en fonction du site dans la Basse Vallée de l'Ognon	67
• Figure 7b : Répartition des résultats des tests sérologiques en fonction du site dans la Dombes	68
• Figure 8a : Répartition des résultats des tests sérologiques en termes de séroroupe majoritaire dans la Basse Vallée de l'Ognon	69
• Figure 8b : Répartition des résultats des tests sérologiques en termes de séroroupe majoritaire dans la Dombes	69
• Figure 9a : Répartition des résultats des tests de portage rénal par QPCR en fonction du site dans la Basse Vallée de l'Ognon	70
• Figure 9b : Répartition des résultats des tests de portage rénal par QPCR en fonction du site dans la Dombes	71

LISTE DES ANNEXES

• Annexe I : Arrêté ministériel du 30/09/1998	143
• Annexe II : Arrêté ministériel du 03/04/2012	144
• Annexe III : Arrêtés préfectoraux de déclaration des espèces nuisibles dans le département de l'Ain	146
• Annexe IV : Arrêtés préfectoraux de déclaration des espèces nuisibles dans le département du Doubs	158
• Annexe V : Arrêtés préfectoraux de déclaration des espèces nuisibles dans le département du Jura	164
• Annexe VI : Arrêtés préfectoraux de déclaration des espèces nuisibles dans le département de la Haute-Saône	170
• Annexe VII : Fiches de recueil des données environnementales	175
• Annexe VIII : Fiche de recueil des données d'autopsie	178
• Annexe IX : Liste des publications scientifiques, communications orales et affiches	180

1^{ère} PARTIE :
CONTEXTE GENERAL

I. INTRODUCTION

Le Monde fait actuellement face à une crise écologique qui s'exprime à travers l'expression « Changements globaux ». Ceux-ci sont définis comme l'ensemble des modifications de grande ampleur d'origine anthropique et/ou climatique qui affectent l'environnement à l'échelle planétaire. Or des études récentes montrent que l'émergence (ou la ré-émergence) de maladies infectieuses est largement corrélée avec des changements environnementaux tels que des variations affectant le climat (température, précipitations), les aires de répartition de vecteurs et même des facteurs socio-économiques (Jones et al. 2008). A l'heure actuelle, on considère que plus de 60 % des infections humaines sont des zoonoses parmi lesquelles plus de 70 % sont liées à la faune sauvage (Karesh et al. 2012, Jones et al. 2008). Or parmi les changements environnementaux d'origine anthropique, l'importation d'animaux vivants, que ce soit dans le cadre d'échanges commerciaux (animaux de rente, nouveaux animaux de compagnie), de trafics illégaux, ou d'introductions involontaires avec d'autres marchandises, peut être une des sources principales de modification des écosystèmes par dissémination non-intentionnelle et générer de nombreuses conséquences tant économiques que sanitaires (Gebhardt 1996, Lowe et al. 2000, Zepeda et al. 2001).

La leptospirose est une zoonose de répartition mondiale. La France métropolitaine possède la plus forte incidence constatée parmi les pays de l'Europe de l'Ouest (0,4 cas / 100 000 habitants), bien que celle-ci soit très largement inférieure à celle des pays tropicaux (Baranton & Postic 2006). Une étude de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) souligne le rôle de plus en plus prédominant des loisirs aquatiques en tant que facteur de risque de contracter la maladie. Le contact avec des rongeurs sauvages est aussi mentionné comme facteur de risque dans cette étude (Nardone et al. 2004). L'épidémiologie de la maladie humaine laisse à penser que cette zoonose pourrait être en augmentation avec le réchauffement climatique, sans parler des crises sanitaires et des recrudescences de cas associées à des événements climatiques ponctuels (Baranton & Postic, 2006). La

leptospirose est transmise par contact direct ou indirect avec l'urine contaminée d'un animal infecté. Les bactéries pénètrent par les plaies, les abrasions cutanées mais aussi par la conjonctive. Il est également possible de s'infecter par inhalation d'aérosol ou d'eau contaminée et contact avec la muqueuse respiratoire (Levett, 2004). Les espèces animales et l'Homme sont séparés en deux groupes : les hôtes réservoirs et les hôtes accidentels. Chez les réservoirs, l'infection est généralement endémique, asymptomatique et transmise entre animaux par contact direct le plus souvent, mais la voie indirecte est également possible. Les animaux excrètent de façon chronique des bactéries. Pour les seconds (Homme, Chien, Cheval...), ils se contaminent lors d'un contact indirect avec l'hôte réservoir. Les principaux réservoirs identifiés sont des mammifères commensaux comme les Rongeurs. Une espèce animale, comme le Chien, peut être réservoir pour un sérovar et hôte accidentel pour un autre (Bharti et al. 2003).

Le Ragondin (*Myocastor coypus*) est un gros rongeur d'Amérique du Sud qui a été introduit en France pour développer l'industrie de la pelleterie. Dès le début du XX^e siècle, des individus se sont échappés des fermes et des populations se sont établies dans le sud-ouest du pays. Actuellement, l'espèce est présente sur tout le territoire (Carter & Leonard 2002, Le Louarn & Quéré 2003). Le Ragondin est considéré par l'Union Internationale de Conservation de la Nature (UICN) comme l'une des 100 espèces invasives les plus problématiques (Lowe et al. 2000). Comme le précisent tous les auteurs qui travaillent sur la leptospirose, on ne peut comprendre l'épidémiologie de cette maladie que si on maîtrise les sources environnementales, donc les réservoirs. Or si le portage de leptospires par le Ragondin a été détecté dès 1949 dans son aire de répartition originale, il a fallu attendre les années 2000 pour qu'une étude soit menée à ce sujet en France sur la façade ouest (Michel et al. 2001).

Notre étude avait pour but d'évaluer le rôle du Ragondin dans l'épidémiologie de la leptospirose dans les zones humides tant d'un point de vue de la circulation que du portage de la bactérie que de celui de la contamination de l'environnement.

II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

A. A propos des leptospires et de la leptospirose

1. Présentation du genre *Leptospira*

Les leptospires sont des bactéries qui font partie de l'Ordre des Spirochaetales et de la famille des *Leptospiraceae* (Faine et al. 1999)

1.1 Morphologie et caractéristiques bactériologiques

Les leptospires (Figure 1) sont des bactéries en forme de fin filaments spiralés de 0.1 μm de diamètre sur 10 à 20 μm de longueur, avec une amplitude hélicoïdale de 0.1 à 0.15 μm et une longueur d'onde de 0.5 μm . Les leptospires en culture ont parfois tendance à être légèrement plus longs et avec une hélice moins serrée que les leptospires fraîchement isolés. Au moins une des extrémités forme un crochet caractéristique. Tous les leptospires possèdent deux flagelles périplasmiques, chacun étant inséré à une extrémité dans l'espace périplasmique, de structure moléculaire complexe (Faine et al. 1999, Levett 2001).



Figure 1 : Micrographie électronique d'un leptospire (Image International Leptospirosis Society <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ils.html>)

Les leptospires, comme tous les Spirochètes, possèdent une double membrane : la membrane cytoplasmique qui est associée à une couche de peptidoglycanes et la membrane externe sur laquelle sont fixés des lipopolysaccharides : le LPS (Figure 2). Le

LPS des leptospires se rapproche de celui des bactéries Gram-négatives bien qu'il n'ait pas une activité endotoxinique aussi puissante (Levett 2001, Ko et al. 2009). Les leptospires ne prennent pas la coloration de Gram.

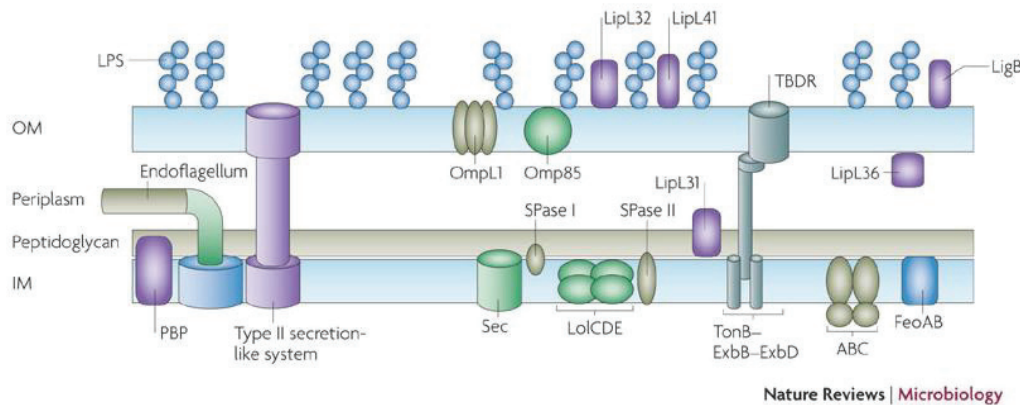


Figure 2 : Schéma de la double membrane d'un leptospire (issu de Ko et al. 2009)

IM = membrane cytoplasmique, OM = membrane externe, LPS = lipopolysaccharide, OmpL1, Omp85, LipL32, LipL41, LigB, LipL36, PBP, Sec, Spase I, SPase II, LolCDE, TonB-ExbB-ExbD, ABC, FeoAB sont certaines des protéines constitutives de la double membrane qui ont été identifiées à l'heure actuelle

Les leptospires sont des bactéries mobiles grâce à leurs flagelles : les mouvements peuvent être soit des mouvements de rotation autour de leur axe soit des mouvements de translation en ligne droite ou sur des grands arcs de cercle (Faine et al. 1999).

Les leptospires sont des bactéries aérobies strictes avec une température optimale de croissance entre 28 et 30 °C pour les souches pathogènes. La culture se fait principalement sur milieu liquide et le milieu le plus couramment utilisé est le milieu dit EMJH (Ellinghausen & McCullough 1965 modifié par Johnson & Harris 1967) qui contient du Tween 80 pour l'apport en acide gras et de l'albumine de sérum bovin pour l'apport protéique (Levett 2001). Le temps de doublement *in vitro* en milieu EMJH des leptospires pathogènes est de l'ordre de 24 heures ce qui rend les cultures longues et lors d'isolement les cultures sont conservées pendant 12 à 13 semaines avant d'être déclarées négatives.

- Les leptospires sont des filaments hélicoïdaux de dimension 0.1 µm sur 10 à 20 µm.
- Ces bactéries sont mobiles grâce à leurs flagelles périplasmiques et possèdent une double membrane caractéristique..
- Les leptospires sont des bactéries aérobies strictes, présentant des caractéristiques proches des bactéries Gram Négatif (présence d'une double membrane, d'un LPS) mais n'appartenant pas *stricto sensu* à ce groupe.
- La culture des leptospires pathogènes est longue et compliquée et se réalise sur un milieu très riche entre 28 et 30°C.

1.2 Systématique

Une première classification des leptospires a été établie sur une base sérologique puis, suite à des études d'hybridation ADN-ADN, une classification génomique a été développée (Yasuda et al. 1987).

1.2.1 *Classification sérologique*

Dans cette classification, les souches ont été séparées en deux « espèces » en fonction de leur caractère de virulence. Les souches pathogènes ont été regroupées au sein de l'espèce *Leptospira interrogans* sensu lato et les souches saprophytes au sein de l'espèce *L. biflexa* s.l. Toutefois cette séparation en fonction uniquement de la pathogénicité n'a plus cours actuellement et les appellations *L. interrogans* s.l. et *L. biflexa* s.l. ne sont plus utilisées.

Ces deux espèces ont été divisées en de nombreux sérovars. Pour que deux souches appartiennent à un même sérovar, il faut que, après avoir testé l'agglutination de la souche A avec le sérum homologue de la souche B et vice versa, les titres d'agglutination hétérologues ne soient pas différents de plus de 10 % des titres homologues (souche A-sérum A, souche B-sérum B). Ce test est appelé test d'agglutination croisée ou CAAT (Faine et al.1999). On compte plus de 60 sérovars pour *L. biflexa* et plus de 200 sérovars pour

L. interrogans et de nouveaux sérovars sont découverts encore à l'heure actuelle (Levett 2001, Valverde et al. 2008). Les sérovars les plus proches d'un point de vue antigénique ont été regroupés en sérogroupes. Ceux-ci n'ont pas de statut taxonomique mais ils sont utiles car les résultats des tests sérologiques sont bien souvent exprimés en termes de sérogroupes et non de sérovars. Etant donné leur importance en épidémiologie et comme de nombreuses études donnent leurs résultats en termes de séro groupe ou de sérovar, cette partie de la classification sérologique reste utilisée actuellement en parallèle de la classification génomique.

1.2.2 Classification génomique

Les premières études d'hybridation ADN-ADN ont permis de déterminer l'existence de 10 espèces génomiques (Yasuda et al. 1987). Depuis d'autres espèces ont été décrites, dont certaines très récemment (Adler & Chappel 2011). Nous connaissons actuellement 21 espèces génomiques : 8 pathogènes strictes (*Leptospira interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. alexanderi*, *L. alstoni*), 8 saprophytes (*Leptospira biflexa*, *L. wolbachii*, *L. kmetyi*, *L. meyeri*, *L. vanthiellii*, *L. terpstrae*, *L. yanagawae* et une nouvelle espèce, *Leptospira idonii*, découverte en 2012 au Japon par Saito et ses collaborateurs) et 5 appartenant à un groupe phylogénétiquement intermédiaire au statut pathogénique peu clair (*Leptospira inadai*, *L. broomii*, *L. fainei*, *L. wolfii*, *L. licerasiae*). Ce dernier groupe souvent inclus parmi les pathogènes comprend des souches pleinement pathogènes et des souches saprophytes (Ko et al. 2009, Saito et al. 2012).

La classification sérologique n'a toutefois pas été totalement abandonnée étant donné son importance dans la compréhension de l'épidémiologie de la maladie. De ce fait les deux classifications coexistent créant de nombreuses confusions car elles ne se recoupent pas en l'absence de correspondance entre le sérovar et l'espèce génomique. Ainsi des souches appartenant au même sérovar peuvent se retrouver dans deux voire trois espèces génomiques différentes (Bharti et al. 2003).

1.3 Milieu de vie

Les leptospires pathogènes vivent dans les tubules rénaux des animaux infectés et ils sont excrétés, généralement de façon intermittente, dans les urines. Les leptospires pathogènes possèdent en outre, comme les souches saprophytes, la capacité de survivre pendant une longue durée dans des environnements aquatiques d'eau douce, que ce soit des eaux vives, des eaux stagnantes ou même des boues. Une étude a prouvé que *Leptospira interrogans* pouvait survivre plus de 100 jours dans de l'eau distillée. Quand les conditions requises à la formation d'agrégats étaient présentes dans le milieu cette survie pouvait atteindre une année (Trueba et al. 2004). Ces résultats doivent tout de même être considérés avec précautions car ils ne concernent que de l'eau distillée, avec un milieu tamponné et dans des conditions de température contrôlées et leur extrapolation aux conditions environnementales doit être réalisée avec prudence. Toutefois cette capacité à survivre hors de leur hôte mammifère est un des points clés dans le cycle de transmission de la leptospirose, au moins hors des périodes trop froides. On peut toutefois noter que cette capacité de survie n'est pas identique chez toutes les espèces de leptospires pathogènes. Quand on compare les séquences du génome de souches de *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo et de *L. interrogans* serovar Copenhageni, le génome est plus petit dans le cas de *L. borgpetersenii* et de nombreux gènes, notamment liés à des fonctions de survie dans l'environnement, sont devenus non fonctionnels suite à des mutations ou à des processus d'insertion d'éléments mobiles. Ces modifications sont à rapprocher avec le fait que *L. borgpetersenii* semble moins bien survivre dans le milieu extérieur que *L. interrogans* (Bulach et al. 2006, Picardeau et al. 2008a).

2. La leptospirose

2.1 Situation épidémiologique humaine

La leptospirose est probablement la zoonose la plus répandue et la plus prévalente au monde (WHO 1999). Les pays tropicaux présentent les plus fortes incidences mais la maladie est aussi présente dans les pays tempérés (Pappas et al. 2008). La prévalence globale est très probablement sous-estimée pour différentes raisons. Dans de nombreux pays la leptospirose n'est pas une maladie à déclaration obligatoire, et même dans les pays à déclaration (comme aux Pays-Bas) un certain nombre de cas ne seraient pas connus. A cela s'ajoute un diagnostic pas toujours évident, cliniquement la maladie pouvant être confondue avec d'autres, comme la dengue (McBride et al. 2005). Les mesures d'incidences ne sont donc basées que sur les cas confirmés, c'est-à-dire les plus graves nécessitant généralement une hospitalisation. Malgré cela on estime globalement l'incidence de la maladie de 0,1-1 cas pour 100 000 habitants en zone tempérée à plus de 10 cas /100 000 habitants en zone tropicale voire plus de 100 cas / 100 000 habitants en cas d'épidémie majeure (Hartskeerl et al. 2011).

La maladie est considérée comme en (ré-)émergence au niveau mondial et de nombreuses épidémies ont eu lieu durant les 10 dernières années à la suite d'événements climatiques notables comme des inondations ou de très fortes pluies en zone tropicale (Lau et al. 2010a, Hartskeerl et al. 2011). En zone tropicale, la maladie était classiquement considérée comme une maladie des zones rurales, du fait de la plus grande proximité entre la population et les animaux, mais avec l'augmentation des populations et la formation de bidonvilles surpeuplés et aux conditions sanitaires précaires (non ramassage des ordures, présence d'égouts à ciel ouvert par exemple), des épidémies en zone urbaines sont maintenant très fréquemment décrites (Ko et al. 1999, Ganoza et al. 2006).

Dans les pays tempérés et notamment en Europe de l'Ouest on a vu un changement du schéma épidémiologique de la maladie : d'une maladie quasi exclusivement

professionnelle et liée à des métiers très spécifiques en contact avec les animaux (égoutiers, travailleurs aux abattoirs, vétérinaires, agriculteurs), la leptospirose est de plus en plus associée avec des activités de loisirs liées au milieu aquatique, comme le canoë-kayak ou le triathlon, ou aux voyages dans les zones à fortes incidences. En effet, le développement du tourisme vert et du tourisme d'aventure en zone tropicale augmente le risque de développer une leptospirose chez les populations de pays tempérés et une forte augmentation des cas liés à ces occurrences a été notée depuis une dizaine d'années (Nardone et al. 2004, Lau et al. 2010b, Radl et al. 2011). Toutefois le risque lié aux activités professionnelles n'a pas disparu et récemment des cas groupés chez des travailleurs saisonniers agricoles en Allemagne ont été rapportés (Desai et al. 2009).

En France il n'existe plus de système de déclaration obligatoire des cas depuis 1976 et la surveillance est basée sur un système de surveillance passive des cas au Centre National de Référence de l'Institut Pasteur. Environ 500 cas sont diagnostiqués chaque année sur tout le territoire avec 250 à 300 cas provenant de métropole, ces chiffres étant globalement stables d'une année sur l'autre (Picardeau et al. 2008b).

2.2 Formes cliniques chez l'Homme et les animaux domestiques

2.2.1 Pathogénie et facteurs de virulence

La pathogénie de la leptospirose n'est pas l'objet principal de notre étude, le but de cette partie n'est pas de faire une revue exhaustive des connaissances mais bien de démontrer la complexité de ce sujet et d'apporter des éléments quant aux avancées récentes dans ce domaine.

Les leptospires pénètrent l'organisme via une écorchure ou une abrasion cutanée et via les muqueuses oculaires ou respiratoires. Ils disséminent par voie hématogène jusqu'aux organes cibles et provoquent ainsi rapidement une infection systémique. La colonisation des organes cibles peut intervenir dès 3 jours post-inoculation. La phase immune débute 1 à 2

semaines après l'apparition des symptômes et elle correspond à la disparition des bactéries dans le flux sanguin avec l'apparition des anticorps circulants qui peuvent provoquer l'agglutination ou l'opsonisation des leptospires (Figure 3a) (Faine et al. 1999). La formation de complexes immuns lors de cette seconde phase a été décrite comme un des facteurs de gravité et de risque de complications organiques. Ce mécanisme semble être une des causes de l'uvéite équine récidivante (Levett 2001).

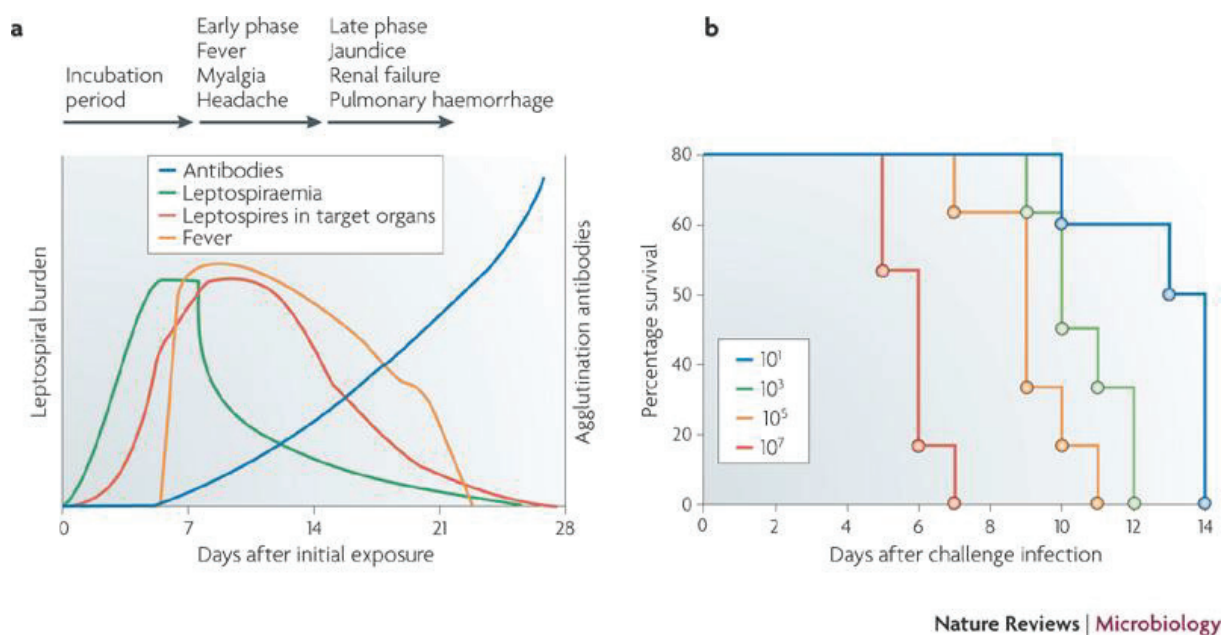


Figure 3 (issue de Ko et al. 2009) : Pathogénie de la leptospirose

a. Représentation du déroulement de l'infection leptospirosique chez l'Homme. b. Courbes de survie lors l'infection expérimentale de Cochon d'inde en fonction de la taille de l'inoculum (cette partie n'a pas été utilisée dans ce travail)

Le déchiffrement du génome et la meilleure connaissance des protéines exprimées par les leptospires pathogènes lors de l'infection ont permis de déterminer récemment des facteurs de pathogénicité putatifs. Toutefois des recherches ultérieures ont montré que ce problème est complexe et nos connaissances à ce sujet sont encore actuellement très parcellaires. La protéine LipL32 est la protéine de surface majoritaire dans le profil protéique des leptospires pathogènes (Haake et al. 2000). Haake et collaborateurs (2000) ont montré que cette protéine était exprimée durant l'infection que ce soit chez les modèles animaux

comme le Hamster ou chez l'Homme et que le gène et la protéine semblaient très fortement conservés parmi les espèces de leptospires pathogènes. En 2008, une étude a montré que l'espèce saprophyte *L. biflexa* ne possédait pas de gènes orthologue pour cette protéine (Picardeau et al. 2008a), confortant ainsi l'hypothèse que LipL32 puisse être un facteur de pathogénicité important. Toutefois, une étude portant sur une souche mutante ayant le gène *lipL32* inactivé a démontré que cette protéine n'était pas indispensable à l'infection aiguë par *Leptospira interrogans* ni à la colonisation rénale chronique (Murray et al. 2009). De plus une étude récente semble indiquer, que contrairement à ce qui était supposé auparavant, cette protéine bien qu'associée à la membrane n'aurait pas de fragment exposé à la surface de la membrane (Pinne & Haake 2013). Le rôle de cette protéine dans la biologie de la bactérie ou de la pathogénie de la maladie reste encore inconnu et cela est un bon exemple de la grande difficulté à identifier quels sont réellement les facteurs de pathogénicité de la leptospirose.

D'autres protéines semblent, elles, mieux répondre à tous les critères définissant un facteur de virulence, le premier à avoir été pleinement identifié est la protéine Loa22. Il a, tout d'abord, été prouvé que l'expression de cette lipoprotéine de la membrane externe est augmentée lors d'infection par *Leptospira interrogans* (Nally et al. 2007). De plus, il n'existe pas de gène orthologue à *loa22* dans le génome de *L. biflexa* (Picardeau et al 2008a). Ristow et collègues ont ensuite montré que la disruption du gène *loa22* créait une souche avec une virulence atténuée, virulence qui était retrouvée quand la souche mutante était complémentée par le gène *loa22* (Ristow et al. 2007). L'étude des facteurs de pathogénicité des leptospires est donc un champ de recherche très complexe et qui évolue d'année en année. Par exemple des études récentes ont montré que la protéine chaperonne ClpB qui est impliquée dans la réponse au stress est nécessaire à l'expression de la virulence chez la Gerbille (Lourdault et al. 2011). D'autres études sur les protéines FlaA, une partie des composants du flagelle, ont montré que lorsque aucune des deux protéines FlaA1 et FlaA2 n'étaient exprimées, la morphologie des bactéries était modifiée avec la perte de l'extrémité

en crochet et que leur mobilité était réduite. Dans ce cas les bactéries présentaient une virulence réduite et semblaient incapable de se disséminer vers les organes cibles. Par contre quand seule la protéine FlaA1 était absente, les bactéries présentaient une mobilité réduite mais leur morphologie et leur virulence étaient conservées (Lambert et al. 2012).

Une meilleure connaissance de ces facteurs permettra, non seulement, de mieux comprendre les mécanismes de l'infection mais aussi de définir des cibles potentielles pour des vaccins (Wang et al. 2007).

2.2.2 La leptospirose humaine

Dans cette partie nous ne ferons pas une revue détaillée des manifestations cliniques chez l'Homme, mais nous nous attacherons juste à démontrer la grande variabilité des signes cliniques et des syndromes associés à la maladie.

La période d'incubation de la leptospirose est de 5 à 14 jours en moyenne. La sévérité de la leptospirose chez l'Homme varie très largement d'une maladie peu ou pas symptomatique, qui va se résoudre en 1 semaine, à des affections graves à mortelles dans 5 à 15 % des cas. Ces formes graves résultent de désordres organiques plus tardifs qui apparaissent environ 4 à 6 jours après le début des symptômes (Figure 3a) (Ko et al. 2009). Globalement, le taux de mortalité dépend de la forme considérée et est compris entre moins de 5 % et plus de 50 % pour les formes les plus graves (Mc Bride et al. 2005). Généralement on considère qu'il existe trois grands syndromes : anictérique, ictérique et pulmonaire.

Le syndrome anictérique représente la grande majorité des cas et il s'agit d'infections asymptomatiques ou très peu sévères avec globalement un syndrome grippal qui dure entre 3 et 7 jours, la guérison du patient coïncidant avec le début de la phase immune et l'apparition des anticorps dans le sang (Levett 2001).

Le syndrome ictérique représente une forme beaucoup plus sévère de leptospirose avec un taux de mortalité entre 5 et 15 %. On estime que cette forme représente 5 à 10 % des patients atteints de leptospirose. Ce syndrome est grave car de multiples complications,

notamment une insuffisance rénale aiguë, peuvent apparaître et il existe un risque de défaillance multiorganique (Levett 2001).

Le troisième syndrome associé à la leptospirose est aussi le plus grave avec plus de 50 % de mortalité rapportée. Il est dominé par des hémorragies pulmonaires et son importance a été mise en évidence durant l'épidémie du Nicaragua en 1995 (Croda et al. 2009). Une étude au Pérou a montré que cette forme, largement sous-diagnostiquée, était essentiellement présente dans les zones urbaines (Segura et al. 2005).

2.2.3 Les leptospiroses chez les animaux domestiques

Les signes cliniques de la leptospirose chez les animaux domestiques sont assez variables en fonction de l'espèce considérée. Le Chien est l'espèce qui peut se rapprocher le plus de l'Homme au niveau des signes cliniques : 4 syndromes sont généralement rapportés chez cette espèce (ictère, syndrome hémorragique, syndrome urémique et problèmes reproducteurs avec des avortements ou des mises-bas prématurées) (Adler & de la Pena Moctezuma, 2010). Toutefois, récemment, un syndrome pulmonaire similaire à celui rencontré chez l'Homme a été bien documenté dans une étude menée à Berlin (Kohn et al. 2010). En France, une étude récente sur 37 cas a montré que les signes les plus fréquemment associés à une leptospirose canine étaient assez peu spécifiques et que la forme rénale stricte était plus répandue que la forme ictérohémorragique (Hazart et al. 2010). Chez les animaux de rente (Ruminants et Porc) les signes les plus fréquents associés à une leptospirose sont des troubles de la reproduction (retour en chaleur, avortements, mortinatalité, momification fœtale) et des troubles de la production de lait (agalactie) (Adler & de la Pena Moctezuma, 2010). Dans le cas du Cheval, des troubles de la reproduction et notamment des avortements peuvent aussi être imputés à une infection par des leptospires généralement du sérovar Pomona (Timoney et al. 2011). Chez cette espèce, la leptospirose semble être la cause ou une des causes principales d'une atteinte oculaire : l'uvéite récidivante équine (Faber et al. 2000).

2.3 Méthodes de diagnostic chez l'Homme et les animaux

Les méthodes de diagnostic de la leptospirose peuvent se diviser en trois catégories.

2.3.1 La culture

C'est la méthode de référence pour démontrer le portage, toutefois elle a de nombreux inconvénients. Les leptospires sont des bactéries à croissance lente et la culture doit être gardée de 12 à 13 semaines avant d'être déclarée négative, ce qui exclut un diagnostic rapide. De plus elle nécessite un laboratoire bien équipé et un personnel formé, ce qui limite son utilisation à certains centres d'expertise (Levett 2001, Hartskeerl et al. 2011).

2.3.2 Les techniques sérologiques

La méthode sérologique de référence est le MAT (ou test de micro-agglutination). Cette méthode consiste à tester l'agglutination du sérum d'un patient vis-à-vis d'un panel de souches de référence maintenues en culture au laboratoire. Là encore, cette technique nécessite un laboratoire qui peut conserver des souches vivantes et un personnel très qualifié, la lecture demandant une grande expérience. Son utilisation est donc limitée à des laboratoires spécialisés (Faine et al. 1999, Hartskeerl et al. 2011). Toutefois, étant donné l'importance de cette technique, un réseau international a été établi afin d'essayer de standardiser les résultats au niveau mondial (Chappel et al. 2004).

Des tests sérologiques rapides ont été développés afin de pouvoir réaliser des diagnostics au chevet des patients. Il existe maintenant différentes techniques ELISA pour le diagnostic chez l'Homme et parfois chez l'animal. Dans le cadre du diagnostic de la leptospirose humaine il existe de nombreux tests ciblant les IgM, les IgG ou les deux types dans le même test (WHO 2003). Actuellement, de nouveaux tests ELISA permettant un screening rapide là où le MAT n'est pas disponible facilement sont toujours en développement, en modifiant notamment l'antigène utilisé. Par exemple, Bourhy et collaborateurs (2013) ont récemment développé un test permettant de détecter les IgM

spécifiques des leptospires pathogènes en utilisant *Leptospira fainei* comme antigène. Le problème des techniques ELISA est qu'elles sont espèce-dépendantes, donc dans le cas des leptospiroses animales un test ne sera développé que pour une espèce à la fois. Malgré cela des tests ont été développés pour le diagnostic de la leptospirose chez différentes espèces. On peut par exemple citer un test ayant pour antigène une protéine LipL32 recombinante pour le diagnostic chez le Porc (Hartleben et al. 2013), un permettant la détection des IgG anti serovar Hadjo chez les bovins (Yan et al. 1999) ou dans l'espèce canine, un test mettant en évidence les IgG anti leptospires pathogènes utilisant une forme recombinante de la protéine OmpL1 (Subathra et al. 2013). Ces méthodes ELISA, qu'elles soient utilisées chez l'Homme ou chez l'animal, permettent un diagnostic rapide qui devra être confirmé par les techniques de référence (Hartskeerl et al. 2011).

Toutefois les techniques sérologiques ne détectent pas toujours les premiers stades de la maladie, stades pendant lesquels les antibiotiques ont le plus de chance d'être efficaces. De plus chez les animaux domestiques, dans le cas des animaux de rente présentant des troubles de la reproduction, les titres en anticorps sont souvent bas et ne sont pas forcément détectés par ces techniques (Hartskeerl et al. 2011).

2.3.3 Les techniques génomiques

De nombreuses techniques permettant la détection des leptospires pathogènes par PCR conventionnelle ou en temps réel (QPCR) ont été développées en ciblant différents gènes (par ex. Merien et al. 1992, Smythe et al. 2002, Levett et al. 2005, Slack et al. 2007, Ahmed et al. 2009). Le diagnostic par PCR peut être réalisé à partir de multiples prélèvements : sur du sang au chevet du patient, dans l'humeur aqueuse, le LCR, ou à partir d'organes (rein, foie notamment) après autopsie (Levett 2001). Il est aussi possible de rechercher les leptospires pathogènes par PCR dans les urines (notamment pour rechercher un portage chronique) mais dans ce cas l'interprétation des résultats devra prendre en compte le fait que l'émission se fait de façon intermittente. Ces techniques nécessitent un équipement onéreux et sophistiqué et ne peuvent pas, pour l'instant, être généralisées dans

toutes les structures, mais les coûts vont en se réduisant et actuellement la PCR devient moins coûteuse que le MAT.

Les techniques génomiques ont permis de développer des méthodes pour typer les leptospires obtenues lors d'isolement de souches. Le VNTR (pour Variable Number Tandem Repeat) est une technique largement utilisée pour typer un grand nombre de bactéries par détermination du nombre de répétition d'un motif à différents loci. Une étude a montré son efficacité pour l'identification de souches appartenant aux espèces *Leptospira interrogans*, *L.kirchneri*, *L. borgpetersenii* au niveau du sérovar (Salaün et al. 2006). Le MLST (Multi Locus Sequence Typing) permet une identification au niveau de l'espèce génomique. Cette technique est intéressante car elle permet une meilleure reproductibilité que les autres techniques basées sur l'estimation de la taille d'un fragment et elle permet la création d'une base de données mondiale (Ahmed et al. 2006). Une étude récente montre que cette technique peut être utilisée directement sur des prélèvements de sang provenant de patients mais uniquement quand la charge bactérienne est conséquente ($>5.10^5$ leptospire/mL) (Agampodi et al. 2012).

3. Le cycle épidémiologique de la leptospirose

3.1 Modalités de transmission

La source de l'infection pour l'Homme ou les animaux domestique est un contact direct ou indirect avec les urines d'un animal contaminé. Une des raisons pour lesquelles la maladie est plus prévalente dans les zones tropicales est un temps de survie plus long des leptospires dans les environnements chauds. La figure 4 représente le cycle épidémiologique de la leptospirose. La contamination se fait généralement via une écorchure ou une abrasion cutanée mais elle peut aussi survenir via une peau saine lors d'immersion prolongée dans l'eau. Elle est aussi possible via les muqueuses, notamment oculaires,

respiratoires (lors d'inhalation d'eau ou d'aérosols) et digestives (des cas ont été décrits suite à la consommation de réserves d'eau contaminées). Beaucoup plus rarement la contamination peut intervenir suite à une morsure (Levett 2001).

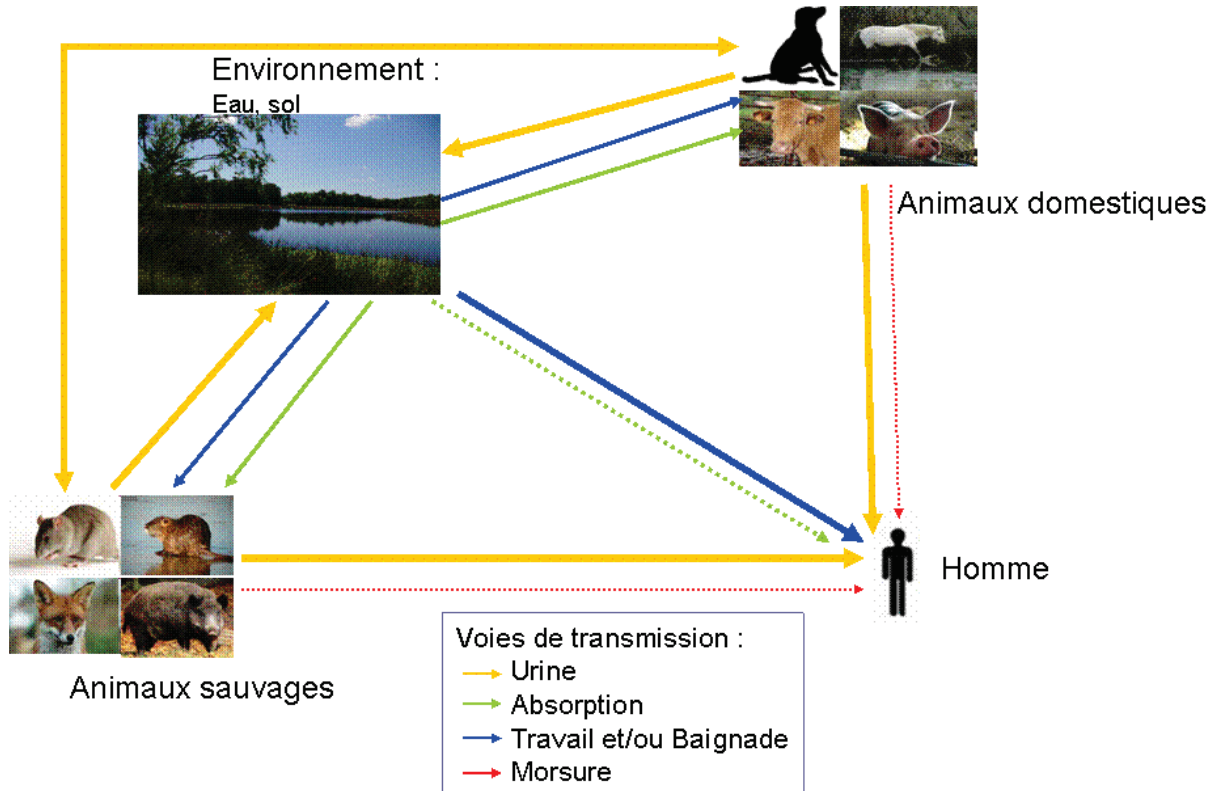


Figure 4 : Cycle épidémiologique de la leptospirose. On note le rôle central d'un environnement aquatique dans la contamination.

3.2 La notion d'hôte-réservoir

L'environnement aquatique est contaminé par le biais des urines d'animaux domestiques ou sauvages infectés. Ces animaux peuvent être séparés en deux catégories : les hôtes accidentels et les hôtes réservoirs.

Les hôtes accidentels vont développer des signes cliniques plus ou moins graves suite à l'infection par des leptospires, ils pourront être porteurs rénal et excréteurs après guérison mais cette excrétion sera limitée dans le temps.

