



HAL
open science

Rôle du rat brun (*Rattus norvegicus*) dans la persistance des leptospires en conditions naturelles

Anne-Laure Zilber

► **To cite this version:**

Anne-Laure Zilber. Rôle du rat brun (*Rattus norvegicus*) dans la persistance des leptospires en conditions naturelles. Santé publique et épidémiologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10243 . tel-01316231

HAL Id: tel-01316231

<https://theses.hal.science/tel-01316231>

Submitted on 16 May 2016

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

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



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale 341 E2M2 : Évolution, Écosystème, Microbiologie, Modélisation

Spécialité : Micro-organismes, interactions, infections

Numéro d'ordre : 243 - 2015

Rôle du rat brun (*Rattus norvegicus*) dans la persistance des leptospires en conditions naturelles

Présentée par

Anne-Laure ZILBER

Pour obtenir le grade de Docteur dans le domaine des Sciences de la Vie de
l'Université de Lyon (Lyon 1)

Thèse soutenue le 30 novembre 2015, devant le jury composé de :

- | | |
|---------------------------|---------------------|
| - Mme MORI Marcella | Rapporteur |
| - Mr MARTINEAU Guy-Pierre | Rapporteur |
| - Mme BOURHY Pascale | Examineur |
| - Mr LAURENT Frédéric | Examineur |
| - Mme HADDAD Nadia | Présidente |
| - Mme DJELOUADJI Zoheira | Directrice de thèse |
| - Mr KODJO Angeli | Co-encadrant |
| - Mr ARTOIS Marc | Co-encadrant |

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUICHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Madame le Docteur Marcella Mori et Monsieur le Professeur Guy-Pierre Martineau, Nous vous remercions d'avoir accepté de juger mon travail, tous mes remerciements pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde considération.

Mesdames le Professeur Nadia Haddad et le Docteur Pascale Bourhy, et Monsieur le Docteur Frédéric Laurent, Nous vous remercions d'avoir accepté de juger mon travail, tous mes remerciements pour avoir accepté d'être membre de mon jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde considération.

Je remercie ma directrice de thèse le Docteur Zorée Djelouadji pour son encadrement depuis mon master, qui m'a donné la chance d'être sa première doctorante. À ces côtés, j'ai pu apprendre à devenir chercheuse.

Je remercie le Professeur Angeli Kodjo pour m'avoir co-encadré et m'avoir donné la chance de réaliser cette thèse. Sans son investissement financier, cette thèse n'aurait jamais vu le jour.

Je remercie sincèrement le Professeur Marc Artois, pour m'avoir co-encadré depuis mon master et m'avoir apporté conseils et soutiens tout au long de ces 4 années.

Je remercie l'USC1233 et l'ancienne équipe PERS par l'intermédiaire des Pr. Etienne Benoît et Pr. Michel Pépin pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de leur unité et équipe et pour leur soutien financier au cours de ma thèse.

Je remercie mes collègues de l'USC1233 et de l'ancienne Équipe PERS (Maria-Halima Laaberki, Tatiana Dupinay, Julie Vein, Marine Hugonnard, Agnès Benamou-Smith et Virginie Lattard) pour leur accueil, leur écoute et les conseils qu'elles m'ont prodigués tout au long de ces 4 années sur VetAgro Sup.

Je remercie ma collègue le Dr. Florence Ayrat, pour cette collaboration fructueuse depuis 4 ans. J'ai beaucoup appris de nos conversations sur la santé publique et l'épidémiologie.

Je remercie le Laboratoire des Leptospires pour m'avoir accueilli depuis 4 ans. Je remercie tout particulièrement Océane Romatif et Diane Grandin pour cette merveilleuse année passée à leur côté. Je remercie également Tristan Ulivieri, Déborah Michel et Marie-Thérèse Teyssier pour l'aide et les conseils qu'ils ont pu m'apporter au cours de mon travail de thèse sur les leptospires.

Je remercie l'institut Claude Bourgelat pour m'avoir chaleureusement accueilli pendant ma phase « expé », tout particulièrement Olivia Leveneur, Roland Roume et

Laure Vinit, qui m'ont permis d'approfondir mes connaissances sur mon modèle infectieux et de m'avoir apporté en toutes circonstances de bon conseil pour le bien-être de mes animaux.

Je remercie le Pr. Thierry Marchal de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire d'anatomopathologie. Je remercie sincèrement le Dr Patrick Belli pour m'avoir encadré au cours de mon travail en histologie, avec tant de gentillesse et de bienveillance. Je remercie Sabine et Huguette pour leur aide et ces moments passés ensemble.

Je remercie les membres du comité d'éthique de VetAgro Sup : d'une part, les Dr. Delphine Grezel et Dr. Samuel Vidal pour leur aide et leurs conseils lors de l'élaboration de mon modèle infectieux et, d'autre part, Mr Alain Dorier, pour avoir accepté ma demande de faire partie du comité. Cette année passée à vos côtés a été extrêmement enrichissante, elle m'a permis de développer mon sens de la réflexion sur le bien-être animal.

Je remercie MM. Benoît Combes et Vincent Raton d'ELIZ, pour m'avoir permis de participer à cette étude unique en France.

DEDICACES

À ma copine **Armelle**, pour tous ces moments et ces encouragements mutuels. Et pour reprendre Frodo: « Le Mordor, Gandalf, c'est à gauche ou à droite ? » A gauche, petit hobbit, à gauche !

À **Alina**, j'ai perdu la meilleure coworking quand tu es devenu Dr.

À **Julie Cat**, **Alice De Boyer des Roches** et **Céline Faverjon**, je garderai en mémoire tous ces repas, ces fous rires et ces soirées passées ensemble. Un Grand Merci pour tous ces bons moments et nos conversations enrichissantes ! (qui me manqueront !)

À **Joffrey Goulois**, nos sorties resto-ciné me manqueront.

Je dédicace cette thèse à ma famille : Maman, Papa, Bertrand, Pascale et les petits loups. Sans votre soutien, votre écoute et votre amour, je ne serais pas arrivé au bout. Je vous aime plus que tout !

Une pensée à mon grand-père qui aurait été fier de mon parcours.

Je remercie toutes les personnes que je n'ai pas mentionnées mais qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Pour finir, petit clin d'œil statistique à Julie, Céline et Alice :

« Nous sommes tous des $n = 1$ »

RÉSUMÉ

Rôle du rat brun (*Rattus norvegicus*) dans la persistance des leptospires en conditions naturelles

La leptospirose est une zoonose ré-émergente de distribution mondiale, causée par un spirochète du genre *Leptospira*. L'OMS rapporte environ un million de cas sévères de leptospirose humaine par an à travers le monde, avec un taux de mortalité de 10 %. Les rongeurs étant considérés comme les principaux hôtes réservoirs de cette bactérie, la transmettent aux Hommes et aux animaux, par un contact direct ou indirect via de l'urine infectée. Le rat brun (*Rattus norvegicus*) est important d'un point de vue épidémiologique car il est réservoir du principal séro groupe incriminé dans les cas de leptospirose humaine : le séro groupe Icterohaemorrhagiae. Chez ce rongeur, l'infection est asymptomatique et a été caractérisée par des modèles expérimentaux centrés sur la colonisation rénale des leptospires faisant appel à une voie d'inoculation éloignée des conditions naturelles. De plus, les détails sur la dynamique de transmission rat-rat restent encore inconnus. Il est donc important de mieux comprendre le rôle du rat dans le maintien des leptospires dans l'environnement, afin de mieux contrôler les épidémies de leptospirose humaine et animale.

À partir d'un modèle expérimental avec une voie d'inoculation mimant des conditions naturelles (conjonctivale ou sous-cutanée), nous avons mis en évidence que la réponse sérologique semblerait être indépendante de la mise en place de la colonisation rénale, et que la voie conjonctivale serait plus efficace pour devenir porteur rénal que la voie sous-cutanée. De plus, une étude de l'infection naturelle sur le terrain avec les mêmes méthodes d'analyse, a permis de mettre en évidence la présence de leptospires dans les poumons de manière concomitante à un portage rénal chez le même individu.

Grâce à la mise au point d'une nouvelle méthode de typage moléculaire, nous avons identifié les souches circulantes de leptospires dans une population urbaine de rats et leur dynamique de transmission. Toutes les souches portées par les rats appartenaient au séro groupe Icterohaemorrhagiae et chaque colonie de rat ne semblait maintenir qu'une seule souche de leptospires dans sa population.

Il est donc important de mener en parallèle des études expérimentales et sur le terrain permettant de caractériser l'infection chez le rat et la dynamique de transmission des souches, dans le but d'obtenir la meilleure modélisation de l'infection chez ce rongeur et de prévenir au mieux les risques pour la santé humaine et animale.

**USC1233 Rongeurs Sauvages- Risques sanitaires et Gestion des populations,
Equipe de recherche sur la leptospirose
Etablissement VetAgro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon,
1, avenue Bourgelat
69280 Marcy l'étoile**

ABSTRACT

The role of the brown rat (*Rattus norvegicus*) in the persistence of *Leptospira* in natural conditions

The leptospirosis is a zoonosis caused by spirochetes of the genus *Leptospira*, which could infect human and animals. This infection represents a major problem of public health in several countries. The WHO estimates at one million of severe cases of human leptospirosis by year in the world, with a 10 % fatality rate. In the human, the leptospirosis is a mortal infection if it is not treated. The rodents, including the brown rat (*Rattus norvegicus*), are considered as a carrier and excrete pathogenic leptospirens via urine, which becomes the main source of direct or indirect contamination of human and animal. In the rat, the asymptomatic infection was few characterized by experimental model, or only focused on the renal colonization using a no-natural inoculation route. Furthermore, the details of the transmission rat-rat remain still unknown. It is important to know the role of the rat in the persistence of leptospirens in rural or urban environments, in order to better control leptospirosis epidemics.

With an experimental model using conjunctival and subcutaneous routes, we showed that the antibodies production was independent of the rate of renal colonization and that the conjunctival route was more efficient to become renal carrier than the subcutaneous route. Furthermore, a study of the characteristics of natural infection using the same methods showed the presence of leptospirens in lung of rat which are renal carriers.

With a new method of molecular typing, we have studied the circulating of the *Leptospira* strains in the rat's urban population. All the strains belonged to the Icterohaemorrhagiae serogroup and every colony of rats maintained only one strain of *Leptospira*.

The characterization of the infection with the experimental and field studies, and the epidemiological studies are also important to model the infection in the brown rat, for the prevention of human and animal leptospirosis.

KEY-WORDS: *Leptospira*, *Rattus norvegicus*, animal model, epidemiology

MOTS-CLÉS: *Leptospira*, *Rattus norvegicus*, modèle animal, épidémiologie

TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ.....	7
ABSTRACT.....	8
Table des matières.....	9
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	13
INDEX DES TABLEAUX.....	14
INDEX DES FIGURES.....	15
INTRODUCTION.....	17
I) <i>Leptospira</i> , l'agent pathogène de la leptospirose.....	17
I. 1) Description de <i>Leptospira</i>	18
I. 2) Systématique.....	20
I. 3) Les techniques de sérogroupage et de typage moléculaire des leptospires.....	22
II) La leptospirose, une zoonose ré-émergente.....	26
II. 1) La leptospirose humaine.....	30
II. 2) La leptospirose animale.....	32
II. 3) Porteurs chroniques et hôtes accidentels.....	36
II. 4) Le cycle de transmission de <i>Leptospira</i>	38
II. 5) Les facteurs de risque et les mesures de lutttes associées en santé publique.....	44
III) Le rat brun et les leptospires.....	45
III. 1) <i>Rattus norvegicus</i>	45
III. 2) L'infection asymptomatique par <i>Leptospira</i> , éléments connus et inconnus.....	49
IV) La leptospirose chez le rat : apports des études épidémiologiques et des études de l'infection expérimentale.....	54
IV. 1) Les études épidémiologiques chez le rat sauvage.....	54
IV. 2) Le modèle d'infection expérimentale chez le rat de laboratoire.....	56
Objectifs du travail.....	61

CHAPITRE 1 :

La leptospirose chez le rat : Caractérisation de l'infection chez un modèle animal mimant les conditions naturelles d'infection.....63

I) Etude comparative de la voie de référence intrapéritonéale et des voies d'inoculations conjonctivale et sous-cutanée	68
I. 1) Objectif	68
I. 2) Article	68
I. 3) Discussion	91
I. 4) Conclusion.....	94
II) Etude sur la dynamique de l'infection par voie sous-cutanée	95
II. 1) Objectif	95
II. 2) La phase expérimentale.....	96
II. 3) Cinétique de production des anticorps par le test de micro-agglutination (MAT)	97
II. 4) L'analyse histologique.....	98
II. 5) Détection et quantification des leptospires dans les organes	101
II. 6) Discussion	102
II. 7) Conclusion.....	107

CHAPITRE 2 :

La leptospirose en conditions naturelles chez le rat brun sauvage: études de l'infection naturelle et de la dynamique de transmission..... 111

I) La Multispacer Sequence Typing, un nouvel outil de typage résolusif pour les souches de <i>L. interrogans</i>	115
I. 1) Objectif	115
I. 2) Article	116
I. 3) Discussion	124
I. 4) Conclusion.....	126
II) L'infection naturelle causée par <i>Leptospira</i> chez le rat, une étude au site du Parc	127
II. 1) Objectif	127
II. 2) Article	128
II. 3) Discussion	144
II. 4) Conclusion.....	147
III) Etude épidémiologique sur la distribution de souches de <i>Leptospira</i> par la MST au sein d'une population urbaine de rat brun.....	149

III. 1) Objectif	149
III. 2) Article	150
III. 3) Discussion	165
III. 4) Conclusion.....	169
DISCUSSION.....	171
I) La leptospirose chez le rat.....	172
II) La dimension écologique de l'infection	173
PERSPECTIVES.....	175
I) Le modèle expérimental	175
II) L'infection naturelle	176
III) Les autres espèces animales réservoirs des leptospires en France (Etude ELIZ, en Annexe).....	177
CONCLUSION	179
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	181
ANNEXE	199
Annexe I: Tableau des principaux sérovars appartenant au séro groupe Icterohaemorrhagiae.....	201
Annexe II : Protocole des colorations histologiques réalisées au cours de ce travail dans l'UP Pathologie Morphologique et Clinique de VetAgro Sup.....	203
Annexe III : Protocole de la PCR en temps-réel SYBR Green réalisée au cours de la phase expérimentale de ce travail.....	207
Annexe IV : Caractéristiques morphométriques de la population lyonnaise de rat et analyse statistique des individus de chaque colonie	211
Annexe V : Surveillance ciblée de la leptospirose au sein de la faune sauvage par l'Entente de Lutte Interdépartementale contre les Zoonoses	213
Annexe VI: Article « The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats: a survey in Rhône, France (2010-2012) » ; Ayral F, Artois J, Zilber AL, Widén F, Pounder KC, Aubert D, Bicout DJ, Artois M. ; Epidemiol Infect. 2015.....	221

LISTE DES ABRÉVIATIONS

µL : microlitre

CAAT : Cross Agglutination Absorption Test

ELIZ : Entente de Lutte Interdépartementale contre les Zoonoses

EMJH : Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

LERG : Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group

LPS : lipopolysaccharide

LVD : Laboratoire Vétérinaire Départemental

MAT : test d'agglutination microscopique (Micro-Agglutination Test)

MLST : MultiLocus Sequence Typing

MST : Multispacer Sequence Typing

PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis

SPF : Specific Pathogen Free

VNTR : Variable-Number Tandem-Repeat

WHO : World Health Organization

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I : Souches de référence des 22 espèces génomiques du genre <i>Leptospira</i>	21
Tableau II : Signes cliniques de la leptospirose chez les principales espèces animales domestiques.	32
Tableau III : Hôtes réservoirs domestiques de certains sérovars de <i>Leptospira</i> et leur implication dans la transmission des leptospires à l'Homme.	36
Tableau IV: Mode de transmission de <i>Leptospira</i> à l'Homme, illustrée de cas humains référencés (liste non exhaustive).	39
Tableau V: Hôtes réservoirs de <i>Leptospira</i> dans la faune sauvage en Europe (liste non exhaustive).	40
Tableau VI : Sérogroupes identifiés chez le rat brun (<i>Rattus norvegicus</i>), lors d'études épidémiologiques fondées sur le typage moléculaire (liste non exhaustive).	51
Tableau VII : Voies d'inoculation utilisées dans les modèles expérimentaux d'infection par <i>Leptospira</i> chez les espèces sensibles et leurs conséquences sur la cinétique de l'infection.	56
Tableau VIII : Répartition des lots de rats de l'essai sur la dynamique de l'infection leptospirosique par voie sous-cutanée, avec la date de prélèvement sanguin et de mise à mort correspondant.	93
Tableau IX : Lésions anatomo-pathologiques observées grâce à une coloration hémalum-phloxine, chez les rats inoculés par voie sous-cutanée.	96
Tableau X : Taux d'échantillons positifs en fonction du type d'organe et du jour de prélèvement.	99

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : microscopie électronique de <i>L. interrogans</i> sérovar Icterohaemorrhagiae (P. N. Levett 2001).	18
Figure 2 : Schéma de l'architecture de la membrane des leptospires.	19
Figure 3 : Estimation de l'incidence globale annuelle de la leptospirose humaine, estimée sur des données de prévalences observées de 1996 à 2005 (Pappas et al. 2008).	27
Figure 4 : Facteurs influençant l'incidence de la leptospirose humaine (Tulsiani et al. 2010).	28
Figure 5 : Schéma des organes impliqués dans les symptômes de la leptospirose humaine.	30
Figure 6 : Cycle de transmission de <i>Leptospira</i>	38
Figure 7 : Schéma détaillant les différences morphologiques entre le rat noir (<i>Rattus rattus</i>) et le rat brun (<i>Rattus norvegicus</i>).	45
Figure 8: Cinétique de dissémination des leptospires pathogènes chez le rat Wistar, exprimés en moyenne et écart-type, et détectés par coloration argentique et immunofluorescence des leptospires (Athanzio et al. 2008).	49
Figure 9 : Analyse sérologique par MAT des sérums de rats inoculés par voie sous-cutanée.	94
Figure 10 : Coloration hémalum-phloxine de coupe rénale de rat infecté par <i>Leptospira</i> , présentant une néphrite interstitielle (Grossissement X200).	95
Figure 11 : Coloration argentique Warthin-Starry de coupes de reins de rats infectés par <i>Leptospira</i> à J14 (A) et J30 (B) (Grossissement X400).	97
Figure 12 : Coloration par immunohistochimie de coupes d'organes de rats infectés par <i>Leptospira</i> , présence de marquage à J5 dans le poumon (A) et J30 dans le rein (B) (Grossissement X400).	97

INTRODUCTION

La leptospirose est une zoonose à multiples facettes, pouvant conduire à plusieurs formes cliniques chez l'homme et les animaux. Son diagnostic étant difficile, sa prévalence réelle est sous-estimée. Cependant, avec les changements climatiques, l'urbanisation et la mondialisation, nous pouvons nous attendre à l'émergence de plusieurs épidémies de leptospirose dans les années à venir.

I) *Leptospira*, l'agent pathogène de la leptospirose

La leptospirose est une maladie qui a été décrite pour la première fois en 1886 par Alfred Weil. Le 1^{er} cas impliquait une forme sévère ictérique (splénomégalie, jaunisse et néphrite) de la leptospirose dans la région d'Heidelberg en Allemagne (Weil 1886). Une maladie similaire a également été décrite à la même époque chez des travailleurs agricoles de rizières en Chine, et des mineurs japonais (Vijayachari et al. 2008).

L'agent pathogène responsable de cette maladie a été identifié pour la première fois au début du XX^{ème} siècle, au Japon. Inada démontra que les leptospires causaient la leptospirose par la transmission de l'infection à des cobayes par du sang de patients infectés (Inada et al. 1916). Lors d'études suivantes, la transmission au rat a été étudiée permettant de constater son manque de sensibilité face aux leptospires, ainsi son statut de réservoir a été établi quelques années après la découverte de cette bactérie (Ido et al. 1917).

I. 1) Description de *Leptospira*

Les leptospires sont des bactéries appartenant à l'ordre des Spirochaetales, la famille des *Leptospiraceae* et le genre *Leptospira* (Adler et de la Pena Moctezuma 2010). Ce sont des bactéries de forme hélicoïdale (Figure 1).

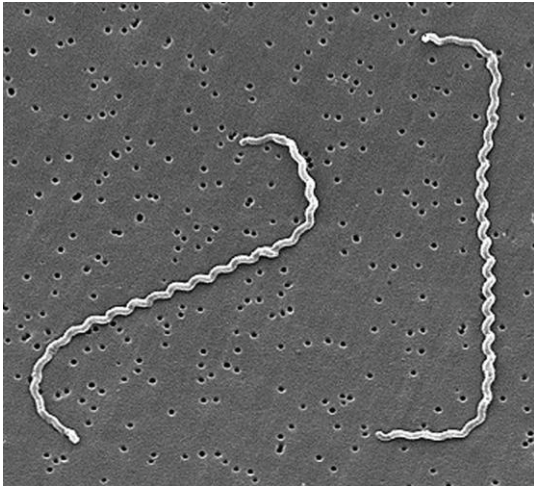


Figure 1 : microscopie électronique de *L. interrogans* sérovar Icterohaemorrhagiae (P. N. Levett 2001).

Les leptospires présentent des dimensions particulières parmi les procaryotes : 0,1 μm de diamètre et 6 à 20 μm de longueur (Adler et de la Pena Moctezuma 2010). Les spirochètes ayant divergé rapidement lors de l'évolution bactérienne (Bharti et al. 2003; Bern et Goldberg 2005), les leptospires ont une structure membranaire typique, ressemblant à la fois à la structure des Gram positif et celle des Gram négatif. Elles ont une double membrane associée au peptidoglycane (Ko et al. 2009). Elles présentent également deux flagelles périplasmiques insérés au niveau de chaque pôle et localisé dans l'espace périplasmique (Adler et de la Pena Moctezuma 2010). Ces deux flagelles assurent la motilité des leptospires, leur permettant d'échapper aux cellules de la réponse immunitaire. Plusieurs protéines de surface sont présentes sur la membrane externe, comme la LipL32, LipL41 ou la LigB, mais les principaux antigènes sont surtout les lipopolysaccharides (LPS) (Adler et de la Pena Moctezuma 2010), présents à la surface des leptospires (Figure 2) et entraînant une réponse immunitaire ciblée.

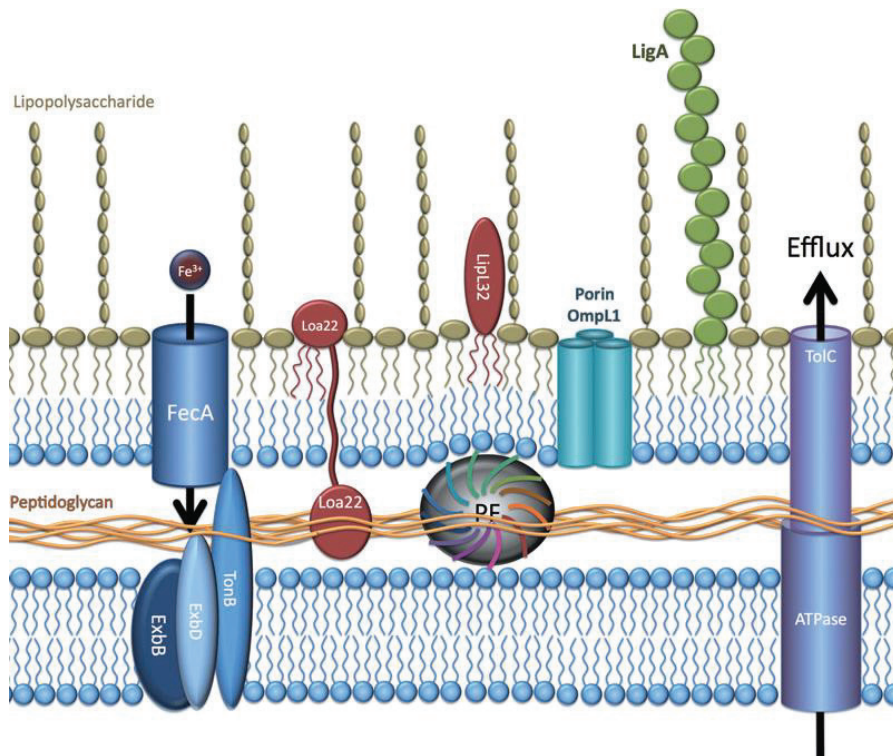


Figure 2 : Architecture de la membrane des leptospires (Haake et Matsunaga 2010).

La membrane externe contient des lipopolysaccharides, des lipoprotéines (LipL32*, Loa22) et des protéines transmembranaires. Le flagelle périplasmique (PF) est localisé dans le périplasme. La protéine FecA assure le transport ferrique et la protéine TolC forme un canal permettant un efflux grâce à des pompes ATP.

* La lipoprotéine LipL32 est une protéine membranaire intrinsèque sub-surface (Pinne et Haake 2013).

Les leptospires nécessitent une culture particulièrement longue et difficile, comparée à d'autres genres bactériens (comme les familles *Staphylococcus* ou *Escherichia*). Ce sont des bactéries aérobies strictes, présentant une croissance optimale à 28-30 °C, pour les souches pathogènes (Zuerner 2005). La multiplication des leptospires est lente, la culture bactérienne nécessite alors plusieurs semaines. Elles peuvent se multiplier sur un simple milieu enrichi en vitamines B1 et B12, avec un ajout d'acides gras à longues chaînes et de sels d'ammonium (Adler et de la Pena Moctezuma 2010). Cependant, le milieu le plus couramment utilisé actuellement est le medium d'Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH), qui est enrichi en acide oléique, en sérum albumine bovin et en polysorbate. De plus, pour limiter les contaminants, il est possible d'ajouter un antimétabolite (antipyrimidine), comme le le

5-fluorouracil, ou un antibiotique, comme la gentamycine (de 0,01 à 0,04 %) (Adler et de la Pena Moctezuma 2010; WHO 2003).

I. 2) Systématique

Les leptospires ont la particularité de présenter une double classification : sérologique et génomique. La classification génomique s'est développée au cours de ces 30 dernières années et est basée sur l'hybridation ADN-ADN (Cerqueira et Picardeau 2009). Les leptospires sont divisés en 22 espèces génomiques, elles-mêmes réparties selon leurs propriétés pathogéniques en 10 espèces pathogènes, 5 espèces intermédiaires et 7 espèces saprophytes (Bourhy et al. 2014; Levett 2015). Les leptospires appartenant aux espèces pathogènes sont capables de provoquer une infection chez l'animal et l'homme, celles appartenant aux espèces saprophytes sont non pathogènes et vivent dans l'environnement. Enfin, les espèces intermédiaires se distinguent des saprophytes et des pathogènes par leur séquence de l'ARNr 16S, et leur virulence n'a pas été démontrée expérimentalement (Picardeau 2013). Toutes les espèces de *Leptospira* sont reprises dans le tableau I.

Tableau I : Souches de référence des 22 espèces génomiques du genre *Leptospira*.

Espèces	Sérogroupe	Sérovar	Souche type
Pathogènes			
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Fiocruz LI-130
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	Sejroe	M84
<i>L. weilii</i>	Celledoni	Celledoni	Celledoni
<i>L. santarosai</i>	Tarassovi	Atlantae	LT81
<i>L. alexanderi</i>	Manhao	Manhao 3	L60
<i>L. alstonii</i>	ND	Sichuan	79,601
<i>L. kmetyi</i>	ND	ND	Bejo-Iso 9
<i>L. mayottensis</i>	-	-	200901116T

Intermédiaires			
<i>L. wolffii</i>	ND	ND	Korat-H2
<i>L. licerasiae</i>	ND	Varillal	VAR010
<i>L. inadai</i>	Tarassovi	Kaup	LT64-68
<i>L. fanei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT6
<i>L. broomii</i>	Undesignated	ND	5399

Saprophytes			
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice	CDC
<i>L. meyeri</i>	Semarang	Semarang	Veldrat
<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc I
<i>L. vanthielii</i>	Holland	Holland	WaZ Holland
<i>L. terpstrae</i>	ND	ND	LT 11-33
<i>L. yanagawae</i>	Semarang	Saopaulo	Sao Paulo
<i>L. idonii</i>	-	-	Eri-1 (T)

(Picardeau 2013; Saito et al. 2012; Bourhy et al. 2014)

La classification sérologique est la classification historique encore utilisée aujourd'hui par les épidémiologistes et les cliniciens (Bharti et al. 2003). Elle est basée sur la structure du LPS et sa réactivité observée avec les anticorps anti-leptospires (Picardeau 2013). Les leptospires sont alors répartis en sérogroupe (24) et sérovars (>300) (Evangelista et Coburn 2010; Picardeau 2013). Le sérovar est l'unité taxonomique sérologique des leptospires. Il est défini sur la base de l'hétérogénéité structurale du composé carbohydrate du LPS grâce au Cross Agglutination Absorption Test (CAAT) (Cerqueira et Picardeau 2009). Deux souches présentant une ressemblance antigénique stable appartiennent au même sérovar, et deux

sérovars présentant des antigènes majeurs communs appartiennent au même séro groupe (Guerra 2009).

Les deux classifications, sérologique et génomique, sont indépendantes (Bharti et al. 2003) mais non corrélées car les sérovars d'un même séro groupe peuvent être répartis entre différentes espèces génomiques (Cerqueira et Picardeau 2009). Les deux classifications cohabitent donc aujourd'hui : la classification génomique est de plus en plus utilisée ces dernières années avec l'emploi des techniques moléculaires ; parallèlement à cela, la méthode sérologique reste en vigueur étant la méthode de référence pour le diagnostic. Dans un futur proche, la liaison entre les deux classifications sera peut-être possible grâce aux nouvelles générations de séquenceur permettant de faire du séquençage à haut débit de génome bactérien entier (Desai et al. 2013; Kilianski et al. 2015), et ainsi d'identifier les gènes codant les antigènes de surface.

I. 3) Les techniques de sérogroupage et de typage moléculaire des leptospires

- La technique d'agglutination microscopique

Le test sérologique d'agglutination microscopique (MAT) est la méthode standard utilisée depuis le début du siècle (Martin et Pettit 1918) pour le diagnostic sérologique et les études épidémiologiques. Elle permet en général d'identifier le séro groupe infectant. En effet, la MAT est une méthode d'identification spécifique du séro groupe mais présente une mauvaise identification du sérovar incriminé (Picardeau 2013; Cerqueira et Picardeau 2009). Ceci est dû à de nombreuses réactions croisées observées au cours de l'analyse, qui entraînent une diminution de la valeur prédictive positive de la MAT à 65-82 % (McBride et al. 2005). Plusieurs études ont rapporté qu'il n'y a pas toujours une corrélation entre le séro groupe incriminé avec la MAT et l'identité de la souche isolée du même individu (Picardeau 2013; Levett 2003). La technique MAT est donc une méthode peu adaptée pour un typage précis des souches de leptospires infectant des individus, à la fois pour une infection aiguë et chronique.

Ces dernières années, le typage a été principalement réalisé par plusieurs techniques de biologie moléculaire comme la *Pulsed-field Gel Electrophoresis*

(PFGE), la *Variable-Number Tandem-Repeat* (VNTR) ou la *MultiLocus Sequence Typing* (MLST) (Picardeau 2013).

- **L'électrophorèse en champs pulsés**

L'électrophorèse en champs pulsés (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* - PFGE) est une méthode dérivée du principe technique du polymorphisme de longueur des fragments de restriction. Après une lyse cellulaire *in situ* dans un gel d'agarose et une digestion de l'ADN par une endonucléase de restriction à faible fréquence de coupure, généralement l'enzyme *Not I*, les fragments ainsi découpés migrent dans des champs électriques alternatifs, qui permettent la séparation des fragments d'ADN allant de quelques kilobases à 10 000 kb. Cette méthode de typage génomique présentant un puissant pouvoir de discrimination, est considérée comme la méthode de typage moléculaire standard (Cerqueira et Picardeau 2009).

De nombreuses études épidémiologiques faites ces dernières années avec la PFGE ont permis d'établir les sérovars circulant au sein des populations de rongeurs, notamment aux Philippines (Villanueva et al. 2010), avec les sérovar *Manilae* et *Losbanos* ; ou au Portugal (Collares-Pereira et al. 2000), avec les sérovars *Icterohaemorrhagiae*, *Tsaratsovo* et *Arborea*, à partir des génotypes de référence correspondants.

La PFGE est une méthode standardisée et reproductible. N'utilisant qu'une seule enzyme de restriction, le nombre de fragment d'ADN obtenu est limité, ce qui simplifie la comparaison des profils. Son pouvoir de discrimination dépend du nombre de fragment, celui-ci étant significatif à partir de 3 à 6 fragments (Galloway et Levett 2008). Concernant le typage, elle permet d'identifier environ 90 % des sérovars connus de leptospires. Les 10 % restants représentent les sérovars ayant un nombre de fragment d'ADN inférieur à la valeur significative, ou appartenant à des espèces de leptospires saprophytes et intermédiaires (Galloway et Levett 2008). Cependant, elle est incapable de faire la différence entre les sérovars *Icterohaemorrhagiae* et *Copenhageni* (Galloway et Levett 2008; Herrmann et al. 1992; Turk et al. 2009), ce qui représente un inconvénient majeur étant donné que ces sérovars sont les plus fréquemment incriminés dans les cas de leptospirose humaine. De plus, la PFGE nécessite l'obtention d'un inoculum bactérien suffisant par la mise en culture afin d'obtenir une concentration d'ADN suffisante pour

l'analyse. Cette technique demande également beaucoup de temps de manipulation et nécessite un équipement spécifique coûteux (Galloway et Levett 2008).

Malgré sa bonne résolution, la PFGE reste donc une technique limitée, dans la mesure où elle se base sur la culture souvent difficile des leptospires à partir de prélèvements cliniques. Ceci peut conduire à une impasse vis-à-vis du typage des prélèvements, c'est pourquoi des équipes de recherche se sont tournées vers la mise au point de nouvelles techniques moléculaires de typage, directement à partir des échantillons biologiques.

- **La Variable-Number Tandem-Repeat**

Le principe de la *Multiple Locus Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) Analysis (MLVA)* repose sur le polymorphisme de longueur de régions génomiques constituées d'un nombre variable de courts motifs répétés.

Plusieurs études épidémiologiques ont été réalisées avec la VNTR, ces dernières années, et ont permis de caractériser les souches circulantes dans plusieurs régions, comme par exemple en Argentine, où prédomine le sérovar Pomona (Pavan et al. 2011), ou aux Antilles où sévit surtout le séro groupe Icterohaemorrhagiae (Bourhy et al. 2013). D'autres études ont permis de spéculer sur la dynamique de transmission des souches entre différentes espèces animales et l'homme, comme en Australie (Slack et al. 2005), par similarité génétique entre des souches du sérovar Australis isolées chez l'homme et chez des rongeurs indigènes de la même région.

La VNTR est une méthode reproductible et facilement standardisable. L'équipement nécessaire est simple, composé d'un thermocycleur pour réaliser les PCR et d'une électrophorèse pour la migration des bandes d'ADN. Cette technique est directement applicable sur des prélèvements biologiques et évite ainsi la mise en culture difficile des leptospires. Le pouvoir de discrimination de la VNTR dépend du nombre de loci utilisés et de leur polymorphisme, en général, 2 à 7 loci sont nécessaires (Salaun et al. 2006), mais ce nombre peut être augmenté jusqu'à 25 pour certains sérovares difficilement identifiables, comme le sérovar Australis (Slack et al. 2005). Cette méthode présente l'avantage d'être utilisable pour l'identification des sérovares des trois espèces pathogènes principales en Europe avec un pouvoir de discrimination correct en fonction de l'espèce considérée : 90-92 % pour *L. interrogans*, de 90 % pour *L. kirschneri* et de 60 % pour *L. borgpetersenii* (Salaun et al. 2006), et elle a été

adaptée depuis peu à l'espèce *L. santarosai*, très présente en Amérique (Hamond et al. 2015).

Cependant, la méthode VNTR présente quelques limites : 1) une limite de résolution dépendant de la composition du gel et du nombre de répétition du locus ce qui rend la différenciation de fragment de poids moléculaire proche peu aisée (Slack et al. 2005), 2) quelques défauts d'identification de sérovars subsistant, comme les sérovars Icterohaemorrhagiae et Copenhageni ou les sérovars Bratislava et Australis (Majed et al. 2005), 3) la méthode étant basée sur la taille et non sur la séquence des fragments d'ADN, certains génotypes ne peuvent pas être différenciés. Ainsi, malgré la simplicité d'utilisation et un fort pouvoir de discrimination permettant d'identifier certains sérovars, de nouvelles techniques basées sur le séquençage d'ADN ont été développées ces dernières années.

- **La MultiLocus Sequence Typing**

La *MuliLocus Sequence Typing* (MLST) permet d'assigner et de caractériser les allèles existants sur différents gènes par un séquençage direct des régions génomiques. Les gènes choisis pour cette technique sont des gènes de ménage, qui sont stables et présents chez toutes les espèces de la bactérie étudiée (Enright et Spratt 1999). Pour identifier une souche, plusieurs gènes sont séquencés et l'ensemble des allèles obtenus pour ces gènes forme alors le profil allélique de cette souche. Il existe à l'heure actuelle deux schémas de MLST en fonction des gènes cibles (Ahmed et al. 2006; Thaipadungpanit et al. 2007) : le premier décrit par Ahmed et collaborateurs, est basé sur le séquençage de six gènes (*adk*, *icdA*, *secY*, *rrs2*, *lipL41* et *lipL32*), et le second décrit par Thaipadungpanit et collaborateurs, est basé sur l'analyse de sept gènes (*pntA*, *sucA*, *pfkB*, *tpiA*, *mreA*, *glmU* et *fadD*). Les deux modèles ont un pouvoir de discrimination comparable (93,5% avec 6 gènes vs. 92% avec 7 gènes), mais le schéma avec 6 gènes est composé de certains gènes codant pour des protéines de surface, ce qui n'est pas conforme à la définition d'une MLST (Ahmed et al. 2011). Une étude réalisée en Nouvelle Calédonie (Perez et al. 2011), a permis de typer les souches portées par les différentes espèces de rats de cette région : *L. interrogans* du séro groupe Icterohaemorrhagiae chez *Rattus norvegicus* et *L. borgpetersenii* du séro groupe Ballum chez *Rattus rattus*. Lors d'une étude faite en Argentine, combinant la VNTR et la MLST pour l'identification des souches, la MLST a permis d'augmenter le pouvoir de discrimination global en mettant en évidence 3

nouveaux profils du sérovar Pomona (Caimi et al. 2012). La MLST présente donc plusieurs avantages, comme le fait qu'elle soit facilement standardisable, et que ses résultats soient sans ambiguïté et spécifiques. L'échange de données entre les laboratoires est également simplifié par les bases de données disponibles sur les banques génomiques. Cependant, elle ne permet pas d'identifier avec précision les sérovars Copenhageni et Icterohaemorrhagiae (Caimi et al. 2012) et elle présente l'inconvénient de nécessiter l'usage d'un séquenceur, faisant d'elle une méthode coûteuse.

À l'heure actuelle, les techniques de typage ont un pouvoir de discrimination de plus en plus élevé, ce qui permet une identification précise des souches de leptospires, qui sont soit responsables d'infection aiguë, soit retrouvées chez des hôtes réservoirs. La plupart peuvent être utilisées directement sur des échantillons de terrain, ce qui est un avantage considérable. Cependant, le plus gros défaut des techniques de typage actuelles reste une identification imprécise des sérovars Copenhageni et Icterohaemorrhagiae, qui sont, à ce jour, les plus souvent incriminés dans les cas de leptospirose humaine.

II) La leptospirose, une zoonose ré-émergente

Les zoonoses sont des maladies et infections qui se transmettent naturellement des animaux vertébrés à l'Homme et réciproquement (Toma 1996). Chaque zoonose se définit en fonction de sa fréquence et de sa gravité médicale, cette dernière étant appréciée en fonction de la mortalité et de la morbidité de la maladie chez l'Homme. La leptospirose est responsable d'un million de cas sévères chez l'Homme à travers le monde avec un taux de mortalité d'environ 10% (Picardeau 2013; Adler et al. 2011).

La leptospirose est une maladie à répartition mondiale, et est présente de manière endémique dans des régions ayant un climat tropical, favorable à la survie des leptospires dans l'environnement et à leur transmission à l'Homme (Bharti et al.

2003). L'incidence de l'infection humaine est donc plus grande dans les régions tropicales que dans les régions tempérées (Figure 3), mais elle est souvent sous-estimée par un manque de connaissance de la maladie par le personnel de santé ou bien par un manque de disponibilité des tests diagnostiques (Bharti et al. 2003).

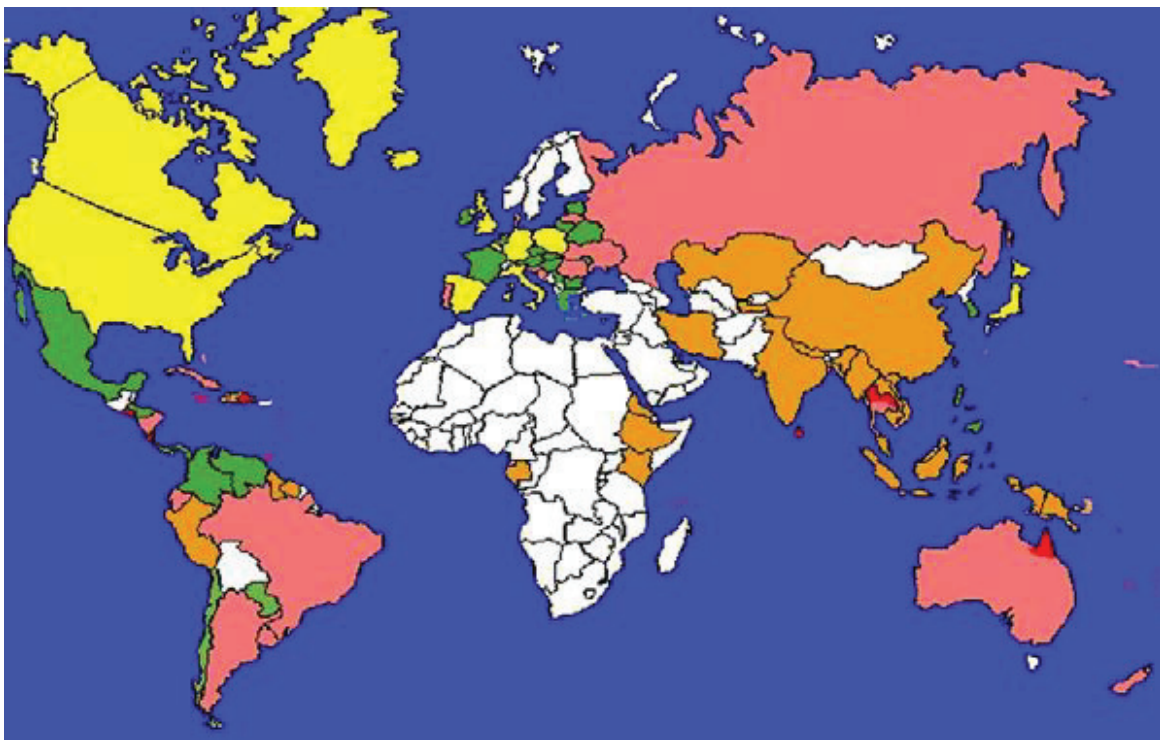


Figure 3 : Estimation de l'incidence globale annuelle de la leptospirose humaine, estimée sur des données de prévalences observées de 1996 à 2005 (Pappas et al. 2008).

Les couleurs indiquent la force de l'incidence : Dorée (non estimée mais probablement la plus élevée) > Rouge > Rose > Vert > Jaune > Blanc (aucune donnée).

Le réchauffement global et l'augmentation des précipitations sont des facteurs augmentant l'incidence de la leptospirose humaine (Hartskeerl et al. 2011), du fait que les calamités naturelles favorisent les épidémies humaines (Vijayachari et al. 2008; Baranton et Postic 2006). En effet, il a été rapporté que les fortes précipitations et les inondations facilitent la dispersion des leptospires dans l'environnement et augmentent ainsi le contact de l'homme avec la bactérie (Evangelista et Coburn 2010; Himsworth et al. 2013).

Ce phénomène est exacerbé dans les régions endémiques, par les conditions de vie précaires dans les pays en voie de développement (Pappas et al. 2008; Bharti et al. 2003). Les conditions socio-économiques défavorables dans ces pays offrent des conditions favorables à la transmission des leptospires à l'Homme, dont les principaux facteurs de risques sont une forte proximité de vie avec des animaux, comme les chiens ou les animaux de production (comme le bétail, les porcs ou les volailles) qui attirent les rongeurs (Reis et al. 2008; Lau et al. 2010). L'absence de système sanitaire et l'accumulation de déchets sont également des facteurs de risques importants (Reis et al. 2008; Johnson et al. 2004; Lau et al. 2010). Tous ces facteurs, repris dans la Figure 4, conduisent à une incidence dans les régions tropicales de supérieur à 10 cas pour 100.000 habitants, pouvant augmenter en fonction de la présence de période d'épidémies jusqu'à plus de 100 cas pour 100.000 habitants (Pappas et al. 2008; Hartskeerl et al. 2011).

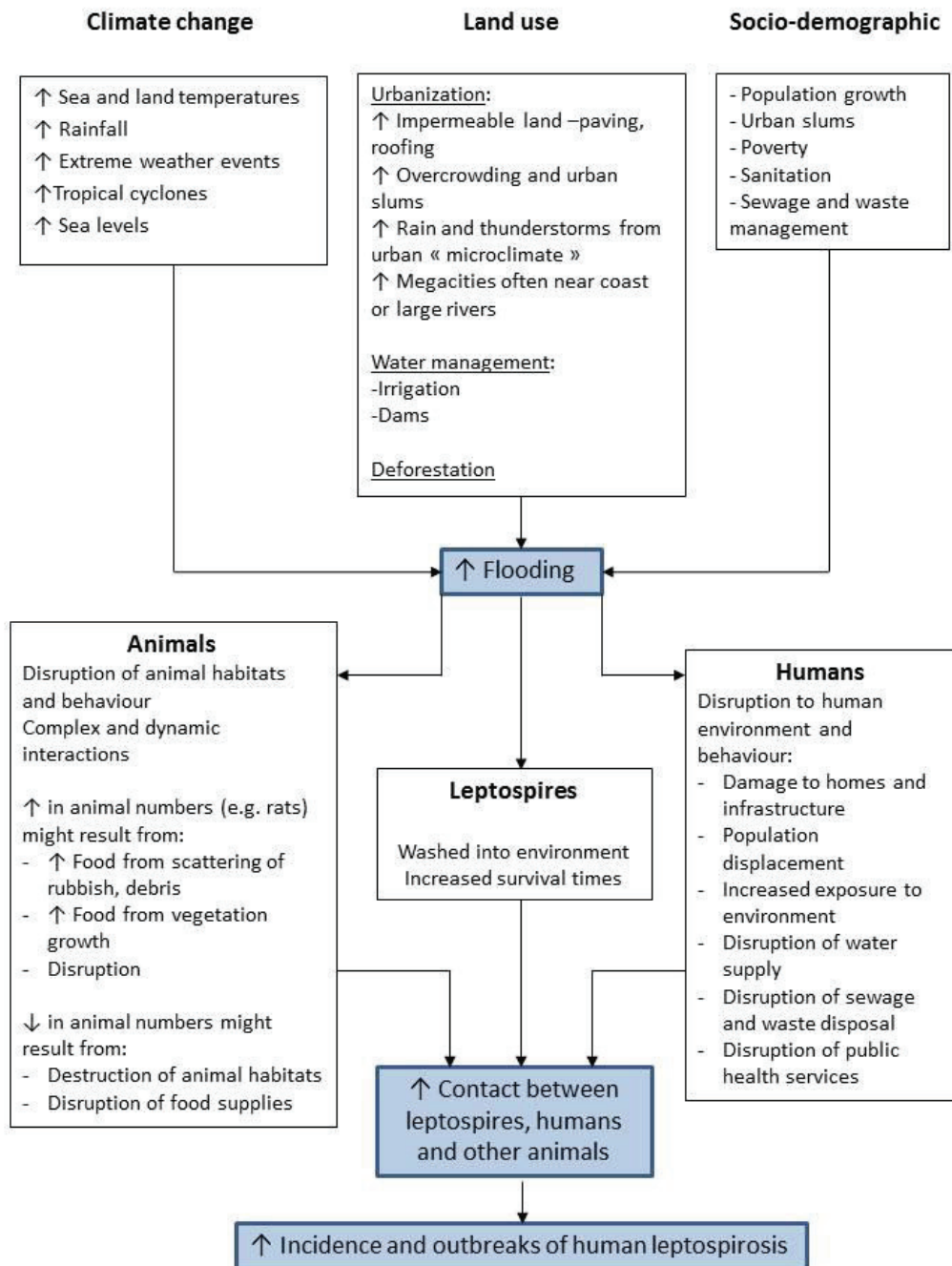


Figure 4 : Facteurs influençant l'incidence de la leptospirose humaine (Tulsiani et al. 2010). Ainsi, l'incidence de la leptospirose est influencée par des facteurs climatiques, territoriaux, sociodémographiques, associés à des éléments humains et animaux.

Dans les pays développés, l'incidence de la leptospirose humaine a baissé grâce aux politiques de mesures de prévention individuelles et collectives et à une augmentation des standards d'hygiène (Baranton et Postic 2006), permettant de diminuer le contact de l'Homme avec les agents de transmission des leptospire.

Plusieurs études ont pu montrer une fluctuation du nombre de cas en Europe, en fonction de la saisonnalité et des facteurs environnementaux (Baranton et Postic 2006; Pappas et al. 2008). Il est intéressant de souligner que l'incidence en France métropolitaine est l'une des plus élevée en région tempérée (0,5 cas/100 000 habitants) et que cette incidence est 10 à 100 fois plus élevée dans les DOM/TOM, situés en région tropicale (Picardeau 2013). L'étude et la surveillance de la leptospirose représentent aujourd'hui un enjeu de santé publique notable en France. Depuis quelques années, une recrudescence de cas humain a été observée dans ces pays développés due à une augmentation des activités de loisirs nautiques combinés ou non à des voyages, principalement en régions tropicales (Lau et al. 2010; Monahan et al. 2009). L'activité sportive aquatique est ainsi devenue un réel facteur de risque de transmission de la leptospirose (Baranton et Postic 2006; Wasiński et Dutkiewicz 2013; Nardone et al. 2004). Ce type de cas peut entraîner un problème lors du diagnostic car 1) les sérovars varient en fonction des régions du monde et ne sont pas tous inclus dans le diagnostic par la MAT, et 2) une possible co-infection ou un tableau clinique frustré peut également faire penser à une autre maladie tropicale (Lau et al. 2010). Ces cas de leptospirose humaine chez des voyageurs représentent un nouveau problème auquel la société moderne doit faire face.

II. 1) La leptospirose humaine

Le tableau clinique de la leptospirose chez l'Homme, présente plusieurs formes, allant d'un syndrome grippal à la maladie de Weil (défaillance rénale et hépatique, accompagnée ou non d'hémorragies et d'une détresse respiratoire, conduisant le plus souvent à la mort) (Adler et de la Pena Moctezuma 2010). Au cours de ces 30 dernières années, des complications pulmonaires se sont ajoutées au tableau clinique classique des cas sévères, avec une augmentation de la fréquence de cette complication qui varie aujourd'hui de 20 % à 70 % des cas (Bharti et al. 2003). La principale manifestation pulmonaire observée est une hémorragie alvéolaire entraînant une dyspnée et une hémoptysie (Dolhnikoff et al. 2007). La cause de ces hémorragies n'est pas encore certaine, elles pourraient être dues à l'action d'une toxine provoquant des vascularites et/ou à l'action de la réponse immunitaire de l'hôte lui-même (Dolhnikoff et al. 2007). Seul un nombre moyen à modéré de cellules

mononucléaires et neutrophiles est observé en association avec ces hémorragies, mais rarement des leptospires (Dolhnikoff et al. 2007; Nally et al. 2004). La leptospirose peut causer d'autres complications de fréquence variable, comme des uvéites, des méningites ou des problèmes cardiaques (Levett 2001), pouvant conduire à des séquelles. Les organes impliqués dans le tableau clinique de la leptospirose sont repris dans la Figure 5.