Les hôtes-réservoirs, au contraire, sont des espèces dans lesquelles la circulation de la bactérie se fait de façon endémique. Les individus s'infectent généralement jeunes, et ne vont présenter aucune conséquence clinique de cette infection. Les individus infectés sont alors des porteurs chroniques de la bactérie dans les tubules rénaux et des excréteurs chroniques dans les urines. Le rôle des espèces réservoirs est prépondérant : les animaux ne sont pas malades et ils maintiennent la présence de la bactérie dans l'environnement par une excrétion régulière dans leurs urines (Levett 2001).

- La leptospirose est une maladie liée à un environnement d'eau douce.
- Les leptospires pathogènes sont maintenus dans l'environnement par des hôtes – réservoirs
- La contamination de l'Homme ou des animaux se fait par un contact direct ou indirect avec les urines d'un animal contaminé.

3.3 Des espèces animales avec des situations contrastées

Dans ce paragraphe, nous nous attacherons à montrer la complexité du rôle des différentes espèces animales dans le cycle épidémiologique de la leptospirose. Le but n'est pas de faire une liste exhaustive des différents réservoirs mais bien plutôt d'insister sur les différentes situations existantes dans la faune sauvage et sur la grande complexité que cela crée en ce qui concerne la compréhension de l'épidémiologie et le contrôle de cette maladie chez l'Homme et les animaux domestiques.

Les Rongeurs sont identifiés comme des espèces réservoirs majeures de leptospires pathogènes. Les espèces du genre *Rattus* notamment sont des réservoirs mondiaux du sérovar *Icterohaemorrhagiae*, et le Rat surmulot (*Rattus norvegicus*) est considéré comme un des meilleurs modèles de colonisation rénale chronique. Il est de plus un des principaux

responsable des épidémies en zone urbaine que ce soit en zone tropicale ou en Europe occidentale (Bharti et al. 2003, Athanazio et al. 2008, Tucunduva de Faria et al. 2008, Socolovschi et al. 2011). La Souris domestique (*Mus musculus*) est généralement réservoir du sérovar Ballum mais sur les îles de La Barbade, cette espèce est le réservoir du sérovar Bim (Bharti et al. 2003). Pour autant, il ne faut pas en conclure que tous les Rongeurs puissent être réservoirs. Il existe des espèces sensibles à la maladie et qui sont même parmi les meilleurs modèles d'étude de certaines formes humaines les plus graves, comme le Hamster (*Mesocricetus auratus*), la Gerbille (*Meriones unguiculatus*) et le Cobaye (*Cavia porcellus*) (Nally et al. 2004, Croda et al. 2008). Il semble donc légitime de se demander dans quel groupe se classe le Ragondin (*Myocastor coypus*).

L'ordre des Rongeurs n'est pas le seul à posséder des espèces réservoirs de leptospires. On peut ainsi rencontrer des espèces réservoirs chez les Insectivores, une étude récente a montré que la Musaraigne des maisons (*Suncus murinus*) est un réservoir important à Madagascar par contre il n'est pas précisé de quel sérovar (Rahelinirina et al. 2010). On trouve aussi des réservoirs dans l'ordre des Carnivores. La Mangouste de Java (*Herpestes auropunctatus*) est considérée comme un réservoir des sérovars Sejroe et Icterohaemorrhagiae à Hawaï et des sérovars Icterohaemorrhagiae et Djatzi à Porto-Rico (Bharti et al. 2003). Le Raton laveur (*Procyon lotor*) semble être aussi un réservoir au Colorado (Duncan et al. 2012). Le cas des Chiroptères est complexe et dépend de l'espèce considérée. Certaines espèces semblent être porteuses de leptospires qui ne sont pathogènes que chez les chauves-souris tandis que d'autres espèces comme celles du genre *Pteropus* sont considérées en Australie comme des réservoirs pour l'Homme et les animaux domestiques (Mühldorfer 2012). Chez les espèces d'ongulés sauvages, peu d'études ont été réalisées hormis des études de séroprévalence (Slavica et al. 2008 en Croatie) mais cela ne nous permet pas de déterminer le statut des espèces. On peut toutefois noter une étude sur le Sanglier (*Sus scrofa*) à Berlin, qui démontre certes le portage rénal de la bactérie par cette espèce mais associé à des lésions de néphrite chronique

interstitielle (Jansen et al. 2007). Ceci démontre que le Sanglier peut être hôte de la bactérie et l'éliminer dans les urines par contre il ne semble pas qu'il soit un réservoir vrai tel qu'il a été défini précédemment.

Il existe aussi quelques espèces plus « exotiques » chez lesquelles on ne s'attendrait pas à trouver une infection par la leptospirose. Alors que les leptospires ne peuvent pas survivre dans un environnement marin, des épidémies de leptospiroses ont été détectées périodiquement dans les populations d'Otarie de Californie (*Zalophus californianus*). Dans ce cas les animaux sont atteints par l'infection qui peut se révéler mortelle et il semble probable que les animaux se contaminent quand ils sont à terre. Toutefois, les animaux malades ont le temps de migrer le long de la côte ce qui pose une question quant à la dissémination de l'agent pathogène sur de grandes distances. Toutes les analyses menées dans ce cas typaient la souche responsable comme appartenant à *Leptospira interrogans* serovar Pomona (Norman et al. 2008, Zuerner et al. 2009). Une autre étude présente des résultats surprenants, puisqu'une équipe a pu démontrer la présence d'anticorps par sérologie MAT et le portage rénal par PCR de leptospires pathogènes chez des serpents au Brésil. Les auteurs précisent toutefois que le rôle de ces espèces dans le cycle épidémiologique de la leptospirose est encore indéterminé et que cette question nécessite des études complémentaires (Biscola et al. 2011).

- Un hôte réservoir est un porteur rénal chronique de leptospires qui ne présente pas de signes cliniques associés au portage.
- Les réservoirs de la leptospirose sont très divers.
- Il semble exister une certaine spécificité de l'association hôte-sérovar, celle-ci pouvant être modifiée en fonction de la zone géographique
- Les hôtes accidentels peuvent aussi être des facteurs de dissémination dans l'environnement, mais sur des temps plus courts.
- Le portage de la leptospirose ne se limite pas aux mammifères terrestres.

B. A propos du Ragondin (*Myocastor coypus*)

1. Présentation de l'espèce

1.1 Systématique

Le position systématique du Ragondin a longtemps été floue et a prêté à confusion, l'espèce étant souvent confondue avec d'autres non apparentées comme la Loutre (*Lutra lutra*) (Dagault 1987). En 1782, Molina décrit une espèce de gros rat d'eau sous le nom *Mus coypus* (coypu étant dérivé d'un nom donné à cet animal par certaines populations indiennes en Amérique du Sud) et le nom du genre *Myocastor* apparaît en 1792 avec Kerr qui est le premier à associer les deux noms actuels en *Myocastor coypus* (Micol 1991 ; Woods et al. 1992).

La classification actuelle est donc celle que propose Grassé en 1955 (Dagault 1987):

Ordre	Rongeur
Sous Ordre	Hystricomorphes
Famille	Myocastoridae
Genre	<i>Myocastor</i>
Espèce	<i>coypus</i> (Molina 1782)

1.2 Aire de distribution et statut juridique

1.2.1 Aire de répartition originelle

Le Ragondin est originaire d'Amérique du Sud et vit dans toute la zone qui se trouve au sud de 23° Sud incluant l'Argentine, la Bolivie, le sud du Brésil, le Chili, le Paraguay et

l'Uruguay (Carter & Leonard 2002). Quatre sous-espèces distinctes ont été décrites dans les différents milieux et climats de son aire de répartition (Dagault 1987, Woods et al. 1992).

En Amérique du Sud, le Ragondin est une source importante de revenus par le biais du commerce des fourrures, la majorité provenant d'animaux prélevés dans la nature. Toutefois, le contrôle des permis de chasse étant parfois peu efficace, il existe des marchés parallèles ce qui induit une sur-exploitation des populations dans certaines régions. En Argentine, l'espèce est inscrite sur la liste des espèces qui nécessitent des programmes de gestion durables (Guichon & Cassini 2005). Dans certaines zones de son aire d'origine, les populations de Ragondin ont été très largement réduites et l'espèce peut être considérée comme en danger localement (Reggiani et al. 1993)

1.2.2 Zones d'introduction

Le Ragondin a été introduit dans de nombreux pays du fait de son intérêt dans l'industrie de la pelleterie. Il est maintenant présent sur tous les continents excepté en Australie, en Antarctique et en Nouvelle-Zélande. Les premiers essais d'élevage ont eu lieu en France dès les années 1880 mais des fermes ont ensuite été rapidement installées en Amérique du Nord et dans le reste de l'Europe (Carter & Leonard 2002).

Les populations introduites résultent soit de la fuite d'individus provenant de ces fermes soit, dans certains cas, d'individus relâchés pour créer une population nouvelle de gibier ou dans le but d'entretenir des plans d'eau en diminuant l'extension de la végétation aquatique (Carter & Leonard 2002 ; Le Louarn & Quéré 2003). Toutefois, du fait du potentiel invasif de l'espèce et des dégâts causés à la biodiversité et aux activités humaines, l'espèce est maintenant classée par l'IUCN (l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature) parmi les 100 espèces les plus invasives au monde (Lowe et al. 2000).

En France, l'espèce est introduite dès 1882 mais l'élevage se répand franchement à partir des années 1925-28. Les individus échappés ont permis une colonisation importante avec, à partir des années 1950, une explosion des populations qui maintenant couvrent tout

le pays (Maurin 1997 ; Le Louarn & Quéré 2003). L'arrêté du 30 septembre 1988 classe le Ragondin parmi les espèces susceptibles d'être déclarées nuisibles par le préfet (Annexe I) et depuis l'arrêté du 3 avril 2012 le Ragondin est classé nuisible sur tout le territoire français et peut être détruit toute l'année par piège, tir ou déterrage sans avoir besoin d'un arrêté préfectoral (Annexe II).

1.3 Morphologie

Le Ragondin est un des plus gros Rongeurs connus avec un poids moyen de 6 à 7 kg mais certains individus peuvent peser jusque 10 kg (Micol 1991, observations personnelles J. Vein). Les individus adultes des populations Européennes sont généralement 20 à 30 % plus gros que ceux rencontrés dans les populations d'origine (Guichon et al. 2003b).

La tête est massive avec des petites oreilles rondes, des narines légèrement écartées et valvulaires, et des incisives orange vif. Les oreilles, les yeux et les narines sont placées sur le dessus de la tête si bien qu'ils sont émergés quand l'animal nage. De plus, les lèvres sont obturables derrière les incisives, permettant à l'animal de couper de la végétation immergée. La queue est cylindrique, écailleuse et glabre et n'est d'aucune utilité dans la nage. La nage est facilitée par les grands pieds postérieurs fortement palmés. Le pelage est imperméable et composé de deux types de poils, les poils de jarre longs et raides et les poils de bourre plus courts et restant toujours secs (Micol 1991, Le Louarn & Quéré 2003).

La femelle possède 8 à 10 mamelles dorso-latérales. Certains auteurs pensent que cela correspond à une adaptation au milieu aquatique, la femelle pouvant allaiter en nageant mais d'autres réfutent cette explication et émettent l'hypothèse que cette disposition permet à la femelle de garder une position d'alerte pendant l'allaitement (Micol 1991).

2. Biologie et écologie dans ses zones d'introduction

2.1 Habitat

Le Ragondin est inféodé aux zones humides quelque soit leur type pourvu qu'il y trouve une nourriture suffisamment abondante. Il préfère généralement les zones où l'eau est plus calme et utilise les cours d'eau plutôt lors des déplacements (Dagault 1987, Reggiani et al. 1993).

Son gîte peut être de deux types, le plus connu est le terrier avec plusieurs entrées la plupart du temps immergées, des galeries d'environ 20-30 cm de diamètre et un système de chambres souterraines, mais le Ragondin peut aussi s'abriter dans un nid recouvert de roseaux, qu'il soit terrestre ou flottant (Laurie 1946).

2.2 Régime alimentaire

Le Ragondin est strictement herbivore. Dans son habitat d'origine, les plantes aquatiques forment la majeure partie de son alimentation alors que celles-ci n'apportent pas d'avantages d'un point de vue nutritionnel. Il semblerait que ce comportement alimentaire soit privilégié pour la protection qu'il apporte vis-à-vis de la prédation (Guichon et al. 2003a). En France, en l'absence de prédateur spécifique, son régime alimentaire couvre un très large spectre allant des plantes aquatiques aux graminées prairiales. Les racines sont aussi consommées, principalement en période de disette. Si l'opportunité se présente, il peut se nourrir à partir des céréales cultivées. Son régime alimentaire présente assez peu de variations saisonnières dans le marais Poitevin (Abbas 1991). Cette grande plasticité alimentaire favorise son expansion territoriale.

2.3 Reproduction

Les populations de Ragondin fonctionnent selon une stratégie d'accouplement polygyne, le territoire d'un mâle couvrant celui de plusieurs femelles (Doncaster & Micol 1989). Les femelles peuvent se reproduire toute l'année avec des pics de naissances en Mai, Septembre et Novembre, selon des observations italiennes (Reggiani et al. 1993).

La gestation semble être de 132 jours quel que soit leur milieu de vie, ce qui permet au moins 2 portées par an et par femelle et parfois jusqu'à 5 portées en 2 ans. Les portées sont en moyenne de 5 jeunes avec des extrêmes allant de 2 à 11 jeunes (Laurie 1946). Les hivers rigoureux peuvent toutefois arrêter momentanément l'activité reproductrice des femelles (Dagault 1987). Dans ce cas une synchronisation des mises-bas est observée au printemps ou en tout début d'été (Doncaster & Micol 1989). La maturité sexuelle est atteinte entre 5 et 6 mois chez les femelles et vers 6 mois chez les mâles. Toutefois de nombreux facteurs peuvent en moduler l'âge. Ainsi, elle peut être atteinte plus jeune en été et plus tardivement en hiver. La présence d'adulte en phase de reproduction peut aussi repousser l'âge de la maturité sexuelle chez les jeunes femelles (Dagault 1987, Micol 1991).

2.4 Paramètres démographiques

Le sexe-ratio d'une population est corrélé à la densité de population. Il a été montré que dans le cas d'une population avec une faible densité (notamment après la coupure hivernale), les mâles sont majoritaires dans les classes d'âge juvéniles et sub-adultes alors qu'en automne, au moment des pics de densité les femelles sont prédominantes dans ces deux classes d'âge. De même dans des zones où une lutte territoriale importante est instaurée, le sexe-ratio sera largement en faveur des mâles. Ceci confirme la plus grande tendance des jeunes mâles à émigrer alors que les jeunes femelles restent généralement avec leur mère (Doncaster & Micol 1989).

La structure en classe d'âge suit une tendance saisonnière marquée. Lors de périodes peu favorables, grands froids ou disette, la reproduction est interrompue et les mises-bas sont synchronisées à la fin de cette période. Les classes d'âges juvéniles et sub-adultes sont alors surreprésentées. Par contre en périodes favorables, les adultes sont largement prédominants dans une population (Doncaster & Micol 1989, Reggiani et al. 1993).

En France, le Ragondin n'a pas de prédateurs naturels hormis le Chien et parfois la Loutre qui peuvent attaquer les jeunes (Le Louarn & Quéré 2003). Certains événements climatiques peuvent influencer les populations. Les fortes inondations induisent une émigration plus forte notamment des jeunes mâles ce qui déséquilibre le sexe-ratio de façon plus ou moins transitoire. Le froid est un des principaux facteurs limitant des populations. Il semble que les mâles soient plus sensibles aux déperditions énergétiques dues au froid que les femelles. Plusieurs causes sont envisageables, le territoire d'un mâle est plus grand, ils se déplacent donc plus et leurs réserves en graisses sont généralement réduites en hiver alors que chez les femelles ces réserves dépendent du stade de gestation. Toutefois, la mortalité due au froid est élevée quel que soit le sexe. Les Ragondins sont sujets à des blessures sur la queue. Il est fréquent que les individus en perdent tout ou partie lors d'un hiver rigoureux. Les blessures dues au froid ne cicatrisant pas bien, elles peuvent entraîner une mortalité retardée pendant le printemps (Doncaster & Micol 1990, Reggiani et al. 1995).

3. Problèmes liés à l'introduction du Ragondin dans un écosystème européen

Le Ragondin ne possède pas de prédateurs naturels en France et ses populations ont été en constante augmentation depuis son introduction (Maurin 1997). L'augmentation des populations a commencé à causer de nombreux problèmes qui peuvent être regroupés en quatre grands types : dégâts environnementaux, destruction de cultures, dégâts aux infrastructures et problèmes sanitaires (Bertolino & Genovesi 2007).

Les dégâts aux cultures sont assez difficiles à évaluer mais de nombreuses plantes peuvent être consommées par les Ragondins, ainsi Moutou (1997) parle essentiellement de dégâts causés à des parcelles de maïs ou de tournesol en France, alors qu'en Italie, les cultures les plus affectées semblent être le riz, les betteraves à sucre ou les carottes (Panzacchi et al. 2007). Pour ces auteurs, durant la période 1995-2000, les pertes liées aux dégâts causés aux cultures par les Ragondins ont été estimées, en Italie, à près de 159 000 Euro par an (Panzacchi et al. 2007).

Les dégâts aux infrastructures, concernent principalement les systèmes de drainage et les digues qui peuvent être minés par les Ragondins quand ils creusent leurs terriers. Les principales conséquences observées sur le terrain sont des infiltrations dans des digues qui parfois peuvent aller jusqu'à la rupture, des glissements de terrain, ou un assèchement de zones humides protégées. Il est parfois possible que ces activités de terrassement provoquent des effondrements de routes et par conséquent des accidents de la circulation ou de façon, heureusement, très exceptionnelle des inondations importantes lorsque ces dégâts sont corrélés à un mauvais entretien des ouvrages et des conditions climatiques extrêmes (Carter et al. 1999, Gebhardt 1996, Panzacchi et al. 2007). En Italie entre 1995 et 2000, les coûts engendrés par les dégâts aux infrastructures strictement liés aux activités des Ragondins se sont élevés à près de 1 783 000 Euro par an (Panzacchi et al. 2007).

Les conséquences environnementales de la présence de populations de Ragondin sont multiples. Ils peuvent se nourrir sur une large gamme de plantes aquatiques indigènes et réduire considérablement la biomasse de ces espèces qui ne sont pas adaptées à la présence d'un aussi grand consommateur. En Italie, la présence de populations de Ragondin a très fortement et très négativement impacté certains programmes de restauration de zones humides entrepris dans le cadre du programme « Natura 2000 » (Bertolino et al. 2005). En Louisiane, les Ragondins sont responsables de la disparition de certains marais qu'ils soient d'eau douce ou saumâtre du fait de leur comportement alimentaire appelé « eat out ». L'« eat out » correspond à l'ingestion des parties basales des

tiges et au déterrage des racines et rhizomes. Ce qui a pour conséquences, non seulement la diminution de la biomasse émergée mais aussi, lors d'épisodes de hautes eaux, le décapage du substrat qui laissera place à un espace où la végétation du marais ne pourra plus se reconstituer. Comme les Ragondins pâturent de proche en proche, ce comportement fait que le marais devient de plus en plus fragmentaire et par là même plus fragile (Carter et al. 1999). Cette disparition des plantes aquatiques peut causer de nombreux problèmes pour tous les animaux (oiseaux, poissons, invertébrés notamment) qui les utilisent comme maillon de la chaîne alimentaire, comme lieu de reproduction ou comme zone de repos. Une autre conséquence à la présence de populations de Ragondin impacte plus directement les oiseaux nicheurs dans les roselières puisqu'il a été prouvé que les Ragondins utilisent les nids comme plateformes de repos et à cette occasion détruisent ou font couler les œufs. Des études récentes montrent que ces perturbations peuvent significativement diminuer le succès reproducteur d'espèces d'oiseaux qui utilisent des nids flottants comme la Foulque macroule (*Fulica atra*) (Bertolino et al. 2011). Enfin, le Ragondin est en compétition avec la forme aquatique d'*Arvicola terrestris*, espèce indigène qui, elle, est en voie de disparition (Bertolino & Genovesi 2007).

Au plan sanitaire, il a été prouvé que le Ragondin est un réservoir sauvage potentiel pour la grande douve du foie (*Fasciola hepatica*) dans l'ouest de la France avec un développement complet du parasite dans l'animal et l'émission d'éléments parasitaires qui sont infectants pour les ruminants domestiques (Ménard et al. 2001). De plus, la transmission de deux zoonoses bactériennes par le Ragondin est à craindre, la Tularémie et la Leptospirose (Moutou 1997).

Le Ragondin est une espèce invasive qui crée de nombreux dégâts dans ses aires d'introduction, notamment des dégâts agricoles, des dégâts aux infrastructures humaines, des dégâts aux zones humides et qui est potentiellement un maillon dans le cycle épidémiologique de certaines zoonoses ou maladies du bétail. En conséquence, il est classé en France sur la liste des espèces nuisibles et des opérations de contrôle des populations sont nécessaires.

4. Le Ragondin et la Leptospirose

La première étude qui rapporte, à notre connaissance, un lien entre le Ragondin et la Leptospirose date de 1949 en Argentine. Anchezar et collaborateurs (1949) rapportent que les Ragondins peuvent être une source de « *Leptospira bonariensis* ». Cette espèce de leptospire a ensuite été plus correctement identifiée en tant que *Leptospira icterohaemorrhagiae* (Savino & Renella 1949) Cette importance du Ragondin en tant que maillon du cycle épidémiologique de la Leptospirose a par la suite été plus étudiée dans les pays où il a été introduit et où son caractère invasif pose des problèmes que ce soit aux Etats-Unis ou en Europe.

Aux Etats-Unis, dès les années 1960 des études ont été conduites dans les marais de Louisiane et lors d'une étude sur 26 ragondins, il a été possible d'isoler 8 souches de leptospires à partir des reins (Roth et al. 1962). Ces souches ont pu être déterminées comme appartenant au séro groupe Bataviae et au sérovar Paidjan. Lors d'études plus récentes portant sur l'état de santé des ragondins de Louisiane, des tests sérologiques n'ont pas mis en évidence une forte séroprévalence pour la Leptospirose puisque sur 28 animaux testés seuls 2 présentaient une réaction positive (Howerth et al. 1994).

En Europe, les premières études ont eu lieu en Grande-Bretagne pendant la période d'éradication des populations introduites en East Anglia. Ces études ont permis à la fois de

démontrer l'existence d'une séroprévalence non négligeable dans cette population mais sont aussi les premières prouvant l'existence du portage de leptospires pathogènes par des Ragondins en Europe de l'Ouest (Waitkins et al. 1985 ; Wanyangu et al. 1986). En Italie, une étude sur l'état de santé d'une population de Ragondin a permis de détecter une séroprévalence de plus de 10 % vis à vis des leptospires pathogènes sans lien avec la présence de lésions rénales (Bollo et al. 2003).

En France, la première enquête concernant la séroprévalence de la Leptospirose dans des populations de Ragondin, révèle une prévalence de 47,3 % au total avec une forte majorité des cas qui concerne le sérogroupe Icterohaemorrhagiae (Trap 1988). Plus récemment, Michel et collaborateurs (2001) ont, pour la première fois, réalisé l'isolement de souches à partir de rein de Ragondin en France, l'une identifiée comme *Leptospira interrogans* serovar Sejroe et les deux autres comme *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. Durant la même étude, ils ont déterminé la séroprévalence des populations de Ragondin dans 6 sites de l'Ouest de la France entre 16,5 et 66 % (Michel et al. 2001).

En conclusion, que ce soit dans son aire d'origine ou dans les zones où il a été introduit, le Ragondin est une espèce susceptible non seulement d'avoir une circulation de leptospires pathogènes dans ses populations, ce qui est visible avec des taux de séroprévalence généralement non négligeables quelque soit l'endroit où les animaux ont vécu, mais aussi de porter ces bactéries au niveau rénal et donc de pouvoir les disséminer dans l'environnement.

III. OBJECTIFS GENERAUX

L'objectif de cette thèse a été d'évaluer le rôle du Ragondin dans l'épidémiologie de la leptospirose tant d'un point de vue de la circulation que du portage de la bactérie ainsi que de la contamination de l'environnement. Pour cela deux axes de travail ont été définis.

1. Suivi de la contamination des populations de Ragondin dans deux zones humides de l'est de la France et place du Ragondin dans le cycle épidémiologique

Dans cette optique nous nous sommes intéressés à répondre à trois problématiques.

- Quelle est la prévalence sérologique et la prévalence du portage rénal de leptospires au sein de chacune des populations ?
- Etant donné que les deux zones ont été choisies pour leur différences tant sur le plan environnemental que sur celui de la prévalence des infections humaines déclarées, existe-t-il des différences de prévalence entre les deux populations ?
- Les Rongeurs sont généralement connus comme des hôtes-réservoirs de la leptospirose mais certaines espèces peuvent être sensibles à l'infection. Est-il possible à partir de nos résultats de préciser la place du Ragondin ?

2. Mise en place d'un outil de suivi de la contamination environnementale

La leptospirose est une maladie dont la transmission à l'Homme ou aux animaux domestiques passe principalement par un contact avec de l'eau douce contaminée. Dans ce contexte, il nous a semblé intéressant de développer une méthode permettant de détecter la contamination de l'eau sans passer par une étape de piégeage des réservoirs potentiels.

2^{ème} PARTIE :

ETUDE EXPERIMENTALE

I. MATERIEL ET METHODES

A. Sites d'étude

Les prélèvements ont été réalisés dans deux zones humides de l'Est de la France : la Dombes et la Basse Vallée de l'Ognon (Figure 5). Le choix de ces sites a été réalisé sur deux critères principaux : la différence de prévalence de cas humains déclarés entre ces deux zones et la proximité d'une salle aux normes pour pouvoir réaliser les autopsies des animaux. La consultation des rapports d'activités du CNR Leptospirose de l'Institut Pasteur à Paris (CNR 2010) et la discussion avec les responsables des services concernés des CHU proches de ces zones nous a permis de constater que le nombre de cas déclarés par an de leptospiroses humaines dans la Basse Vallée de l'Ognon était plus important qu'en Dombes. Il nous a semblé intéressant de travailler sur deux zones avec des prévalences humaines déclarées différentes afin de déterminer si une des causes à cette différence pouvait être liée à l'environnement ou à une contamination différente de certaines espèces d'hôtes. Le Ragondin étant l'espèce de Rongeur aquatique largement majoritaire dans les deux zones, il nous a semblé intéressant de nous concentrer sur cet hôte dans notre étude.

La Dombes est située à 50 kilomètres au nord-est de Lyon. C'est un plateau de plus de 1000 km² borné par les rivières Ain et Saône, et le fleuve Rhône. Un ensemble de plus de 1200 étangs qui recouvrent près de 12 000 ha en eau occupe ce plateau. Ces étangs ont été creusés progressivement depuis le Moyen-Age et sont gérés selon une rotation entre mise en eau et assec qui permet alors une mise en culture des terres. Ces étangs sont principalement utilisés pour la pisciculture et la chasse mais certains sont maintenant des réserves naturelles privées comme la Fondation Vérôts ou des zones de récréation ouvertes au public comme le Parc aux Oiseaux de Villard les Dombes. Si on exclut les étangs (12 % de la superficie totale en 2000), ce plateau est constitué de terres agricoles utilisées (59 %

en 2000) pour la culture des céréales (maïs principalement), de prairies permanentes ou temporaires dédiées à l'élevage bovin et ovin et de quelques petits espaces forestiers (moins de 20 % en 2000) (Bernard & Lebreton 2007).

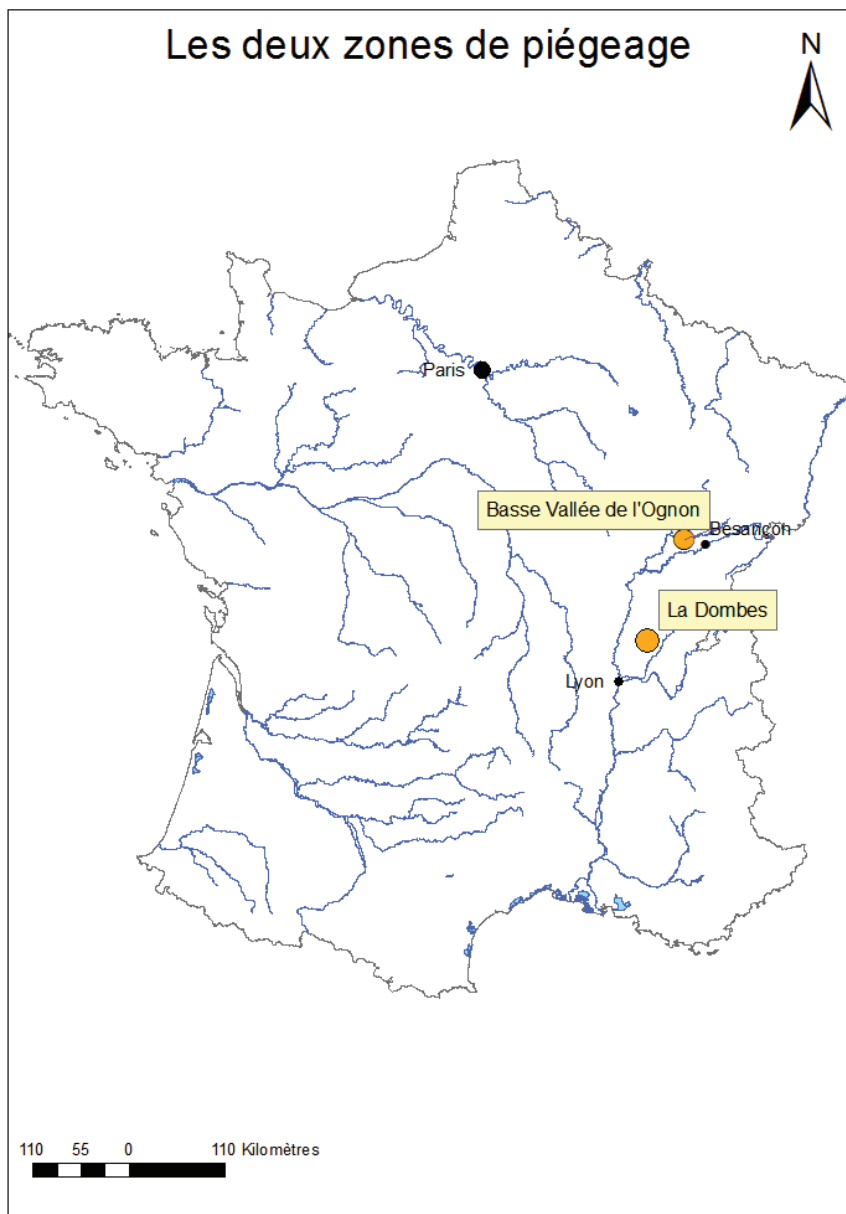


Figure 5 : Localisation des deux zones d'étude.

L'Ognon prend sa source à proximité du Ballon de Servance à 904 m d'altitude et s'écoule sur 215 kms jusqu'à sa confluence avec la Saône. La zone de la Basse Vallée de l'Ognon sur laquelle nous avons travaillé est située à environ 20 kilomètres au nord de Besançon et au point de rencontre de 3 départements : le Doubs, la Haute-Saône et le Jura.

Notre aire d'étude est composée d'un tronçon d'environ 50 kilomètres de long centré sur la commune de Marnay et limité par les communes de Pin en amont et de Vitreux en aval. L'environnement du périmètre d'étude est composé principalement de prairies et de milieux boisés avec quelques terres cultivées, principalement en maïs. L'Ognon est une rivière à forte activité halieutique. Une base de loisir est implantée sur la commune de Marnay. Cette zone est aussi très prisée des chasseurs pour la chasse au petit gibier, au gibier d'eau ainsi qu'au sanglier et au chevreuil.

B. Collecte des échantillons et des données

1. Animaux piégés

Le piégeage a été réalisé pendant les opérations de contrôle des populations de Ragondin dans les deux zones d'étude grâce à l'aide des associations départementales des piégeurs de l'Ain, du Doubs, du Jura et de la Haute-Saône. Dans ces quatre départements le Ragondin a été classé parmi les espèces nuisibles par les préfets durant toute la durée des opérations de prélèvements (Annexes III, IV, V, VI). Les sessions de piégeage ont eu lieu en Dombes pendant le printemps et l'été 2008, l'été et l'automne 2009 et le printemps et l'été 2010 ; et dans la Vallée de l'Ognon pendant les automnes 2008 et 2009.

Il avait été décidé de réaliser les piégeages dans chacune des zones le long d'un transect avec des cellules hexagonales pour avoir une répartition homogène des animaux prélevés dans chaque zone. Toutefois, pour des raisons de différences de densité dans les populations de Ragondin et surtout en raison de la difficulté de pénétrer sur certaines propriétés privées, ce schéma n'a pas pu être respecté.

Le piégeage a été réalisé au moyen de piège-cage de dimension 102x35x35 cm sans appâts qui sont placés dans les lieux de passage de ragondins. Les pièges sont tous vérifiés avant midi et si un animal a été capturé il est ensuite euthanasié de la façon la plus éthique possible (tir à balle ou énuquation) suivant les recommandations de l'AVMA (American Veterinary Medicine Association) (AVMA 2007). Chaque animal est identifié par un numéro unique et le point GPS (Global Positioning System) du piège est relevé. Il est à noter qu'occasionnellement, nos pièges ont capturé deux autres espèces de rongeurs aquatiques : des Rats musqués (*Ondatra zibethicus*), lui aussi classé nuisible, et des Rats surmulot (*Rattus norvegicus*).

Sitôt après la mort, du sang est prélevé par ponction intracardiaque et le sang est transféré dans un tube sec avec un activateur de coagulation.

2. Prélèvements d'eau

Tous les prélèvements d'eau ont été réalisés dans la Dombes durant le printemps 2008 et le printemps 2010. La plupart ont eu lieu à côté de pièges ayant capturé des Ragondins. Quarante sept prélèvements de 50 ml ont ainsi été réalisés au moyen de tubes en polypropylène. Ces échantillons ont été stockés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

3. Données environnementales

Pour chaque lieu de piégeage, un recueil de données environnementales a été réalisé à l'aide d'un questionnaire standardisé (Annexe VII) afin de noter la présence de forêts, de cultures, de routes, de pâturage, le type de zone humide. Pour chaque journée de piégeage, les données météorologiques du jour (ensoleillement, précipitations) ainsi que l'intensité des précipitations des dernières 24h ont été relevées.

C. Analyses réalisées

1. Autopsies

Elles ont toutes été pratiquées par la même personne et ont eu lieu dans le bâtiment prévu pour les autopsies du Campus Vétérinaire de Lyon pour les animaux capturés dans la Dombes et dans la salle du Laboratoire Vétérinaire du Doubs (LVD) de Besançon pour les animaux capturés dans la Basse Vallée de l'Ognon.

Chaque animal a été autopsié le jour de sa capture. Avant de procéder à l'autopsie, des données morphologiques ont été recueillies : poids, taille du corps (sans la queue), taille du pied postérieur, taille de l'avant-bras. Durant l'autopsie, le sexe de l'animal, son statut sexuel ainsi que la condition corporelle ont été notés sur une fiche individuelle (Annexe VIII). La condition corporelle a été évaluée par l'examen de la déposition du tissu adipeux suivant 3 catégories : bon état général, maigre, cachectique. Les animaux ont été classés en 3 catégories d'âge (jeunes au nid, juvéniles et adultes) suivant leur poids et la maturité des organes sexuels.

Durant l'autopsie, les lésions macroscopiques touchant les organes de la cavité abdominale et les téguments ont été relevées sur la fiche individuelle. Les lésions touchant la cavité thoracique n'ont pas été prises en considérations pour éviter toute confusion avec des lésions liées à la méthode de mise à mort.

Pour chaque animal les deux reins ont été prélevés de manière aseptique, le premier a été immédiatement conservé à -20 °C jusqu'à l'extraction d'ADN pour la recherche des leptospires par PCR (polymerase chain reaction), pour le second, dans le cas des animaux piégés dans la Dombes, une partie a été utilisée pour la mise en culture et l'isolement de leptospires et dans tous les cas une tranche a été placée dans du formol tamponné pour une utilisation ultérieure en histologie.

2. Histologie

L'histologie réalisée a pour but de déterminer la structure du rein ainsi que des éventuelles lésions présentes chez les ragondins capturés, aussi le protocole utilisé a été standard. Les échantillons ont été fixés dans du formol tamponné à 10 %. Après recoupe et mise en cassettes des sections (une par animal), les tissus ont été déshydratés et imprégnés par la paraffine. Des coupes de 4 µm ont été réalisées par un microtome rotatif puis les lames ont été colorées par l'hémalun-éosine. La lecture a été réalisée par un pathologiste du laboratoire d'Anatomo- Pathologie du Campus Vétérinaire de Lyon.

3. Sérologie

Chaque échantillon de sang a été centrifugé à 5000 tours/minutes pendant 10 minutes pour permettre une bonne séparation du sérum qui a ensuite été séparé puis conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation pour un examen sérologique selon la méthode de référence, le MAT (Faine et al. 1999) au Laboratoire des Leptospires du Campus Vétérinaire de Lyon.

Le but de ce test est de faire réagir des dilutions successives de chaque sérum vis-à-vis d'un panel de souches vivantes de leptospires et de contrôler la présence ou non d'agglutination à l'aide d'un microscope à fond noir. Si aucune agglutination n'est visible, le sérum est considéré comme non réactif vis-à-vis de la souche en question, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'anticorps contre cette souche. Si une agglutination est détectée, le titre de positivité sera considéré comme la plus forte dilution où 50 % au moins des leptospires sont agglutinées. Dans le cas de notre étude, le panel utilisé regroupe l'ensemble des souches présentes au laboratoire et comprend 24 sérovars de 14 sérogroupes différents.

Le seuil de positivité a été fixé à 1/100 suivant les données de la littérature (Michel et al. 2001) et l'expérience du laboratoire.

4. Mise en culture et isolement

Le rein dans sa capsule est rincé plusieurs fois avec du PBS (Phosphate Buffer Solution) stérile puis la capsule est retirée de façon aseptique sous un PSM (poste de sécurité microbiologique). Une partie est découpée au milieu de l'organe en prenant à la fois la corticale et la médulla puis est scarifiée avec un scalpel avant d'être placée dans du milieu EMJH pendant 24 heures (Ellinghausen et McCullough modifié par Johnson et Harris) (Ellinghausen & McCullough 1965 ; Johnson & Harris 1967). Un millilitre de ce tube est ensuite placé dans 9 mL de milieu EMJH neuf (tube 1/10) puis des dilutions sériées sont réalisées de 10 en 10 jusqu'à 1/1000. Les cultures sont maintenues dans une étuve à 30 °C pendant 12 semaines avant d'être déclarées négatives et sont contrôlées une fois par semaine au microscope à fond noir. Si des contaminations par d'autres micro-organismes sont détectées au cours de ces contrôles, une purification des cultures par filtration sur des filtres de 0.45 ou 0.2 µm et/ou par traitement avec du 5-fluorouracile (250 µg/mL) est entreprise suivant le niveau de contamination détecté.