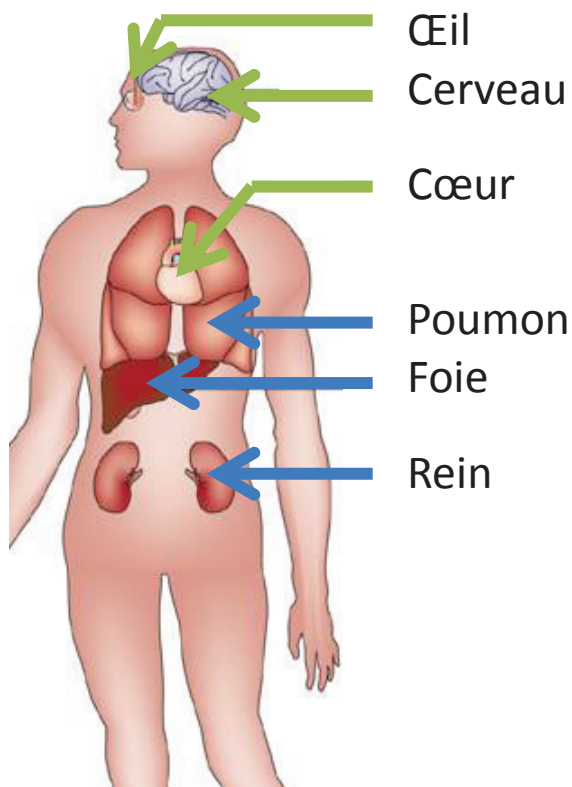


Figure 5 : Schéma des organes impliqués dans les symptômes de la leptospirose humaine. Les flèches bleues indiquent les organes impliqués dans le tableau clinique de la maladie de Weil. Les flèches vertes indiquent les organes lésés dans les cas de complications rares.

Le taux de mortalité de la leptospirose varie fortement en fonction du tableau clinique. Ainsi, ce taux est de 10 %, dans le cas d'une défaillance rénale et hépatique, correspondant à la maladie de Weil classique, mais dans les cas de complication pulmonaire, ce taux s'élève à plus de 50 % (McBride et al. 2005).

Les différentes études épidémiologiques réalisées dans les régions endémiques ou non endémiques, ont permis de montrer que le sérotype *Icterohaemorrhagiae* est

le plus fréquemment incriminé dans les cas de leptospirose humaine que ce soit en France ou à travers le monde (Picardeau 2013). Même si le nombre de cas dû à *Icterohaemorrhagiae* a légèrement diminué en France au cours de ces 30 dernières années, il reste tout de même le sérotype prédominant. Cependant, une recrudescence d'autres sérotypes est observée en France : *Grippityphosa*, *Australis* et *Sejroe* (Baranton et Postic 2006).

À l'heure actuelle, il est intéressant de noter que l'incidence d'*Icterohaemorrhagiae* n'a pas fortement diminué malgré l'existence d'un vaccin dirigé contre les leptospires de ce sérotype, comprenant le sérovar *Icterohaemorrhagiae*. Il est donc important de continuer la surveillance de la circulation de ce sérotype ainsi que des autres sérotypes afin de protéger au mieux la santé publique.

II. 2) La leptospirose animale

La leptospirose est une zoonose qui peut affecter aussi bien les animaux domestiques que les animaux sauvages (Hartskeerl et Terpstra 1996). Le tableau clinique varie fortement en fonction de l'espèce considérée. Toutes les espèces animales domestiques ont la particularité d'être à la fois des porteurs sains de certains sérotypes de *Leptospira* (forme chronique) et de développer des signes cliniques vis-à-vis des autres leptospires (forme aiguë). Dans cette partie, nous présenterons les différents symptômes de la leptospirose clinique en fonction de l'espèce animale domestique considérée, comme indiqué dans le Tableau II.

Tableau II : Signes cliniques et subcliniques de la leptospirose chez les principales espèces animales domestiques.

Espèces animales domestiques	Tableau clinique de la leptospirose	Organes lésés	Sérogroupes incriminés	Références bibliographiques*
Chien (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Défaillance rénale et hépatique ; Syndrome hémorragique pulmonaire	Rein, foie, poumon	Icterohaemorrhagiae, Australis, Grippotyphosa, Sejroe et Canicola	(Mastrorilli et al. 2007; Ellis 2010; Schuller et al. 2015)
Bovin (<i>Bos taurus</i>)	Avortement, prématuré, non-retour en chaleur, agalactie	Tractus génital ; mamelle	Hardjo, Pomona, Sejroe et Grippotyphosa	(Sanhueza et al. 2013; Ellis 2015; Ayrat et al. 2014)
Porc (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	Baisse de la reproduction, avortement	Tractus génital	Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae et Canicola	(Ellis 2015; Jacobs et al. 2015)
Cheval (<i>Equus caballus</i>)	Subclinique, uvéite, avortement	Yeux, tractus génital	Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae	(Verma et al. 2013; Wood et Townsend 1999)

* : Tableau synthétique établi sur base de la bibliographie datant de ces 15 dernières années.

- Le chien

Chez le chien, la leptospirose est une maladie multi-systémique dont les symptômes sont proches de ceux observés chez l'Homme : un état léthargique avec une anorexie (Schuller et al. 2015), accompagné d'une défaillance rénale et hépatique, due pour le rein à des lésions glomérulaires et tubulaires et pour le foie à une hépatite cholestatique associée une nécrose hépatocytaire (De Brito et al. 2006; Mastrorilli et al. 2007). De plus, depuis quelques années en Europe, les vétérinaires observent une recrudescence d'un syndrome hémorragique pulmonaire associé au tableau clinique classique (Schuller et al. 2015). Ce syndrome entraîne, comme chez l'homme, un fort taux de mortalité chez le chien. La fréquence de la leptospirose canine varie suivant les saisons et les régions (Lee et al. 2014). En effet, les études ont montré que les facteurs individuels varient en fonction des régions et que les chiens mâles présentent un risque plus élevé de développer une leptospirose, sans lien avec l'âge et la race (Lee et al. 2014). Par ailleurs, les sources de contamination des chiens sont multiples : par l'eau (les baignades ou le fait de boire dans des

points d'eau à l'extérieur) ou par un contact indirect avec la faune sauvage (Ghneim et al. 2007). Les principaux sérogroupes incriminés dans les cas de leptospirose canine en Europe sont Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Australis, Sejroe et Canicola (Ellis 2010; Ayrat et al. 2014). L'utilisation des vaccins canins contenant les sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Canicola a eu une influence sur l'incidence de ces sérogroupes dans les cas de leptospirose canine, mais la recrudescence des cas dus aux sérogroupes Grippotyphosa et Australis a conduit à l'évolution du vaccin vers deux nouveaux modèles tétravalents (Klaasen et al. 2013; Wilson et al. 2013), contenant quatre sérovars appartenant chacun à un des quatre sérogroupes incriminés au-dessus (Icterohaemorrhagiae, Canicola, Australis et Grippotyphosa) et commercialisés depuis peu de temps.

- **Les animaux de production**

Chez les bovins, la leptospirose présente rarement une forme clinique sévère (anémie hémolytique, jaunisse, fièvre), sauf chez de jeunes animaux (Ellis 2015). Dans la majorité des cas, elle présente une forme subclinique à chronique selon l'étape physiologique de l'animal. Chez les vaches en lactation, la forme subclinique, provoquée par le sérovar Hardjo, cause une chute de la production de lait (Higgins et al. 1980), qui peut avoir un fort impact économique. La forme chronique peut durer en moyenne, 5 à 12 semaines, en fonction de la souche infectante (12 semaines pour le sérovar Hardjo) (Ellis 2015), et entraîne principalement des problèmes de reproduction avec un non-retour en chaleur des animaux, des avortements, des prématurés ou une momification fœtal (Ellis et al. 1985; Guerra 2009). Le sérovar Hardjo est le plus souvent incriminé dans les cas de leptospirose bovine (Sanhueza et al. 2013), avec deux souches fréquemment rencontrées : *L. borgpetersenii* Hardjobovis et *L. interrogans* Hardjoprajitno (Ellis 2015). Les facteurs de risque de l'infection leptospirosique sont : la taille du troupeau, les contacts avec des troupeaux voisins, le pâturage, l'accès à des points d'eau contaminés et la présence ou non d'une politique de vaccination (Ryan et al. 2012; van Schaik et al. 2002), avec un vaccin contenant le sérovar Hardjo (Cortese et al. 2014). En France, les sérogroupes Australis, Sejroe et Grippotyphosa sont les plus fréquemment incriminés dans les cas de leptospirose bovine clinique (Ayrat et al. 2014).

Chez le porc, la leptospirose clinique entraîne une perte significative de la reproduction, pouvant être associée à des avortements (Huhn 1972), due principalement aux sérogroupes Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae et Canicola (Ellis 2015). La séroprévalence dépend principalement du système de management de l'élevage (hors-sol ou en extérieur), celle-ci augmente avec les précipitations qui favorise les conditions de transmission en élevage extérieur (Boqvist et al. 2012). Les sérovars Pomona, Bratislava et Tarassovi ne provoquent pas en général de leptospirose clinique sévère (Ellis 2015; Boqvist et al. 2012), mais les porcs peuvent présenter une séroprévalence plus ou moins élevée suivant les régions (Perea et al. 1994; Boqvist et al. 2012) associée ou non à une baisse de la reproduction, ce qui a conduit récemment au développement d'un vaccin hexavalent, contenant les sérogroupes Icterohaemorrhagiae, Canicola, Australis, Grippotyphosa, Pomona et Tarassovi (Jacobs et al. 2015), pas encore commercialisé en France.

- **Les chevaux**

Chez les chevaux, la leptospirose est peu étudiée malgré des pertes économiques non négligeables dues aux pertes de poulain ou l'arrêt de carrière suite à une uvéite (Ellis 2015). L'infection est majoritairement subclinique chez les adultes, mais des formes cliniques, allant d'une fièvre associée à une anorexie jusqu'à une anémie, un ictère et une défaillance rénale, peuvent être observées, principalement chez le poulain (Verma et al. 2013; Wood et Townsend 1999). Chez les juments gestantes, l'infection peut conduire à des avortements ou des prématurés (Timoney et al. 2011) et, chez les étalons, l'excrétion des leptospires peut se faire à la fois par voie urinaire ou séminale (Hamond et al. 2013 (a); Hamond et al. 2013 (b)). Deux à huit mois après l'infection initiale, un certain nombre de chevaux peuvent développer des séquelles ophtalmiques : une uvéite récurrente (Ellis 2015; Verma et al. 2013), accompagnée de la présence d'anticorps spécifiques dans l'humeur aqueuse et vitrée (Verma et al. 2010). La séroprévalence varie fortement en fonction des régions géographiques (Verma et al. 2013), mais reste difficile à établir due au caractère principalement asymptomatique de cette infection chez le cheval.

Le problème récurrent dans le monde vétérinaire concernant la leptospirose est l'ambiguïté de la relation de chaque espèce animale avec les sérovars de *Leptospira*. En effet, en fonction du sérovar considéré, certaines espèces développeront une

forme aiguë ou une forme chronique, selon qu'ils soient un hôte accidentel ou un hôte réservoir vis-à-vis du sérovar incriminé. L'origine biologique exacte de cette différence de réceptivité vis-à-vis de l'infection par un sérovar spécifique est encore inconnue actuellement.

II. 3) Porteurs chroniques et hôtes accidentels

D'un point de vue clinique, nous emploierons les définitions suivantes. Les « porteurs chroniques » présentent une infection ayant une expression clinique faible ou en général asymptomatique, et excrètent de grande quantité de leptospires dans l'environnement pendant une longue période ; au contraire, les « hôtes accidentels » présentent une forme sévère de l'infection avec des signes cliniques graves mais excrètent une quantité limitée de leptospires (Guerra 2009; Hartskeerl et Terpstra 1996). Les porteurs chroniques assurent la persistance des leptospires dans l'environnement, auquel sont exposés les hôtes accidentels. Ces porteurs jouent ainsi le rôle de réservoir des leptospires vis-à-vis des hôtes accidentels. Comme le définissent Viana et ses collaborateurs, un réservoir est une ou plusieurs populations connectées épidémiologiquement, dans laquelle le pathogène peut être maintenu de manière continue et à partir de laquelle l'infection est transmise à des populations cibles (ou hôtes accidentels) (Viana et al. 2014).

Cependant, le statut d'hôte accidentel ou de porteur chronique dépend du sérovar incriminé (cf. leptospirose animale) ; car certaines espèces de mammifère peuvent présenter les caractéristiques de l'un ou de l'autre. Les cas de leptospirose inapparente cliniquement peuvent s'expliquer par une co-adaptation sérovar-hôte ; comme le chien et le sérovar Canicola, le porc avec le sérovar Bratislava ou Pomona, ou le bovin et le sérovar Hardjo (Adler et de la Pena Moctezuma 2010). Ces adaptations sont reprises dans le Tableau III.

Tableau III : Hôtes réservoirs domestiques de certains sérovars de *Leptospira* et leur implication dans la transmission des leptospires à l'Homme.

Espèce animale	Sérovar de <i>Leptospira</i> associé	Facteurs de risques des cas humains *	Référence bibliographique **
Rat brun (<i>Rattus norvegicus</i>)	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni	Propriétaires de NAC (rongeurs), riverains de grève d'éboueurs	(Socolovschi et al. 2011; Pischke et al. 2010; Gaudie et al. 2008)
Chien (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Canicola	Propriétaires, vétérinaires	(Klarenbeek et Schuffner 1933; Rojas et al. 2010; Vincent et al. 2007; Gay et al. 2014; Barmettler et al. 2011)
Bovin (<i>Bos taurus</i>)	Hardjo, Pomona	Employés en abattoir ou exploitants	(Sanhueza et al. 2013; Higgins et al. 1980; Dreyfus et al. 2015)
Porc (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	Pomona, Bratislava, Tarassovi	Producteurs de porc	(Campagnolo et al. 2000; Ellis 2015)
Cheval (<i>Equus caballus</i>)	Bratislava (en débat)	/	(Ellis 2015; Ellis et al. 1983; Bharti et al. 2003)

* : Facteurs de risques identifiés à partir de cas humains référencés ces 15 dernières années dont l'origine de la transmission de *Leptospira* provenait d'animaux domestiques, dans les pays développés.

** : les références datant du XXème siècle portent sur le statut de « réservoir » de ces espèces domestiques; les références datant du XXIème siècle portent sur les cas de transmission à l'Homme rapportés dans la littérature.

Plus de 180 espèces animales peuvent être porteuses de leptospires, principalement les mammifères, mais également certains reptiles, amphibiens et oiseaux (Guerra 2009; Babudieri 1958). Les investigations sur leur statut exact vis-à-vis des leptospires ne font que débuter avec, par exemple, quelques études épidémiologiques françaises sur certaines classes de mammifères, comme les rongeurs ou les mustélidés (Moinet et al. 2010; Aviat et al. 2009). Tous ces animaux

pouvant être des porteurs excréteurs de leptospires, ils constituent donc une source potentielle de contamination de cette bactérie pour l'Homme.

II. 4) Le cycle de transmission de *Leptospira*

Le cycle de transmission des leptospires est complexe si on inclut toutes les espèces animales pouvant tenir un rôle dans le maintien des nombreux sérovars de *Leptospira* existants dans l'environnement, et plus encore si on mentionne toutes les espèces animales pouvant développer une leptospirose clinique.

Pour rendre ce cycle plus simple (Figure 6), les leptospires pathogènes pouvant infecter l'Homme et les animaux domestiques, se maintiennent chez des hôtes réservoirs grâce à une colonisation des tubules rénaux (Adler et de la Pena Moctezuma 2010). Les leptospires sont excrétés via l'urine de ces hôtes infectés et contaminent alors l'environnement (Goeijenbier et al. 2013). Deux voies de transmission sont possibles pour infecter l'Homme et les animaux domestiques : 1) par contact direct avec de l'urine ou des tissus d'animaux infectés ou 2) par contact (indirect) avec l'eau ou la boue contaminée (Goeijenbier et al. 2013), sachant que les leptospires peuvent survivre dans l'environnement pendant plusieurs mois grâce à leur capacité d'agrégation et de formation de biofilm (Ko et al. 2009).

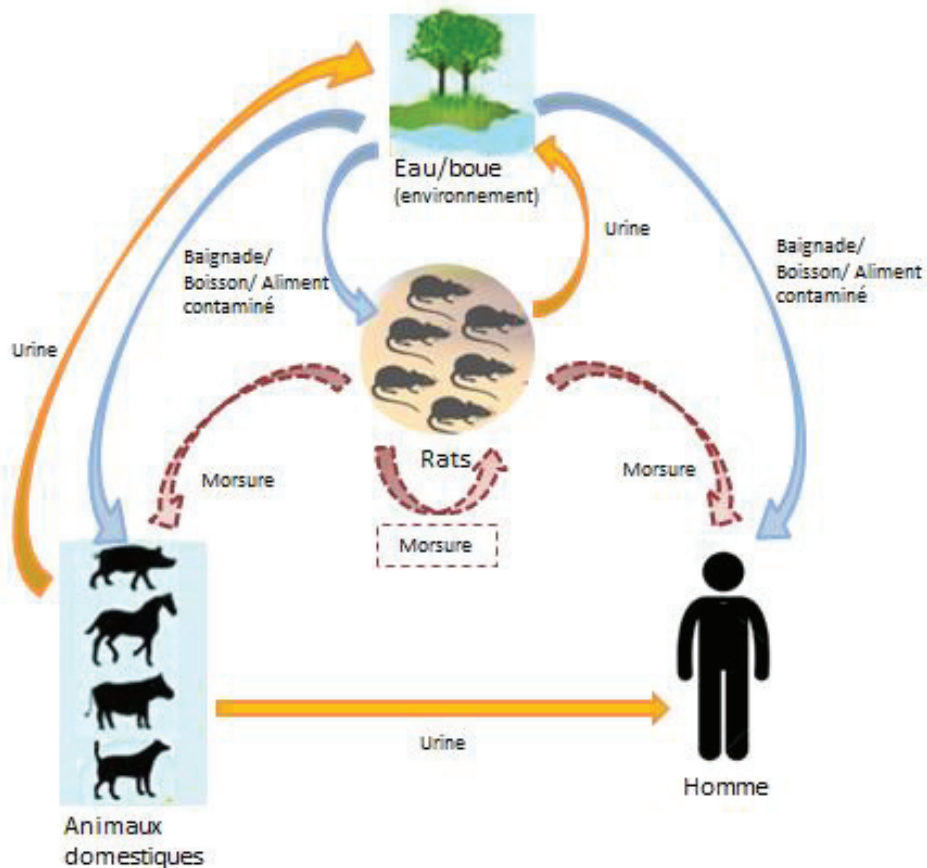


Figure 6 : Cycle de transmission de *Leptospira*.

Chez l'Homme et les espèces sensibles, la contamination se réalise donc par contact direct ou indirect ; les leptospires pénètrent alors par les membranes muqueuses ou la peau abrasée (Ko et al. 2009). Cette dernière semble être la voie la plus commune, chez l'Homme. Toutefois, plusieurs études ont rapporté que les membranes muqueuses étaient également de bonnes voies d'entrées, comme les muqueuses du nez, de la bouche ou des yeux ; dans certains cas particuliers, une transmission orale est associée à la présence de leptospires dans des nœuds lymphatiques mésentériques (Goeijenbier et al. 2013; Morgan et al. 2002; Haake et al. 2002). Après pénétration de la barrière cutanéomuqueuse, l'infection se développe en deux à 20 jours, entraînant les symptômes décrits précédemment. Les différents modes d'exposition de l'Homme associés aux sources de contamination identifiées sont repris dans le Tableau IV.

Tableau IV: Mode de transmission de *Leptospira* à l'Homme, illustrée de cas humains référencés (liste non exhaustive).

Mode de transmission	Nb de cas	Voie d'entrée	Lésions atypiques	Source contamination	Sérovar (ou espèce) incriminé	Référence bibliographique
Direct-morsure	1	Lésion cutanée	Morsure	Rat de compagnie (urine)*	Icterohaemorrhagiae	(Roczek et al. 2008)
Direct-morsure	1	Lésion cutanée	Morsure	Rat sauvage (urine ou salive)	Mankarso (Sérogroupe Ictero)	(Gollop et al. 1993)
Direct- urine	1	Membrane mucoale ou lésions cutanée	/	Rat de compagnie (supposition par l'urine)	Icterohaemorrhagiae	(Gaudie et al. 2008)
Indirect-baignade	52	Oral (membrane mucoale, tube digestif)	Présence de <i>Leptospira</i> dans les nœuds mésentériques	Lac dans l'Illinois	Grippotyphosa	(Morgan et al. 2002)
Indirect-baignade	80	Peau abrasée	Lésions cutanées saines	Rivières lors compétition Eco-challenge en Malaisie	<i>L. weilii</i>	(Haake et al. 2002; Sejvar et al. 2003)

Nb : nombre

Ictero : Icterohaemorrhagiae

* : la source de contamination était l'urine infectée ayant pénétré la barrière cutanée au moment de la morsure. La salive n'a pas été incriminée car le rat de compagnie avait mordu régulièrement son propriétaire qui n'a pas développé de leptospirose, mais aucune analyse directe n'a confirmé le statut « sain » de la salive.

Le plus grand nombre de cas regroupés de leptospirose humaine résultent souvent d'un contact indirect avec un environnement contaminé par des espèces animales sauvages réservoirs et excréteurs de leptospires.

Les principaux animaux réservoirs de cette bactérie sont les rongeurs (incluant le rat brun), et les insectivores ; cependant, dans certains cas décrits précédemment, le chien, le porc, le bovin et le cheval peuvent également être excréteur de certains sérovars de *Leptospira* (Goeijenbier et al. 2013). Les leptospires colonisent alors les tubules rénaux des hôtes réservoirs de manière dense et s'agrègent en une structure semblable à un biofilm (Ko et al. 2009), ce qui leur permet d'être excrété en grand nombre dans l'urine de ces animaux et ainsi contaminer l'environnement.

Les différentes espèces de la faune sauvage décrites comme pouvant être excrétrices de leptospires en Europe sont reprises dans le Tableau V.

Tableau V: Hôtes réservoirs de *Leptospira* dans la faune sauvage en Europe (liste non exhaustive).

Ordre	Famille et espèce animale	Sérovar isolé	Référence bibliographique
Rodentia	Arvicolinae (7 esp.) - <i>Microtus arvalis</i> - <i>Ondatra zibethicus</i> Castoridae (1 esp.) - <i>Castor fiber</i> Cricetinae (1 esp.) Gliridae (2 esp.) Murinae (6 esp.) - <i>Mus musculus</i> - <i>Rattus norvegicus</i> Myocastoridae (1 esp.) - <i>Myocastor coypus</i> Sciuridae (2 esp.)	Grippotyphosa, Ballum Grippotyphosa, Ictero Ictero* Ballum, Mozdok, Sejroe Ictero Australis, Ictero	(Kuiken et al. 1991) (Steinen et al. 1992; Aviat et al. 2009) (Hartskeerl et Terpstra 1996) (Van Der Hoeden 1958; Turk et al. 2003) (Aviat et al. 2009) (Vein et al. 2013; Aviat et al. 2009)
Insectivora	Erinaceidae (1 esp.) - <i>Erinaceus europaeus</i> Soricidae (6 esp.) - <i>Crocidura russula</i> Talpidae (1 esp.)	Bratislava, Sorexjalna Mozdok, Poi	(Wolff 1965) (Hartskeerl et Terpstra 1996)
Chiroptera	Chauve-souris (19 esp.)		
Lagomorpha	Leporidae (2 esp.) - <i>Lepus europaeus</i>	Grippotyphosa*, Bratislava*	(Hartman et Broekhuizen 1980)
Carnivora	Canidae (1 esp.) - <i>Vulpes vulpes</i> Felidae (1 esp.) - <i>Lynx pardinus</i> Mustelidae (8 esp.) Procyonidae (1 esp.)	Ictero * Sejroe	(Akerstedt et al. 2010) (Millán et al. 2009)
Ungulata	Bovidae (1 esp.) Cervidae (3 esp.) - <i>Dama dama</i> Suidae (1 esp.) - <i>Sus scrofa</i>	Pomona * Pomona *, Sejroe *	(Espí et al. 2010) (Espí et al. 2010; Krawczyk 2005)

* : résultat établi à partir d'observations basées sur des données sérologiques.

esp. : espèce animale

Ictero : sérovar Icterohaemorrhagiae ou Copenhageni

Basé sur un tableau publié par Hartskeel et Terpstra en 1996 (Hartskeel et Terpstra 1996).

Le rat brun (*Rattus norvegicus*) est connu comme étant le porteur d'un grand nombre de sérovars appartenant au sérogroupe Icterohaemorrhagiae et pouvant infecter l'Homme et les animaux (Adler et de la Pena Moctezuma 2010). Le sérogroupe Icterohaemorrhagiae est le plus fréquemment incriminé dans les cas de leptospiroses humaines, surtout dans les cas les plus sévères (Picardeau 2013) (Tableau des sérovars en annexe). Puisqu'il existe une forte association hôte-sérovar liant l'espèce *Rattus* et les sérovars Icterohaemorrhagiae et Copenhageni (Bharti et al. 2003), la présence de ces sérovars chez des patients humains indique la forte probabilité que le rat soit la source principale de ces bactéries (Villanueva et al. 2014). Cependant, aucun lien quantifiable entre la prévalence du portage de leptospires dans la population de rats et le nombre d'infections humaines n'a pu être établi à ce jour (Dupouey et al. 2014).

En outre, les modalités de transmission des leptospires de rat à rat sont encore inconnues au sein des colonies naturelles de ce rongeur, commensal de l'Homme et des élevages (Villanueva et al. 2014; Webster et al. 1995).

Au moins deux études suggèrent une transmission des leptospires en dehors des milieux aquatiques ou humides, ce qui peut impliquer qu'au sein d'une colonie, le passage de leptospires peut passer par des contacts directs de rat à rat. La première étude menée chez divers mustélidés rapporte une prévalence plus faible chez les espèces semi-aquatiques, par rapport aux espèces dont l'habitat était exclusivement terrestre (Moinet et al. 2010). La seconde étude menée sur les prévalences de portage de colonies urbaines de rat, suggère que le facteur de risque pour un rat d'être porteur de leptospires augmente avec le nombre de plaies de morsures (Himsworth et al. 2013). Le manque de connaissances sur les conditions écologiques de transmission rat-rat nécessite donc des études plus approfondies sur le portage des leptospires par ces rongeurs et leur environnement.

De plus, des études réalisées sur divers rongeurs évoluant dans un même environnement ont montré des différences de prévalences selon les espèces. Une

espèce semi-aquatique, comme le ragondin, présentait une prévalence de portage variant de 3 % à 10 % selon les régions étudiées (Vein et al. 2013; Aviat et al. 2009), alors que celle du rat brun, évoluant dans le même habitat, était de 35 % (Aviat et al. 2009). Ces espèces peuvent donc contaminer l'environnement dans lequel elles évoluent, en particulier les eaux douces, mais les différences de réceptivité à l'infection en fonction des conditions écologiques environnantes sont encore inconnues.

Par ailleurs, les cas de transmission directe des leptospires du rat à l'Homme, rapportés dans le Tableau IV, montrent la difficulté d'établir avec précision quelle matière virulente issue de l'animal infecté peut avoir contaminé l'Homme.

L'urine a été la première voie d'excrétion identifiée des leptospires chez le rat, découverte au début du XXe siècle (Ido et al. 1917). Elle permet une transmission des leptospires directement par contact avec une peau abrasée ou une muqueuse, ou par contamination de l'environnement, par exemple, dans le cas des litières des rats domestiques (Gaudie et al. 2008) ou dans une ville où la cohabitation Homme-rat est proche (Villanueva et al. 2014).

D'autres voies d'excrétion ont été incriminées depuis, comme la salive (Babudieri 1958). L'hypothèse d'une persistance des leptospires dans les glandes salivaires associée à une excrétion dans la salive a été régulièrement envisagée, à la suite de plusieurs cas documentés d'infection humaine consécutives à des morsures de chien ou de rat (Gollop et al. 1993; Luzzi et al. 1987; Roczek et al. 2008). Bien que la transmission par morsure de rat ait été reproduite en expérimentation sur cobaye (Ido et al. 1917), et que toutes les sécrétions de l'animal en phase aiguë puissent contenir des leptospires (Hanson 1982), la salive est communément considérée comme un fluide non virulent (Gollop et al. 1993; Babudieri 1958) mais aucune analyse spécifique avec des outils récents n'a été entreprise sur cette dernière pour vérifier son statut virulent. La dernière hypothèse établie, pour les cas de morsure rapportés dans le tableau IV, voudrait qu'il s'agisse d'une contamination de la plaie par de l'urine infectée, soit par contact direct, soit indirectement par contamination de la bouche du mordeur (Gollop et al. 1993; Roczek et al. 2008), mais aucune analyse salivaire spécifique avec des outils récents n'a été entreprise ces dernières années en dépit des cas référencés.

Il serait donc intéressant de mener des investigations sur d'autres voies potentielles d'excrétion des leptospires par le rat, afin d'approfondir nos connaissances sur les modes de transmission par ce rongeur, qui est la source principale de contamination humaine de *Leptospira*.

II. 5) Les facteurs de risque et les mesures de lutttes associées en santé publique

Dans les pays développés situés en zone de climat tempéré, un nombre limité de sérovars est responsable d'un faible nombre de cas de leptospirose humaine. (Guerra 2009). Les récents foyers de leptospirose ont été principalement liés aux activités sportives dans des environnements aquatiques, situés ou non en régions tropicales (Guerra 2009; Hartskeerl et al. 2011). Quant à l'augmentation de cas liée à une transmission urbaine ou périurbaine, elle serait probablement due à une prolifération des rats comme source de contamination (Dupouey et al. 2014). Cette prolifération de rongeurs découle généralement de la présence de sources alimentaires importantes pendant une période plus ou moins longue, comme cela a pu être observé à Marseille au cours de l'épisode de grève des éboueurs (Socolovschi et al. 2011).

La prévention et le contrôle de la leptospirose humaine sont complexes en raison du nombre élevé de sérovars existant et des différentes sources d'infection directes et indirectes impliquées dans la transmission à l'Homme, encore mal documentées. Le contrôle des cas humains passe donc, en premier lieu, par le contrôle des hôtes qui maintiennent la présence de leptospires dans l'environnement humain. Ce contrôle repose sur la destruction des populations de rats par l'utilisation de rodenticides, mais cette méthode n'a pas apporté de solution durable. Il est également important de mettre en place une séparation physique entre les rongeurs et les habitations humaines, tout en réduisant les niches écologiques attractives pour les rats grâce au nettoyage des poubelles et à la mise en place de mesures sanitaires (Hartskeerl et al. 2011). Le contrôle des cas humains passe en troisième lieu, par la réduction des infections dans les populations d'animaux domestiques susceptibles de véhiculer l'infection, comme le chien ou le bovin, par la mise en place de programme de vaccination (Ellis 2010; Ryan et al. 2012).

Pour protéger la santé publique, les points clés des mesures de lutte contre la leptospirose n'ont pas changé depuis la mise en place d'un comité d'expert, il y a 20 ans (McBride et al. 2005; WHO 2003). Il s'agit du diagnostic et de la prise en charge des cas cliniques de l'infection chez l'Homme, ainsi que de la prévention de la transmission passant par la connaissance des sources d'infection et de la route de transmission Homme-sources. Le rat étant considéré comme la source principale de transmission des leptospires, il se trouve au centre de ce programme de lutte. Il est donc nécessaire de connaître au mieux les interactions entre le rat et les leptospires afin de prendre les mesures de luttés les plus efficaces pour protéger la santé publique.

III) Le rat brun et les leptospires

III. 1) *Rattus norvegicus*

Les rongeurs (*Rodentia*) forment un ordre de mammifères caractérisé par une dentition particulière constituée d'une paire d'incisives à croissance continue sur chacune de leurs mâchoires, qui leur permet de ronger leur nourriture, de creuser des galeries ou de se défendre (Louarn et Quéré 2003). La famille des Muridae comporte plus de 1 150 espèces présentes dans une grande variété de biotopes à travers le monde, dont les espèces les plus connues sont les souris, les campagnols et les rats.

Le terme « rat » qualifie les rongeurs du genre *Rattus*, appartenant à la sous-famille des Murinae, auquel appartiennent également les souris (*Mus*). Les trois espèces de *Rattus* les plus répandues à travers le monde sont : le rat brun ou surmulot (*Rattus norvegicus*), le rat noir (*Rattus rattus*) et le rat polynésien (*Rattus exulans*). Ce dernier n'est présent que dans les régions d'Asie du sud-est (Thomson et al. 2014). En Europe, le rat brun et le rat noir sont les deux espèces ayant colonisé les différents environnements urbains, à travers l'histoire (Morand et al. 2015). Plusieurs différences morphologiques permettent de les différencier (Figure 7).

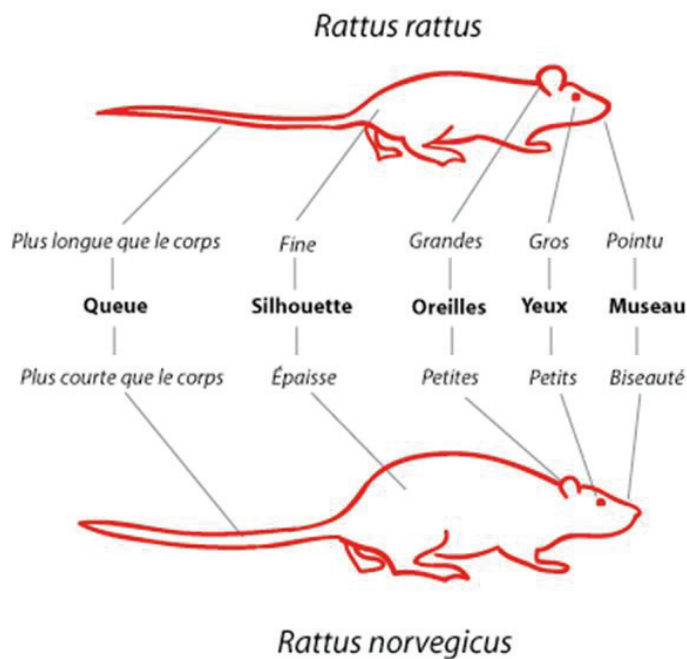


Figure 7 : Schéma détaillant les différences morphologiques entre le rat noir (*Rattus rattus*) et le rat brun (*Rattus norvegicus*).

Basé sur un diagramme du Centre de contrôle des maladies américain (CDC et U.S. Department of Housing and Urban Development 2006).

Ces deux espèces ayant un comportement « synanthropique », elles sont devenues les plus importants rongeurs vivant en commensalisme avec l'Homme. Historiquement, le rat brun est arrivé en Europe au XVIIIe siècle à bord des navires marchands en provenance d'Asie (Vigne et Villié 1995; Suckow et al. 2005), et a supplanté le rat noir, présent à l'époque, dans les environnements urbanisés. Aujourd'hui, le rat brun se trouve donc principalement dans des environnements urbains avec une forte densité humaine, bien qu'il puisse également s'adapter à divers biotopes ; alors que le rat noir ne se trouve plus que dans un environnement exclusivement rural (Morand et al. 2015).

En France, on évalue la population du rat brun (*Rattus norvegicus*) à un rat par habitant, en moyenne (Bridier et al. 2006). La démographie des populations de rats composant une colonie est sous l'influence de trois paramètres : la reproduction, la mortalité et les déplacements migratoires (Davis 1951), qui sont, tous les trois, dépendants de l'environnement : comme la présence de nourriture, d'abris ou de

prédateur. Les variations de taille et de structure des populations de rat brun seraient dues principalement aux taux de croissance et de reproduction associés aux migrations plutôt qu'au taux de mortalité (Glass et al. 1989). Les taux de croissance élevés sont principalement liés à la disponibilité d'une nourriture abondante et riche en énergie (Glass et al. 1989), alors que la mortalité des rats peut être causée par les prédateurs, la famine, par le contrôle de la population par l'homme et plus rarement par des agents pathogènes (Davis 1948; Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec 2006). Dans un environnement stable, la taille de la population d'une colonie trouvera un équilibre et restera constante dans le temps (Davis 1953), mais si des changements conséquents s'opèrent, comme une réduction drastique des ressources alimentaires, l'équilibre sera rompu et la taille de la population évoluera (Feng et Himsforth 2013), principalement en raison du changement de taux de survie des jeunes (Vadell et al. 2010). Le territoire des colonies urbaines de rats est délimité principalement par les constructions humaines linéaires (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec 2006), comme les rues ou les murs : un pâté de maison correspond alors au domaine vital d'une colonie isolée (Davis 1953; Traweger et al. 2006). Les déplacements migratoires à courtes distances en ville sont plutôt fréquents et fructueux (Easterbrook et al. 2005), ceux effectués sur de longues distances sont plus rares et sont provoqués par un changement environnemental majeur, par une limitation des ressources et/ou par une forte compétition intra spécifique (Gardner-Santana et al. 2009). Bien que vivant en groupes sociaux, les rats affichent peu de comportement coopératif (Inglis et al. 1996). Les combats tiennent une grande place dans les interactions sociales lors des périodes de reproduction ou de répartition des ressources alimentaires (Ziporyn et McClintock 1991). Ce type de comportement est influencé par les relations hiérarchiques de dominance (Feng et Himsforth 2013), qui peuvent également s'exprimer sous la forme du dominant qui rampe sur les dominés (Ziporyn et McClintock 1991). Cette hiérarchisation de la colonie joue un rôle important dans la régulation de la population de rat dans cette dernière (Storer et Davis 1953).

Le contrôle des populations des colonies de rats par l'homme peut se faire de plusieurs manières : par exemple par une régulation chimique par l'emploi d'anticoagulants ou par des captures (Rao 2006). Il est important de retenir que la maîtrise de la population de rats ne peut être efficace que par l'exercice d'une

pression constante et continue sur l'ensemble des paramètres influençant la dynamique de population (Davis 1951).

Rattus norvegicus est donc devenu le rat prédominant dans l'environnement urbain proche de l'homme (Dupouey et al. 2014). Les villes étant des environnements favorables au développement du nombre de rats, cela a conduit à des contacts étroits entre les rats et la population humaine, augmentant ainsi la probabilité d'une transmission des leptospires ou d'autres agents zoonotiques à l'Homme (Himsworth et al. 2013; Lau et al. 2010). En effet, le rat est considéré comme un nuisible et est vecteur de nombreuses zoonoses virales (Hantavirus) et bactériennes (*Leptospira*, *Pasteurella*, *Staphylococcus*, *Salmonella*) (Himsworth et al. 2014; Goeijenbier et al. 2013). Dans cette étude, c'est surtout son statut de principal porteur des sérovars Icterohaemorrhagiae et Copenhageni, du séro groupe Icterohaemorrhagiae (Dupouey et al. 2014; Ko et al. 2009), qui nous intéresse.

En effet, depuis plusieurs années, l'émergence de cas de leptospirose humaine a été rapportée dans les pays développés, particulièrement dans les zones urbaines (Jansen et al. 2005; Dupouey et al. 2014). En Europe, ce phénomène serait dû à plusieurs facteurs : 1) le changement climatique, 2) l'augmentation de la population de rat brun associée à la présence de porteurs de leptospires dans cette population, 3) une augmentation de la population humaine liée à une urbanisation de l'environnement (Dupouey et al. 2014). La leptospirose pourrait donc devenir dans un futur proche, un problème majeur de santé publique en Europe.

Les observations faites sur l'infection leptospirosique chez le rat (et énoncées dans la partie suivante) ont été réalisées principalement sur des souches de rat de laboratoire. Les souches les plus utilisées dans les modèles expérimentaux sont les souches Wistar et Sprague-Dawley qui ont été produites au début du XXème siècle, par sélection des reproducteurs chez des éleveurs spécialisés à partir d'individus sauvages de rat brun (*Rattus norvegicus*) (Suckow et al. 2005). Aujourd'hui, deux types de lignées existent : des lignées consanguines qui sont constituées d'une population génétiquement homogène permettant d'exclure l'influence des variations génétiques dans les expériences, et inversement des lignées non-consanguines quand la diversité génétique est nécessaire (Panthier et al. 2003). Une étude sur l'impact génétique de la sélection des souches de laboratoire a montré que les

souches Wistar et Sprague-Dawley ont un nombre moyen d'allèles par locus inférieur à celui observé chez les rats bruns sauvages : respectivement 2,3 et 1,7 chez les lignées non-consanguines contre 4,6 chez les individus sauvages. Mais la souche Wistar présente une hétérozygotie similaire à celle observée chez les rats sauvages (Klötting et al. 2003). Un rat de la souche Wistar présente donc une variabilité allélique moindre qu'un rat sauvage, malgré un bon rapport d'hétérozygotie. Ceci peut conduire lors d'une expérimentation, à une variabilité individuelle chez le rat de laboratoire, inférieure à celle qui serait observée chez un rat sauvage, en raison d'un plus faible impact de la variabilité génétique et phénotypique du rat de laboratoire. Il faut donc tenir compte de ce manque de diversité génétique dans les observations expérimentales faites sur l'infection leptospirosique avec des souches de laboratoire.

III. 2) L'infection asymptomatique par *Leptospira*, éléments connus et inconnus

Dès le début du XXe siècle, le rat a été identifié comme un porteur asymptomatique de *Leptospira*, capable de transmettre des leptospires pathogènes à des espèces sensibles qui en meurent (Ido et al. 1917). L'infection asymptomatique résulte d'un équilibre biologique particulier entre des espèces animales et certains sérovars de *Leptospira*. L'hôte ne présente alors aucun signe clinique et les leptospires sont capables d'éviter avec succès la réponse immunitaire pour coloniser les tubules rénaux. L'excrétion urinaire des leptospires chez ces hôtes est alors longue, constante et de forte intensité. Les mécanismes d'évasion immunitaire sont encore inconnus, malgré la présence de quelques signes de cette réponse, comme la production d'immunoglobulines anti-leptospires dans le sérum et dans l'urine, et l'observation de néphrite interstitielle (Monahan et al. 2009).

- Cinétique de l'infection

Les leptospires pénètrent habituellement par la peau abrasée et les surfaces muqueuses comme la conjonctive, à partir de contact direct avec des animaux infectés ou des sources contaminées (Monahan et al. 2009). Les voies d'entrée sont estimées être identiques à celles testées lors des modèles sensibles, comme le cobaye (*Cavia porcellus*) ou le hamster doré (*Mesocricetus auratus*). Cependant, aucune étude n'a démontré que ces voies d'entrée étaient celles qui permettaient

d'établir l'infection chez le rat brun, et de façon plus précise, de conduire à un portage asymptomatique.

Quelques études portant sur l'infection chez le rat ont permis d'établir la cinétique d'infection suivante, grâce à une inoculation intrapéritonéale permettant d'obtenir un taux d'animaux infectés avoisinant 90%. Après avoir pénétré dans l'organisme, les leptospires se disséminent dans tous les organes jusqu'à cinq jours post-inoculation (Athanzio et al. 2008). Cette phase est suivie d'une clairance des leptospires dans tous les organes, à l'exception du rein. A partir de neuf jours post-inoculation, les leptospires survivent dans les tubules rénaux et prolifèrent pour être excrétés par voie urinaire, comme montré dans la Figure 8 (Athanzio et al. 2008; Monahan et al. 2008; Monahan et al. 2009). La clairance dans les organes semble être associée à une production d'immunoglobulines détectables à partir du septième jour post-inoculation (Monahan et al. 2009). Chez le rat brun, les leptospires ont un tropisme cellulaire pour le rein qui est un site d'échappement immunitaire favorable à leur maintien à long-terme (Monahan et al. 2009; Ko et al. 2009; Werts 2010).

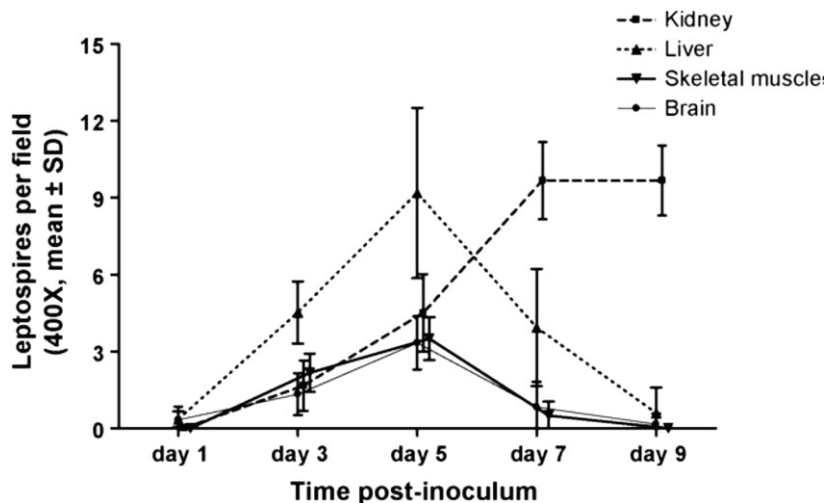


Figure 8: Cinétique de dissémination des leptospires pathogènes chez le rat Wistar, exprimés en moyenne et écart-type, et détectés par coloration argentique et immunofluorescence des leptospires (Athanzio et al. 2008).

La phase migratoire des leptospires, du système circulatoire jusqu'à la lumière des tubules rénaux, a été étudiée en premier lieu chez le porc et la souris, qui présentent une forme chronique de la leptospirose selon le sérovar utilisé. D'après une étude

expérimentale réalisée chez le porc domestique (*Sus scrofa*) infecté par voie intrapéritonéale avec le sérovar Pomona, les leptospires migrent de l'endothélium vasculaire à l'interstitium rénal, durant la première semaine d'infection. Au cours de cette phase dite « interstitielle », la migration des leptospires provoque des œdèmes et des vascularites. Puis, durant la phase tubulaire (seconde semaine d'infection), une réaction inflammatoire lymphocytaire et macrophagique se met en place au niveau périvasculaire et interstitiel, associée à l'établissement et au maintien des leptospires dans la lumière des tubules proximaux (Cheville et al. 1980). Ces résultats étaient similaires à ceux observés chez la souris, infectée avec le même sérovar par la même voie d'inoculation (Marshall 1976). Toutefois, chez le rat, malgré une phase de migration précoce et l'établissement des leptospires dans la lumière tubulaire au cours de la deuxième semaine d'infection, les lésions correspondant à l'infiltration lymphocytaire ne sont observables qu'à partir de 21 jours post-inoculation (Nally et al. 2005; Tucunduva de Faria et al. 2007). Ceci suggère que la migration des leptospires chez le rat se déroule sans dommage tissulaire majeur ou sans stimulation de la réponse immunitaire cellulaire locale, à la différence de ce qui s'observe chez le porc et la souris (Monahan et al. 2009).

- **La réponse immunitaire**

L'infiltration lymphocytaire, observable à 21 jours dans le modèle expérimental « rat », correspond à une néphrite interstitielle. Cette lésion rénale peut être multifocale avec des grades de sévérité allant de moyen à élevé (Monahan et al. 2008), mais n'est observable que chez 30 % à 70 % des individus au cours des premiers mois d'infection (Tucunduva de Faria et al. 2007). Il s'agit de la seule lésion imputable à la leptospirose chez le rat, car elle est observable à la fois en infection expérimentale et en infection naturelle (Tucunduva de Faria et al. 2007). L'inflammation provient d'une infiltration riche en lymphocytes avec quelques agrégats de macrophages, localisée principalement dans l'interstitium de la région tubulaire (Monahan et al. 2008).

D'un point de vue sérologique, la production d'immunoglobulines anti-leptospires est détectable à partir du septième jour post-inoculation, et semble être associée à la destruction des leptospires dans les différents organes du rat, à l'exception du rein (Monahan et al. 2009). Cette présence d'anticorps est détectable à la fois chez des rats infectés naturellement et expérimentalement (Sterling et Thiermann 1981).

Cependant, le titre en anticorps peut varier en durée et en intensité, en fonction du sérovar considéré (Thiermann 1981). Ainsi, un rat infecté par le sérovar Icterohaemorrhagiae aura un titre en anticorps avoisinant 1:1280 durant sept mois, alors qu'avec le sérovar Grippytyphosa, le titre sera de 1:320 et les anticorps auront disparu à trois mois post-inoculation. La réponse immunitaire humorale et cellulaire varie donc fortement en fonction de l'individu et du sérovar de *Leptospira* infectant, mais le maintien des leptospires chez le rat provient également d'une adaptation de ces dernières à l'environnement *in vivo*.

- **Adaptation métabolique des leptospires**

Pour se maintenir dans le rein, les leptospires adaptent leur métabolisme à l'environnement rénal. En effet, les leptospires excrétés par voie urinaire ont une expression protéique et une présentation antigénique différentes de celles observées en culture *in vitro* (Monahan et al. 2008). Ainsi, les leptospires ayant colonisé les tubules de souris infectées présentent une réaction d'agglutination moins forte que celle observée pour la même souche de leptospires maintenue en culture (Faine 1962a; Faine 1962b). Ceci est dû à une différence d'expression antigénique fondamentale entre une souche ayant une origine *in vivo* ou *in vitro*. L'hypothèse est que cette différence d'expression protéique et de sous-régulation de l'expression des antigènes spécifiques facilite le maintien des leptospires dans les tubules rénaux et la persistance de leur excrétion urinaire en présence d'anticorps spécifique de l'hôte (Monahan et al. 2009). L'excrétion urinaire de ces bactéries chez ces hôtes est alors longue (> 7 mois), constante et de forte intensité (10^5 - 10^7 leptospires/ml) (Monahan et al. 2008). Elle permet ainsi au rat brun « porteur chronique » de jouer vraisemblablement son rôle de réservoir en assurant la persistance des leptospires à long terme dans l'environnement auquel sont exposés les hôtes accidentels, tel que l'Homme et les animaux domestiques.

- **Sérogroupe maintenus par le rat brun**

Le rat brun (*Rattus norvegicus*) est donc connu comme étant le principal porteur du sérovar Icterohaemorrhagiae (Bharti et al. 2003), grâce à leur maintien à long terme dans les tubules rénaux au cours d'une infection asymptomatique chez cet animal. Cependant, d'autres sérogroupe, comme Ballum ou Pomona, peuvent être

parfois identifiés par typage moléculaire chez des rats bruns porteurs chroniques de leptospires, lors d'études de terrain (Tableau VI).

Tableau VI : Sérogroupes identifiés chez le rat brun (*Rattus norvegicus*), lors d'études épidémiologiques fondées sur le typage moléculaire (liste non exhaustive).

Région étudiée	Sérogroupes identifiés	Proportion du séro groupe Ictero*	Référence bibliographique
Antilles françaises	Ictero, Ballum	5/6	(Bourhy et al. 2013)
Nouvelle-Calédonie	Ictero	7/7	(Perez et al. 2011)
Japon (Tokyo)	Ictero	18/18	(Koizumi et al. 2009)
Portugal	Ictero, Ballum, Pomona	1/3	(Collares-Pereira et al. 2000)

Ictero : séro groupe Icterohaemorrhagiae.

* : proportion du nombre de rat porteur du séro groupe Icterohaemorrhagiae sur le nombre total de rat identifié comme étant porteur de *Leptospira*.

Une seule étude expérimentale a étudié la durée de portage rénal chez le rat brun, en fonction du sérovar infectant (Thiermann 1981). Ainsi, le rat serait capable d'excréter des leptospires appartenant au sérovar Icterohaemorrhagiae jusqu'à 220 jours minimum, alors que les leptospires du sérovar Grippotyphosa ne sont capables de se maintenir chez le rat et d'être excrétées par cet animal que durant un mois. Cette différence semblerait provenir de la co-adaptation sérovar-hôte, qui est observée dans le cas du sérovar Icterohaemorrhagiae (Thiermann 1981). Toutefois, le portage rénal d'un autre sérovar étant possible chez le rat brun, celui-ci permettrait dans une moindre mesure, en comparaison avec le sérovar Icterohaemorrhagiae, de maintenir ces leptospires dans l'environnement proche de l'Homme et des animaux domestiques.

Les connaissances sur l'infection asymptomatique montrent que l'interaction hôte-pathogène au niveau cellulaire est le domaine le plus étudié à l'heure actuelle, du fait des nombreuses études réalisées sur la réponse immunitaire de l'hôte et sur l'adaptation des leptospires à la colonisation *in vivo*. En comparaison, la cinétique de l'infection n'a été que peu étudiée, sans compter que la voie d'inoculation utilisée

dans ces études expérimentales, ne mime pas les conditions naturelles d'infection. Ainsi, les voies d'entrée des leptospires chez le rat brun restent méconnues, tout comme la migration exacte des leptospires jusqu'aux tubules rénaux et les facteurs intrinsèques des sérovars assurant la durée du portage.

D'autre part, ces connaissances sont fondées à la fois sur des études expérimentales et de terrain chez le rat brun, mais également chez d'autres espèces animales. Or l'extrapolation d'observation d'une espèce à l'autre doit être prise avec prudence, du fait des variations biologiques liées à la spécificité d'espèce. Il est donc nécessaire de recentrer l'étude de l'infection asymptomatique exclusivement chez l'animal considéré comme la principale source de contamination de l'Homme : *Rattus norvegicus*, afin de connaître avec exactitude les paramètres de cette infection.

IV) La leptospirose chez le rat : apports des études épidémiologiques et des études de l'infection expérimentale

IV. 1) Les études épidémiologiques chez le rat sauvage

Plusieurs études épidémiologiques se sont intéressées à la prévalence du portage des leptospires chez les rats bruns dans divers environnements : urbain, rural, dans des pays développés ou en voie de développement. Elles ont permis de mieux comprendre les facteurs pouvant influencer l'interaction leptospires-rat dans l'environnement, même s'il reste encore des points à élucider (Himsworth et al. 2013).

Tout d'abord, certaines études épidémiologiques avaient pour objectif de caractériser l'infection asymptomatique naturelle observée dans les populations de rat sauvage, mais celle-ci est fortement influencée par la co-adaptation hôte-pathogène qui se manifeste : d'une part, par la différence non significative des lésions rénales entre un individu porteur ou non porteur de leptospires (Tucunduva de Faria et al. 2007); et d'autre part, par un titre en anticorps faible ou non détectable par la MAT chez un rat porteur de leptospires (Agudelo-Florez et al. 2009; Aviat et al. 2009). Ainsi, le

manque de connaissance sur le contexte infectieux et environnemental de l'animal sauvage rend difficile l'interprétation des résultats de terrain.

Ensuite, ces études ont permis d'étudier les conditions écologiques intrinsèques et extrinsèques des colonies de rongeurs où les leptospires étaient maintenus. Ainsi, la probabilité d'infection chez un rat augmente généralement avec l'âge et le nombre de plaies de morsures (Krojgaard et al. 2009; Himsworth et al. 2013), en raison de l'augmentation des opportunités d'un individu d'être exposé à cette bactérie au cours du temps et des liens sociaux (Bharti et al. 2003; Himsworth et al. 2013). Il n'y a pas toujours de différence significative de portage entre les sexes (Costa et al. 2014). Par ailleurs, le nombre de rats infectés par colonie ne semble pas être lié au nombre de rats qui composent la colonie (Himsworth et al. 2013), alors que la dynamique de population des rats et celle du portage des leptospires semblent toutes les deux liées aux conditions météorologiques (température et hygrométrie) (Perez et al. 2011; Himsworth et al. 2013). L'impact des changements de dynamique de population sur l'évolution de la prévalence par un contrôle actif des rongeurs est encore inconnu (Himsworth et al. 2013), tout comme la dynamique de transmission des souches de leptospires dans ces populations de rongeurs. Les caractéristiques des populations de rats porteurs de leptospires présentent encore quelques inconnues qu'il est nécessaire d'élucider pour modéliser au mieux la transmission de l'infection leptospirosique dans les colonies de rats.

Enfin, ces études ont permis d'explorer la distribution géographique des leptospires à travers la mesure des prévalences du portage rénal chez le rat ainsi que les facteurs environnementaux pouvant les influencer. La fréquence et la distribution de ce pathogène a évolué au cours du temps en association avec les changements de distribution de la population humaine (Himsworth et al. 2013). Si la leptospirose était autrefois une maladie surtout liée à un environnement rural avec ou sans contact étroit avec les animaux (Vijayachari et al. 2008; Guerra 2009), aujourd'hui son incidence augmente principalement dans les villes des pays développés et en voie de développement (Dupouey et al. 2014; Reis et al. 2008). Les études réalisées dans les environnements urbains ont montré une forte hétérogénéité de prévalence de portage chez les rats en fonction des régions étudiées. D'une part, il y a une variation des prévalences entre les villes, où les études ont été faites à travers le monde : 17% à Tokyo (Koizumi et al. 2009), 21% à Medellin (Agudelo-Florez et al. 2009), 53% à Copenhague (Krojgaard et al. 2009) et 80% à Salvador (de Faria et al.

2008). D'autre part, il y a une variation des prévalences entre les villes d'un même pays (Turk et al. 2003) et même entre les différents quartiers d'une même ville (Koizumi et al. 2009; Krojgaard et al. 2009; Himsworth et al. 2013). Cette variation de la prévalence, même à très courtes distances, suggère une spécificité liée au site, pouvant provenir 1) d'un petit territoire de la colonie, 2) de faible transmission entre les différentes familles de rongeurs, ou bien 3) d'un microenvironnement physique favorable au rat, au facteur de transmission ou au pathogène (Himsworth et al. 2013). Les modalités de transmission des leptospires entre les rats qui pourraient expliquer ces variations, n'ont pas encore été élucidées à ce jour.

Les études épidémiologiques tiennent une place importante dans la compréhension de la position du rat dans le cycle de transmission des leptospires à l'homme, d'une part, et des facteurs influençant la fréquence de ces bactéries au sein de ces populations de rongeurs, d'autre part. Cependant, la plus grande limite des études menées sur le terrain est l'ensemble des facteurs écologiques qui ne sont pas toujours observables ou mesurables. Ainsi, les études réalisées chez le rat sauvage sont des images d'un moment précis, focalisant uniquement sur un seul élément de l'image. Il est donc difficile de comprendre cette image sans connaître le cadre exact dans lequel elle a été prise. C'est pourquoi il est nécessaire d'étudier la leptospirose chez le rat grâce à des modèles expérimentaux qui permettent de contrôler la majorité des éléments environnementaux.

IV. 2) Le modèle d'infection expérimentale chez le rat de laboratoire

Il existe deux types de modèle d'infection expérimentale, classés en fonction de la forme de la maladie : 1) sur des espèces dites sensibles, comme le cobaye (*Cavia porcellus*) et le hamster (*Mesocricetus auratus*), qui reproduisent une cinétique d'infection et des signes cliniques similaires à ceux observés chez l'Homme, avec une dose d'inoculum faible (<100 leptospires) ; 2) sur des espèces dites résistantes, comme le rat brun (*Rattus norvegicus*), qui permet l'étude du portage rénal et de l'excrétion urinaire mais nécessite l'utilisation de forte dose d'inoculum (Ko et al. 2009). L'origine biologique de la faible réceptivité du rat à une infection causée par une faible dose d'inoculum est encore inconnue.

Le modèle rat est un modèle idéal pour l'étude de la colonisation rénale car l'infection chez cet animal n'entraîne ni la mort, ni des lésions histopathologiques notables (Athanzio et al. 2008). La colonisation rénale est obtenue chez 50 % des individus avec une dose contenant 10^4 leptospires avec une souche de *L. interrogans* Copenhageni. Par ailleurs, pour une colonisation à 100 % lors de ce modèle, un inoculum de 10^6 à 10^8 leptospires doit être utilisé (Athanzio et al. 2008), ce qui est largement supérieur à la dose létale 50 pratiquée chez les espèces sensibles.

Tous les modèles d'infection « rat » ont été réalisés à partir d'injection intrapéritonéale, permettant une inoculation reproductible de la dose utilisée, mais ne reflétant pas une transmission naturelle du pathogène (Evangelista et Coburn 2010). Cette voie d'inoculation pourrait provoquer un biais de cinétique par un temps de dissémination plus court comparé à ce qui pourrait se passer lors d'une infection naturelle (Athanzio et al. 2008). En effet, lors d'études sur le modèle d'infection aiguë chez des espèces sensibles, d'autres voies d'inoculation ont été testées en comparaison ou non de la voie intrapéritonéale, comme la voie conjonctivale, sous-cutanée, intradermique ou épi-cutanée (Tableau VII). Or elles ont toutes présenté des différences significatives sur la cinétique de dissémination et pour certaines sur les doses nécessaires (Coutinho et al. 2014; Lourdault et al. 2009; Zhang et al. 2012). Il serait donc nécessaire d'explorer d'autres voies d'inoculation plus proches des conditions naturelles chez le modèle « rat », afin de mieux connaître les caractéristiques de l'infection chez ce rongeur en éliminant un potentiel biais dû à la voie d'inoculation.

Tableau VII : Voies d'inoculation utilisées dans les modèles expérimentaux d'infection par *Leptospira* chez les espèces sensibles et leurs conséquences sur la cinétique de l'infection.

Espèce Animale*	Voie d'inoculation	Dose létale 50	Dose de l'inoculum	Observation sur la cinétique de l'infection	Référence bibliographique
Cobaye (<i>Cavia porcellus</i>)	Intra-péritonéale	133 leptospires	1.10 ⁸ leptospires	Mort des animaux à 6 jours p.i.	(Lourdault et al. 2009)
	Sous-cutanée	251 leptospires	1.10 ⁸ leptospires	Mort des animaux à 7 jours p.i.	
	Conjonctivale	2.10 ⁵ leptospires	1.10 ⁸ leptospires	Mort des animaux à 7-9 jours p.i.	
Hamster (<i>Meso-cricetus auratus</i>)	Sous-cutanée	/	2.10 ⁶ leptospires	Réponse sérologique faible à 8 jours p.i.; pic de la charge bactérienne rénale à 6 jours p.i.	(Coutinho et al. 2014)
	Intra-dermique	/	2.10 ⁶ leptospires	Réponse sérologique élevée à 8 jours p.i.; pic de la charge bactérienne rénale à 5 jours p.i.	
Cobaye	Cutanée: peau rasée	/	5.10 ⁸ leptospires	Pas de signes cliniques à 6 jours p.i.	(Zhang et al. 2012)
	Cutanée: peau abrasée	/	5.10 ⁸ leptospires	Ictère à 4 jours p.i.	

* : aucune étude comparative sur la cinétique de l'infection chez le rat en fonction de différentes voies d'inoculation n'est référencée à ce jour.

p.i.: post-inoculation

La dissémination des leptospires chez le rat brun, présentée dans la partie précédente, n'a été déterminée que par une seule étude, celle d'Athanazio et collaborateurs en 2008. Les méthodes d'analyse utilisées au cours de cette étude étaient l'isolement et l'histologie avec l'immunofluorescence et la coloration argentique Warthin-Starry. Il est important de souligner que les techniques histologiques ont un pouvoir de détection des leptospires dans les tissus infectés, similaire, sinon inférieur à certaines techniques plus modernes comme la PCR ou la qPCR (Fornazari et al. 2012; Chagas-Junior et al. 2012), et ce malgré le fait que la coloration Warthin-Starry soit reconnue comme une méthode histologique de choix pour l'identification des leptospires dans des échantillons tissulaires de terrain (Guerra 2009).

Un modèle récent sur des portées de ratons a montré une sensibilité des jeunes rats aux leptospires qui disparaissait rapidement avec l'âge (Muslich et al. 2015). Les jeunes de moins de deux semaines sont sensibles à l'infection, conduisant à la mort des individus, à des doses pouvant descendre jusqu'à 10^2 leptospires. Ils présentent alors des signes cliniques semblables aux espèces sensibles, comme un ictère, des troubles neurologiques dus à des vascularites qui ont conduit à des hémorragies cérébrales, une perte de poids de 5 % à 15 %, ainsi que des hémorragies massives ou des pétéchies dans les poumons. Ces signes sont associés à une persistance des leptospires dans des organes où elles sont habituellement éliminées chez l'adulte. L'excrétion urinaire a été semblable à ce qu'on observe chez l'adulte. Il n'y avait pas de relation entre la production des anticorps et l'excrétion urinaire, les jeunes excréteurs pouvant avoir ou non des anticorps détectés par la MAT. Le passage du statut sensible à résistant pourrait alors s'expliquer par la maturation du système immunitaire mais cela reste à approfondir (Muslich et al. 2015).

Peu d'études portent sur la production des anticorps chez les rats lors d'une infection expérimentale. Seule l'étude de Thiermann est à citer. Tous les rats infectés ont développé rapidement des titres élevés en anticorps (entre 1:1280 et 1:2560 vis-à-vis des antigènes du sérovar *Icterohaemorrhagiae*), qui ont persisté durant plus de sept mois. Les rats infectés étaient également excréteurs de leptospires dans leurs urines durant plusieurs mois (> 7 mois). Il est intéressant de noter que l'excrétion urinaire et l'évolution des titres en anticorps varient fortement en fonction du sérovar considéré. En effet, lors d'une infection avec un sérovar moins adapté à l'espèce *Rattus*, comme *Grippotyphosa*, les titres en anticorps et l'excrétion urinaire sont moins élevés et durent moins longtemps (Thiermann 1981).

Ces études sont très intéressantes et surtout utiles pour comprendre l'interaction entre les leptospires et le rat, mais étant souvent uniques, elles n'ont pas été confrontées à la critique scientifique. Ainsi, l'ensemble des connaissances obtenues avec le modèle expérimental « rat » souffre de ce manque de répétabilité. De plus, certaines études sont fondées sur des techniques histologiques dont la sensibilité est inférieure aux techniques de biologie moléculaire actuelles. Il est donc nécessaire de reproduire plus d'études chez le rat avec des méthodes d'analyses récentes afin de vérifier et d'affiner les observations décrites au cours de ces modèles.

Peu d'études intègrent les deux aspects de la recherche : infection naturelle et expérimentale. Lors d'une étude comparative sur les lésions rénales provoquées par l'infection expérimentale et naturelle (Tucunduva de Faria et al. 2007), la néphrite interstitielle a été la seule lésion observable chez 30 % à 70 % des rats inoculés expérimentalement, à partir d'un mois. Chez les rats sauvages, plusieurs types de lésions rénales ont pu être observés comme une néphrite interstitielle, une néphrose hyaline, une dilatation tubulaire, des fibroses interstitielles, une calcification multifocale... Cependant, la néphrite interstitielle a été observée avec la même fréquence dans le groupe des individus porteurs de leptospires et dans le groupe des individus non porteurs. Les conclusions observationnelles sur la cause de la néphrite seraient donc, dans le cas de l'expérimentation, imputables à la leptospirose et dans le cas de l'approche terrain, non imputable à la leptospirose. Ceci montre qu'il est nécessaire de combiner les observations faites à la fois au cours de modèles expérimentaux « rat » et lors d'études épidémiologiques avec une infection naturelle, afin de définir au mieux les caractéristiques de l'infection chez ce rongeur et de pouvoir prévenir la transmission des leptospires à l'Homme.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif de ce travail de thèse a été de caractériser l'infection asymptomatique par *Leptospira* chez le rat brun, considéré comme hôte réservoir de premier plan, afin de mieux comprendre le rôle de ce rongeur dans la persistance de la bactérie, conduisant à sa transmission à l'Homme, dans les conditions naturelles. Le but, *in fine*, des nouvelles connaissances que nous aurons acquises sera de paramétrer des modèles mathématiques de l'infection chez ce rongeur pour analyser les conditions d'apparitions d'épidémies de leptospirose et tester des scénarios de prévention et de contrôle pour la santé publique.

À ce jour, les connaissances sur l'infection asymptomatique par *Leptospira* chez le rat sont limitées, tout comme les modalités de transmission rat-rat qui permettent un maintien de cette bactérie dans les colonies de ce rongeur et de contaminer des environnements proches de l'Homme. Nous avons décidé de réaliser ce travail avec l'objectif de rester au plus près de ce qui se passe sur le terrain afin de simuler au mieux l'infection « naturelle ». C'est pourquoi nous avons réalisé un travail qui a intégré deux aspects en parallèle : la description de l'infection naturelle et la réalisation d'un modèle d'infection expérimentale.

Dans un premier temps, nous avons développé un modèle expérimental d'infection leptospirosique chez le rat se rapprochant le plus possible des conditions naturelles : nous avons choisi des voies d'inoculation mimant les voies d'entrées naturelles au sein des colonies de rongeur.

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré la prévalence et étudié l'infection leptospirosique « naturelle » au sein de colonies urbaines de rats afin d'analyser les conditions écologiques influençant ces prévalences et la dynamique de transmission des souches de leptospires dans des colonies de rongeurs.

Au terme de notre étude, nous avons analysé les observations réalisées sur le terrain et en expérimentation animale pour déterminer les éléments essentiels au paramétrage de modèles épidémiologiques de la leptospirose murine, pour pouvoir comprendre et surtout prédire la transmission des leptospires entre rats et entre le rat et les hôtes accidentels.

CHAPITRE 1 :

LA LEPTOSPIROSE CHEZ LE RAT : CARACTERISATION DE L'INFECTION CHEZ UN MODELE ANIMAL MIMANT LES CONDITIONS NATURELLES D'INFECTION

Depuis la découverte des leptospires au début du XXème siècle, les modèles animaux tiennent une place importante dans la compréhension des caractéristiques de l'infection et de leur transmission entre les différentes espèces animales. Au cours de ces 30 dernières années, ces modèles ont permis d'accroître les connaissances dans le domaine des interactions cellulaires et moléculaires entre les leptospires et les hôtes mammifères. Deux types de modèles sont utilisés à l'heure actuelle : le premier exploite des espèces dites « sensibles », comme le cobaye ou le hamster, et le second correspond aux espèces dites « résistantes », comme le rat. Chez ce dernier, l'infection présente une forme asymptomatique, caractérisée par une phase de dissémination, de colonisation et de maintien des leptospires dans les reins. Après une phase d'entrée dont les voies restent encore mal connues, les leptospires se disséminent rapidement à travers tout l'organisme en 5 jours. Cette phase est suivie d'une phase de clairance dans tous les organes, à l'exception du rein (Athanazio et al. 2008), associée à une production d'immunoglobulines à partir du 7^{ème} jour post-inoculation (Monahan et al. 2008; Monahan et al. 2009) et à une reconnaissance du lipide A du LPS par les récepteurs Toll-like 4 qui permettent une meilleure sensibilité des récepteurs du système immunitaire humorale (Werts 2010). Les leptospires se maintiennent alors uniquement dans les tubules proximaux, puis sont excrétées par voies urinaires à partir du 10^{ème} jour post-inoculation (Athanazio et al. 2008; Monahan et al. 2008). Les mécanismes assurant la survie et le maintien des leptospires dans les reins sont encore mal connus. Ceux-ci proviendraient d'un changement d'expression protéique opéré par les leptospires en milieu *in vivo* (Monahan et al. 2008; Matsui et al. 2012), associé à leur capacité à former des

biofilms (Ristow et al. 2008; Ko et al. 2009). Cette évasion immunitaire serait également liée aux caractéristiques du rein qui est un site d'échappement immunitaire du fait que les anticorps présents dans les tubules ne peuvent pas détruire les bactéries dues à une absence de complément empêchant une réponse immunitaire innée optimale (Monahan et al. 2009).

Les modalités de transmission rat-rat sont toujours inconnues à l'heure actuelle (Villanueva et al. 2014). Or, ils permettraient de mieux comprendre la dynamique de transmission des leptospires au sein des colonies de rongeurs et ainsi de mieux évaluer les risques pour la santé publique, liés au maintien de la bactérie dans un environnement proche de l'homme. Cette transmission rat-rat passerait par deux facteurs clés : la voie d'excrétion par un individu et la voie d'entrée chez un autre, avec ou non la présence d'un vecteur environnemental entre les deux. Les études sur l'infection naturelle permettent aujourd'hui d'établir certaines hypothèses sur les caractéristiques de cette infection et de sa transmission entre individus, mais plus rarement de les prouver du fait de l'inconnue environnementale. Plusieurs points importants de la leptospirose naturelle manquent encore pour une modélisation de l'infection chez ce rongeur : comme les voies d'entrée, la durée de dissémination en conditions naturelles, le taux d'efficacité d'une colonisation rénale et les voies d'excrétion des leptospires qui permettent leur maintien dans une colonie de rat. Par ailleurs, il est difficile d'établir une modélisation exacte en se basant exclusivement sur des données épidémiologiques, il est donc nécessaire de compléter ces données par des études expérimentales.

Chez le rat, les modèles actuels d'infection ciblent principalement la colonisation rénale et l'excrétion urinaire (Bonilla-Santiago et Nally 2011; Athanazio et al. 2008; Monahan et al. 2008; Nally et al. 2005), dans le but de comprendre les interactions hôte-pathogène impliquées dans le maintien de cette bactérie. Pour se faire, la majorité des individus étudiés doivent être porteurs de leptospires avec un taux de colonisation rénale maximal : supérieur à 90% durant les premiers mois (Athanazio et al. 2008). C'est ce qui explique que la voie d'inoculation utilisée de manière exclusive dans ces modèles, est la voie intrapéritonéale. Cependant, comme elle ne mime pas les conditions naturelles, cette voie peut entraîner un biais sur la vitesse de dissémination et de développement de l'infection (Athanazio et al. 2008; Lourdault et

al. 2009). En effet, une telle variation a été observée lors des modèles sensibles selon la voie d'inoculation utilisée. Par exemple, chez le cobaye, la voie conjonctivale nécessite une dose létale supérieure à celle de la voie intrapéritonéale ou sous-cutanée, pour un temps de dissémination rallongé de 24 à 48 heures (Lourdault et al. 2009). Il est donc envisageable qu'une variation similaire soit observée lors d'une infection chez le rat par d'autres voies d'inoculation plus proche des conditions naturelles. Chez le rat, seule la peau intacte et la membrane nasale semble être une barrière efficace vis-à-vis d'une contamination par des leptospires (Stavitsky 1945), mais les autres voies d'inoculation testées ne mimaient pas une contamination naturelle: intrapéritonéale, intracardiaque, injection au niveau des méninges ou des yeux (Athanazio et al. 2008; Bonilla-Santiago et Nally 2011; Stavitsky 1945). Deux hypothèses sur les voies de contamination naturelles peuvent être explorées : la première est une transmission par morsures au cours d'interactions hiérarchiques avancée lors d'études épidémiologiques (Himsworth et al. 2013; Desvars et al. 2013), la seconde est une contamination par l'environnement humide.

Notre premier objectif, au cours de ce travail, a été l'élaboration d'un modèle expérimental « résistant » mimant les conditions naturelles de contamination chez le rat, basé sur deux hypothèses de voies d'entrée (conjonctivale et sous-cutanée). Cette étude permettrait de mieux connaître les caractéristiques de l'infection « naturelle » chez le rat et peut-être de comprendre les facteurs influençant les taux de prévalence observés sur le terrain.

Depuis le début du siècle, plusieurs hypothèses circulent sur les voies d'excrétion des leptospires, mais seule la voie urinaire a été démontrée. D'autres voies d'excrétion, comme la salive, n'ont pas encore été prouvées (Babudieri 1958), malgré des cas de transmission à l'homme par morsure (Gollop et al. 1993; Babudieri 1958). La dernière hypothèse expliquant ces cas, serait une contamination de la plaie de morsure directement par l'urine infectée ou par la salive contaminée par de l'urine infectée, et non par des leptospires excrétés par les glandes salivaires. (Gollop et al. 1993). Ces investigations, réalisées par des approches peu sensibles comme la microscopie directe et l'histologie, n'excluent pas de manière certaine que la salive soit une voie d'excrétion potentielle. Une investigation par biologie moléculaire pourrait permettre d'établir le statut de la matrice salivaire comme potentiel vecteur. D'autres voies d'excrétion pourraient également être investiguées,

comme les fèces ou les expectorations. La présence de leptospires dans les fèces pourrait s'expliquer par les deux hypothèses suivantes : 1) les leptospires pourraient être ingérés par les rats et survivre dans le tractus digestif ; ou 2) considérant leur faible taille, ces bactéries pourraient traverser la barrière intestinale de la même manière qu'elles réalisent la phase interstitielle dans le rein (Monahan et al. 2009; Cheville et al. 1980). Elles pourraient donc réaliser une translocation des capillaires à la lumière du tractus digestif, la portion intestinale étant également un site de symbiose hôte-bactérie avec une régulation spécifique de la réponse immunitaire (Min et Rhee 2015). L'hypothèse d'une excrétion par expectorations pourrait être également envisagée, suivant la même logique de passage transendothélial jusqu'à la lumière d'un organe. Les leptospires pourraient alors traverser la membrane alvéolaire, se retrouver dans les poumons et être excrétés lors d'expectorations par les rats. L'étude d'autres voies d'excrétion permettrait ainsi de mieux caractériser l'infection chez ce rongeur et la transmission des leptospires entre congénères. Notre deuxième objectif au cours de cette partie expérimentale était d'explorer les hypothèses portant sur d'autres voies d'excrétion des leptospires, qui sont la salive, les fèces et la voie respiratoire.

Enfin, pour suivre la dynamique de l'infection chez le modèle rat d'un point de vue méthodologique, les études précédentes utilisaient principalement les techniques histologiques comme la coloration argentique (Athanzio et al. 2008; Thiermann 1981), l'immunofluorescence (Athanzio et al. 2008; Tucunduva de Faria et al. 2007; Nally et al. 2005) et l'immunohistochimie (Monahan et al. 2008; Nally et al. 2005). Ces méthodes présentent l'avantage de pouvoir visualiser directement les lésions tissulaires ou les leptospires, mais elles nécessitent une observation minutieuse des lames à un grossissement de x400 (Athanzio et al. 2008). L'interprétation peut donc être longue et dépendante de l'opérateur. Les résultats des études précédentes pourraient donc présenter un biais d'analyse. De plus, les méthodes histologiques sont moins sensibles que les nouveaux outils moléculaires, tel que la PCR ou la PCR en temps-réel (Fornazari et al. 2012). En effet, les techniques de biologie moléculaire qui ont été développées au cours de ces dernières années, sont de plus en plus sensibles grâce à la mise au point de la PCR en temps réel avec les systèmes SYBR Green et Taq-Man. Cette méthode présente un seuil de détection pouvant quantifier jusqu'à 5 copies génomiques d'ADN/ μ l de PCR (Bourhy et al. 2011). Elle pourrait

donc permettre de caractériser avec plus de sensibilité l'infection chez le rat. Par ailleurs, lors des études épidémiologiques, la production en anticorps mesurée par la technique de micro-agglutination est souvent non corrélée aux résultats observés par d'autres techniques d'analyse, comme la PCR ou la culture (Agudelo-Florez et al. 2009). Le titre observé chez le rat est inférieur à celui observé lors d'une infection aiguë. Même si le test de micro-agglutination est moins sensible chez des hôtes réservoirs, il est important de l'utiliser lors de l'analyse de la production en anticorps au cours d'une infection expérimentale afin de comprendre l'origine du biais de mesure observé lors des études épidémiologiques.

Notre dernier objectif, au cours de cette partie, a donc été de caractériser et d'affiner l'étude de la dynamique de l'infection leptospirosique chez le rat en utilisant des méthodes moléculaires en parallèle de méthodes histologiques et sérologiques.

I) Etude comparative de la voie de référence intrapéritonéale et des voies d'inoculations conjonctivale et sous-cutanée

I. 1) Objectif

L'objectif de ce travail était la mise au point d'un modèle d'infection expérimentale par *Leptospira* chez le rat, mimant au mieux les conditions naturelles de transmission pouvant avoir lieu au sein des colonies de rongeurs. Ce modèle devait répondre aux hypothèses actuelles sur les différentes voies d'entrée et d'excrétion possibles des leptospires par le rat, afin d'élaborer la modélisation de l'infection chez ce rongeur. Nous avons choisi d'explorer deux nouvelles voies d'inoculation naturelles pour ce modèle : la voie conjonctivale, mimant une contamination du rat lors de la prise de boisson accompagnée de projections d'eau contaminée par des leptospires, et la voie sous-cutanée, suggérant une contamination par morsure de la part d'un congénère lors d'échange hiérarchique.

Au cours de cette étude, la dynamique de l'infection a été suivie jusqu'à la mise en place de la colonisation rénale associée à l'excrétion urinaire, étudiée au moyen de méthodes bactériologique, moléculaire et histologique. La production d'anticorps a été suivie par le test de micro-agglutination. Les autres voies d'excrétion potentielles énumérées ci-dessus (salive, fèces, voie aérienne) ont été également explorées par biologie moléculaire.

I. 2) Article

Cette étude est présentée dans le manuscrit ci-dessous et a été soumise le 2 septembre 2015 au journal Plos Neglected Tropical Disease.

Comparison of conjunctival, subcutaneous and intraperitoneal routes of rat *Leptospira* infection

Authors: Anne-Laure Zilber^{1*}, Patrick Belli², Delphine Grezel³, Marc Artois¹, Angeli Kodjo^{1,4} and Zoheira Djelouadji^{1,4*}

¹ USC 1233 INRA/VAS, Equipe de Recherche sur la Leptospirose, Université de Lyon-VetAgro Sup, Marcy-l'Etoile, France.

² UP Pathologie Morphologique et Clinique, Université de Lyon-VetAgro Sup, Marcy-l'Etoile, France.

³ Université de Lyon-VetAgro Sup, Marcy-l'Etoile, France.

⁴ Laboratoire des Leptospires, Université de Lyon-VetAgro Sup, Marcy-l'Etoile, France.

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonosis found worldwide that is caused by a spirochete. The main reservoirs of *Leptospira*, which presents as an asymptomatic infection, are wild rodents, especially the brown rat (*Rattus norvegicus*). Experimental studies of the mechanisms of its renal colonization in rats have previously used an intraperitoneal inoculation route. However, knowledge of rat-rat transmission requires the use of a natural route of inoculation, such as a conjunctival or subcutaneous route. We investigated the effects of subcutaneous and conjunctival inoculation routes compared to the reference intraperitoneal route during *Leptospira* infection in adult rats. Infection characteristics were studied using *Leptospira* renal isolation, serology, and molecular and histological analyses. *Leptospira* infection was asymptomatic using each inoculation route and caused similar antibody production regardless of renal colonization. The observed renal colonization rates were 8 out of 8 rats, 4 out of 8 rats and 1 out of 8 rats for the intraperitoneal, conjunctival and subcutaneous inoculation routes, respectively. Thus, among the natural infection routes studied, conjunctival inoculation was more efficient at renal colonization associated with urinary excretion than the subcutaneous route and induced a slower-progressing

infection than the intraperitoneal route. These results can help in the understanding of the infection modalities in rat. Future studies of other natural inoculation routes in rat models will increase our knowledge of rat-rat disease transmission and allow the investigation of infection kinetics.

INTRODUCTION

Leptospirosis is a worldwide zoonosis that is caused by a spirochete of the genus *Leptospira* (Adler and de la Pena Moctezuma 2010). The World Health Organization (WHO) reports one million severe human cases of leptospirosis each year (Picardeau 2013; Abela-Ridder, Sikkema, and Hartskeerl 2010), especially in tropical and subtropical regions. Recently, the number of reported outbreaks has increased with rainfall and urbanization associated with the conditions of slum living (McBride et al. 2005; Guerra 2009). Human leptospirosis ranges from a mild form to a severe infection called Weil's disease, which has a fatality rate of 5-15% and is characterized by jaundice, renal failure and hemorrhage (Vijayachari, Sugunan, and Shriram 2008). In animals, leptospirosis also causes reproductive failure, abortion and infertility in cattle (Adler and de la Pena Moctezuma 2010), and acute febrile illness with renal and hepatic failure in dogs (Schuller et al. 2015). The main reservoirs of *Leptospira* are wild rodents, especially the brown rat (*Rattus norvegicus*) (Adler and de la Pena Moctezuma 2010). The infection is asymptomatic in this animal, and leptospires persist by renal carriage, colonizing the proximal tubules (Bharti et al. 2003). Leptospires are secreted in the rat's urine and contaminate humans and other animals by direct or indirect contact with the environment (Guerra 2009; Hartskeerl, Collares-Pereira, and Ellis 2011). *Rattus* species appear to have a specific association with the Icterohaemorrhagiae serogroup (McBride et al. 2005; Dupouey et al. 2014) that causes most human cases of leptospirosis worldwide (Dupouey et al. 2014; Picardeau 2013). The control of the contamination of humans and domestic animals is therefore required in a rodent infection study.

The experimental approach used to study leptospiral infection often focuses on the mechanisms of pathogenicity, especially in the acute dose-response model of infection in guinea pigs or hamsters (Watanabe, Teske, and Haas 2014). Rat models have been developed to study the mechanisms of *Leptospira* renal colonization or urinary excretion during chronic infection (Bonilla-Santiago and Nally 2011), but

infection kinetics in rats are rarely studied. The intraperitoneal route of infection has been used in all rat studies (Athanzio et al. 2008; Thiermann 1981; Monahan, Callanan, and Nally 2008; Nally et al. 2005), but this route could overestimate the pathogen load (Athanzio et al. 2008). Moreover, the intraperitoneal route is a non-natural *Leptospira* infection route in rat colonies, and the details of transmission between rats remains unknown (Villanueva et al. 2014). Studies of natural routes of rat-rat transmission could explain the heterogeneity of renal carriage in rat colonies from the same region (Krojgaard et al. 2009; Himsworth et al. 2013) by variable *Leptospira* dissemination kinetics. Natural routes of infection, such as conjunctival, subcutaneous, epicutaneous and intradermal routes, have only been studied in acute infection models in guinea pigs and hamsters (Zhang et al. 2012; Coutinho et al. 2014; Lourdault, Aviat, and Picardeau 2009). The kinetics of *Leptospira* dissemination exhibit significant variation depending on the inoculation route used. For example, abraded skin is a less efficient barrier to leptospires than intact skin (Zhang et al. 2012); in the same way, it has been shown that the conjunctival route requires a higher dose to cause lethality than do the subcutaneous and intraperitoneal routes (Lourdault, Aviat, and Picardeau 2009). The influence of a natural inoculation route remains to be studied in rat models. The conjunctival and subcutaneous inoculation routes are natural routes of rat transmission. The conjunctival route corresponds to mucosal transmission by environmental contamination, and the subcutaneous route corresponds to direct contamination from a rat bite (Himsworth et al. 2013). Both routes could significantly affect dissemination time and renal colonization.

In this study, we investigated the establishment of a rat infection model based on natural disease transmission routes in rat colonies. We report the effect of subcutaneous and conjunctival inoculation routes on the renal colonization and urinary excretion of *Leptospira* infection compared to the reference intraperitoneal inoculation route.

MATERIALS AND METHODS

Leptospiral strain used for rat inoculation

A virulent *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130, provided by the National Reference Center and WHO collaboration Center for Leptospirosis (Institut Pasteur, Paris, France), was used in all experiments. This

same strain has been used in several experimental studies in rats (Athanzio et al. 2008; Tucunduva de Faria et al. 2007), is a clinical isolate from Brazil (Ko et al. 1999). Leptospire were cultivated in Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) media (Indicia, Sainte-Foy-l'Argentière, France) at 29°C.

Before the use of the obtained experimental strain in rats, a virulence test was performed using 8-week-old male Mongolian gerbils (Janvier Labs, France) intraperitoneally injected with *Leptospira* suspensions. The strain was found to be 100% lethal in the gerbil model even at a single dose of 10^1 leptospire. Blood was collected by cardiac puncture after the humane killing of sick bacteriemic animals on day 5 after inoculation and was aseptically transferred into tubes containing EMJH media (Indicia). Second-passage pathogenic cultures, derived from the cardiac puncture culture, were used for all experimental rat infections.

Experimental infection

Specific pathogen-free 7-week-old male Wistar rats (*Rattus norvegicus*, RjHan:WI) (Janvier Labs) weighing 275 g were provided with food and drink ad libitum and housed in individual cages with specific enrichment in the form of nesting materials and wood chew sticks, which allowed both the absence of inter-individual contamination and the maintenance of normal conditions and behavior. All rats were weighed and examined weekly over the course of one month for clinical and behavioral signs.

The experimental procedures encompassed the inoculation procedure, the sample collection and the final sample set. Groups of eight animals were inoculated at day 0, either intraperitoneally (IP, 500 µL of EMJH containing 1×10^7 leptospire), subcutaneously (SC, 500 µL of EMJH containing 1×10^7 leptospire in the lumbar region) or conjunctivally (C, 100 µL of EMJH containing 0.5×10^7 leptospire, dispensed as: 25 µL on the left eye, 25 µL in the left nostril and 50 µL in the mouth). A inoculum of 1×10^7 leptospire resulted in 100% infected animals (Athanzio et al. 2008). A control group of two uninfected animals was established for each inoculation route, and the control group received sterile EMJH distributed in the same manner as the corresponding inoculation.

Sample collection was performed under isoflurane anesthesia, as shown in the timeline of Table 1. Blood and/or serum samples (500 µL) were collected, using a 26 gauge needle, from the caudal vein. Urine samples were collected in a sterile

aluminum box from vigil rats (on day 10) or from anesthetized rats (on other days) by sphincter relaxation. Feces were collected in a sterile aluminum box by spontaneous dropping. Saliva samples were collected by oral plugging with a cotton swab. On day 30, rats were anesthetized with isoflurane and sacrificed by cervical dislocation. At necropsy, samples were collected aseptically for serology, *Leptospira* isolation, and molecular and histological analyses. Blood (from an intracardiac puncture), urine, feces and saliva were collected. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was collected from the lungs by tracheal catheterization with a 14 gauge needle followed by an injection with 5 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich France, Lyon, France). The kidneys, liver, lungs, spleen and salivary glands were also collected. The left eye was collected from all rats in the infected and control C groups.

Table 1. Sample collection of selected organs and excretions analyzed by qPCR for the *Lfb1* gene, micro-agglutination test and histology.

Day after inoculation	MAT	Selected organs or fluids for qPCR*	Histology	Animal group
1	Serum	B	NA	Infected, Control
7	Serum	U	NA	Infected, Control
10	NA	U	NA	Infected
14	Serum	U, F	NA	Infected, Control
20	Serum	U, F, S	NA	Infected
25	NA	U, F, S	NA	Infected
30	Serum	B, U, F, S, K, Li, Sp, Lu, Sg, BAL	K, Li, Sp, Lu, Sg	Infected, Control

MAT: Micro-agglutination test.

*qPCR performed on the *Lfb1* gene (Merien et al., 2005)

B: Blood; U: Urine; F: Feces; S: Saliva; K: Kidney; Li: Liver; Sp: Spleen; Lu: Lung; Sg: Salivary gland; BAL: Bronchoalveolar Lavage.

NA: not applicable

Micro-agglutination test

Serological tests using the microscopic agglutination test (MAT) using WHO endpoints (WHO 2003) were performed in the Laboratoire des Leptospires (VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France) using a panel of four *Leptospira interrogans* strains from the Icterohaemorrhagiae serogroup as antigens: the M20 Copenhageni, the RGA Icterohaemorrhagiae, the Verdun Icterohaemorrhagiae and the Fiocruz Copenhageni serovars. Blood samples were centrifuged for 5 minutes at 3500 rpm, and screening was performed with serum dilutions ranging from 1:50 to 1:6400. The analysis of each serum sample from each rat was repeated in triplicate.

DNA extraction and quantitative PCR (qPCR)

The kidney, liver, spleen, lung, ocular and salivary gland samples were ground aseptically. A small amount (25 mg) was incubated with 180 µL ATL Buffer (Qiagen, Courtaboeuf, France) and 25 µL proteinase K for 2 hours. For the urine, blood, saliva and BAL matrices, 200 µL of each sample was lysed for 15 minutes. After proteinase K treatment, DNA was extracted from 200 µl of lysed tissue or 200 µl of lysed matrices using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. DNA from fecal samples (200 mg) was extracted using the QIAamp DNA stool kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. All DNA concentrations were controlled spectrophotometrically by measurement of the absorbance at 260/280 using a NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific, Illkirch, France). All DNA samples were stored at -20°C.

DNA was tested by qPCR SYBR Green using the Rotor-Gene Q (Qiagen). A qPCR primer pair amplified the *Lfb1* gene, as previously described by Merien et al. (Merien et al. 2005) and used in real-time PCR test (Bourhy et al. 2011). qPCR was performed on a final volume of 25 µl containing 12 µl of Rotor-Gene SYBR Green PCR kit (Qiagen), 1 µl of forward primer (10 µM), 1 µl of reverse primer (10 µM), 6 µl of H₂O and 5 µl of target DNA. Control reactions without target DNA were included in each assay. The following thermocycling program was used: initial incubation step at 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 10 s and 61 °C for 40 s. Standard curves were generated from bacterial suspensions containing 1×10^7 *L. interrogans* Copenhageni Fiocruz/200 µL of DNA extract. Ten-fold serial dilutions from 10^7 to 10^1 leptospires were performed in TE Buffer (Ambion Life Technologies, Saint Aubin,

France). From the stock solution, 1 μL of target DNA contained 1.25×10^6 genomic copies based on the genome size of *L. interrogans* L1-130 (4.6 Mb): 1 genome is ~ 5 fg of genomic DNA. Each DNA sample was tested in duplicate or triplicate if variable results were observed. The T_m of each positive DNA sample was controlled with the T_m of the *L. interrogans* Copenhageni Fiocruz used as a reference.

***Leptospira* renal isolation**

Half of a kidney from each rat in the infected and control groups was crushed and aseptically transferred into tubes containing EMJH media (Indicia). A series of three dilution tubes were incubated at 29 °C according to the protocol for pathogenic *Leptospira* isolation (Zuerner 2005). The tubes were examined weekly for three months using a dark-field microscope.

Histological analysis

A sample of each organ (kidney, liver, spleen, lung and salivary gland) from each rat was fixed in 10% formaldehyde for 24 h and subsequently transferred to 70° ethanol. The tissues were embedded in paraffin and cut into 3 μm sections. For each rat, all the organ samples were embedded in the same paraffin block. One section of each block was then stained with hematoxylin-phloxine (HP) to observe morphological lesions. Two stains were used for the visualization of leptospire. For each rat, one section was stained with Warthin-Starry silver staining (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (Faine 1965), and another section was subjected to immunohistochemistry with antiserum specific to the *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae serovar. For immunohistochemistry, paraffin was removed from the sections with xylene and ethanol. The tissues were incubated in citrate buffer (pH = 6) for 1 h at 95 °C and subsequently treated with 0.3% hydrogen peroxide for 10 min at room temperature. Nonspecific staining was blocked by incubation of the sections with Super Block (UltraTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack, ScyTek Laboratories, Logan, USA) for 30 min at room temperature, and rodent-specific sites were blocked by incubation of a 1,000-fold dilution of peroxidase-conjugated goat anti-rat antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) for 10 min at room temperature. Tissue sections were incubated with a 2,000-fold dilution of *Leptospira* antiserum overnight at 4 °C. The samples were then incubated with a 1:2 dilution of Ultra Tek Anti-Polyvalent (UltraTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack, ScyTek Laboratories) for 30

min at room temperature; subsequently, they were incubated with UltraTek HRP (UltraTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack, ScyTek Laboratories) at room temperature for 30 min. Enzymatic reactions were developed using the Vector NovaRED substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, USA). As an appropriate negative control, sections were incubated without *Leptospira* antiserum.

Statistics

Bias reduction was achieved by a random allocation of rats in each group. Rats were taken in the same order for the collection of each sample.

The results are expressed as the median for the MAT and as the confidence interval for qPCR. Statistical tests were not used when fewer than 5 rats tested positive for leptospires. Bartlett's one-way and permutational analysis of variance (ANOVA) test was used to examine the differences between multiple groups. Fisher's test was applied to evaluate independence between multiple distributions. All statistical analyses were conducted using R software, version 2.15.2 (R Development Core Team, R foundation for statistical computing, Vienna, Austria).

Animal ethics

All experimental procedures were performed according to the ethical and regulatory standards of the European Union Legislation governing the care and use of laboratory animals (Directive EU 10/63). All animal procedures were approved by the ethical committee of VetAgro Sup establishment (n°1288 for the gerbil procedure and n°1289 for the rat procedure) and were conducted by an authorized person (agreement no. 69-127811 issued by the Préfecture of the Rhône).

RESULTS

Clinical response to infection and effect on body weight

The weekly general examinations of all infected and uninfected rats were normal throughout the study, without any clinical signs of infection observed.

The body weights of infected and control rats showed weight gains in the infected and control groups (between 129 g and 165 g, data not shown), corresponding to the expected growth of the 7-week-old rats during this month. The weight gain differences were not significant (p -value > 0.05) in the three infected groups, in the

control groups and between the infected and control animals that were inoculated identically.

Antibody response

All infected rats developed antibodies, and all the control animals remained negative during the study. A positive MAT titer was detected from day 7 post-inoculation for the 8 rats in the infected IP and SC groups and from day 14 for the C group (Figure 1). The antibody levels increased rapidly and appeared to stabilize after one week. The means of the MAT titers at day 30 were 701, 570 and 416 for the SC, IP and C groups, respectively. The leptospiral antibody levels of each group were significantly different at day 7 (p-value < 0.05), but the differences between the titers of the infected groups were not significant from day 14 until the end of the study (p-value > 0.05).

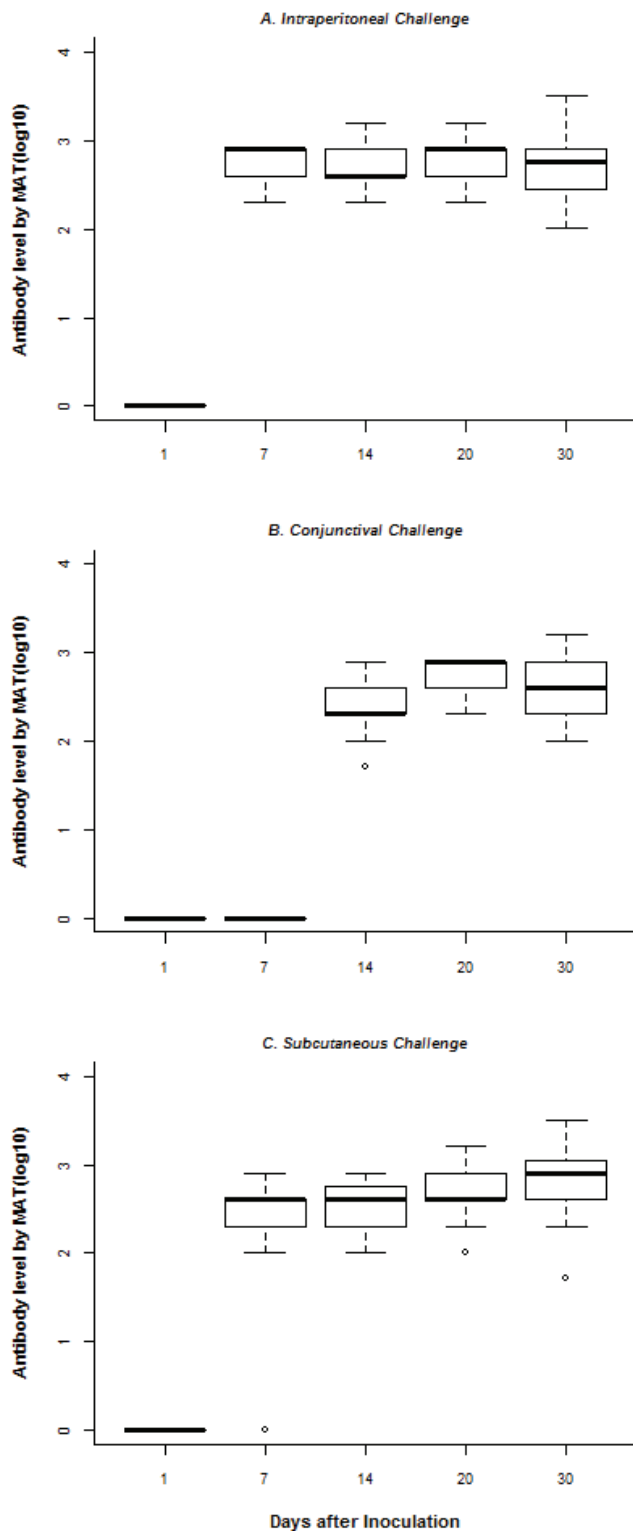


Figure 1. Antibody response in infected rats.

Rat anti-*Leptospira* antibody responses were measured by the micro-agglutination test. The box plot shows the log₁₀ titers of the sera samples of eight rats from each group (tested in triplicate at a starting dilution of 1:50). *Leptospira* antibody levels in each group were only significantly different on day 7 (p-value < 0.05).

Leptospiral organ and matrix burden analysis by qPCR

Organ and fluid samples were collected on days 1, 7, 10, 14, 20, 25 and 30 post-inoculation, as indicated in Table 1. Data obtained from the three groups of infected rats from day 7 to day 25 are summarized in Table 2, and all data from infected rats obtained at necropsy on day 30 are shown in Table 3. All organ and matrix samples from control rats had negative qPCR results for the duration of the study.

On day 1, blood samples from the infected rats were positive in 8 of 8 rats from the IP group and in 1 of 8 rats from the SC group. In the C group, all 8 rats had negative blood samples. The numbers of genomic copies in the blood samples of rats from the infected groups are shown in Table 2.

Leptospira urinary excretion was examined using molecular analyses of urine samples collected every five days during the study. The results are shown in Table 2 and Table 3. On day 7, the urine sample from one rat in the IP group was positive, and no samples from rats in any other groups tested positive. A similar pattern was found on day 10, with one positive rat in the IP group but none in the other groups. For the IP infected group, 6 rats, 6 rats and 5 rats tested positive for leptospires on days 14, 20 and 25, respectively. Finally, on day 30, 8 out of 8 rats tested positive for leptospires. In the SC infected group, none of the 8 rats tested positive for leptospires before day 25 post-inoculation. On day 25, one rat tested positive for leptospires. However, on day 30, no rats tested positive. In the C infected group, one rat tested positive for leptospires on day 14. However, none of the 8 rats tested positive for leptospires on day 20. Finally, 2 rats and 5 out of 8 rats tested positive for leptospires on days 25 and day 30, respectively. All fecal samples and saliva matrices from the infected rats, collected from days 14 to 25, were negative (Table 2).

On day 30, all DNA samples from the blood, feces, saliva and BAL matrices and from the liver, spleen, lung and salivary gland tissues were negative. The DNA from the left eyes of the C group collected on day 30 was negative. Molecular analyses of DNA from the kidneys of infected rats revealed that 8 out of 8 rats tested positive in the IP group, whereas 0 of 8 rats from the SC group and 3 out of 8 rats from the C group tested positive for leptospires. All data from the renal molecular analyses are shown in Table 3.

Table 2. Results of blood, urine, feces and saliva samples from each infected group, analyzed by qPCR for the *Lfb1* gene on days 1 to 25.

	Intraperitoneal			Subcutaneous			Conjunctival					
	Blood	Urine	Feces	Saliva	Blood	Urine	Feces	Saliva	Blood	Urine	Feces	Saliva
Day 1	8/8 ^a [109.45, 233.09] ^b	ND	ND	ND	1/8 (9.15) ^c	ND	ND	ND	0/8 (0)	ND	ND	ND
Day 7	ND	1/6 (135.87)	ND	ND	ND	0/7 (0)	ND	ND	ND	0/6 (0)	ND	ND
Day 10	ND	1/2 (543.75)	ND	ND	ND	0/3 (0)	ND	ND	ND	0/2 (0)	ND	ND
Day 14	ND	6/7 [10.63, 10843.75]	0/6 (0)	ND	ND	0/7 (0)	0/5 (0)	ND	ND	1/8 (147.58)	0/5 (0)	ND
Day 20	ND	6/7 [103.31, 4693.75]	0/6 (0)	0/8 (0)	ND	0/8 (0)	0/6 (0)	0/8 (0)	ND	0/8 (0)	0/3 (0)	0/8 (0)
Day 25	ND	5/7 [45.25, 2758.75]	0/6 (0)	0/8 (0)	ND	1/6 (57.50)	0/3 (0)	0/8 (0)	ND	2/8 [54.8 7, 1071.87]*	0/0 (0)	0/8 (0)

^a: Number of positive samples/total number of collected rats

^b: The confidence intervals of the concentrations of genomic copies/ μ L of the positive samples with 0.95 probability are in brackets; * with 0.5 probability.

^c: The concentration of genomic copies/ μ L of one positive sample is in parentheses.

ND: not determined

qPCR was performed on the *Lfb1* gene (Merien et al., 2005)

Table 3. Renal colonization and urinary excretions of each infected group on day 30.

	Urine qPCR	Kidney qPCR	Kidney isolation
Intraperitoneal	8/8 ^a [664.37, 3564.68] ^b	8/8 [8.34, 93.69]	7/8
Subcutaneous	0/8 (0)	0/8 (0)	1/8
Conjunctival	5/8 [120.21, 715]	3/8 [2.44, 11.58] *	4/8

^a: Number of positives samples/total number of rats

^b: The confidence intervals of the concentrations of genomic copies/ μ L of the positive samples with 0.95 probability are in brackets; *with 0.75 probability.

The other samples (blood, feces, saliva, liver, spleen, lung, salivary gland and bronchoalveolar lavage) tested negative for the *Lfb1* gene by qPCR (Merien et al., 2005).

***Leptospira* renal isolation**

Renal colonization was studied by *Leptospira* isolation from the kidney samples of all rats in both the infected and control groups. In the infected groups, a *Leptospira* culture was obtained in 7 out of 8 rats from the IP group, 4 out of 8 rats from the C group and 1 out of 8 rats from the SC group (Table 3), which are the same rats that tested positive by qPCR. All 6 rats from the control groups had negative renal cultures. Fisher's test showed that the rate of culture corresponding to colonization was dependent on the inoculation route (p-value < 0.05).

Histological analysis

Histological stains (HP, Warthin-Starry silver staining and immunohistochemistry) were conducted on sections of the kidney, liver, lung, spleen and salivary gland tissues from all rats in both the infected and control groups.