Il ne nous a pas été possible d'obtenir des cultures pures à partir de nos échantillons de ragondins. Par contre, les observations nous permettaient dans certains cas de détecter la présence de micro-organismes pouvant évoquer des leptospires. Afin de confirmer la présence de leptospires pathogènes dans nos cultures de reins de ragondins, nous avons soumis ces cultures à une méthode de PCR quantitative en temps réel (QPCR) spécifique adaptée de la méthode décrite par Levett et collaborateurs (2005). Le volume réactionnel de 20 µL contient 1 µL de milieu de culture, 10 µL de Mix 2X ABsolut™ Blue QPCR SYBR® Green Low ROX (ThermoFischer Scientific®, Courtaboeuf, France), 50 nM d'amorce sens et 150 nM d'amorce anti-sens développées par Levett et collaborateurs (2005). Les cycles d'amplifications ont été réalisés sur le thermocycleur Mx3000P (Stratagène) et ont consisté en 1 cycle d'activation de 15 minutes à 95 °C, puis de 40 cycles : 15 secondes à 95 °C, 30 secondes à 67 °C, 40 secondes à 72 °C, et enfin après une étape de 30 secondes à 95 °C.

pour stopper la réaction, une courbe de dissociation a été réalisée suivant les paramètres par défaut de l'appareil.

5. QPCR sur les reins

Les reins ont été décongelés de façon progressive à +4 °C pendant 12 heures avant la procédure d'extraction de l'ADN. Ils ont ensuite été découpés de façon aseptiques sous PSM puis broyés à travers une seringue stérile de 10 mL dans du tampon phosphate (PBS) stérile. Ce broyat a ensuite été utilisé pour l'extraction d'ADN.

L'extraction d'ADN a été réalisée avec un Kit Nucleospin Tissue (Macherey Nagel, Düren, Germany) et la réaction de QPCR avec le Kit TaqVet PathoLept (LSI, Lissieu, France) spécifiquement développé pour la détection des leptospires pathogènes dans des échantillons d'animaux et notamment dans le rein. L'extraction d'ADN et la réaction de QPCR ont été réalisées suivant les instructions données dans le manuel d'utilisation du Kit TaqVet PathoLept. Les cycles d'amplification ont été réalisés sur le RotorGene 6000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) et ont consisté en un cycle d'activation de 5 minutes à 95 °C puis 45 cycles : 30 secondes à 95 °C et 35 secondes à 60 °C.

6. Détection des leptospires dans l'eau

Le développement et la validation de la méthode pour l'extraction d'ADN et la détection des leptospires pathogènes dans l'eau douce est le sujet central de l'article 2 présenté dans ce travail.

7. Analyses statistiques

Les différences entre les deux populations ont été testées par le biais du test de χ^2 d'indépendance de Pearson en ce qui concerne les variables qualitatives et le test de la somme des rangs de Mann-Whitney-Wilcoxon pour les variables quantitatives. Le seuil de significativité a été fixé à $p \leq 0,05$ dans tous les cas. Tous les tests statistiques ont été réalisés grâce au logiciel R 2.11.1 (R Development Core Team 2011).

8. Cartographie

Toutes les cartes présentées dans ce document ont été réalisées grâce à la suite ArcGis version 9 et au logiciel ArcMap version 9.1.

II. SUIVI DE LA CONTAMINATION DES POPULATIONS DE RAGONDIN DANS DEUX ZONES HUMIDES

A. Présentation des résultats de piégeage et de contamination

Dans cette partie nous présenterons sous forme graphique les résultats de piégeage, de sérologie et de portage par QPCR dans les deux zones étudiées.

Les figures 6a (Vallée de l'Ognon) et 6b (Dombes) présentent le nombre d'animaux piégés en fonction de la localisation dans la zone respective.

Les figures 7a (Vallée de l'Ognon) et 7b (Dombes) présentent les résultats des tests sérologiques en fonction des localisations de piégeages dans chaque zone.

Les figures 8a (Vallée de l'Ognon) et 8b (Dombes) présentent les résultats en termes de sérogroupes majoritaires dans chaque zone. Un séro groupe est considéré comme séro groupe majoritaire si son titre réactionnel est au moins supérieur de deux dilutions par rapport aux autres sérogroupes. Dans le cas contraire on considère qu'il y a co-agglutination.

Les figures 9a (Vallée de l'Ognon) et 9b (Dombes) présentent les résultats des tests de portage rénal par QPCR en fonction des localisations des piégeages dans chaque zone.

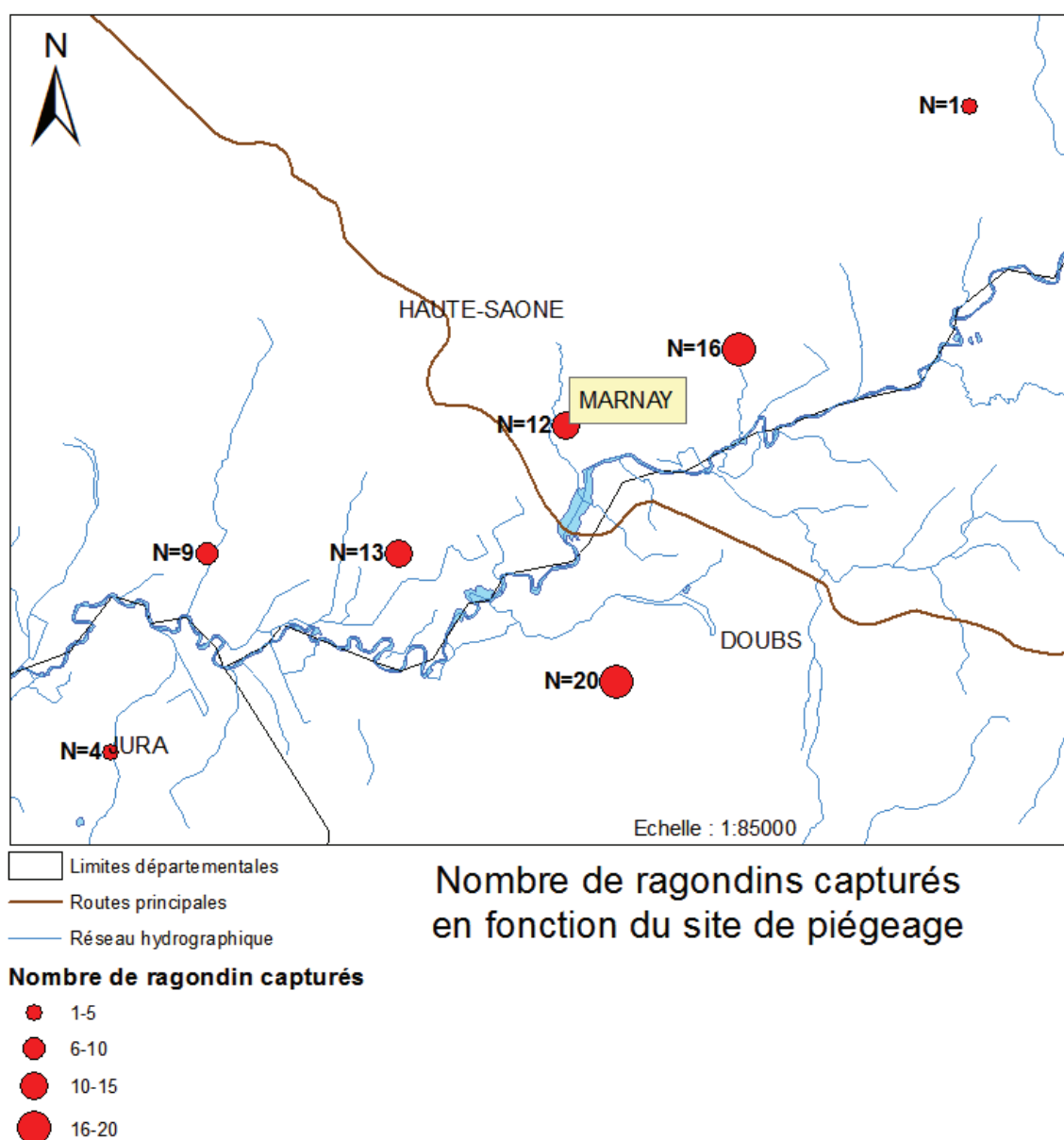


Figure 6a : Nombre de ragondins piégés en fonction du site de piégeage dans la Basse Vallée de l'Ognon

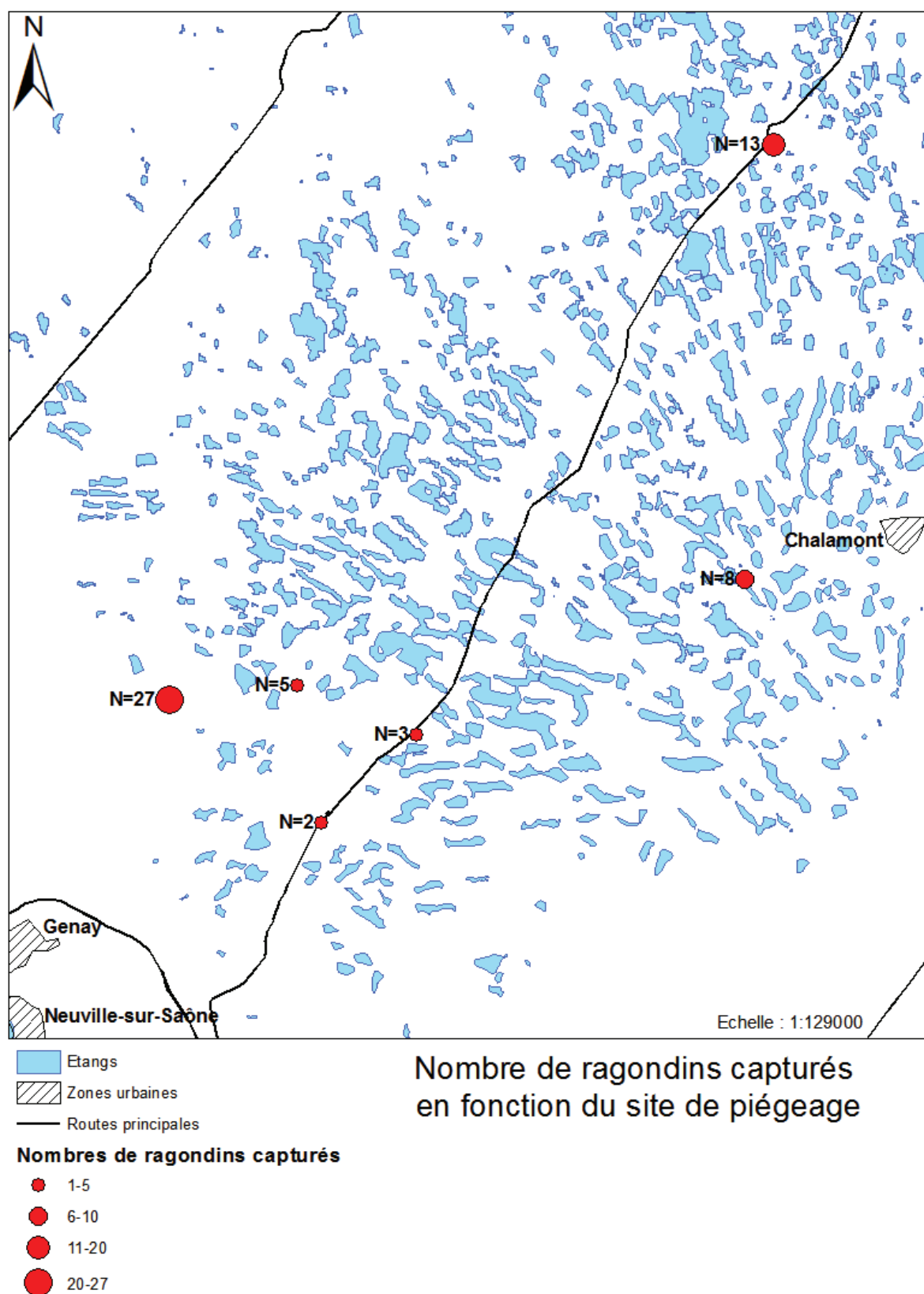


Figure 6b : Nombre de ragondins piégés en fonction du site dans la Dombes

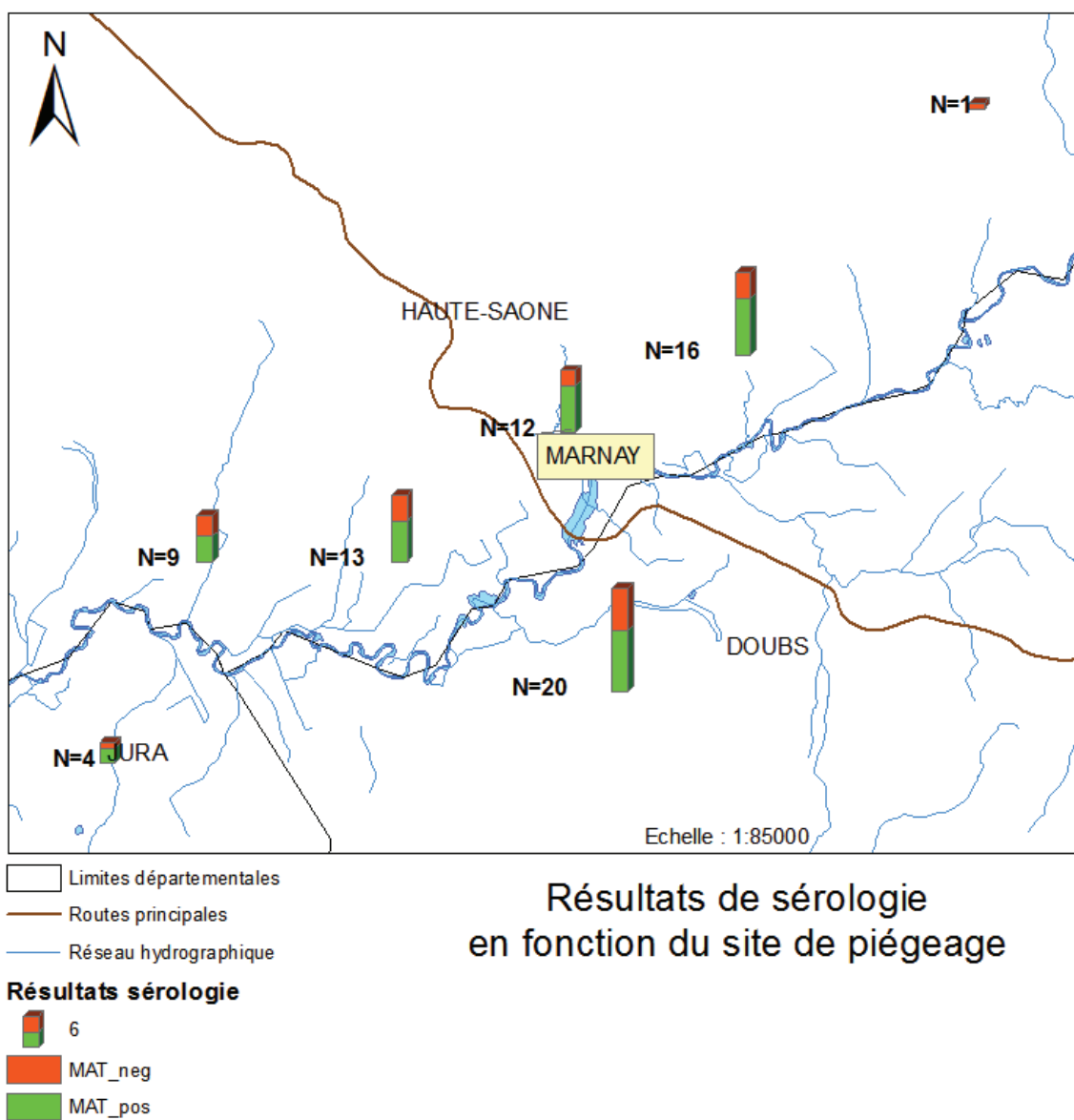


Figure 7a : Répartition des résultats des tests sérologiques en fonction du site dans la Basse Vallée de l'Ognon (MAT_neg : sérologie MAT négative, MAT_pos : sérologie MAT positive)

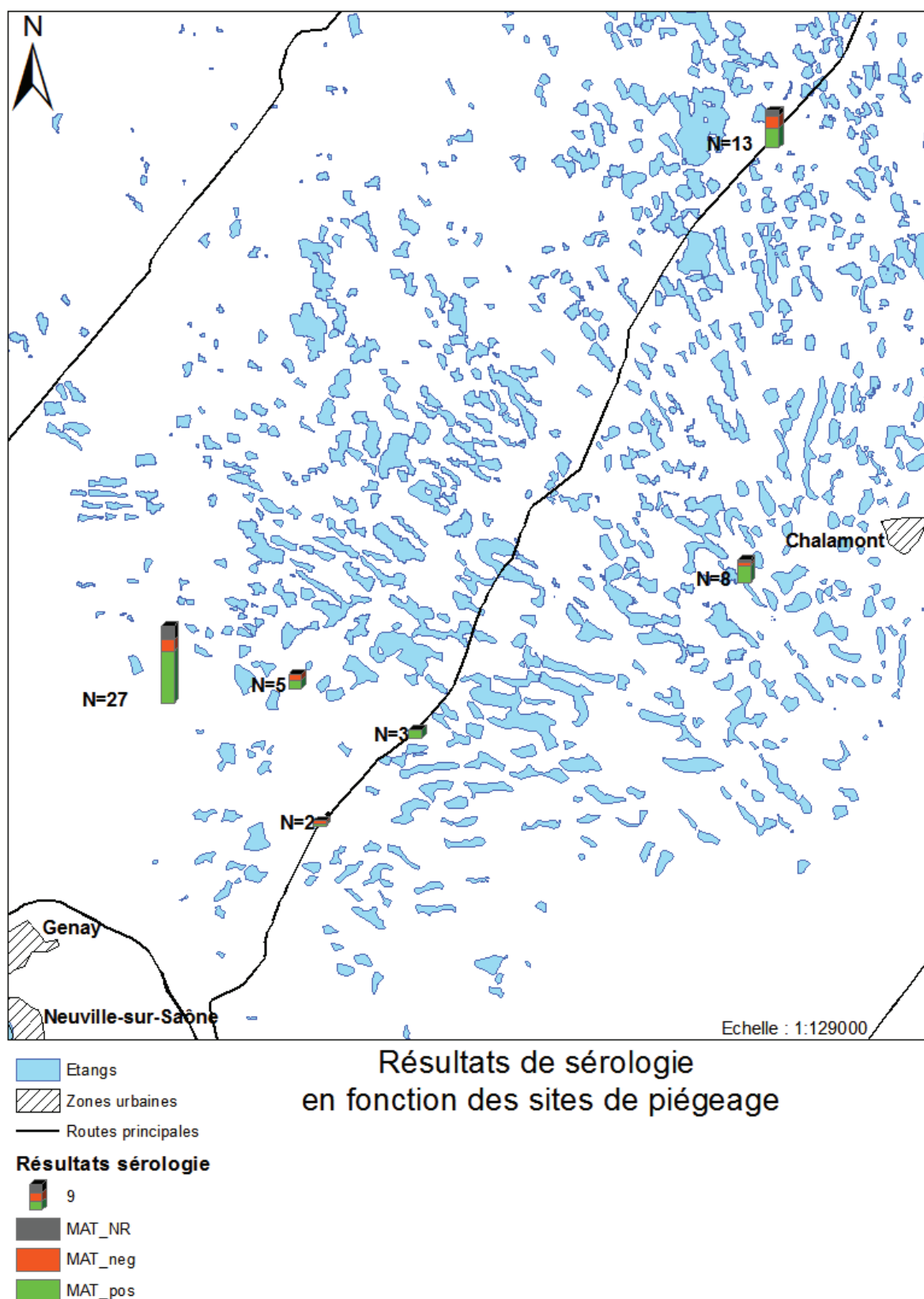


Figure 7b : Répartition des résultats des tests sérologiques en fonction du site dans la Dombes. (MAT_NR : sérologie non réalisée, MAT_neg : sérologie MAT négative, MAT_pos : sérologie MAT positive)

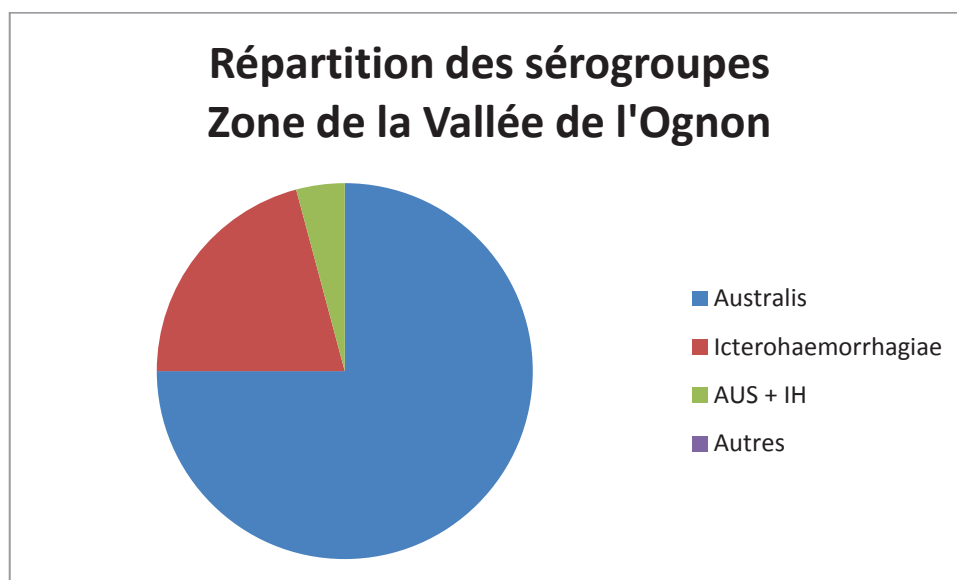


Figure 8a : Répartition des résultats des tests sérologiques en termes de sérogroupe majoritaire dans la Basse Vallée de l'Ognon (AUS+IH = co-agglutination entre les sérogroupes Australis et Icterohaemorrhagiae).

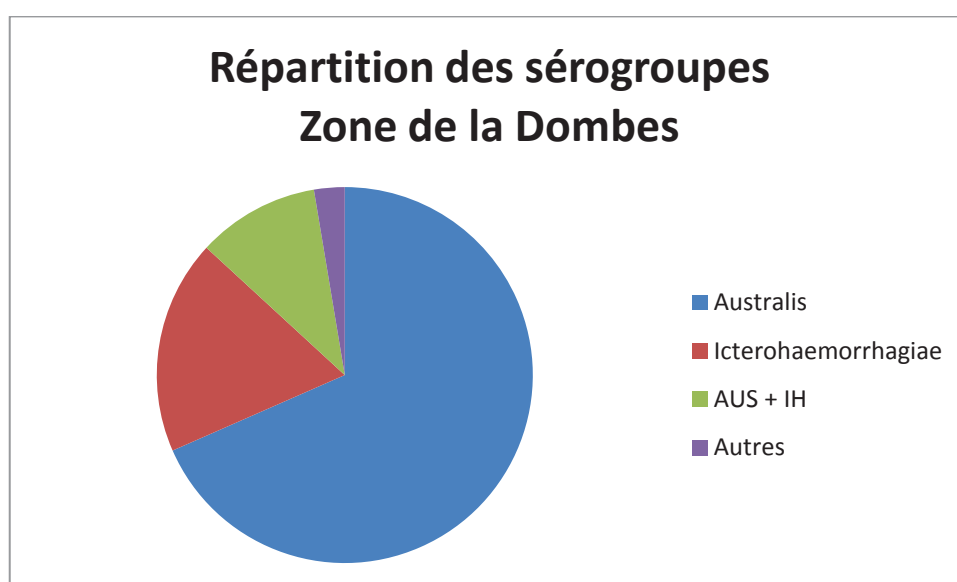


Figure 8b : Répartition des résultats des tests sérologiques en termes de sérogroupe majoritaire dans la Dombes (AUS+IH = co-agglutination entre les sérogroupes Australis et Icterohaemorrhagiae).

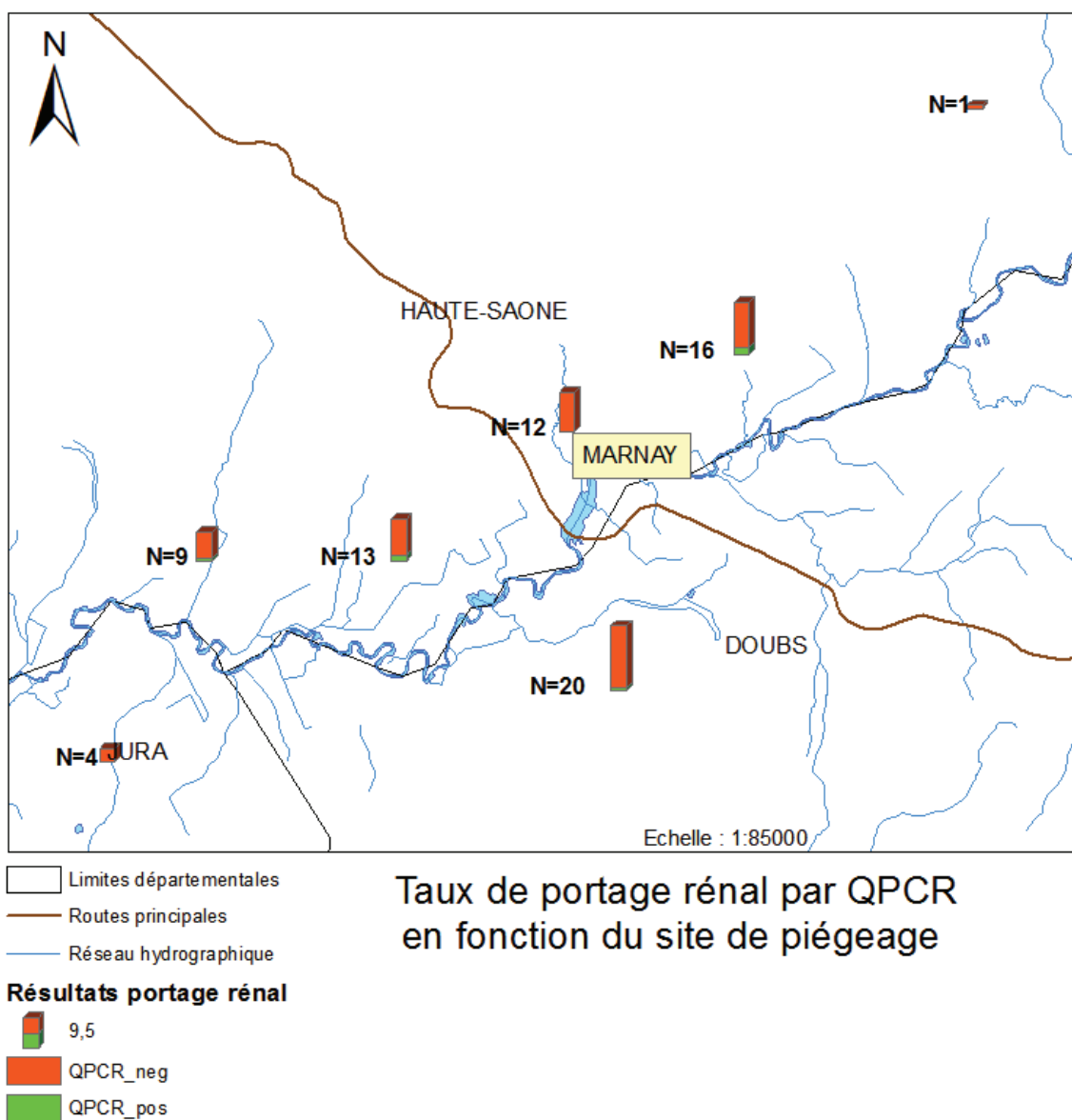
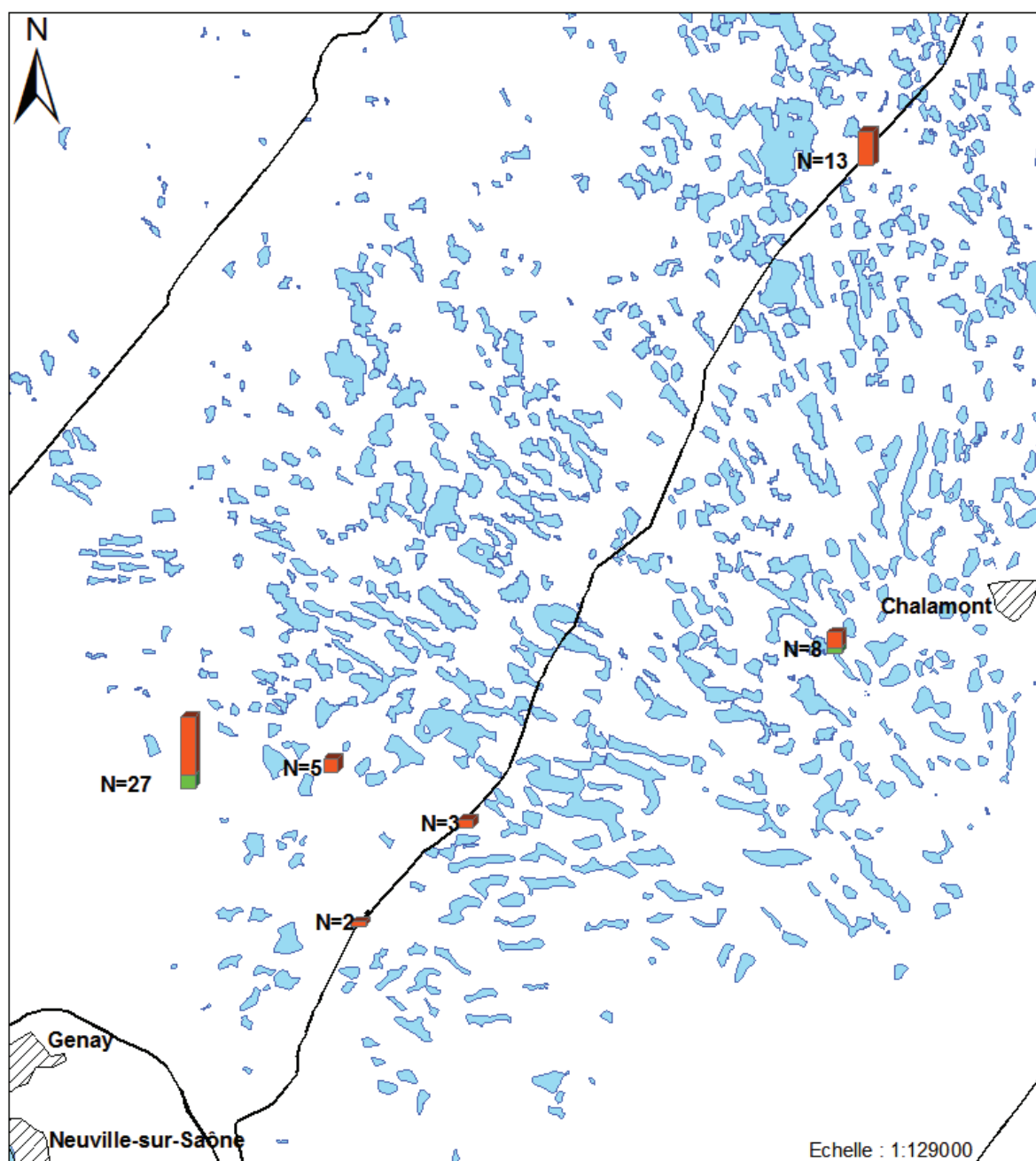


Figure 9a : Répartition des résultats des tests de portage rénal par QPCR en fonction du site dans la Basse Vallée de l'Ognon (QPCR_neg : QPCR négative, QPCR_pos : QPCR positive)



Taux de portage rénal par QPCR en fonction du site de piégeage

Figure 9b : Répartition des résultats des tests de portage rénal par QPCR en fonction du site dans la Dombes (QPCR_neg : QPCR négative, QPCR_pos : QPCR positive).

B. Place du Ragondin dans le cycle épidémiologique de la leptospirose

Les objectifs de ce travail étaient de quantifier la prévalence de la leptospirose dans deux populations de Ragondins provenant de deux zones humides dans l'Est de la France et de mesurer les éventuelles répercussions cliniques et/ou histologiques de la maladie chez les individus afin de pouvoir déterminer quelle est la place de cette espèce dans le cycle épidémiologique de la leptospirose.

Plusieurs points clés ont été abordés :

- 1) La structure des populations piégées
- 2) L'état de santé des animaux par le biais
 - a) D'une autopsie complète
 - b) D'une évaluation histologique des reins
- 3) Leur statut vis-à-vis de la leptospirose
 - a) D'un point de vue sérologique par la technique sérologique de référence : le MAT
 - b) D'un point du vue du portage rénal grâce à deux techniques : la QPCR dans tous les cas et la mise en culture pour les animaux piégés dans une des deux zones.

En épidémiologie, la notion d'espèce réservoir fait référence à des espèces qui sont porteuses d'un agent pathogène de façon endémique et dont les individus porteurs n'expriment pas (ou très peu) de signes cliniques liés à cette infection. Au contraire des espèces dites sensibles ou accidentelles qui présentent des signes cliniques et/ou nécropsiques liés à l'infection.

Cette étude nous a permis de déterminer le haut niveau de circulation de la bactérie dans nos deux populations de Ragondins ainsi qu'un portage non négligeable au niveau rénal.

Les individus ne présentaient pas de lésions macroscopiques majeures lors des autopsies qui auraient pu être reliées à un état général détérioré ou plus spécifiquement à la leptospirose. L'histologie n'a révélé aucune lésion significative dans plus de 80 % des cas. Les rares lésions significatives détectées ne sont pas liées à un portage rénal de la bactérie.

En conséquence, notre étude apporte des arguments très en faveur du classement du Ragondin comme hôte réservoir de la leptospirose dans les zones humides de l'est de la France.

Cette étude a été soumise à *European Journal of Wildlife Research*. La version incluse dans ce manuscrit est en cours de revue auprès des reviewers.

The role of the Coypu (*Myocastor coypus*) in the epidemiological cycle of leptospirosis: a study in two wetlands in the East of France

Julie Vein^{1,2}, Agnès Leblond², Patrick Belli³, Angeli Kodjo^{1,4} and Philippe J. Berny^{1,5}

¹ USC 1233 INRA – VetAgro Sup, ² INRA, UR346 Epidémiologie Animale, Département Hippique, Université de Lyon, ³ Unité Pathologie Morphologique et Clinique, ⁴ Laboratoire des Leptospires

VetAgro Sup Campus Vétérinaire de Lyon, 1 Avenue Bourgelat, 69280 Marcy L'Etoile France

⁵ Corresponding author: email: philippe.berny@vetagro-sup.fr, phone: +33 4 78 87 26 31, fax: +33 4 78 87 80 12)

Abstract

Leptospirosis is caused by pathogenic species of the *Leptospira* genus. Animals can have two roles in the epidemiological cycle: they can be an accidental host and suffer of the disease or a reservoir host which doesn't express any clinical sign and shed bacteria in their urine. Some of the most known reservoirs for leptospirosis are certain Rodent species, but the situation is less clear for aquatic rodents, especially for coypu (*Myocastor coypus*). It has been shown that this species can have kidney carriage for leptospirosis but the relationship between carriage and individuals or population health has not been investigated yet. We trapped 133 coypus in two wetlands in the East of France during three years. For each animal, a complete necropsy, leptospirosis serology and a specific QPCR (real-time quantitative PCR) for pathogenic leptospires was performed and in addition, for some animals, a specific kidney culture for leptospires and histology on kidney were performed. In spite of a high seroprevalence (respectively 76 % and 64 %) and of a significant prevalence of kidney carriage in both areas (respectively 12.1 % and 8.0 % of positive QPCR on kidney), the trapped animals seemed in good health and the population didn't seem to be affected by the circulation of the bacteria. These findings are concurring arguments to consider coypu as a real reservoir for leptospirosis.

Key words: Coypu, epidemiological cycle, leptospirosis, *Myocastor coypus*, reservoir host

Introduction

Leptospirosis is the most prevalent bacterial zoonosis in the world (Levett 2001; Pappas et al. 2008). The infection is caused by pathogenic leptospires of the *Leptospira* genus, which is composed of 20 genomic species, comprising over 250 serovars grouped in 25 serogroups. The species are divided in three groups regarding their 16S rDNA phylogeny: pathogenic, non pathogenic and intermediate. (Perolat et al.; Ko et al. 2009).

The World Health Organization considers that at least 500,000 people per year develop a serious form of the disease, most of them in tropical and subtropical zones but also in temperate areas (WHO 1999). Metropolitan France is one of the most affected countries in the European Union with about 250-300 declared cases per year (Baranton et al. 2006; Picardeau et al. 2008). In France and in the European Union, the risk factors switch from an occupational disease to a recreational disease, in relation to water sports, fishing or hunting in freshwater areas (Nardone et al. 2004).

Humans and animals can be infected by direct or indirect contact of intact mucous membranes or wounded skin with urines of contaminated animal. In humans, symptoms vary from an influenza-like syndrome to severe complications like Weil's syndrome or severe pulmonary hemorrhages (Bharti et al. 2003). In animals, clinical signs can be very diverse and depend of the species infected. (Adler and de la Pena Moctezuma 2010).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Leptospira are maintained in the environment by animal reservoirs. Reservoirs are defined as chronically-infected mammals that do not show clinical signs but are leptospires carriers in their kidneys and shed pathogenic leptospires in their urine (Adler and de la Pena Moctezuma 2010).

In the Rodent Order, the situation of the different species is contrasting. While some of the species, especially mice (*Mus musculus*) and rats (*Rattus sp.*), are known to be reservoirs of pathogenic leptospires (Levett 2001), others, such as hamsters (*Mesocricetus auratus*) or guinea pigs (*Cavia porcellus*) are very susceptible hosts and can be used as a pathogenic model for severe leptospirosis in human (Nally et al. 2004; Croda et al. 2008). Considering the aquatic rodents, and especially the Coypu (*Myocastor coypus*), it is not known to which host category they belong.

Coypu, also named nutria, comes from South America (south of 23° latitude). It has been introduced in France for fur farming in the 1880's and, as this activity declined after 1925, some animals were released and became feral. Coypu is considered as a pest in France because of ecological (destruction of marshland, of water birds nests) and agricultural (destruction of crops) nuisances (Carter and Leonard 2002; Bertolino et al. 2011). Population control operations can be performed using traps and shooting. In spite of these operations, coypus have colonized France almost entirely (Le Louarn and Quéré 2003). In their natural distribution area, the first description of *Leptospira* isolation from a coypu was made in Argentina in 1949 (Anchezar et al. 1949 cited in Michel et al. 2001). In Europe, the first description of carriage of leptospires by a coypu was made in Great Britain in 1984 (Waitkins et al. 1985). In France, two recent papers studied the relations between coypu and leptospirosis. The first one, focused on the

western part of France, is the first report of renal carriage (Michel et al. 2001). The other one studied the relation between seropositivity and renal carriage in some species of rodents including coypu, Norway rat (*Rattus norvegicus*) and muskrat (*Ondatra zibethicus*). The authors found that even if coypus presented a high seroprevalence, the renal carriage was not as frequent as in the others rodent species studied (Aviat et al. 2009). To our knowledge, no study has investigated the specific place of the coypu in the epidemiological cycle of leptospirosis, whether it is a real reservoir or an accidental host becoming sick because of the infection.

The aims of our study was to assess seroprevalence as well as the prevalence of renal carriage in coypu populations of two wetlands areas used for recreational activities and to investigate whether coypu harbor renal lesions in relation with seropositivity and renal carriage and so if it can be considered as a reservoir host.