The HP staining revealed no lesions in the liver, spleen or salivary glands of all rats in the three infected groups. Three types of pulmonary lesions were observed: bronchial lymphoid hypertrophy, perivascular lymphoid hypertrophy and interstitial pneumonia. These lesions were not significant, as they occurred only in a few animals from the control and infected groups. HP staining of the kidney sections showed that only 1 out of 8 rats in the SC group had interstitial nephritis, although this rat tested negative for leptospire using PCR and isolation analyses. The other 7 rats from the SC group and all 8 rats from the IP and C groups, as well as those in the control groups, had no renal lesions.

No leptospire were observed in the liver, spleen, lung and salivary glands of any rats in the three infected groups or in the control groups by silver staining or immunohistochemistry. Additionally, silver staining and immunohistochemistry revealed that no *Leptospira* were found in the tubules of renal sections from the 24 infected rats and the 6 control rats.

DISCUSSION

We have studied a rat model for *Leptospira* infection based on the potential natural transmission routes of leptospirosis in rat colonies. We chose to investigate the conjunctival and subcutaneous routes because they were shown to be efficient routes of infection in previous investigations of acute infection in susceptible species (Coutinho et al. 2014; Lourdault, Aviat, and Picardeau 2009). We report the effect of the inoculation route on *Leptospira* asymptomatic infection in a rat model and the results of investigations of other potential leptospire excretion routes.

Asymptomatic infection and the effect of the inoculation route

Infections appeared to be identically asymptomatic regardless of the inoculation route (C, SC and IP). Indeed, the infections had no effect on weight gain or on clinical and behavioral examinations conducted during the study. This absence of weight loss in the adult rats is different than observations of weight loss in young rats (Muslich et al. 2015) because they are not susceptible. Adult rats that carry *Leptospira* do not appear physically disadvantaged in rat colonies. Consequently, a carrier rat could be as healthy as a non-carrier rat.

Regarding serology, MAT titers were similar at the end of the month in all 3 groups. However, antibodies were detectable at day 7 post-inoculation for the SC and IP routes, while antibodies were only detectable at day 14 by the C route. The titers in chronic infections were considerably lower than the titers reported in acute infections, and no relationship was found between antibody production and renal colonization rate. This similar observation in field rats may result from an adaptation between the host and the pathogen (Agudelo-Florez et al. 2009) and may create a bias for MAT epidemiological studies. Hence, MAT is not a useful method for detecting animals suspected of carrying leptospire.

In this study, leptospiral bacteremia differed based on the inoculation route. Using molecular analysis, bacteremia was detected on day 1 for the SC and IP routes but

not for the C route. The absence of bacteremia at day 1 and the detection of an MAT titer by day 14 for the C route may be a result of slower bacterial spread, likely delayed by passing the conjunctival barrier.

The renal colonization rate varied significantly depending on the inoculation route. All rats in the IP infected group were renal carriers. Our IP rate was similar to rates observed in other rat studies, in which 100% of rats were densely colonized after one month of inoculation (Athanzio et al. 2008; Monahan, Callanan, and Nally 2008), but this inoculation route was not natural. Consistent with this result, the rats in our study that were inoculated via the SC and the C routes had renal colonization rates of 1 out of 8 and 4 out of 8, respectively, as shown by molecular analysis associated with isolation. *Leptospira* isolation sensitivity is often lower than that of other techniques, such as molecular or serological analyses (Paixao Mdos et al. 2014; Fornazari et al. 2012). Renal isolation allowed for the completion of results obtained by qPCR for the SC and the C samples. The decrease in qPCR sensitivity can be explained by the heterogeneous distribution of few *Leptospira* in renal samples obtained during the DNA extraction step, resulting in bias (Bourhy et al. 2011). The natural C inoculation route allowed a higher rate of renal colonization than the SC inoculation route.

In histological analysis, HP sections from only one rat in the SC group showed interstitial nephritis in the kidney, although this rat was negative for leptospires by PCR and by isolation. Interstitial nephritis is the only lesion attributable to leptospiral infection in rats (Tucunduva de Faria et al. 2007), but in our study, renal carrier rats had no lesions. This absence of lesions may be the result of only observing sections that did not contain leptospires.

Urinary excretion in rats infected by the IP route began on days 7-10, as observed in other studies (Athanzio et al. 2008; Monahan, Callanan, and Nally 2008), but leptospires were not detected in the urinary excretion of rats from the SC and C groups until day 25. Therefore, the natural infection routes affected both the time course of *Leptospira* dissemination in the body and the renal colonization associated with urinary excretion.

***Leptospira* transmission in rat colonies**

We investigated the potential natural transmission routes of *Leptospira*, the conjunctival and the subcutaneous routes, in rat colonies by studying the kinetics of infection and excretion of leptospires from rats. The conjunctival inoculation route

corresponds to mucosal transmission from environmental contamination, such as drinking from a contaminated water source and splashing water into the eyes or nose. The subcutaneous route mimics transmission from a rat bite (Himsworth et al. 2013), with contamination of the wound by *Leptospira*. Our study showed that the conjunctival route was more efficient at renal colonization associated with *Leptospira* urinary excretion than the subcutaneous route. In our study, the C inoculum was 2-fold less concentrated than the SC inoculum because of technical constraints, and in acute infections, the C inoculation route required a higher lethal dose (Lourdault, Aviat, and Picardeau 2009). Moreover, the conjunctival route induced a slower progression of chronic infection. Previous studies using the intraperitoneal inoculation route created a bias for dissemination time and infection progression. Therefore, rat-rat transmission could require a high dose of *Leptospira* (Athanzio et al. 2008), but the transmission route is also important and significantly affects the renal colonization rate. The conjunctival inoculation route is more efficient than the subcutaneous inoculation route; this can be explained by the possibility that the contaminated environment has a larger effect on renal carriage prevalence in a rat colony than biting.

Other potential excretion routes

Using molecular methods, we investigated other potential excretion fluids that might enable *Leptospira* transmission, such as saliva, feces and BAL. Saliva has rarely been indicated as a contaminated fluid (Babudieri 1958), but a few cases of bite transmission have been reported during the last century (Gollop et al. 1993; Luzzi, Milne, and Waitkins 1987; Roczek et al. 2008). However, these have mainly been attributed to indirect urinary contamination of the mouth or wound. All the saliva and salivary gland samples from infected rats tested negative for *Leptospira* by qPCR, even if the infected rat excreted leptospire in the urine and continued to groom itself. The saliva was not contaminated, either by direct excretion from the salivary gland or by indirect contamination from urine during grooming.

We also assessed the feces, which have never been investigated. The idea to test the feces came from two assumptions: 1) if rats are contaminated by an infected environment, the ingested leptospire could be found in the feces; 2) because the gut is an immune escape site, leptospire could take advantage of this opportunity. All fecal samples from the infected rats tested negative for leptospire. The potentially

ingested leptospire do not appear to survive in the rat digestive tract, most likely because they are destroyed by gastric acid (Asoh et al. 2014).

Finally, we investigated airborne leptospire excretion in the BAL. All BAL samples from the infected rats tested negative for leptospire, but the pulmonary lesions observed in our study may have been caused by acute susceptibility to transitory leptospire. Pulmonary lesions with hemorrhages were previously described only in acute infection models (Nally et al. 2004; Pereira et al. 2005), with the exception of infections in rat pups (Muslich et al. 2015). Hemorrhages in susceptible animal models are caused by vasculitis, which could be the cause of the perivascular lymphoid hypertrophy and interstitial pneumonia found in this study. Warthin-Starry staining and immunohistochemistry did not reveal leptospire in pulmonary sections, as observed previously (Athanzio et al. 2008). However, leptospire are also rarely detected in the alveoli during acute infection (Nally et al. 2004). Despite the negative BAL samples, leptospire appear to have a pathogenic effect on the rat lung.

Conclusions

Leptospira infection in rats has identical asymptomatic forms regardless of the three inoculation routes (C, SC and IP) used. The antibody response in chronic infections was considerably lower than in acute infections, and antibody production had no relationship to the renal colonization rate. Therefore, natural routes of infection, such as conjunctival and subcutaneous routes, affected both the time course of *Leptospira* dissemination in the body and the renal colonization associated with urinary excretion. The conjunctival inoculation route was more efficient at renal colonization associated with *Leptospira* urinary excretion than the subcutaneous route. Our investigation of other potential excretory fluids, such as saliva, feces and BAL, showed that these fluids do not appear to transmit *Leptospira*. We suggest using natural routes of *Leptospira* infection in future studies of rat models to investigate infection kinetics and renal colonization rates under natural conditions.

Acknowledgments:

The authors would like to thank the Department of Morphological and Clinical Pathology of the Etablissement VetAgro Sup for assistance and expertise in performing the histological analysis; the Laboratoire des Leptospires of the Etablissement VetAgro Sup for technical expertise concerning leptospires; the Biovivo-Claude Bourgelat Institute of the Etablissement VetAgro Sup, namely Olivia Leveneur, Roland Roume, Emilien Henry and Laetitia Durand, for assistance and expertise during experimental sessions; and the Unité de Biologie des Spirochètes of the Institut Pasteur, namely Dr Pascale Bourhy, for expertise and for supplying the *Leptospira* strain and *Leptospira*'s antisera for immunohistochemistry.

REFERENCES

- Abela-Ridder, B., R. Sikkema, and R. A. Hartskeerl. 2010. "Estimating the Burden of Human Leptospirosis." *Int J Antimicrob Agents* 36 Suppl 1 (November): S5–7.
- Adler, B., and A. de la Pena Moctezuma. 2010. "Leptospira and Leptospirosis." *Vet Microbiol* 140 (January): 287–96.
- Agudelo-Florez, P., A. F. Londono, V. H. Quiroz, J. C. Angel, N. Moreno, E. T. Loaiza et al. 2009. "Prevalence of Leptospira Spp. in Urban Rodents from a Groceries Trade Center of Medellin, Colombia." *Am J Trop Med Hyg* 81 (November): 906–10.
- Asoh, T., M. Saito, S. Y. A. M. Villanueva, T. Kanemaru, N. Gloriani, and S. Yoshida. 2014. "Natural Defense by Saliva and Mucosa against Oral Infection by Leptospira." *Can J Microbiol* 60 (6): 383–89. doi:10.1139/cjm-2014-0016.
- Athanazio, D. A., E. F. Silva, C. S. Santos, G. M. Rocha, M. A. Vannier-Santos, A. J. McBride et al. 2008. "Rattus Norvegicus as a Model for Persistent Renal Colonization by Pathogenic Leptospira Interrogans." *Acta Trop* 105 (February): 176–80.
- Babudieri, B. 1958. "Animal Reservoirs of Leptospires." *Annals of the New York Academy of Sciences* 70 (3): 393–413.
- Bharti, A. R., J. E. Nally, J. N. Ricaldi, M. A. Matthias, M. M. Diaz, M. A. Lovett et al. 2003. "Leptospirosis: A Zoonotic Disease of Global Importance." *Lancet Infect Dis* 3 (December): 757–71.

- Bonilla-Santiago, R., and J. E. Nally. 2011. "Rat Model of Chronic Leptospirosis." *Curr Protoc Microbiol* Chapter 12 (February): Unit 12E.3. doi:10.1002/9780471729259.mc12e03s20.
- Bourhy, P., S. Bremont, F. Zinini, C. Giry, and M. Picardeau. 2011. "Comparison of Real-Time PCR Assays for Detection of Pathogenic *Leptospira* Spp. in Blood and Identification of Variations in Target Sequences." *J Clin Microbiol* 49 (June): 2154–60.
- Coutinho, M. L., J. Matsunaga, L. Wang, A. de la Peña Moctezuma, M. S. Lewis, J. T. Babbitt et al. 2014. "Kinetics of *Leptospira Interrogans* Infection in Hamsters after Intradermal and Subcutaneous Challenge." *PLoS Negl Trop Dis* 8 (11): e3307. doi:10.1371/journal.pntd.0003307.
- Dupouey, J., B. Faucher, S. Edouard, H. Richet, A. Kodjo, M. Drancourt et al. 2014. "Human Leptospirosis: An Emerging Risk in Europe?" *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 37 (2): 77–83. doi:10.1016/j.cimid.2013.12.002.
- Faine, S. 1965. "Silver Staining of Spirochaetes in Single Tissue Sections." *J Clin Pathol* 18 (May): 381–82.
- Fornazari, F., R. C. da Silva, V. B. Richini-Pereira, H. E. O. Beserra, M. C. R. Luvizotto, and H. Langoni. 2012. "Comparison of Conventional PCR, Quantitative PCR, Bacteriological Culture and the Warthin Starry Technique to Detect *Leptospira* Spp. in Kidney and Liver Samples from Naturally Infected Sheep from Brazil." *J Microbiol Methods* 90 (3): 321–26. doi:10.1016/j.mimet.2012.06.005.
- Gollop, J. H., A. R. Katz, R. C. Rudoy, and D. M. Sasaki. 1993. "Rat-Bite Leptospirosis." *The Western Journal of Medicine* 159 (1): 76–77.
- Guerra, M. A. 2009. "Leptospirosis." *J Am Vet Med Assoc* 234 (4): 472–78, 430. doi:10.2460/javma.234.4.472.
- Hartskeerl, R. A., M. Collares-Pereira, and W. A. Ellis. 2011. "Emergence, Control and Re-Emerging Leptospirosis: Dynamics of Infection in the Changing World." *Clin Microbiol Infect* 17 (April): 494–501.
- Himsworth, C. G., J. Bidulka, K. L. Parsons, A. Y. T. Feng, P. Tang, C. M. Jardine et al. 2013. "Ecology of *Leptospira Interrogans* in Norway Rats (*Rattus Norvegicus*) in an Inner-City Neighborhood of Vancouver, Canada." *PLoS Negl Trop Dis* 7 (6): e2270. doi:10.1371/journal.pntd.0002270.

- Ko, A. I., M. Galvão Reis, C. M. Ribeiro Dourado, W. D. Johnson, and L. W. Riley. 1999. "Urban Epidemic of Severe Leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group." *Lancet* 354 (9181): 820–25.
- Krojgaard, L. H., S. Villumsen, M. D. Markussen, J. S. Jensen, H. Leirs, and A. C. Heiberg. 2009. "High Prevalence of *Leptospira* Spp. in Sewer Rats (*Rattus Norvegicus*)." *Epidemiol Infect* 137 (November): 1586–92.
- Lourdault, K., F. Aviat, and M. Picardeau. 2009. "Use of Quantitative Real-Time PCR for Studying the Dissemination of *Leptospira Interrogans* in the Guinea Pig Infection Model of Leptospirosis." *J Med Microbiol* 58 (May): 648–55.
- Luzzi, G. A., L. M. Milne, and S. A. Waitkins. 1987. "Rat-Bite Acquired Leptospirosis." *The Journal of Infection* 15 (1): 57–60.
- McBride, A. J. A., D. A. Athanazio, M. G. Reis, and A. I. Ko. 2005. "Leptospirosis." *Curr Opin Infect Dis* 18 (5): 376–86.
- Merien, F., D. Portnoi, P. Bourhy, F. Charavay, A. Berlioz-Arthaud, and G. Baranton. 2005. "A Rapid and Quantitative Method for the Detection of *Leptospira* Species in Human Leptospirosis." *FEMS Microbiology Lett* 249 (1): 139–47. doi:10.1016/j.femsle.2005.06.011.
- Monahan, A. M., J. J. Callanan, and J. E. Nally. 2008. "Proteomic Analysis of *Leptospira Interrogans* Shed in Urine of Chronically Infected Hosts." *Infect Immun* 76 (11): 4952–58. doi:10.1128/IAI.00511-08.
- Muslich, L. T., S. Y. A. M. Villanueva, M. Y. Amran, T. Segawa, M. Saito, and S. Yoshida. 2015. "Characterization of *Leptospira* Infection in Suckling and Weaning Rat Pups." *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 38 (February): 47–55. doi:10.1016/j.cimid.2014.11.001.
- Nally, J. E., C. Chantranuwat, X. Y. Wu, M. C. Fishbein, M. M. Pereira, J. J. Da Silva et al. 2004. "Alveolar Septal Deposition of Immunoglobulin and Complement Parallels Pulmonary Hemorrhage in a Guinea Pig Model of Severe Pulmonary Leptospirosis." *Am J Pathol* 164 (March): 1115–27.
- Nally, J. E., E. Chow, M. C. Fishbein, D. R. Blanco, and M. A. Lovett. 2005. "Changes in Lipopolysaccharide O Antigen Distinguish Acute versus Chronic *Leptospira Interrogans* Infections." *Infect Immun* 73 (June): 3251–60.
- Paixao Mdos, S., M. F. Alves-Martin, S. Tenorio Mda, W. A. Starke-Buzetti, M. L. Alves, D. T. da Silva et al. 2014. "Serology, Isolation, and Molecular Detection

- of *Leptospira* Spp. from the Tissues and Blood of Rats Captured in a Wild Animal Preservation Centre in Brazil." *Prev Vet Med* 115 (July): 69–73.
- Pereira, M. M., J. J. P. Da Silva, M. A. Pinto, M. F. Da Silva, M. P. Machado, H. L. Lenzi et al. 2005. "Experimental Leptospirosis in Marmoset Monkeys (*Callithrix jacchus*): A New Model for Studies of Severe Pulmonary Leptospirosis." *Am J Trop Med Hyg* 72 (1): 13–20.
- Picardeau, M. 2013. "Diagnosis and Epidemiology of Leptospirosis." *Med Mal Infect* 43 (January): 1–9.
- Roczek, A., C. Forster, H. Raschel, S. Hörmansdorfer, K. Bogner, A. Hafner-Marx et al. 2008. "Severe Course of Rat Bite-Associated Weil's Disease in a Patient Diagnosed with a New *Leptospira*-Specific Real-Time Quantitative LUX-PCR." *J Med Microbiol* 57 (Pt 5): 658–63. doi:10.1099/jmm.0.47677-0.
- Schuller, S., T. Francey, K. Hartmann, M. Hugonnard, B. Kohn, J. E. Nally et al. 2015. "European Consensus Statement on Leptospirosis in Dogs and Cats." *J Small Anim Pract* 56 (3): 159–79. doi:10.1111/jsap.12328.
- Thiermann, A. B. 1981. "The Norway Rat as a Selective Chronic Carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*." *J Wildl Dis* 17 (1): 39–43.
- Tucunduva de Faria, M., D. A. Athanzio, E. A. Goncalves Ramos, E. F. Silva, M. G. Reis, and A. I. Ko. 2007. "Morphological Alterations in the Kidney of Rats with Natural and Experimental *Leptospira* Infection." *J Comp Pathol* 137 (November): 231–38.
- Vijayachari, P., A. P. Sugunan, and A. N. Shriram. 2008. "Leptospirosis: An Emerging Global Public Health Problem." *Journal of Biosciences* 33 (4): 557–69.
- Villanueva, S. Y. A. M., M. Saito, R. A. Baterna, C. A. M. Estrada, A. K. B. Rivera, M. C. Dato et al. 2014. "Leptospira-Rat-Human Relationship in Luzon, Philippines." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 16 (11): 902–10. doi:10.1016/j.micinf.2014.07.001.
- Watanabe, T., S. S. Teske, and C. N. Haas. 2014. "Classic Dose-Response and Time Postinoculation Models for *Leptospira*." *Risk Analysis: An Official Publication of the Society for Risk Analysis* 34 (3): 465–84. doi:10.1111/risa.12122.
- WHO. 2003. *Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control*. World Health Organization. Geneva, Switzerland.

- Zhang, Y., X. Lou, H. Yang, X. Guo, X. Zhang, P. He et al. 2012. "Establishment of a Leptospirosis Model in Guinea Pigs Using an Epicutaneous Inoculations Route." *BMC Infect Dis* 12: 20. doi:10.1186/1471-2334-12-20.
- Zuerner, R. L. 2005. "Laboratory Maintenance of Pathogenic *Leptospira*." *Curr Protoc Microbiol* Chapter 12 (October): Unit 12E 1.

I. 3) Discussion

Cette étude nous a permis de comparer les caractéristiques de l'infection leptospirosique en fonction de différentes voies d'inoculation potentiellement naturelles et d'explorer d'autres voies d'excrétion possibles des leptospires par le rat.

- Les caractéristiques de l'infection en fonction de la voie d'inoculation

La leptospirose chez le rat présente une forme asymptomatique, n'affectant pas l'animal. Au cours de notre étude, le gain de poids entre les rats infectés et sains ne présentait pas de différence significative, quelle que soit la voie d'entrée. Le portage rénal ne semble donc pas être un désavantage sélectif au sein de la colonie de rongeurs.

Concernant les caractéristiques de la leptospirose chez le rat, la dynamique de l'infection par voie intrapéritonéale de notre modèle était similaire à celle rapportée dans les études précédemment publiées, avec une dose infectante similaire (Athanzio et al. 2008; Monahan et al. 2008). L'infection par voie intrapéritonéale développée au cours de ce travail, peut ainsi servir de référence pour comparer les résultats obtenus avec les autres voies d'inoculation.

En fonction des voies d'inoculation (conjonctivale et sous-cutanée), nous avons observé des variations de la phase bactériémique, de la vitesse de mise en place de l'infection et du taux de colonisation rénale associée à l'excrétion urinaire.

L'infection par voie conjonctivale ne présentait pas de bactériémie à J1 et a conduit à une colonisation rénale dans 50 % des cas, avec une excrétion urinaire des leptospires à partir de la 4^{ème} semaine. Par voie sous-cutanée, l'infection présentait une phase bactériémique à J1 chez 12 % des individus avec une colonisation rénale et une excrétion urinaire intervenant à la 4^{ème} semaine chez ces mêmes d'individus. Par ailleurs, la réponse sérologique était indépendante du taux de colonisation rénale et présentait un titre final similaire, quelle que soit la voie d'entrée considérée.

Ainsi, la voie conjonctivale s'est révélée être plus efficace pour obtenir un portage rénal chez le rat que la voie sous-cutanée, comparativement à la méthode de référence.

Les autres matrices testées (salive, fèces, Lavage Broncho-Alvéolaire (LBA)), correspondant à des voies d'excrétion potentielles, se sont toutes révélées être négatives par analyse moléculaire. Les rats infectés par voie intrapéritonéale,

excrétaient via leurs urines des quantités importantes de leptospires dans l'environnement de leur cage. Malgré un milieu environnant contaminé, aucun prélèvement de salive n'a présenté de traces d'ADN de leptospires. Les cas de morsures rapportés (Luzzi et al. 1987; Gollop et al. 1993) seraient donc probablement dus à une contamination directe de la plaie par de l'urine infectée, plutôt que par la salive. L'excrétion de leptospires par les fèces n'a pas non plus été prouvée au cours de cette étude, l'intégralité des échantillons prélevés étant négative, même chez les rats inoculés par voie conjonctivale. La transmission par voie respiratoire ou par expectoration est peu probable car tous les échantillons de liquide broncho-alvéolaire étaient négatifs par PCR. Nous avons pu démontrer au cours de cette étude qu'il ne semblait pas y avoir chez le rat d'autres voies d'excrétion des leptospires, que la voie urinaire.

- **Caractéristiques du modèle rat développé**

Cette étude comparative de l'infection chez le rat en fonction des voies d'inoculation mimant une contamination naturelle est la première rapportée depuis ces 30 dernières années.

Nous avons choisi d'utiliser, au cours de ce travail, une souche de rat de laboratoire : la lignée non-consanguine Wistar, à statut Specific Pathogen Free (SPF). Cette lignée a été sélectionnée par des éleveurs spécialisés au début du XXe siècle. Elle présente donc une variabilité génétique inférieure à celle des rats sauvages (Klötting et al. 2003), ce qui peut provoquer un éventuel biais lors du développement de l'infection dû à une variabilité individuelle amoindrie. Cependant, l'élaboration d'une lignée sauvage avec un statut sanitaire SPF pour l'expérimentation aurait nécessité la mise en place d'un programme de reproduction sous contrôle sanitaire strict, ce qui était trop long pour être envisagé au cours de ce travail. Nous avons donc choisi la souche Wistar car elle ne présentait pas de différence significative avec les lignées sauvages concernant l'hétérogénéité allélique (Klötting et al. 2003), à la différence de la lignée de Sprague Dawley, utilisée parfois lors de modèle « rat » (Nally et al. 2005). Cette souche Wistar a aussi été utilisée dans l'étude d'Athanzio, ce qui permettait un comparatif et limitait les variations des résultats liées à la souche de l'animal.

La souche de leptospire que nous avons choisie, était *L. interrogans* Copenhageni Fiocruz L1-130, qui avait été isolée d'un patient humain présentant un tableau

clinique sévère avec des complications pulmonaires (Ko et al. 1999). Elle est virulente et létale pour les espèces sensibles. Chez le rat, la dose infectant 50 % des individus est de 10^4 leptospires (Athanzio et al. 2008), c'est pourquoi nous avons utilisé des doses d'inoculum de 10^7 afin d'obtenir, avec la voie de référence intrapéritonéale, un taux de colonisation avoisinant les 100 %.

L'avantage de l'expérimentation est de pouvoir contrôler tous les paramètres afin de caractériser l'infection pour une modélisation. Mais les conditions d'expérimentation peuvent aussi entraîner un biais si elles ne sont pas correctement maîtrisées. Au cours de cette étude et afin d'éviter une contamination interindividuelle, les rats ont été placés en hébergement individuel. De plus, les prélèvements sanguins, urinaires, fécaux et salivaires ont été réalisés sous anesthésie générale pour garantir un nombre de prélèvements optimal avec le volume suffisant pour les analyses prévues. Cette standardisation des prélèvements n'a pu être obtenue que par l'utilisation de l'isoflurane qui permet d'induire tous les stades de l'anesthésie, de l'analgésie et de la relaxation musculaire, nécessaire au relâchement des sphincters urinaire et anal, tout en ayant un effet vasodilatateur permettant de faciliter les prises de sang. L'isoflurane étant éliminé à presque 100 % par les poumons et ne présentant pas d'effet néphro - ou hépatotoxique, ne peut être mis en cause dans la présence des lésions histopathologiques observées en post-inoculation.

Les modèles sur les espèces sensibles ont été plus étudiés ces dernières années, car ils permettent d'étudier les caractéristiques de la leptospirose humaine. Il peut être tentant d'extrapoler les observations faites lors de ces études, à l'espèce rat. Cependant, lors d'une étude réalisée sur le cobaye, la durée de l'infection conduisant à la mort de l'animal était allongée de 24 à 48 heures par voie conjonctivale par rapport à la durée par voie sous-cutanée, sachant que la DL50 pour la voie conjonctivale était significativement supérieure à celle de la voie sous-cutanée (Lourdault et al. 2009). Nos observations sur la cinétique de l'infection sont différentes. Les observations rapportées chez les espèces sensibles sur les variations de l'infection en fonction des voies d'inoculation ou d'autres paramètres ne sembleraient donc pas être transposables à une espèce résistante comme le rat.

Il est donc nécessaire d'approfondir les connaissances sur la leptospirose chez son hôte réservoir par des modèles ciblant cette espèce. Au cours de cette étude, nous n'avons abordé qu'un seul couple de deux paramètres de l'infection (souche et voie d'entrée), mais l'investigation d'autres paramètres serait nécessaire pour connaître et

modéliser l'infection chez ce rongeur : autres voies d'entrée, autres souches de leptospires, ainsi que la durée de l'excrétion urinaire. Les combinaisons sont très nombreuses et nécessiteront plusieurs années d'études.

I. 4) Conclusion

D'après cette première étude, nous avons pu mettre en évidence l'efficacité de la voie conjonctivale pour obtenir un portage rénal des leptospires chez les rats par rapport à la voie sous-cutanée. Cette bactérie pourrait ainsi être transmise principalement par un contact direct via les muqueuses et/ou les conjonctives, plutôt que par morsures. La transmission rat-rat des leptospires dans une colonie serait donc plus efficace par une contamination directe via un environnement infecté par de l'urine de congénère, plutôt que par les relations sociales hiérarchiques (Himsworth et al. 2013), pouvant conduire à des plaies contaminées par de l'urine. Il a été démontré que la présence d'eau stagnante concomitante à la présence de rats entraîne une augmentation significative de la concentration d'ADN de *Leptospira* pathogène dans l'environnement (Ganoza et al. 2006). Les prévalences observées au sein des colonies de rats pourraient donc être essentiellement entretenues par un environnement contaminé par l'urine et favorable au maintien de la bactérie, et dans une moindre mesure par un contact direct entre individus au cours de bagarres. Il est intéressant de souligner que le faible taux de colonisation rénale après infection par voie sous-cutanée permettrait, dans une moindre mesure, le maintien de la bactérie au sein de la colonie si les conditions environnementales n'étaient pas remplies pour une contamination par les points d'eau.

Ces dernières années, quelques études sur la faune sauvage ont montré une prévalence plus faible chez les espèces semi-aquatiques par rapport aux espèces de rongeurs habitant un environnement majoritairement terrestre (Aviat et al. 2009; Moinet et al. 2010). Ces observations suggèrent une transmission des leptospires indépendante de la présence d'eau. Il est donc étonnant de constater que la voie sous-cutanée conduit à un taux de 12 % de colonisation rénale chez le rat après une durée d'un mois.

C'est pourquoi nous avons choisi de réaliser une étude focalisée sur la cinétique de l'infection par voie sous-cutanée afin d'essayer de comprendre cette différence par rapport à la voie conjonctivale.

II) Etude sur la dynamique de l'infection par voie sous-cutanée

II. 1) Objectif

Lors de l'étude précédente, nous avons pu constater que la contamination par des leptospires lors des échanges hiérarchiques serait moins efficace qu'une contamination directe à partir d'un environnement infecté par de l'urine de congénère. Or l'hypothèse d'une transmission des leptospires au sein d'une colonie de rats via les morsures entre congénères a été fortement envisagée au cours d'études épidémiologiques précédentes (Himsworth et al. 2013; Desvars et al. 2013). Le taux de portage rénal augmenterait, en effet, avec l'âge, le nombre de cicatrices et le sexe masculin (Himsworth et al. 2013; Desvars et al. 2013). De plus, des études épidémiologiques sur la faune sauvage montrent une variation des taux de prévalence en fonction de l'environnement de l'espèce considérée. Ainsi, la prévalence chez les espèces animales cibles augmenterait avec un appauvrissement de la présence d'eau dans leur biotope correspondant (Aviat et al. 2009). Cependant, l'inoculation par voie sous-cutanée n'a conduit qu'à un taux de colonisation rénale de 12 %. Il est donc nécessaire d'approfondir l'étude portant sur l'inoculation par voie sous-cutanée afin d'évaluer la portée de ces résultats sur la transmission.

Dans cette partie, nous avons étudié la dynamique de l'infection par voie sous-cutanée grâce à des euthanasies séquentielles, afin d'essayer de comprendre l'origine de la différence du taux de colonisation rénale par rapport à celui de la voie conjonctivale, et de mieux modéliser l'infection dans le cas d'une contamination par voie sous-cutanée par un suivi trihebdomadaire. Une analyse des différents prélèvements a été réalisée au moyen de méthode sérologique, histologique et moléculaire.

II. 2) La phase expérimentale

Lors de cette étude, nous avons utilisé la même souche de *Leptospira* que précédemment : *Leptospira interrogans* séro groupe Icterohaemorrhagiae Copenhageni Fiocruz L1-130, afin de pouvoir comparer les résultats des deux études.

Vingt-cinq rats mâles Wistar âgés de 7 semaines et de statut Specific Pathogen Free (SPF) ont été répartis en 5 lots de 5 individus. Un volume de 500 µl d'EMJH contenant 1.10^7 leptospires a été injecté à chaque rat par voie sous-cutanée en région lombaire. Un lot témoin de 2 rats a été constitué. Ces rats ont reçu une injection de 500 µl de milieu EMJH stérile, par voie sous-cutanée en région lombaire. Cinq cents microlitres de sang ont été prélevés sur chaque rat au niveau du sinus rétro-orbitaire, à J3 ou J11 en fonction du lot correspondant. Une ponction intracardiaque a été réalisée entre l'anesthésie et l'euthanasie de chaque individu. Les dates des procédures réalisées sur chaque lot sont reprises dans le tableau suivant (Tableau VIII).

Tableau VIII : Répartition des lots de rats de l'essai sur la dynamique de l'infection leptospirosique par voie sous-cutanée, avec la date de prélèvement sanguin et de mise à mort correspondant.

N° de lot	Nombre de rat	Inoculum à J0 (leptospire/500µl)	Date de prélèvement sanguin	Date de mise à mort
1	5	10^7	NA	Jour 1
2	5	10^7	Jour 3	Jour 5
3	5	10^7	Jour 3	Jour 8
4	5	10^7	Jour 11	Jour 14
5	5	10^7	Jour 11	Jour 30
6	2	10^0 (EMJH stérile)	Jour 3 (1 rat) Jour 11 (1 rat)	Jour 30

Après l'euthanasie, les reins, le foie, la rate, les poumons, le cœur, les glandes salivaires mandibulaires, le cerveau, les yeux, le sang et l'urine ont été collectés et stockés différemment en fonction des analyses envisagées.

II. 3) Cinétique de production des anticorps par le test de micro-agglutination (MAT)

Chaque sérum prélevé a été centrifugé 5 minutes à 3500 rpm, puis stocké à -20°C pour une analyse ultérieure. Pour la réalisation de ce test, chacun des sérums dilués selon une progression géométrique de raison 2 (de 1:50 à 1:6400), a été mis en contact avec les antigènes des sérovars suivant : Icterohaemorrhagiae (RGA, Verdun) et Copenhageni (M20, 19, Fiocruz). L'analyse par MAT a été répétée trois fois de manière indépendante.

La souche infectante étant *L. interrogans* Copenhageni Fiocruz, l'analyse a été centrée sur les titres obtenus avec ce sérovar. Les titres observés avec les autres sérovars du séro groupe Icterohaemorrhagiae étaient comparables, à une dilution près.

Les anticorps ont été détectés à partir de la première semaine, à 5 jours post-inoculation. Puis, une augmentation du titre suivie d'une stabilisation a été constatée à partir du 11ème jour. La moyenne du titre à 30 jours était de 766.

Les titres d'anticorps, relevés au cours de l'étude sont exposés dans la figure suivante (Figure 9).

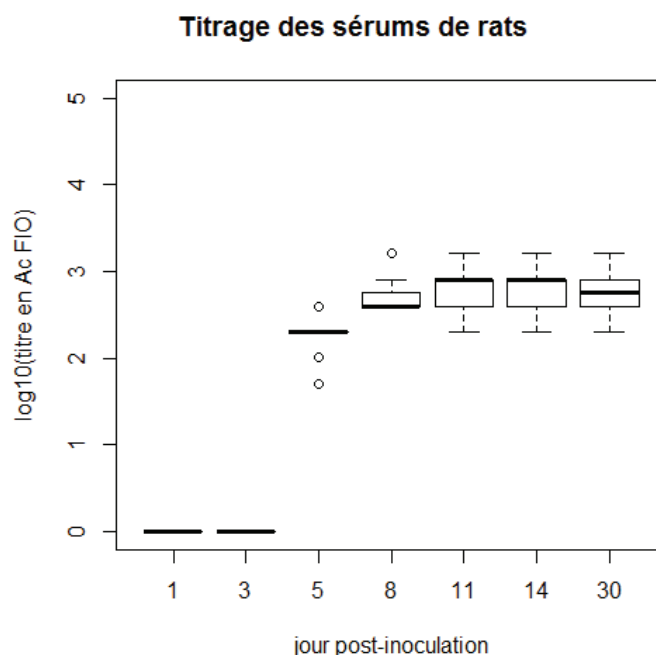


Figure 9 : Analyse sérologique par MAT des sérums de rats inoculés par voie sous-cutanée.

II. 4) L'analyse histologique

Une partie de chaque organe prélevé a été transférée dans du formol à 10 % pendant 24 heures, puis dans de l'alcool à 70°, afin de limiter la destruction des antigènes d'intérêt. Ensuite, pour chaque rat, deux blocs de paraffine ont été confectionnés : le premier contenant le rein, le foie, la rate et le poumon et le second contenant le cœur, la glande salivaire, le cerveau et un globe oculaire. Pour chaque bloc, trois sections tissulaires de 3 µm ont été colorées soit par coloration hémalun-phloxine, soit par coloration argentique Warthin-Starry, soit par immunohistochimie. Les protocoles de ces colorations mis au point pour ce travail sont repris en annexe. Pour les colorations argentiques et immunohistochimiques, des lames « témoin positif », issues de rat de terrain porteur de leptospires, ont été ajoutées à chaque série de coloration.

La coloration hémalun-phloxine a montré que 14/25 rats infectés présentaient des signes anatomopathologiques au niveau du foie et/ou du poumon. Cependant, les deux rats Témoin négatif présentaient également des signes identiques. De ce fait, la majorité des lésions était non significative. Par ailleurs, des lésions rénales de néphrite interstitielle ont été observées chez 2/25 rats. Ces lésions étaient imputables à l'infection par les leptospires, étant absentes chez les rats Témoin négatif (Figure 10).

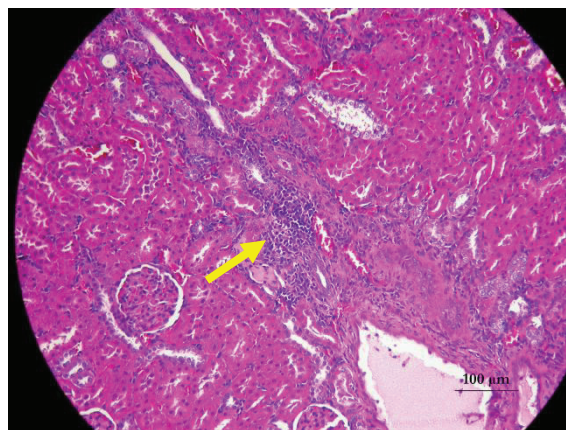


Figure 10 : Coloration hémalun-phloxine de coupe rénale de rat infecté par *Leptospira*, présentant une néphrite interstitielle (Grossissement X200).

L'intégralité des lésions anatomopathologiques observées est reprise dans le Tableau IX.

Tableau IX : Lésions anatomo-pathologiques observées grâce à une coloration hémalum-phloxine, chez les rats inoculés par voie sous-cutanée.

Lot	ID rat	Organes et lésions anatomo-pathologiques
1 (J1)	01	/
	02	Foie (1 Foyer Cell-Infl ϕ) /Poumon (HT Lymph pb)
	03	Foie (1 Foyer Cell-Infl ϕ)
	04	/
	05	/
2 (J5)	06	Foie (stéatose)
	07	/
	08	Foie (stéatose)
	09	Foie (stéatose)
	26	Foie (stéatose)
3 (J8)	11	Rein (2 néphrites interstitielles localisées) / Foie (stéatose, 4 Foyers Cell-Infl 50)
	12	Foie (stéatose, 2 Foyers Cell-Infl 50)
	13	Foie (2 Foyers Cell-Infl 50)
	14	/
	15	Foie (3 Foyers Cell-Infl 50)
4 (J14)	16	Rein (2 néphrites interstitielles localisées)/ Foie (4 Foyers Cell-Infl 50)
	17	/
	18	Foie (1 Foyer Cell-Infl 50)
	19	Poumon (HT Lymph pb)
	20	Poumon (HT Lymph pb)
5 (J30)	21	/
	22	/
	23	/
	24	Foie (2 Foyers Cell-Infl 50)
	25	/
7 (T-)	28	Foie (stéatose, 1 Foyer Cell-Infl 50)
	29	Foie (5 Foyers Cell-Infl 50)/ Poumon (HT Lymph pb)

/ : Aucune lésion observé chez tous les organes;

Cell-Infl 50 : Foyer de cellules inflammatoires lymphoïdes (>50 cellules)

Cell-Infl ϕ : Foyer inflammatoire de cellules macrophagiques (<50 cellules)

HT Lymph pb : Hypertrophie lymphoïde péri-bronchique

La coloration argentique Warthin-Starry a permis de mettre en évidence la présence de leptospires chez 2 rats à J14 et 3 rats à J30. Cependant, le nombre de leptospires présents était de 1 à 2 par champ et plusieurs agrégats de coloration étaient présents sur les lames (Figure 11). La coloration argentique n'a donc pas permis de mettre en évidence une colonisation dense des tubules rénaux à la fin de l'étude.

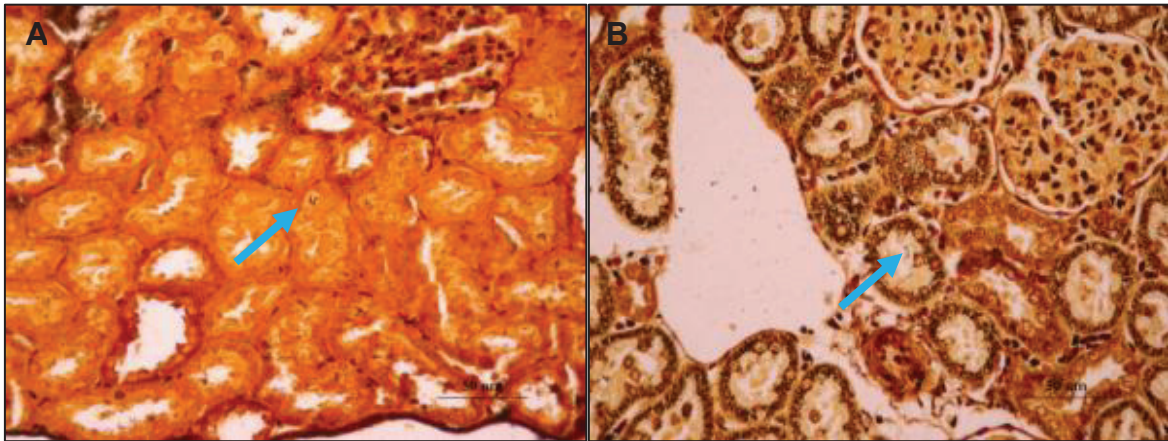


Figure 11 : Coloration argentique Warthin-Starry de coupes de reins de rats infectés par *Leptospira* à J14 (A) et J30 (B) (Grossissement X400).

Les lames colorées par immunohistochimie ne présentaient pas d'artéfact de coloration, à part une légère pigmentation rougeâtre de certaines cellules macrophagiques due à une accroche non spécifique des anticorps. Les lames des rats témoins négatifs étaient négatives à l'analyse.

Nous avons pu observer la présence de leptospires marqués sur trois lames (1 à 2 bactéries par champ), dans la lumière alvéolaire d'un rat à J5 post-inoculation (Figure 12 A) ainsi que dans les tubules et les travées conjonctives rénaux de deux rats à J30 post-inoculation (Figure 12 B).

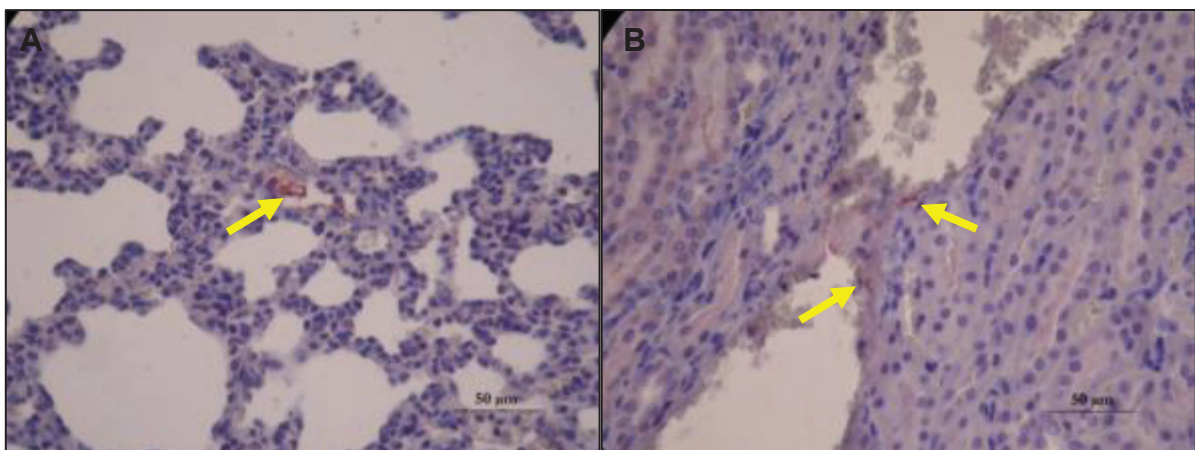


Figure 12 : Coloration par immunohistochimie de coupes d'organes de rats infectés par *Leptospira*, présence de marquage à J5 dans le poumon (A) et J30 dans le rein (B) (Grossissement X400).

II. 5) Détection et quantification des leptospires dans les organes

L'ADN des organes (rein, foie, rate, poumon, cœur, cerveau, glande salivaire et œil) et des matrices (sang et urine) a été extrait par filtration sur colonne de silice (QIAamp DNA mini kit, Qiagen, Courtaboeuf, France), selon le protocole repris en annexe II. La qualité et la concentration d'ADN de chaque extrait ont ensuite été estimées par spectrophotométrie, grâce à une mesure de l'absorbance à 260/280nm avec un spectrophotomètre UV Visible (nanodrop 2000, Thermo Fischer Scientific, Illkirch, France). Les extraits d'ADN obtenus ont été ensuite stockés à -20 °C.

Les extraits d'ADN ont été analysés par PCR quantitative en temps-réel SYBR Green avec des amorces amplifiant le gène *Lfb1* (Merien et al. 2005) spécifique des leptospires pathogènes. La PCR quantitative était identique à celle présentée dans l'étude comparative de l'infection (Article 1). Les détails du protocole sont repris en annexe. Chaque échantillon a été testé en duplicata, ou triplicata si les résultats étaient variables. Des témoins positifs et négatifs adéquats ont été ajoutés lors de chaque série d'analyses.

Les analyses moléculaires ont été réalisées sur les prélèvements de sang, d'urine et d'organes collectés de chaque rat appartenant à chaque lot. Les prélèvements collectés à partir des rats témoins négatifs ont tous été négatifs par qPCR.

La proportion d'échantillons positifs par lot et par type de prélèvement, associée à leurs concentrations en ADN de *Leptospira* (copies génomiques / μ l) est reprise dans le Tableau X.

Tableau X : Taux d'échantillons positifs en fonction du type d'organe et du jour de prélèvement.

	Sang	Urine	Rein	Foie	Rate	Poumon	Cœur	Cerveau	Gl. Sal.	Œil
J1	3/5 (101.93 ±58.96)*	0/5	2/5 (6.02 ±4.85)	0/5	3/5 (6.16 ±5.94)	2/5 (56.83 ±76.60)	0/5	0/5	0/5	0/5
J3	0/10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
J5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
J8	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
J14	0/5	2/5 (848 ±837.21)	2/5 (397.15 ±514.56)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
J30	0/5	1/5 (311)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Gl. Sal. : Glande Salivaire

* : entre parenthèse la concentration moyenne en ADN de leptospires associé à l'écart-type (en copie génomique/ μ l).

Les analyses moléculaires ont montré la présence d'une phase bactériémique chez 3/5 rats à J1 avec un passage par plusieurs organes (rein, rate et poumon). Cette phase bactériémique ne semble pas durer plus de 24-48h.

Au cours des 14 premiers jours, aucun ADN de leptospires n'a été détecté dans les organes et matrices étudiés.

A J14 post-inoculation, l'ADN de leptospires était présent dans les reins et urines de 2/5 rats. Et, à J30, 1/5 rat présentait de l'ADN dans l'urine.

Ces observations sont similaires à celles relevées au cours de l'étude précédente.

II. 6) Discussion

Dans cette partie, nous avons étudié la cinétique de l'infection par voie sous-cutanée, afin d'essayer de comprendre l'origine de la différence du taux de colonisation rénale observée entre la voie sous-cutanée et la voie conjonctivale. Dans un contexte scientifique où l'hypothèse d'une contamination rat-rat par morsure en milieu terrestre a été rapportée d'après des études épidémiologiques précédentes, l'objectif était d'étudier l'efficacité de cette voie d'inoculation comme modalité possible de transmission entre rats.

- La cinétique de l'infection par voie sous-cutanée

L'infection leptospirosique présentait, tout d'abord, une cinétique des anticorps, mesurés par la MAT, similaire à celle observée lors de l'étude précédente. L'apparition des anticorps a été détectée à la fin de la première semaine d'infection avec une augmentation rapide jusqu'à la fin de la deuxième semaine. Un titre final situé entre 1:700-1:750 a été observé à 30 jours, lors des deux études. La réponse sérologique développée par les rats adultes est donc deux à cinq fois moins importante que celle développée lors d'une infection aiguë chez les espèces sensibles ou les ratons (Muslich et al. 2015). Cette différence pourrait s'expliquer par : 1) une adaptation « hôte-pathogène » des leptospires conduisant à une régulation spécifique de l'expression des protéines FlaB, LigB, LipL32 et OmpL37 dans un environnement *in vivo* murin (Matsui et al. 2012) (ces protéines ayant un rôle dans l'interaction cellulaire lors de l'invasion tissulaire des leptospires) ; 2) une adaptation « hôte-pathogène » de l'hôte, amenant à une multiplication contrôlée des leptospires pendant la phase de dissémination, grâce à une réponse inflammatoire et humorale adaptée, qui se traduit par la surexpression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 qui, d'une part, limite la réponse pro-inflammatoire et les lésions tissulaires associées, et qui, d'autre part, active la production des immunoglobulines par les lymphocytes B, en synergie avec la reconnaissance du lipide A du LPS des leptospires par les récepteurs Toll-like 4 de ces mêmes lymphocytes (Werts 2010; Matsui et al. 2011) ; 3) un fort tropisme rénal des leptospires, leur permettant d'échapper à la phase de clairance provoquée par les lymphocytes B et leurs immunoglobulines (Monahan et al. 2008; Werts 2010).

Il est intéressant de souligner que la réponse sérologique développée par le rat est identique quelle que soit la voie d'entrée des leptospires, et qu'elle n'est pas corrélée au pourcentage de réussite de la colonisation rénale. Le facteur-clé conduisant un rat à être ou non porteur de leptospires n'est donc pas la force de sa réponse immunitaire, par l'intermédiaire de la production d'anticorps.

Une courte phase bactériémique a été observée à J1 (durée 24-48 heures), accompagnée d'une dissémination transitoire et aléatoire des bactéries dans l'organisme du rat, par voie sanguine. La présence de marquage dans la lumière alvéolaire à J5 est en adéquation avec les observations d'Athanazio (Athanazio et al. 2008) traduisant un passage transitoire des leptospires dans les organes, comme dans le poumon. Une phase de clairance, similaire à celle décrite par Athanazio et

collaborateurs, a été observée en corrélation avec l'apparition à J5 des anticorps. La colonisation rénale associée à l'excrétion urinaire s'est établie chez moins de 20 % des individus à partir de la 3^{ème} semaine, avec une concentration en ADN de leptospires dans le rein et l'urine variant individuellement. La néphrite interstitielle, seule lésion rénale observée, était corrélée chez 50 % des rats à la présence de leptospires détectés par biologie moléculaire. Les analyses histologiques ont révélé une faible quantité de leptospires à J30 post-inoculation, qui pourrait correspondre au début de la mise en place de la colonisation rénale, comme cela a été observé lors de l'étude précédente. Sachant que le nombre de néphrons colonisés est proportionnel à la dose infectante, qui est en lien avec la concentration en phase bactériémique (Ratet et al. 2014), il est envisageable que la colonisation rénale à faible densité, observée lors d'une inoculation sous-cutanée, provienne d'une concentration en leptospires dans le sang plus faible que celle établie lors d'une inoculation intrapéritonéale.

Une variabilité individuelle pourrait donc fortement influencer le développement de l'infection, des lésions tissulaires et du portage rénal. Seule la réponse en anticorps reste indépendante. Le facteur-clé conduisant un rat à être ou non porteur de leptospires serait donc la présence d'une phase bactériémique. La probabilité du passage des leptospires dans la circulation sanguine varierait alors en fonction de la voie d'entrée et de ses caractéristiques. Ainsi, la peau du rat avec ses poils, la desquamation permanente des kératinocytes, la kératinisation intracellulaire et le ciment intercellulaire offre une barrière infranchissable aux leptospires, à la seule exception d'une lésion de cette barrière lors d'une morsure. Dans ce cas-ci, la peau présente une bonne défense immunitaire par l'intermédiaire des cellules macrophagiques de Langerhans et des lymphocytes, assurant la destruction des bactéries.

Nous avons pu constater au cours de notre étude, que cette réponse était efficace pour éviter un passage sanguin des leptospires dans 70 % à 85 % des cas. Les leptospires n'étant pas présents dans la salive, seule une contamination de la lésion par contact avec de l'urine infectée est à envisager. La probabilité que les leptospires entrent en contact avec une lésion enfouie dans les poils de l'animal est donc très faible. L'hypothèse d'une contamination rat-rat par morsure dans un milieu terrestre ne semble donc pas être la source principale du maintien des leptospires dans la colonie, mais elle permettrait de maintenir la prévalence à un niveau minimal.

Contrairement à la peau, les muqueuses, bien qu'ayant une structure semblable à la barrière cutanée, ont une moindre résistance, ce qui augmente de manière significative le nombre de lésions favorisant une contamination par les leptospires. La voie conjonctivale serait potentiellement une voie de contamination rat-rat plus efficace dans une colonie, par l'intermédiaire de points d'eau. En conclusion, la voie d'entrée sous-cutanée accroît la durée de mise en place du portage rénal chez le rat, dont elle influence le taux de réussite à seulement 15 %.

- **Le modèle d'infection expérimentale et les méthodes analytiques**

Nous avons choisi au cours de cette partie expérimentale, de caractériser et d'affiner l'étude de la dynamique de l'infection leptospirosique chez le rat avec des méthodes moléculaires récentes en parallèle de méthodes histologiques et sérologiques classiques. Les méthodes d'analyses histologiques et moléculaires utilisées présentaient plusieurs avantages mais également des limites.

Pour les analyses histologiques, nous avons utilisé la coloration Warthin-Starry qui est une méthode de choix pour l'identification des leptospires dans des échantillons tissulaires (Guerra 2009), avec en parallèle l'immunohistochimie, une technique d'immunomarquage avec une bonne sensibilité quel que soit les organes cibles (Monahan et al. 2008; Nally et al. 2004). Malgré cela, nous avons été confrontés à deux problèmes importants. Le premier était une interprétation difficile des coupes histologiques en raison, d'une part, d'une faible quantité de leptospires observables, et, d'autre part, de lésions similaires observées à la fois chez les individus infectés et chez les rats témoins. Les lésions hépatiques de stéatose semblaient être imputables aux conditions expérimentales, les rats ayant présentés une masse graisseuse supérieure à la condition physique normale d'un individu de 12 semaines. Le second problème était une forte proportion de lames négatives, malgré la présence d'ADN de leptospires dans les échantillons correspondants détectés par biologie moléculaire. Ceci pourrait s'expliquer par une sensibilité plus faible des colorations histologiques classiques, comme la coloration argentique, par rapport aux techniques moléculaires (Fornazari et al. 2012) et par une répartition aléatoire et hétérogène des leptospires dans les tubules. Il s'est avéré important de faire évoluer les techniques histologiques afin qu'elles soient plus sensibles. Une première évolution, basée sur les liaisons Antigène-Anticorps, s'est opérée depuis quelques années avec le développement des techniques d'immunomarquage, comme l'immunohistochimie

(Ristow et al. 2007), l'immunofluorescence (Ristow et al. 2007) et l'immunofluorescence imprint (Chagas-Junior et al. 2009). Même si l'immunohistochimie est plus facilement interprétable par rapport à la coloration argentique, elle manque également de sensibilité, due aux liaisons antigène-anticorps sérotype dépendant. L'immunomarquage présente donc une limite face à la diversité de sérotypes pouvant être observés sur le terrain. La technique Fluorescence In Situ Hybridization, qui est une technique basée sur la détection de l'ADN dans les sections tissulaires (Schmiedel et al. 2009; Hammer et al. 2001), pourrait être considéré comme une amélioration supplémentaire dans l'étude des infections leptospirosiques.

Quant aux analyses moléculaires, la qPCR quantitative utilisée dans ce chapitre, présentait une bonne sensibilité permettant de détecter des échantillons contenant de faible quantité d'ADN de *Leptospira*. En effet, le système SYBR Green amplifiant le gène *Lfb1* présente un seuil de sensibilité avoisinant les 10^1 leptospires/ μ l ainsi qu'une bonne spécificité pouvant être validée par la température de fusion des séquences amplifiées (Bourhy et al. 2011). Il faut souligner que la qPCR Taq-Man, décrite dans le chapitre 2, n'est qu'une technique semi-quantitative de détection, utilisée lors du diagnostic d'échantillon clinique, présentant une spécificité renforcée par la sonde ciblant une portion de gène spécifique des leptospires pathogènes. Ainsi, le système SYBR Green est mieux adapté dans le cas de notre infection expérimentale avec une souche connue de leptospire, plutôt que le système Taq-Man. Toutefois, au cours de l'étude expérimentale, certaines séries de prélèvement au sein d'un même individu présentaient des résultats variables, avec pour exemple, un individu présentant une urine positive à J_n et négative à J_{n+7} , ou encore un individu ayant à J_{30} , une urine positive avec un résultat négatif sur le rein. Cette observation proviendrait certainement d'un biais d'analyse, probablement au cours des étapes de prélèvement et/ou d'extraction (Bourhy et al. 2011), ceci malgré la mise en place, au cours de notre étude, de mesures de standardisation et de réduction des biais expérimentaux et d'extraction. La qPCR est une méthode sensible adaptée à l'étude de la cinétique de l'infection, mais qui pourrait être complétée par de nouvelles techniques d'analyse basée sur l'imagerie directement sur l'animal vivant (Ratet et al. 2014).

Au vu des taux de colonisation rénale observés au cours de notre travail, une étude statistiquement significative de la cinétique nécessiterait l'utilisation de cinq fois plus

d'animaux que lors de notre étude, ce qui demanderait des moyens financiers conséquents et qui irait à l'encontre de la nouvelle réglementation européenne sur l'expérimentation animale. L'imagerie présenterait l'avantage d'éviter la mise en place de modèle avec des euthanasies séquentielles et permettrait ainsi le suivi de l'infection avec des leptospires bioluminescents (Ratet et al. 2014), directement sur des animaux vivants.

II. 7) Conclusion

Dans cette partie, nous avons démontré que la dynamique de l'infection par voie sous-cutanée était fortement influencée par la variabilité individuelle et par les caractéristiques de cette voie d'entrée, qui conditionnent le passage des leptospires jusqu'à la circulation sanguine. La transmission par les morsures au sein des colonies présente ainsi une part aléatoire qu'il est difficile de modéliser.

Conclusion du chapitre 1

Nous avons mis au point un modèle expérimental de l'infection par *Leptospira* chez le rat, mimant pour la première fois des conditions naturelles d'inoculation. Ce modèle nous a permis de nous rendre compte que la cinétique de l'infection et le taux de colonisation rénale étaient liés à la voie d'inoculation utilisée. Ainsi, la transmission de cette bactérie s'effectuerait principalement par contact direct avec un environnement contaminé via les muqueuses et/ou conjonctives, plutôt que par les morsures. Le point essentiel de la mise en place de l'infection chez le rat serait donc la voie d'entrée, permettant d'établir une phase bactériémique, les caractéristiques du site d'entrée influençant la proportion de leptospires passant du milieu extérieur jusqu'à la circulation sanguine de l'animal, d'autant plus que cette phase bactériémique est indicatrice du portage rénal. C'est pourquoi, il est important de déterminer quelles seraient les voies d'entrée les plus efficaces chez le rat, conduisant à la mise en place d'une dissémination des leptospires par une phase bactériémique, afin de connaître toutes les caractéristiques de l'infection et permettre une modélisation correcte.

Aucune autre voie d'excrétion investiguée (salive, fèces et voie aérienne) au cours de ce travail, n'a indiqué à l'analyse la présence de leptospires. L'excrétion urinaire semble ainsi être la seule et unique voie d'excrétion des leptospires dans l'environnement.

Au cours de ces études, nous avons constaté que les techniques moléculaires présentent une meilleure sensibilité que les techniques histologiques pour la caractérisation de la cinétique de l'infection. Cependant, certains biais d'expérimentation et d'extraction existent. Afin de s'en affranchir, il serait intéressant d'utiliser une technique d'analyse directement sur l'animal vivant. Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence une production d'anticorps mesurée par la technique de micro-agglutination, indépendante de la présence de colonisation rénale par les leptospires, ce qui entraîne un biais d'analyse important, principalement lors des études épidémiologiques. En effet, lors de ces études, la MAT a souvent été utilisée comme technique de sérotypage, mais au vu de ces observations, il serait préférable

d'utiliser d'autres outils pour étudier la prévalence chez les rongeurs, tels que les outils moléculaires.

Dans la partie suivante réalisée sur le terrain, nous avons étudié l'infection leptospirosique « naturelle » au sein de colonies urbaines de rats dans le but de combiner les observations faites à la fois sur notre modèle expérimental « rat » et au cours d'une infection naturelle, et ce, afin de définir au mieux les caractéristiques de l'infection chez ce rongeur en vue d'une modélisation.

Par ailleurs, au cours de cette étude sur le terrain, nous avons étudié la dynamique d'infection et de transmission des souches de leptospires dans des colonies de rats tout en analysant les conditions écologiques pouvant les influencer afin de pouvoir, *in fine*, prévenir la transmission des leptospires à l'Homme et aux animaux domestiques.

CHAPITRE 2 :

LA LEPTOSPIROSE EN CONDITIONS NATURELLES CHEZ LE RAT BRUN SAUVAGE: ETUDES DE L'INFECTION NATURELLE ET DE LA DYNAMIQUE DE TRANSMISSION

Au cours de la première partie, nous avons étudié la dynamique de l'infection chez le rat brun dans un modèle expérimental en utilisant des voies d'inoculation se rapprochant au mieux des conditions naturelles. S'il est intéressant d'étudier les interactions cellulaires et moléculaires entre les tissus de l'hôte et de son « pathogène » en conditions expérimentales, il est tout aussi important d'étudier cette relation « hôte-pathogène » sur des rats vivants dans un environnement naturel, afin de comprendre la complexité des actions influençant cette interaction dans son écosystème d'origine. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'infection naturelle à l'échelle individuelle, afin de vérifier que les observations relevées au cours des modèles expérimentaux correspondent à ce qui se passe sur le terrain lors d'une infection naturelle. Nous avons ensuite étudié la dynamique de transmission des leptospires chez une population de rats en s'intéressant, d'une part, à la mesure de la prévalence du portage des leptospires dans les colonies de rats de la région lyonnaise tout en explorant les facteurs environnementaux pouvant influencer cette prévalence et, d'autre part, à l'identification précise des souches de leptospires afin de comprendre la dynamique de leur transmission entre les rats au sein d'une colonie et entre différentes colonies.

Ces dernières années, peu d'études se sont intéressées à l'infection naturelle chez le rat et ses caractéristiques à l'échelle individuelle, du fait du manque de données sur l'historique des individus étudiés rendant plus difficile l'interprétation des résultats. Les études réalisées sur des rats sauvages naturellement infectés ont

montré que les tubules rénaux présentent une forte densité de colonisation par les leptospires, sous la forme d'une structure analogue à celle d'un biofilm (Ko et al. 2009), leur permettant de s'accrocher à l'interface épithélium-lumière du tubule. Cette colonisation peut être associée ou non à une néphrite interstitielle (Agudelo-Florez et al. 2013). De plus, les leptospires sont excrétés par l'urine en grande quantité durant une période pouvant aller jusqu'à plus de 6 mois, chez le rat brun (Thiermann 1981; Sterling et Thiermann 1981). Malheureusement, ces études sur l'infection naturelle sont exclusivement ciblées sur le rein et n'ont que peu exploré la présence de leptospires dans d'autres organes. Par ailleurs, afin de mieux caractériser cette infection, une étude a tenté de comparer les lésions histologiques observées lors d'infections expérimentales et d'infections naturelles (Tucunduva de Faria et al. 2007). Celle-ci a montré que la néphrite interstitielle était la seule lésion observable au cours de l'infection expérimentale. Mais dans le cas de l'infection naturelle, le contexte infectieux et environnemental de l'animal demeurant inconnus, une néphrite interstitielle peut alors être ou non concomitante à la présence d'une douzaine d'autres lésions tissulaires, et être en proportion similaire chez des individus porteurs ou non de leptospires (respectivement culture positive ou négative).

Notre premier objectif était de comparer l'étude de l'infection obtenue en condition expérimentale par rapport à celle obtenue en condition naturelle chez le rat brun, en analysant les mêmes paramètres, et en utilisant les mêmes outils d'analyse.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la dynamique de transmission des leptospires qui se produit au sein d'un groupe d'individus : la colonie. Les connaissances sur la dynamique de transmission des pathogènes ont fortement progressé grâce à l'étude d'un système épidémiologique impliquant un seul pathogène infectant une seule espèce d'hôte. Le défi rencontré avec les leptospires est de comprendre une dynamique de transmission qui implique plusieurs espèces d'hôtes et plusieurs espèces pathogènes de *Leptospira* réparties en plus de 200 sérovars différents (Bharti et al. 2003). Par conséquent, dans cette étude, nous avons ciblé l'espèce hôte la plus importante d'un point de vue épidémiologique : le rat brun.

Le premier point à étudier pour établir la dynamique de transmission des leptospires au sein d'une population de rats passe par la mesure de la prévalence du portage rénal au sein des colonies d'une région définie et par l'analyse de cette prévalence

en fonction des variables environnementales. Plusieurs études épidémiologiques ont été réalisées, dans divers habitats, pour essayer d'établir un lien entre la prévalence observée de la leptospirose et les facteurs environnementaux: dans des régions tropicales ou tempérées (Perez et al. 2011; Krojgaard et al. 2009), dans des environnements humides (Aviat et al. 2009), dans des milieux urbains ou ruraux (Webster et al. 1995; Koizumi et al. 2009). Ces études ont révélé que la prévalence varie fortement entre différentes villes d'un même pays (Turk et al. 2003) ou entre les localisations au sein d'une même ville (Krojgaard et al. 2009; Koizumi et al. 2009), indépendamment de la zone climatique. Cette hétérogénéité de prévalence du portage de leptospires, au sein des colonies de rats d'une même région, suggère que la prévalence dépend du site (Himsworth et al. 2013), et donc, de facteurs résultant des interactions locales entre l'environnement immédiat de la colonie et des facteurs intrinsèques à cette colonie de rongeurs. Même si ces facteurs sont malheureusement à ce jour mal définis, il est nécessaire de tenir compte de ceux qui sont mesurables à l'heure actuelle, dans l'étude de la dynamique de transmission, afin de permettre une meilleure prévision des risques d'infection pour l'Homme et les animaux.

Notre second objectif était de mesurer les prévalences de portage de leptospires, dans des colonies de rats de la région lyonnaise, et de les analyser en fonction de certaines variables intrinsèques et extrinsèques aux colonies, afin de comprendre la dynamique de transmission des leptospires chez les rats.

Il est également important de considérer pour cette étude de la dynamique de transmission, la grande variabilité des souches présentes sur le terrain et la capacité que nous avons de pouvoir les identifier avec précision. Les leptospires pathogènes sont répartis en plus de 200 sérovars, or il est important de se baser sur une caractérisation fine des souches de *Leptospira* circulantes pour modéliser leur transmission entre les rats au sein d'une même colonie et entre plusieurs colonies. Pour se faire, il est nécessaire d'avoir un outil fiable et hautement résolutif permettant d'identifier précisément chaque sérovar. À l'heure actuelle, le sérotypage par la technique de micro-agglutination (MAT) est remplacé par des techniques de biologie moléculaires, car la méthode MAT conduit souvent à des réactions croisées entre différents sérovars, ce qui rend l'interprétation difficile lors d'études épidémiologiques. Les techniques les plus utilisées ces dernières années pour le

typage des souches de leptospires sont les méthodes de Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) (Salaun et al. 2006) et de MultiLocus Sequence Typing (MLST) (Ahmed et al. 2006).

Les avantages de la VNTR sont multiples : elle est reproductible, facilement standardisable et son pouvoir de discrimination est de 90-92 % pour les sérovars de *L. interrogans* (Salaun et al. 2006). Toutefois, le pouvoir résolutif dépend de la composition du gel et du nombre de répétition du locus ; la différenciation de fragment de poids moléculaire proche n'est pas toujours aisée (Slack et al. 2005).

Quant à la MLST, les gènes choisis sont des « gènes de ménage », qui sont présents chez toutes les espèces de leptospires et qui montrent une vitesse de mutation très lente (Enright et Spratt 1999), ce qui implique une faible variabilité des allèles. Elle est facilement standardisable et ses résultats sont robustes du fait qu'elle soit basée sur l'analyse de séquences.

Cependant, aujourd'hui, ces deux techniques ne permettent pas de discriminer avec précision les sérovars *Icterohaemorrhagiae* et *Copenhageni* (Pavan et al. 2011; Caimi et al. 2012; Perez et Goarant 2010; Bourhy et al. 2013), appartenant tous les deux au sérogroupe *Icterohaemorrhagiae*. Ce sérogroupe est le plus fréquemment incriminé, à ce jour, dans les cas sévères de leptospirose humaine à travers le monde et dont le rat est le réservoir principal (Picardeau 2013; Adler et de la Pena Moctezuma 2010). Il est donc important d'utiliser un outil permettant une identification fine et précise des sérovars de ce sérogroupe pour tracer au mieux la dynamique de transmission des leptospires.

Notre dernier objectif était de développer un nouvel outil de typage moléculaire permettant d'identifier avec précision les souches de *Leptospira* dans la population de rats de la région lyonnaise.

I) La Multispacer Sequence Typing, un nouvel outil de typage résolutif pour les souches de *L. interrogans*

I. 1) Objectif

Avant l'ère de la génétique, les études épidémiologiques étaient basées sur des analyses sérologiques par la méthode de MAT. Au cours de ces études, une forte proportion d'échantillons réagissait à plusieurs sérogroupes, dus aux réactions croisées, ce qui était gênant pour l'interprétation et l'identification précise des sérovars circulants (Agudelo-Florez et al. 2009). Les techniques de PCR développées ces dernières années, ont montré une plus grande sensibilité que la MAT pour la détection des leptospires, avec une corrélation statistiquement faible entre les résultats de ces deux techniques (Fornazari et al. 2012). C'est pourquoi les études épidémiologiques actuelles utilisent de plus en plus les techniques de détection basées sur la PCR, associées à des méthodes moléculaires pour le typage.

Aujourd'hui, les deux méthodes utilisées sont la VNTR et la MLST. Bien qu'ils soient résolutifs, ces outils de typage présentent certaines limites gênantes lors d'études sur le terrain. Ces limites sont liées soit à une faible discrimination des sérovars *Icterohaemorrhagiae* et *Copenhageni*, soit à des contraintes techniques comme l'analyse parfois difficile de la taille des loci de VNTR, ou la nécessité de séquencer sept à huit loci pour la MLST (Caimi et al. 2012).

La Multispacer Sequence Typing (MST) est une nouvelle technique basée sur le séquençage de régions intergéniques qui étant moins soumises à la pression de sélection, sont souvent plus variables que les gènes de ménages (Foucault et al. 2005). De plus, cette technique s'est souvent montrée robuste, reproductible et plus discriminante que la MLST lors de son application chez différentes espèces bactériennes (Fournier et al. 2004).

Nous avons alors mis au point son développement pour le typage des souches de leptospires de l'espèce *L. interrogans*, avec pour objectif la discrimination des sérovars pathogènes, particulièrement ceux du séro groupe *Icterohaemorrhagiae*.

I. 2) Article

Ces travaux présentés dans le manuscrit sont publiés dans le Journal of Clinical Microbiology et intégrés dans la thèse.

High-Resolution Typing of *Leptospira interrogans* Strains by Multispacer Sequence Typing

Anne-Laure Zilber,^a Mathieu Picardeau,^b Florence Ayrat,^a Marc Artols,^a Pierre Demont,^c Angeli Kodjo,^{a,c} Zoheira Djelouadi^{a,c}

USC1233 INRAVAS, Equipe PERS, Etablissement VetAgro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Etoile, France^a; Institut Pasteur, Unité de Biologie des Spirochètes, National Reference Center and WHO Collaborating Center for Leptospirosis, Paris, France^b; Laboratoire des Leptospire, Etablissement VetAgro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Etoile, France^c

Leptospirosis is a worldwide zoonosis which is responsible for the typical form of Weil's disease. The epidemiological surveillance of the *Leptospira* species agent is important for host prevalence control. Although the genotyping methods have progressed, the identification of some serovars remains ambiguous. We investigated the multispacer sequence typing (MST) method for genotyping strains belonging to the species *Leptospira interrogans*, which is the main agent of leptospirosis worldwide. A total of 33 DNA samples isolated from the reference strains of *L. interrogans* serogroups Icterohaemorrhagiae, Australis, Canicola, and Grippityphosa, which are the most prevalent serogroups in France, were analyzed by both the variable-number tandem-repeat (VNTR) and MST methods. An MST database has been constructed from the DNA of these reference strains to define the MST profiles. The MST profiles corroborated with the VNTR results. Moreover, the MST analysis allowed the identification at the serovar level or potentially to the isolate level for strains belonging to *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, which then results in a higher resolution than VNTR (Hunter-Gaston index of 0.94 versus 0.68). Regarding *L. interrogans* serogroups Australis, Canicola, and Grippityphosa, the MST and VNTR methods similarly identified the genotype. The MST method enabled the acquisition of simple and robust results that were based on the nucleotide sequences. The MST identified clinical isolates in correlation with the reference serovar profiles, thus permitting an epidemiological surveillance of circulating *L. interrogans* strains, especially for the Icterohaemorrhagiae serogroup, which includes the most prevalent strains of public health interest.

Leptospirosis is a worldwide zoonosis with high mortality and morbidity rates in humans (1). The current reports estimate that more than 500,000 severe cases occur annually throughout the world (2). Recent outbreaks have increased with the rainfall (2, 3) and the urbanization associated with the conditions of slum living (2, 4, 5). In humans, the infection ranges from a mild form to a severe infection with fever, jaundice, and renal failure (Weil's disease), which leads to death in 5 to 10% of all patients with leptospirosis (4, 6, 7). In animals, leptospirosis can cause reproductive failure, with abortion and infertility in cattle and acute febrile illness with renal and hepatic failure in dogs (8).

Leptospirosis is caused by spirochetes, which belong to the family *Leptospiraceae*. Actually, two classifications of *Leptospira* spp. coexist, with one based on serological analyses and the other on genomic classification. The serologic classification of *Leptospira* spp. is based on the expression of the lipopolysaccharide (LPS) antigens and has been used to define more than 300 serovars (1). The DNA-DNA hybridization data have been used to classify the genus *Leptospira* into 21 genomospecies, including saprophytic, intermediate, and pathogenic species (1, 7, 9, 10).

The identification of a *Leptospira* species isolate has important implications for both diagnosis and epidemiology. During the serological diagnosis, the identification permits the establishment of the serogroup responsible for the infection. Moreover, the serogroup identification enables the determination of the animal reservoir and the prevalence of serogroup according to geographic regions (4), which can then be used to plan updates to the vaccine components (11, 12).

The serological reference test, which is the microscopic agglutination test (MAT), is a specific and complex procedure performed by reference laboratories. This method is a serogroup-

specific test rather than a serovar-specific test, because cross-reactions between different serovars from the same serogroup can occur (8, 13), which means that the serovar identification is uncertain, thereby limiting its power as an epidemiological tool.

Several genotyping methods have been developed to tentatively identify the isolates to the serovar level. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (14, 15) is a standardized method that can identify 90% of the pathogenic *Leptospira* species serovars (15, 16). Moreover, the discrimination of certain pathogenic serovars, such as Pomona, Icterohaemorrhagiae, and Copenhageni, is still difficult by PFGE (14, 17). Multilocus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis (18) was part of the routine analysis for the diagnosis of *Leptospira* species genotypes. This method has been standardized and requires only simple PCR equipment. The VNTR analysis enables the serovar identification of causal agents that belong to the *Leptospira interrogans*, *Leptospira kirschneri*, and *Leptospira borgpetersenii* species. However, its resolution is dependent on the agarose component of the electrophoresis gel, and the analysis of nearby fragment sizes can occasionally be ambiguous (19). Moreover, the differentiation of certain serovars, such as between *L. interrogans* serovars Icterohaemorrhagiae and Copen-

Received 6 September 2013 Returned for modification 2 October 2013

Accepted 2 December 2013

Published ahead of print 11 December 2013

Editor: A. B. Onderdonk

Address correspondence to Zoheira Djelouadi, z.djelouadi@vetagro-sup.fr.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.02482-13

TABLE 1 MST primers used for the PCR amplification and sequencing of *L. interrogans* isolates

Spacer	ORF upstream (F) and downstream (R) of spacer sequence ^a	Position and nucleotide sequence (5'→3')	PCR product size (bp) ^a
MST1 F	Hypothetical protein	210612 ACG GGA GAA TCT GTC AAA GG	207–263
MST1 R	Hypothetical protein	210837 AAA TTC ACT GAT TAC CTC CAC CA	
MST3 F	4-Diphosphocytidil-2-C-methyl-D-erythriol kinase	3792625 ACG ATC GTG CCA ATG TTT TT	361–375
MST3 R	Transcriptional regulator	3793059 AAA ATT CAA ACC GGC AAA TG	
MST4 F	Hypothetical protein	3656262 GGT TTA TTT GAA ATC ATG AAA ACT TCT	323–328
MST4 R	Hypothetical protein	3656586 TAT CTT TTA TTC AAT CTT GTG AAT CC	
MST7 F	Inhibitor of MCP methylation	2448482 AAA AGG CCT TCT TGG GTT TA	392–393
MST7 R	Hypothetical protein	2448875 GAT CAA CGG TCC GTA AAA CG	
MST9 F	Bifunctional 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate	1155922 TTT GAA AAA CGA CTG AGG TCA A	236–237
MST9 R	Hypothetical protein	1156167 TCG ATA TCG GCA CAA AAT CA	

^a ORF, open reading frame; F, forward; R, reverse. Based on the *L. interrogans* serovar Lai strain Lai 56601 genome sequence reference (GenBank accession no. AE010300.2).

hageni or between *L. interrogans* serovars Bratislava and Australis, remains difficult (20). Recently, a genotyping method based on the partial sequences of some housekeeping genes, known as multilocus sequence typing (MLST), has been developed for a phylogenetic analysis of *Leptospira* species isolates (21, 22). MLST produced nonambiguous, specific results with a good resolution. However, MLST demonstrated an inability to distinguish certain isolates at the serovar level, such as for Icterohaemorrhagiae and Copenhageni (23).

Recently, multispacer sequence typing (MST) has emerged as a new genotyping method, which is based on the comparison of the nucleotide sequences of several intergenic regions. The spacers seem to be more variable than coding genes, because they were less submitted to selection pressure (24). MST has been developed to genotype several pathogens, including *Rickettsia anorii* (24), *Bartonella quintana* (25), and *Mycobacterium tuberculosis* (26). MST produced reproducible and robust results with a high discriminatory power compared with that of MLST (24). Moreover, MST permitted the phylogeographical lineages to be defined (26), which is of great interest in epidemiologic studies. In this study, we investigated the MST for *L. interrogans* species genotyping, particularly for the Icterohaemorrhagiae, Canicola, Australis, and Grippotyphosa serogroups, which are the most prevalent serogroups in France (12, 27–30). The results of MST genotyping have been subsequently compared with the results of the VNTR analysis used as the reference molecular typing method.

MATERIALS AND METHODS

Selection of MST spacers. The complete genome sequences of *L. interrogans* serovar Lai strain Lai 56601 (GenBank accession no. AE010300.2) and *L. interrogans* serovar Copenhageni strain Focruz LI-130 (GenBank accession no. AE016823.1) were investigated by the EMBOSS software (<http://www.emboss.sourceforge.net>). The intergenic spacers were further extracted from the reference genomes using Script software. The homologous spacer comparisons were analyzed by the Difseq software in EMBOSS. Then, an NCBI BLAST of these homologous spacers was performed to detect the differences between these spacer sequences. The spacers were selected using the following criteria: (i) sequence length of ≈ 400 bp, (ii) software script-filtered range of sequence similarity of 70 to 99% between *L. interrogans* genomes, and (iii) a difference between *L. interrogans* serovar Lai and Copenhageni sequences of ≥ 5 bp. The spacer homology between the *L. interrogans* genomes was further ensured by the presence of the same homologous genes upstream and downstream of the spacers. A dot plot was constructed for each spacer to visualize the type of genetic events that were responsible for the spacer sequence heterogeneity, i.e., insertion, deletion, or mutation. The PCR primers for the spacers

were designed using the Primer3 software program (Infobiogen, Evry, France) and are indicated in Table 1.

***Leptospira* sp. strains.** The development of MST for *L. interrogans* species was conducted by the amplification and sequencing of spacers using DNA samples from 33 *Leptospira* sp. reference strains provided by the National Reference Center and WHO Collaboration Center for Leptospirosis (Institut Pasteur, Paris, France) and the Laboratoire des Leptospores. These strains, which are listed in Table 2, belonged to four serogroups (*L. interrogans* serogroups Icterohaemorrhagiae, Australis, Canicola, and Grippotyphosa) that were chosen for their high prevalence in France (27).

The DNA was also extracted from 35 clinical isolates, including 25 isolates from human patients with leptospirosis (isolated by the University Hospitals of Pointe à Pitre in Guadeloupe and Fort de France in Martinique and the National Reference Center of Leptospirosis as part of the national surveillance of leptospirosis) and 10 isolates that were isolated from rats (*Rattus norvegicus*) trapped in five areas inside or in the suburb of the town of Lyon (France) in 2012. These captures were facilitated by collaboration with several pest control operations. Captures and euthanasia of rats were performed in accordance with the European Union legislation (directive 86/609/EEC) and conducted by two of us, authorized to perform the rodent experiments (authorization no. 69-080931 by the "Préfecture du Rhône"). Rats are considered invasive mammals in France, and rat samples are material for which no ethical committee approval has been required. Beforehand, all specimens yielded a PCR-positive result with a cycle threshold (C_T) inferior to 31 cycles using a specific pathogenic *Leptospira* species TaqMan real-time PCR kit (TaqVet PathoLept, LSI, Lissieu, France).

VNTR analysis. The *Leptospira* sp. reference strains and clinical specimens were genotyped using the VNTR method (18). The PCRs were performed in a final volume of 50 μ l containing the following: 35 μ l of H_2O , 5 μ l of 10 \times buffer (Qiagen, Courtabouef, France), 2 μ l of 25 mM $MgCl_2$, 1 μ l of deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 1 μ l of forward primer (10 μ M), 1 μ l of reverse primer (10 μ M), 1.5 U of HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen), and 12 ng of target DNA. The samples were amplified as previously described (18). After a 4-hour 1.8% agarose MS-8 gel electrophoresis (Conda Pronadisa, Madrid, Spain), the amplified products were analyzed, and the sizes of the amplicons were defined by comparison with a 100-bp DNA ladder (Promega France, Lyon, France), with the size of the reference strain used as a control (18).

MST analysis. The MST PCRs were performed in a final volume of 50 μ l containing 35 μ l of H_2O , 5 μ l of 10 \times buffer (Qiagen), 2 μ l of 25 mM $MgCl_2$, 1 μ l of 10 mM dNTPs (Qiagen), 1 μ l of forward primer (10 μ M), 1 μ l of reverse primer (10 μ M), 1.5 U of HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen), and 12 ng of target DNA. The PCRs were performed according to the following program: 15 min of enzyme activation at 95°C, followed by 40 cycles consisting of 95°C for 30 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 1 min and a 10-min final elongation step at 72°C. After controlling the size of the

TABLE 2 MST analysis of 33 *L. interrogans* reference strains

<i>L. interrogans</i> serogroup	<i>L. interrogans</i> serovar	Strain	Origin	No. of genotypes by MST typing/profile		
				MST1	MST3	MST9
Icterohaemorrhagiae	Birkini	Birkini	Malaysia	3	1	1
Icterohaemorrhagiae	Mwogolo	Korea	Korea	3	1	1
Icterohaemorrhagiae	Lai	Lai 56601	China	2	5	2
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	M20	Denmark	4	6	3
Icterohaemorrhagiae	Mankars o	Mankars o	Indonesia	3	3	4
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	CHU Réunion	La Réunion (France)	4	10	3
Icterohaemorrhagiae	Naam	Naam	Indonesia	3	2	1
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	R1		4	7	3
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA	Belgium	4	8	3
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Shibaura 9	Japan	4	9	3
Icterohaemorrhagiae	Smithi	Smith	Malaysia	4	4	5
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Verdan	France	4	8	3
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Wijnberg	The Netherlands	4	6	3
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Fiocruz L1-130	Brazil	4	8	3
Australis	Muenchen	Munchen C90	Germany	5	11	6
Australis	Jalna	Jalna	Czechoslovakia	5	11	6
Australis	Fugis	Fudge	Malaysia	3	4	5
Australis	Bratislava	Jez-Bratislava	Czechoslovakia	6	3	3
Australis	Bangkok	Bangkok-D92	Thailand	1	2	3
Australis	Australis	Ballico	Australia	6	3	3
Canicola	Benjamini	Benjamin	Indonesia	9	2	11
Canicola	Bindjei	Bindjei	Indonesia	14	4	1
Canicola	Broomi	Patane	Australia	7	3	7
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV	The Netherlands	8	12	3
Canicola	Jonsis	Jones	Malaysia	9	14	2
Canicola	Kuwait	1362/2	Kuwait	11	13	8
Canicola	Portlandvere	MY 1039	Jamaica	8	12	7
Canicola	Schuffneri	Vleermuis 90C	Indonesia	9	14	2
Canicola	Sumneri	Sumner	Malaysia	12	15	1
Grippityphosa	Grippityphosa	Andaman	Andaman Islands	8	2	3
Grippityphosa	Liangguang	1880	China	10	16	9
Grippityphosa	Muelleri	RM 2	Malaysia	5	4	3
Grippityphosa	Valbuzzi	Valbuzzi	Australia	13	17	10

amplified fragments on 1.5% agarose gel electrophoresis (Electran agarose DNA pure grade; VWR, Fontenay sous Bois, France), the PCR products were sequenced with the BigDye Terminator sequencing kit using the 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). The sequences were edited using the ChromasPro program and aligned using NPS Multalin multiple alignment (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>). Direct visual examination of the edited alignments was also conducted to reduce the risk of alignment errors.

Reproducibility and discriminatory power. The stability of MST typing was evaluated on two serial cultures of *L. interrogans* reference isolates and on clinical isolates. The discrimination power of MST was evaluated and compared with that of the VNTR method using the Hunter-Gaston index, which was estimated as

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

where N is the total number of isolates in the sample population, S is the total number of types described, and n_j is the number of isolates belonging to the j th type (31).

Nucleotide sequence accession numbers. All of the spacer sequences obtained were deposited in GenBank under accession numbers KF420439 to KF420480.

RESULTS

Selection of MST spacers. A total of 200 spacers were edited by the comparison of the two *L. interrogans* genome sequences according to the previous criteria, from which 16 spacers were selected.

Five spacers, MST1, MST3, MST4, MST7, and MST9, were then chosen based on the high number of genotypes identified *in silico*. The localization of these spacers was determined, and the primers were designed (Table 1).

First, the five spacers were tested on the DNA samples from 14 unrelated strains of *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae. The nucleotide sequences obtained were analyzed and used to define several genotypes. The MST1, MST3, and MST9 spacers were more discriminating, resulting in three, 10, and five genotypes, respectively. A database was constructed based on the sequences derived from the selected spacer.

MST database. In the present study, the MST analysis focused on four serogroups that were previously analyzed by the VNTR method: *L. interrogans* serogroups Icterohaemorrhagiae, Australis, Canicola, and Grippityphosa (18). A total of 33 reference strains were analyzed by MST, including 14 strains belonging to *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae, six strains of serogroup Australis, nine strains of serogroup Canicola, and four strains of serogroup Grippityphosa (Table 2).

Among the 33 reference strains, the genetic events observed in these spacers were mutations, insertions, and deletions, which were used to identify several genotypes for each spacer. For the MST1 spacer, 14 genotypes were defined, with sizes varying between 207 and 263 bp. The MST1 spacer presented 25 variable

regions, with 18 regions (94.7%) being single nucleotide mutations and one region (5.3%) being an insertion. Moreover, six regions were considered to be multivariable regions, containing one multiple nucleotide insertion region, one single nucleotide mutation, three deletion regions, and two regions containing a single nucleotide sequence insertion. For the MST3 spacer, 17 genotypes were defined based on 14 variable regions. The MST3 sequence size varied between 361 and 375 bp. A total of 12 regions (85.7%) were single nucleotide mutations, one region (7.1%) was a deletion, and one region (7.1%) was a nucleotide sequence insertion. This last region was located between the positions of 215 and 227 and comprised a poly(T) nucleotide sequence. The number of T nucleotides varied from 9 to 13 and allowed *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae to be differentiated into five genotypes. For the MST9 spacer, 11 genotypes were defined. The MST9 sequence size varied between 236 and 237 bp. A total of 11 variable regions were identified, with 10 (90.9%) being single nucleotide mutations and one (9.1%) being an insertion.

The genotypes of these three spacers were combined to define the MST profile for each serovar. The MST genotype sequences were also checked to confirm that they were not coding regions and proved that the sequences targeted were effectively in spacer regions.

Comparison of MST typing with the VNTR reference method. The *Leptospira* sp. reference strains were analyzed by both the VNTR and MST methods.

As previously analyzed by Salaun et al. (18), the 33 *Leptospira* sp. strains analyzed in this study provided a unique VNTR profile, except for *L. interrogans* serovars Canicola and Portlandvere, which exhibited the same VNTR profile. Similarly, the strains belonging to the Copenhageni and Icterohaemorrhagiae serovars were not differentiated by the VNTR analysis.

A total of 24 VNTR locus combinations were defined among the 33 reference strains (Table 2), whereas 26 MST locus combinations were defined. MST enabled identification not only at the serogroup and serovar levels but also at the strain level in some cases.

In *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae, including the eight serovars studied, MST permitted the identification of each serovar, except for *L. interrogans* serovars Birkinii and Mwoogo. Moreover, for each serovar, a unique profile was defined for each strain, except for the strains M20 and Wijnberg, belonging to *L. interrogans* serovar Copenhageni, and the strains RGA and Verdun, belonging to *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. In comparison, the VNTR analysis exhibited the same profile for the strains belonging to either *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae or Copenhageni. The index of discrimination of MST and VNTR methods was calculated among serovars of *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae and found to be 0.94 and 0.68, respectively.

In *L. interrogans* serogroup Canicola, including the nine serovars analyzed, MST identified each serovar by a unique profile, except for the Jonsis and Schueffneri serovars, which exhibited the same MST combination, whereas their VNTR profiles were different.

In *L. interrogans* serogroup Australis, including six serovars, the Muenchen and Jalna serovars exhibited the same MST profile, as did the Bratislava and Australis serovars. In contrast, each serovar had a unique VNTR profile.

Finally, in *L. interrogans* serogroup Grippityphosa, the four

TABLE 3 Discrimination power of MST compared with that of the VNTR method

Typing method	No. of clusters	Size (%) of largest type	No. of unique isolates	Hunter-Gaston index
MST	26	9.1	20	0.985
VNTR	24	24.2	21	0.943

serovars each had a unique profile by both the MST and VNTR methods.

The reproducibility and repeatability of the MST method were evaluated on two serial cultures of four strains of *L. interrogans* serogroups Icterohaemorrhagiae, Australis, and Canicola and on clinical isolates; the spacer sequences obtained were identical.

The discriminatory power of MST was evaluated and compared with that of the VNTR method based on the results of the present study. MST defined 26 clusters, with the size of the largest type being the three strains of *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae. According to the Hunter-Gaston index, MST exhibited an index of discriminatory power of 0.985. With respect to the VNTR profile data, 24 clusters were identified, and the size of the largest type was eight strains of *L. interrogans* serovars Copenhageni and Icterohaemorrhagiae. Consequently, the discriminatory power of VNTR was 0.943 (Table 3).

Application to field and clinical isolates. A total of 35 field and clinical isolates belonging to *L. interrogans* serogroups Icterohaemorrhagiae and Australis based on VNTR analysis were tested by the MST method (Table 4).

Twenty-five clinical isolates were isolated from a human source. A total of 18 specimens belonged to *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae. These isolates were divided into three MST profiles but into one VNTR profile. The unique VNTR profile corresponded to the Icterohaemorrhagiae-Copenhageni genotype, whereas the MST profiles permitted the identification of eight samples as the Copenhageni genotype strains M20 and Wijnberg, eight other samples as the Icterohaemorrhagiae genotype strain CHU Réunion, and two samples as the Icterohaemorrhagiae genotype strains RGA and Verdun. Seven clinical samples, belonging to *L. interrogans* serogroup Australis, were defined both with the VNTR and MST methods as the Australis-Bratislava genotype.

For 10 rodents' field isolates, the same VNTR profile was defined and identified as the Icterohaemorrhagiae-Copenhageni genotype, whereas three different MST profiles were obtained, with one corresponding to the Icterohaemorrhagiae genotype strain RI, one to the Icterohaemorrhagiae genotype strain CHU Réunion, and the last one to the Copenhageni genotype strains M20 and Wijnberg. The MST method was also applied on DNA extracts from the kidneys of 10 rodents, showing an MST profile identical to that of the strains isolated from the same rodents.

DISCUSSION

In this study, we investigated the MST method for the typing of *L. interrogans* strains. The selection of MST as a genotyping method is justified by its good discrimination when it has been applied to other bacteria, such as *Rickettsia conorii* (24), *Bartonella quintana*, and *Bartonella henselae* (25, 32), and by its capacity to define phylogeographical lineage, as demonstrated for Orientalis-like *Yer-*

TABLE 4 MST application to clinical isolates

<i>L. interrogans</i> serogroup	<i>L. interrogans</i> serovar	Strain	Source	Origin	No. of genotypes by spacer			Serovar deduced (strain[s])
					MST1	MST3	MST9	
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200700457	Human	Guadeloupe	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200704250	Human	France (Nancy)	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200704251	Human	France (Nancy)	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200800857	Human	French Polynesia	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200801909	Human	Guadeloupe	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200803290	Human	France (Vesoul)	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200803792	Human	French Polynesia	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200804216	Human	Guadeloupe	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200900101	Human	French Polynesia	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200901382	Human	Guadeloupe	4	8	3	Icterohaemorrhagiae (RGA/Verdun)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200901383	Human	Guadeloupe	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200903008	Human	French Polynesia	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	201000456	Human	Guadeloupe	4	8	3	Icterohaemorrhagiae (RGA/Verdun)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	201000458	Human	Guadeloupe	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	201000929	Human	French Polynesia	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	201000930	Human	French Polynesia	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	201100517	Human	Guadeloupe	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200201190	Human	Guadeloupe	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Australis	Australis	200701474	Human	French Polynesia	6	3	3	Australis/Bratislava
Australis	Australis	200701475	Human	French Polynesia	6	3	3	Australis/Bratislava
Australis	Australis	200703202	Human	French Polynesia	6	3	3	Australis/Bratislava
Australis	Australis	200703203	Human	French Polynesia	6	3	3	Australis/Bratislava
Australis	Australis	201001460	Human	French Polynesia	6	3	3	Australis/Bratislava
Australis	Australis	201000439	Human	French Polynesia	6	3	3	Australis/Bratislava
Australis	Australis	201100860	Human	French Polynesia	6	3	3	Australis/Bratislava
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	200210109	Rattus	Guadeloupe	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0505	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0834	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	7	3	Icterohaemorrhagiae (R1)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0854	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	10	3	Icterohaemorrhagiae (CHU Réunion)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0867	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0869	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0872	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0873	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0874	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae/Copenhageni	LYO0884	<i>Rattus norvegicus</i>	France (Lyon)	4	6	3	Copenhageni (Wijnberg/M20)

sinia pestis (33) and *Mycobacterium tuberculosis* (26). An MST database was created from spacer sequences obtained for *Leptospira* sp. strains belonging to the Icterohaemorrhagiae, Australis, Grippotyphosa, and Canicola serogroups (Table 2), which are highly prevalent in France, with the seroprevalence of the Icterohaemorrhagiae serogroup in rodents being as high as 45.6% (12, 27–30).

The choice of spacer was based on the same MLST scheme (21). In the present study, 200 loci were identified in the genomes, of which 16 spacers were selected according to the criteria defined below. We then combined three spacers for discriminating strains within the same serovar, enabling the identification of 26 genotypes among the 33 strains of *L. interrogans*.

The spacers were selected according to the following criteria. The sequence size of ≤ 400 bp permitted the evolution of the MST PCR method toward real-time PCR. The 70 to 99% sequence similarity between the two *L. interrogans* reference complete genomes allowed the selection of homologous spacers belonging to the same *Leptospira* species. The spacer variability of ≥ 5 bp permitted the selection of highly discriminatory regions. Moreover, the MST spacer selection was based on the discriminatory power of *L. in-*

terrogans serogroup Icterohaemorrhagiae, which is the serogroup that presents ambiguous identification between the Icterohaemorrhagiae and Copenhageni serovars when analyzed by other typing method, such as PFGE and VNTR (17, 18).

Each sequence's spacer presented mutation and/or insertion or deletion genetic events. Moreover, the MST1 and MST3 spacers have deletion events and one variable region. For the MST1 spacer, the variable region permits the identification of five different genotypes in *L. interrogans* serogroups Australis, Canicola, and Grippotyphosa. For the MST3 spacer, the variable region allows the discrimination of strains belonging to *L. interrogans* serovars Icterohaemorrhagiae and Copenhageni. For the MST9 spacer, the mutation and insertion genetic events identified permit discrimination among the four serogroups when used in combination with MST1 and MST3.

In the present study, among the 33 strains studied, a total of 26 MST profiles were defined, whereas 24 genotypes were defined by the VNTR method.

A total of 14 strains of *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae were analyzed, with four strains belonging to the Icterohaemorrhagiae serovar and four to the Copenhageni serovar. The

MST method permits the strains of the Copenhageni and Icterohaemorrhagiae serovars to be differentiated into five distinct profiles, in contrast to the unique profile by VNTR analysis (18). These two serovars are particularly difficult to discriminate when using other typing methods, such as PFGE (34), VNTR (35), and MLST (36). This MST capacity is particularly interesting for the epidemiologic surveillance of the *L. interrogans* species carried in rodents, such as *Rattus norvegicus*, since they are considered the main environmental spreader of zoonotic *Leptospira* species. Indeed, rodents play an important role for the circulation of the Icterohaemorrhagiae serogroup, with high *Leptospira* sp. loads in their renal tubules (4, 27, 37, 38). Identification of the *Leptospira* sp. genotypes in the rodent population is important for assessing the risk for human or domestic animal exposure (37, 39), as well as for a better evaluation of their role in the transmission of leptospirosis in humans. With regard to *L. interrogans* serogroup Grippityphosa, the discrimination of MST was similar to that of the VNTR method. Identification can be achieved by either one or the other method.

For *L. interrogans* serogroup Canicola, the same numbers of profiles were obtained by both the MST and VNTR methods. The MST profile was the same for *L. interrogans* serovars Jonsis and Schueffneri of the Canicola serogroup, but the VNTR profiles were different. In addition, the VNTR profiles of the Canicola and Portlandvere serovars were identical, but their MST profiles were not. A joint application of the MST and VNTR methods enables a total identification of the serovars of the Canicola serogroup. In veterinary applications, Canicola serogroup surveillance is important for the protection of dogs. These animals are vaccinated against the strains of the Canicola and Icterohaemorrhagiae serogroups (40). The regular serovar identification of these serogroups is important to define more precisely the prevalence of infecting serovars and its use for the development of the vaccines (41).

For *L. interrogans* serogroup Australis, the VNTR discrimination was superior to that of MST. However, *L. interrogans* serovars Bratislava and Australis are differentiated by only one copy for one of the VNTR loci. This could lead to ambiguous results in size determination by gel electrophoresis (19). The prevalence of the Australis serogroup increased in several countries (42, 43), and this epidemiologic surveillance allowed the evolution of a future vaccine for dogs to be defined with the addition of an Australis serovar.

With respect to the studied reference strain, the MST discriminatory power (0.98) was superior to that of VNTR (0.94). This difference is explained by the fact that MST permitted the identification of strains belonging to the same serovar as the strain belonging to *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, which leads to a better discrimination than VNTR (0.94 compared to 0.68).

Because nucleotide sequences were found identical between, for example, the Verdun strain, which was isolated in 1918 during the first World War, and recent clinical isolates of *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, we can hypothesize that the MST sequence profiles remained identical and stable in a long period of time.

MST is a simple method based on PCR and sequencing. Therefore, because it is based on the nucleotide sequence, MST provides a robust and non-ambiguous result. It requires an additional sequencing step; however, the sequencing has become a routine method of DNA analysis as the cost of sequencing has decreased. The MST allowed obtaining exportable data, which represents a great resource for other laboratories in the world

through the use of nucleotide sequences deposited in GenBank. In comparison, VNTR is a rapid method based on PCR and electrophoretic migration. Thus, the VNTR analysis depends on the electrophoresis gel components and resolution limits and the locus tandem-repeat number (19, 44). These factors may affect the VNTR interpretation, which can occasionally be ambiguous at nearby high tandem-repeat numbers. This ambiguity of the serovar identification is problematic for epidemiologic applications if the research level is at the serovar or even the strain level.

For field and clinical isolates, MST and VNTR permitted the serovar identification for all isolates. The MST-PCR sensitivity was similar to that of VNTR. Moreover, the results were consistent using both the MST and VNTR methods. MST was used on isolates belonging to *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae to test the strain identification ability. From one up to five samples were tested in geographically distinct trapping sites. Thus, MST permits the precise identification of the *Leptospira* sp. strains present in the rodent populations in each area. A study on a larger rodent population will be undertaken to validate the notion of genotyping (36). The MST method may become a new genotyping method for the epidemiological surveillance of *L. interrogans* and the geographical study of the strain's repartition of the Icterohaemorrhagiae serogroup.

In conclusion, the development of MST for the *L. interrogans* species offered a new genotyping method with a high discriminatory power. MST represents an evolved genotyping method for the identification of *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae because the Icterohaemorrhagiae and Copenhageni serovars were clearly identified and because this method also permitted identification at the strain level. This capacity is interesting for epidemiological applications. The MST method enabled serovar identification similar to that by the VNTR method for the other serogroup, suggesting an enlargement of the MST method for supplementary serogroups and other species, such as the other pathogenic species *L. kirschneri* and *L. borgpetersenii*.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the technical expertise of Diane Gandin, the team of the National Reference Center and WHO Collaborating Center for Leptospirosis (Institut Pasteur) for their help in strain identification, and the European Commission under the Food, Agriculture and Fisheries and Biotechnology theme of the 7th Framework Program for Research and Technological Development, grant agreement no. 222633, WildTech project WP6 Epidemiology and Risk assessment, which had supported the work of M.A. and F.A. This study was supported by the Laboratoire des Leptospires, VetAgroSup, Campus de Lyon, France.