Materials and methods

Study areas

Coypus were caught in two areas (the Dombes and the Low Ognon Valley) between 2008 and 2010 (Fig 1).

The Dombes, an area 50 kilometers north of Lyon (5°3' East, 46°1' North), is a complex of about 1200 ponds of various sizes. These ponds are used for different purposes, including fish farming, hunting, and include natural reserves, and recreation areas. The area is a plateau of 1000 square kilometers that is composed

of agricultural lands (especially dedicated to corn production), grassland and some woodland.

The Low Ognon Valley is located 20 kilometers north of Besançon in the North East of France (5°45' East, 47°16' North). The Ognon is a great river with running water of 215 kilometers long. The studied area was restricted to a part of about 50 kilometers long. The biotope is composed mainly of grasslands and woods. Some agricultural lands are present especially for corn production. The river is a well-known fishing site and, in the middle of the studied area, an aquatic recreation site is settled. The area is also used by hunters (waterfowls, wild boars and roe deer).

These two areas were selected because of the presence of large coypu populations and because the number of cases of leptospirosis declared in humans seemed quite different. As several cases are declared every year in the Ognon Valley, the number of declared cases in the Dombes is very scarce.

Sampling and collection of data

In the Dombes trapping took place in spring and early summer 2008, summer and autumn 2009 and spring and early summer 2010. In the Ognon Valley trapping took place in September and October 2008 and in October 2009.

Trapping was performed with registered trappers in each town during coypus' population control operations. Animals were caught in cage-traps without baits and were humanely killed as soon as they were discovered. Traps were visited every day. As the animals were not easy to handle, the sacrifice was performed by gunshot as recommended by the American Veterinary Medical Association panel

on euthanasia (AVMA 2007). Each animal was identified by a unique number and GPS (Global Positioning System) point was noted.

A blood sample was collected immediately after death by cardiac puncture using sterile needle and syringe. Blood was put in a tube coated with silicone and containing a clotting activator (Venoject® Terumo®).

Laboratory analysis

Necropsy

All the animals were necropsied the day of their capture. Necropsies were performed at the Veterinary Campus for the animals trapped in the Dombes area and at the Doubs Veterinary Laboratory in Besançon for the animals from the Ognon Valley.

For each animal body weight, body length (without the tail), sex and sexual status (mature or not, gravidity) were reported as well as body condition. Age was determined considering both body weight and sexual maturity. It was classified in 3 categories: cubs less than three months, juvenile from three months to sexual maturity (e.g. around six to eight months) and adults. Body condition was determined through the examination of fat tissues disposition patterns. It was classified as good condition, thin or cachectic animal.

For each animal one kidney was removed aseptically and immediately stored at -20°C until PCR diagnosis of leptospirosis. The other kidney was removed and a slice was put into buffered formalin for histology. For the animals captured in the Dombes area, the second kidney was removed aseptically and one piece was used for *Leptospira* isolation by culture before sampling for histology.

Histology

Kidney samples were fixed in 10 % buffered formalin and routinely processed in paraffin embedded cassettes. Cuts of 4µm were obtained through a rotating microtome and were stained with hematoxinilin-eosin.

Serology

Blood samples were centrifuged at 5000 rpm for 10 minutes for serum separation. Sera samples were stored at -20°C until MAT (Micro Agglutination Test) serology (Faine et al. 1999). MAT was performed at the Leptospire Laboratory of the Veterinary Campus on all sera using a panel of 24 serovars representing 14 serogroups (Table 1). Considering the literature (Michel et al. 2001) and the experience of the laboratory for wild fauna the threshold title for positivity was defined at 1/100. Serum without antibodies was used as negative control and sera with antibodies against each strain used in the MAT panel were used as positive control.

The positive serogroups in one animal was defined as the one against which the highest titer was found. If more than one serogroup reacted at the same titer all were considered as positive in this animal.

Culture

Kidney capsule was removed aseptically and kidney was washed with sterile PBS. A piece was cut in the middle of the kidney and was scarified with a sterile scalpel then put in EMJH (Ellinghausen and McCullough 1965 modified by Johnson and Harris 1967) liquid medium for 24 hours. After that 1 ml of the medium was

removed and mixed with 9 ml of fresh EMJH medium (tube 1/10). One tenth serial dilutions were performed from 1/10 to 1/1000. Culture tubes were incubated at 30°C for 12 weeks and examined by dark field microscopy every week. If contaminations by opportunistic micro-organisms occurred, cultures were purified by filtration through 0.45 µ or 0.2 µ filters and some media tubes were enriched with 5- fluorouracil, depending on contamination level.

As contaminations could not be eliminated completely, cultures were tested by Q-PCR for the presence of pathogenic leptospires. In brief, the reaction volume was 20 µL and contained 1 µL of culture medium, 10 µL of 2X ABsolut™ Blue QPCR SYBR® Green Low ROX Mix (ABgene, ThermoFischer Scientific ®, Courtaboeuf, France), 50 nM of the forward primer and 150 nM of the reverse primer. The primers used in this experiment have been described by Levett and collaborators (2005). Positive control was performed with 1µL of a log phase culture of a strain from the serovar Australis and negative control with 1µL of pure water. The amplification protocol was performed on the Mx3000P (Stratagene) and consisted in one cycle of 15 minutes at 95°C for enzyme activation, followed by 40 cycles of amplification (15 s at 95°C, 30 s at 67°C, 40 s at 72°C) then the amplification reaction was stopped 30 seconds at 95 °C and cooled 30 seconds at 55 °C. Finally, a dissociation curve from 55°to 95°C was established with the default parameters of the Mx3000P.

Q-PCR on kidneys

Kidneys were gently thawed at 4°C 12 hours before DNA extraction then they were crushed through a 10 ml sterile syringe in a 50 ml sterile polypropylene tube containing sterile PBS.

DNA extraction was performed using Nucleospin Tissue Kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) and Q-PCR was performed using the TaqVet™ PathoLept Kit (LSI, Lissieu, France), specific for the detection of pathogenic leptospires. The extraction and Q-PCR procedure was performed following the TaqVet™ PathoLept Kit instructions. The positive and negative controls were contained in the kit procedure. The Q-PCR reaction was run on the RotorGene 6000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia). The amplification protocol was 95°C for 5 minutes for enzyme activation and 45 cycles of 95 °C for 30 seconds and 60°C for 35 seconds.

Statistical methods

Differences between the two populations regarding physical characteristics, seroprevalence or leptospire carriage in the kidney were tested using Pearson's chi squared test for qualitative variables and Wilcoxon sum rank test for quantitative variables. Results were considered significant for p-values ≤ 0.05 . All statistical analyses were performed using the R 2.11.1 software (R Development Core Team 2011).

Results

Trapping and Necropsy

During the study period, 133 coypus were caught, 58 in the Dombes and 75 in the Ognon Valley. We also trapped some rats and muskrats (respectively seven and nine) but the results for these animals were not included in this paper.

Sex ratio was not statistically different between the two areas and was 0.7 female for 1 male in the whole (55 females and 78 males). In the adult females group (n=45) the proportion of gravidity was not different between the two areas (29 females gravid, 64%).

The age class distribution was statistically different in the two populations (p=0.005). In the Dombes, six animals (10.3%) were cubs, eight (13.8%) juveniles and 44 (75.9%) were mature adults. Conversely, no cubs (0%), five juveniles (6.7%) and 70 mature adults (93.3%) were trapped in the Ognon Valley.

Given the very low number of coypus trapped in the cub and juvenile age class, the weight distribution was compared only in the adult age class. Heavier animals were trapped in the Ognon Valley (p=0.002). The median for the Dombes' adults' population was 5,150 g (from 1,400 g to 8,100 g) and for the Ognon Valley's adults' population 6,050 g (from 1,800 to 9,500 g).

For the animals trapped in the Dombes area, all but three adults had a very good body condition. The three other animals were classified as thin. They were trapped in April (one gravid female and two males). In the Ognon Valley, all the animals but two adult males had a good body condition. They were trapped the same day (28/10/2009) at the same place.

During necropsy, it was noteworthy that almost all adult animals (more than one year) presented scars on their foot or tail, probably due to cold injuries as it is commonly observed in other places in France (Doncaster and Micol 1990). Apart from these scars, most lesions were on the liver or the kidneys. Liver abscesses, generally accompanied with focal peritonitis, were noted in nine animals in the Ognon Valley, three other animals from Ognon Valley presented small

hemorrhages or congestion and some heterogeneity in color (probably a post mortem alteration) was noted for nine coypus in Ognon Valley and eight in Dombes. Regarding the kidneys, the most frequent lesions were small hemorrhages (seven animals in Dombes and five in Ognon), some irregularities in the form (two in Dombes, seven in Ognon) or in consistence (three cases in Dombes). For the other organs, we observed two coypus with skin abscesses, one with inflammatory lesions and necrosis of the pylori in Ognon Valley and one with urinary lithiasis in the bladder in Dombes. In summary, very few trapped coypus presented significant abdominal lesions.

Histology

On the 133-trapped coypus, 88 were analyzed through kidney histology, 13 from the Dombes and 75 from the Ognon Valley.

Taken as a whole, only two adult females trapped in the Ognon Valley (2.3%, n=88) had a chronic interstitial nephritis: histologically severe glomerulo-sclerosis and extensive interstitial fibrosis were observed. The kidney was filled with collagen fiber and the normal nephrons were very rare. Most glomerules were atrophied or replaced by proteins, tube were dilated and formed microscopic cysts. For one individual, the lesion was generalized and the kidney was almost non functional (Fig 2a).

Nineteen other animals (five in Dombes and 14 in Ognon Valley, no significant difference) presented a modification in their kidney, mostly characterized as subacute interstitial nephritis or little infarcts of very little histological significance (Fig 2b). The subacute interstitial nephritis was characterized by normal architecture of glomeruli and tubes surrounded by a light infiltrate of mononuclear cells (around 100 cells per cluster). The regularity of the lesion and

its low extent compared to the total area lead us to conclude to a non-significant lesion.

Serology

In the Dombes, on the 58-trapped animals, 50 could be tested for MAT serology.

The six cubs were excluded from serology analyses because of the persistence of maternal antibodies in mammals and thus the results of the analyses on these animals would have been non interpretable without the mother serology result. In one adult animal cardiac puncture was not successful. In addition, one blood collection tube had been broken during the transport to the laboratory. On these 50 animals tested, 38 presented a positive result at a 1/100 titer or more. The seroprevalence in this area was 76 % (95% IC 64.2-87.8 %). The highest titer observed was 1/6400 for two animals against the serogroup Australis. The most frequent reacting serogroup in this area was Australis and the second one was Icterohaemorrhagiae (Table 2).

In the Ognon Valley, all the 75 animals were tested for MAT serology and 48 individuals were positive at a 1/100 titer or more. The seroprevalence was 64 % (95% IC 53.1-74.9%). The highest titer observed was 1/1600 against the serogroup Australis for three animals. The most frequent serogroup in this area was also Australis followed by Icterohaemorrhagiae (Table 2).

The comparison between the two areas showed no significant difference considering the seroprevalence.

The two females, which had significant lesions in their kidney, were positive in MAT with higher titers against the serogroup Australis. In the group of 19 animals that had little alterations of the kidney, six were MAT negative and 13 were

positive with higher titers against the serogroup Australis in 10 cases and against the serogroup Icterohaemorrhagiae in three cases.

Presence of leptospires in kidney

In this part we will summarize the results of the culture (for the Dombes only) and of QPCR (for both areas).

In the Dombes area 38 coypus were submitted to kidney culture. Because of culture problems (especially contamination of culture tubes by opportunistic bacteria that could not be overcome), the isolation of the leptospire strains was not possible, but the culture tubes were tested by QPCR for pathogenic leptospires. Nine coypus presented a positive PCR on their culture tube (23.7%). It is noteworthy that on these nine animals, four were probably of the same litter (trapped at the same point, during the same week and age were very similar), so the prevalence could be overestimated.

Furthermore, in this area all the animals' kidneys were analyzed by QPCR for pathogenic leptospires. On the 58 animals, seven had a positive result (12.1%). On these seven animals only two had a positive result in culture and seven animals (including the four cubs) presented a positive result in culture and a negative one in QPCR.

In the Ognon Valley, the 75 animals were submitted to kidney QPCR and six animals presented a positive result (8.0%).

The comparison of the two areas concerning the QPCR results only showed no significant difference.

The two females that had significant lesions in their kidneys and the 19 animals with few kidney alterations were negative for QPCR. Table 3 presents the results

of kidney carriage for pathogenic leptospires compared to MAT serology. There was no significant association between MAT results and QPCR, culture or general carriage results.

Discussion

The purpose of our study was to document the status of the coypu, reservoir or accidental host, regarding the epidemiological cycle of leptospirosis by determining the health status of two populations of coypus and investigating whether animals had signs related to the infection.

We trapped 133 coypus in two wetlands areas of the East of France, the Dombes and the Ognon Valley. The two populations trapped were not statistically different regarding the sex ratio but a significant difference could be observed in the age class and weight distributions in the adult age class. In the Dombes area, the cubs and juveniles were more frequent than in the Ognon Valley. In the Ognon Valley the median weight of adults was higher than in the Dombes (respectively 6,050 g and 5,150 g). These differences could be easily explained by the differences of trapping periods. In the Ognon Valley trapping took place exclusively in fall whereas in the Dombes it was performed either in spring, summer and autumn. Moreover, even if coypus can be gravid throughout the year, the spring and the beginning of summer are the preferential moment for having litter (Doncaster and Micol 1989; Guichon et al. 2003). With respect to the median weight, the discrepancy could also be explained by the trapping period because animals in the Ognon Valley were all trapped after the more favorable period for foraging in this

area (summer), or it could be due to a difference of diet between the two areas. It is also interesting to note that on the 133 trapped animals all but five (96.2%) were in very good body conditions regarding the fat tissue deposition pattern and the five (3.8%) remaining individuals were thin and non cachectic. Furthermore, on the 88 animals on which kidney histology had been performed, only two (2.3%) had significant lesions with chronic interstitial nephritis. All remaining animals showed no lesions or lesions with any histological significance. These results indicated that both populations seemed in good clinical condition and didn't seem to be suffering from specific signs classically associated with leptospirosis, such as kidney disorders (Adler and de la Pena Moctezuma 2010). Some studies (e.g. Michel et al. 2001; Aviat et al. 2009) have already demonstrated that coypus could be infected and carry leptospires but to our knowledge, the consequences of infection for the individuals' and populations' health status have not been investigated so far.

Seroprevalence was high in both populations, 76 % (95% IC 64.2-87.8 %) for the Dombes and 64 % (95% IC 53.1-74.9%) for the Ognon Valley. When comparing with other recent studies in France (Michel et al. 2001; Aviat et al. 2009), we found higher levels of seroprevalence. The most frequent serogroups (*Icterohaemorrhagiae* and *Australis*) involved are some of those most frequently implicated in human or domestic animals diseases (CNR 2010; Hazart et al. 2010). These results are in agreement with those of Michel et al. (2001), who suggested that these serogroups could be adapted to the coypu. The high reacting titers were the sign of a recent infection and the high median titers in the two populations indicated that there was significant circulation of leptospires in these

populations. We chose these two sampling sites partly because of the differences in the incidence of human leptospirosis (CNR 2010). Our results seem to prove that the circulation of the bacteria is not significantly different in the two coypus' populations. One explanation in the differences of human cases could be that the Dombes is composed of private properties and that Ognon Valley is more open to public use with water sport bases for example.

The presence of leptospires in the kidney was tested by two means: culture and QPCR. Even if QPCR does not differentiate alive or dead bacteria, it is generally considered a useful tool for the determination of kidney carriage because of the difficulties encountered for leptospires culture (Bharti et al. 2003). As we didn't have the facilities in this area, culture was not performed on animals from the Ognon Valley. If we consider only the results of the QPCR, kidney carriage was similar in both areas (12% for the Dombes and 8% for the Ognon Valley) and superior to previously published results (3.3% Aviat et al. 2009). In the Dombes, when comparing with culture results, two animals presented concordant results, five have a positive QPCR and negative culture that could be explained by the technical difficulties and seven presented a negative QPCR and a positive culture. These last results could be due to the presence of some PCR inhibitors in tissues or to a very low number of leptospires in the kidney as a unique viable leptospire can give a positive culture whereas the detection limit of a QPCR reaction is around 10 copies. Even if all the procedures for DNA extraction and for QPCR are optimized to prevent this problem, unfortunately it cannot be overcome in all cases (Kik et al. 2006). It should also be noted that the two analyses were not performed on the same kidney in one animal.

There was no association between MAT and carriage results. If kidney carriage is present and MAT negative, it could be the sign of a very recent infection with antibodies under the limit of detection of the MAT or of a carriage due to a very low immune response as already described in this species (Aviat et al. 2009) or in other reservoir species (Tucunduva de Faria et al. 2008).

Overall, we trapped animals in two healthy populations with a normal structure: presence of cubs and juveniles depending on the trapping period. Adult females were frequently gravid confirming a sexual activity almost throughout the year. Animals were in good body condition and didn't present histological alterations of their kidneys. The high seroprevalence and the high titers observed indicate that there was an important circulation of leptospires in these populations. A significant level of kidney carriage was also detected. These results confirm our hypothesis that coypus seemed to be a real reservoir for pathogenic leptospires and that their populations should be taken into account as a maintenance host in wetlands areas. As it was noted, the major reacting serogroups were similar to those observed in human or animal diseases, so it seems important to underline the potential significant epidemiological role of coypus in the maintenance, circulation and transmission of leptospirosis to human and animal users of wetlands.

Acknowledgements

We thank Fondation Verôts, the Dombes trappers' federation, the Franche Comté regional hunter federation, the Doubs trappers' federation, the Jura trappers' federation and the Haute Saône trappers' federation for their help on field work. We thank the Doubs veterinary Laboratory for the necropsy room and all the facilities during the Ognon Valley trapping session. We thank Kevin Monteiro, Claire Renaud and Sandrine Lecheval for their help at the Leptospire

laboratory. We thank the French National Agency for Sanitary Security (ANSES) for financial support.

References

- Adler B, de la Pena Moctezuma A (2010) *Leptospira* and leptospirosis. Vet Microbiol 140: 287-296
- Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J, Mansotte F, Brasme L, de Champs C, Bolut P, Mondot P, Faliu J, Rochereau S, Kodjo A, Andre-Fontaine G (2009) *Leptospira* exposure in the human environment in France: a survey in feral rodents and in fresh water. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 32: 463-476
- AVMA (2007) AVMA Guidelines on Euthanasia. Document consulted at http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf accessed the 26/04/2012
- Baranton G, Postic D (2006) Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. Int J Infect Dis 10: 162-170
- Bertolino S, Angelici C, Monaco E, Monaco A, Capizzi D (2011) Interaction between coypu (*Myocastor coypus*) and bird nests in three Mediterranean wetlands of Central Italy. Hystrix It J Mamm 22: 333-339
- Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis 3: 757-771
- Carter J, Leonard BP (2002) A review of the literature on the worldwide distribution, spread of, and efforts to eradicate the coypu (*Myocastor coypus*). Wildlife Soc B 30: 162-175
- CNR (2010) Rapport d'activité. Années 2006 à 2010. Document consulted at <http://www.pasteur.fr/ip/resource/filecenter/document/01s-00004h-07l/ra-cnr-lepto-2010.pdf> accessed the 20/04/2012
- Croda J, Pereira Figueira C, Wunder Jr EA, Santos CS, Reis MG, Ko AI, Picardeau M (2008) Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of Leptospirosis. Infect Immun 76: 5826-5833
- Doncaster CP, Micol T (1989) Annual cycle of a coypu (*Myocastor coypus*) population: male and female strategies. J Zool Lond 217: 227-240
- Doncaster CP, Micol T (1990) Response by coypus to catastrophic events of cold and flooding. Holarctic Ecol 13: 98-104
- Ellinghausen HC, McCullough WG (1965) Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. Am J Vet Res 26: 45-51
- Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (1999) *Leptospira* and Leptospirosis 2nd Edition. MediSci, Melbourne, Australia
- Guichon ML, Doncaster CP, Cassini MH (2003) Population structure of coypus (*Myocastor coypus*) in their region of origin and comparison with introduced populations. J Zool Lond 261: 265-272

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure captions

Fig 1: Localization of the two sampling area

Fig 2: Histological aspect of two coypus kidneys at the same magnification (the reference bar represent 200 μm)

a Chronic nephritis with tubule-cystic dilatations (2). Note the huge development of collagen fiber (1). The glomerules with a normal architecture are scarce (3) and most are atrophic (4) or replaced by proteins (5). In this animal the lesion was generalized and the functionality of the kidney should have been greatly impaired.

b Slight subacute interstitial nephritis. The glomerules (6) and the tubes (7) present a normal architecture. The only change is the presence of small clusters of mononuclear cells (about 100 cells/cluster). The regularity and the little extent of the lesions lead to consider these as non significant.

Tables

Species	Serogroup	Serovar	Strain
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	Ballum	Castellonis	Castellon 3
	Sejroe	Sejroe	M84
	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
<i>Leptospira inadai</i>	Panama	Mangus	TRLV/CAREC
<i>Leptospira interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	19
	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Wijnberg
	Australis	Munchen	Munchen C90
	Australis	Australis	Ballico
	Australis	Bratislava	Jez-Bratislava
	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami AA
	Bataviae	Bataviae	Van Tiernen
	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
	Hebdomadis	Kremastos	Kremastos
	Pomona	Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
	Sejroe	Saxkoebing	Mus 24
	Sejroe	Hardjo	Hardjoprattino
	Sejroe	Wolfii	3705
	Cynopteri	Cynopteri	3522C
<i>Leptospira noguchii</i>	Panama	Panama	CZ214K
<i>Leptospira kirchneri</i>	Autumnalis	Bim	1051
	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
	Grippotyphosa	Vanderhoedoni	Kipod 179

Table 1: List of the pathogenic *Leptospira* strains maintained at the laboratory and used in the study for MAT serology

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15	Sites	Number of animals tested	Number of animals with positive results				
			Total Seroprevalence (95% IC)	AUS ^a	IH ^b	AUS+IH ^c	Other ^d
	Dombes	50	38 76% (64.2-87.8)	26	7	4	1
	Ognon Valley	75	48 64% (53.1-74.9)	36	10	2	0

^a Serogroup Australis, ^b Serogroup Icterohaemorrhagiae, ^c Both serogroups, ^d Other serogroups are major reacting serogroups

Table 2: Number of coypus (*Myocastor coypus*) trapped in each area presenting a positive result in Microscopic Agglutination Test serology regarding the major reactive serogroup

Sites			QPCR on kidney results		Kidney carriage (QPCR + culture results)	
			N° Positives	N° Negatives	N° Positives	N° Negatives
The Dombes	MAT serology results	N° Positives	4	34	7	31
		N° Negatives	3	9	3	9
		N° NP	0	8	4	4
Ognon Valley	MAT serology results	N° Positives	3	45	NA	NA
		N° Negatives	3	24	NA	NA

Table 3: Comparison of the Microscopic Agglutination Test results and results for kidney carriage (determined by real –time PCR and culture for one area) in coypus (*Myocastor coypus*) trapped in the two areas studied

NP is for non performed serology because of the young age of the coypu or of a missing blood tube. NA is for non available result. We didn't perform culture on animals trapped in the Ognon Valley because we didn't have a laboratory adapted to leptospires culture near this site

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

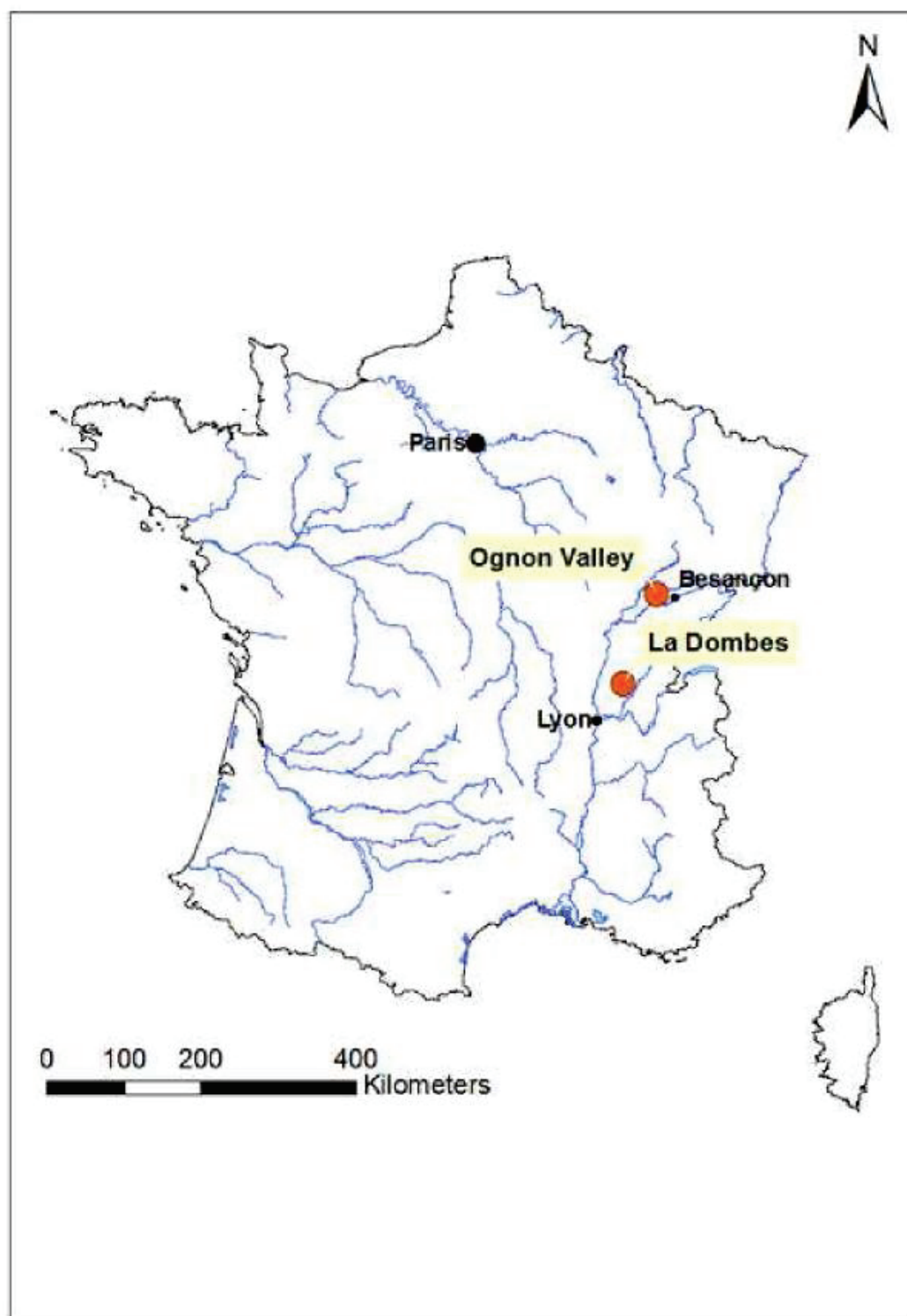
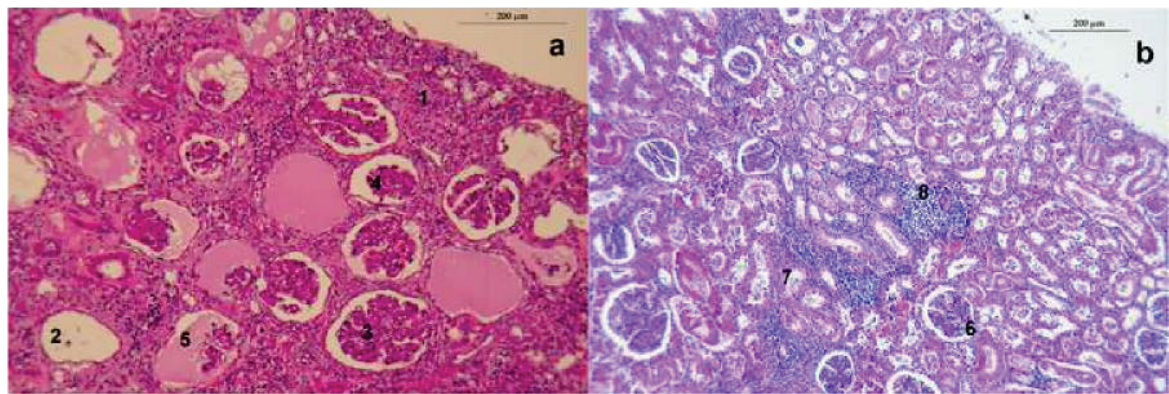


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)



III. MISE EN PLACE D'UN OUTIL DE SUIVI DE LA CONTAMINATION ENVIRONNEMENTALE

La détection des leptospires pathogènes est assez compliquée du fait de la grande diversité génétique et antigénique de ce groupe de bactérie. Cette remarque est d'autant plus vraie que l'on s'intéresse, non plus à des prélèvements biologiques provenant de patients, mais à des échantillons environnementaux. Or dans les pays en zone tempérée, et notamment d'Europe de l'Ouest, le schéma épidémiologique de la leptospirose a profondément changé. On est passé d'une maladie majoritairement professionnelle à une maladie liée aux loisirs d'eau douce et aux voyages.

Il nous a paru opportun, dans une logique de détermination des facteurs de risques de contamination pour l'Homme et les animaux domestiques liés aux zones humides continentales de l'Est de la France, de développer une méthode fiable et sensible pour la détection des leptospires pathogènes dans l'environnement, méthode qui pourrait être intégrée à des programmes de surveillance de la qualité de l'eau.

Pour ce faire nous avons adapté une méthode de PCR quantitative qui avait été mise au point à l'origine sur des échantillons biologiques.

Notre étude retrace les différentes étapes de mise au point depuis l'extraction d'ADN à partir des échantillons d'eau jusqu'à la lecture et à la quantification de leptospires pathogènes dans des échantillons d'eau prélevés sur une des deux zones d'étude.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le *Canadian Journal of Microbiology* en juillet 2012 (volume 58, issue 7, pages 828-835).

Adaptation of a real-time PCR method for the detection and quantification of pathogenic leptospires in environmental water

Julie Vein, Aurélie Perrin, Philippe J. Berny, Etienne Benoit, Agnès Leblond, and Angeli Kodjo

Abstract: Leptospirosis is a major zoonotic disease that affects humans and animals in all continents, in both rural and urban areas. In Europe, metropolitan France is the most affected country, with about 300 human cases declared per year. In France, although leptospirosis is now mostly considered as a recreational disease related to freshwater areas, isolation of pathogenic leptospires from environmental water samples still remains difficult. It thus seemed important to set up an efficient method to detect and quantify these bacteria in this environment. We determined a DNA extraction method suitable for freshwater samples and adapted a real-time quantitative PCR based on the detection of the *LipL32* gene using the SYBR green chemistry. The method developed is specific for pathogenic *Leptospira*. It permits the detection of all the pathogenic strains tested and none of the saprophytic strains. Quantification is possible between 10^1 and 10^7 bacteria/mL, and therefore, the method represents a tool that could be integrated into future public health surveillance programs for recreational freshwater areas.

Key words: pathogenic leptospires, real-time PCR, freshwater samples, *LipL32* gene.

Résumé : La leptospirose est une zoonose qui affecte les humains et les animaux des quatre continents, tant en région rurale qu'en région urbaine. En Europe, la France métropolitaine est la région la plus affectée avec environ 300 cas humains déclarés par année. En France, même si la leptospirose est maintenant surtout considérée comme une maladie associée aux loisirs nautiques en eau douce, l'isolement de leptospires pathogènes d'échantillons d'eau de l'environnement demeure encore difficile. Il a donc semblé important de mettre au point une méthode efficace de détection et de quantifier cette bactérie dans l'environnement. Nous avons développé une méthode d'extraction d'ADN applicable aux échantillons d'eau douce et nous avons adapté un protocole de PCR en temps réel basé sur la détection du gène *LipL32* en utilisant la chimie du SYBR green. La méthode développée est spécifique à *Leptospira* pathogène. Elle permet de détecter toutes les souches pathogènes testées et aucune des souches saprophytes. La quantification est possible entre 10^1 à 10^7 bactéries/mL et constitue donc un outil qui pourrait être intégré à des programmes de surveillance de santé publique dans les zones récréatives d'eau douce.

Mots-clés : leptospires pathogènes, PCR en temps réel, échantillons d'eau douce, gène *LipL32*.

[Traduit par la Rédaction]

Introduction

Leptospirosis is the most prevalent bacterial zoonosis in the world (Levett 2001; Pappas et al. 2008). The infection is caused by pathogenic leptospires. The *Leptospira* genus is composed of 20 genomic species, comprising over 250 serovars grouped into 25 serogroups. The species are divided into 3 groups according to their 16S rDNA phylogeny: pathogenic, nonpathogenic, and intermediate (Perolat et al. 1998; Ko et al. 2009).

The World Health Organization considers that at least 500 000 people per year develop a serious form of the disease, most of them in tropical and subtropical zones but also in temperate areas (WHO 1999). Metropolitan France is one of the most affected countries in the European Union, with about 250–300 declared cases per year (Baranton and Postic 2006; Picardeau et al. 2008). In France and in the European Union, the epidemiological pattern switches from an occupational disease to a recreational disease, in relation to water

Received 7 November 2011. Revision received 22 March 2012. Accepted 12 April 2012. Published at www.nrcresearchpress.com/cjmm on XX June 2012.

J. Vein, USC 1233 INRA – VetAgro Sup, VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat 69280, Marcy L'Etoile, France; INRA UR 346 Épidémiologie Animale, Département Hippique, Université de Lyon, VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat 69280, Marcy L'Etoile, France.

A. Perrin, P.J. Berny, and E. Benoit, USC 1233 INRA – VetAgro Sup, VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat 69280, Marcy L'Etoile, France.

A. Leblond, INRA UR 346 Épidémiologie Animale, Département Hippique, Université de Lyon, VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat 69280, Marcy L'Etoile, France.

A. Kodjo, USC 1233 INRA – VetAgro Sup, VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat 69280, Marcy L'Etoile, France; Laboratoire des Leptospires, VetAgro Sup – Campus Vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat 69280, Marcy L'Etoile, France.

Corresponding author: Julie Vein (e-mail: julie.vein@vetagro-sup.fr).

Table 1. List of the *Leptospira* strains maintained at the Leptospirosis Laboratory and used in the study.

Species	Serogroup	Serovar	Strain
Pathogenic strains			
<i>Leptospira borgpeterseni</i>	Ballum	Castellonis	Castellon 3
	Sejroe	Sejroe	M84
	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin
<i>Leptospira inadai</i>	Panama	Mangus	TRLV/CAREC
<i>Leptospira interrogans</i>	Icterhaemorrhagiae	Icterhaemorrhagiae	19
	Icterhaemorrhagiae	Copenhageni	Wijnberg
	Australis	Munchen	Munchen C90
	Australis	Australis	Ballioo
	Australis	Bratislava	Jez-Bratislava
	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami AA
	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
	Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
	Hebdomadis	Kremastos	Kremastos
	Pomona	Pomona	Pomona
	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
	Sejroe	Saxboebing	Mus 24
	Sejroe	Hardjo	Hardjo Pratjino
	Sejroe	Wolffi	3705
	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
<i>Leptospira noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214K
<i>Leptospira kirchneri</i>	Autumnalis	Bim	1051
	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
	Grippotyphosa	Vanderhoedoni	Kipod 179
Saprophytic strain			
<i>Leptospira biflexa</i>	Patoc	Patoc	Patoc 1

sports, fishing, or hunting in freshwater areas (Nardone et al. 2004). It should be noted that all the cases diagnosed in Europe were not acquired locally but a significant proportion of these leptospiral infections were acquired through travel to tropical or subtropical areas (Lau et al. 2010).

Leptospira are maintained in the environment by animal reservoirs, which are chronically infected mammals, such as rodents, that shed bacteria in their urine (Adler and de la Peña Moctezuma 2010). *Leptospira* can survive in moist soil and in water for weeks to months (Trueba et al. 2004). Humans and animals can be infected by direct or indirect contact of mucous membranes or wounded skin with urine of an infected animal. In humans, symptoms vary from an influenza-like syndrome to severe complications like Weil's syndrome or severe pulmonary hemorrhage (Adler and de la Peña Moctezuma 2010; Bharti et al. 2003).

Our purpose was to set up a method to detect pathogenic leptospires in water samples. The major problem in detecting leptospires in environmental samples is caused by the difficulty of isolating pathogenic *Leptospira* from such samples. Indeed, cultivation of pathogenic *Leptospira* requires weeks or months of incubation in specific medium with the risk of contamination by saprophytic *Leptospira* or other bacteria, especially when the original sample is freshwater (Ganoza et al. 2006). To overcome these problems, we chose to develop a real-time quantitative PCR (Q-PCR) method, adapted from that developed by Levett et al. (2005) for the detection of pathogenic *Leptospira* in mammals' serum and urine samples. Our goals were (i) to find an optimal method for DNA

extraction from environmental water samples, (ii) to adapt this Q-PCR method to these types of samples, and (iii) to demonstrate the method's usefulness in detecting pathogenic leptospires in freshwater.

Materials and methods

Samples collection

For this study, all water samples were collected from the Dombes area, which is a complex of ponds located 50 km north of Lyon (France) (Fig. 1). These ponds are used for different purposes, including fish farming and hunting, and include natural reserves and recreation areas. This work is a part of larger study about the spatial epidemiology of leptospirosis in the Dombes in relation to the aquatic rodent populations.

Forty-seven samples of water were collected in sterile 50 mL polypropylene tubes from different ponds. For each sample the Global Positioning System point was noted (Fig. 1). They were collected during the spring of 2008 and the spring of 2010. Each sample was identified by a unique number and stored at -20 °C until DNA extraction was performed.

Strain collection

The strains used are summarized in Table 1. They were maintained at the Leptospirosis Laboratory of VetAgro Sup in EMJH (Ellinghausen and McCullough modified by Johnson and Harris) liquid medium (Ellinghausen and McCullough 1965; Johnson and Harris 1967).

Published by NRC Research Press

Fig. 1. The sampling area: global localization (small map in bottom right-hand corner) and global positioning system localization for each sample (large map). The large map also represents the positive and the negative samples. Q-PCR, real-time quantitative PCR.