A.-L.Z. performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. Z.D. conceived the study, performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. A.K. and P.D. provided the isolates and obtained the funding. A.K. analyzed the data. M.P. provided the isolates used in this study, supplied several DNA samples, and analyzed the results. M.A. coordinated this study and wrote the manuscript. F.A. provided the rodent clinical specimens. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Cerqueira GM, Huard M. 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect. Genet. Evol.* 9:760–768. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.009>.
2. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing

- world. Clin. Microbiol. Infect. 17:494–501. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x>.
3. Levett PN. 2004. Leptospirosis: a forgotten zoonosis? Clin. Appl. Immunol. Rev. 4:435–448. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cair.2004.08.001>.
 4. Bharti AR, Nally JE, Ricakli 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. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00830-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2).
 5. Reis RB, Ribero GS, Fdzemburgh RD, Santana FS, Mohr S, Melendez AX, Queiroz A, Santos AC, Ravines RR, Tassinari WS, Carvalho MS, Reis MG, Ko AI. 2008. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. PLoS Negl. Trop. Dis. 2:e228. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000228>.
 6. Levett PN. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14:296–326. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>.
 7. Adler B, de la Pena Motezuma A. 2010. *Leptospira* and leptospirosis. Vet. Microbiol. 140:287–296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vepmic.2009.03.012>.
 8. Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2011. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. J. Vet. Intern. Med. 25:1–13. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x>.
 9. Perdat P, Chappel RJ, Adler B, Baranton G, Bulach DM, Billingham ML, Letocart M, Merien F, Serrano MS. 1998. *Leptospira fainei* sp. nov., is isolated from pigs in Australia. Int. J. Syst. Bacteriol. 48(Part 3):851–858.
 10. Saito M, Villanueva SY, Kawamura Y, Iida KI, Tomida J, Kanemaru T, Kohno E, Miyahara S, Umeda A, Amako K, Gloriani NG, Yoshida SI. 2012. *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from an environmental water in Fukuoka, Japan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63(Part 7):2457–2462. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.047233-0>.
 11. Arent ZJ, Andrews S, Adamama-Moraitou K, Gilmore C, Pardali D, Ellis WA. 2012. Emergence of novel *Leptospira* serovars: a need for adjusting vaccination policies for dogs? Epidemiol. Infect. 141:1–6. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268812002087>.
 12. Renaud C, Andrews S, Djoudi Z, Lecheval S, Corrao-Revol N, Buff S, Demont P, Kodjo A. 2012. Prevalence of the *Leptospira* serovars bratislava, grippityphosa, mozdok, and pomona in French dogs. Vet. J. 196(1): 126–127. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.10.002>.
 13. WHO. 2003. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
 14. Herrmann JL, Bellenger E, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. 1992. Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. J. Clin. Microbiol. 30:1696–1702.
 15. Galloway RL, Levett PN. 2008. Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. Am. J. Trop. Med. Hyg. 78:628–632.
 16. Galloway RL, Levett PN. 2010. Application and validation of PFGE for serovar identification of *Leptospira* clinical isolates. PLoS Negl. Trop. Dis. 4:e824. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000824>.
 17. Turk N, Milas Z, Mojevic V, Ruzic-Sabljic E, Staresina V, Stritof Z, Habus J, Postic D. 2009. Molecular analysis of *Leptospira* spp. isolated from humans by restriction fragment length polymorphism, real-time PCR and pulsed-field gel electrophoresis. FEMS Microbiol. Lett. 300:174–179. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01776.x>.
 18. Salaun L, Merien F, Gurianova S, Baranton G, 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00336-06>.
 19. Slack AT, Dohnt MF, Symonds ML, Smythe LD. 2005. Development of a multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 4:10. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-4-10>.
 20. Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, Baranton G, Picardeau M. 2005. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto*. J. Clin. Microbiol. 43:539–545. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.2.539-545.2005>.
 21. Ahmed N, Devi SM, Valverde Mde L, Vijayachari P, Machang'ru RS, Ellis WA, Hartskeerl RA. 2006. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 5:28. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-0711-5-28>.
 22. Nalam K, Ahmed A, Devi SM, Francalacci P, Baig M, Sedhi LA, Hartskeerl RA, Ahmed N. 2010. Genetic affinities within a large global collection of pathogenic *Leptospira*: implications for strain identification and molecular epidemiology. PLoS One 5:e12637. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012637>.
 23. Romero EC, Blanco RM, Galloway RL. 2011. Analysis of multilocus sequence typing for identification of *Leptospira* isolates in Brazil. J. Clin. Microbiol. 49:3940–3942. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01119-11>.
 24. Fournier PE, Zhu Y, Ogata H, Raoult D. 2004. Use of highly variable intergenic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains. J. Clin. Microbiol. 42:5757–5766. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.12.5757-5766.2004>.
 25. Foucault C, La Scola B, Lindmos H, Andersson SG, Raoult D. 2005. Multispacer typing technique for sequence-based typing of *Bartonella quintana*. J. Clin. Microbiol. 43:41–48. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.1.41-48.2005>.
 26. Djoudi Z, Arnold C, Gharbia S, Raoult D, Drancourt M. 2008. Multispacer sequence typing for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. PLoS One 3:e2433. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024333>.
 27. Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J, Mansotte F, Brasme L, De Champs C, Bohut P, Mondot P, Falu 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2008.05.004>.
 28. Moinet N, Fournier-Chambrillon C, Andre-Fontaine G, Aulagnier S, Mesplede A, Blanchard B, Descarsin V, Dumas P, Dumas Y, Coic C, Couzi L, Fournier P. 2010. Leptospirosis in free-ranging endangered European mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores (*Mustelidae*, *Viverridae*) from southwestern France. J. Wildl. Dis. 46:1141–1151. <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-464.1141>.
 29. Roqueplo C, Cabre O, Davoust B, Kodjo A. 2013. Epidemiological study of animal leptospirosis in New Caledonia. Vet. Med. Int. 2013:826834. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/826834>.
 30. Picardeau M. 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Med. Mal. Infect. 43:1–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>.
 31. Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J. Clin. Microbiol. 26:2465–2466.
 32. Li W, Chomel BB, Maruyama S, Gupta L, Sander A, Raoult D, Fournier PE. 2006. Multispacer typing to study the genotypic distribution of *Bartonella henselae* populations. J. Clin. Microbiol. 44:2499–2506. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00498-06>.
 33. Drancourt M, Roux V, Dang LV, Tran-Hung L, Castex D, Chenal-Francisque V, Ogata H, Fournier PE, Crubezy E, Raoult D. 2004. Genotyping, Orientalis-like *Yersinia pestis*, and plague pandemics. Emerg. Infect. Dis. 10:1585–1592. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1009.030933>.
 34. Collares-Pereira M, Korver H, Cao Thi BV, Santos-Reis M, Bellenger E, Baranton G, Terpstra WJ. 2000. Analysis of *Leptospira* isolates from mainland Portugal and the Azores islands. FEMS Microbiol. Lett. 185: 181–187. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09059.x>.
 35. Pavan ME, Cairo F, Pettinari MJ, Samartino L, Brihuega B. 2011. Genotyping of *Leptospira interrogans* strains from Argentina by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA). Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 34:135–141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2010.06.002>.
 36. Bourhy P, Herrmann Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, Lamaury I, Ziniri F, Bremont S, Landier A, Cassadou S, Rosine J, Picardeau M. 2013. Serovar diversity of pathogenic leptospires circulating in the French West Indies. PLoS Negl. Trop. Dis. 7:e2114. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002114>.
 37. Perez J, Brescia F, Becam J, Mauron C, Goarant C. 2011. Rodent abundance dynamics and leptospirosis carriage in an area of hyperendemicity in New Caledonia. PLoS Negl. Trop. Dis. 5:e1361. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001361>.
 38. Krogaard LH, Vilhimsen S, Markussen MD, Jensen JS, Leirs H, Heiberg AC. 2009. High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*). Epidemiol. Infect. 137:1586–1592. <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268809002647>.
 39. Thaipudungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpaboon R, Apiwatanaporn A, Slack AT, Suputtamongkol Y, White NJ, Feil EJ, Day NP, Peacock SJ. 2007. A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. PLoS Negl. Trop. Dis. 1:e56. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000056>.

40. Andre-Fontaine G. 2013. Diagnosis algorithm for leptospirosis in dogs: disease and vaccination effects on the serological results. *Vet. Rec.* 172(19):502. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.101333>.
41. Ellis WA. 2010. Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? *Vet. Rec.* 167:602–605. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.c4965>.
42. Mayer-Scholl A, Luge E, Draeger A, Nockler K, Kohn B. 2013. Distribution of leptospira serogroups in dogs from Berlin, Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13:200–202. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2012.1121>.
43. Koizumi N, Muto MM, Akachi S, Okano S, Yamamoto S, Horikawa K, Hamda S, Funatsumaru S, Ohnishi M. 2012. Molecular and serological investigation of *Leptospira* and leptospirosis in dogs in Japan. *J. Med. Microbiol.* 62:630–636. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.050039-0>.
44. Pavan ME, Brihuega B, Pettinari MJ, Cairo F. 2011. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of reference strains used for the diagnosis of leptospirosis in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 43:251–255. <http://dx.doi.org/10.1590/S0325-75412011000400003>.

I. 3) Discussion

Au cours de cette étude, nous avons développé le typage des leptospires de l'espèce *L. interrogans* par Multispacer Sequence Typing (MST).

Après analyse bio-informatique, seize régions intergéniques ont été présélectionnées sur les deux génomes complets disponibles à cette époque (*L. interrogans* sérovar Lai souche Lai 56601 et *L. interrogans* sérovar Copenhageni souche Fiocruz L1-130) et répondaient aux critères suivant : la taille inférieure ou égale à 400bp, 70 % à 99 % de similitude avec les séquences de l'espèce *L. interrogans* et au moins cinq variations polymorphiques entre les séquences des génomes de références. Suite à une analyse préliminaire sur plusieurs sérovars du séro groupe Icterohaemorrhagiae, les trois régions les plus discriminantes ont été retenues. L'analyse des trois régions avait permis d'identifier plusieurs éléments de mutation, d'insertion et/ou de délétion, permettant une bonne discrimination des 33 souches utilisées. L'une des caractéristiques les plus discriminantes pour les sérovars du séro groupe Icterohaemorrhagiae est une région variable de la région intergénique MST3, qui est constituée d'une séquence de polyT dont le nombre détermine l'identité de la souche. Cette région nous permet de différencier les sérovars Icterohaemorrhagiae et Copenhageni jusqu'à l'échelle de l'isolat, et de ce fait, elle correspond à la région la plus importante pour l'identification des souches de ce séro groupe par la MST.

À partir des 33 souches étudiées, la VNTR et la MST ont permis d'identifier respectivement, 24 et 26 profils. Pour le séro groupe *Icterohaemorrhagiae*, la MST a permis une meilleure discrimination des sérovars que la VNTR, dont *Copenhageni* et *Icterohaemorrhagiae*, avec parfois une discrimination jusqu'à l'échelle des isolats, ce que les autres méthodes de typage n'avaient jusque-là jamais réussi à atteindre. Pour le séro groupe *Grippotyphosa* et *Canicola*, la VNTR et la MST ont permis d'établir un nombre identique de profils. Mais pour le séro groupe *Canicola*, elles ne permettaient pas d'identifier avec précision les mêmes sérovars. Par conséquent, ces deux techniques sont complémentaires pour ce dernier séro groupe. Pour le séro groupe *Australis*, la VNTR a permis d'obtenir plus de profil que la MST. Cependant, les profils de VNTR ne présentant qu'une seule copie de différence, pourraient rendre moins fiable la lecture des résultats. L'index de Hunter-Gaston, indiquant le pouvoir de discrimination des méthodes de typage, était de 0,98 pour la MST et de 0,94 pour la VNTR. Cette différence s'explique principalement par le pouvoir résolutif de la MST pour la discrimination des souches du séro groupe *Icterohaemorrhagiae*.

La MST a donc permis une identification complémentaire à celle des autres méthodes pour les séro groupes *Canicola* et *Australis*. Elle a surtout permis d'affiner l'identification des souches des sérovars *Copenhageni* et *Icterohaemorrhagiae*, ce qu'aucune technique de typage actuelle comme la MLST ou la VNTR, n'est capable de faire au cours des études épidémiologiques (Bourhy et al. 2013; Caimi et al. 2012). Le séro groupe *Icterohaemorrhagiae* étant principalement porté par le rat, la MST pourrait donc devenir un nouvel outil de choix pour l'identification des souches circulantes au sein des populations de rongeurs.

Lors de cette étude méthodologique, certains isolats issus de cas clinique ou d'hôte réservoir ont également été testés. La MST a permis d'obtenir des résultats répétables, robustes et clairement identifiables sur ces isolats de terrain, avec une sensibilité similaire à celle de la VNTR, faisant de la MST un excellent outil en complément de la VNTR pour le typage des échantillons de terrain et la conduite d'études épidémiologiques. Cependant, sa configuration actuelle ne permettant d'amplifier que les souches de l'espèce *L. interrogans*, une amélioration de la MST par le développement de nouvelles amorces lui permettrait d'effectuer le typage d'autres espèces pathogènes de leptospires, comme *L. kirschneri* et *L.*

borgpetersenii. À l'heure actuelle, la MST pourrait permettre une surveillance épidémiologique des souches circulantes de *L. interrogans*, basée sur la notion de géotypage, démontrée avec d'autres pathogènes.

I. 4) Conclusion

Nous avons mis au point un nouvel outil de typage moléculaire, basé sur le séquençage de régions intergéniques, qui permet une identification précise des souches de *L. interrogans*, particulièrement celles du sérogroupe Icterohaemorrhagiae. Il est maintenant important de l'éprouver sur le terrain: tout d'abord, lors d'une étude portant sur la caractérisation de l'infection naturelle chez quelques individus (rats sauvages) et enfin, lors d'une étude épidémiologique à plus grande échelle et dont l'objectif est de caractériser les souches circulantes au sein d'une population d'hôte réservoir.

II) L'infection naturelle causée par *Leptospira* chez le rat, une étude au site du Parc

II. 1) Objectif

Au cours de la partie expérimentale, nous avons caractérisé l'infection leptospirosique chez le rat, dans un environnement se rapprochant au mieux des conditions naturelles de contamination. La dynamique d'infection a été suivie par des méthodes d'analyse sérologique, bactériologique, moléculaire et histologique. Cependant, il existe souvent des variations entre les observations faites lors d'essais expérimentaux et celles faites sur le terrain. Il est donc préférable de vérifier que notre modèle expérimental présente les mêmes caractéristiques que celles d'une infection naturelle. Par exemple, la néphrite interstitielle est la seule lésion pouvant être parfois observée lors des infections expérimentales, alors que sur le terrain, plusieurs types de lésions rénales sont relevés, même si la néphrite semble la seule imputable à la leptospirose (Tucunduva de Faria et al. 2007). De plus, les études portant sur l'infection naturelle ciblent majoritairement les reins, sans investiguer d'autres organes de l'animal.

Afin de mieux comprendre l'infection naturelle en vue d'une modélisation, il faut étudier l'individu dans son ensemble pour comprendre l'interaction hôte-pathogène et les facteurs intrinsèques à l'individu pouvant l'influencer. Pour cela, une première investigation portant sur l'infection leptospirosique naturelle a été menée sur le site « Parc », site dont la prévalence a été étudiée précédemment (Ayrat et al. 2014) (article en annexe). Ce site présente l'avantage d'être dans un environnement semi-urbain, il s'agit d'une déchetterie d'un parc citadin avec des zones humides et boisées. Lors de l'étude précédente, la colonie de rat présentait un fort taux de portage rénal des leptospires (60 %), ce qui permettait de piéger une bonne proportion d'individus infectés sur une faible population totale de rats. Le suivi de l'infection s'est fait sur les mêmes organes analysés lors de la phase expérimentale

avec les mêmes outils d'analyse, afin de pouvoir caractériser l'infection de manière identique.

II. 2) Article

Ces travaux présentés dans le manuscrit ont été soumis le 28 août 2015 à l'American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

First observation of pulmonary *Leptospira interrogans* in *Rattus norvegicus*

Authors: Anne-Laure Zilber^{1*}, Patrick Belli², Marc Artois¹, Angeli Kodjo^{1, 3} and Zoheira Djelouadji^{1, 3}

¹ USC 1233 INRA/VAS, Université de Lyon-VetAgro Sup, Marcy-l'Etoile, France.

² UP Pathologie Morphologique et Clinique, Université de Lyon-VetAgro Sup, Marcy-l'Etoile, France.

³ Laboratoire des Leptospires, Université de Lyon-VetAgro Sup, Marcy-l'Etoile, France.

ABSTRACT

We report the first two cases of pulmonary presence of the leptospire in apparently healthy rats captured in a city park in Lyon (France). Only renal carriage of *Leptospira* has been described in the literature. Blood serology was performed in parallel with molecular and histological analyses assessed on the kidney and lung samples. We isolated leptospire from the kidneys of two out of three seropositive wild rats. These results were confirmed by specific detection of pathogenic *Leptospira* by real-time PCR. Moreover, *Leptospira* DNA was detected in lung tissues. Immunohistochemistry associated to Warthin-Starry staining revealed that leptospire were present on the surface of the ciliated epithelium of the bronchi. Using PCR of the *rrs* (16s) gene and multispacer sequence typing, DNA extracts of the kidney and lung were identified as belonging to *Leptospira interrogans*

Icterohaemorrhagiae serovar “CHU Réunion”. This first observation of pulmonary *Leptospira*'s presence with simultaneous renal carriage will require further study in future to gain a better understanding of the *Leptospira* infection in rat.

INTRODUCTION

Leptospirosis is a re-emerging zoonosis worldwide (1, 2) that is caused by a spirochete of genus *Leptospira*. The WHO reports that one million severe human cases of leptospirosis arise each year (2), especially in tropical regions. Metropolitan France has the highest incidence of infection among the developed countries (2).

Leptospirosis has several clinical presentations. Weil's disease represents the most frequent severe form in humans, with a fatality ratio ranging from 5% to 15%. The symptoms are characterized by jaundice, renal failure and hemorrhages (1). Over the last two decades, the incidence of pulmonary involvement varied from 20% to 70% in humans; thus, it has become a predominant symptom of the illness (1, 3, 4). In veterinary medicine, leptospiral pulmonary hemorrhage syndrome has also been recently reported in dogs in Europe (1, 5). Several studies have shown the emergence of *Leptospira* strains that cause renal and pulmonary signs in humans and a range of animal species (4, 6), and the pulmonary localization of these strains has been studied in animal models. In acute infections, leptospirens have been found to be abundant in the kidney, spleen and liver. In contrast, few leptospirens were detected in lung tissue, although antibodies were visualized in the alveolar septal wall in guinea pigs (7).

Most mammalian species are likely to carry leptospirens; however, the main maintenance hosts are wild rodents, such as the brown rat (*Rattus norvegicus*), which is considered to be a reservoir for these bacteria with renal carriage (1). In rats, leptospirosis is an asymptomatic infection, and leptospirens persist, colonizing the proximal renal tubules (1). The specific associations between some serovars and animal reservoirs have previously been described, and *Rattus* species have been identified as the main reservoir of the Icterohaemorrhagiae serogroup (1). Thus, the majority of human cases of leptospirosis are caused by the Icterohaemorrhagiae serogroup (2), which is the most frequently observed serogroup worldwide (1, 2). Consequently, many epidemiological studies have investigated renal carriage in rodents in endemic or non-endemic regions through the assessment of *Leptospira* in

both the urine and the kidney; however, few studies have monitored the presence of leptospire in other organs. Moreover, an experimental approach in a rat model previously revealed the transient passage of leptospire through the lungs and several organs during a chronic infection. *Leptospira* was detected in the lung at five days post-inoculation, and this was followed by a clearance phase (8). Thus, hallmarks of the chronic infection model are renal carriage and the absence of leptospire in the lungs.

In the frame of an investigation of the microbiota in free-living rats (*Rattus norvegicus*), we investigated the presence of *Leptospira* in several target organs, which were collected to serve as possible positive controls in future analyses. As a consequence, in the present study, we report two cases in which leptospire were simultaneously present in the kidneys and lungs of rats.

MATERIALS AND METHODS

Rats were captured during a routine intervention in our field study area, which has a high level of infected rats (9). In a short-term survey of the microbiota, potentially infected animals were caught. The specimens of free-living Norway rats were identified as *Rattus norvegicus* based on their morphological characteristics (10).

Traps were set in a city park in Lyon (France) in January 2013. Trapped rats were transported to the laboratory and were immediately anaesthetized using isoflurane and sacrificed by cervical dislocation, in accordance with the ethical standard of the European Union Legislation governing the care and use of laboratory animals (Directive EU 86/609). Rats were trapped for the purpose of pest control (permit for the capture no. 69-1810). They were euthanized and used according the ethical rules approved by the Rhône Préfecture (agreement no. 69-127811). Data regarding the rats' weight, size, sex and sexual maturity were recorded. Blood and tissue samples were aseptically collected and treated according to the aims of the serological, histological and molecular analysis.

Serological tests using the microscopic agglutination test (MAT) (11) were performed in the Laboratoire des Leptospire (VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France). Blood samples were centrifuged, and the serum obtained was stored at -20°C. A total of 23 *Leptospira* strains belonging to 14 serogroups were used for the MAT: Australis (using the Australis, Bratislava and Munchen serovars as antigens); Autumnalis (using the Autumnalis and Bim serovars); Ballum, Bataviae, Canicola, Grippotyphosa

(using the Grippotyphosa and Vanderhoedoni serovars as antigens); Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae (using the M20 Copenhageni and Verdun Icterohaemorrhagiae serovars); Panama (using the Panama and Mangus serovars as antigens); Pomona (using the Pomona and Mozdok serovars); Pyrogenes, Sejroe (using the Sejroe, Saxkoebing, Hardjo and Wolffi serovars); Tarassovi and Cynopteri. The screening was performed starting with a serum dilution of 1:30 up to a dilution of 1:480. The endpoint was the highest serum dilution showing 50% agglutination in free-moving leptospire. A titer of 1:100 or more was considered positive, and this titer was also used in several previous studies (12, 13).

For *Leptospira* isolation, half of one kidney from each rat was crushed and aseptically transferred to tubes containing Ellinghausen McCullough Johnson and Harris (EMJH) medium (Indicia, St G enis, France) (14). A series of three dilution tubes were incubated at 29 C according to the protocol for pathogenic *Leptospira* isolation (14). The tubes were examined weekly using a dark-field microscope for a period of three months.

For molecular analyses, the kidney and lung samples were aseptically grinded using a syringe. After digestion, DNA was extracted from 200  l of lysed tissue or 200  l of lysed *Leptospira* culture using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. All the DNA samples were stored at -20 C. The presence of *Leptospira* DNA was assessed using a specific pathogenic *Leptospira* TaqMan real-time PCR kit (TaqVet PathoLept, LSI, France). As an appropriate negative control, PCR mix without the target DNA was included. The specimens with a Cycle threshold (Ct) of less than 45 cycles were considered positive, in accordance with the manufacturer's instructions.

All positive samples were then characterized following two phases: species identification using the *rrs* (16S) gene (15) follow-up to a genotyping using Multispacer Sequence Typing (MST) (16). For the first step, DNA was amplified using the *rrs* (16S) gene primers (LeptA, LeptB). The PCRs were performed in a final volume of 50  l containing 35  l of H₂O, 5  l of 10  buffer (Qiagen), 2  l of 25 mM MgCl₂, 1  l of 10 mM dNTPs (Qiagen), 1  l of forward primer (10  M), 1  l of reverse primer (10  M), 0.3  l of HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) and 5  l of target DNA. The following thermocycling program was utilized: a 15-min enzyme activation step at 95 C, followed by 40 cycles of 95 C for 30 s, 57 C for 30 s, and 72 C for 1 min with a final elongation step of 72 C for 10 min. PCR mix without the target DNA

was included as a negative control, and PCR mix with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz DNA was included as a positive control. The PCR products were sequenced with the BigDye Terminator sequencing kit using a 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). The *Leptospira* species were identified using the sequence information of NCBI nucleotide BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). For the second step, the samples were characterized using the MST, as previously described (16). PCR mix without the target DNA was included as a negative control, and PCR mix with *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz DNA was included as a positive control. The PCR products were sequenced with the BigDye Terminator sequencing kit using a 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). The MST profile of the sequences was determined using NCBI nucleotide BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

For the histological analyses, two stains were performed; the Warthin-Starry staining used as a complement to immunohistochemistry targeting *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae serovar. Samples of each organ (kidney, liver, spleen and lung) were fixed in 10% formaldehyde for 24 h and subsequently transferred to 70% ethanol. The tissues were embedded in paraffin and cut into 3- μ m sections. For each rat, all the organ samples were embedded in the same paraffin block. Two stains were used for visualization of the leptospire. For each rat, one section was stained with Warthin-Starry silver staining (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (17), and another section was subjected to immunohistochemistry with antiserum specific to the *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae serovar. For immunohistochemistry, the paraffin was removed from the sections with xylene and ethanol. The tissues were incubated in a citrate buffer (pH = 6) for 1 h at 95°C and subsequently treated with 0.3% hydrogen peroxide for 10 min at room temperature. The nonspecific sites were blocked by incubation of the sections with Super Block (UltraTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack, ScyTek Laboratories, Logan, USA) for 30 min at room temperature, and the rodent-specific sites were blocked by incubation with a 1,000-fold dilution of peroxidase-conjugated goat anti-rat antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) for 10 min at room temperature. Tissue sections were incubated with a 2,000-fold dilution of *Leptospira* Icterohaemorrhagiae antiserum (Institut Pasteur, Paris, France) overnight at 4°C. The samples were then incubated with a 1:2 dilution of Ultra Tek Anti-Polyvalent (UltraTek HRP Anti-

Polyvalent Lab Pack, ScyTek Laboratories) for 30 min at room temperature; subsequently, they were incubated with UltraTek HRP (UltraTek HRP Anti-Polyvalent Lab Pack, ScyTek Laboratories) at room temperature for 30 min. Enzymatic reactions were developed using Vector NovaRED substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, USA). As an appropriate negative control, sections were included that were incubated without *Leptospira* antiserum.

RESULTS

During 5 days of trapping, three Norway rats were captured alive. All the rats were male adults, and they were sexually mature, as indicated in Table 1. The general conditions of the rats were acceptable, and they appeared healthy. In a previously investigated site with a high level of infected animals, only a few animals were needed to constitute a sample of infected rats. The three rats that we captured served as controls for further tests. The rats were named DTO14, DTO15 and DTO16.

Table 1. Results of various laboratory tests performed on three *Rattus norvegicus* individuals naturally infected in a city park in Lyon (France).

Rat	Weight (g)	Size (mm)	Sex	Age	MAT (serovar)	Organs	Real-time PCR (Ct)	<i>Leptospira</i> isolation	Immunohistochemistry (localization)
DTO14	206	235	Male	Adult	Copenhageni: 1:60; IH, Cynopteri, Mangus: 1:120	Kidney Lung	+ (19,88) + (34,15)	+	Warthin-starry staining + (tubules) + (ciliated epithelium)
DTO15	239	243	Male	Adult	Copenhageni: 1:60; IH, Cynopteri: 1:120	Kidney Lung	- -	-	- -
DTO16	176	225	Male	Adult	Copenhageni: 1:30; IH: 1:120	Kidney Lung	+ (23,95) -	+	+ (tubules) + (ciliated epithelium)

IH: Icterohaemorrhagiae serovar; +: presence of leptospires or *Leptospira* DNA; -: absence of leptospires or *Leptospira* DNA.

Serological tests showed that the three rats were positive using the MAT, and all had antibody titers of 1:120 for the Icterohaemorrhagiae serovar and 1:30-1:60 for the Copenhageni serovar (Table 1). These two serovars belong to the Icterohaemorrhagiae serogroup. Moreover, DTO14 had antibody titers of 1:120 for the Mangus serovar (Panama serogroup) and the Cynopteri serovar (Cynopteri serogroup). DTO15 had an antibody titer of 1:120 for the Cynopteri serovar.

Leptospira isolation showed that only two of the three rats (DTO14 and DTO16) produced positive renal cultures, as shown in Table 1.

Molecular analyses were performed on DNA extracts from the kidneys and lungs of the three rats. The results showed that DTO14 tested positive in the kidney and the lung (20 and 34 Ct, respectively). PCR indicated that the kidney and lung from DTO15 were negative for pathogenic *Leptospira*. Finally, for DTO16, PCR of the DNA extracts from the kidney (24 Ct) was positive, whereas that from DNA extracts of the lung was negative, even after repeated runs. All the results are shown in Table 1. The positive control yielded 25 Ct on average.

Using *rrs* (16S) gene amplification, the leptospire detected from the lung, kidney and corresponding isolates were identified as belonging to the species *Leptospira interrogans*. Further, MST genotyping showed that the sequences of all the samples were identical to the sequences of the Icterohaemorrhagiae serogroup, Icterohaemorrhagiae serovar “CHU Réunion” profile, with a strict similarity between leptospire from the lung and from the kidney.

Immunohistochemical staining of the tissue sections of DTO14 and DTO16 using specific anti-leptospire antibodies revealed that leptospire were localized on the surface of the bronchial ciliated epithelium, as shown in Figure 1B and 1D; these results were validated by negative controls in which staining was performed without anti-leptospire antibodies (Figure 1A and 1C). In the same rats, leptospire colonization was observable in several tubules, as shown in Figure 1E and 1F. Renal and pulmonary sections from the third rat, DTO15, were negative.

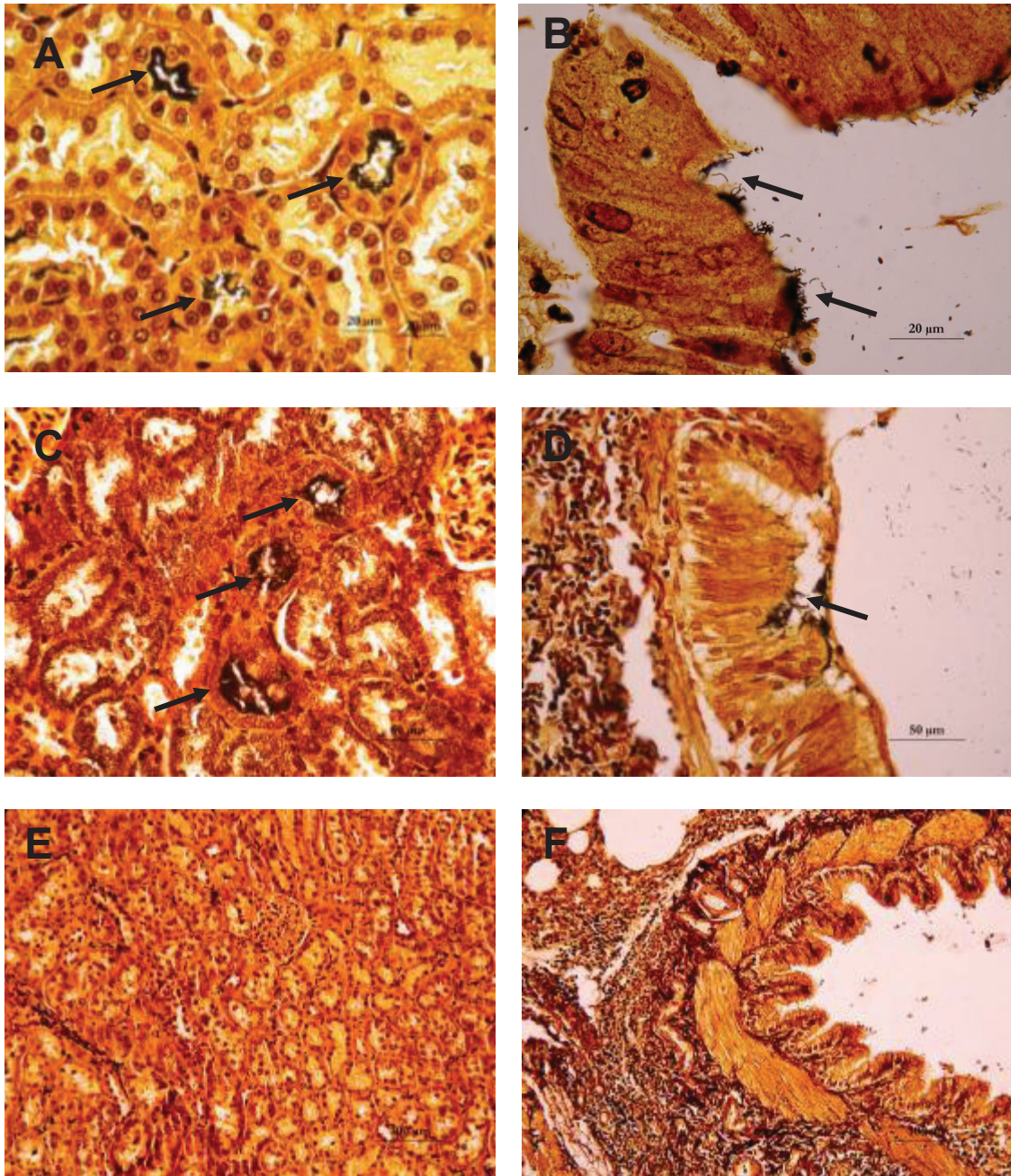


Figure 1. Immunohistochemical examination of the kidney and lungs of wild rats naturally infected with *Leptospira*.

A and C, pulmonary sections obtained from two rats, DTO14 and DTO16, that were not incubated with anti-leptospire antibodies (negative control, no stain fixation). B and D, pulmonary sections obtained from the same rats showing the presence of leptospires (arrows) on the bronchial epithelium using anti-leptospire antibodies. E and F, renal sections obtained from two rats, DTO14 and DTO16, showing dense *Leptospira* colonization in the renal tubules using anti-leptospire antibodies (arrows).

The silver-stained sections revealed also that DTO14 and DTO16 had very dense leptospire colonization in their renal tubules (Figure 2A and 2C). However, the number of colonized tubules relative to the total number of viewed tubules was low, and their distribution was heterogeneous. The renal structures were histologically normal, and no sign of an immune system reaction was observed around the infected tubules. In the same rats (DTO14 and DTO16), silver-stained leptospire were also detected on the bronchial epithelium, as shown in Figure 2B and 2D. Leptospire were observed in the bronchi, but not in the alveolar sacs. They localized at the level of the ciliated epithelium, with a heterogeneous and compact distribution. Renal and pulmonary sections obtained from the third rat, DTO15, were negative (Figure 2E and 2F). In addition, we observed pulmonary lymph node hypertrophy in the lung sections of all rats. Therefore, in DTO14 and DTO16, leptospire localization was identical as observed by both immunohistochemistry and silver staining. In these rats, leptospire were localized on the surface of the bronchial ciliated epithelium and the renal tubules.

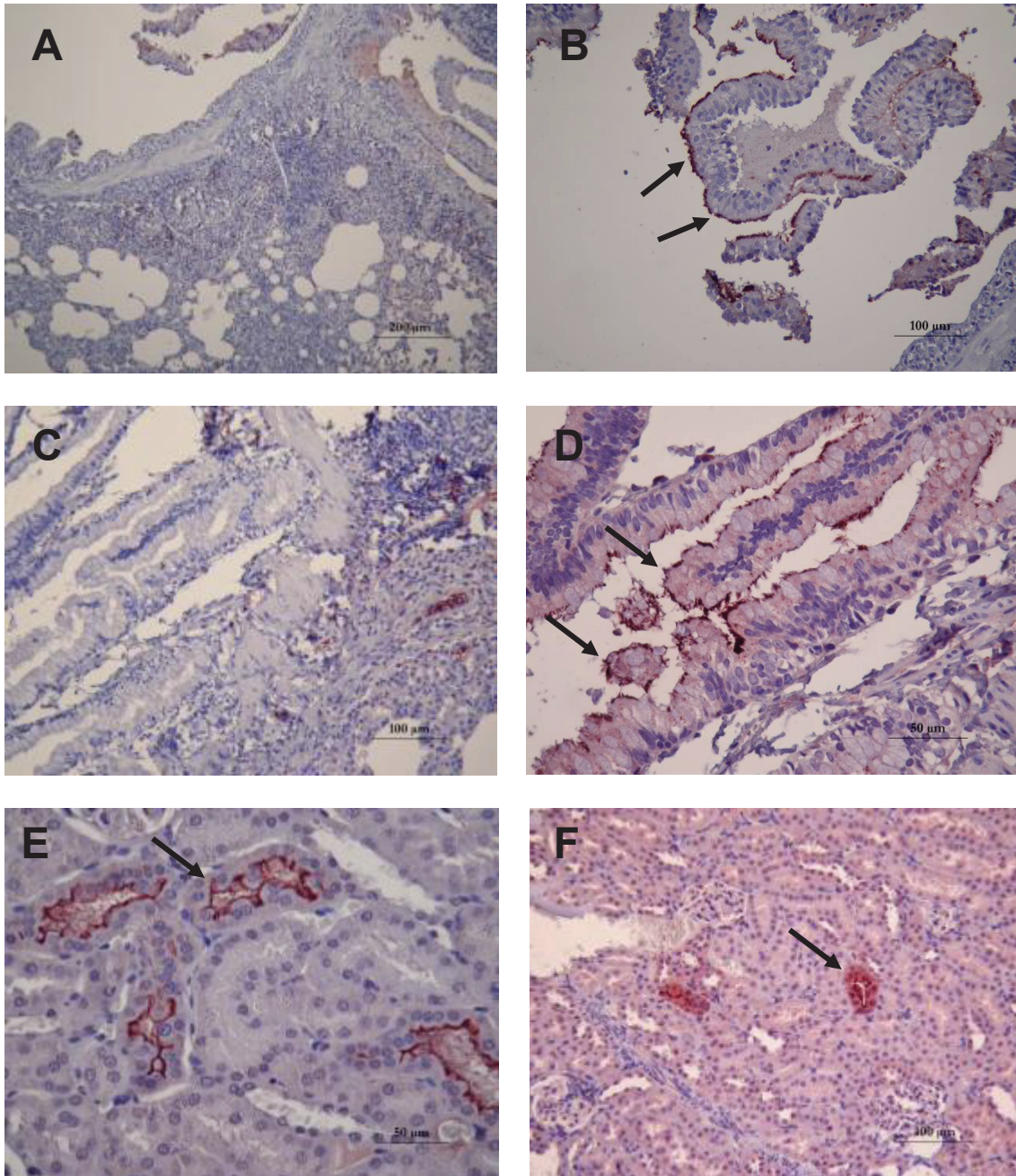


Figure 2. Histopathological examination of the kidney and lungs of wild rats naturally infected with *Leptospira* using Warthin-Starry silver stain.

A and C, renal sections obtained from two rats, DTO14 and DTO16, showing dense *Leptospira* colonization in the renal tubules (approximately 3 μm thick) (arrows). B and D, pulmonary sections from the same rats showing the presence of leptospires (arrows) on the bronchial epithelium. E and F, renal and pulmonary sections of the third rat, which was negative.

DISCUSSION

In the present study, we report the simultaneous presence of leptospires in the renal tubules and on the bronchial epithelium in two free-living rats (*Rattus norvegicus*) for the first time.

The context of our investigation was purposely not allowing evaluation of the prevalence of *Leptospira*. Indeed, we captured only a few animals with the aim of obtaining infected samples that could be used as positive controls in further studies. The trapping site was previously investigated and characterized as being an area in which many animals are infected (9).

All three trapped rats (DTO14, 15 and 16) were seropositive. The low antibody titer might suggest that these rats have recovered from infection. However, in DTO14 and DTO16, leptospires were detected in both the lung and the kidney with molecular and histological methods, and these findings were confirmed by renal isolation. Thus, a low antibody titer might result from adaptation between the host and the pathogen (18), which was characterized by the presence of the bacteria in the renal tubules, an immune escape site (19). Furthermore, despite very dense colonization of the leptospires, as shown by silver staining, lesions were not observed in the renal tissues. An inflammatory reaction did not appear to be correlated with the isolation of leptospires or the presence of leptospires (19, 20). Thus, the absence of interstitial nephritis was possible, even if this latter was the only morphological alteration attributable to leptospiral infection (21). The rats DTO14 and DTO16 could, therefore, be considered as chronically infected, because of the *Leptospira* renal dense colonization.

To our knowledge, this is the first time that leptospires have been found in the lung tissues of free-living rats. Their presence was detected via a molecular method, and they were confirmed by histological analysis. Leptospires were observed by immunohistochemistry (heterogeneous and compact distribution of leptospires on the ciliated epithelium) associated with Warthin-Starry staining used as a complement. However, pulmonary lymph node hypertrophy was observed in infected and non-infected rats, which could be caused by an immune response against an incidental contaminant. Furthermore, genotyping showed that the leptospires present in both the bronchi and the renal tubules belonged to the Icterohaemorrhagiae serogroup, Icterohaemorrhagiae serovar "CHU Réunion" strain of *Leptospira interrogans*. Thus,

the renal and pulmonary leptospire could have originated from the same infectious source.

Several techniques were utilized in our study. The isolation of the leptospire from pulmonary tissues was not feasible because only two small pieces of lung were available for molecular and histological analyses. The presence of leptospire on the surface of the bronchial ciliated epithelium was validated by three control points. The first was simultaneous staining of the renal and pulmonary leptospire using the same paraffin block containing a piece of the kidney and a piece of the lung. The second was the use of an optimized immunohistological protocol that involved the addition of specific anti-rat antibodies and the use of specific *Leptospira* antibodies targeted against the Icterohaemorrhagiae serogroup. The third was a negative immunohistochemical control involving staining without the use of anti-leptospire antibodies. The heterogeneous and compact distribution of the leptospire on the ciliated epithelium cannot be confused with other anatomical features of the bronchi. The presence of leptospire DNA in the lung was verified by several molecular methods: a specific pathogenic *Leptospira* real-time PCR protocol used in a previous survey of wild rats (9), PCR of the *rrs* (16s) gene, and typing with an MST protocol previously tested on rat's renal isolates (16). The negative PCR result obtained with the lung tissues of DTO16 could be explained by a sampling bias that may have occurred during sample collection for DNA extraction, as leptospire were located in small clusters in some bronchi. A similar failure of detection was previously reported in infected kidney tissue (Warthin-Starry-positive kidney with negative PCR results and a negative culture) (20).

This study demonstrated the simultaneous presence of leptospire in the renal tubules and the bronchi in wild rats. This observation of natural infection was different from previous observations of rat's experimental infection, in which *Leptospira* was not detected, or rarely, in the lung during the first month post-inoculation and after the acute phase (8, 22). Moreover, in contrast to what was observed during acute infection, the leptospire were localized on the ciliated epithelium of the bronchi and not in the alveolar sacs of experimentally infected hamsters (7).

The observation of *Leptospira*'s pulmonary presence in these two cases raises questions about the hypothesis of potential pulmonary presentation of *Leptospira* infections in wild rats. Future epidemiological studies should involve examinations of

pulmonary presence of leptospire in rats using histological and molecular methods to gain a better understanding of the *Leptospira* infection in rats.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Department of Morphological and Clinical Pathology of the Etablissement VetAgro Sup for assistance and expertise in the performing of the histological analysis, the Laboratoire des Leptospire of the Etablissement VetAgro Sup for technical expertise concerning leptospire, the PERS team of the Etablissement VetAgro Sup, namely Dr Maria-Halima Laaberki and Dr Tatiana Dupinay, for help during trapping sessions and the Unité de Biologie des Spirochètes of the Institut Pasteur, namely Dr Pascale Bourhy, for the supply of *Leptospira*'s antisera for the immunohistochemistry.

REFERENCES

1. Adler B, de la Pena Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):287-96. PubMed PMID: 19345023.
2. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect.* 2013;43(1):1-9. PubMed PMID: 23337900.
3. Dolhnikoff M, Mauad T, Bethlem EP, Carvalho CR. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. *Braz J Infect Dis.* 2007;11(1):142-8. PubMed PMID: 17625743.
4. Vijayachari P, Sehgal SC, Goris MG, Terpstra WJ, Hartskeerl RA. *Leptospira interrogans* serovar Valbuzzi: a cause of severe pulmonary haemorrhages in the Andaman Islands. *J Med Microbiol.* 2003;52(Pt 10):913-8. PubMed PMID: 12972588.
5. Sykes JE, Hartmann K, Lunn KF, Moore GE, Stoddard RA, Goldstein RE. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med.* 2011;25(1):1-13. PubMed PMID: 21155890.
6. da Silva EF, Felix SR, Cerqueira GM, Fagundes MQ, Neto AC, Grassmann AA, et al. Preliminary characterization of *Mus musculus*-derived pathogenic strains of *Leptospira borgpetersenii* serogroup Ballum in a hamster model. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(2):336-7. PubMed PMID: 20682877.

7. Nally JE, Chantranuwat C, Wu XY, Fishbein MC, Pereira MM, Da Silva JJ, et al. Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. *Am J Pathol.* 2004;164(3):1115-27. PubMed PMID: 14982864.
8. Athanazio DA, Silva EF, Santos CS, Rocha GM, Vannier-Santos MA, McBride AJ, et al. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Trop.* 2008;105(2):176-80. PubMed PMID: 18093568.
9. Ayrál F, Artois J, Zilber AL, Widen F, Pounder KC, Aubert D, et al. The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats: a survey in Rhone, France (2010-2012). *Epidemiol Infect.* 2014;16:1-14. PubMed PMID: 24838220.
10. Cunningham D.M. MPJ. Guide to the identification and collection of New Zealand rodents. 3rd ed. Wellington, New Zealand: Department of Conservation; 1996. 24 p.
11. Martin L, Pettit A. Sero-diagnostic de la spirochaetose ictero-haémorragique. *Bull Mem Soc Med Hop Paris.* 1918;42:672-5.
12. Krojgaard LH, Villumsen S, Markussen MD, Jensen JS, Leirs H, Heiberg AC. High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol Infect.* 2009;137(11):1586-92. PubMed PMID: 19393116.
13. de Faria MT, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJ, Hartskeerl RA, Pereira MM, et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop.* 2008;108(1):1-5. PubMed PMID: 18721789.
14. Zuerner RL. Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. *Curr Protoc Microbiol.* 2005;Chapter 12:Unit 12E 1. PubMed PMID: 18770554.
15. Merien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 1992;30(9):2219-24. PubMed PMID: 1400983.
16. Zilber AL, Picardeau M, Ayrál F, Artois M, Demont P, Kodjo A, et al. High-resolution typing of *Leptospira interrogans* strains by multispacer sequence typing. *J Clin Microbiol.* 2014;52(2):564-71. PubMed PMID: 24478489.
17. Faine S. Silver Staining of Spirochaetes in Single Tissue Sections. *J Clin Pathol.* 1965;18:381-2. PubMed PMID: 14304261.

18. Agudelo-Florez P, Londono AF, Quiroz VH, Angel JC, Moreno N, Loaiza ET, et al. Prevalence of *Leptospira* spp. in urban rodents from a groceries trade center of Medellin, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81(5):906-10. PubMed PMID: 19861630.
19. Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE. Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. *Vet Pathol.* 2009;46(5):792-9. PubMed PMID: 19429975.
20. Agudelo-Florez P, Murillo VE, Londono AF, Rodas JD. Histopathological kidney alterations in rats naturally infected with *Leptospira*. *Biomedica.* 2013;33 Suppl 1:82-8. PubMed PMID: 24652252.
21. Tucunduva de Faria M, Athanazio DA, Goncalves Ramos EA, Silva EF, Reis MG, Ko AI. Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. *J Comp Pathol.* 2007;137(4):231-8. PubMed PMID: 17996544.
22. Nally JE, Chow E, Fishbein MC, Blanco DR, Lovett MA. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infect Immun.* 2005;73(6):3251-60. PubMed PMID: 15908349.

II. 3) Discussion

Comme cela a été décrit dans la littérature (Evangelista et Coburn 2010), l'infection naturelle par *Leptospira interrogans* chez le rat se présente sous une forme asymptomatique qui n'influence pas l'état général des individus porteurs de leptospires, et c'est cette infection naturelle qui a été caractérisée dans cette partie.

- La réponse sérologique

Au cours de cette étude, la réponse sérologique mesurée par le test de micro-agglutination, était faible, comme souvent observée lors d'autres études de terrain (Agudelo-Florez et al. 2009). Ce phénomène pourrait résulter, d'une part, d'une co-adaptation de l'hôte et du pathogène, en l'occurrence leptospires-rat (Agudelo-Florez et al. 2009; Bharti et al. 2003), caractérisée par la production d'anticorps à un taux inférieur à celui observé lors d'une infection aiguë, et, d'autre part, par la localisation et le maintien des leptospires au niveau des tubules rénaux qui est une localisation favorisant l'échappement à la réponse immunitaire (Monahan et al. 2009). Lors d'une première exposition du rat aux leptospires, une réponse humorale est mise en place, constituée d'immunoglobulines M et G (IgM et IgG). Ces dernières ayant un temps de demi-vie plus long que les IgM, elles sont détectées lors des tests de micro-agglutination réalisés sur des rats infectés en phase chronique. Cependant, le taux en IgG baisse avec le temps jusqu'à devenir indétectable, s'il n'y a pas de nouvelle exposition. Or, en colonisant les tubules rénaux, les leptospires n'entrent plus en contact avec les cellules du système immunitaire. Ainsi, des rats infectés par les leptospires peuvent présenter des taux en anticorps faibles ou non détectables.

Par ailleurs, nous avons pu constater que la production en anticorps et leur intensité ne variaient pas en fonction du statut d'infection du rat sauvage. Un rat identifié comme étant non porteur peut avoir un titre en anticorps aussi élevé qu'un individu « porteur ». Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la réponse sérologique soit indépendante du statut final de colonisation rénale, avec un titre final similaire quelles que soient les conditions d'inoculation (résultats d'étude du modèle expérimental précédent). Notre modèle sur des rats de laboratoire est donc conforme à la réponse sérologique observée dans la nature. Cette observation souligne que l'utilisation du MAT au cours des études épidémiologiques est plus adéquate pour le suivi de l'exposition des rats aux souches de leptospires circulantes que comme

technique de détection de l'infection et de suivi de la prévalence. Dans ce dernier cas, elle entraînerait alors un biais d'analyse dû aux individus qui seraient entrés en contact avec des leptospires et auraient produit des anticorps, sans être devenu porteurs.

- **La colonisation rénale**

Au cours de ces infections naturelles, la colonisation rénale était dense, d'environ 3 μm d'épaisseur, en une structure similaire à un biofilm, ce qui est comparable avec la littérature (Ko et al. 2009). Les tubules colonisés présentaient une répartition tissulaire fortement hétérogène. En effet, sur l'entièreté de la section rénale, nous pouvions compter 2 ou 3 champs d'observation qui présentaient seulement 2 à 3 tubules colonisés. Sur un champ d'observation au grossissement x400, cela faisait 3 tubules colonisés sur environ une trentaine au total. Ainsi, on peut supposer que le pourcentage de tubules rénaux colonisés par rein serait donc faible par rapport à la totalité des tubules. Ceci pourrait s'expliquer par les mécanismes de dissémination des leptospires, observés lors de nos essais expérimentaux. La phase de bactériémie permettrait une dissémination des bactéries par la circulation sanguine, à faible concentration. Quelques bactéries se seraient alors retrouvées dans le système circulatoire du rein. Puis, par un phénomène d'adhésion et de translocation, ces quelques leptospires auraient pu se mouvoir jusqu'à la lumière d'un tubule qu'elles ont colonisé par multiplication. Les groupes de tubules observés par histologie correspondraient alors aux circonvolutions du néphron infecté. Nous aurions alors un néphron fortement colonisé par les leptospires au milieu de plusieurs autres néphrons sains. Ce serait donc la forte densité de leptospires, qui en se multipliant dans les tubules d'un néphron infecté, serait à l'origine de la détection par différentes techniques moléculaires et histologiques.

- **Les autres organes, en particulier les poumons**

Lors des investigations réalisées sur plusieurs organes de ces rats infectés, nous avons pu observer, pour la première fois, la présence de leptospires au niveau pulmonaire, dans la lumière bronchique. L'ADN de leptospires a été détecté dans une portion de poumon prélevé de deux rats. Les colorations histologiques ont permis de localiser les leptospires à la surface de l'épithélium bronchique avec une répartition hétérogène en petit groupe compact dans les bronches segmentaires.

Une hypertrophie des nodules bronchiques a été observée sur les sections tissulaires. L'hypertrophie de ces nodules résulterait d'une réponse immunitaire locale, potentiellement en réaction à la présence d'un agent pathogène. Dans notre étude, cette réaction a été observée à la fois chez les individus présentant des leptospires au niveau pulmonaire et chez l'individu non porteur. L'hypertrophie nodulaire pourrait aussi bien être causée par *Leptospira*, que par une infection sous-jacente, par exemple face à un Hantavirus dont la présence a aussi été rapportée sur ce site (Ayrat et al. 2014; Dupinay et al. 2014).

Le typage moléculaire par MST a permis de mettre en évidence un profil identique des leptospires présents dans les reins et les poumons, appartenant à l'espèce *L. interrogans* séro-groupe Icterohaemorrhagiae sérovar Icterohaemorrhagiae « CHU Réunion ». Les leptospires infectants ces deux rats proviendraient vraisemblablement de la même source d'infection, mais les conditions environnementales exactes ayant conduit à la même forme d'infection restent encore inconnues.

Le tableau clinique de la leptospirose aiguë a évolué récemment chez l'homme et le chien, en comparaison avec les formes classiques décrites dans la littérature, vers une forme composée d'une défaillance rénale et hépatique associée à des complications pulmonaires dues à des hémorragies (Dolhnikoff et al. 2007; Schuller et al. 2015). Plusieurs études ont rapporté l'émergence de souches de *Leptospira* pouvant être à l'origine des symptômes pulmonaires humains (Vijayachari et al. 2003; da Silva et al. 2010). La localisation pulmonaire de ces souches a été étudiée grâce aux modèles animaux sur les espèces sensibles, comme le cobaye, le hamster et le singe (Dolhnikoff et al. 2007; Pereira et al. 2005). Lors de la phase d'infection aiguë, les leptospires sont observés de manière abondante dans les reins, le foie et la rate, alors qu'ils sont rarement détectés dans les tissus pulmonaires. Les colorations par immunomarquage ont permis de visualiser les leptospires au niveau du septum alvéolaire (Nally et al. 2004). Les hémorragies proviendraient d'un effet pathogénique des leptospires sur l'endothélium capillaire des alvéoles. Ainsi, la localisation pulmonaire des leptospires divergerait entre l'infection clinique et l'infection asymptomatique.

La présence concomitante de leptospires dans les poumons et les reins de rats sauvages ne présentant pas de lésions au niveau des organes infectés, pourrait

provenir de plusieurs hypothèses. La première serait que les souches responsables de l'infection naturelle chez le rat emprunteraient le même chemin évolutif que celles rencontrées au cours d'une infection aiguë chez les espèces sensibles. Les leptospires émergeant ces dernières années, semblent présenter un changement de tropisme cellulaire (Werts 2010) qui a conduit à l'addition de signes cliniques pulmonaires au tableau clinique chez l'homme et l'animal (Vijayachari et al. 2003; Schuller et al. 2015; Nally et al. 2004), et pourrait peut-être conduire à un portage pulmonaire associé au portage rénal chez le rat. Des études complémentaires de nos observations seront donc nécessaires pour approfondir cette hypothèse qui pourrait ouvrir la porte à celle d'une potentielle excrétion par voie aérienne. La seconde hypothèse sur cette nouvelle localisation dans les poumons de rat pourrait résulter d'un effet de l'environnement. En effet, plusieurs types de pathogènes circulent dans l'environnement direct de ces rongeurs. Il est donc possible qu'un virus ou une bactérie (Hantavirus ou *Pasteurella*) présent dans l'environnement ait pu fragiliser les défenses immunitaires locales de l'arbre respiratoire et endommager les cellules épithéliales, ce qui aurait pu augmenter la susceptibilité du tissu pulmonaire, vis-à-vis des effets pathogènes des leptospires, et permettre ainsi l'implantation de ces dernières au niveau de l'arbre bronchique.