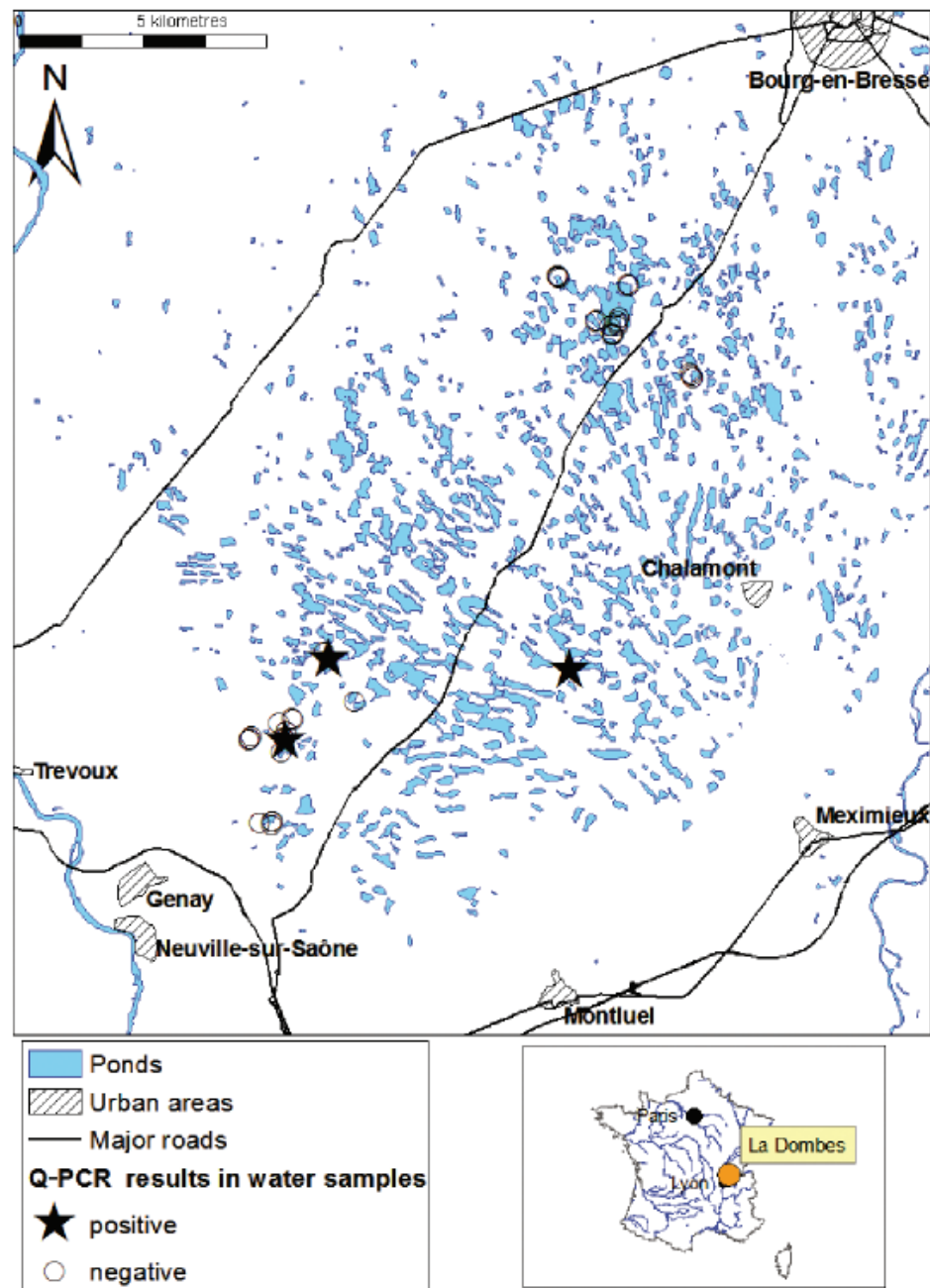
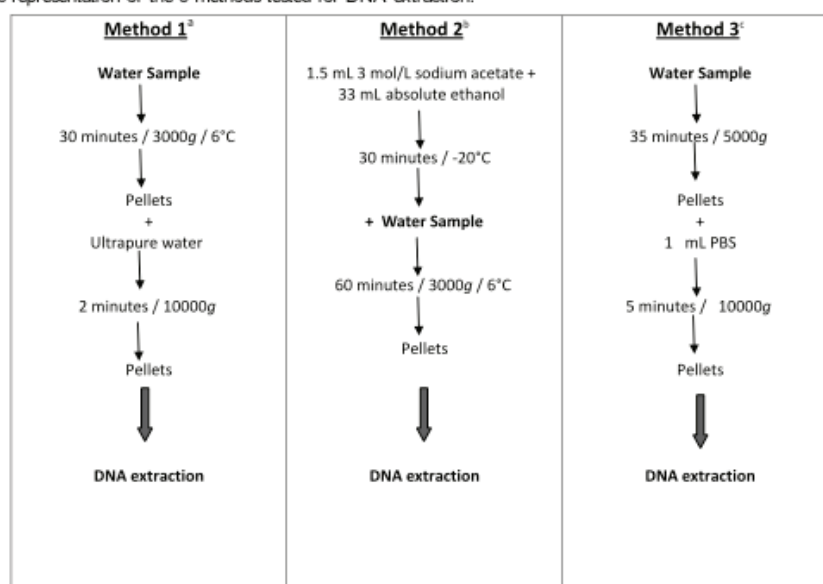


Fig. 2. Schematic representation of the 3 methods tested for DNA extraction.

^a Method adapted from Ganoza et al. (2006)^b Method adapted from Ficetola et al. (2008)^c Method adapted from Queralto et al. (2005)

DNA extraction from leptospires cultures

After centrifugation at 3000g for 15 min, the pellets of culture were subjected to DNA extraction by the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions.

DNA quantification

We used the Quant-iT PicoGreen dsDNA quantitation kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) following the method developed by Blotta et al. (2005). Each calibration point and each sample was prepared in triplicate.

DNA extraction from water samples

To prepare water samples before DNA extraction, we tested 3 methods (Fig. 2) from the literature. For these tests, we used mineral water (Evian) and samples from a creek near the laboratory. In each case, the sample was divided into 6 aliquots of 13.5 mL, which were spiked with 1.5 mL of the same fresh culture of leptospires in log phase (*Leptospira interrogans* serovar Australis). The samples were well mixed and frozen at -20 °C for 1 week, and then allowed to thaw gradually at +4 °C before DNA extraction. Each preparation method was tested on mineral and creek water in duplicate.

The first method was adapted from that of Ganoza et al. (2006). The sample was centrifuged for 30 min at 3000g at 6 °C. The pellets were then resuspended in ultrapure water (milliQ water, Millipore, Molsheim, France) and further centrifuged for 2 min at 10 000g (this step was added to the original method to have pellets easier to manipulate for

DNA extraction). The supernatant was eliminated, and the pellets obtained were used for DNA extraction.

The second method was adapted from that of Ficetola et al. (2008). Briefly, a mixed solution containing 1.5 mL of 3 mol/L sodium acetate and 33 mL of absolute ethanol was prepared and stored for 30 min at -20 °C before the 15 mL water sample was added. The final solution was centrifuged for 60 min at 3000g at 6 °C, the supernatant was eliminated, and the pellets were used for DNA extraction.

For the third method, we concentrated the 15 mL water samples by centrifugation for 35 min at 5000g. Then the pellets were resuspended in 1 mL of PBS and the solution was centrifuged for 5 min at 10 000g (Queralto et al. 2005).

DNA extraction was performed on the pellets obtained using each of the above methods using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The manufacturer's instructions were followed, except for the incubation step, which was performed with 100 µL of elution buffer and 15 min of incubation at room temperature before DNA elution. The quality of DNA extraction was controlled by quantification of DNA.

Q-PCR method

The reaction used the primers described by Levett et al. (2005) (LipL32-270F: 5'-CGCTGAAATGGGAGTTCGATGATT-3' and LipL32-692R: 5'-CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT-3'), which target the coding region of the LipL32 (also named in some studies hap1) gene and amplify a 423 bp product. The Q-PCR experiments were performed on the Mx3000P and with the Absolute Blue Q-PCR

SYBR Green Low ROX Mix (ABgene, ThermoFisher Scientific, Courtabouff, France). The volume of the reaction was 20 μ L and contained 50 nmol/L forward primer and 150 nmol/L reverse primer, 10 μ L of 2 $\times$ Mix and 1 μ L of DNA. The amplification protocol consisted of 1 cycle of 15 min at 95 °C for the enzyme activation followed by 40 cycles of amplification (15 s at 95 °C, 30 s at 67 °C, 40 s at 72 °C). Then the amplification reaction was stopped for 30 s at 95 °C and cooled for 30 s at 55 °C. Finally, a dissociation curve from 55 to 95 °C was established with the default parameters of the Mx3000P.

The method was tested for each strain (pathogenic or non-pathogenic), and the Q-PCR products obtained were sequenced with the PCR primers by Biofidal (Vaulx en Velin, France). Each Q-PCR experiment was performed in triplicate. The sequences were analyzed using 4peaks version 1.7.1 (Mekentosj, USA) and ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> (accessed 15 October 2010)) software.

The standard curves were created first with genomic DNA of *L. interrogans* serovar Australis then were verified with genomic DNA of *Leptospira kirchneri* serovar Grippotyphosa, *Leptospira borgpetersenii* serovar Sejroe, *Leptospira noguchii* serovar Panama, and *Leptospira inadai* serovar Mangus to test robustness for different species and serovars of pathogenic leptospires. Each standard curve was performed 3 times in 3 different days and each point of the curve was performed in triplicate.

Q-PCR on water samples

We tested the method on the DNA samples extracted from the spiked water (either mineral or creek water) and used nonspiked water samples from the same source as negative controls. To take into consideration the possible presence of PCR inhibitors in DNA extracted from natural water samples, we used serial dilution. Briefly, we tested PCR with DNA extracts diluted from 10^0 to 10^{-3} . If a lower cycle threshold (Ct) was obtained with a bigger dilution, it indicated the presence of inhibitors. The lowest Ct was considered as the result of the sample, and the dilution (generally 10^{-1}) was used to calculate the quantity of leptospires. Each reaction was tested in triplicate.

The samples from the Dombes were analyzed with the same method: dilutions from 10^0 to 10^{-3} , each reaction in triplicate.

Results

DNA extraction from water samples

The mean quantity of DNA recovered by the 3 methods (4 trials for each method) was 41.7 ng/ μ L with the method adapted from Ganoza et al. (2006), 21.0 ng/ μ L with that from Ficetola et al. (2008), and 39.1 ng/ μ L with that from Queralt et al. (2005).

The DNA recovery results with the first and third methods were similar and better than with the second method. But since the first method was easier to perform in our laboratory conditions, we selected that method (i.e., from Ganoza et al. 2006) for all other DNA extractions.

Q-PCR method setup

Q-PCR enabled the detection of all pathogenic strains tested. Conversely, with *Leptospira biflexa* serovar Patoc (a

saprophytic strain) there was no amplification, which confirmed that our modification of the method preserves the specificity of the original method for pathogenic leptospires.

Each product from the pathogenic strains was sequenced, and the results were compared with LipL32 published sequences in GenBank (accession Nos. AY609325, AY609327, AF181554, AF181556, and AF121192). Each product obtained from our strains was unique, and the sequences matched the published sequences (data not shown). A dissociation curve was performed at the end of each experiment. The amplified products had a melting temperature of between 84.9 and 85.6 °C.

The calibration curve was created from genomic DNA of a strain of pathogenic leptospire. The amount of DNA was quantified, and the equivalence with the number of genomes was determined with the genome size of 4.659 Mb (Nascimento et al. 2004; Ren et al. 2003).

The standard curve (Figs. 3A and 3B) obtained with *L. interrogans* serovar Australis was linear from 10^1 to 10^7 genome-equivalents, the quantification limit was 10 genome-equivalents, and the detection limit was 5 genome-equivalents. The efficacy of the reaction was 98.7%, and the equation of the regression line (Fig. 3B) is $y = -3.404 \log X + 38.60$, where y is the Ct, and X is the initial quantity of leptospires. The standard curve was performed on 3 different experiments, and the variation coefficient for the Ct at the different concentrations ranged from 0.93% to 2.01%. The same results were obtained with the DNA of the other serovars tested (data not shown).

Q-PCR on water samples

The negative controls (nonspiked mineral and brook water) gave no amplification. All the spiked samples gave amplification, and quantification was between 10^5 and 10^7 genome-equivalents/mL. The detection and quantification limit for spiked samples was 10 genome-equivalents.

Forty-seven environmental samples from the Dombes were tested. Amplification was present in 3 of these samples. Quantification was 10^4 genome-equivalents/mL in 2 samples and 10^3 genome-equivalents/mL in the third one. These 3 specimens had been collected in 3 different ponds and at different times during the spring of 2008 (Fig. 1).

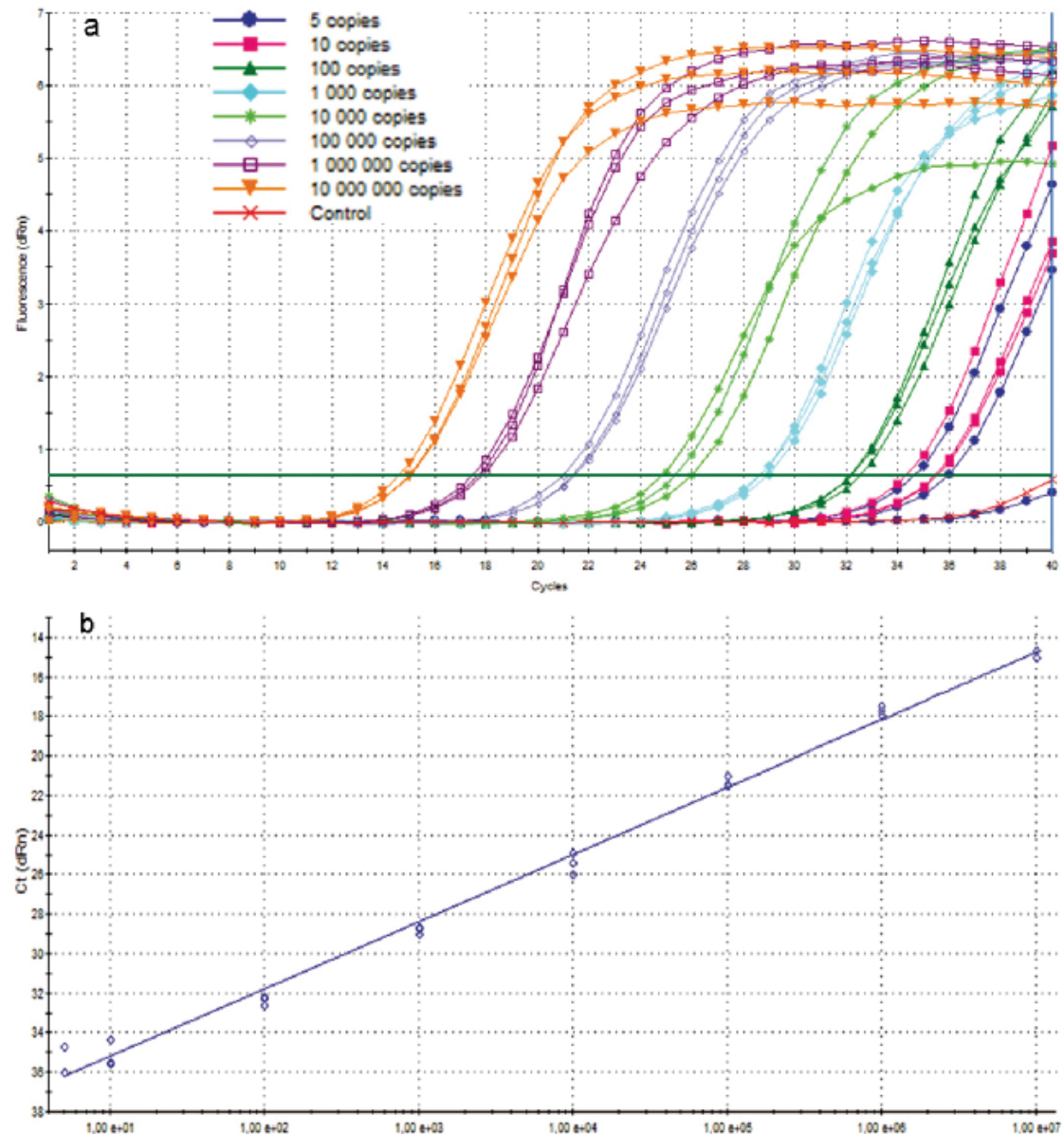
When amplification occurs, the dissociation curve present a profile similar to the one for the pure *Leptospira* culture, with a melting temperature between 84.9 and 85.6 °C. Each amplified product obtained either from the spiked samples or the environmental samples was sequenced with the same method as described in Section Q-PCR method in Materials and methods. Each product was unique and each sequence matched with the published sequences in GenBank (accession Nos. AY609325, AY609327, AF181554, AF181556, and AF121192).

Discussion

We have adapted a method that enables the detection and the quantification of pathogenic leptospires in water samples. This method enabled us to detect leptospires in 3 environmental water samples from a temperate area.

The method we have adapted is based on the detection of a fragment of the LipL32 gene. This gene is highly conserved

Fig. 3. Standard curve obtained with *Leptospira interrogans* serovar Australis. (a) Fluorescence data at each cycle of the reaction for different initial quantities of leptospires. (b) Regression line between the cycle threshold (Ct), considered as the point of positivity, and the initial quantity of leptospires. The equation of the line is $y = -3.404 \log X + 38.60$, where y is the Ct and X the initial quantity of leptospires. The efficacy of the reaction was 98.7%.



within the pathogenic group of leptospires and is absent in the saprophytic strains and in other bacterial species (Haake et al. 2000). However, it seems that this gene is not required for the pathogenicity of leptospires (Murray et al. 2009). Several published studies are based on the detection of this gene, using either PCR or Q-PCR (Branger et al. 2005; Levett et al.

2005; Stoddard et al. 2009), but none of them describe a technique to detect and quantify pathogenic leptospires in environmental water samples.

Moreover, a study of the epidemiology of human leptospirosis in Metropolitan France between 1995 and 2005 showed that 42% of the investigated cases were related to exposure to

freshwater during leisure activities (Abgueuen et al. 2008). Thus, it appears useful to provide a tool to estimate the contamination of water samples with pathogenic leptospires. The PCR method detects the DNA of pathogenic leptospires, but it is not possible to differentiate between live bacteria and dead cells. However, the lifetime of free-DNA (from dead cells) in water is less than 24 h because it is a source of phosphorus for microorganisms (Paul et al. 1989). Therefore, the quantity of free-DNA remaining in water samples is likely to be insignificant. Thus, despite the limitation of possible quantification of free-DNA instead of potentially infecting bacteria, PCR has fewer drawbacks than classical microbiological techniques. The isolation of leptospires from biological samples is difficult and time consuming (Levett 2001). Isolating pathogenic leptospires from water samples is not impossible, but it is somewhat difficult because of the presence of saprophytic leptospires and of other fast-growing bacteria that are less fastidious than pathogenic leptospires.

The specimen sampling method needs to be improved if the method is to be used as a tool for routine control of water quality, because the volumes collected in this study cannot be considered as representative of a whole pond. As human leptospirosis cases are more prevalent in summer and in autumn, this study suggests that water sampling be done every month to be an effective protocol for water quality surveillance. However, the goal of this study was to adapt the method and to prove that it is possible to quantify pathogenic leptospires in environmental water samples, not to suggest a definite protocol for water surveillance. The method described in this paper is specific and sensitive and, therefore, represents a convenient tool for this purpose.

Conclusion

We developed a convenient technique that can be used to detect and quantify pathogenic leptospires in freshwater samples. This technique could be part of a refined protocol for a cost-effective surveillance of freshwater quality, since leptospirosis is a problem of public health associated with freshwater activities.

Acknowledgements

We thank Mathieu Guerin, research engineer from ISARA (an Engineering School in Agriculture, Alimentation, Rural Development and Environment in Lyon), Fondation Vérois, and the trappers of the Dombes federation, for their help in field work. We also thank the French National Agency for Sanitary Security (ANSES) for financial support.

References

- Abgueuen, P., Delbos, V., Blainvillain, J., Chenebault, J.M., Cottin, J., Fanello, S., and Richard, E. 2008. Clinical aspects and prognostic factors of leptospirosis in adults. Retrospective study in France. *J. Infect.* 57(3): 171–178. doi:10.1016/j.jinf.2008.06.010. PMID:18656263.
- Adler, B., and de la Peña Motezuma, A. 2010. Leptospira and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140(3–4): 287–296. doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.012. PMID:19345023.
- Baranton, G., and Postic, D. 2006. Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. *Int. J. Infect. Dis.* 10(2): 162–170. doi:10.1016/j.ijid.2005.02.010. PMID:16298537.
- Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., et al. Peru-United States Leptospirosis Consortium. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* 3(12): 757–771. doi:10.1016/S1473-3099(03)00830-2. PMID:14652202.
- Blotta, I., Prestinaci, F., Mirante, S., and Cantafora, A. 2005. Quantitative assay of total ds DNA with PicoGreen reagent and real-time fluorescent detection. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 41(1): 119–123. PMID:16037660.
- Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., Chevallier, B., and André-Fontaine, G. 2005. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene *hsp1* encoding the hemolysin-associated protein-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 243(2): 437–445. doi:10.1016/j.femsle.2005.01.007. PMID:15686847.
- Ellinghausen, H.C., Jr., and McCullough, W.G. 1965. Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am. J. Vet. Res.* 26(110): 45–51. PMID:14266934.
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., and Taberlet, P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4(4): 423–425. doi:10.1098/rsbl.2008.0118. PMID:18400683.
- Ganoza, C.A., Matthias, M.A., Collins-Richards, D., Brouwer, K.C., Cunningham, C.B., Segura, E.R., et al. 2006. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med.* 3(8): e308. doi:10.1371/journal.pmed.0030308. PMID:16933963.
- Haake, D.A., Chao, G., Zuercher, R.L., Barnett, J.K., Barnett, D., Mazel, M., et al. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect. Immun.* 68(4): 2276–2285. doi:10.1128/IAI.68.4.2276-2285.2000. PMID:10722630.
- Johnson, R.C., and Harris, V.G. 1967. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. 1. Growth at low temperatures. *J. Bacteriol.* 94(1): 27–31. PMID:6027998.
- Ko, A.I., Goarant, C., and Picardeau, M. 2009. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(10): 736–747. doi:10.1038/nrmicro2208. PMID:19756012.
- Lau, C., Smythe, L., and Weinstein, P. 2010. Leptospirosis: an emerging disease in travellers. *Travel Med. Infect. Dis.* 8(1): 33–39. doi:10.1016/j.tmaid.2009.12.002. PMID:20188303.
- Levett, P.N. 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(2): 296–326. doi:10.1128/CMR.14.2.296-326.2001. PMID:11292640.
- Levett, P.N., Morey, R.E., Galloway, R.L., Turner, D.E., Steigerwalt, A.G., and Mayer, L.W. 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J. Med. Microbiol.* 54(1): 45–49. doi:10.1099/jmm.0.45860-0. PMID:15591254.
- Murray, G.L., Srikram, A., Hoke, D.E., Wunder, E.A., Jr., Henry, R., Lo, M., et al. 2009. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 77(3): 952–958. doi:10.1128/IAI.01370-08. PMID:19103763.
- Nardone, A., Capek, I., Baranton, G., Campese, C., Postic, D., Vaillant, V., et al. 2004. Risk factors for leptospirosis in Metropolitan France: results of a national case-control study 1999–2000. *Clin. Infect. Dis.* 39(5): 751–753. doi:10.1086/423272. PMID:15356794.
- Nascimento, A.L.T.O., Ko, A.I., Martins, E.A.L., Monteiro-Vitorello, C.B., Ho, P.L., Haake, D.A., et al. 2004. Comparative genomics of

- two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J. Bacteriol.* 186(7): 2164–2172. doi:10.1128/JB.186.7.2164-2172.2004. PMID:15028702.
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Siozopoulou, V., Christou, L., and Akritidis, N. 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int. J. Infect. Dis.* 12(4): 351–357. doi:10.1016/j.ijid.2007.09.011. PMID:18055245.
- Paul, J.H., Jeffrey, W.H., David, A.W., DeFlaun, M.F., and Cazares, L.H. 1989. Turnover of extracellular DNA in eutrophic and oligotrophic freshwater environments of southwest Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(7): 1823–1828. PMID:16347976.
- Perolat, P., Chappel, R.J., Adler, B., Baranton, G., Bulach, D.M., Bilinghurst, M.L., et al. 1998. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48(3): 851–858. doi:10.1099/00207713-48-3-851. PMID:9734039.
- Picardeau, M., Cornet, M., Morel, V., Sertour, N., Chaumet, D., Brachet, E., and Bourhy, P. 2008. Impact of the revised diagnostic policy on the diagnosis and surveillance of leptospirosis in France. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*, 37: 329–331. [In French.]
- Queralt, N., Bartolome, R., and Araujo, R. 2005. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different levels of faecal pollution in the north-east of Spain. *J. Appl. Microbiol.* 98(4): 889–895. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02523.x. PMID:15752335.
- Ren, S.-X., Fu, G., Jiang, X.-G., Zeng, R., Miao, Y.-G., Xu, H., et al. 2003. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 422 (6934): 888–893. doi:10.1038/nature01597. PMID:12712204.
- Stoddard, R.A., Gee, J.E., Wilkins, P.P., McCaustland, K., and Hoffmaster, A.R. 2009. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *LipL32* gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64(3): 247–255. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014. PMID:19395218.
- Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., Cullen, P., and Haake, D. 2004. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int. Microbiol.* 7(4): 35–40. PMID:15179605.
- WHO. 1999. Leptospirosis worldwide. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 74(29): 237–242. PMID:10437435.

3^{ème} PARTIE :
DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. DISCUSSION

Dans notre travail nous nous sommes attachés à déterminer quelle est la place du Ragondin dans le cycle de transmission de la leptospirose ainsi qu'à développer un outil permettant de détecter la contamination d'eaux douces de surface par le biais d'une technique de QPCR. Cette partie de discussion générale s'organisera en trois volets distincts, tout d'abord le premier concernera la méthodologie employée puis le second s'intéressera plus spécifiquement aux résultats obtenus et enfin un dernier évoquera les perspectives résultant de notre travail.

A. Discussion méthodologique

Le premier point a été de choisir les zones de piégeage et dans le cas de notre étude, plusieurs critères ont compté. Le premier était une question de faisabilité, à savoir un accès aux lieux de piégeage et donc la nécessaire coopération des associations départementales des piégeurs concernées mais aussi un accès à des facilités permettant de réaliser les autopsies dans des conditions de sécurité sanitaires acceptables pour les intervenants. Etant donné notre volonté d'essayer de déterminer l'éventuelle influence de l'environnement sur la prévalence dans les populations de Ragondin, il fallait également choisir deux zones aussi différentes que possible d'un point de vue environnemental et si possible des infections humaines déclarées. Compte tenu de ces impératifs, la Dombes et la Basse Vallée de l'Ognon ont été sélectionnées. En effet, nous avons une zone d'étangs

privatifs principalement dédiés à la pisciculture et la chasse (Dombes) et la vallée d'une rivière avec un débit conséquent, qui est largement utilisée pour les sports aquatiques, la chasse et la pêche de loisir (Ognon). Concernant les autopsies, les animaux de la Dombes pouvaient être apportés rapidement sur le Campus Vétérinaire de Lyon, tandis que, pour ceux capturés sur l'Ognon, une collaboration a été nouée avec le Laboratoire Vétérinaire Départemental du Doubs pour l'utilisation de leur salle d'autopsie. Des partenariats ont pu être développés avec les différentes associations départementales des piégeurs concernées (Ain, Doubs, Haute Saône et Jura) afin de pouvoir travailler avec des piégeurs agréés.

Le plan primitif de l'étude était de réaliser un quadrillage en mailles hexagonales de chaque zone (le long de la rivière sur l'Ognon et le long d'un transect traversant la Dombes du sud-ouest au nord-est) et de prélever le même nombre d'animaux dans chaque maille afin d'obtenir la meilleure représentativité possible.

Toutefois ce plan s'est heurté à un très gros problème d'autorisation d'accès, notamment dans la Dombes. Cette zone est composée de domaines privés avec de nombreux propriétaires différents et malgré l'implication des piégeurs du département, les autorisations pour entrer sur les étangs n'ont pas forcément été obtenues.

La répartition des piégeages souffre sur les deux zones du déficit d'homogénéité des populations. Ce manque d'homogénéité peut provenir soit d'un environnement moins propice d'un endroit à un autre avec des berges plus ou moins accueillantes pour les Ragondins mais surtout, il est généralement lié à une plus ou moins grande pression de contrôle des populations les années précédentes. En effet après enquête auprès des piégeurs, les lieux avec une forte efficacité de piégeage sont souvent des endroits où des opérations massives de contrôle des populations n'ont pas été réalisées au moins pendant les 2 ou 3 années précédentes.

D'autres écueils ont été rencontrés durant ces sessions de piégeage. Notre protocole nécessitait de piéger des animaux vivants ce qui est toujours moins efficace que l'utilisation de pièges létaux, étant donné que les trappes peuvent ne pas se déclencher au passage des animaux. Il fallait aussi être sur place pour pouvoir faire le prélèvement sanguin juste après la mort et ramener les animaux rapidement pour réaliser les autopsies dans les heures suivant la mort. Ce protocole était donc extrêmement lourd et ne permettait pas de mener plusieurs campagnes de piégeage de front, ce qui a réduit le nombre d'animaux pouvant être inclus dans l'étude. La météo et notamment la rigueur des hivers 2008-2009 et 2009-2010 ainsi que les fortes chutes de neiges ont restreint les périodes de piégeage prévues dans la Dombes mais peuvent aussi avoir contribué à une diminution des populations durant les printemps suivants. Enfin, une période de piégeage avait été prévue en avril 2009 sur l'Ognon mais une semaine avant le début de la session de capture un arrêté préfectoral a interdit les opérations de régulation des nuisibles. Cet arrêté est resté en vigueur jusqu'en mai 2009 puis a été annulé. Toutefois, étant donné l'emploi du temps des piégeurs et leurs autres activités il n'a pas été possible de reprogrammer la session et celle-ci a dû être annulée.

Concernant la mise en évidence du portage rénal, la méthode de référence est la mise en culture et l'isolement. Toutefois celle-ci nécessite un laboratoire spécialisé à proximité des lieux d'autopsie, et une mise en culture des spécimens immédiatement après prélèvement. Ces conditions ne pouvaient pas être remplies dans le cas de la zone de l'Ognon. Il faut aussi noter que ces bactéries sont difficiles et longues à cultiver et que les cultures rencontrent souvent des problèmes de contaminations par des bactéries opportunistes (notamment avec des prélèvements d'organes) (Levett 2001). Nos cultures ont été exposées à ces problèmes et, malgré l'utilisation de filtrations différentielles et d'antibiotiques adaptés, il n'a pas été possible de réaliser l'isolement de souches pures. Ces circonstances nous ont ainsi empêchés de pouvoir typer les souches impliquées dans un portage rénal dans la zone de la Dombes. Etant donné que nous ne pouvions pas utiliser la

culture dans une des deux zones, le portage rénal a aussi été évalué par une méthode de QPCR. La technique utilisée repose sur un kit commercial spécifique des leptospires pathogènes qui a été validé pour la recherche dans les reins.

La sérologie a été réalisée par le Laboratoire des Leptospires du Campus Vétérinaire de Lyon, qui est le laboratoire de référence pour le diagnostic des leptospiroses animales en France, par le biais de la technique de référence, le test MAT. Le seuil de détection employé de 1/100 est celui classiquement retrouvé dans la littérature pour des études similaires sur la Faune Sauvage (Michel et al. 2001). L'interprétation des résultats de sérologie doit être faite avec prudence, étant donné que cela signe le passage de l'agent pathogène mais pas forcément une infection en cours. Toutefois, en comparant avec ce qui est connu chez des espèces domestiques, des titres élevés ($> 1/800$) en MAT peuvent être considérés comme la marque d'une infection récente si ce n'est actuelle.

Dans l'optique de développer une technique permettant de suivre la contamination environnementale sans avoir recours aux piégeages d'espèces susceptibles d'être réservoirs, étant donné les aléas que ces piégeages peuvent rencontrer et l'investissement en temps qu'ils représentent, nous avons choisi de faire des prélèvements d'eau à proximité des pièges. Ces prélèvements ont été effectués de manière très exploratoire afin de déterminer si la mise en œuvre d'une technique de détection des leptospires dans de l'eau d'étang était réalisable et il n'a pas été défini de protocole de prélèvement précis dans ce cas.

B. Discussion des principaux résultats

Que ce soit au niveau des résultats de sérologie ou de portage rénal, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux zones étudiées.

Globalement, on a ainsi pu déterminer une séroprévalence de 76 % (IC95 % 64,2-87,8 %) et un taux de portage rénal déterminé par QPCR de 12,1 % pour les animaux capturés dans la Dombes alors que dans le cas de ceux de la Vallée de l'Ognon, la séroprévalence était de 64 % (IC95 % 53,1-74,9 %) et le taux de portage rénal de 8,0 %. Cette absence de différence significative nous a posé un problème quant à la réponse à un de nos objectifs. En effet nous avons choisi deux sites très différents d'un point de vue typologie géographique afin de pouvoir étudier l'influence de l'environnement sur la prévalence de la leptospirose, mais étant donné l'absence de différence significative entre les zones il n'a pas été possible de tirer des conclusions définitives à ce sujet.

Nos recherches également à préciser la place du Ragondin dans le cycle épidémiologique de la leptospirose : hôte réservoir ou hôte accidentel. Pour ce faire, chaque animal a été nécropsié et les lésions macroscopiques, notamment celles observées dans la cavité abdominale, ont été répertoriées. Une histologie des reins a été réalisée chez 88 individus des deux zones. Les autopsies ont révélés des individus avec un bon état corporel dans plus de 96 % des cas. Les lésions macroscopiques découvertes dans la cavité abdominale sont assez peu nombreuses, considérant que nous sommes en présence d'animaux sauvages et peu semblent pouvoir être reliées à l'expression d'une leptospirose aiguë telle qu'elle est connue chez d'autres espèces animales (Adler & de la Pena Moctezuma 2010). Au niveau microscopique, les reins ne montrent que des lésions subaiguës sans signification histologique évidente à part dans le cas de deux animaux. Aucun de ces résultats ne permet d'émettre l'hypothèse que les animaux capturés souffrent de conséquences liées à une leptospirose clinique bien que la séroprévalence soit élevée avec dans certains cas des titres permettant de conclure à une infection récente et que le taux de portage démontré par QPCR soit non négligeable. Tous nos résultats sont en faveur d'un Ragondin hôte réservoir tel que peut l'être le Rat surmulot. Toutefois, il est difficile d'être totalement affirmatif et il serait nécessaire de compléter cette étude par des expériences en

milieu contrôlé avec des infections provoquées afin de pouvoir définitivement confirmer ces résultats.

Les sérogroupes très majoritairement détectés par le MAT sont en premier lieu Australis et en second lieu Icterohaemorrhagiae. Il est à noter que d'après le CNR (Centre National de Référence) de l'Institut Pasteur, Icterohaemorrhagiae est le premier séro groupe incriminé en MAT dans le cas des infections humaines et Australis le troisième entre 2006 et 2010 en France métropolitaine (CNR 2010). Toutefois il faut faire attention à ne pas tirer de conclusions trop hâtives. En effet dans ces deux cas on s'intéresse à des résultats de sérologie, or le seul moyen de typer exactement une souche de leptospire nécessite une mise en culture puis, soit un typage sérologique par CAAT (Cross Agglutination Absorption Test) soit un typage génétique grâce aux nouvelles méthodes de type VNTR (Variable Number Tandem Repeat), MLST (Multi Locus Sequence Typing) ou d'autres. Il n'est pas possible avec uniquement des résultats sérologiques d'affirmer catégoriquement qu'il y a correspondance entre les leptospires circulant dans nos populations de Ragondin et celles responsables d'une majorité des infections humaines. Cependant le fait que les titres observés chez certains animaux de cette étude soient très élevés et la quasi absence d'autres sérogroupes réactifs dans les sérums est fortement en faveur d'une circulation au sein de nos populations de leptospires appartenant à ces deux groupes qui sont par ailleurs connus pour être pathogènes chez l'Homme (Levett 2001).

Un des critères de choix des deux zones avait été une différence de cas déclarés de leptospiroses humaines. Etant donné l'absence de différences significatives entre nos deux populations de Ragondin, d'autres facteurs sont à envisager pour tenter d'expliquer ce fait. Il faut d'abord noter que la leptospirose n'est pas une maladie à déclaration obligatoire en France et de ce fait une sous-estimation du nombre de cas est rapportée par le CNR. Cette sous-estimation est dépendante de la sensibilisation des médecins dans chaque zone en France (CNR 2010). Il est donc possible que la différence de cas observée entre les deux zones soit plus artéfactuelle que réelle et révèle une plus grande vigilance vis-à-vis de la

leptospirose, et un plus grand nombre de tests MAT demandés, des médecins dans la zone de l'Ognon que dans celle de la Dombes. Si nous considérons que la différence en nombre de cas est réelle, plusieurs explications peuvent être envisagées. Il se peut que le Ragondin ne soit pas le facteur discriminant entre ces deux zones, et qu'un (ou plusieurs) autre(s) hôte(s) réservoir(s) de ces sérogroupes soi(en)t responsable(s) des différences observées en ce qui concerne les infections humaines. Notre hypothèse privilégiée est toutefois différente. Ces deux zones sont très différentes d'un point de vue utilisation par l'Homme : l'Ognon est une rivière de loisirs aquatiques avec des bases nautiques alors que la Dombes est principalement composée d'étangs privés sans accès public utilisés pour la pisciculture. Il nous semble probable que si la différence en nombre de cas de leptospirose humaine est bien réelle, elle soit majoritairement due à une différence de fréquentation des zones par le public.

La leptospirose est une maladie liée à l'environnement et son épidémiologie en Europe est maintenant majoritairement liée aux loisirs aquatiques (sports nautiques, pêche). La surveillance de l'environnement par le biais d'un ou plusieurs réservoirs est compliquée et demande un investissement en temps et en personnel important. Il nous a ainsi paru intéressant de développer un indicateur plus facile à mettre en œuvre pour un suivi environnemental. Plusieurs options étaient possibles : une recherche directe dans les eaux ou l'utilisation d'animaux domestiques (notamment le Chien) comme sentinelle de la circulation de leptospires pathogènes dans une zone. Nous avons choisi de développer une méthode de détection par QPCR des leptospires pathogènes dans l'eau qui permet de détecter de très faibles quantités de bactéries dans des eaux douces. Cette méthode, basée sur la détection du gène *lipL32*, permet la détection des souches pathogènes et d'aucune souche saprophyte et la quantification de 10 à 10^7 bactéries / ml. En ce qui concerne la stratégie d'échantillonnage, sa mise en place nécessite des connaissances en hydrologie que nous ne possédons pas et nous ne nous sommes pas penchés sur ce sujet par manque de temps mais il serait fortement intéressant de pouvoir développer ce genre de

collaborations et de poursuivre ce projet. La méthode publiée pourra être utilisée par différents acteurs souhaitant intégrer la recherche des leptospires pathogènes dans un suivi de la qualité de l'eau, notamment dans le cas d'eaux de baignades.

II. PERSPECTIVES

Suite aux résultats obtenus durant ce travail de thèse, plusieurs pistes restent à approfondir.

1. Poursuivre la mise au point du test sur l'eau

Ainsi qu'il a déjà été mentionné notre travail portant sur la détection de leptospires pathogènes dans les eaux douces n'a porté que sur la mise au point de la méthode analytique. Il semble intéressant, au vu des résultats positifs obtenus, de développer des collaborations avec des spécialistes dans les analyses bactériologiques des eaux afin de poursuivre la mise au point du protocole et de pouvoir proposer un schéma complet allant des modalités de prélèvement, à la conservation des échantillons jusqu'à l'interprétation des résultats aux organismes de surveillance de la qualité de l'eau.

2. Confirmer le rôle du Ragondin comme hôte-réservoir

Nos arguments en faveur d'un rôle de réservoir de cette espèce sont principalement des arguments négatifs (pas d'association entre des lésions macroscopiques ou histologiques avec un examen sérologique positif ou la preuve d'un portage rénal). Pour confirmer nos conclusions et établir formellement la place du Ragondin, des études en conditions contrôlées avec des animaux en captivité seront nécessaires. Il serait intéressant de pouvoir réaliser un suivi temporel d'une infection leptospirosique chez cette espèce. Dans ce cadre il faudrait pouvoir évaluer le temps de la leptospiémie, le temps de séroconversion, la durée pendant laquelle la sérologie MAT reste positive, le taux de portage rénal après une infection

et la durée de l'excrétion urinaire. Ces éléments seraient à évaluer au moins vis-à-vis de leptospires représentant les sérogroupes Australis et Icterohaemorrhagiae mais il pourrait aussi être intéressant de tester d'autres souches afin de déterminer s'il existe une spécificité du Ragondin pour ces sérogroupes ou si l'espèce est plus ubiquiste comme hôte que ce que nos résultats semblent indiquer.

3. Typage des souches de leptospires infectantes dans une population de Ragondin par méthode moléculaire

Les méthodes de typage moléculaire (VNTR, MLST) permettent de s'affranchir des cultures pures voire de typer les souches infectantes dans des échantillons biologiques dans le cas de charge bactérienne élevée (Agampodi et al. 2012). Nos échantillons de reins positifs en QPCR n'avaient pas une charge bactérienne assez élevée pour pouvoir envisager d'utiliser ce genre de méthode et, suite à des soucis techniques, il ne nous a pas été possible de les appliquer dans le cas des cultures trouvées positives en PCR. Toutefois il semblerait intéressant de pouvoir réaliser ce genre de typage dans le cadre d'études ultérieures afin de pouvoir déterminer plus exactement quel(s) est(sont) le(s) sérogroupes et sérovars infectants des populations de Ragondin. Dans ce cadre des piégeages proches du site du Campus Vétérinaire de Lyon sembleraient le plus adaptés afin de pouvoir réaliser des cultures sur les reins des animaux.

4. Développer un réseau d'animal- sentinelle pour la maladie humaine

La recherche des leptospires dans les réservoirs et dans l'eau peut être délicate et/ou lourde techniquement. Un autre moyen de détecter une contamination éventuelle de

l'environnement et donc un danger pour l'Homme lors de l'utilisation de cet environnement pourrait être de développer un réseau d'animaux-sentinelles sur une zone donnée. Il s'agirait de déterminer dans ce cas quelle espèce domestique serait la plus appropriée en tenant compte de son utilisation de l'espace, des données de vaccination éventuelles pour l'espèce et des données du Laboratoire des Leptospires, puis de mettre en place un réseau de surveillance avec des vétérinaires sur le terrain.

Un exemple de ce type de réseau pourrait être basé sur une surveillance sérologique des meutes de chiens de chasse par exemple sur la zone de la Dombes. L'utilisation des chiens de chasse présentent plusieurs avantages : ils sont en contact avec quasiment le même environnement que l'Homme, les meutes sont généralement sorties dans des lieux bien définis (zone de chasse de leur maître), de plus une étude récente en France semble indiquer que les sérogroupes détectés majoritairement en MAT dans cette espèce sont *Icterohaemorrhagiae* et *Australis* (Hazart et al. 2010) ce qui est cohérent avec les données chez l'Homme (CNR 2010). On pourrait imaginer la création d'un réseau des vétérinaires praticiens de la zone qui suivraient ces chiens sur le long terme permettant ainsi de connaître le statut vaccinal et l'historique médical de chaque animal. Les vétérinaires organiseraient un suivi sérologique avec des MAT réalisés avant, en milieu et après la saison de chasse et rapporteraient tout épisode pouvant être évocateur d'une leptospirose (un questionnaire précis avec les facteurs d'inclusion devant être établi et distribué aux praticiens participants). Ce genre de réseau est un réseau de vigilance et si une proportion conséquente d'animaux présente une séroconversion, il peut servir d'outil d'alerte pour les médecins du secteur ou les pouvoirs publics.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- ABBAS, A. 1991. Feeding strategy of coypu (*Myocastor coypus*) in central western France. *J. Zool. Lond.* 224: 385-401.

- ABGUEGUEN, P., DELBOS, V., BLAINVILLAIN, J., CHENNEBAULLLT, J.M., COTTIN, J., FANELLO, S., AND PICHARD, E. 2008. Clinical aspects and prognosis factors of leptospirosis in adults. Retrospective study in France. *J. Infect.* 57: 171-178.

- ADLER, B., AND CHAPPEL, R. 2011. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of *Leptospiraceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 698-699.

- ADLER, B., AND DE LA PENA MOCTEZUMA, A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* 140: 287-296.

- AGAMPODI, S.B., MORENO, A.C., VINETZ, J.M., AND MATTHIAS, M.A. 2012. Short Report: Utility and limitations of direct Multi-Locus Sequence Typing on qPCR-positive blood to determine infecting *Leptospira* strain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Published online December 3, 2012, doi: 10.4269/atjmh.2012.12-0526.

- AHMED, N., DEVI, S.M., VALVERDE, M. DE LOS A., VIJAYACHARI, P., MACHANG'U, R.S., ELLIS, W.A., AND HARTSKEERL, R.A. 2006. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5:28. Doi: 10.1186/1476-0711-5-28.

- AHMED, A., ENGELBERTS, M.F.M., BOER, K.R., AHMED, N., HARTSKEERL, R.A. 2009. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. *PLoS ONE* 4: e7093. Doi: 10.1371/journal.pone.0007093.

- ANCHEZAR, B.V., ILLA, R., AND VIVOLI, D. 1949. La nutria, fuente de infeccion de la de Weil por *Leptospira bonariensis*. *Rev. Inst. Bact.* 14: 114-123.

- ATHANAZIO, D.A., SILVA, E.F., SANTOS, C.S., ROCHA, G.M., VANNIER-SANTOS, M.A., MCBRIDE, A.J.A., KO, A.I., AND REIS, M.G. 2008. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Trop.* 105: 176-180.

- AVIAT, F., BLANCHARD, B., MICHEL, V., BLANCHET, B., BRANGER, C., HARS, J., MANSOTTE, F., BRASME, L., DE CHAMPS, C., BOLUT, P., MONDOT, F., FALIU, J., ROCHEREAU, S., KODJO, A., AND ANDRE-FONTAINE, G. 2009. *Leptospira* exposure in the human environment in France: a survey in feral rodents and in fresh water. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32: 463-476.
- AVMA. 2007. AVMA guidelines on euthanasia. Document consulté à http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf le 26/04/2012.

B

- BARANTON, G., AND POSTIC, D. 2006. Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. *Int. J. Infect. Dis.* 10: 162-170.
- BERNARD, A., ET LEBRETON, P. 2007. Les oiseaux de la Dombes : une mise à jour. *Dombes* 27, 168 pp.
- BERTOLINO, S., AND GENOVESI, P. 2007. Semiaquatic mammals introduced into Italy: case studies in biological invasion. *In*: GHERARDI, F. (ed). Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats. Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, The Netherlands, p. 175-191.
- BERTOLINO, S., ANGELICI, C., MONACO, E., MONACO, A., AND CAPIZZI, D. 2011. Interactions between coypu (*Myocastor coypus*) and bird nests in three Mediterranean wetlands of central Italy. *Hystrix It. J. Mamm.* 22: 333-339.
- BERTOLINO, S., PERRONE, A., AND GOLA, L. 2005. Effectiveness of coypu control in small Italian wetland areas. *Wildlife Soc. B.* 33: 714-720.
- BHARTI, A.R., NALLY, J.E., RICARDI, 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. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect. Dis.* 3: 757-771.
- BISCOLA, N.P., FORNAZARI, F., SAAD, E., RICHINI-PEREIRA, V.B., CAMPAGNER, M.V., LANGONI, H., BARRAVIERA, AND FERREIRA JUNIOR, R.S. 2011. Serological investigation and PCR in detection of pathogenic leptospires in snakes. *Pesq. Vet. Bras.* 31: 806-811.

- BLOTTA, L., PRESTINACI, F., MIRANTE, S., AND CANTAFORA, A. 2005. Quantitative assay of total ds DNA with PicoGreen reagent and real-time fluorescent detection. *Ann. Ist. Sper. Sanita* 41:119-123.
- BOLLO, E., PREGEL, P., GENNERO, S., PIZZONI, E., ROSATI, S., NEBBIA, P., AND BIOLATTI, B. 2003. Health status of a population of nutria (*Myocastor coypus*) living in a protected area in Italy. *Res. Vet. Sci.* 75: 21-25.
- BOURHY, P., VRAY, M., AND PICARDEAU, M. 2013. Evaluation of an in-house ELISA using the intermediate species *Leptospira fainei* for diagnosis of leptospirosis. *J. Med. Microbiol.* Published online March 2013 doi: 10.1099/jmm.0.054304-0.
- BRANGER, C., BLANCHARD, B., FILLONNEAU, C., SUARD, I., AVIAT, F., CHEVALLIER, B., AND ANDRE-FONTAINE, G. 2005. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene *hap1* encoding the hemolysis- associated protein 1. *FEMS Microbiol. Lett.* 243: 437-445
- BULACH, D.M., ZUERNER, R.L., WILSON,P., SEEMANN, T., MCGRATH, A., CULLEN, P.A., DAVIS, J., JOHNSON, M., KUCZEK, E., ALT, D.P., PETERSON-BURCH, B., COPPEL, R.L., ROOD, J.I., DAVIES, J.K., AND ADLER, B. 2006. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 14560-14565

C

- CARTER, J., AND LEONARD, B.P. 2002. A review of the literature on the worldwide distribution, spread of, and efforts to eradicate the coypu (*Myocastor coypus*). *Wildlife Soc. B.* 30: 162-175.
- CARTER, J., FOOTE, L., AND JOHNSON-RANDALL, L.A. 1999. Modeling the effects of nutria (*Myocastor coypus*) on wetland loss. *Wetlands* 19: 209-219.
- CHAPPEL, R.J., GORIS, M., PALMER, M.F., AND HARTSKEERL, R.A. 2004. Impact of proficiency testing on results of the microscopic agglutination test for diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5484-5488.

- CNR. 2010. Rapport d'activité. Années 2006 à 2010. Document consulté à <http://www.pasteur.fr/ip/resource/filecenter/document/01s-00004h-07l/ra-cnr-lepto-2010.pdf> le 20/04/2012.
- CRODA, J., NETO, A.N.D., BRASIL, R.A., PAGLIARI, C., NICODEMO, A.C., AND DUARTE, M.I.S. 2009. Leptospirosis pulmonary haemorrhage syndrome is associated with linear deposition of immunoglobulin and complement on the alveolar surface. *Clin. Microbiol. Infect.* 16: 593-599.
- CRODA, J., PEREIRA FIGUEIRA, C., WUNDER JR, E.A., SANTOS, C.S., REIS, M.G., KO, A.I., AND PICARDEAU, M. 2008. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira*: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. *Infect. Immun.* 76: 5826-5833.

D

- DAGAULT, N. 1987. Caractéristiques des populations de *Myocastor* (*Myocastor coypus* Molina) dans deux milieux particuliers, rivière et marais en Poitou-Charentes. Etude de la reproduction. Thèse de 3^{ème} cycle. Université de Poitiers, France. 170 pp.
- DESAI, S., VAN TREECK, U., LIERZ, M., ESPELAGE, W., ZOTA, L., SARBU, A., CZERWINSKI, M., SADKOWSKA-TODYS, M., AVDICOVA, M., REETZ, J., LUGE, E., GUERRA, B., NÖCKLER, K., AND JANSEN, A. 2009. Resurgence of field fever in a temperate country: an epidemic of leptospirosis among seasonal strawberry harvesters in Germany in 2007. *Clin. Infect. Dis.* 48: 691-697.
- DONCASTER, C.P., AND MICOL, T. 1989. Annual cycle of a coypu (*Myocastor coypus*) population: male and female strategies. *J. Zool. Lond.* 217: 227-240.
- DONCASTER, C.P., AND MICOL, T. 1990. Response by coypus to catastrophic events of cold and flooding. *Holarctic Ecol.* 13: 98-104.
- DUNCAN, C., KRAFSUR, G., PODELL, B., BAETEN, L.A., LEVAN, I., CHARLES, B., AND EHRHART, E.J. 2012. Leptospirosis and tularaemia in raccoons (*Procyon lotor*) of Larimer County, Colorado. *Zoonoses Public Health* 59: 29-34.

E

- ELLINGHAUSEN, H.C., AND MCCULLOUGH, W.G. 1965. Nutrition of *Leptospira Pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am. J. Vet. Res.* 26: 45-51.

F

- FABER, N.A., CRAWFORD, M., LEFEBVRE, R.B., BUYUKMIHCI, N.C., MADIGAN, J.E., AND WILLITS, N.H. 2000. Detection of *Leptospira* spp. in the aqueous humor of horses with naturally acquired recurrent uveitis. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2731-2733.
- FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C., AND PEROLAT, P. 1999. *Leptospira* and Leptospirosis. 2nd Edition. MediSci Edition, Melbourne, Australia, 272 pp.
- FICETOLA, G.F., MIAUD, C., POMPANON, F., AND TABERLET, P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4: 423-425.

G

- GANOZA, C.A., MATTHIAS, M.A., COLLINS-RICHARDS, D., BROUWER, K.C., CUNNINGHAM, C.B., SEGURA, E.R., GILMAN, R.H., GOTUZZO, E., AND VINETZ, J.M. 2006. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Med.* 3: e308, DOI: 10.1371/journal.pmed.0030308.
- GEBHARDT, H. 1996. Ecological and economic consequences of introduction of exotic wildlife (birds and mammals) in Germany. *Wildlife Biol.* 2: 205-211.
- GUICHON, M.L., AND CASSINI, M.L. 2005. Population parameters of indigenous populations of *Myocastor coypus*: the effect of hunting pressure. *Acta Theriol.* 50: 125-132.
- GUICHON, M.L., BENITEZ, V.B., ABBA, A., BORGNIA, M., AND CASSINI, M.H. 2003a. Foraging behaviour of coypus *Myocastor coypus*: why do coypus consume aquatic plants? *Acta Oecol.* 24: 241-246.
- GUICHON, M.L., DONCASTER, C.P., AND CASSINI, M.L. 2003b. Population structure of coypus (*Myocastor coypus*) in their region of origin and comparison with introduced populations. *J. Zool. Lond.* 261: 265-272.

H

- HAAKE, D.A., CHAO, G., ZUERNER, R.L., BARNETT, J.K., BARNETT, D., MAZEL, M., MATSUNAGA, J., LEVETT, P.N., AND BOLIN, C.A. 2000. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect. Immun.* 68: 2276-2285.
- HARTLEBEN, C.P., LEAL, F.M., MONTE, L.G., HARTWIG, D.D., SEIXAS, F.K., VASCONCELLOS, S.A., BRIHUEGA, B., AND DELLAGOSTIN, O.A. 2013. Serological analysis by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigen LipL32 for the diagnosis of swine leptospirosis. *Curr. Microbiol.* 66: 106-109.
- HARTSKEERL, R.A., COLLARES-PEREIRA, M., AND ELLIS, W.A. 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics infection in the changing world. *Clin. Microbiol. Infect.* 17: 494-501.
- HAZART, G., HUGONNARD, M., KODJO, A., GROUD, K., AND GOY-THOLLOT, I. 2010. La leptospirose canine en France : étude rétrospective de 37 cas. *Prat. Med. Chir. Anim.* 45: 59-64.
- HOWERTH, E.W., REEVES, A.J., MCELVEEN, M.R., AND AUSTIN, F.W. 1994. Survey for selected diseases in nutria (*Myocastor coypus*) from Louisiana. *J. Wildlife Dis.* 30: 450-453.

J

- JANSEN, A., LUGE, E., GUERRA, B., WITTSCHEN, P., GRUBER, A.D., LODDENKEMPER, C., SCHNEIDER, T., LIERZ, M., EHLERT, D., APPEL, B., STARK, K., AND NÖCKLER, K. 2007. Leptospirosis in urban wild boars, Berlin, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 739-742.
- JOHNSON, R.C., AND HARRIS, V.G. 1967. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. 1. Growth at low temperatures. *J. Bacteriol.* 94: 27-31.
- JONES, K.E., PATEL, N.G., LEVY, M.A., STOREYGARD, A., BALK, D., GITTLEMAN, J.L., AND DASZAK, P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990-994.

K

- KARESH, W.B., DOBSON, A., LLOYD-SMITH, J.O., LUBROTH, J., DIXON, M.A., BENNETT, M., ALDRICH, S., HARRINGTON, T., FORMENTY, P., LOH, E.H., MACHALABA, C.C., JASON THOMAS, M., AND HEYMANN, D.L. 2012. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *Lancet* 380: 1936-1945.
- KIK, M.J.L., GORIS, M.G., BOS, J.H., HARTSKEERL, R.A., AND DORRESTEIN, G.M. 2006. An outbreak of leptospirosis in seals (*Phoca vitulina*) in captivity. *Vet. Quart.* 28: 33-39.
- KO, A.I., GOARANT, C., AND PICARDEAU, M. 2009. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7: 736-747
- KO, A.I., REIS, M.G., RIBEIRO DOURADO, C.M., JOHNSON JR, W.D., RILEY, L.W., AND THE SALVADOR LEPTOSPIROSIS STUDY GROUP. 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet* 354: 820-825.
- KOHN, B., STEINICKE, K., ARNDT, G., GRUBER, A.D., GUERRA, B., JANSEN, A., KASER-HOTZ, B., KLOPFLEISCH, R., LOTZ, F., LUGE, E., AND NÖCKLER, K. 2010. Pulmonary abnormalities in dogs with leptospirosis. *J. Vet. Intern. Med.* 24: 1277-1282.

L

- LAMBERT, A., PICARDEAU, M., HAAKE, D.A., SERMSWAN, R.W., SRIKRAM, A., ADLER, B., AND MURRAY, G.A. 2012. FlaA proteins in *Leptospira interrogans* are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. *Infect. Immun.* 80: 2019-2025.
- LAU, C.L., SMYTHE, L.D., CRAIG, S.B., AND WEINSTEIN, P. 2010A. Climate change, flooding, urbanization and leptospirosis: fuelling the fire? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 104: 631-638.
- LAU, C., SMYTHE, L., AND WEINSTEIN, P. 2010B. Leptospirosis: an emerging disease in travelers. *Travel Med. Infect. Dis.* 8: 33-39.
- LAURIE, E.M.O. 1946. The coypu (*Myocastor coypus*) in Great Britain. *J. Anim. Ecol.* 15: 22-34.

- LE LOUARN, H., ET QUERE, J.-P. 2003. Les Rongeurs de France. Faunistique et biologie. 2^{ème} édition revue et augmentée. INRA Editions, Paris, France, 256 pp.
- LEVETT, P.N. 2001. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 296-326.
- LEVETT, P.N. 2004. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clin. Applied Immunol. Rev.* 4: 435-448.
- LEVETT, P.N., MOREY, R.E., GALLOWAY, R.L., TURNER, D.E., STEIGERWALT, A.G., AND MAYER, L.W. 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J. Med. Microbiol.* 54: 45-49.
- LOURDAULT, K., CERQUEIRA, G.M., WUNDER JR, E.A., AND PICARDEAU, M. 2011. Inactivation of *clpB* in the pathogen *Leptospira interrogans* reduces virulence and resistance to stress conditions. *Infect. Immun.* 79: 3711-3717.
- LOWE, S., BROWNE, M., BOUDJELAS, S., AND DE POORTER, M. 2000. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. A selection from the Global Invasive Species Database. Published by ISSG as special lift-out in Alien 12, December 2000, 12 pp.

M

- MAURIN, H. 1997. L'Homme et les Mammifères de France métropolitaine : Evolution historique et introduction d'espèces dans les milieux humides et aquatiques. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 344/345: 117-132.
- MCBRIDE, A.J.A, ATHANAZIO, D.A., REIS, M.G., AND KO, A.I. 2005. Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 18: 376-386.
- MENARD, A., AGOULON, A., L'HOSTIS, M., RONDELAUD, D., COLLARD, S., AND CHAUVIN, A. 2001. *Myocastor coypus* as a reservoir host of *Fasciola hepatica* in France. *Vet. Res.* 32: 499-508.
- MERIEN, F., AMOURIAUX, P., PEROLAT, P., BARANTON, G., AND SAINT-GIRONS, I. 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2219-2224.

- MICHEL, V., RUVOEN-CLOUET, N., MENARD, A., SONRIER, C., FILLONNEAU, C., RAKOTOVAO, F., GANIERE, J.P., AND ANDRE-FONTAINE, G. 2001. Role of the coypu (*Myocastor coypus*) in the epidemiology of leptospirosis in domestic animals and humans in France. *Eur. J. Epidemiol.* 17: 111-121.
- MICOL, T. 1991. Socio-démographie d'un mammifère introduit : le Ragondin (*Myocastor coypus*) dans le marais poitevin. Thèse de 3^{ème} cycle. Université de Toulouse, France. 179 pp.
- MOUTOU, F. 1997. Mammifères aquatiques et semi-aquatiques introduits en France. Risques et conséquences. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 344/345: 133-139.
- MÜHLDOERFER, K. 2012. Bats and bacterial pathogens: a review. *Zoonoses Public Health* published online August, 2 2012. Doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01536.x.
- MURRAY, G.L., SRIKRAM, A., HOKE, D.E., WUNDER JR, E.A., HENRY, R., LO, M., ZHANG, K., SERMSWAN, R.W., KO, A.I., AND ADLER, B. 2009. Major surface protein LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. *Infect. Immun.* 77: 952-958.

N

- NALLY, J.E., CHATRANUWAT, C., WU, X.-Y., FISHBEIN, M.C., PEREIRA, M.M., PEREIRA DA SILVA, J.J., BLANCO, D.R., AND LOVETT, M.A. 2004. Alveolar septal disposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *Am. J. Pathol.* 163: 1115-1127.
- NALLY, J.E., WHITELEGGE, J.P., BASSILIAN, S., BLANCO, D.R., AND LOVETT, M.A. 2007. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. *Infect. Immun.* 75: 766-773.
- NARDONE, A., CAPEK, I., BARANTON, G., CAMPESE, C., POSTIC, D., VAILLANT, V., LIENART, M., AND DESENCLOS, J.-C. 2004. Risk factors for leptospirosis in metropolitan France: results of a national case-control study, 1999-2000. *Clin. Infect. Dis.* 39: 751-753.

- NASCIMENTO, A.L.T.O., KO, A.I., MARTINS, E.A.L., MONTEIRO- VITORELLO, C.B., HO, P.L., HAAKE, D.A., VERJOVSKI- ALMEIDA, S., HARSKEERL, R.A., MARQUES, M.V., OLIVEIRA, M.C., MENCK, C.F.M., LEITE, L.C.C., CARRER, H., COUTNHO, L.L., DEGRAVE, W.M., DELLAGOSTIN, O.A., EL-DORRY, H., FERRO, E.S., FERRO, M.I.T., FURLAN, L.R., GAMBERINI, M., GIGLIOTI, E.A., GOES-NETO, A., GOLDMAN, G.H., GOLDMAN, M.H.S., HARAKAVA, R., JERONIMO, S.M.B., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M., KIMURA, E.T., KURAMAE, E.E., LEMOS, E.G.M., LEMOS, M.V.F., MARINO, C.L., NUNES, L.R., DE OLIVEIRA, R.C., PEREIRA, G.G., REIS, M.S., SCHRIEFER, A., SIQUEIRA, W.J., SOMMER, P., TSAI, S.M., SIMPSON, A.J.G., FERRO, J.A., CAMARGO, L.E.A., KITAJIMA, J.P., SETUBAL, J.C., AND VAN SLUYS, M.A. 2004. Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J. Bacteriol.* 186: 2164-2172.
- NORMAN, S.A., DIGIACOMO, R.F., GULLAND, F.M.D., MESCHKE, J.S., AND LOWRY, M.S. 2008. Risk factors for an outbreak of leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) in California, 2004. *J. Wildl. Dis.* 44: 837-844.

P

- PALANIAPPAN, R.U.M., RAMANUJAM, S., AND CHANG, Y.-F. 2007. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 20: 284-292.
- PANZACCHI, M., BERTOLINO, S., COCCHI, R., AND GENOVESI, P. 2007. Population control of coypu *Myocastor coypus* in Italy compared to eradication in UK: a cost-benefit analysis. *Wildlife Biol.* 13: 159-171.
- PAPPAS, G., PAPADIMITRIOU, P., SIOZOPOULOU, V., CHRISTOU, L., AND AKRITIDIS, N. 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int. J. Infect. Dis.* 12: 351-357.
- PAUL, J.H., DAVID, W.H., DEFLAUN, A.W., AND CAZARES, L.H. 1989. Turnover of extracellular DNA in eutrophic and oligotrophic freshwater environments of southwest Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1823-1828.
- PEROLAT, P., CHAPPEL, R.J., ADLER, B., BARANTON, G., BULACH, D.M., BILLINGHURST, M.L., LETOCART, M., MERIEN, F., AND SERRANO, M.S. 1998. *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 851-858.

- PICARDEAU, M., BULACH, D.M., BOUCHIER, C., ZUERNER, R.L., ZIDANE, N., WILSON, P.J., CRENO, S., KUCZEK, E.S., BOMMEZZADRI, S., DAVIS, J.C., MCGRATH, A., JOHNSON, M.J., BOURSAUX-EUDE, C., SEEMANN, T., ROUY, Z., COPPEL, R.L., ROOD, J.I., LAJUS, A., DAVIES, J.K., MEDIGUE, C., AND ADLER, B. 2008A. Genome sequence of saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE* 3: e1607. Doi: 10.1371/journal.pone.0001607.
- PICARDEAU, M., CORNET, M., MOREL, V., SERTOUR, N., CHAUMET, D., BRACHET, E., AND BOURHY, P. 2008B. Impact of the revised diagnostic policy on the diagnosis and surveillance of leptospirosis in France. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 37: 329-331.
- PINNE, M., AND HAAKE, D.A. 2013. LipL32 is a subsurface lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies. *PLoS One* 8: e51025. Doi: 10.1371/journal.pone.0051025.

Q

- QUERALT, N., BARTOLOME, R., AND ARAUJO, R. 2005. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human faeces and water with different level of faecal pollution in the north-east of Spain. *J. Appl. Microbiol.* 98: 889-895.

R

- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Consulté le 20/04/2012 à www.R-project.org.
- RADL, C., MÜLLER, M., REVILLA-FERNANDEZ, S., KARNER-ZUSER, S., DE MARTIN, A., SCHAUER, U., KARNER, F., STANEK, G., BALCKE, P., HALLAS, A., FRANK, H., FÜRNSCHLIEF, A., ERHART, F., AND ALLERBERGER, F. 2011. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Langau, Austria, 2010. *Wien. Klin. Wochenschr.* 123: 751-755.

- RAHELINIRINA, S., LEON, A., HARTSKEERL, R., SERTOUR, N., AHMED, A., RAHARIMANANA, C., FERQUEL, E., GARNIER, M., CHARTIER, L., DUPLANTIER, J.-M., RAHALISON, L., AND CORNET, M. 2010. First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. *PLoS ONE* 5: e14111. Doi: 10.1371/journal.pone.0014111.
- REGGIANI, G., BOITANI, L., D'ANTONI, S., AND DE STEFANO, R. 1993. Biology and control of the coypu in the Mediterranean area. *Suppl. Ric. Biol. Selvagina* 21: 67-100.
- REGGIANI, G., BOITANI, L., AND DE STEFANO, R. 1995. Population dynamics and regulation in the coypu *Myocastor coypus* in central Italy. *Ecography* 18: 138-146.
- 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. 2003. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 422: 888-893.
- RISTOW, P., BOURHY, P., WEYKAMP DA CRUZ MCBRIDE, F., PEREIRA FIGUEIRA, C., HUERRE, M., AVE, P., SAINT GIRONS, I., KO, A.I., AND PICARDEAU, M. 2007. The OmpA-Like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLoS Pathog.* 3: e97. Doi: 10.1371/journal.ppat.0030097.
- ROTH, E.E., ADAMS, W.V., SANFORD, G.E., GREER, B., AND MAYEUX, P. 1962. *Leptospira paidjan* (Bataviae serogroup) isolated from nutria in Louisiana. *Public Health Rep.* 77: 583-587.

S

- SAITO, M., VILLANUEVA, S.Y., KAWAMURA, Y., IIDA, K.I., TOMIDA, J., KANEMARU, T., KOHNO, E., MIYAHARA, S., UMEDA, A., AMAKO, K., GLORIANI, N.G., AND YOSHIDA, S.I. 2012. *Leptospira idonii* sp. nov. isolated from an environmental water in Fukuoka, Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Published ahead of print November 30, 2012, doi: 10.1099/ijs.0.047233-0.

- SALAÜN, L., MERIEN, F., GURIANOVA, S., BARANTON, G., AND PICARDEAU, M. 2006. Application of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3954-3962.

- SAVINO, E., AND RENNELLA, E. 1949. Estudios sobre *Leptospira*. XV. Posicion sistematica de la *Leptospira boniariensis*. Su identidad con la *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Rev. Inst. Bact.* 14: 270-272.

- SEGURA, E.R., GANOZA, C.A., CAMPOS, K., RICALDI, J.N., TORRES, S., SILVA, H., CESPEDES, M.J., MATTHIAS, M.A., SWANCUTT, M.A., LOPEZ LINAN, R., GOTUZZO, E., GUERRA, H., GILMAN, R.H., AND VINETZ, J.M. 2005. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity with quantification of leptospiral burden. *Clin. Infect. Dis.* 40: 343-351.

- SLACK, A., SYMONDS, M., DOHNT, M., HARRIS, C., BROOKES, D., AND SMYTHE, L. 2007. Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 57: 361-366.

- SLAVICA, A., CVETNIC, Z., MILAS, Z., JANICKI, Z., TURK, N., KONJEVIC, D., SEVERIN, K., TONCIC, J., LIPEJ, Z. 2008. Incidence of leptospiral antibodies in different game species over a 10-year period (1996-2005) in Croatia. *Eur. J. Wildl. Res.* 54: 305-311.

- SMYTHE, L.D., SMITH, I.L., SMITH, G.A., DOHNT, M.F., SYMONDS, M.L., BARNETT, L.J., AND MCKAY, D.B. 2002. A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect. Dis.* 2:13. Doi: 10.1186/1471-2334-2-13.

- SOCOLOVSKI, C., ANGELAKIS, E., RENVOISE, A., FOURNIER, P.-E., MARIE, J.L., DAVOUST, B., STEIN, A., AND RAOULT, D. 2011. Strikes, flooding, rats and leptospirosis in Marseille, France. *Int. J. Infect. Dis.* 15: e710-e715.

- STODDARD, R.A., GEE, J.E., WILKINS, P.P., MCCAUSTLAND, K., AND HOFFMASTER, A.R. 2009. Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64: 247-255.

- SUBATHRA, M., SENTHILKUMAR, T.M., AND RAMADASS, P. 2013. Recombinant OmpL1 protein as a diagnostic antigen for the detection of canine leptospirosis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169: 431-437.

T

- TIMONEY, J.F., KALIMUTHUSAMY, N., VELINENI, S., DONAHUE, J.M., ARTIUSHIN, S.C., AND FETTINGER, M. 2011. A unique genotype of *Leptospira interrogans* serovar Pomona type kennewicki is associated with equine abortion. *Vet. Microbiol.* 150: 349-353.
- TRAP, D. 1988. Les petits mammifères sauvages, source de leptospirose. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 7: 885-892.
- TRUEBA, G., ZAPATA, S., MADRID, K., CULLEN, P., AND HAAKE, D. 2004. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *Int. Microbiol.* 7: 35-40.
- TUCUNDUVA DE FARIA, M., CALDERWOOD, M.S., ATHANAZIO, D.A., MCBRIDE, A.J.A., HARTSKEERL, R.A., PEREIRA, M.M., KO, A.I., REIS, M.G. 2008. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop.* 108: 1-5

V

- VALVERDE, MA. DE LOS A., RAMIREZ, J.M., MONTES DE OCA, L.G., GORIS, M.G.A, AHMED, N., AND HARTSKEERL, R. 2008. Arenal, a new *Leptospira* serovar of serogroup Javanica, isolated from a patient in Costa Rica. *Infect. Genet. Evol.* 8: 529-533.

W

- WAITKINS, S.A., WANYANGU, S., AND PALMER, M. 1985. The coypu as a rodent reservoir of leptospira infection in Great Britain. *J. Hyg. Camb.* 95: 409-417.
- WANG, Z., JIN, L., AND WEGRZYN, A. 2007. Leptospirosis vaccines. *Microb. Cell Fact.* 6:39. Doi: 0.1186/1475-2859-6-39.
- WANYANGU, S., WAITKINS, S.A., AND PALMER, M.F. 1986. Isolation of leptospires from a one week dead coypu (*Myocastor coypus* Molina). *Int. J. Zoon.* 13: 236-240.
- WHO. 1999. Leptospirosis worldwide. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 74: 237-242.

- WHO. 2003. Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organisation, Geneva, Switzerland, 109 pp.
- WOODS, C.A., CONTRERAS, L., WILNER-CHAPMAN, G., AND WHIDDEN, H. 1992. *Myocastor coypus*. *Mamm. Species* 398: 1-8.

Y

- YAN, K.-T., ELLIS, W.A., MACKIE, D.P., TAYLOR, M.J., MCDOWELL, S.W.J., AND MONTGOMERY, J.M. 1999. Development of an ELISA to detect antibodies to a protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar *hardjo* in cattle. *Vet. Microbiol.* 69: 173-187.
- YASUDA, P.H., STEIGERWALT, A.G., SULZER, K.R., KAUFMANN, A.F., ROGERS, F., AND BRENNER, D.J. 1987. Deoxyribonucleic acid relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 407-415.

Z

- ZEPEDA, C., SALMAN M., AND RUPPNER, R. 2001. International trade, animal health and veterinary epidemiology: challenges and opportunities. *Prev. Vet. Med.* 48: 261-271.
- ZUERNER, R.L., CAMERON, C.E., RAVERTY, S., ROBINSON, J., COLEGROVE, K.M., NORMAN, S.A., LAMBOURN, D., JEFFRIES, S., ALT, D.P., AND GULLAND, F. 2009. Geographical dissemination of *Leptospira interrogans* serovar Pomona during seasonal migration of California sea lions. *Vet. Microbiol.* 137: 105-110.

ANNEXES

ANNEXE I

Arrêté du 30 septembre 1988.

Arrêté fixant la liste des animaux susceptibles d'être classés nuisibles.

J.O du 22/12/1988.

Article premier

La liste des animaux susceptibles d'être classés nuisibles par le préfet est fixée comme suit :

MAMMIFERES

Belette (*Mustela nivalis*)
Chien viverrin (*Nyctereutes procyonoides*)
Fouine (*Martes martes*)
Lapin de garenne (*Orytolagus cuniculus*)
Martre (*Martes martes*)
Putois (*Mustela putorius*)
Ragondin (*Myocastor corypus*)
Rat musqué (*Ondatra zibethica*)
Renard (*Vulpes vulpes*)
Sanglier (*Sus scrofa*)
Vison d'Amérique (*Mustela vison*)

OISEAUX

Corbeaux freux (*Corvus frugilegus*)
Corneille noire (*Corvus corone corone*)
Etourneau sansonnet (*Sturgus vulgaris*)
Geai des chênes (*Garrulus glandarius*)
Pie bavarde (*Pica pica*)
Pigeon ramier (*Colomba polumbus*)

*En vigueur, version du 6 novembre 2002
JO du ?/2002*

ANNEXE II

25 avril 2012

JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

Texte 6 sur 142

Décrets, arrêtés, circulaires

TEXTES GÉNÉRAUX

MINISTÈRE DE L'ÉCOLOGIE, DU DÉVELOPPEMENT DURABLE, DES TRANSPORTS ET DU LOGEMENT

Arrêté du 3 avril 2012 pris pour l'application de l'article R. 427-6 du code de l'environnement et fixant la liste, les périodes et les modalités de destruction des animaux d'espèces classées nuisibles sur l'ensemble du territoire métropolitain du 1^{er} juillet 2012 au 30 juin 2013

NOR : DEVL1107115A

Le ministre de l'écologie, du développement durable, des transports et du logement,
Vu le code de l'environnement, et notamment les articles L. 425-2, R. 427-6, R. 427-8, R. 427-13 à R. 427-18 et R. 427-25 ;
Vu la mise en ligne du projet d'arrêté effectuée le 5 mars 2012 ;
Vu l'avis du Conseil national de la chasse et de la faune sauvage en date du 17 mars 2011,

Arrête :

Art. 1^{er}. – La liste des espèces classées nuisibles sur l'ensemble du territoire métropolitain, les périodes et les modalités de destruction des animaux sont fixées comme suit :

1° Le chien viverrin (*Nyctereutes procyonoides*), le vison d'Amérique (*Mustela vison*) et le raton laveur (*Procyon lotor*) peuvent être piégés toute l'année et en tout lieu. Ils peuvent être détruits à tir sur autorisation individuelle délivrée par le préfet entre la date de clôture générale et la date d'ouverture générale de la chasse ;

2° Le ragondin (*Myocastor coypus*) et le rat musqué (*Ondatra zibethicus*) peuvent, toute l'année, être :
– piégés en tout lieu ;
– détruits à tir ;
– déterrés, avec ou sans chien ;

3° La bernache du Canada (*Branta canadensis*) peut être détruite à tir entre la date de clôture spécifique de la chasse de cette espèce et le 31 mars au plus tard sur autorisation individuelle délivrée par le préfet.

Le tir s'effectue à poste fixe matérialisé de main d'homme.

Le tir dans les nids est interdit.

Le piégeage de la bernache du Canada est interdit sans préjudice de l'application de l'article L. 427-1 du code de l'environnement.

Art. 2. – La protection du vison d'Europe (*Mustela lutreola*) relève d'une politique spécifique visant la restauration de l'espèce dans les onze départements suivants :

Charente, Charente-Maritime, Dordogne, Gers, Gironde, Landes, Lot-et-Garonne, Pyrénées-Atlantiques, Hautes-Pyrénées, Deux-Sèvres et Vendée.

Dans ces onze départements :

– les cages-pièges de catégorie 1 doivent être munies d'un dispositif permettant aux femelles de vison d'Europe de s'échapper d'avril à juillet inclus, durant la période de gestation et d'allaitement. Ce dispositif consistera en une ouverture de cinq centimètres par cinq centimètres qui pourra être obturé les autres mois de l'année ;
– la destruction à tir du vison d'Amérique et du putois est interdite.

Dans ces onze départements ainsi que dans les secteurs où la présence de la loutre ou du castor d'Eurasie est avérée :

– l'usage des pièges de catégorie 2 est strictement interdit sur les abords des cours d'eaux et bras morts, marais, canaux, plans d'eaux et étangs, jusqu'à la distance de 250 mètres de la rive.

Art. 3. – En cas de capture accidentelle d'animaux n'appartenant pas à une espèce classée nuisible, ces animaux sont immédiatement relâchés.

Art. 4. – La directrice de l'eau et de la biodiversité est chargée de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait le 3 avril 2012.