II. 4) Conclusion

Au cours de notre micro-étude, nous avons pu identifier pour la première fois, la présence de leptospires de manière concomitante dans les reins et les poumons. Les leptospires avaient colonisé les tubules rénaux de manière dense et hétérogène, et en parallèle, ont été visualisés à la surface des cellules bronchiques en petit groupe compact. Au cours des essais de notre modèle « rat », nous n'avons relevé aucune trace de leptospires au niveau pulmonaire. D'un point de vue sérologique, les observations réalisées lors de l'étude de notre modèle sont conformes à ce qui se passe lors de l'infection naturelle, c'est-à-dire une réponse sérologique indépendante du statut de « porteur » de l'animal. Les caractéristiques de l'infection naturelle par *Leptospira* sont donc en partie différentes de celles observées lors de la phase expérimentale. Par conséquent, l'étude de l'infection naturelle ne peut pas être entièrement remplacée par l'expérimentation, car les conditions de cette dernière ne

peuvent reproduire l'ensemble des conditions rencontrées sur le terrain par le rat. L'approche expérimentale complète donc l'approche de terrain.

Ainsi, la variabilité entre les deux approches semblant provenir des conditions environnementales auxquelles sont soumis les rats sauvages au sein des colonies. Après avoir étudié l'infection naturelle à l'échelle individuelle, nous nous sommes intéressés à la dynamique de transmission des souches de leptospires circulant au sein de différentes colonies de rats : d'une part, en mesurant les différentes prévalences de portage dans les colonies de la région lyonnaise, avec les facteurs environnementaux pouvant expliquer cette variabilité de portage, et d'autre part, en identifiant les souches de leptospires circulant dans ces colonies grâce à notre nouvel outil de typage, la MST.

III) Etude épidémiologique sur la distribution de souches de *Leptospira* par la MST au sein d'une population urbaine de rat brun

III. 1) Objectif

Les nombreuses études épidémiologiques réalisées au cours de ces dernières années ont démontré une variation importante de la prévalence du portage de leptospires chez le rat, dépendant du site étudié (Himsworth et al. 2013). Cette hétérogénéité semble provenir de plusieurs facteurs, d'une part, liés à la colonie et d'autre part, à l'environnement particulier du site (Himsworth et al. 2013). En effet, plusieurs études mettent en avant que les facteurs de risque, liés à l'animal, d'être porteur de leptospires varient en fonction des régions. Ainsi, dans certaines études, il est établi que les rats adultes mâles dominants sont plus susceptibles d'être porteur (Himsworth et al. 2013; Desvars et al. 2013), alors que dans d'autres, le risque est le même quel que soit le sexe ou le niveau hiérarchique de l'individu (Costa et al. 2014). Concernant l'étude de l'environnement de la colonie, il est plus difficile d'établir des conclusions sur les facteurs influençant cette hétérogénéité de prévalence. Les études réalisées en ville montrent que cet environnement a une forte influence sur les rats eux-mêmes (Himsworth et al. 2013). Toutefois, les facteurs influençant la présence de leptospires sont encore difficiles à établir. Afin de comprendre au mieux l'interaction rat-*Leptospira*, il est important d'étudier les deux échelles de cet écosystème urbain : la colonie et la population dans son ensemble. Pour se faire, il est intéressant de connaître la circulation des souches de leptospires au sein de la population de rat et la confronter aux facteurs environnementaux. De plus, l'étude de la variabilité des sérovars circulants au sein de ces colonies permettrait de modéliser les potentiels mouvements des individus entre celles-ci et connaître les interactions des colonies cohabitant dans une même région.

À partir de rats capturés sur plusieurs sites répartis à travers l'agglomération lyonnaise, une étude de la prévalence du portage rénal a été réalisée exclusivement par détection moléculaire et isolement, associée à un génotypage par MST des

souches de *Leptospira* correspondantes. Cette étude nous a permis d'éprouver l'application de cette méthode au cours d'une étude épidémiologique dont le but était de déterminer avec précision les souches circulantes au sein des populations de rat, et les facteurs influençant les prévalences dans cette région.

III. 2) Article

Ces travaux présentés dans le manuscrit sont publiés dans le journal PlosOne et intégrés dans la thèse.

RESEARCH ARTICLE

Distribution of *Leptospira interrogans* by Multispacer Sequence Typing in Urban Norway Rats (*Rattus norvegicus*): A Survey in France in 2011-2013

Florence Ayrat¹*, Anne-Laure Zilber²*, Dominique J. Bicout⁴, Angeli Kodjo³, Marc Artois¹, Zoheira Djelouadji³

1 WildTech, USC 1233, Université de Lyon-VetAgro Sup, Marcy L'Etoile, France, **2** USC 1233, Université de Lyon-VetAgro Sup, Marcy L'Etoile, France, **3** USC 1233, Laboratoire des Leptospires, Université de Lyon-VetAgro Sup, Marcy L'Etoile, France, **4** Biomatématiques et Epidémiologie, EPSP-TIMC, UMR CNRS 5525, Université Grenoble-Alpes, VetAgro Sup, Marcy L'Etoile, France

* These authors contributed equally to this work.

* florence.ayrat@vetagro-sup.fr



OPEN ACCESS

Citation: Ayrat F, Zilber A-L, Bicout DJ, Kodjo A, Artois M, Djelouadji Z (2015) Distribution of *Leptospira interrogans* by Multispacer Sequence Typing in Urban Norway Rats (*Rattus norvegicus*): A Survey in France in 2011-2013. PLoS ONE 10(10): e0139604. doi:10.1371/journal.pone.0139604

Editor: Brian Stevenson, University of Kentucky College of Medicine, UNITED STATES

Received: April 29, 2015

Accepted: September 14, 2015

Published: October 8, 2015

Copyright: © 2015 Ayrat et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This project was supported by USC 1233 and by WildTech Project WP6, Epidemiology and Risk Assessment, which is supported by the European Commission under the Food, Agriculture and Fisheries and Biotechnology theme of the Seventh Framework Programme for Research and Technological Development (grant number 222633). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Background

Urban leptospirosis has increasingly been reported in both developing and developed countries. The control of the disease is limited because our understanding of basic aspects of the epidemiology, including the transmission routes of leptospire among rat populations, remains incomplete. Through the ability to distinguish among *Leptospira* strains in rats, multispacer sequence typing (MST) could provide a modern understanding of *Leptospira* epidemiology; however, to our knowledge, the distribution of *Leptospira* strains among urban rat colonies has not been investigated using MST.

Aims and Methodology

The objective of this study was to identify the *Leptospira* strains present in rats (*Rattus norvegicus*) in Lyon (France) using MST and to characterize their spatial distribution. Kidneys and urine were collected from rats trapped live in seven locations in the city and in one sub-urban location. Each location was considered to represent a rat colony. Bacterial cultures and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assays were performed, and the *L. interrogans* DNA identified was then genotyped using MST. The distributions of *Leptospira* strains were spatially described.

Key Results

Among 84 wild rats, MST profiles were obtained in 35 of 37 rats that had a positive result for *L. interrogans* by bacterial culture and/or qPCR analyses. All of the MST profiles were related to reference strains previously isolated from human patients that belong to the serogroup Icterohaemorrhagiae and the serovars [strain(s)] Copenhageni [Wijnberg or M20]

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

(n = 26), Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion] (n = 7), Icterohaemorrhagiae [R1] (n = 1) and Copenhageni [Shibaura 9] (n = 1). Each colony was infected with leptospires having the same MST profile.

Major Conclusions

This study demonstrated that MST could be used for the purpose of field studies, either on culture isolates or on DNA extracted from kidneys and urine, to distinguish among *L. interrogans* isolates in rats. MST could thus be used to monitor their distributions in urban rats from the same city, thereby providing new knowledge that could be applied to explore the circulation of *L. interrogans* infection in rat colonies. Because the strains are related to those previously found in humans, this application of MST could aid in the source tracking of human leptospirosis, and the findings would be relevant for public health purposes according to the One Health principle.

Introduction

It has been estimated that more than one million severe cases of leptospirosis occur per year worldwide [1], and leptospirosis is considered to be an emerging disease in many countries [2]. The infection can cause fever, renal failure and pulmonary hemorrhage and is potentially fatal in 5% to 15% of cases [3–5]. It is a bacterial zoonosis caused by pathogenic *Leptospira*, resulting from direct or indirect contact with the urine or tissues of infected animals [6]. Although many animals can be carriers, rats are the most common source of human infection, particularly in urban environments, as rats are a synanthropic species (adapted to coexisting with the human population) [7–9]. Environmental factors also play a role in leptospirosis, leading to a higher incidence in tropical countries; however, because rats are ubiquitous, leptospirosis remains a public health issue even in cities of developing countries [8–10].

Pathogenic species include *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. santarosai*, *L. alexanderi*, *L. alstonii* and *L. mayottensis* [11–13]. *Leptospira* can also be classified into approximately 300 serovars, based on the lipopolysaccharide (LPS) structure. Antigenically related serovars have been grouped into 25 serogroups [11]. Because the species identification is not related to the LPS-associated genes (*i.e.*, O-antigen gene cluster), the molecular and the serology-based taxonomies do not entirely overlap [14]. Different serovars are adapted to different mammalian hosts, which can either act as a reservoir of a co-adapted *Leptospira* serovar or carry and disseminate other serovars [6]. It is therefore difficult to track strains with molecular identities or serotypes that change with the hosts and the environments they inhabit or pass through.

Rats are colonial and territorial [15] animals that promote intra-colony interactions. In the urban environment, limited available space leads to the formation of colonies with a small home range, and inter-colony contacts may occur. Therefore, the urban rat population more likely functions as a meta-population, as described by Viana *et al.* [16], in which the sub-unit is the rat colony. Determining rat meta-population behavior with regard to *Leptospira* strain distribution would provide evidence of rat interactions resulting in rat infections. These investigations are of public health importance according to the One Health principle, as they could aid in understanding of the spatial distribution of infected rats, leading to potential disease transmission to humans. A molecular tool that can identify and monitor the isolates circulating in urban rat colonies is required for the investigation of potential routes of contamination (intra vs. inter colony) and their relative importance.

To successfully establish the epidemiological relationship between any two isolates, it is necessary to type them at a sufficient level of resolution [17]. Rats have been reported as the primary carriers of *Leptospira* serovars Icterohaemorrhagiae and Copenhageni (i.e., the Icterohaemorrhagiae serogroup) [8,18]. Therefore, the molecular data on the leptospires circulating in urban rat populations at the serovar level are not sufficient, and opportunities to distinguish at the isolate level could provide new perspectives for epidemiological analysis and for source tracking, in particular. Other than serological methods, molecular tools that have been employed to detect and genotype leptospiral agents in rat surveys include pulse field electrophoresis (PFGE), analyses of variable number tandem repeats (VNTR), and multi-locus sequence typing (MLST) [19–22]. However, these methods suffer from low discriminatory power and can only distinguish between *Leptospira* species, serogroups or serovars. O-genotyping could be a relevant method for identifying isolates; however, because of a lack of sequences of O-antigen gene clusters from various serogroups, this method has not been developed in *Leptospira*. Recently, multispacer sequence typing (MST) technology has been used and validated to distinguish between *L. interrogans* at the strain level in both human and animal samples. Because it is based on sequencing, MST has particularly high discriminatory power for the Icterohaemorrhagiae serogroup compared with VNTR [23]. The method can generate sequence data that are suitable for epidemiological and rat population studies. To our knowledge, no previous studies have applied MST for the purpose of a survey of wild rats.

The objectives of the study were as follows: (1) to identify the MST profile of *L. interrogans* isolates circulating in rat colonies in central Lyon, France, and in suburbs of Lyon; and (2) to characterize the distribution of MST profiles in rat colonies over space. Based on the results of this study, the use of MST for the surveillance of *Leptospira* in animal hosts should be considered, and we offer a public health perspective on the potential for its use.

Materials and Methods

Ethics statement

The authors assert that all procedures conducted in this study complied with the ethical standards of the European regulation governing the care and use of laboratory animals, following the agreement n° 69–020931, delivered by Rhône Préfecture (S1 File).

Study area

The study was conducted in Lyon (N45°45'/E4°50') and included seven trapping locations within the city center and one in a suburb. The eight urban trapping locations encompassed five dwelling areas: “Mermoz-B” N45°43'43.16"/E4°53'09.63", “Mermoz-F” N45°43'38.47"/E4°53'05.35", and “Mermoz-R” N45°43'44.96"/E4°52'57.56" were from an inner-city neighborhood; “Guillotière” N45°45'08.45"/E4°50'08.45" included ancient buildings; and “Chapelle” N45°45'52.58"/E4°47'24.28" included more recent buildings, a public garden (“Parc de la Tête d'Or” N45°46'26.93"/E4°44'04.06"), the waste incineration plant (“UIOM” N45°43'26.95"/E4°50'16.75") and a grassland in the suburb (“Francheville” N45°44'28.87"/E 4°44'04.06"). The dwellings and public areas were selected based on the presence of high rat concentrations, as reported by the “Service d'Hygiène de Lyon” (i.e., the department of public health in Lyon). This study formed the basis of a larger project characterizing the distribution of zoonotic pathogens, including *Leptospira*, in rat populations conducted in the Rhône département (i.e., administrative sub-unit of France) [24]. For the purposes of this project, trapping locations were chosen based on population density to represent a range of urbanization levels. Only eight locations where *Leptospira* was detected were included in this study because the bacterial load in rats' kidneys was found to be appropriate for further molecular investigations.

Trapping occurred on both public and private properties, and permission to trap was obtained from the City and the property managers, respectively.

Sample collection

Previous research has indicated that urban rats form tight colonies with a small home range, suggesting that a colony could be limited to a block [25–26]. Thus, we defined colonies to consist of rats inside geographical barriers, such as rivers, or urban infrastructures, including railways or blocks. Using this definition, the trapping locations were chosen to encompass not more than one colony. The survey was subdivided into a main trapping period, consisting of one 6-month period (October 2011 to March 2012), and a follow-up period, consisting of a 1-week period in January 2013 in which trapping was limited to the “Parc de la Tête d’Or” location. This extra week of trapping was performed to verify the consistency of the former results over time, and the location was chosen based on public health relevance (public garden) and high rat abundance. For the purposes of both pest control and this study, trapping/removal methods were used (snap trapping and live capture), with live capture being the preferred method to prevent post-mortem kidney contamination. Most rats were captured with small (28 cm x 9 cm x 9 cm) or large (50 cm x 15 cm x 15 cm) single-catch rat traps. The captured rats were transported to the laboratory, immediately anesthetized using isoflurane and sacrificed by cervical dislocation. For each animal, the weight, size, sex and level of sexual maturity (*i.e.*, the presence of seminal vesicles in males and a developed uterus in females) were recorded. The rats that died during capture were frozen at -20°C and thawed on the day of dissection.

One kidney was removed and samples were taken for bacteriological culture immediately following collection, and one fourth of the other kidney, including the cortex and medulla, was stored at -80°C until further analysis.

Molecular investigations

The flow chart of the molecular investigations is presented in Fig 1 and is detailed as follows.

Leptospira isolation. Half of one crushed kidney was aseptically transferred to tubes containing Ellinghausen McCullough Johnson and Harris (EMJH) culture media (Indicia, St G enis, France). Three dilution tubes were incubated at 29°C, according to a previously published protocol for the isolation of pathogenic *Leptospira* [27]. The tubes were examined weekly by dark-field microscopy for two months [28]. An additional month of culture examination was performed when PCR analysis yielded positive results (TaqMan real-time PCR kit performed in parallel and detailed below) to increase the probability of detecting *Leptospira* growth.

DNA was extracted from 200 µl of each *Leptospira* culture using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer’s instructions. All DNA samples were stored at -20°C.

MST profile determination. DNA extraction and *Leptospira* detection in kidney tissue and urine. One fourth of each kidney was homogenized aseptically using a syringe. A small amount of this crushed kidney (ca. 25 mg) or urine when available was incubated with 180 µl T1 Buffer and 25 µl proteinase K for 3 hours. After this protein digestion, DNA was extracted from 200 µl of lysed tissue using a Nucleospin Tissue kit (Macherey Nagel, Hoerd, France) following the manufacturer’s instructions. All DNA samples were stored at -20°C.

The presence of *Leptospira* colonization of the kidney was assessed using a specific pathogenic *Leptospira* TaqMan real-time PCR kit (TaqVet PathoLept Kit, LSI, Lissieu, France) following the manufacturer’s instructions. A final volume of 25 µl, consisting of 20 µl Mix Lepto (LSI) and 5 µl

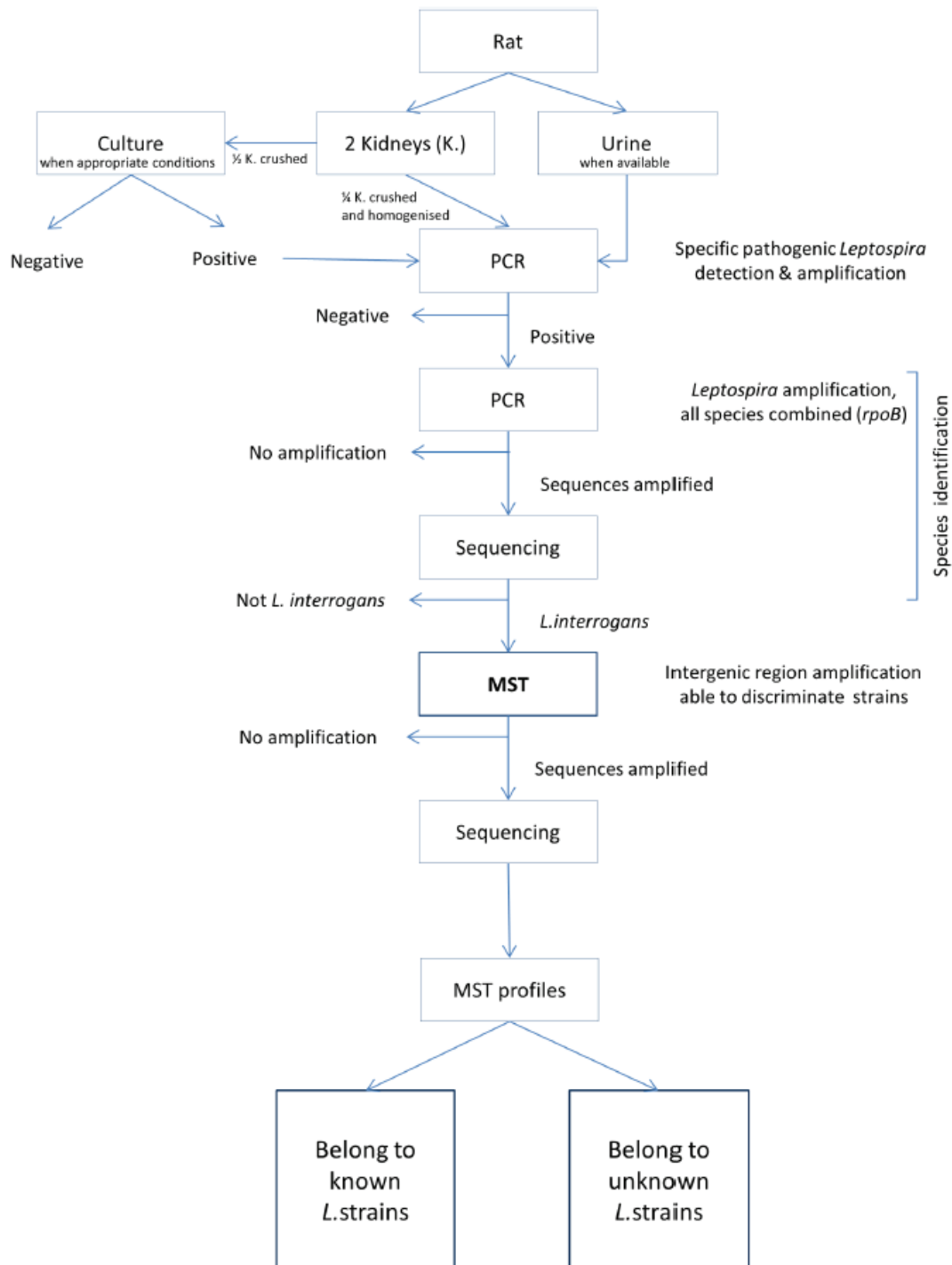


Fig 1. Flow chart of the molecular methods performed to determine *Leptospira* strains.

doi:10.1371/journal.pone.0139604.g001

target DNA, was amplified using a Rotor-Gene Q (Qiagen) according to the following program: 10 min of enzyme activation at 95°C, followed by 45 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. An appropriate negative control, consisting of the PCR mix without the target DNA, was included. The specimens with a cycle threshold (Ct) less than 45 cycles were considered positive.

When available, the DNA extraction and PCR technique was performed on urine samples as well.

Molecular typing. The genotyping of *Leptospira* DNA was conducted using extracts from the isolate cultures and from the kidney samples. As the MST that we used was developed to discriminate among strains of the species *Leptospira interrogans*, this species was verified first as follows: the *rpoB* gene was amplified by PCR using HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) under standard conditions and the primers previously described [29]. A final volume of 50 µl, consisting of 35 µl H₂O, 5 µl of 10× buffer (Qiagen), 2 µl of 25 mM MgCl₂, 1 µl of 10 mM dNTPs (Qiagen), 1 µl of forward primer (10 µM), 1 µl of reverse primer (10 µM), 0.3 µl of HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) and 5 µl of target DNA, was amplified according to the following program: 15 min of enzyme activation at 95°C, followed by 40 cycles consisting of 95°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 1 min and a final elongation step of 10 min at 72°C. The PCR products were sequenced using the BigDye Terminator sequencing kit and a 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). The *Leptospira* species in the samples were identified by analyzing these sequences using the NCBI nucleotide BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

The samples in which the *L. interrogans* species was identified were screened using the MST method as reported previously [23]. PCR amplifications were performed in a final volume of 50 µl containing 35 µl of H₂O, 5 µl of 10× buffer (Qiagen), 2 µl of 25 mM MgCl₂, 1 µl of 10 mM dNTPs (Qiagen), 1 µl of forward primer (10 µM), 1 µl of reverse primer (10 µM), 0.3 µl of HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) and 5 µl of target DNA. For samples with a low quantity of *Leptospira* DNA, the volume of the target DNA was increased to 8 µl. The mix was amplified according to the following program: 15 min of enzyme activation at 95°C; followed by 40 cycles consisting of 95°C for 30 s, 50°C or 52°C, depending on the primer, for 30 s, and 72°C for 1 min; and a final elongation step of 10 min at 72°C. PCR mixes without the target DNA and with DNA from *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni were used as appropriate negative and positive controls, respectively. The PCR products were sequenced using the BigDye Terminator sequencing kit with an Applied Biosystems 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). The *Leptospira* serovars and strains were deduced from a comparison of the sequences obtained with the MST reference sequences using NCBI nucleotide BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) and a previously published database [23].

Spatial analysis

Variations in the locations, infection status and strains of rats trapped across the study area were visualized spatially using the ArcGIS software, version 9.3 (ESRI, Redlands, CA, USA). The mean distance between colonies in which a given strain was identified was compared with the mean distance between colonies in which different strains were identified using Student's T test; an alpha value of 0.05 was used to identify significant differences. The statistical analyses were conducted using the R software, version 3.0.1 (R Development Core Team (2013), R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

Leptospira spp. detection

A total of 84 rats were trapped in the eight locations, and all were Norway rats. The distributions of the rats trapped at each site and of PCR-positive samples are displayed in [Table 1](#).

Table 1. Distribution of rats testing positive among the trapping locations and nature (species, serogroup [Sg], serovar [Sv] and strain) of *Leptospira* based on multispacer sequence typing profiles.

	No of rats captured	No of PCR ^a -positive kidneys	No of PCR ^a -positive urines (no performed)	No of culture-positive kidneys	Total infected rats	<i>L.interrogans</i> species (by sequencing)	No of complete MST-profiles	<i>L.</i> strains deduced from the MST-profile		
								Sg	Sv	strain
Francheville	9	1		1	1	1	1	IH	cop	M20 or Wijnberg
Guillotièrre	3	2		0	2	2	2	IH	cop	M20 or Wijnberg
la chapelle	1	0		1	1	1	1	IH	ict	R1
Mermoz sud_B	13	9	2 (3)	9	9	9	9	IH	cop	M20 or Wijnberg
Mermoz sud_F	17	12		6	12	12	11	IH	cop	M20 or Wijnberg
Mermoz sud_R	7	2	1(2)	2	3	3	3	IH	cop	M20 or Wijnberg
PTO	8	5	1(1)	3	5	5	5	IH	ict	CHU Réunion
PTO (2)*	3	2		2	2	2	2	IH	ict	CHU Réunion
UIOM	23	2	0(1)	0	2	1	1	IH	cop	Shibaura 9
Total	84	36	4(7)	24	37	36	35			

^a PCR using *rpoB* primer

*second trapping period for the strain followed up in the Parc de la Tête d'Or

IH, Icterohaemorrhagiae; cop, Copenhageni; ict, icterohaemorrhagiae; PTO, "Parc de la Tête d'Or"

doi:10.1371/journal.pone.0139604.t001

L. interrogans was isolated from 24 rats, and *L. interrogans* DNA was extracted from 36 rats' kidneys. For one rat, a positive culture result was observed together with a negative PCR result. For another rat, *L. interrogans* DNA was detected in the urine, whereas it was not in the kidney tissue.

Leptospira MST profiles

All 37 rats in which *L. interrogans* was detected were typed by MST, and MST profiles were determined in 35 samples; two MST profiles could not be identified due to low DNA concentrations. Four different MST profiles were identified and related to the serogroup Icterohaemorrhagiae and the serovars Icterohaemorrhagiae and Copenhageni (strains are indicated in brackets). The most commonly observed MST-profile-related strain was Copenhageni [Wijnberg or M20] (n = 26), followed by Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion] (n = 7), Icterohaemorrhagiae [R1] (n = 1) and Copenhageni [Shibaura 9] (n = 1). All of the MST profiles of the *Leptospira* isolates were similar to the MST profiles of the *Leptospira* DNA from the corresponding kidneys or urine.

The characteristics of the infected-rat populations are displayed in Table 2. All the morphometric characteristics and the laboratory results of the 81 rats collected from October 2011 to March 2012 are available (S1 Table).

Spatial patterns observed

Fig 2 illustrates the distribution of rats infected with *L. interrogans* and shows the strains and locations of larger clusters of rats carrying a given strain. Interestingly, one strain was isolated

Table 2. Morphometric characteristics of a population of wild Norway rats with different multispacer sequence typing profiles.

Characteristic	Leptospira strains			
	copenhageni [Wijnberg/M20] (n = 26)	icterohaemorrhagiae [CHU Réunion] (n = 7)	copenhageni [Shibaura 9] (n = 1)	icterohaemorrhagiae [R1] (n = 1)
sex				
Female	10	2	0	0
Male	16	5	1	1
Sexual maturity				
Immature	1	0	0	0
mature	25	7	1	1
Weight (g)				
Median (IQR)	244.3 (204.8–287.0)	387.0 (273.5–431.0)	374 (- ^a)	267 (- ^a)
Length (cm)				
Median (IQR)	22.7 (22.0–23.9)	25 (23.5–26.7)	24.5 (- ^a)	23.3 (- ^a)

^a insufficient number of rats to estimate the interquartile range (IQR)

doi:10.1371/journal.pone.0139604.t002

in each colony. The colonies infected with *Leptospira* serovar Copenhageni [Wijnberg or M20] were most common (n = 5); each of the three other strains was found in only one colony.

Among the five colonies infected by Copenhageni [Wijnberg or M20], three locations (“Mermoz-B”, “Mermoz-F” and “Mermoz-R”) were separated by less than 0.5 km. Two other colonies infected by *Leptospira* serovar Copenhageni [Wijnberg or M20] (“Francheville” and “Guillotière”) were farther from the former locations, at 11.5 km and 4.5 km away, respectively. The colony where Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion] circulated was located in “Parc de la Tête d’or” and was separated by 2.6 km to 10 km from the other locations. The mean distance between colonies where *Leptospira* Copenhageni [Wijnberg or M20] circulated was 5.5±4.82 km and was not significantly different from the mean distance between colonies that contained different strains, which was 6.88±1.84 km (t = -0.8, df = 10, p = 0.44).

In the two infected rats trapped in the second period in the “Parc de la Tête d’Or”, the serovar Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion] was identified from the MST profiles. The serovar detected in this period was the same as the serovar detected in the same location one year previously.

Discussion

This study has demonstrated that urban rats carry a variety of *L. interrogans* strains, all with MST profiles that are concordant with reference strains from the serogroup Icterohaemorrhagiae, which has been previously identified in humans. More specifically, four distinct MST profiles were identified in the rat population in this study, and a single MST profile was attributed to each rat colony. These outcomes raised public health, methodological and epidemiological issues.

Implications for public health

This study distinguished among four MST profiles related to four strains from the serogroup Icterohaemorrhagiae. As an MST profile is only a partial typing of the entire leptospiral

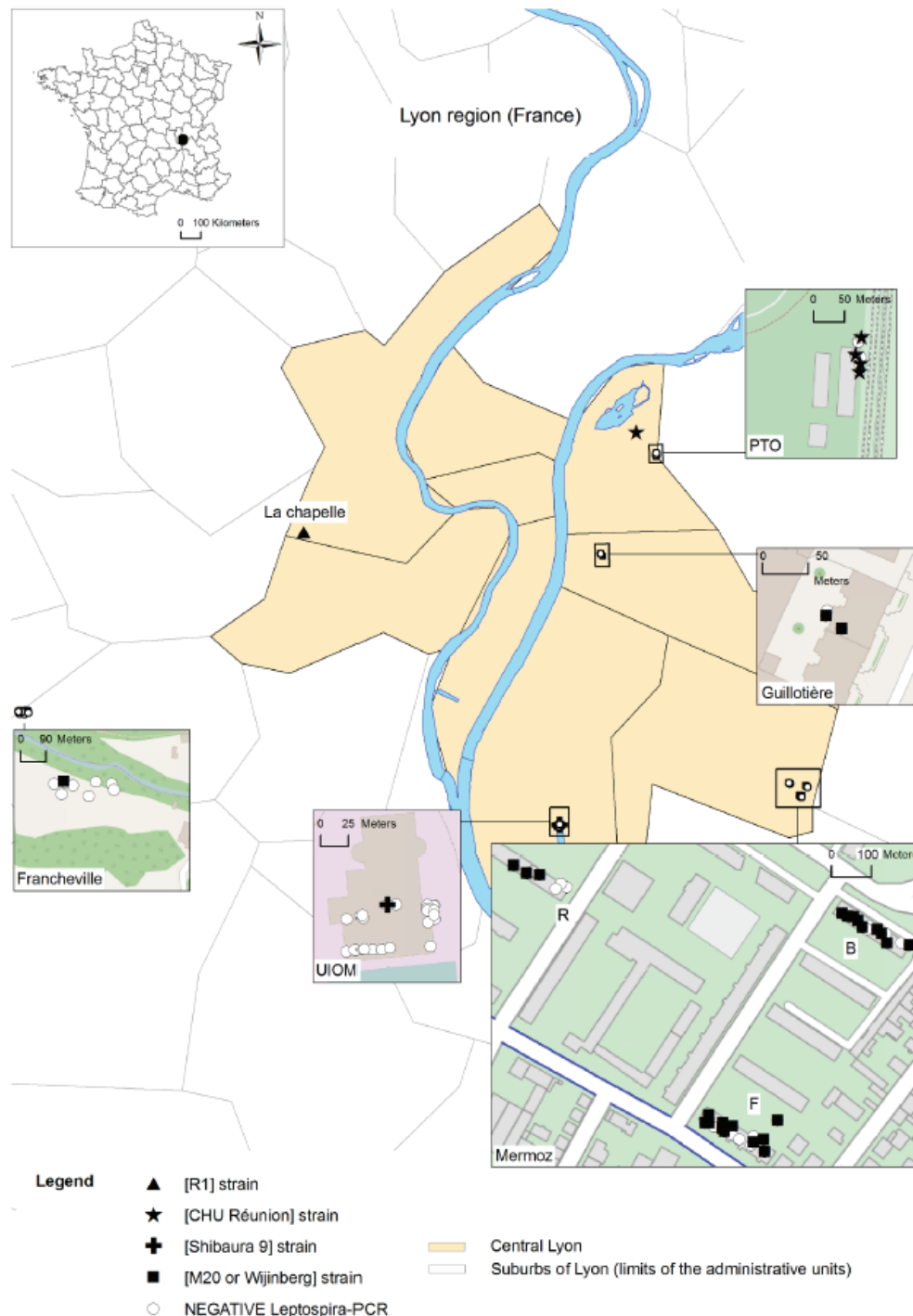


Fig 2. Geographic distribution of *L. interrogans*. *L. interrogans* strains deduced from MST profiles detected in the kidneys of wild Norway rats from downtown Lyon and a suburb, trapped between October 2011 and March 2012 (contains information from OpenStreetMap[®], which is made available here under the CC BY 3.0 License, the original images were modified for representative purposes).

doi:10.1371/journal.pone.0139604.g002

genome, two identical MST profiles are not necessarily evidence of two identical strains; however, two identical MST profiles strongly suggest that the strains are closely related. The MST profiles found in the rats in our survey were identical to those of the reference strains that were isolated from humans in various areas. This finding indicates that the strains circulating in rats and humans are closely related. Assuming that a human patient would be infected in Lyon city center with one of the four MST profiles described in our study, it would be possible to speculate that the transmission occurred via the rat population. Although rats are the main source of *Leptospira* in cities, many reservoir hosts of leptospirosis exist, and to determine whether rats are the source of human disease, an inventory of strains among the varied hosts species and humans is required. In this context, the MST approach could be used for the purpose of source tracing.

MST has previously helped to define phylogeographical lineages of mycobacteria [30]. As the present study suggests that only one strain may be assigned to a colony home range, the areas in which individual strains are distributed are expected to be well delimited without overlapping. Among the numerous colonies that exist in Lyon, the eight colonies in this study provide a restricted overview of currently circulating strains; with more sampling, it would be possible to determine whether additional strains circulate and to provide a more complete picture of their spatial distributions. Maps of the spatial distribution of *Leptospira* strains would be of great interest in epidemiologic investigations. This knowledge would help to locate the potential sources of infection. Together with surveillance of MST outcomes in rats, an updated map of strain distributions would permit early detection of emerging strains. Strain emergence or re-emergence in a given area is likely to occur due to changing environments, host population fluctuations and vaccine pressure. Detecting such a change would facilitate appropriate leptospirosis preparedness efforts and would be useful in preparing for natural disasters, such as storms, hurricanes and particularly flooding, all of which are usually associated with an increased incidence of human and animal leptospirosis [31–32].

Finally, our finding that all of the strains belonged to the serogroup Icterohaemorrhagiae supported the use of the current vaccine available for humans in France, which includes the serovar Icterohaemorrhagiae (Spirolept®). By distinguishing *Leptospira* strains, MST could identify further strains of interest for public health and could aid in the designing of future vaccines.

Use of MST to distinguish among *Leptospira* strains in rat surveys

MST allows for the direct detection of *Leptospira* in rat tissues; therefore, it is useful in field surveys in which appropriate sampling for bacteriological cultures is limited. The robustness of MST was highlighted by the consistency with which it could identify strains in various samples (e.g., isolates or *Leptospira* DNA from the kidney or urine) from the same rat. This finding suggested that *Leptospira* DNA extracted from rat samples could be sufficient for MST use.

The MST profiles were not fully obtained for two rats that tested positive for *L. interrogans* because the DNA load, characterized by the Ct, was lower in these samples (LYO0845, Ct = 38.67 and LYO0881, Ct = 38.72), compared to other samples (Ct ≤ 35). Because the MST method is less sensitive than real-time PCR, the MST method cannot be used alone for screening purposes. The use of serial testing, consisting of culture and/or qPCR combined with MST, can be expected to provide a reliable reflection of *Leptospira* infection and of the *Leptospira* strains circulating in rat colonies.

The recovery of bacteria from an individual kidney by bacteriological culture was considered to be definitively diagnostic of *L. interrogans* infection and was considered to be appropriate for early detection because kidney colonization occurs during the first week of *Leptospira*

infection [33]. However, this culturing method is slow and insensitive, and the frequency with which bacteria are isolated is typically low. Thus, qPCR was also performed because it is reportedly the most sensitive method of detection for human *Leptospira* [34]. However, false negatives can still be obtained if PCR is used to identify uncharacterized pathogenic strains [34] or if the bacteria have aggregated in an unsampled part of the kidney. Thus, a combination of culturing and qPCR analyses on a variety of sample types was performed in an attempt to increase detection sensitivity. For instance, one rat that was PCR-positive in the urine and PCR-negative in the kidney would have been missed without this combination of tests.

Implications for the epidemiology of *Leptospira*

Spatial analysis suggests that a single strain was found in each colony. It cannot be determined whether this specific geographical pattern resulted from the dispersal of individual rats and rat-to-rat transmission or from exposure to a non-rat source, such as the environment within a given colony, or both. As colonies infected with the same strain are not significantly closer to each other than are colonies infected with different strains, a dispersal of individuals resulting in admixed strains would have been expected; however, such a pattern was not observed in this study. Based on the assumption that a single strain was associated with each colony, it is likely that few contacts occur between colonies, which is consistent with previous studies of the genetic characteristics of urban rats [35]. Moreover, high degrees of habitat fragmentation in urban areas should also limit individual rat movement between areas and result in the geographical isolation of urban rat populations [25]. The absence of cross-contamination between colonies strongly supports this hypothesis. Thus, Copenhageni [Wijnberg or M20] infections in rats from remote colonies may be related to rare and ancient rat movements between colonies, as has been described previously in other cities by assessing population genetics [36]. Interestingly, the environment associated with the 5 sites varied considerably (low-income dwelling, old dwellings, public garden in the suburb), suggesting that a variety of habitats may be associated with the same strain.

Although follow-up observations were limited to one location, the fact that the same strain was isolated in the same location one year later suggests that the isolated *Leptospira* strain persists over time within the same colony and supports the hypothesis that there is limited interaction between colonies. Therefore, the strain Copenhageni [Wijnberg or M20] encountered in remote locations may have been there for a substantial amount of time.

One potential method for testing the distributions of strains over space and time would be to tag rats and monitor their movements. Such protocols have been used before in rural or island habitats, although they are less appropriate for urban wild rats, mainly due to the adverse effects of human activities on capture success (e.g., pest control measures and trap deterioration). Thus, our original findings aid in the estimation of temporal stability and spatial connectivity of populations, increasing our knowledge of the epidemiology of this disease, which will be crucial for the development of prevention methods.

Conclusions

Our study demonstrates the relevance of MST for the accurate characterization of *Leptospira interrogans* extracted-DNA from rat tissues. Improved typing methods are required to investigate the molecular epidemiology of leptospirosis, and MST could aid in achievement of the level of definition that is needed for proper interpretation, thereby offering novel perspectives for epidemiological surveillance and investigations.

In the future, large-scale *Leptospira* genotyping using MST could provide substantial knowledge of leptospirosis in various host populations and habitats. This approach could generate

valuable information that could be used to generate a phylogeographical database to improve epidemiological investigations and to track the sources of this disease in a particular epidemiological catchment area. Early detection of emergent strains or changes in the strain distribution using MST could drive future public health efforts.

Supporting Information

S1 File. Supplemental information. ARRIVE check list.
(PDF)

S1 Table. Data set. Morphometric characteristics and laboratory results of the 81 rats collected from October 2011 to March 2012.
(XLSX)

Acknowledgments

We thank the city of Lyon and its public health department (Dr. Gilbert Gault), the waste plant UIOM de Lyon (Mr. Joël Baud) and the Parc de la Tête d'Or (Drs. David Gomis and Guillaume Douay, managers) for assisting with rat and census data collection. We thank Philippe Berny and Joffrey Goulois for assisting with rat collections.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FA. Performed the experiments: FA ALZ. Analyzed the data: FA. Contributed reagents/materials/analysis tools: MA ZD. Wrote the paper: FA ALZ DB AK MA ZD.

References

1. Abela-Ridder B, Sikkema R, Hartskeerl RA. Estimating the burden of human leptospirosis. *Int J Antimicrob Agents*. 2010. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2010.06.012](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.012)
2. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17: 494–501. doi: [10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03474.x) PMID: [21414083](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21414083/)
3. Guerra MA. Leptospirosis. *J Am Vet Med Assoc*. 2009; 234: 472–478. doi: [10.2460/javma.234.4.472](https://doi.org/10.2460/javma.234.4.472) PMID: [19222355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19222355/)
4. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3: 757–771. PMID: [14652202](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14652202/)
5. Meerburg BG, Singleton GR, Kijlstra A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit Rev Microbiol*. 2009; 35: 221–270. doi: [10.1080/10408410902989837](https://doi.org/10.1080/10408410902989837) PMID: [19548807](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19548807/)
6. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14: 296–326. PMID: [11292640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11292640/)
7. Vinetz JM, Glass GE, Flexner CE, Mueller P, Kaslow DC. Sporadic urban leptospirosis. *Ann Intern Med*. 1996; 125: 794–798. PMID: [8928985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8928985/)
8. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7: 736–747. doi: [10.1038/nrmicro2208](https://doi.org/10.1038/nrmicro2208) PMID: [19756012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19756012/)
9. Evangelista KV, Coburn J. Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*. 2010; 5: 1413–1425. doi: [10.2217/fmb.10.102](https://doi.org/10.2217/fmb.10.102) PMID: [20860485](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20860485/)
10. Socolovschi C, Angelakis E, Renvoisé A, Fournier PE, Marié JL, Davoust B, et al. Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. *Int J Infect Dis*. 2011; 15:e710–5. doi: [10.1016/j.ijid.2011.05.017](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.05.017) PMID: [21767971](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21767971/)
11. Adler B, de la Peña Moctezuma A. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol*. 2010; 140: 287–96. doi: [10.1016/j.vetmic.2009.03.012](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012) PMID: [19345023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19345023/)
12. Cerqueira GM, Picardeau M. A century of Leptospira strain typing. *Infect Genet Evol*. 2009; 9: 760–768. doi: [10.1016/j.meegid.2009.06.009](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.009) PMID: [19540362](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19540362/)

13. Bourhy P, Collet L, Brisse S, Picardeau M. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014; 64: 4061–4067. doi: [10.1099/ijs.0.066597-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.066597-0) PMID: [25249563](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25249563/)
14. Kmety E, Dikken H. Classification of the Species *Leptospira interrogans* and the History of Its Serovars. A History of the Publication of the Serovars of Leptospire, and a Catalogue of their Relationships. University Press Groningen, Groningen, the Netherlands; 1993.
15. Bameett SA. The rat: A study in behavior. Chicago: Aldine Pub Co; 1963.
16. Viana M, Mancy R, Biek R, Cleaveland S, Cross PC, Lloyd-Smith JO, Haydon DT. Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. *Trends Ecol Evol*. 2014; 29: 270–279. doi: [10.1016/j.tree.2014.03.002](https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.03.002) PMID: [24726345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24726345/)
17. EFSA. Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance: Part 1 (evaluation of methods and applications) *EFSA Journal* 2013; 11: 3502 [84 pp.]. doi: [10.2903/j.efsa.2013.3502](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3502)
18. Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J. et al.. *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2009; 32: 463–476. doi: [10.1016/j.cimid.2008.05.004](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2008.05.004) PMID: [18639932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18639932/)
19. Li S, Wang D, Zhang C, Wei X, Tian K, Li X. et al. Source tracking of human leptospirosis: serotyping and genotyping of *Leptospira* isolated from rodents in the epidemic area of Guizhou province, China. *BMC Microbiol*. 2013; 13: 75. doi: [10.1186/1471-2180-13-75](https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-75) PMID: [23548108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23548108/)
20. Bourhy P, Hermann Storck C, Theodose R, Olive C, Nicolas M, Hochedez P, et al. Serovar diversity of pathogenic *Leptospira* circulating in the French West Indies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7:e2114. doi: [10.1371/journal.pntd.0002114](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002114)
21. Villanueva SY, Saito M, Baterna RA, Estrada CA, Rivera AK, Dato MC, et al. *Leptospira*-rat-human relationship in Luzon, Philippines. *Microbes Infect*. 2014 Jul 15. pii: S1286-4579(14)00087-2. doi: [10.1016/j.micinf.2014.07.001](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.07.001) PMID: [25048015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25048015/)
22. Cosson JF, Picardeau M, Mielcarek M, Tatar D, Chaval Y, Suputtamongkol Y, et al. Epidemiology of *Leptospira* transmitted by rodents in southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8:e2902. doi: [10.1371/journal.pntd.0002902](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002902) PMID: [24901706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24901706/)
23. Zilber AL, Picardeau M, Ayril F, Artois M, Demont P, Kodjo A, et al. High-resolution typing of *Leptospira interrogans* strains by multispacer sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: 564–571. doi: [10.1128/JCM.02482-13](https://doi.org/10.1128/JCM.02482-13) PMID: [24478489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24478489/)
24. Ayril F, Artois J, Zilber AL, Widén F, Pounder KC, Aubert D, et al. The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats: a survey in Rhône, France (2010–2012). *Epidemiol Infect*. 2015; 143: 586–599. doi: [10.1017/S0950268814001137](https://doi.org/10.1017/S0950268814001137) PMID: [24838220](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24838220/)
25. Feng AYT, Himsforth C. The secret life of the city rats: a review of ecology of urban Norway and black rats (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*) *Urban ecosyst*. 2014; 17: 149–162. doi: [10.1007/s11252-013-0305-4](https://doi.org/10.1007/s11252-013-0305-4)
26. Davis DE, Emlen JT, Stokes A W. Studies on Home Range in the Brown Rat *Journal of Mammalogy*. 1948; 29: 207–225
27. Zuemer RL. Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. *Current Protocols in Microbiology*. 2005. doi: [10.1002/9780471729259.mc12e01s00](https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc12e01s00)
28. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*. 2013; 43: 1–9. doi: [10.1016/j.medmal.2012.11.005](https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005) PMID: [23337900](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23337900/)
29. La scola B, Bui LT, Baranton G, Khamis A, Raoult D. Partial *rpoB* gene sequencing for identification of *Leptospira* species. *FEMS Microbiol Lett*. 2006; 263: 142–147. PMID: [16978348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16978348/)
30. Djelouadji Z, Arnold C, Gharbia S, Raoult D, Drancourt M. Multispacer sequence typing for *Mycobacterium tuberculosis* genotyping. *PLoS One*. 2008; 3:e2433. doi: [10.1371/journal.pone.0002433](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002433) PMID: [18560597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18560597/)
31. Watson JT, Gayer M, Connolly MA. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13: 1–5 PMID: [17370508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17370508/)
32. Pereira C, Barata M, Trigo A, *Int J Environ Res Public Health*. 2014; 11: 4140–4157 doi: [10.3390/ijerph110404140](https://doi.org/10.3390/ijerph110404140) PMID: [24739767](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24739767/)
33. Athanazio DA, Silva EF, Santos CS, Rocha GM, Vannier-Santos MA, McBride AJ et al. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonisation by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Tropica* 2008; 105: 176–180. PMID: [18093568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18093568/)
34. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 2154–2160. doi: [10.1128/JCM.02452-10](https://doi.org/10.1128/JCM.02452-10) PMID: [21471336](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21471336/)

35. Gardner-Santana LC, Norris DE, Fornadel CM, Hinson ER, Klein SL, Glass GE. Commensal ecology, urban landscapes, and their influence on the genetic characteristics of city-dwelling Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Mol Ecol*. 2009; 18: 2766–2778. doi: [10.1111/j.1365-294X.2009.04232.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04232.x) PMID: [19457177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19457177/)
36. Kajdacsí B, Costa F, Hyseni C, Porter F, Brown J, Rodrigues G, et al. Urban population genetics of slum-dwelling rats (*Rattus norvegicus*) in Salvador, Brazil. *Mol Ecol*. 2013; 22: 5056–70. doi: [10.1111/mec.12455](https://doi.org/10.1111/mec.12455) PMID: [24118116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24118116/)

III. 3) Discussion

Un total de 84 rats a été piégé sur huit sites urbains et périurbains de la région lyonnaise, présentant des caractéristiques socio-économiques variables de l'habitat (Ayrat et al. 2014). Trente-sept de ces rats étaient porteurs de leptospires pathogènes : sur la base de la PCR en temps-réel de détection réalisée sur du tissu rénal (36/37) et sur la base de l'isolement des leptospires en culture (24/37). Un de ces rats présentait un résultat positif sur culture mais une PCR négative. Ceci montre que, la sensibilité des techniques de détection n'est pas de 100 %, ainsi il est préférable lors d'étude épidémiologique de combiner plusieurs types de méthodes afin d'identifier le plus d'individus porteurs.

Sur les 37 rats positifs, 35 ont pu être typés avec exactitude. Les deux autres présentaient des profils de typage incomplets, ne permettant pas une identification précise des leptospires présents. Ceci pourrait s'expliquer par une faible concentration en ADN de leptospires (>38 Ct). Les 35 échantillons typés ont été caractérisés en quatre profils de souches différentes appartenant toutes au séro-groupe Icterohaemorrhagiae et identiques aux profils des souches de références suivants : Copenhageni « M20/Wijnberg », Icterohaemorrhagiae « CHU Réunion », Copenhageni « Shibaura 9 » et Icterohaemorrhagiae « R1 ». Les profils obtenus à partir des extraits de reins étaient identiques aux profils obtenus à partir des cultures et des urines correspondantes.

Ainsi, cette étude démontre que la MST est un bon outil de typage pour des échantillons de terrain issus de rats, quelle que soit la nature du prélèvement. Par ailleurs, les profils identifiés correspondaient à des souches de références ayant été isolées respectivement, en Europe, à La Réunion, au Japon et aux Antilles. Nous pouvons donc nous demander si les souches identifiées dans la région lyonnaise sont entièrement identiques génétiquement aux souches de références ou s'agit-il de souches apparentées ? Dans un cas, comme dans l'autre, il serait intéressant d'investiguer l'origine géographique de toutes ces souches pour comprendre si la circulation des souches de leptospires présente une influence à plus grande échelle (par exemple le transport aérien de vecteurs).

- Une souche de *Leptospira* par colonie

Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois, grâce à un typage hautement résolusif des sérovars du séro groupe *Icterohaemorrhagiae*, le fait que les rats d'une même colonie étaient porteurs d'une unique souche de *Leptospira*. En effet, sur 5/8 sites, le profil Copenhagèni « M20/Wijinberg » a été retrouvé chez 3 individus répartis sur deux colonies non contiguës (distantes de plus d'un kilomètre) et chez 23 rats répartis sur 3 colonies distantes de 150 mètres. Les 3 autres profils ont été retrouvés chacun sur un site différent et non contigu aux autres. La différence de souches identifiées dans différentes colonies n'était pas liée statistiquement à la distance entre ces colonies. Ainsi, deux colonies distinctes et proches pouvaient maintenir des souches de *Leptospira* différentes ou bien identiques. Lors d'une seconde période de piégeage sur l'un de nos sites précédents, la même souche de leptospires (correspondante au même profil MST) a été identifiée. Ceci laisserait supposer que la souche semble se maintenir dans le temps au sein d'une colonie.

Le maintien d'une unique souche dans une colonie pourrait venir de plusieurs facteurs : d'une part, lié à la composition de la colonie elle-même et d'autre part, lié à l'interaction hôte-pathogène, induisant une immunité de masse.

Des études menées sur les populations urbaines de rongeurs rapportent qu'il y a peu de contacts entre les rats de colonies différentes (Gardner-Santana et al. 2009) et que le mouvement des rats d'une colonie serait limité par la fragmentation de l'habitat (Himsworth et al. 2013; Davis 1951). Ainsi, les rats porteurs de leptospires ont une faible probabilité de transmettre la souche qu'il porte à des congénères de colonies voisines lors de migrations ou de contacts en bordure du territoire de la colonie. Par exemple, lorsque les délimitations des territoires sont des barrières infranchissables pour les rats, comme des murs, les individus infectés ne peuvent contaminer que le territoire de leur propre colonie par leur urine.