Pour le ministre et par délégation :

*La directrice de l'eau
et de la biodiversité,*

O. GAUTHIER

ANNEXE III



PREFECTURE DE L'AIN

Direction Départementale de l'Agriculture
et de la Forêt de l'AIN

**ARRETE FIXANT LA LISTE DES ANIMAUX CLASSES NUISIBLES
EN APPLICATION DE L'ARTICLE L 427-8 DU CODE DE L'ENVIRONNEMENT
POUR LA PERIODE DU 1^{er} juillet 2007 au 30 juin 2008 DANS LE DEPARTEMENT DE L'AIN**

**Le préfet de l'AIN,
Chevalier de la légion d'honneur,**

VU le livre IV, titre II, du Code de l'environnement notamment ses articles L 427-8, L 427-9 et R 427-6 à R 427-27 ;

VU le décret n°2006-1503 du 29 novembre 2006 relatif à la destruction des animaux nuisibles et à l'usage des appeaux pour le grand gibier et modifiant le code de l'environnement ;

VU l'arrêté ministériel du 30 septembre 1988 modifié fixant la liste des animaux susceptibles d'être classés nuisibles ;

VU l'avis de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage du 31 octobre 2006 et du 21 juin 2007 ;

VU l'avis de la fédération départementale des chasseurs ;

VU le rapport du directeur départemental de l'agriculture et de la forêt ;

CONSIDERANT que les espèces visées ci-après sont répandues de manière significative dans le département ;

CONSIDERANT que ces espèces portent atteinte ou sont susceptibles de porter atteinte aux intérêts visés à l'article R 427-7 du code de l'environnement ;

CONSIDERANT qu'il ressort des débats et des éléments produits lors des réunions de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage précitées que les dégâts portés aux élevages avicoles industriels et domestiques de plein air, aux élevages cynicoles et d'espèces gibier, imputables notamment aux espèces martre, putois et belette, constituent une atteinte avérée à l'économie de ces établissements ;

CONSIDERANT que le prélèvement limité des espèces précitées dans une zone précisément définie ne sera pas de nature à porter atteinte à la préservation desdites espèces dans le département de l'AIN ;

SUR proposition du secrétaire général de la préfecture ;

ARRETE

ARTICLE 1 :

Dans l'intérêt de la santé et de la sécurité publiques, pour prévenir les dommages importants aux activités agricoles, forestières et aquacoles, et pour la protection de la flore et de la faune, les animaux des espèces suivantes sont classés nuisibles pour la période du 1^{er} juillet 2007 au 30 juin 2008 sur l'ensemble du département.

.../...

ESPECES Nom scientifique	LIEUX où l'ESPECE est classée nuisible	MOTIVATIONS
MARTRE <i>Martes martes</i>	Secteur de 200 mètres autour des exploitations et des bâtiments d'élevage avicoles et cynicoles, des aménagements cynégétiques clos et des parcs de pré-lâcher.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles.
PUTOIS <i>Putorius putorius</i>	Secteur de 50 mètres autour des exploitations et des bâtiments d'élevage avicoles et cynicoles, des aménagements cynégétiques clos et des parcs de pré-lâcher.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles.
BELETTE <i>Mustela nivalis</i>	Secteur de 50 mètres autour des exploitations et des bâtiments d'élevage avicoles et cynicoles, des aménagements cynégétiques clos et des parcs de pré-lâcher.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles.
FOUINE <i>Martes foina</i>	Ensemble du département.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles. Protection de la faune sauvage. Salubrité et tranquillité publiques.
RAGONDIN <i>Myocastor coypus</i>		Dégâts aux cultures, à l'aquaculture, à la flore. Protection des berges et digues de cours d'eau, canaux et plans d'eau et des autres ouvrages hydrauliques. Santé publique, propagation de la maladie « la leptospirose ».
RAT MUSQUE <i>Ondatra zibethica</i>		Dégâts aux cultures, à l'aquaculture, à la flore. Protection des berges et digues de cours d'eau, canaux et plans d'eau et des autres ouvrages hydrauliques. Santé publique, propagation de la maladie « la leptospirose ».
RENARD <i>Vulpes vulpes</i>		Dégâts aux élevages avicoles. Intérêt de la santé publique, propagation de la maladie « l'échinococcose ».
SANGLIER <i>Sus scrofa</i>		Dégâts aux cultures. Protection de la faune. Intérêt de la sécurité routière.
CORBEAU FREUX <i>Corvus frugilegus</i>		Dégâts aux semis de céréales, oléagineux et protéagineux. Salubrité et tranquillité publiques.
CORNEILLE NOIRE <i>Corvus corone corone</i>		Dégâts aux élevages. Dégâts aux semis de céréales, oléagineux et protéagineux. Protection de la faune. Salubrité et tranquillité publiques.
PIE BAVARDE <i>Pica pica</i>		Dégâts aux activités agricoles : élevages de volailles, cultures, bûches de silo. Protection de la faune. Salubrité et tranquillité publiques.
ETOURNEAU SANSONNET <i>Sturnus vulgaris</i>		Dégâts aux vergers, aux vignes, aux silos ou ensilage à grains. Salubrité et tranquillité publiques.

.../...

ARTICLE 2 :

Les dispositions du présent arrêté se substitueront dès sa publication à celles de l'arrêté préfectoral du 27 novembre 2006 fixant la liste des animaux nuisibles pour l'année 2007.

ARTICLE 3 :

Cette décision peut être contestée dans les deux mois qui suivent sa notification :

- Par recours gracieux auprès de l'auteur de la décision ou hiérarchique auprès du ministre. L'absence de réponse dans un délai de deux mois fait naître une décision implicite de rejet qui peut être elle-même déférée au tribunal administratif dans les deux mois suivants.
- Par recours contentieux devant le tribunal administratif.

ARTICLE 4 :

Monsieur le secrétaire général de la préfecture, le directeur départemental de l'agriculture et de la forêt, le lieutenant-colonel commandant le groupement de gendarmerie de l'AIN, les gardes de l'office national de chasse et de la faune sauvage, les lieutenants de louveterie, sont chargés chacun en ce qui les concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au recueil des actes administratifs et affiché dans toutes les communes par les soins des maires ; une copie sera également adressée au président de la fédération des chasseurs de l'AIN et aux sous-préfets de BELLEY, GEX et NANTUA.

Fait à BOURG EN BRESSE, le 17 juillet 2007

Le préfet,

Pierre SOUBELET



PREFECTURE DE L'AIN

Direction Départementale de l'Agriculture
et de la Forêt de l'AIN

**ARRETE FIXANT LA LISTE DES ANIMAUX CLASSES NUISIBLES
EN APPLICATION DE L'ARTICLE L 427-8 DU CODE DE L'ENVIRONNEMENT
POUR LA PERIODE DU 1^{er} juillet 2008 au 30 juin 2009 DANS LE DEPARTEMENT DE L'AIN**

**Le préfet de l'AIN,
Chevalier de la légion d'honneur,**

VU le livre IV, titre II, du Code de l'environnement notamment ses articles L 427-8, L 427-9 et R 427-6 à R 427-27 ;

VU l'arrêté ministériel du 30 septembre 1988 modifié fixant la liste des animaux susceptibles d'être classés nuisibles ;

VU l'avis de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage du 23 juin 2008

VU l'avis de la fédération départementale des chasseurs ;

VU le rapport du directeur départemental de l'agriculture et de la forêt ;

CONSIDERANT que les espèces visées ci-après sont répandues de manière significative dans le département ;

CONSIDERANT que ces espèces portent atteinte ou sont susceptibles de porter atteinte aux intérêts visés à l'article R 427-7 du code de l'environnement ;

CONSIDERANT qu'il ressort des débats et des éléments produits lors des réunions de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage précitées que les dégâts portés aux élevages avicoles industriels et domestiques de plein air, aux élevages cynicoles et d'espèces gibier, imputables notamment aux espèces martre, putois et belette, constituent une atteinte avérée à l'économie de ces établissements ;

CONSIDERANT que le prélèvement limité des espèces précitées dans une zone précisément définie ne sera pas de nature à porter atteinte à la préservation desdites espèces dans le département de l'AIN ;

SUR proposition du secrétaire général de la préfecture ;

ARRETE

ARTICLE 1 :

Dans l'intérêt de la santé et de la sécurité publiques, pour prévenir les dommages importants aux activités agricoles, forestières et aquacoles, et pour la protection de la flore et de la faune, les animaux des espèces suivantes sont classés nuisibles pour la période du 1^{er} juillet 2008 au 30 juin 2009 sur l'ensemble du département.

ESPECES Nom scientifique	LIEUX ou L'ESPECE est la plus nuisible	MOTIVATIONS
MARTRE <i>Martes martes</i>	Secteur de 200 mètres autour des exploitations et des bâtiments d'élevage avicoles et cynicoles, des aménagements cynégétiques clos et des parcs de pré-lâcher.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles.
PUTOIS <i>Putorius putorius</i>	Secteur de 50 mètres autour des exploitations et des bâtiments d'élevage avicoles et cynicoles, des aménagements cynégétiques clos et des parcs de pré-lâcher.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles.
BELETTE <i>Mustela nivalis</i>	Secteur de 50 mètres autour des exploitations et des bâtiments d'élevage avicoles et cynicoles, des aménagements cynégétiques clos et des parcs de pré-lâcher.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles.
FOUINE <i>Martes foina</i>	Ensemble du département.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles. Protection de la faune sauvage. Salubrité et tranquillité publiques.
RAGONDIN <i>Myocastor coypus</i>		Dégâts aux cultures, à l'aquaculture, à la flore. Protection des berges et digues de cours d'eau, canaux et plans d'eau et des autres ouvrages hydrauliques. Santé publique, propagation possible de la maladie « la leptospirose ».
RAT MUSQUE <i>Ondatra zibethica</i>		Dégâts aux cultures, à l'aquaculture, à la flore. Protection des berges et digues de cours d'eau, canaux et plans d'eau et des autres ouvrages hydrauliques. Santé publique, propagation possible de la maladie « la leptospirose ».
RENARD <i>Vulpes vulpes</i>		Dégâts aux élevages avicoles. Intérêt de la santé publique, propagation de la maladie « l'échinococcose ».
SANGLIER <i>Sus scrofa</i>		Dégâts aux cultures. Protection de la faune. Intérêt de la sécurité routière.
CORBEAU FREUX <i>Corvus frugilegus</i>		Dégâts aux semis de céréales, oléagineux et protéagineux. Salubrité et tranquillité publiques.
CORNEILLE NOIRE <i>Corvus corone corone</i>		Dégâts aux élevages. Dégâts aux semis de céréales, oléagineux et protéagineux. Protection de la faune. Salubrité et tranquillité publiques.
PIE BAVARDE <i>Pica pica</i>		Dégâts aux activités agricoles : élevages de volailles, cultures, bûches de silo. Protection de la faune. Salubrité et tranquillité publiques.
ETOURNEAU SANSONNET <i>Sturnus vulgaris</i>		Dégâts aux vergers, aux vignes, aux sîces ou ensilage à grains. Salubrité et tranquillité publiques.

.../...

ARTICLE 2 :

Cette décision peut être contestée dans les deux mois qui suivent sa notification :

- Par recours gracieux auprès de l'auteur de la décision ou hiérarchique auprès du ministre.
L'absence de réponse dans un délai de deux mois fait naître une décision implicite de rejet qui peut être elle-même déférée au tribunal administratif dans les deux mois suivants.
- Par recours contentieux devant le tribunal administratif.

ARTICLE 3 :

Monsieur le secrétaire général de la préfecture, le directeur départemental de l'agriculture et de la forêt, le lieutenant-colonel commandant le groupement de gendarmerie de l'AIN, les gardes de l'office national de chasse et de la faune sauvage, les lieutenants de louveterie, sont chargés chacun en ce qui les concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au recueil des actes administratifs et affiché dans toutes les communes par les soins des maires ; une copie sera également adressée au président de la fédération des chasseurs de l'AIN et aux sous-préfets de BELLEY, GEX et NANTUA.

Fait à BOURG EN BRESSE, le 30 JUIN 2006

Le préfet
Pour le Préfet
Le Secrétaire Général

Pierre-Kéni VRAY





PREFECTURE DE L'AIN

REQU 13 OCT. 2009

Direction Départementale de l'Agriculture
et de la Forêt de l'AIN

**ARRETE FIXANT LA LISTE DES ANIMAUX CLASSES NUISIBLES
EN APPLICATION DE L'ARTICLE L 427-8 DU CODE DE L'ENVIRONNEMENT
POUR LA PERIODE DU 1^{er} juillet 2009 au 30 juin 2010 DANS LE DEPARTEMENT DE L'AIN**

**Le préfet de l'AIN,
Chevalier de la légion d'honneur,**

VU le livre IV, titre II, du Code de l'environnement notamment ses articles L 427-8, L 427-9 et R 427-6 à R 427-27 ;

VU l'arrêté ministériel du 30 septembre 1988 modifié fixant la liste des animaux susceptibles d'être classés nuisibles ;

VU l'avis de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage du 18 juin 2009

VU l'avis de la fédération départementale des chasseurs ;

VU le rapport du directeur départemental de l'agriculture et de la forêt ;

CONSIDERANT que les espèces visées ci-après sont répandues de manière significative dans le département ;

CONSIDERANT que ces espèces portent atteinte ou sont susceptibles de porter atteinte aux intérêts visés à l'article R 427-7 du code de l'environnement ;

CONSIDERANT qu'il ressort des débats et des éléments produits lors des réunions de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage précitées que les dégâts portés aux élevages avicoles industriels et domestiques de plein air, aux élevages cynicoles et d'espèces gibier, imputables notamment aux espèces martre, putois et belette, constituent une atteinte avérée à l'économie de ces établissements ;

CONSIDERANT que le prélèvement limité des espèces précitées dans une zone précisément définie ne sera pas de nature à porter atteinte à la préservation desdites espèces dans le département de l'AIN ;

SUR proposition du secrétaire général de la préfecture ;

ARRETE

ARTICLE 1 :

Dans l'intérêt de la santé et de la sécurité publiques, pour prévenir les dommages importants aux activités agricoles, forestières et aquacoles, et pour la protection de la flore et de la faune, les animaux des espèces suivantes sont classés nuisibles pour la période du 1^{er} juillet 2009 au 30 juin 2010 sur l'ensemble du département.

.../...

ESPECES Nom scientifique	LEUX où l'ESPECE est classée nuisible	MOTIVATIONS
MARTRE <i>Martes martes</i>	Secteur de 50 mètres autour des exploitations et des bâtiments d'élevage avicoles et cynicoles, des aménagements cynégétiques clos et des parcs de pré-lâcher.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles.
PUTOIS <i>Putorius putorius</i>	Secteur de 50 mètres autour des exploitations et des bâtiments d'élevage avicoles et cynicoles, des aménagements cynégétiques clos et des parcs de pré-lâcher.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles
BELETTE <i>Mustela nivalis</i>	Secteur de 50 mètres autour des exploitations et des bâtiments d'élevage avicoles et cynicoles, des aménagements cynégétiques clos et des parcs de pré-lâcher.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles.
FOUINE <i>Martes foina</i>	Ensemble du département.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles. Protection de la faune sauvage. Salubrité et tranquillité publiques.
RAGONDIN <i>Myocastor coypus</i>		Dégâts aux cultures, à l'aquaculture, à la flore. Protection des berges et digues de cours d'eau, canaux et plans d'eau et des autres ouvrages hydrauliques. Santé publique, propagation possible de la maladie « la leptospirose ».
RAT MUSQUE <i>Ondatra zibethica</i>		Dégâts aux cultures, à l'aquaculture, à la flore. Protection des berges et digues de cours d'eau, canaux et plans d'eau et des autres ouvrages hydrauliques. Santé publique, propagation possible de la maladie « la leptospirose ».
RENARD <i>Vulpes vulpes</i>		Dégâts aux élevages avicoles. Intérêt de la santé publique, propagation de la maladie « l'échinococcose ».
SANGLIER <i>Sus scrofa</i>		Dégâts aux cultures. Protection de la faune. Intérêt de la sécurité routière.
CORBEAU FREUX <i>Corvus frugilegus</i>		Dégâts aux semis de céréales, oléagineux et protéagineux. Salubrité et tranquillité publiques.
CORNEILLE NOIRE <i>Corvus corone corone</i>		Dégâts aux élevages. Dégâts aux semis de céréales, oléagineux et protéagineux. Protection de la faune. Salubrité et tranquillité publiques.
PIE BAVARDE <i>Pica pica</i>		Dégâts aux activités agricoles : élevages de volailles, cultures, bûches de silo Protection de la faune. Salubrité et tranquillité publiques.
ETOURNEAU SANSONNET <i>Sturnus vulgaris</i>		Dégâts aux vergers, aux vignes, aux silos ou ensilage à grains. Salubrité et tranquillité publiques.

.../...

ARTICLE 2 :

Cette décision peut être contestée dans les deux mois qui suivent sa notification :

- Par recours gracieux auprès de l'auteur de la décision ou hiérarchique auprès du ministre.
L'absence de réponse dans un délai de deux mois fait naître une décision implicite de rejet qui peut être elle-même déférée au tribunal administratif dans les deux mois suivants.
- Par recours contentieux devant le tribunal administratif.

ARTICLE 3 :

Monsieur le secrétaire général de la préfecture, le directeur départemental de l'agriculture et de la forêt, le lieutenant-colonel commandant le groupement de gendarmerie de l'AIN, les gardes de l'office national de chasse et de la faune sauvage, les lieutenants de louveterie, sont chargés chacun en ce qui les concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au recueil des actes administratifs et affiché dans toutes les communes par les soins des maires ; une copie sera également adressée au président de la fédération des chasseurs de l'AIN et aux sous-préfets de BELLEY, GEX et NANTUA.

Fait à BOURG EN BRESSE, le 25 JUIN 2009

Le préfet,



Régis GUYOT



REÇU 19 JUIL. 2010

PRÉFET DE L'AIN

Direction départementale des territoires

Service Protection et Gestion de l'Environnement

Unité Faune Sauvage Pêche et Chasse

ARRETÉ

fixant la liste des animaux classés nuisibles
en application de l'article L.427-8 du code de l'environnement
pour la période du 1er juillet 2010 au 30 juin 2011
dans le département de l'Ain

Le préfet de l'Ain
Chevalier de la légion d'honneur

Vu le livre IV, titre II, du code de l'environnement notamment ses articles L.427-8, L.427-9 et R.427-6 à R.427-27 ;

Vu l'arrêté ministériel du 30 septembre 1988 modifié fixant la liste des animaux susceptibles d'être classés nuisibles ;

Vu l'avis de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage du 22 juin 2010 ;

Vu l'avis de la fédération départementale des chasseurs ;

Vu le rapport du directeur départemental des territoires ;

Considérant que les espèces visées ci-après sont répandues de manière significative dans le département ;

Considérant que ces espèces portent atteinte ou sont susceptibles de porter atteinte aux intérêts visés à l'article R.427-7 du code de l'environnement ;

Considérant qu'il ressort des débats et des éléments produits lors des réunions de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage précitées, que les dégâts portés aux élevages avicoles industriels et domestiques de plein air, aux élevages cynicoles et d'espèces gibier, imputables notamment aux espèces martre, putois et belette, constituent une atteinte avérée à l'économie de ces établissements ;

Considérant que le prélèvement limité des espèces précitées dans une zone précisément définie ne sera pas de nature à porter atteinte à la préservation des dites espèces dans le département de l'Ain ;

Considérant qu'il n'existe aucune autre solution alternative au classement de ces espèces parmi la liste départementale des animaux nuisibles ;

Sur proposition du secrétaire général de la préfecture ;

ARRETE

Article 1

Dans l'intérêt de la santé et de la sécurité publiques, pour prévenir les dommages importants aux activités agricoles, forestières et aquicoles et pour la protection de la flore et de la faune, les animaux des espèces suivantes sont classés nuisibles pour la période du 1er juillet 2010 au 30 juin 2011 sur l'ensemble du département.

...

1/3

ESPECES Nom scientifique	L'EFUX ou l'ESPECE est classée nuisible	MOTIVATIONS
MARTRE <i>Martes martes</i>	Secteur de 50 mètres autour des exploitations et des bâtiments d'élevage avicoles et cynicoles, des aménagements cynégétiques clos et des parcs de pré-lâcher.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles.
PUTOIS <i>Putorius putorius</i>	Secteur de 50 mètres autour des exploitations et des bâtiments d'élevage avicoles et cynicoles, des aménagements cynégétiques clos et des parcs de pré-lâcher.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles
BELETTE <i>Mustela nivalis</i>	Secteur de 50 mètres autour des exploitations et des bâtiments d'élevage avicoles et cynicoles, des aménagements cynégétiques clos et des parcs de pré-lâcher.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles.
FOUINE <i>Martes foina</i>	Ensemble du département.	Prévention des dommages aux activités agricoles : dégâts aux élevages avicoles et cynicoles. Protection de la faune sauvage. Salubrité et tranquillité publiques.
RAGONDIN <i>Myocastor coypus</i>		Dégâts aux cultures, à l'aquaculture, à la flore. Protection des berges et digues de cours d'eau, canaux et plans d'eau et des autres ouvrages hydrauliques. Santé publique, propagation possible de la maladie « la leptospirose ».
RAT MUSQUE <i>Ondatra zibethica</i>		Dégâts aux cultures, à l'aquaculture, à la flore. Protection des berges et digues de cours d'eau, canaux et plans d'eau et des autres ouvrages hydrauliques. Santé publique, propagation possible de la maladie « la leptospirose ».
RENARD <i>Vulpes vulpes</i>		Dégâts aux élevages avicoles. Intérêt de la santé publique, propagation de la maladie « l'échinococcose ».
SANGLIER <i>Sus scrofa</i>		Dégâts aux cultures. Protection de la faune. Intérêt de la sécurité routière.
CORBEAU FREUX <i>Corvus frugilegus</i>		Dégâts aux semis de céréales, oléagineux et protéagineux. Salubrité et tranquillité publiques.
CORNEILLE NOIRE <i>Corvus corone corone</i>		Dégâts aux élevages. Dégâts aux semis de céréales, oléagineux et protéagineux. Protection de la faune. Salubrité et tranquillité publiques.
PIE BAVARDE <i>Pica pica</i>		Dégâts aux activités agricoles : élevages de volailles, cultures, bûches de silo Protection de la faune. Salubrité et tranquillité publiques.
ETOURNEAU SANSONNET <i>Sturnus vulgaris</i>		Dégâts aux vergers, aux vignes, aux silos ou ensilage à grains. Salubrité et tranquillité publiques.

.../...

Article 2

Cet arrêté peut être contesté dans les deux mois qui suivent sa notification :

- Par recours gracieux auprès de l'auteur de la décision ou hiérarchique auprès du ministre.

L'absence de réponse dans un délai de deux mois fait naître une décision implicite de rejet qui peut être elle-même déférée au tribunal administratif dans les deux mois suivants.

- Par recours contentieux devant le tribunal administratif.

Article 3

Le secrétaire général de la préfecture de l'Ain, le directeur départemental des territoires, les maires, le directeur départemental des services fiscaux, le commandant du groupement de gendarmerie de l'Ain, les lieutenants de louveterie, les agents assermentés de l'office national des forêts, les agents de l'office national de la chasse et de la faune sauvage, sont chargés chacun en ce qui le concerne de l'exécution du présent arrêté qui sera publié au recueil des actes administratifs et affiché par les soins des maires dans chaque commune.

Fait à Bourg en Bresse, le 30 JUIN 2010

Le préfet,



Régis GUYOT

ANNEXE IV



Direction départementale de
l'agriculture et de la forêt



PREFECTURE DU DOUBS

LE PREFET DE LA REGION DE FRANCHE-COMTE
PREFET DU DOUBS

N° 2008-

ARRETE FIXANT LA LISTE DES ANIMAUX CLASSÉS NUISIBLES POUR LA PERIODE ALLANT DU 1^{er} JUILLET 2008 AU 30 JUIN 2009 DANS LE DEPARTEMENT DU DOUBS

Vu les articles L.427-8, L.427-10 et R.427-6 à R.427-29 du Code de l'Environnement ;
Vu le décret n° 2006-1503 du 29 novembre 2006 ;
Vu l'arrêté ministériel du 30 septembre 1988 modifié fixant la liste des animaux susceptibles d'être classés nuisibles ;
Vu le schéma départemental cynégétique approuvé le 29 septembre 2004 ;
Vu l'avis de la fédération départementale des chasseurs ;
Vu l'avis de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage du 7 mai 2008 ;
Sur proposition de M. le secrétaire général de la préfecture ;

ARRETE

ARTICLE 1. En application de l'article R. 427-7 du Code de l'Environnement, sont classés comme animaux nuisibles, pour la période allant du 1^{er} juillet 2008 au 30 juin 2009, dans le département du Doubs :

Espèces	Territoires de classement nuisible
<i>Mammifères</i>	
pour la protection de la faune, dans l'intérêt de la santé publique et la prévention des dommages aux activités agricoles	
FOUINE	Ensemble du département, uniquement dans un périmètre de 200 m autour des habitations, des loges, des ruchers, des élevages, des volières et des parcs de lâchers
RENARD	Ensemble du département, sauf sur les pays cynégétiques ou unités de gestion⁽¹⁾ suivants , comme figuré sur la carte annexe 1 : Vallée du Drugeon, Loue-Lison, Basse Vallée de la Loue, unité de gestion 2
pour la prévention des dommages aux activités agricoles et dans l'intérêt de la santé publique	
RAGONDIN	Ensemble du département
RAT MUSQUE	Ensemble du département
<i>Oiseaux</i>	
pour la prévention des dommages aux activités agricoles, la protection de la faune et dans l'intérêt de la santé publique	
CORBEAU FREUX	Ensemble du département
CORNEILLE NOIRE	Ensemble du département
ETOURNEAU SANSONNET	Ensemble du département

¹ La liste des communes du département du Doubs, classées par ordre alphabétique et réparties par pays et unité de gestion, figure en annexe 4 du schéma départemental de gestion cynégétique

ARTICLE 2. La présente décision pourra faire l'objet d'un recours contentieux devant le tribunal administratif de Besançon dans un délai de 2 mois à compter de sa publication.

ARTICLE 3. M. le secrétaire général de la préfecture et M. le directeur régional et départemental de l'agriculture et de la forêt sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté qui sera publié au recueil des actes administratifs et affiché dans toutes les communes par les soins des Maires.

A Besançon, le
Le Préfet,



Direction départementale
de l'Équipement et de l'agriculture

Préfecture du Doubs

LE PREFET DE LA REGION DE FRANCHE-COMTE
PREFET DU DOUBS

N° 2009-205 - 04674

**ARRETE FIXANT LA LISTE DES ANIMAUX CLASSÉS NUISIBLES POUR LA PERIODE ALLANT DU
1^{er} JUILLET 2009 AU 30 JUIN 2010 DANS LE DEPARTEMENT DU DOUBS**

Vu les articles L.427-8, L.427-10 et R.427-6 à R.427-29 du Code de l'Environnement ;
Vu l'arrêté ministériel du 30 septembre 1988 modifié fixant la liste des animaux susceptibles d'être classés nuisibles ;
Vu le schéma départemental cynégétique approuvé le 29 septembre 2004 ;
Vu l'avis de la fédération départementale des chasseurs ;
Vu l'avis de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage du 5 mai 2009 ;
Sur proposition de la directrice départementale de l'équipement et de l'agriculture du Doubs ;

ARRETE

ARTICLE 1. En application de l'article R. 427-7 du Code de l'Environnement, sont classés comme animaux nuisibles, pour la période allant du 1^{er} juillet 2009 au 30 juin 2010, dans le département du Doubs :

Espèces	Territoires de classement nuisible
<i>Mammifères</i>	
pour la protection de la faune, dans l'intérêt de la santé publique et la prévention des dommages aux activités agricoles	
FOUINE	Ensemble du département, uniquement dans un périmètre de 200 m autour des habitations, des loges, des ruchers, des élevages, des volières et des parcs de lâchers
RENARD	Ensemble du département
pour la prévention des dommages aux activités agricoles et dans l'intérêt de la santé publique	
RAGONDIN	Ensemble du département
RAT MUSQUE	Ensemble du département
<i>Oiseaux</i>	
pour la prévention des dommages aux activités agricoles, la protection de la faune et dans l'intérêt de la santé publique	
CORBEAU FREUX	Ensemble du département
CORNEILLE NOIRE	Ensemble du département
ETOURNEAU SANSONNET	Ensemble du département

ARTICLE 2. La présente décision pourra faire l'objet d'un recours contentieux devant le tribunal administratif de Besançon dans un délai de 2 mois à compter de sa publication.

ARTICLE 3. M. le secrétaire général de la préfecture et Mme la directrice départementale de l'équipement et de l'agriculture du Doubs sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté qui sera publié au recueil des actes administratifs et affiché dans toutes les communes par les soins des Maires.

A Besançon, le
Le Préfet,

20 MAI 2009

Pour le Préfet
Le Secrétaire Général

Pierre CLAVREUIL



Direction départementale
de l'Équipement et de l'agriculture

Préfecture du Doubs

LE PREFET DE LA REGION DE FRANCHE-COMTE
PREFET DU DOUBS

N° 2009- 2005 - 01675

**ARRETE RELATIF AUX MODALITES DE DESTRUCTION A TIR DES ANIMAUX CLASSES NUISIBLES
POUR LA PERIODE ALLANT DU 1^{er} JUILLET 2009 AU 30 JUIN 2010 DANS LE DEPARTEMENT DU
DOUBS**

Vu le Code de l'Environnement et notamment les articles L.427-8, L.427-10 et R.427-6 à R.427-29 ;
Vu l'arrêté préfectoral n° fixant la liste des animaux classés nuisibles pour la période
allant du 1^{er} juillet 2009 au 30 juin 2010 dans le département du Doubs ;
Vu l'avis favorable de la fédération départementale des chasseurs ;
Vu l'avis de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage en date du 5 mai 2009 ;
Sur proposition de la directrice départementale de l'équipement et de l'agriculture du Doubs ;

ARRETE

ARTICLE 1. La destruction à tir des animaux classés nuisibles peut s'effectuer, de jour, dans les conditions
suivantes :

ESPECES	PERIODE AUTORISEE	LIEUX	FORMALITES	MOTIVATIONS	CONDITIONS SPECIFIQUES
CORBEAU FREUX (Corvus frugilegus) CORNEILLE NOIRE (Corvus corone)	du 1 ^{er} mars au 10 juin	Dans les agglomérations et dans les semis de maïs et de céréales	Autorisation préfectorale individuelle dans les conditions prévues à l'article 2	Importance des dégâts causés par ces espèces	Ces espèces ne peuvent être tirées qu'à poste fixe. Le corbeau freux peut également être tiré dans l'enceinte de la corbeautière. Le tir dans les nids est interdit.
ETOURNEAU SANSONNET (Sturnus vulgaris)	du 1 ^{er} mars au 31 mars du 1 ^{er} avril à l'ouverture générale de la chasse	Ensemble du département Dans les agglomérations			
RAGONDIN (Myocastor corypus) RAT MUSQUE (Ondatra zibethica)	du 1 ^{er} mars au 31 mars du 1 ^{er} avril à l'ouverture générale de la chasse	Ensemble du département au bord des plans d'eau, rivières, canaux, réservoirs, lacs et étangs	Autorisation préfectorale individuelle dans les conditions prévues à l'article 2.	Protection des productions agricoles, des berges et des ouvrages hydrauliques	Tir à l'arc uniquement

Toutefois les agents de l'Etat et de ses établissements publics, assermentés au titre de la police de la chasse, et les gardes-particuliers sont autorisés à détruire à tir les animaux nuisibles, toute l'année, de jour seulement, sous réserve de l'assentiment du détenteur du droit de destruction.

L...

- ARTICLE 2.** La demande d'autorisation de destruction est sollicitée par le détenteur du droit de destruction ou son délégué auprès de la Direction Départementale de l'Équipement et de l'Agriculture. Elle est formulée selon le modèle annexé au présent arrêté.
- ARTICLE 3.** L'autorisation sera délivrée sous forme d'arrêté après consultation par la DDEA, du lieutenant de louveterie concerné ou de la fédération départementale des chasseurs.
- ARTICLE 4.** Seuls les agents du service départemental de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage et les lieutenants de louveterie sont autorisés à employer des chiens pour la destruction des animaux nuisibles.
- ARTICLE 5.** L'emploi du grand duc artificiel est autorisé à l'exception de la période comprise entre le 1^{er} mars et le 30 juin 2010. Le tir ne pourra avoir lieu que de l'intérieur de huttes dont les emplacements, une fois fixés, ne pourront être modifiés.
- ARTICLE 6.** Les dispositions du présent arrêté entreront en vigueur le 1^{er} juillet 2009.
- ARTICLE 7.** La présente décision pourra faire l'objet d'un recours contentieux devant le tribunal administratif de Besançon dans un délai de 2 mois à compter de sa publication.
- ARTICLE 8.** M. le Secrétaire général de la Préfecture et Mme la directrice départementale de l'équipement et de l'agriculture du Doubs sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté qui sera publié au recueil des actes administratifs et affiché dans toutes les communes par les soins des maires.

A Besançon, le 20 MAI 2009
Le Préfet,

Pour le Préfet,
Le Secrétaire Général

Pierre CLAUDEUIL

ANNEXE V



DIRECTION
DEPARTEMENTALE
DE L'AGRICULTURE
ET DE LA FORET

Arrêté DDAF n° 2008-171

ARRETE FIXANT LA LISTE DES ANIMAUX CLASSES NUISIBLES POUR L'ANNEE 2008-2009 DANS LE DEPARTEMENT DU JURA

Le Préfet du Jura
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Ordre National du Mérite

VU le code de l'environnement et notamment les articles R. 427-5 à R. 427-26 ;
VU l'Arrêté ministériel du 30 septembre 1988 fixant la liste des animaux susceptibles d'être classés nuisibles modifié par les arrêtés ministériels du 21 mars 2002 et du 6 novembre 2002 ;
VU l'avis de la Fédération départementale des chasseurs du Jura en date du 5 juin 2008 ;
VU l'avis de la Commission départementale de la chasse et de la faune sauvage du 18 juin 2008 ;
CONSIDERANT que les mesures alternatives à la destruction des oiseaux étudiées lors de la Commission départementale de la chasse et de la faune sauvage ont été jugées insatisfaisantes ou inefficaces ;
CONSIDERANT que toutes les espèces retenues sont présentes de manière significative dans le Jura et que compte tenu des caractéristiques locales, elles sont susceptibles de porter atteinte aux intérêts protégés visés à l'article R. 427-7 du code de l'environnement pour l'un ou pour plusieurs des motifs listés ;
SUR PROPOSITION de Monsieur le Secrétaire général de la Préfecture du Jura ;

A R R E T E

ARTICLE 1^{er} – Dans l'intérêt de la santé et de la sécurité publiques, pour prévenir les dommages importants aux activités agricoles, forestières et aquacoles, aux élevages domestiques et pour la protection de la flore et de la faune, les animaux des espèces suivantes sont classés NUISIBLES sur l'ensemble du département du Jura (excepté le renard – Cf. article 2) pour la période du 1^{er} juillet 2008 au 30 juin 2009 :

MAMMIFERES :

ESPECES	PRECISIONS ET MOTIVATIONS
FOUINE (Martes foina)	Prévention des dommages aux activités agricoles et aux élevages domestiques Protection de la faune Uniquement dans un périmètre de 200 m autour des habitations et dépendances diverses, des élevages, des parcs de lâchers et des bâtiments agricoles
RAGONDIN (Myocastor coypus)	Prévention des dommages aux activités agricoles et aquacoles Dans l'intérêt de la sécurité et de la santé publiques
RAT MUSQUE (Ondatra zibethica)	Prévention des dommages aux activités agricoles et aquacoles Dans l'intérêt de la sécurité publique
RENARD (Vulpes vulpes) (C.f. Article 2)	Prévention des dommages aux activités agricoles et aux élevages domestiques Protection de la faune, dans l'intérêt de la santé publique
SANGLIER (Sus scrofa)	Prévention des dommages aux activités agricoles
RATON LAVEUR (Procyon lotor)	Protection de la faune
CHIEN VIVERRIN (Nyctereutes procyonoides)	Protection de la faune

OISEAUX :

ESPECES	PRECISIONS ET MOTIVATIONS
CORBEAU FREUX (Corvus frugilegus)	Prévention des dommages aux activités agricoles Dans l'intérêt de la santé et de la sécurité publiques
CORNEILLE NOIRE (Corvus corone corone)	Prévention des dommages aux activités agricoles Dans l'intérêt de la santé et de la sécurité publiques Protection de la faune
ETOURNEAU SANSONNET (Sturnus vulgaris)	Prévention des dommages aux activités agricoles Dans l'intérêt de la sécurité publique

ARTICLE 2 – Le renard (*Vulpes vulpes*) est classé nuisible pour l'année 2008-2009 sur l'ensemble du département du Jura excepté sur les communes suivantes : Arsure-Arsurette, Bief-des-Maisons, Les Chalesmes, Bief du Fourg, Billecul, Censeau, Cerniébaud, Charency, Communailles en Montagne, Conte, Cuvier, Doye, Esserval-Combe, Esserval-Tartre, Fraroz, Gillois, La Favière, La Latette, Les Nans, Longcochon, Mièges, Mignovillard, Molpré, Mournans Charbonny, Nozeroy, Onglières, Plénise, Plénisette et Rix-Trébief.

ARTICLE 3– Le Secrétaire Général de la Préfecture du Jura, le Directeur départemental de l'agriculture et de la forêt du Jura, le Colonel commandant le Groupement de gendarmerie du Jura, le Chef du service départemental de l'Office national de la chasse et de la faune sauvage, le Directeur de l'agence départementale de l'Office national des forêts ainsi que toutes autorités habilitées à constater les infractions à la police de la chasse sont chargés chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté dont ampliation sera affichée dans toutes les communes du Jura par les soins des maires et dont mention sera publiée au recueil des actes administratifs.

LONS-le-SAUNIER, le 27 juin 2008

Pour le Préfet et par délégation
Le secrétaire général,

Signé Francis BLLONDIEAU

Arrêté fixant la liste des animaux classés nuisibles pour la campagne 2009-2010

Direction
départementale
de l'équipement
et de l'agriculture
Jura

Arrêté DDEA n° 2009/369

La Préfète du Jura,
Chevalier de la Légion d'Honneur,
Officier de l'Ordre National du Mérite,

VU le code de l'environnement et notamment les articles L.427-8 et R. 427-5 à R. 427-26 ;
VU l'arrêté ministériel du 30 septembre 1988 modifié fixant la liste des animaux susceptibles d'être classés nuisibles ;
VU l'avis de la fédération départementale des chasseurs du Jura en date du 5 mai 2009 ;
VU l'avis de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage du 14 mai 2009 ;
CONSIDERANT que les mesures alternatives à la destruction des oiseaux étudiées en commission départementale de la chasse et de la faune sauvage ont été jugées insatisfaisantes ou inefficaces ;
CONSIDERANT que toutes les espèces retenues sont présentes de manière significative dans le Jura et que compte tenu des caractéristiques locales, elles sont susceptibles de porter atteinte aux intérêts protégés visés à l'article R. 427-7 du code de l'environnement pour l'un ou pour plusieurs des motifs listés ;
SUR PROPOSITION du secrétaire général de la Préfecture du Jura ;

A R R E T E

ARTICLE 1^{er} – Dans l'intérêt de la santé et de la sécurité publiques, pour prévenir les dommages importants aux activités agricoles, forestières et aquacoles, aux élevages domestiques et pour la protection de la flore et de la faune, les animaux des espèces suivantes sont classés NUISIBLES sur l'ensemble du département du Jura (excepté le renard – Cf. article 2) pour la période du 1^{er} juillet 2009 au 30 juin 2010 :

MAMMIFERES :

ESPECES	PRECISIONS ET MOTIVATIONS
FOUINE (Martes foina)	Prévention des dommages aux activités agricoles et aux élevages domestiques, Protection de la faune, Uniquement dans un périmètre de 500 m autour des habitations et dépendances diverses, des élevages, des parcs de lâchers et des bâtiments agricoles.
RAGONDIN (Myocastor coypus)	Prévention des dommages aux activités agricoles et aquacoles, Dans l'intérêt de la sécurité et de la santé publiques.
RAT MUSQUE (Ondatra zibethica)	Prévention des dommages aux activités agricoles et aquacoles Dans l'intérêt de la sécurité publique
RENARD (Vulpes vulpes) (C.f. Article 2)	Prévention des dommages aux activités agricoles et aux élevages domestiques, Protection de la faune, Dans l'intérêt de la santé publique.
SANGLIER (Sus scrofa)	Prévention des dommages aux activités agricoles.
RATON LAVEUR (Procyon lotor)	Protection de la faune.
CHIEN VIVERRIN (Nyctereutes procyonoides)	Protection de la faune.

OISEAUX :

ESPECES	PRECISIONS ET MOTIVATIONS
CORBEAU FREUX (Corvus frugilegus)	Prévention des dommages aux activités agricoles Dans l'intérêt de la santé et de la sécurité publiques
CORNEILLE NOIRE (Corvus corone corone)	Prévention des dommages aux activités agricoles Dans l'intérêt de la santé et de la sécurité publiques Protection de la faune
ETOURNEAU SANSONNET (Sturnus vulgaris)	Prévention des dommages aux activités agricoles Dans l'intérêt de la sécurité publique

ARTICLE 2 – Le renard (*Vulpes vulpes*) est classé nuisible pour l'année 2009-2010 sur l'ensemble du département du Jura excepté sur les communes suivantes : Arsure-Arsurette, Bief-des-Maisons, Les Chalesmes, Bief du Fourg, Billecul, Censeau, Cerniébaud, Charency, Communailles en Montagne, Conte, Cuvier, Doye, Esserval-Combe, Esserval-Tartre, Fraroz, Gillois, La Favière, La Latette, Les Nans, Longcochon, Mièges, Mignovillard, Molpré, Mournans Charbonny, Nozeroy, Onglières, Plénise, Plénisette et Rix-Trébief.

ARTICLE 3 – A titre expérimental, le périmètre d'intervention sur la fouine visé à l'article 1^{er} est étendu à 500 m pour la campagne 2009-2010, sous réserve qu'un bilan des opérations portant sur la période de juillet 2009 à mars 2010 soit transmis par l'association des piégeurs agréés du Jura (APAJ) au directeur départemental de l'équipement et de l'agriculture au plus tard le 20 avril 2010.

ARTICLE 4 – Le secrétaire général de la préfecture du Jura, le directeur départemental de l'équipement et de l'agriculture du Jura, le chef du service départemental de l'office national de la chasse et de la faune sauvage, le directeur de l'agence du Jura de l'office national des forêts ainsi que toutes autorités habilitées à constater les infractions à la police de la chasse sont chargés de l'exécution du présent arrêté dont mention sera publiée au recueil des actes administratifs et une copie sera affichée dans toutes les communes par les soins des maires.

Lons-le-Saunier, le 30 juin 2009

La préfète,

Signé Joëlle LE MOUËL

**Arrêté fixant les modalités de destruction à tir
des animaux classés nuisibles
pour la campagne 2009-2010**

Arrêté DDEA n° 2009/370

La Préfète du Jura,
Chevalier de la Légion d'Honneur,
Officier de l'Ordre National du Mérite,

VU la loi n° 2008-1545 du 31 décembre 2008 pour l'amélioration et la simplification du droit de la chasse ;
VU le code de l'environnement et notamment les articles L. 427-8 et L. 427-9 et R. 427-7, R. 427-8, R. 427-16 à R. 427-22 et R. 427-25 ;
VU l'arrêté ministériel du 30 septembre 1988 modifié fixant la liste des animaux susceptibles d'être classés nuisibles ;
VU l'arrêté ministériel du 4 novembre 2003 modifié relatif à l'usage des appeaux et des appelants pour la chasse des oiseaux de passage et du gibier d'eau et pour la destruction des animaux nuisibles ;
VU l'arrêté DDEA n° 2009-369 fixant la liste des animaux classés nuisibles pour la campagne 2009-2010 ;
SUR PROPOSITION du secrétaire général de la Préfecture du Jura ;

ARRETE

ARTICLE 1^{er} – La destruction à tir des animaux classés nuisibles en application de l'article L. 427-8 du code de l'environnement peut s'effectuer de jour pendant le temps, dans les lieux et selon les modalités figurant dans le tableau ci-après. Pour procéder à cette destruction, le permis de chasser validé est obligatoire.

MAMMIFERES :

ESPECES	PERIODE AUTORISEE	LIEUX	FORMALITES	MOTIVATIONS	CONDITIONS SPECIFIQUES
RENARD (Vulpes vulpes)	Du 1 ^{er} février 2010 au 31 mars 2010	Ensemble du département sauf sur les communes nommées à l'article 2 de l'arrêté DDEA N° 2009-369	Autorisation préfectorale individuelle dans les conditions prévues à l'article 2	Santé publique Dégâts à l'aviculture et aux petits élevages	
RAGONDIN (Myocastor coypus) RAT MUSQUE (Ondatra zibethica)	Du 1 ^{er} juillet 2009 au 12 septembre 2009 et du 1 ^{er} février 2010 au 30 juin 2010	Ensemble du département au bord des plans d'eau, rivières, canaux, réservoirs, lacs et étangs	Sans formalité	Protection des productions agricoles, des berges et des ouvrages d'art hydrauliques	

OISEAUX :

ESPECES	PERIODE AUTORISEE	LIEUX	FORMALITES	MOTIVATIONS	CONDITIONS SPECIFIQUES
CORBEAU FREUX (Corvus frugilegus) CORNEILLE NOIRE (Corvus corone corone)	Du 1 ^{er} février 2010 au 10 juin 2010	Dans les agglomérations et dans les semis de céréales et les cultures de printemps	Autorisation préfectorale individuelle dans les conditions prévues à l'article 2	Importance des dégâts	Ces espèces ne peuvent être tirées qu'à poste fixe matérialisé de la main de l'homme. Le corbeau freux peut également être tiré dans l'enceinte de la corbetière. Le tir dans les nids est interdit.
ETOURNEAU SANSONNET (Sturnus vulgaris)	Du 1 ^{er} février 2010 au 31 mars 2010	Ensemble du département	Déclaration au Préfet		Cette espèce ne peut être tirée qu'à poste fixe matérialisé de la main de l'homme. Le tir dans les nids est interdit.
	Du 1 ^{er} juillet 2009 à l'ouverture générale de la chasse et du 1 ^{er} avril 2010 au 30 juin 2010	Dans les agglomérations	Autorisation préfectorale individuelle dans les conditions prévues à l'article 2		Modalités à préciser sur l'autorisation préfectorale au cas par cas

ARTICLE 2 – La demande d'autorisation de destruction est souscrite par le détenteur du droit de destruction ou son délégué auprès de la direction départementale de l'équipement et de l'agriculture. Elle est formulée selon le modèle annexé au présent arrêté.

ARTICLE 3 – Les agents de l'Etat et de ses établissements publics assermentés au titre de la police de la chasse, les lieutenants de louveterie et les gardes particuliers sont autorisés à détruire à tir les animaux nuisibles à l'exclusion du sanglier, toute l'année, de jour seulement et sous réserve de l'assentiment du détenteur du droit de destruction. Cette disposition est valable sur l'ensemble du territoire excepté sur les terrains mis en réserve de chasse et de faune sauvage où la destruction des nuisibles ne peut être effectuée qu'après autorisation préfectorale à la demande du détenteur du droit de destruction ou de son délégué.

ARTICLE 4 – Le secrétaire général de la préfecture du Jura, le directeur départemental de l'équipement et de l'agriculture, le chef du service départemental de l'office national de la chasse et de la faune sauvage, le directeur de l'agence du Jura de l'office national des forêts ainsi que toutes autorités habilitées à constater les infractions à la police de la chasse sont chargés de l'exécution du présent arrêté dont mention sera publiée au recueil des actes administratifs et une copie sera affichée dans toutes les communes par les soins des maires.

Lons-le-Saunier, le 30 juin 2009

La préfète,

Signé Joëlle LE MOUËL

ANNEXE VI



PRÉFECTURE DE LA HAUTE-SAÔNE

DIRECTION DES LIBERTÉS PUBLIQUES
ET DES COLLECTIVITÉS LOCALES

BUREAU DES ÉLECTIONS
ET DE LA RÉGLEMENTATION

ARRETE PREF-D1-R-2008 N° 69

18 JUIN 2008

fixant la liste des animaux classés nuisibles dans le département de la Haute-Saône pour la période du 1er juillet 2008 au 30 juin 2009 et les conditions de leur destruction.

LE PREFET DE LA HAUTE-SAONE
Chevalier de la Légion d'honneur

- VU le Code de l'environnement notamment les articles L. 427-8 et R. 427-6 à R. 427-26,
- VU l'arrêté ministériel du 26 juin 1987 modifié fixant la liste des espèces de gibier dont la chasse est autorisée,
- VU l'arrêté ministériel du 30 septembre 1988 modifié fixant la liste des animaux susceptibles d'être classés nuisibles,
- VU l'arrêté ministériel du 4 novembre 2003 relatif à l'usage des appeaux et des appelants pour la chasse des oiseaux de passage et du gibier d'eau et pour la destruction des animaux nuisibles, modifié par l'arrêté du 18 décembre 2003,
- VU l'avis de la Fédération départementale des Chasseurs de la Haute-Saône en date du 27 mai 2008,
- VU l'avis de la Commission départementale de la chasse et de la faune sauvage en date du 27 mai 2008,

CONSIDERANT que les mesures alternatives à la destruction des oiseaux étudiées lors de la réunion de la Commission Départementale de la Chasse et de la Faune Sauvage ont été jugées à l'unanimité des membres présents insatisfaisantes ou inefficaces,

CONSIDERANT que le raton laveur, le vison d'Amérique et le chien viverrin sont des espèces invasives et que les autres espèces retenues sont soit présentes de manière significative en Haute-Saône et que, compte-tenu des caractéristiques locales, elles sont susceptibles de porter atteinte aux intérêts protégés visés à l'article R.427-7 du code de l'environnement, soit à l'origine d'atteintes significatives à ces intérêts protégés, pour l'un ou plusieurs des motifs listés,

SUR proposition du secrétaire général de la préfecture de la Haute-Saône,

ARRETE

Article 1^{er} : En application de l'article R. 427-7 du code de l'Environnement sont classés comme animaux nuisibles, pour la période du 1^{er} juillet 2008 au 30 juin 2009, dans le département de la Haute-Saône :

...

1, RUE DE LA PREFECTURE - B.P. 429 - 70013 VESOUL CEDEX - TEL. : 03 84 77 70 00
Mél. : prefecture@haute-saone.pref.gouv.fr

HORAIRE D'OUVERTURE AU PUBLIC : du lundi au vendredi
Guichets : de 9 h 00 à 11 h 30 et de 13 h 30 à 15 h 00 - Autres services : de 9 h 00 à 11 h 30 et de 14 h 00 à 16 h 30

ESPECES	TERRITOIRES DE CLASSEMENT NUISIBLE
Mammifères	
Dans l'intérêt de la santé publique et pour la prévention des dommages aux activités agricoles :	
Renard	ensemble du département
Raton laveur	ensemble du département
Dans l'intérêt de la santé et de la sécurité publiques :	
Ragondin	ensemble du département
Rat musqué	ensemble du département
Pour la protection de la faune et de la flore :	
Chien viverrin	ensemble du département
Vison d'Amérique	ensemble du département
Pour la prévention des dommages aux activités agricoles :	
Fouine	sur l'ensemble du département, seul le piégeage est autorisé.
Martre	sur les communes de Chassey-les-Montbozon, Dampierre-sur-Linotte, Dampierre-sur-Salon, Esprels, Filain, Frahier-et-Chatebier, Magny-les-Jussey, Neurey-les-la-Demie, seul le piégeage est autorisé.
Putois	sur la commune de Dampierre-sur-Linotte, seul le piégeage est autorisé.
Oiseaux	
Pour la prévention des dommages aux activités agricoles :	
Corbeau freux	ensemble du département
Cornelle noire	ensemble du département
Étourneau sansonnet	sur les communes de Avriigny-Virey, Bucey-les-Gy, Champlitte, Charcenne, Hugier, Motey-Besuche et Roche-et-Raucourt.
Pour la protection de la faune et de la flore :	
Pie bavarde	ensemble du département, seul le piégeage est autorisé et uniquement du 1^{er} avril 2009 au 31 mai 2009.

Article 2 : La destruction à tir par armes à feu ou à tir à l'arc, peut s'effectuer de jour seulement dans les conditions définies au tableau suivant

espèces concernées	types de formalités	date limite de la période autorisée	conditions spécifiques
Ragondin Rat musqué	déclaration à la DDAF ou sans formalité si arrêté de lutte collective	du 1 ^{er} juillet 2008 jusqu'à l'ouverture générale et du 1 ^{er} mars 2009 au 30 juin 2009	Peuvent également être déterrés avec ou sans chien, toute l'année
Renard	autorisation individuelle préfectorale	du 1 ^{er} au 31 mars 2009	Peut également être enfumé à l'aide de produits non toxiques ou déterrés avec ou sans chien, toute l'année

Raton laveur, vison d'Amérique et chien viverrin	autorisation individuelle préfecturale	du 1 ^{er} au 31 mars 2009	
Corbeau freux Cornelle noire	} sans formalité autorisation individuelle préfecturale	} du 1^{er} au 31 mars 2009 du 1^{er} avril 2009 au 10 juin 2009	} Ces espèces ne peuvent être tirées qu'à poste fixe Le corbeau freux peut aussi être tiré dans l'enceinte de la corbeautière Le tir dans les nids est interdit
Etourneau sansonnet	sans formalité autorisation individuelle préfecturale	du 1 ^{er} au 31 mars 2009 du 1 ^{er} juillet 2008 jusqu'à l'ouverture générale et du 1 ^{er} avril 2009 au 10 juin 2009	Cette espèce ne peut être tirée qu'à poste fixe

Article 3 : L'emploi du Grand Duc artificiel (forme en bois ou en plastique articulée ou non) pourra être autorisé par décision préfectorale individuelle pour les périodes comprises entre le 1^{er} juillet 2008 et l'ouverture générale de la chasse – saison 2008-2009 – et entre le 1^{er} mars 2009 et le 30 juin 2009 inclus. Le tir ne pourra avoir lieu que de l'intérieur de huttes dont les emplacements une fois fixés ne pourront être modifiés.

Article 4 : Pour les ragondins et les rats musqués, les déclarations à la Direction Départementale de l'Agriculture et de la Forêt se font à l'aide de l'imprimé joint en annexe.

Les modalités de délivrance des autorisations individuelles mentionnées à l'article 2 sont fixées comme suit :

Le propriétaire, possesseur ou fermier doit (au moins 15 jours avant le début de l'opération) établir une demande d'autorisation de destruction (modèle joint). La demande précisera les dates ou périodes choisies, le ou les lieux de l'opération (désignation cadastrale) de la destruction à tir, le ou les animaux nuisibles concernés et le motif de la destruction. Cette demande, adressée à la Fédération départementale des Chasseurs, qui la transmettra à la DDAF accompagnée de son avis, fera l'objet, en cas de suite favorable, d'un arrêté préfectoral.

Article 5 : Les dispositions du présent arrêté entreront en vigueur le 1^{er} juillet 2008.

Article 6 : L'arrêté n° 43 du 29 juin 2007 fixant la liste des animaux classés nuisibles dans le département de la Haute-Saône pour la période du 1^{er} juillet 2007 au 30 juin 2008 et les conditions de leur destruction est abrogé à compter du 1^{er} juillet 2008.

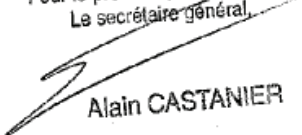
Article 7 : La présente décision pourra faire l'objet d'un recours contentieux devant le tribunal administratif de Besançon dans un délai de 2 mois à compter de sa publication.

.../...

Article 8 : Le Secrétaire Général de la Préfecture de la Haute-Saône, le Sous-Préfet de Lure, les Maires, le Directeur Départemental de l'Agriculture et de la Forêt, les chefs d'Agences départementales de l'Office National des Forêts, le Directeur Départemental des Services Vétérinaires, le Directeur Départemental des Services Fiscaux, le Lieutenant-Colonel, Commandant le Groupement de Gendarmerie de la Haute-Saône, le Directeur Départemental des Polices urbaines de la Haute-Saône, le Président de la Fédération départementale des Chasseurs de la Haute-Saône, les Agents Techniques de l'Environnement, les Lieutenants de Louveterie, les Fonctionnaires ou Agents assermentés de l'Office National des Forêts, les Gardes champêtres, les Gardes particuliers assermentés, sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté qui sera publié au recueil des actes administratifs de la Préfecture et affiché dans chaque commune du département, par les soins des Maires.

Fait à Vesoul, le 18 JUIN 2008

Pour le préfet et par délégation,
Le secrétaire général



Alain CASTANIER

Animaux nuisibles



**Préfecture
de la Haute-Saône**

ARRÊTÉ N° 53 du 29/06/2009 fixant la liste des animaux classés nuisibles dans le département de la Haute-Saône pour la période du 1er juillet 2009 au 30 juin 2010 et les conditions de leur destruction

LE PREFET DE LA HAUTE-SAONE
Chevalier de la Légion d'honneur

VU le code de l'environnement notamment les articles L.427-8 et R.427-6 à R.427-26,
VU l'arrêté ministériel du 26 juin 1987 modifié fixant la liste des espèces de gibier dont la chasse est autorisée,
VU l'arrêté ministériel du 30 septembre 1988 modifié fixant la liste des animaux susceptibles d'être classés nuisibles,
VU l'arrêté ministériel du 4 novembre 2003 relatif à l'usage des appeaux et des appelants pour la chasse des oiseaux de passage et du gibier d'eau et pour la destruction des animaux nuisibles, modifié par l'arrêté du 18 décembre 2003,
VU la loi de la fédération départementale des chasseurs de la Haute-Saône en date du 30 avril 2009,
VU l'avis de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage en date du 20 mai 2009.

CONSIDÉRANT que les mesures alternatives à la destruction de la martre et du putois étudiées lors de la réunion de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage ont été jugées à l'unanimité des membres présents insatisfaisantes ou inefficaces,
CONSIDÉRANT que les mesures alternatives à la destruction des oiseaux étudiées lors de la réunion de la commission départementale de la chasse et de la faune sauvage ont été jugées à l'unanimité des membres présents insatisfaisantes ou inefficaces,
CONSIDÉRANT que le raton laveur, le vison d'Amérique et le chien viverrin sont des espèces invasives et que les autres espèces retenues sont soit présentes de manière significative en Haute-Saône et que, compte-tenu des caractéristiques locales, elles sont susceptibles de porter atteinte aux intérêts protégés visés à l'article R.427-7 du code de l'environnement, soit à l'origine d'atteintes significatives à ces intérêts protégés, pour l'un ou plusieurs des motifs listés,
SUR proposition du secrétaire général de la préfecture de la Haute-Saône,

ARRÊTÉ

ARTICLE 1.- En application de l'article R.427-7 du code de l'environnement sont classés comme animaux nuisibles, pour la période du 1er juillet 2009 au 30 juin 2010, dans le département de la Haute-Saône :

Espèces	Territoires de classement nuisible
Mammifères	
Dans l'intérêt de la santé publique et pour la prévention des dommages aux activités agricoles :	
Renard	ensemble du département
Raton laveur	ensemble du département
Dans l'intérêt de la santé et de la sécurité publiques :	
Ragondin	ensemble du département
Rat musqué	ensemble du département
Pour la protection de la faune et de la flore :	
Chien viverrin	ensemble du département
Vison d'Amérique	ensemble du département
Pour la prévention des dommages aux activités agricoles :	
Fouine	sur l'ensemble du département, seul le piégeage est autorisé.
Pour la prévention des dommages aux activités agricoles et pour la protection de la faune sauvage (secteurs à tétrogonides) :	
Martre	sur les communes de : Champagny, Fautigny et Melisey et sur les communes de Baulay, Chassay-Montbozon, Colombes-Vesoul, Dampierre-sur-Linotte, Dampierre-sur-Salon, Esprey, Filain, Frahier-et-Chatebier, Magny-lès-Jussy, Neurey-lès-Damois, seul le piégeage est autorisé.
Pour la prévention des dommages aux activités agricoles :	
Putois	sur les communes de Dampierre-sur-Linotte, Filain et La Neuville-lès-Scey, seul le piégeage est autorisé.
Oiseaux	
Pour la prévention des dommages aux activités agricoles et dans l'intérêt de la santé publique :	
Corbeau freux	ensemble du département
Corneille noire	ensemble du département
Pour la prévention des dommages aux activités agricoles :	
Bourneau sansonnet	sur les communes de : Avigney-Virey, Bucey-lès-Gy, Champillet, Charcenne, Fondremand, Hugier, Motey-Besuche et Roche-et-Raucourt.
Pour la prévention des dommages aux activités agricoles et pour la protection de la faune sauvage (cuvées de passereaux) :	
Pie bavarde	ensemble du département, uniquement du 1er avril 2010 au 30 juin 2010.

ARTICLE 2.- La destruction à tir par armes à feu ou à l'arc, peut s'effectuer de jour seulement dans les conditions définies au tableau suivant :

Espèces concernées	Types de formalités	Date limite de la période autorisée	Motivations	Conditions spécifiques
Renard	autorisation individuelle préfectorale	du 1er au 31 mars 2010		Peut également être enlèvement à l'aide de produits non toxiques ou détruit avec ou sans chien, toute l'année.
Raton laveur, chien viverrin et vison d'Amérique	autorisation individuelle préfectorale	du 1er au 31 mars 2010		
Ragondin Rat musqué	sans formalité	du 1er juillet 2009 jusqu'à l'ouverture générale et du 1er mars au 30 juin 2010	Prévention des risques en matière de santé publique et protection des berges et des ouvrages hydrauliques	Ces espèces peuvent également être détruites avec ou sans chien, toute l'année.
Corbeau freux Corneille noire	autorisation individuelle préfectorale	du 1er mars au 10 juin 2010	Protection des semis dans les cultures au-delà du 31 mars	Ces espèces ne peuvent être tirées qu'à poste fixe. Le corbeau freux peut également être tiré dans l'enclos de la corbeaulière. Le tir dans les rizières est interdit.
Bourneau sansonnet	autorisation individuelle préfectorale	du 1er juillet 2009 jusqu'à l'ouverture générale	Protection des vignes et des vergers pendant la période de maturation des fruits et des récoltes.	Cette espèce ne peut être tirée qu'à poste fixe. Le tir dans les rizières est interdit.
Pie bavarde	autorisation individuelle préfectorale	du 1er avril 2010 au 10 juin 2010	Protection de la faune sauvage (cuvées de passereaux) et prévention des dégâts aux activités agricoles (arbres fruitiers, cerisiers, pommiers).	Cette espèce ne peut être tirée qu'à poste fixe. Le tir dans les rizières est interdit.

ARTICLE 3.- Les modalités de délivrance des autorisations individuelles mentionnées à l'article 2 sont fixées comme suit :

Le propriétaire, possesseur ou fermier doit établir une DEMANDE D'AUTORISATION DE DESTRUCTION (cette imprimé est disponible en mairie). La demande précisera les dates ou périodes choisies, le ou les lieux de l'opération (désignation cadastrale) de la destruction à tir, le ou les animaux nuisibles concernés et le motif de la destruction. Cette demande, adressée à la fédération départementale des chasseurs, qui la transmettra à la DDEA accompagnée de son avis, fera l'objet, en cas de suite favorable, d'un arrêté préfectoral.

ARTICLE 4.- Les dispositions du présent arrêté entreront en vigueur le 1er juillet 2009.

ARTICLE 5.- La présente décision pourra faire l'objet d'un recours contentieux devant le tribunal administratif de Besançon dans un délai de 2 mois à compter de sa publication.

ARTICLE 6.- Le secrétaire général de la préfecture de la Haute-Saône, le sous-préfet de Lure, les maires, le directeur départemental de l'équipement et de l'agriculture, les chefs d'agences départementales de l'office national des forêts, le directeur départemental des services vétérinaires, le directeur départemental des services fiscaux, le lieutenant-colonel, commandant le groupement de gendarmerie de la Haute-Saône, le directeur départemental des polices urbaines de la Haute-Saône, le président de la fédération départementale des chasseurs de la Haute-Saône, les agents techniques de l'environnement, les lieutenants de louveterie, les fonctionnaires ou agents assermentés de l'office national des forêts, les gardes champêtres, les gardes particuliers assermentés, sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté qui sera publié au recueil des actes administratifs de la préfecture et affiché dans chaque commune du département, par les soins des maires.

Fait à Vesoul, le 29 juin 2009
Pour le préfet et par délégation
Le secrétaire général
Alain CASTANIER

RAPPEL

Extraits du Code de l'environnement

Article R. 427-8 : « Le propriétaire, possesseur ou fermier, procède personnellement aux opérations de destruction des animaux nuisibles, y fait procéder en sa présence ou délègue par écrit le droit d'y procéder.
Le délégant ne peut percevoir de rémunération pour l'accomplissement de sa délégation ».

Article R. 427-21 : « La période de destruction à tir des animaux nuisibles doit être comprise entre la date de clôture générale de la chasse et le 31 mars au plus tard. La période de destruction du pigeon ramier peut commencer à la date de clôture spécifique de la chasse de cette espèce.

Toutefois, les fonctionnaires ou agents mentionnés aux 1^{er} et 3^{er} du I de l'article L.428-20 (soit les agents de l'Etat, de l'office national de la chasse et de la faune sauvage, de l'office national de l'eau et des milieux aquatiques, du domaine national de Chambord, de l'office national des forêts et des parcs nationaux commissionnés pour constater les infractions en matière forestière, de chasse et de pêche, les lieutenants de louveterie) ainsi que les gardes particuliers sur le territoire sur lequel ils sont commissionnés, sont autorisés à détruire à tir les animaux nuisibles, à l'exclusion du sanglier, du lapin et du pigeon ramier, toute l'année, de jour seulement et sous réserve de l'assentiment du détenteur du droit de destruction ».

Arrêté du 29 janvier 2007 fixant les dispositions relatives au piégeage des animaux classés nuisibles en application de l'article L.427-8 du code de l'environnement

« Article 8 : Les piégeurs agréés doivent tenir un relevé quotidien de leurs prises
Tous les piégeurs agréés envoient au préfet du département du lieu de piégeage, avant le 30 septembre de chaque année, un bilan annuel de leurs prises au 30 juin, y compris s'ils n'ont pas pratiqué le piégeage au cours de l'année cynégétique écoulée.
Ce bilan, établi par commune où des opérations de piégeage ont été réalisées, mentionne le nom et l'adresse du piégeur, son numéro d'agrément, l'espèce capturée et le nombre des prises ».

ANNEXE VII

CARACTERISTIQUES SITE

1) Zone

↑ Dombes

↑ Vallée de l'Ognort

2) Piégeur (ne remplir que le nom si déjà saisi)

- Nom :
- Téléphone Fixe :
- Téléphone Portable :
- Adresse :
- Code Postal :
- Commune :
- Adresse email :
- Nombre de sites gérés sur la zone :

3) Site

- Nom du site / propriété :
- Commune :
- Code Postal :
- Utilisation du site (plusieurs choix possibles) :

↑ Base de loisirs

↑ Parc / réserve naturelle,

Si Oui, préciser Statut de Protection : _____

↑ Zone de chasse ou de pêche

↑ Pisciculture

↑ Zone ouverte au public

↑ Autre,

Si Oui, préciser l'Autre type : _____

- Espèces de rongeurs les plus fréquentes sur le site¹ :

- Populations de Ragondin sur le site :
 - Date d'arrivée sur le site (année) : _____
 - Date de début du plan de gestion (année) : _____
 -
 -

Commentaire libre :

¹ Nom latin par ordre décroissant. Par ex. *Myocastor coypus* > *Ondatra zibethicus* > *Rattus norvegicus* ...

QUESTIONNAIRE PIECE D'EAU

1) Rappel

- Nom piéteur :
- Nom site :

2) Caractéristiques générales

- Nom :
- Type :
- ↑ Etang

Si Oui, préciser : Taille (en ha) : _____

↑ Rivière

↑ Marais

↑ Autre

Si Autre type, préciser l'Autre type : _____

- Date de dernière mise en eau (mm/aaaa) : __/____

3) Environnement autour de la pièce d'eau

- Présence de routes :
 - ↑ Non ↑ Chemin de terre ↑ Voie communale
 - ↑ Voie départementale ↑ Voie nationale ou supérieure

- Présence de Forêt : ↑ Oui ↑ Non
- Présence de Cultures : ↑ Oui ↑ Non
- Habitat humain : ↑ Absence ↑ Dispersé ↑ Dense
- Présence Animaux domestiques : ↑ Oui ↑ Non

Si Oui, espèces présentes sur le site ² :

↑ Equins ↑ Bovins ↑ Ovins ↑ Volailles ↑ Autres

Si Autres espèces domestiques, les nommer :

- Présence Autres Espèces animales sauvages sur / autour de la pièce d'eau³ :
 Oui ↑ Non

Si Oui, espèces sauvages présentes sur le site ⁴ :

↑ Rongeurs ↑ Sangliers ↑ Daims ↑ Autres

Si Autres espèces sauvages, les nommer:

- Piégeage :
 - Nombre de nuit- piège par an : _____

² Plusieurs choix possibles

³ Autres espèces susceptibles d'être réservoirs : rongeurs, sangliers, daims

⁴ Plusieurs choix possibles

- Nombre de rongeurs piégés par an : _____
- Estimation de la quantité de ragondins en 2008 :
↑ ≤ 10 ↑ [10-20] ↑ > 20 ↑ Autre : _____

Commentaire libre :

ANNEXE VIII

QUESTIONNAIRE ANIMAL

1) Rappels

- Date capture : ____ / ____ / 2010
- Nom Site : _____
- Nom Pièce d'eau : _____
- Identifiant Séance de capture : _____
- Identifiant Piège : _____
- Coordonnées WGS84 décimales :
 - X : _____
 - Y : _____
 - Z : _____

2) Animal capturé : mesures biométriques

- Identifiant de l'animal⁵ : _____
- Espèce⁶ : _____
- Condition corporelle :
 - ↑ Cachectique ↑ Maigre ↑ Bonne
- Poids (en g) : _____
- Taille de l'animal (en mm)⁷ : _____
- Taille pied postérieur (en mm)⁸ : _____
- Taille avant bras (en mm)⁹ : _____

3) Autopsie

- Sexe : ↑ Mâle ↑ Femelle
- Maturité sexuelle : ↑ Oui ↑ Non
- Statut reproducteur Femelle mature :
 - ↑ RAS ↑ Gravide ↑ A déjà porté
- Détermination de l'âge :
 - Poids cristallin sec Œil 1 (mg) : _____
 - Poids cristallin sec Œil 2 (mg) : _____
 - Age (mois)¹⁰ : _____
- Lésions observées : Oui ↑ Non ↑
Si Oui , compléter tableau

⁵ Format aammjj/ A n° / initiales du préleveur

⁶ Indiquer le nom latin

⁷ Taille du bout du nez à la base de la queue

⁸ Taille depuis le talon jusqu'à la griffe du doigt le plus long

⁹ Taille depuis la pointe du coude jusqu'à l'articulation du carpe

¹⁰ D'après la formule de Gosling et al.

Rappel identifiant animal : _____

Localisation des lésions (plusieurs choix possibles) :

Organes touchés	Type de Lésions
Reins	
Foie	
TD	
Autre :	
Autre :	

4) Prélèvements¹¹

Prélèvements sur Animal	Nombre d'Echantillons
Sang sur tube sec	
Bout de queue	
Rein	
Intestin	
Foie	
Nœud lymphatique mésentérique	
Autre :	

Commentaire libre :

¹¹ Nombre : marquer 0 pour aucun prélèvement

ANNEXE IX

Publications en rapport avec le travail de thèse
--

- **Articles scientifiques parus dans des revues à comité de lecture**

VEIN, J., PERRIN, A., BERNY, P.J., BENOIT, E., LEBLOND, A., AND KODJO, A. 2012. Adaptation of a real-time PCR method for the detection and quantification of pathogenic leptospires in environmental water. *Can. J. Microbiol.* 58: 828-835. Publié.

VEIN, J., LEBLOND, A., BELLI, P., KODJO, A., AND BERNY, P.J. The role of the coypu (*Myocastor coypus*) in the epidemiological cycle of leptospirosis: a study in two wetlands in the East of France. *Eur. J. Wildl. Res.* Soumis.

- **Communication par affiche**

VEIN, J., LEBLOND, A., MONTEIRO, K., RENAUD, C., KODJO, A. ET BERNY, P. Rôle du Ragondin dans l'épidémiologie de la leptospirose dans deux zones humides du Nord Est de la France. *VIII^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie, 2 -4 Juin 2010, Marseille (France).*

- **Communications orales dans des congrès internationaux**

VEIN, J., LEBLOND, A., MONTEIRO, K., RENAUD, C., KODJO, A., AND BERNY, P.J. Role of the nutria in the epidemiology of leptospirosis in two wetlands of the East of France. *7th European Vertebrate Pest Management Conference, 7-11 September 2009, Lyon (France).*

VEIN, J., LEBLOND, A., MONTEIRO, K., RENAUD, C., KODJO, A., AND BERNY, P.J. Role of the nutria in the epidemiology of leptospirosis in two wetlands of the East of France. *VIth International Leptospirosis Society Conference, 21-24 September 2009, Cochin (India).*

- **Communications orales dans des congrès nationaux**

VEIN, J., KODJO, A., LEBLOND, A., MONTEIRO, K., RENAUD, C., ET BERNY, P. Diversité des réservoirs animaux : du Rat au Ragondin. *VIII^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie, 2 - 4 Juin 2010, Marseille (France).*

VEIN, J., KODJO, A., PERRIN, A., LEBLOND, A., ET BERNY, P. Place du Ragondin dans le maintien des leptospires pathogènes dans des zones humides récréatives. *Les Rencontres Scientifiques de l'ANSES : Exposition aux contaminants de l'environnement, 6 Décembre 2010, Paris (France).*

VEIN, J., LEBLOND, A., MONTEIRO, K., RENAUD, C., KODJO, A., ET BERNY, P. Des Rongeurs aux Chiroptères : Diversité des réservoirs animaux. *Symposium Leptospirose, 5 Avril 2012, Marcy L'Etoile (France)*.

Publications sur d'autres sujets

- **Articles scientifiques parus dans des revues à comité de lecture**

VEIN, J., GRANDEMANGE, A., COSSON, J.-F., BENOIT, E., AND BERNY, P.J. 2011. Are water vole resistant to anticoagulant rodenticides following field treatments? *Ecotoxicology* 20: 1432-1441. Publié.

VEIN, J., VEY, D., FOUREL, I., AND BERNY, P. 2012. Bioaccumulation of chlorophacinone in strains of rats resistant to anticoagulants. *Pest. Manag. Sci.* DOI 10.1002/ps.3367. Publié en ligne.

- **Communications dans des congrès internationaux**

VEIN, J., GRANDEMANGE, A., BENOIT, E., ET BERNY, P. Les Campagnols font ils de la résistance ? 25^{èmes} *Rencontres du Groupe d'Etude sur l'Eco-Pathologie de la Faune Sauvage de Montagne, 8-10 Juin 2007, Massello (Italie)*.

VEIN, J., GRANDEMANGE, A., LASSEUR, R., BENOIT, E., AND BERNY, P. The resistance of rodents to anticoagulants: What about water vole after field treatment? 6th *European Vertebrate Pest Management Conference, 11-15 September 2007, Reading (UK)*.

ABSTRACT

Leptospirosis is one of the most prevalent bacterial zoonosis. It is caused by Spirochetes of the *Leptospira* genus and affects all mammals. The WHO considers it as a re emerging disease because of global warming. About 500 000 severe human cases are recognized worldwide but the incidence is probably under evaluated because of the diagnosis difficulties. Metropolitan France is the most affected European country with about 300 human cases declared per year. Infection results from exposure to infected urines of carrier animals, either directly or indirectly via contaminated environment. Animal hosts can be classified as reservoir hosts, healthy carriers or accidental hosts that suffer from the disease. Rodents are well known reservoir hosts but other mammals, as Insectivorous or Chiropters, can also be reservoirs for pathogenic leptospires. The nutria (*Myocastor coypus*) is a large aquatic rodent originating from South America. The species is now settled throughout France and it has been identified as a potential carrier of leptospirosis in 2001 in Western France.

This work had two major goals. Firstly, we studied the contamination of two coypus' populations by pathogenic leptospires. In this part we determined the serological prevalence and the prevalence of kidney carriage in both populations. Simultaneously, detailed necropsy and kidney histology were performed in order to characterize the impact of leptospirosis infection in this species and thus to clarify the role of the coypu in the epidemiological cycle of leptospirosis. Secondly, we developed a tool to detect and quantify pathogenic leptospires in environmental water that can be used in water quality surveillance program.

Key words: Leptospirosis, Coypu, *Myocastor coypus*, wetlands, epidemiological cycle, reservoir host

RESUME

La leptospirose est une zoonose bactérienne due à des Spirochètes du genre *Leptospira*. Elle est classée dans le groupe des maladies ré émergentes en raison du réchauffement climatique par l'OMS. Elle peut atteindre tous les mammifères et notamment l'Homme. On recense environ tous les ans 500 000 cas graves humains (c'est-à-dire ayant nécessité une hospitalisation) mais les difficultés du diagnostic laissent à penser que ce chiffre est sous évalué. La France métropolitaine est le pays d'Europe où le nombre de cas déclarés est le plus important (environ 300 / an). La contamination se produit après à un contact direct ou indirect d'une plaie ou de muqueuses saines avec les urines d'un animal infecté. Les hôtes peuvent être séparés en réservoirs, porteurs sains, et animaux malades ; les Rongeurs forment le réservoir le plus connu mais des représentants d'autres ordres de Mammifères, tels les Insectivores ou les Chiroptères, peuvent aussi jouer ce rôle. Le Ragondin (*Myocastor coypus*) est un grand Rongeur aquatique originaire d'Amérique du Sud qui a maintenant colonisé la quasi-totalité du territoire français. Cette espèce a été identifiée comme un porteur rénal potentiel de leptospires pathogènes en France au début des années 2000.

Notre étude a été orientée suivant deux axes de travail. Tout d'abord un suivi de la contamination par les leptospires pathogènes de deux populations de Ragondin dans des zones humides de l'est de la France. Au cours de cette partie, nous nous sommes intéressés à la prévalence sérologique et à la prévalence du portage rénal dans chacune des populations. Cette étude a été complétée par une estimation de l'état général des animaux au cours d'autopsies détaillées et de l'évaluation histologique des reins afin de déterminer quel pouvait être l'impact, dans cette espèce, de l'infection par des leptospires pathogènes. Ces derniers résultats nous ont permis de clarifier, en partie, le rôle du Ragondin dans le cycle épidémiologique de la maladie. Dans un second axe, nous avons développé un outil permettant le suivi de la contamination des eaux environnementales par les leptospires pathogènes.

Mots Clés : Leptospirose, Ragondin, *Myocastor coypus*, zones humides, cycle épidémiologique, hôte-réservoir