De plus, une pression de sélection s'exerçant sur les souches de leptospires présentes pourrait s'opérer de deux manières. La première hypothèse se traduirait par un microenvironnement hautement contaminé par une seule souche au sein du territoire de la colonie. Les rats pouvant excréter environ 10^7 leptospires par millilitre d'urine (Sterling et Thiermann 1981), la présence d'eau stagnante concomitante à la présence de rats entraîne une augmentation significative de la concentration de

leptospires pathogènes dans l'environnement (Ganoza et al. 2006). Les leptospires sont également capables de survivre plusieurs mois dans l'eau grâce à leur capacité d'agrégation conduisant à la formation de biofilm (Trueba et al. 2004). Ainsi, les points d'eau sur le territoire de la colonie pourraient être rapidement saturés par la présence d'une seule souche de leptospires. La seconde hypothèse pourrait provenir des caractéristiques intrinsèques de l'infection leptospirosique chez ce rongeur. Tout d'abord, en développant des immunoglobulines lors d'une première immunisation vis-à-vis des leptospires, le rat verrait sa réponse immunitaire devenir plus efficace lors d'un second contact. La production d'anticorps contre une autre souche lors d'un contact suivant serait plus rapide et plus forte, ce qui pourrait conduire à la destruction des leptospires au niveau de la voie d'entrée. Ceci réduirait alors la probabilité d'une dissémination de la bactérie par voie sanguine jusqu'au rein. De plus, les leptospires ont une capacité de maintien sous la forme de biofilm dans les tubules rénaux (Ko et al. 2009), ce qui leur permet de se maintenir à long terme chez l'hôte (Ristow et al. 2008), ainsi la probabilité d'une colonisation par une autre souche diminuerait. Par ailleurs, un biofilm est une population bactérienne, concentrée à une interface, solide-liquide en général, et qui est constitué de polymères extracellulaires, la matrice (Hall-Stoodley et al. 2004). Les leptospires pathogènes, principalement *L. interrogans* et *L. kirschneri*, ont des gènes permettant la synthèse de polysaccharides similaires à ceux constituant la matrice des biofilms (Ristow et al. 2008). De plus, le développement du biofilm des leptospires est également analogue à celui observé chez les autres espèces bactériennes (Ristow et al. 2008). Dans certaines conditions parfois difficiles, les bactéries cherchent à former une communauté stable pour se maintenir, dans laquelle diverses interactions assurent un équilibre délicat. Dans le cas des leptospires, les conditions physiologiques dans les tubules rénaux sont très différentes de celles présentes dans le reste de l'organisme et conduit souvent les leptospires à adapter une partie de leur métabolisme (Monahan et al. 2008). L'hypothèse serait donc qu'une souche venant juste de pénétrer dans un tubule déjà colonisé, ne pourrait pas s'y établir, car elle devrait d'une part, s'adapter aux nouvelles conditions du tubule et d'autre part, adhérer à sa surface malgré la présence d'un biofilm.

- Les prévalences de portage rénal et leurs facteurs d'influence

Au cours de cette étude, nous avons pu observer que les prévalences de portage entre les différents sites de l'agglomération lyonnaise étaient fortement variables, de 7 % à 70 %, ce qui est semblable à ce qui a pu être observé dans d'autres régions du monde (Himsworth et al. 2013; Krojgaard et al. 2009; Koizumi et al. 2009). Les deux sites présentant la plus forte prévalence étaient « Mermoz » et « Parc », avec respectivement 65 % et 62 %. Les souches typées correspondent aux profils Copenhagien « M20/Wijnberg » à Mermoz et Icterohaemorrhagiae « CHU Réunion » au Parc. La prévalence des leptospires dans un site ne semble donc pas être influencée par la nature du sérovar présent.

Concernant les caractéristiques des populations de rats porteurs, telles que le sexe et les conditions générales de l'animal, ces derniers n'auraient pas d'effet significatif (Tableau en annexe). Le facteur de l'âge ne pouvait pas être comparé dans cette étude, car seul des adultes ont été piégés au Parc. Par ailleurs, certaines études ont montré que les facteurs de risque liés aux individus variaient en fonction des localités. Dans la majorité des cas, les rats mâles adultes dominants sont plus à risque (Himsworth et al. 2013), mais cela n'a pas été le cas au cours de notre étude. En région lyonnaise, la prévalence du portage rénale chez les rats définissant un site serait donc indépendante du sexe, de l'âge et des conditions physiques. Les variations observées entre les sites ne semblent pas provenir des caractéristiques des colonies. Cependant, le nombre de rat par site étant faible, à l'exception de Mermoz, nous ne pouvons qu'établir des hypothèses sur ces facteurs.

Concernant les facteurs environnementaux et socio-économiques, Mermoz est un site à forte densité humaine avec de faible revenu et est localisé dans un immeuble (Ayrat et al. 2014). Quant au Parc, il s'agit d'un site de piégeage situé dans la déchetterie d'un parc citadin, donc à faible densité humaine mais avec des revenus moyens à élevés (Ayrat et al. 2014). De précédentes études réalisées dans un environnement urbain ont montré que ce dernier avait une forte influence sur les rats et la composition de la colonie (Himsworth et al. 2013). Cet environnement se définit autour de trois points clés : la présence de nourriture et de cachette, la présence de facteurs extérieurs entraînant la mort des rats (comme un pathogène ou un prédateur) et le niveau de compétition entre les individus (Davis 1951). Dans notre

cas, les deux sites offraient un accès à la nourriture (des ordures) et à des recoins pour se cacher, sans présence de prédation. Ces conditions pourraient expliquer un nombre d'individus plus important dans ces deux colonies, ce qui a conduit à un nombre d'individus piégés plus important que sur les autres sites. Par ailleurs, les facteurs environnementaux influençant la présence de leptospires sont plus difficiles à établir et semblent provenir de facteurs à plus petite échelle (Himsworth et al. 2013). L'identification des sources de contamination des rats est plus difficile à trouver sur le terrain. Dans notre étude, les deux sites semblent avoir un taux d'humidité variable. Le Parc est à ciel ouvert avec une influence de la pluviométrie sur la formation de point d'eau pouvant devenir une source de contamination. Mermoz étant un complexe de cave d'immeuble, semble être plus sec, mais les rats peuvent avoir accès aux égouts et auraient pu y résider une partie du temps. Sur ce second site, les facteurs environnementaux pouvant influencer la présence de leptospires semblent donc être moins dépendants des éléments climatiques que dans le Parc. Toutefois, les prévalences étaient pourtant similaires entre les deux sites, ce qui suppose que la présence d'un environnement humide ne semble pas influencer le taux de prévalence du site. Nous n'avons, de ce fait, pas pu établir avec certitude les facteurs environnementaux ayant influencé les prévalences dans notre région.

III. 4) Conclusion

La MST est un nouvel outil de typage, dont l'application a été éprouvée lors d'une étude de terrain réalisée sur des rats en milieu urbain. Elle nous a permis d'identifier les souches de leptospires circulantes et d'obtenir une discrimination des sérovars du séro groupe *Icterohaemorrhagiae*, jusqu'à l'isolat.

Par ailleurs, au cours de cette étude, il a été démontré que les rats d'une même colonie n'étaient porteurs que d'une seule et même souche de *Leptospira*, appartenant exclusivement aux sérovars *Copenhageni* et *Icterohaemorrhagiae* du séro groupe *Icterohaemorrhagiae*. Enfin, les taux de prévalences présentaient de fortes variations en fonction des sites (de 7 % à 70 %). Dans cette étude, ces variations semblent être indépendantes du sexe, de l'âge et des conditions physiques des individus présents au niveau des sites, tout comme de la présence d'un environnement humide à proximité de la zone de piégeage.

Conclusion du chapitre 2

Au cours de cette partie du travail, nous avons étudié l'infection naturelle à travers l'interaction entre les leptospires et les rats dans l'environnement « naturel » des colonies.

L'infection chez les rats sauvages présentait dans l'ensemble des caractéristiques similaires à celles que nous avons obtenues lors de notre modèle expérimental, à une exception près. Nous avons découvert pour la première fois, la présence de leptospires au niveau de la lumière bronchique chez des rats porteurs rénaux. Les leptospires ont été localisés à la surface de l'épithélium bronchique en petit agrégat compact. Cette observation nous montre qu'il est important d'étudier l'infection chez tous les organes susceptibles de permettre une excrétion de la bactérie ou d'interagir avec le système immunitaire lors d'études portant sur l'interaction entre l'hôte et son pathogène. En ciblant les études uniquement sur le tissu rénal, nous sommes amenés à négliger les facteurs intrinsèques ou extrinsèques à l'animal qui peuvent avoir une influence sur cette interaction.

Grâce à la mise au point d'un nouvel outil de typage, la MST, nous avons pu caractériser avec précision des souches circulant au sein des populations de ces rongeurs de la région lyonnaise. Ainsi, tous les rats détectés positifs étaient porteurs d'un sérovar appartenant au séro groupe Icterohaemorrhagiae. Il s'agissait, selon les colonies, d'un isolat appartenant soit au sérovar Copenhageni, soit au sérovar Icterohaemorrhagiae. Cette étude nous a également permis de mettre en évidence que tous les rats d'une même colonie étaient infectés par une seule souche de *Leptospira*, souvent différente des souches isolées dans d'autres colonies de la région. Les taux de prévalence présentaient de fortes variations en fonction des sites étudiés. Ces variations semblent être indépendantes du sexe, de l'âge et de la condition physique des individus étudiés, elles semblent également ne pas être associées à la présence d'un environnement humide à proximité de la colonie.

Il est en outre important de travailler sur les différents niveaux de complexité de l'écosystème pouvant influencer cette relation leptospires-rat afin de comprendre les mécanismes dans leur ensemble et de pouvoir les modéliser pour une meilleure gestion du risque pour la santé publique.

DISCUSSION

La leptospirose est une zoonose ré-émergente à distribution mondiale (Picardeau 2013; Bharti et al. 2003). Cette recrudescence du nombre de cas humains proviendrait de plusieurs facteurs (Pappas et al. 2008) : les conditions socio-économiques et climatiques qui permettent, d'une part, une augmentation de contact avec les hôtes réservoirs des leptospires et, d'autre part, augmentent les risques de transmission de la bactérie par un environnement favorable. Par ailleurs, il a été démontré que l'augmentation du nombre de cas était également liée à des activités en région tropicale contaminée, comme des expéditions militaires ou des compétitions sportives. Le rat étant le réservoir principal des leptospires pouvant affecter l'homme, il est une des cibles des mesures sanitaires élaborées par le WHO (World Health Organization) et le LERG (Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group) pour lutter contre les épidémies de leptospirose humaine, grâce à des mesures de contrôle des populations de ce rongeur et la mise en place de mesures de protection chez l'homme (Hartskeerl et al. 2011; WHO 2003). Cependant, la dynamique de l'infection chez ce rongeur ainsi que les voies d'entrée de la bactérie chez le rat sont encore inconnues.

Nous avons suggéré en introduction, que pour lutter plus efficacement contre la leptospirose humaine et animale, il serait utile d'étudier en détail l'infection leptospirosique chez le rat, et son interaction avec son environnement naturel urbanisé, afin de modéliser les modes de transmission entre rats ainsi qu'à l'homme et aux animaux domestiques pour analyser, *in fine*, les conditions d'apparitions d'épidémies et tester les scénarios de prévention ou de contrôle. Dans cet objectif, nos résultats sont résumés et discutés ci-dessous.

I) La leptospirose chez le rat

Dans les publications récentes que nous avons confrontées (cf. chapitre I), les études expérimentales et épidémiologiques de l'infection chez le rat se sont restreintes aux modalités de la colonisation rénale et de l'excrétion urinaire. En prenant en compte, chez le rat, d'autres voies de contamination, nous avons mis en évidence une meilleure efficacité de la voie d'entrée conjonctivale pour aboutir au portage rénal par rapport à celle de la voie sous-cutanée ; ces deux voies nous semblent mieux mimer les modes d'entrée naturelle de la bactérie en comparaison de la voie intrapéritonéale, habituellement utilisée (Bonilla-Santiago et Nally 2011). Ceci suggère qu'un environnement contaminé permettrait un meilleur maintien de la bactérie dans la colonie que les interactions entre congénères, notamment les morsures, ce qui va à l'encontre de certaines hypothèses que nous avons envisagées. Finalement, il semblerait que la transmission par contact direct permettrait seulement un maintien des leptospires dans la colonie à un faible niveau, et que la voie d'entrée la plus efficace pour infecter le rat, serait une voie de contamination indirecte par une source d'eau contaminée. Nous avons pu également observer au cours de ce travail, l'importance de la phase bactériémique. Sans cette phase, la bactérie n'arriverait pas jusqu'aux reins, or la voie d'entrée définit le taux de réussite du passage de la bactérie jusqu'à la voie sanguine, probablement en fonction de ses caractéristiques intrinsèques. D'autre part, nous avons pu observer, grâce à la méthode MAT, que la réponse sérologique se développait avec une intensité similaire quelle que soit la voie d'administration utilisée, et de manière indépendante au taux de colonisation rénale, observée par l'isolement et la qPCR. Ainsi, le portage rénal chez le rat apparaît dépendant de la voie d'entrée des leptospires, mais pas de la réponse immunitaire. Selon nos résultats, l'excrétion des leptospires ne semble se produire que par la voie urinaire, les résultats pour les autres voies explorées (salive, fèces, lavage broncho-alvéolaire) ayant été négatifs. Toutefois, nos investigations sur l'infection en conditions naturelles nous ont permis de mettre en évidence la présence de leptospires au niveau de l'épithélium bronchique du poumon de manière concomitante au portage rénal. Ces observations résultant d'infections par des voies

« naturelles » d'entrée suggèrent que l'environnement du rat peut avoir un impact sur l'infection et sa dynamique. En particulier, la présence pulmonaire de leptospires soulève plusieurs questions sur les causes de cette localisation soit par une évolution « naturelle » du tropisme des souches de *Leptospira* pour les cellules pulmonaires (comme observée dans la forme aiguë ces dernières années), soit par une augmentation de la sensibilité de ces cellules pulmonaires due à la présence concomitante d'autres agents pathogènes ou chimiques dans l'environnement direct du rat. Il est donc important pour l'étude de l'infection chez le rat, de considérer l'ensemble des organes cibles de l'infection, des voies d'entrée des leptospires et des modes d'excrétion dans l'environnement, à l'aide d'études expérimentales et de terrain.

II) La dimension écologique de l'infection

Lors de l'étude de l'infection, l'environnement dans lequel vit une colonie de rats, est aussi important à étudier que l'individu. Cependant, les interactions entre les rats au sein des colonies et avec leur environnement sont difficiles à étudier. Elles nécessitent des études de longue durée et impliquant de nombreux rongeurs pour être statistiquement exploitables. Ces interactions peuvent influencer la prévalence de portage des leptospires. C'est pourquoi l'environnement des colonies, leur structure et/ou la génétique des individus sont souvent étudiés en association avec les études épidémiologiques de prévalence du portage rénal d'une région (Gardner-Santana et al. 2009; Himsforth et al. 2013). Elles permettent ainsi de mieux comprendre les mouvements des rats entre les colonies ou dans le territoire même de la colonie, ce qui peut aider à établir les schémas de contamination des individus. Dans notre cas, nous avons choisi de caractériser la nature des souches circulantes, pour expliquer ces interactions. Ainsi, en région lyonnaise, la prévalence dans les colonies étudiées ne semble pas être influencée par un type d'environnement urbain ou semi-urbain, par le sexe ou l'âge de l'animal. Cependant, grâce au nouvel outil de typage hautement résolutif, la MST, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois, qu'une colonie de rats ne maintenait qu'une seule souche de

Leptospira. Ceci nous a permis d'établir une carte des souches circulantes en région lyonnaise, appartenant toutes au séro groupe Icterohaemorrhagiae. Or, en France métropolitaine, seul un tiers des cas sont dus à des souches appartenant à ce séro groupe, suivi en fréquence par les sérogroupe Grippotyphosa, Australis, Canicola et Sejroe (Picardeau 2013). Le rat étant principalement porteur du séro groupe Icterohaemorrhagiae, nous sommes amenés à nous interroger sur les autres espèces animales réservoirs à l'origine des cas provenant des autres sérogroupe. Malgré la vaccination des personnes à risque, le séro groupe Icterohaemorrhagiae reste donc le séro groupe le plus fréquemment incriminé dans les cas de leptospirose humaine, à travers le monde. Il est donc nécessaire de continuer à étudier sa répartition avec les outils les plus fins possible, afin d'anticiper de potentielles épidémies dues à la transmission des leptospires du rat à l'homme. Malgré une configuration actuelle ne lui permettant d'amplifier que les souches de l'espèce *L. interrogans*, la MST pourrait devenir un nouvel outil dans la surveillance épidémiologique des leptospires dans les différentes régions du monde.

PERSPECTIVES

Ce travail a permis de mettre en évidence que l'étude seule de la colonisation rénale par les leptospires, biaisait les connaissances sur les caractéristiques de l'infection chez le rat. Ainsi, la vitesse de dissémination et le taux de colonisation sont dépendants de la voie d'inoculation utilisée, mais pas de la réponse sérologique. Plusieurs perspectives sont donc à envisager lors d'études expérimentales pour affiner ces observations. De plus, au cours des études réalisées sur le terrain, nous avons pu mettre en évidence le maintien d'une souche de leptospire par colonie, couplée à la découverte d'une nouvelle localisation tissulaire des leptospires par l'investigation de plusieurs organes cibles, en plus du rein. L'étude des caractéristiques de l'infection naturelle doit donc compléter les études expérimentales.

I) Le modèle expérimental

Le modèle expérimental développé lors de ce travail est une alternative au modèle d'infection chez le rat, utilisé en expérimentation dans le monde et qui est fondé sur la voie d'inoculation intrapéritonéale (Bonilla-Santiago et Nally 2011). Nous avons initié l'étude de voies d'inoculation (conjonctivale et sous-cutanée), mais d'autres voies restent à explorer, comme celles étudiées lors des modèles d'infection aiguë : la peau abrasée (Zhang et al. 2012) ou l'injection intradermique (Coutinho et al. 2014). Nous avons choisi d'étudier les voies conjonctivales et sous-cutanées car elles permettaient de répondre à deux hypothèses de transmission : par morsure ou par un point d'eau contaminé dont l'importance épidémiologique reste à préciser, tout comme celles des autres voies.

De plus, nous avons choisi d'utiliser une souche de *Leptospira* de référence, isolé d'un cas clinique humain et appartenant au séro groupe Icterohaemorrhagiae. Plusieurs alternatives d'inoculum, d'autres sérogroupes, d'autres origines d'isolat (comme isolé d'un animal) ou même des mélanges de souches appartenant à différents sérogroupes, permettraient de mesurer le degré de spécificité de la relation hôte-sérovar, fréquemment cité dans la littérature (Bharti et al. 2003; Adler et de la Pena Moctezuma 2010) et caractérisé, par exemple, l'affinité des souches du séro groupe Icterohaemorrhagiae pour le rat.

Quant aux voies d'excrétion, la voie urinaire est la voie d'excrétion principale des leptospires. Cependant, nos travaux suggèrent une variation de l'excrétion urinaire en fonction des voies d'entrée. Des leptospires étaient excrétés dès la fin de la première semaine d'infection par voie intrapéritonéale, contrairement aux voies conjonctivale et sous-cutanée, pour lesquelles l'excrétion urinaire débutait à la fin du premier mois d'infection. Notre étude n'ayant duré que 30 jours, il serait donc intéressant de réaliser une étude sur l'excrétion urinaire s'étendant sur une durée de plusieurs mois.

II) L'infection naturelle

Notre étude des caractéristiques de l'infection chez le rat par le modèle expérimental a été complétée par des investigations sur le terrain, faites sur plusieurs sites de la région lyonnaise. Au cours de celles-ci, nous avons complété nos observations expérimentales par la caractérisation de l'infection naturelle en explorant plusieurs organes cibles. Nous avons alors mis en évidence pour la première fois, la présence de leptospires dans la lumière bronchique chez des rats porteurs rénaux. La découverte de ces leptospires au niveau pulmonaire nécessitera un complément d'investigation sur le site « Parc », où les rats ont été piégés. Tout d'abord, une étude sur un plus grand nombre d'individus est nécessaire pour établir des hypothèses sur les causes qui ont conduit à cette forme, avec des analyses ciblant, dans un premier temps, la présence des leptospires au niveau pulmonaire et d'autres pathogènes (comme les hantavirus ou les pasteurelles) avec des cultures

bactériologiques, des PCR et des RT-PCR, et dans un deuxième temps, ciblant la possibilité d'une excrétion par voie aérienne grâce à un lavage broncho-alvéolaire. Ensuite, une étude sur plusieurs sites de la région lyonnaise et d'autres régions permettrait de savoir si cette nouvelle localisation résulte du site lui-même (étant une déchetterie d'un parc, la présence de déchets végétaux en décomposition produisant des gaz irritants pour les voies respiratoires est à prévoir) ou s'il s'agit d'une évolution générale du tropisme cellulaire des leptospires conduisant à cette forme de leptospirose chez le rat.

Il faut souligner que toutes les souches de leptospires que nous avons identifiées avec la MST dans les colonies de rat, appartenaient exclusivement au sérotype Icterohaemorrhagiae (Tableau des sérovars en annexe). Or, en France métropolitaine, seul un tiers des cas de leptospirose humaine sont dus à ce sérotype (Picardeau 2013). Par conséquent, nous sommes amenés à nous interroger sur les espèces animales françaises réservoirs à l'origine des cas humains causés par les autres sérotypes.

III) Les autres espèces animales réservoirs des leptospires en France (Etude ELIZ, en Annexe)

Depuis plusieurs années, une émergence des cas de leptospirose humaine et animale causée par les sérotypes Australis, Grippotyphosa et Sejroe a été relevée en France (Ayrat et al. 2014; Picardeau 2013). Les rats étant reconnus comme le principal porteur du sérotype Icterohaemorrhagiae, les autres sérotypes devraient donc être maintenus dans la nature par d'autres espèces animales, probablement de la faune sauvage, ce que nous avons exploré au travers d'une étude menée par l'Entente de Lutte Interdépartementale contre les Zoonoses (ELIZ), dont les protocoles et les résultats sont repris en annexe.

Au cours de l'étude ELIZ, plusieurs espèces animales de la faune sauvage (hors rongeurs de la famille des Muridae) ont été ciblées pour déterminer celles pouvant être porteuses de leptospires, grâce à une détection moléculaire de l'ADN de

Leptospira dans les reins associée à un typage moléculaire. Vingt-huit espèces animales ont été étudiées, appartenant à différents ordres des mammifères : les ongulés, les mustélidés, les lagomorphes et les carnivores, auxquels s'ajoutent les hérissons (*Erinaceus europaeus*, insectivore) et quelques espèces de rongeurs peu étudiés, comme l'écureuil (*Sciurus vulgaris*), le loir (*Glis glis*) ou la marmotte (*Marmota marmota*).

Nous avons pu mettre en évidence le fait que la faune échantillonnée était porteuse de 10 sérogroupes différents répartis en seulement trois espèces pathogènes de *Leptospira*, avec une prédominance de *L. interrogans*, suivi de *L. kirschneri* et *L. borgpetersenii*. Le séroroupe le plus fréquemment rencontré (29 % des échantillons) était le séroroupe Australis, qui a été détecté chez des renards (*Vulpes vulpes*), un chevreuil (*Capreolus capreolus*) et principalement des hérissons. Le séroroupe Icterohaemorrhagiae (7 % des échantillons) a été retrouvé chez le sanglier (*Sus scrofa*), le blaireau (*Meles meles*), le renard et le raton-laveur (*Procyon lotor*). Les sérogroupes Grippotyphosa et Sejroe ont été peu détectés, seulement chez un putois (*Mustela putorius putorius*), un blaireau et une belette (*Mustela nivalis*) pour le premier et chez un blaireau pour le second. Plusieurs nouveaux profils moléculaires ont pu être déterminés appartenant potentiellement à de nouvelles souches. Nous pouvons constater qu'à la différence de notre étude épidémiologique chez le rat, les espèces animales de la faune sauvage peuvent être porteuses de différents sérogroupes de leptospires, avec une forte proportion du séroroupe Australis. La recrudescence de ce séroroupe pourrait donc provenir de réservoir issu de la faune sauvage qui contamine l'environnement et augmente la probabilité de contact de l'homme et des animaux domestiques avec les leptospires de ce séroroupe.

Ces observations nécessitent d'être approfondies par des analyses sérologiques, bactériologiques et histologiques, lors d'échantillonnage planifié plus représentatif. Un isolement des souches typées chez ces animaux sauvages et des essais expérimentaux permettraient de vérifier si elles sont spécifiques de ces espèces animales et si le rat aurait la capacité de pouvoir les maintenir et de les excréter.

CONCLUSION

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes efforcés de décrire et paramétrer l'infection leptospirosique chez le rat. Notre objectif était de disposer de données précises pour permettre d'analyser le risque de cette infection pour la santé publique et celle des animaux domestiques. Malgré les nombreuses études épidémiologiques et expérimentales des vingt dernières années (cf. introduction), les connaissances sur la leptospirose chez le rat restent encore insuffisantes pour bien comprendre et surtout prédire la transmission des leptospires entre rats et entre le rat et les hôtes accidentels.

Nos études ont permis d'établir la dépendance de la colonisation rénale vis-à-vis de la voie d'entrée des leptospires chez le rat, et une nouvelle localisation de cette bactérie dans le poumon. Ceci nous permet de comprendre un peu mieux les interactions entre les rats et les leptospires qui peuvent ensuite contaminer l'environnement ou, dans une moindre mesure, directement les congénères. Toutefois, d'autres études seront nécessaires pour étudier la variabilité des processus en réponse aux contraintes environnementales, et mieux comprendre toutes les composantes de cette dynamique, aussi bien au niveau de l'individu que de son environnement.

À l'échelle de l'individu, des études tissulaires et cellulaires portant sur les voies d'entrée naturelles, la dynamique de l'infection et la durée de l'excrétion de différentes souches de leptospires, homologues (souches murines) ou hétérologues (souches canines, bovines voire d'espèces sauvages comme le hérisson) seront à mener pour comprendre la persistance, la propagation de la leptospirose chez le rat, et son impact sur les espèces hôtes accidentelles. À l'échelle de la colonie, les investigations sur l'organisation sociale des colonies, leur environnement physique et biologique, et les déplacements des individus permettront de mieux comprendre la dynamique de transmission au sein d'une population de rats, grâce à notre nouvel outil de typage.

Tous ces éléments combinés permettront de modéliser la dynamique et la transmission de l'infection au sein des colonies de rats et la contamination de leur environnement afin d'aider à anticiper l'apparition d'épidémies de leptospirose humaine ou animale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adler, B., et A. de la Pena Moctezuma. 2010. « Leptospira and leptospirosis. » *Veterinary Microbiology* 140: 287-96.
- Adler, B., M. Lo, T. Seemann, et G. L. Murray. 2011. « Pathogenesis of Leptospirosis: The Influence of Genomics. » *Veterinary Microbiology* 153 (1-2): 73-81. doi:10.1016/j.vetmic.2011.02.055.
- Agudelo-Florez, P., A. F. Londono, V. H. Quiroz, J. C. Angel, N. Moreno, E. T. Loaiza et al. 2009. « Prevalence of Leptospira spp. in urban rodents from a groceries trade center of Medellin, Colombia. » *Am J Trop Med Hyg* 81: 906-10.
- Agudelo-Florez, P., V. E. Murillo, A. F. Londono, et J. D. Rodas. 2013. « Histopathological kidney alterations in rats naturally infected with Leptospira. » *Biomedica* 33 Suppl 1: 82-88.
- Ahmed, A., J. Thaipadungpanit, S. Boonsilp, V. Wuthiekanun, K. Nalam, B. G. Spratt et al. 2011. « Comparison of Two Multilocus Sequence Based Genotyping Schemes for Leptospira Species. » *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (11): e1374. doi:10.1371/journal.pntd.0001374.
- Ahmed, N., S. M. Devi, L. Valverde Mde, P. Vijayachari, R. S. Machang'u, W. A. Ellis et al. 2006. « Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic Leptospira species. » *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5: 28.
- Akerstedt, J., A. Lillehaug, I.-L. Larsen, N. E. Eide, J. M. Arnemo, et K. Handeland. 2010. « Serosurvey for Canine Distemper Virus, Canine Adenovirus, Leptospira Interrogans, and Toxoplasma Gondii in Free-Ranging Canids in Scandinavia and Svalbard. » *Journal of Wildlife Diseases* 46 (2): 474-80. doi:10.7589/0090-3558-46.2.474.
- Athanazio, D. A., E. F. Silva, C. S. Santos, G. M. Rocha, M. A. Vannier-Santos, A. J. McBride et al. 2008. « Rattus norvegicus as a model for persistent renal colonization by pathogenic Leptospira interrogans. » *Acta Tropica* 105: 176-80.
- Aviat, F., B. Blanchard, V. Michel, B. Blanchet, C. Branger, J. Hars et al. 2009. « Leptospira exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. » *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32: 463-76.
- Ayral, F., J. Artois, A. L. Zilber, F. Widen, K. C. Pounder, D. Aubert et al. 2014. « The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats: a survey in Rhone, France (2010-2012). » *Epidemiol Infect* 16: 1-14.
- Ayral, F. C., D. J. Bicoût, H. Pereira, M. Artois, et A. Kodjo. 2014. « Distribution of Leptospira Serogroups in Cattle Herds and Dogs in France. » *Am J Trop Med Hyg* 91 (4): 756-59. doi:10.4269/ajtmh.13-0416.

- Babudieri, B. 1958. « Animal Reservoirs of Leptospire. » *Annals of the New York Academy of Sciences* 70 (3): 393-413.
- Baranton, G., et D. Postic. 2006. « Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. » *Int J Infect Dis* 10: 162-70.
- Barmettler, R., A. Schweighauser, S. Bigler, A. M. Grooters, et T. Francey. 2011. « Assessment of Exposure to *Leptospira* Serovars in Veterinary Staff and Dog Owners in Contact with Infected Dogs. » *Journal of the American Veterinary Medical Association* 238 (2): 183-88. doi:10.2460/javma.238.2.183.
- Bern, M., et D. Goldberg. 2005. « Automatic Selection of Representative Proteins for Bacterial Phylogeny. » *BMC Evolutionary Biology* 5: 34. doi:10.1186/1471-2148-5-34.
- Bharti, A. R., J. E. Nally, J. N. Ricaldi, M. A. Matthias, M. M. Diaz, M. A. Lovett et al. 2003. « Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. » *Lancet Infect Dis* 3: 757-71.
- Bonilla-Santiago, R., et J. E. Nally. 2011. « Rat Model of Chronic Leptospirosis. » *Current Protocols in Microbiology* Chapter 12: Unit 12E.3. doi:10.1002/9780471729259.mc12e03s20.
- Boqvist, S., L. Eliasson-Selling, K. Bergström, et U. Magnusson. 2012. « The association between rainfall and seropositivity to *Leptospira* in outdoor reared pigs. » *The Veterinary Journal* 193 (1): 135-39. doi:10.1016/j.tvjl.2011.11.013.
- Bourhy, P., L. Collet, S. Brisse, et M. Picardeau. 2014. « *Leptospira* Mayottensis Sp. Nov., a Pathogenic Species of the Genus *Leptospira* Isolated from Humans. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (Pt 12): 4061-67. doi:10.1099/ijs.0.066597-0.
- Bourhy, P., S. Bremont, F. Zinini, C. Giry, et M. Picardeau. 2011. « Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. » *Journal of Clinical Microbiology* 49: 2154-60.
- Bourhy, P., C. Herrmann Storck, R. Theodose, C. Olive, M. Nicolas, P. Hochedez et al. 2013. « Serovar diversity of pathogenic leptospira circulating in the French west indies. » *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 : e2114.
- Bridier, E., F. Aure, F. Mottier, A. Nivet, G. Laï-Man, et N. Boyer. 2006. « Les rongeurs à la réunion, source de nombreux fléaux. » *Phytoma-La Défense des végétaux*, n° 595: 9-12.
- Caimi, K., V. Varni, Y. Melendez, A. Koval, B. Brihuega, et P. Ruybal. 2012. « A Combined Approach of VNTR and MLST Analysis: Improving Molecular Typing of Argentinean Isolates of *Leptospira* Interrogans. » *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 107 (5): 644-51.
- Campagnolo, E. R., M. C. Warwick, H. L. Marx, R. P. Cowart, H. D. Donnell, M. D. Bajani et al. 2000. « Analysis of the 1998 Outbreak of Leptospirosis in Missouri in Humans Exposed to Infected Swine. » *Journal of the American Veterinary Medical Association* 216 (5): 676-82.

- CDC, et U.S. Department of Housing and Urban Development. 2006. « Healthy housing reference manual. » Atlanta: US Department of Health and Human Services.
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. 2006. « Paramètres d'exposition chez les mammifères – Rat surmulot. » Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec.
- Cerqueira, G. M., et M. Picardeau. 2009. « A century of *Leptospira* strain typing. » *Infect Genet Evol* 9: 760-68.
- Chagas-Junior, A. D., C. L. R. da Silva, L. M. Soares, C. S. Santos, C. D. C. M. Silva, D. A. Athanazio et al. 2012. « Detection and Quantification of *Leptospira Interrogans* in Hamster and Rat Kidney Samples: Immunofluorescent Imprints versus Real-Time PCR. » *PloS One* 7 (2): e32712. doi:10.1371/journal.pone.0032712.
- Chagas-Junior, A. D., A. J. A. McBride, D. A. Athanazio, C. P. Figueira, M. A. Medeiros, M. G. Reis et al. 2009. « An Imprint Method for Detecting *Leptospira* in the Hamster Model of Vaccine-Mediated Immunity for Leptospirosis. » *Journal of Medical Microbiology* 58 (Pt 12): 1632-37. doi:10.1099/jmm.0.014050-0.
- Cheville, N. F., R. Huhn, et R. C. Cutlip. 1980. « Ultrastructure of Renal Lesions in Pigs with Acute Leptospirosis Caused by *Leptospira Pomona*. » *Veterinary Pathology* 17 (3): 338-51.
- Collares-Pereira, M., H. Korver, B. V. Cao Thi, M. Santos-Reis, E. Bellenger, G. Baranton et al. 2000. « Analysis of *Leptospira* isolates from mainland Portugal and the Azores islands. » *FEMS Microbiol Lett* 185: 181-87.
- Cortese, V. S., G. F. Gallo, D. L. Cleary, J. E. Galvin, et R. D. Leyh. 2014. « Efficacy of a flexible schedule for administration of a *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo bacterin to beef calves. » *American Journal of Veterinary Research* 75 (5): 507-12. doi:10.2460/ajvr.75.5.507.
- Costa, F., F. H. Porter, G. Rodrigues, H. Farias, M. Tucunduva de Faria, E. A. Wunder et al. 2014. « Infections by *Leptospira Interrogans*, Seoul Virus, and *Bartonella* Spp. among Norway Rats (*Rattus Norvegicus*) from the Urban Slum Environment in Brazil. » *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 14 (1): 33-40. doi:10.1089/vbz.2013.1378.
- Costa, F., G. S. Ribeiro, R. D. M. Felzemburgh, N. Santos, R. Barbosa Reis, A. C. Santos et al. 2014. « Influence of Household Rat Infestation on *Leptospira* Transmission in the Urban Slum Environment. » *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (12): e3338. doi:10.1371/journal.pntd.0003338.
- Coutinho, M. L., J. Matsunaga, L.-C. Wang, A. de la Peña Moctezuma, M. S. Lewis, J. T. Babbitt et al. 2014. « Kinetics of *Leptospira Interrogans* Infection in Hamsters after Intradermal and Subcutaneous Challenge. » *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (11): e3307. doi:10.1371/journal.pntd.0003307.
- da Silva, E. F., S. R. Felix, G. M. Cerqueira, M. Q. Fagundes, A. C. Neto, A. A. Grassmann et al. 2010. « Preliminary characterization of *Mus musculus*-

- derived pathogenic strains of *Leptospira borgpetersenii* serogroup Ballum in a hamster model. » *Am J Trop Med Hyg* 83: 336-37.
- Davis, D. E. 1948. « The Survival of Wild Brown Rats on a Maryland Farm. » *Ecology* 29 (4): 437-48. doi:10.2307/1932636.
- Davis, D. E. 1951. « The Characteristics of Global Rat Populations. » *American Journal of Public Health and the Nation's Health* 41 (2): 158-63.
- Davis, D. E. 1953. « The Characteristics of Rat Populations. » *The Quarterly Review of Biology* 28 (4): 373-401.
- De Brito, T., L. F. Menezes, D. M. C. Lima, S. Lourenço, A. M. G. Silva, et V. a. F. Alves. 2006. « Immunohistochemical and in Situ Hybridization Studies of the Liver and Kidney in Human Leptospirosis. » *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* 448 (5): 576-83. doi:10.1007/s00428-006-0163-z.
- de Faria, M. T., M. S. Calderwood, D. A. Athanzio, A. J. McBride, R. A. Hartskeerl, M. M. Pereira et al. 2008. « Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. » *Acta Tropica* 108: 1-5.
- Desai, A., V. S. Marwah, A. Yadav, V. Jha, K. Dhaygude, U. Bangar et al. 2013. « Identification of Optimum Sequencing Depth Especially for de Novo Genome Assembly of Small Genomes Using next Generation Sequencing Data ». *PLoS One* 8 (4): e60204. doi:10.1371/journal.pone.0060204.
- Desvars, A., A. Michault, et F. Chiroleu. 2013. « Influence of Risk Factors on Renal Leptospiral Load in Naturally Infected Wild Black Rats. » *Acta Tropica* 125 (3): 258-61. doi:10.1016/j.actatropica.2012.11.011.
- Dolhnikoff, M., T. Mauad, E. P. Bethlem, et C. R. Carvalho. 2007. « Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. » *Braz J Infect Dis* 11: 142-48.
- Dreyfus, A., P. Wilson, J. Collins-Emerson, J. Benschop, S. Moore, et C. Heuer. 2015. « Risk Factors for New Infection with *Leptospira* in Meat Workers in New Zealand. » *Occupational and Environmental Medicine* 72 (3): 219-25. doi:10.1136/oemed-2014-102457.
- Dupinay, T., K. C. Pounder, F. Ayrat, M.-H. Laaberki, D. A. Marston, S. Lacôte et al. 2014. « Detection and Genetic Characterization of Seoul Virus from Commensal Brown Rats in France. » *Virology Journal* 11: 32. doi:10.1186/1743-422X-11-32.
- Dupouey, J., B. Faucher, S. Edouard, H. Richet, C.-A. de Broucker, J.-L. Marié et al. 2014. « Epidemiological Investigation of a Human Leptospirosis Case Reported in a Suburban Area near Marseille. » *New Microbes and New Infections* 2 (3): 82-83. doi:10.1002/nmi2.45.
- Dupouey, J., B. Faucher, S. Edouard, H. Richet, A. Kodjo, M. Drancourt et al. 2014. « Human Leptospirosis: An Emerging Risk in Europe? » *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 37 (2): 77-83. doi:10.1016/j.cimid.2013.12.002.

- Easterbrook, J. D., T. Shields, S. L. Klein, et G. E. Glass. 2005. « Norway Rat Population in Baltimore, Maryland, 2004. » *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* 5 (3): 296-99. doi:10.1089/vbz.2005.5.296.
- Ellis, W. A. 2010. « Control of canine leptospirosis in Europe: time for a change? » *The Veterinary Record* 167: 602-5.
- Ellis, W. A., J. J. O'Brien, D. G. Bryson, et D. P. Mackie. 1985. « Bovine Leptospirosis: Some Clinical Features of Serovar Hardjo Infection. » *The Veterinary Record* 117 (5): 101-4.
- Ellis, W. A., J. J. O'Brien, J. A. Cassells, et J. Montgomery. 1983. « Leptospiral Infection in Horses in Northern Ireland: Serological and Microbiological Findings. » *Equine Veterinary Journal* 15 (4): 317-20.
- Ellis, W. A. 2015. « Animal Leptospirosis. » *Current Topics in Microbiology and Immunology* 387: 99-137. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_6.
- Enright, M. C., et B. G. Spratt. 1999. « Multilocus sequence typing. » *Trends Microbiol* 7: 482-87.
- Espí, A., J. M. Prieto, et V. Alzaga. 2010. « Leptospiral Antibodies in Iberian Red Deer (*Cervus Elaphus Hispanticus*), Fallow Deer (*Dama Dama*) and European Wild Boar (*Sus Scrofa*) in Asturias, Northern Spain. » *Veterinary Journal* 183 (2): 226-27. doi:10.1016/j.tvjl.2008.10.003.
- Evangelista, K. V., et J. Coburn. 2010. « Leptospira as an Emerging Pathogen: A Review of Its Biology, Pathogenesis and Host Immune Responses. » *Future Microbiology* 5 (9): 1413-25. doi:10.2217/fmb.10.102.
- Faine, S. 1962a. « Factors Affecting the Development of the Carrier State in Leptospirosis. » *The Journal of Hygiene* 60 (4): 427-34.
- . 1962b. « The Growth of *Leptospira Australis* B in the Kidneys of Mice in the Incipient Experimental Carrier State. » *The Journal of Hygiene* 60 (4): 435-42.
- . 1965. « Silver Staining of Spirochaetes in Single Tissue Sections. » *J Clin Pathol* 18: 381-82.
- Feng, A. Y. T., et C. G. Himsforth. 2013. « The Secret Life of the City Rat: A Review of the Ecology of Urban Norway and Black Rats (*Rattus Norvegicus* and *Rattus Rattus*). » *Urban Ecosystems* 17 (1): 149-62. doi:10.1007/s11252-013-0305-4.
- Fornazari, F., R. C. da Silva, V. B. Richini-Pereira, H. E. O. Beserra, M. C. R. Luvizotto, et H. Langoni. 2012. « Comparison of Conventional PCR, Quantitative PCR, Bacteriological Culture and the Warthin Starry Technique to Detect *Leptospira* Spp. in Kidney and Liver Samples from Naturally Infected Sheep from Brazil. » *Journal of Microbiological Methods* 90 (3): 321-26. doi:10.1016/j.mimet.2012.06.005.
- Foucault, C., B. La Scola, H. Lindroos, S. G. Andersson, et D. Raoult. 2005. « Multispacer typing technique for sequence-based typing of *Bartonella quintana*. » *Journal of Clinical Microbiology* 43: 41-48.

- Fournier, P. E., Y. Zhu, H. Ogata, et D. Raoult. 2004. « Use of highly variable intergenic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains. » *Journal of Clinical Microbiology* 42: 5757-66.
- Galloway, R. L., et P. N. Levett. 2008. « Evaluation of a modified pulsed-field gel electrophoresis approach for the identification of *Leptospira* serovars. » *Am J Trop Med Hyg* 78: 628-32.
- Ganoza, C. A., M. A. Matthias, D. Collins-Richards, K. C. Brouwer, C. B. Cunningham, E. R. Segura et al. 2006. « Determining Risk for Severe Leptospirosis by Molecular Analysis of Environmental Surface Waters for Pathogenic *Leptospira*. » *PLoS Medicine* 3 (8): e308. doi:10.1371/journal.pmed.0030308.
- Gardner-Santana, L. C., D. E. Norris, C. M. Fornadel, E. R. Hinson, S. L. Klein, et G. E. Glass. 2009. « Commensal Ecology, Urban Landscapes, and Their Influence on the Genetic Characteristics of City-Dwelling Norway Rats (*Rattus norvegicus*). » *Molecular Ecology* 18 (13): 2766-78. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04232.x.
- Gaudie, C. M., C. A. Featherstone, W. S. Phillips, R. McNaught, P. M. Rhodes, J. Errington et al. 2008. « Human *Leptospira* Interrogans Serogroup Icterohaemorrhagiae Infection (Weil's Disease) Acquired from Pet Rats. » *The Veterinary Record* 163 (20): 599-601.
- Gay, N., M.-E. Soupé-Gilbert, et C. Goarant. 2014. « Though Not Reservoirs, Dogs Might Transmit *Leptospira* in New Caledonia. » *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11 (4): 4316-25. doi:10.3390/ijerph110404316.
- Ghneim, G. S., J. H. Viers, B. B. Chomel, P. H. Kass, D. A. Descollonges, et M. L. Johnson. 2007. « Use of a Case-Control Study and Geographic Information Systems to Determine Environmental and Demographic Risk Factors for Canine Leptospirosis. » *Veterinary Research* 38 (1): 37-50. doi:10.1051/vetres:2006043.
- Glass, G. E., J. E. Childs, G. W. Korch, et J. W. LeDuc. 1989. *Comparative ecology and social interactions of Norway rat (*Rattus norvegicus*) populations in Baltimore, Maryland*. Vol. 130. Occasional papers of the Museum of Natural History. University of Kansas. <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/503076>.
- Goeijenbier, M., J. Wagenaar, M. Goris, B. Martina, H. Henttonen, A. Vaheri et al. 2013. « Rodent-Borne Hemorrhagic Fevers: Under-Recognized, Widely Spread and Preventable - Epidemiology, Diagnostics and Treatment. » *Critical Reviews in Microbiology* 39 (1): 26-42. doi:10.3109/1040841X.2012.686481.
- Gollop, J. H., A. R. Katz, R. C. Rudoy, et D. M. Sasaki. 1993. « Rat-Bite Leptospirosis. » *The Western Journal of Medicine* 159 (1): 76-77.
- Guerra, M. A. 2009. « Leptospirosis. » *Journal of the American Veterinary Medical Association* 234 (4): 472-78, 430. doi:10.2460/javma.234.4.472.
- Haake, D. A., M. Dundoo, R. Cader, B. M. Kubak, R. A. Hartskeerl, J. J. Sejvar et al. 2002. « Leptospirosis, Water Sports, and Chemoprophylaxis. » *Clinical*

- Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 34 (9): e40-43. doi:10.1086/339942.
- Haake, D. A., et J. Matsunaga. 2010. « Leptospira: A Spirochaete with a Hybrid Outer Membrane. » *Molecular Microbiology* 77 (4): 805-14. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07262.x.
- Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, et P. Stoodley. 2004. « Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases. » *Nature Reviews. Microbiology* 2 (2): 95-108. doi:10.1038/nrmicro821.
- Hammer, B., A. Moter, O. Kahl, G. Alberti, et U. B. Göbel. 2001. « Visualization of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato by Fluorescence in Situ Hybridization (FISH) on Whole-Body Sections of *Ixodes ricinus* Ticks and Gerbil Skin Biopsies. » *Microbiology* 147 (Pt 6): 1425-36.
- Hamond, C., G. Martins, R. Lawson-Ferreira, M. A. Medeiros, et W. Lilenbaum. 2013a. « The Role of Horses in the Transmission of Leptospirosis in an Urban Tropical Area ». *Epidemiology and Infection* 141 (1): 33-35. doi:10.1017/S0950268812000416.
- Hamond, C., G. Martins, M. A. Medeiros, et W. Lilenbaum. 2013b. « Presence of Leptospiral DNA in Semen Suggests Venereal Transmission in Horses ». *Journal of Equine Veterinary Science* 33 (12): 1157-59. doi:10.1016/j.jevs.2013.03.185.
- Hamond, C., M. Pinna, M. A. Medeiros, P. Bourhy, W. Lilenbaum, et M. Picardeau. 2015. « A Multilocus Variable Number Tandem Repeat Analysis Assay Provides High Discrimination for Genotyping *Leptospira santarosai* Strains ». *Journal of Medical Microbiology* 64 (Pt 5): 507-12. doi:10.1099/jmm.0.000045.
- Hanson, L. E. 1982. « Leptospirosis in domestic animals: the public health perspective. » *Journal of the American Veterinary Medical Association* 181 (12): 1505-9.
- Hartman, E. G., et S. Broekhuizen. 1980. « Antibodies to *Leptospira* in European Hares (*Lepus europaeus* Pallas) in the Netherlands. » *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B* 27 (8): 640-49.
- Hartskeerl, R. A., M. Collares-Pereira, et W. A. Ellis. 2011. « Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. » *Clin Microbiol Infect* 17: 494-501.
- Hartskeerl, R. A., et W. J. Terpstra. 1996. « Leptospirosis in Wild Animals. » *The Veterinary Quarterly* 18 Suppl 3: S149-50.
- Herrmann, J. L., E. Bellenger, P. Perolat, G. Baranton, et I. Saint Girons. 1992. « Pulsed-field gel electrophoresis of NotI digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. » *Journal of Clinical Microbiology* 30: 1696-1702.
- Higgins, R. J., J. F. Harbourne, T. W. Little, et A. E. Stevens. 1980. « Mastitis and Abortion in Dairy Cattle Associated with *Leptospira* of the Serotype Hardjo. » *The Veterinary Record* 107 (13): 307-10.

- Himsworth, C. G., J. Bidulka, K. L. Parsons, A. Y. T. Feng, P. Tang, C. M. Jardine et al. 2013. « Ecology of *Leptospira Interrogans* in Norway Rats (*Rattus Norvegicus*) in an Inner-City Neighborhood of Vancouver, Canada. » *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (6): e2270. doi:10.1371/journal.pntd.0002270.
- Himsworth, C. G., K. L. Parsons, C. Jardine, et D. M. Patrick. 2013. « Rats, Cities, People, and Pathogens: A Systematic Review and Narrative Synthesis of Literature Regarding the Ecology of Rat-Associated Zoonoses in Urban Centers. » *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 13 (6): 349-59. doi:10.1089/vbz.2012.1195.
- Himsworth, C. G., E. Zabek, P. Tang, K. L. Parsons, M. Koehn, C. M. Jardine et al. 2014. « Bacteria Isolated from Conspecific Bite Wounds in Norway and Black Rats: Implications for Rat Bite-Associated Infections in People. » *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 14 (2): 94-100. doi:10.1089/vbz.2013.1417.
- Hould, R., et Collège d'enseignement général et professionnel. 1984. *Techniques d'histopathologie et de cytopathologie*. 1 vol. vol. Canada, France: Maloine Editeur, Paris.
- Huhn, R. G. 1972. « Current Status of Leptospiral Immunizing Agents for Use in Swine ». *Journal of the American Veterinary Medical Association* 160 (4): 634-37.
- Ido, Y., R. Hoki, H. Ito, et H. Wani. 1917. « THE RAT AS A CARRIER OF SPIROCHAETA ICTEROHAEMORRHAGIAE, THE CAUSATIVE AGENT OF WEIL'S DISEASE (SPIROCHAETOSIS ICTEROHAEMORRHAGICA). » *The Journal of Experimental Medicine* 26 (3): 341-53.
- Inada, R., Y. Ido, R. Hoki, R. Kaneko, et H. Ito. 1916. « THE ETIOLOGY, MODE OF INFECTION, AND SPECIFIC THERAPY OF WEIL'S DISEASE (SPIROCHAETOSIS ICTEROHAEMORRHAGICA). » *The Journal of Experimental Medicine* 23 (3): 377-402.
- Inglis, I. R., D. S. Shepherd, P. Smith, P. J. Haynes, D. S. Bull, D. P. Cowan et al. 1996. « Foraging Behaviour of Wild Rats (*Rattus Norvegicus*) towards New Foods and Bait Containers. » *Applied Animal Behaviour Science* 47 (3): 175-90. doi:10.1016/0168-1591(95)00674-5.
- Jacobs, A., F. Harks, M. Hoeijmakers, M. Collell, et R. Segers. 2015. « Safety and Efficacy of a New Octavalent Combined Erysipelas, Parvo and *Leptospira* Vaccine in Gilts against *Leptospira Interrogans* Serovar Pomona Associated Disease and Foetal Death. » *Vaccine*, juin. doi:10.1016/j.vaccine.2015.06.048.
- Jansen, A., I. Schöneberg, C. Frank, K. Alpers, T. Schneider, et K. Stark. 2005. « Leptospirosis in Germany, 1962-2003. » *Emerging Infectious Diseases* 11 (7): 1048-54. doi:10.3201/eid1107.041172.
- Johnson, M. A. S., H. Smith, P. Joeph, R. H. Gilman, C. T. Bautista, K. J. Campos et al. 2004. « Environmental Exposure and Leptospirosis, Peru. » *Emerging Infectious Diseases* 10 (6): 1016-22. doi:10.3201/eid1006.030660.
- Kilianski, A., J. L. Haas, E. J. Corriveau, A. T. Liem, K. L. Willis, D. R. Kadavy et al. 2015. « Bacterial and Viral Identification and Differentiation by Amplicon

- Sequencing on the MinION Nanopore Sequencer ». *GigaScience* 4: 12. doi:10.1186/s13742-015-0051-z.
- Klaasen, H. L. B. M., M. van der Veen, M. J. C. H. Molkenboer, et D. Sutton. 2013. « A Novel Tetravalent *Leptospira* Bacterin Protects against Infection and Shedding Following Challenge in Dogs. » *The Veterinary Record* 172 (7): 181. doi:10.1136/vr.101100.
- Klarenbeek, A., et W. A. P. Schuffner. 1933. « Appearance in Holland of leptospira strain differing from Weil strain. » *Nederl. tijdschr. v. geneesk.* 77(Sept. 16): 4271-76.
- Klötting, I., C. Nitschke, et J. van den Brandt. 2003. « Impact of Genetic Profiles on Experimental Studies: Outbred versus Wild Rats. » *Toxicology and Applied Pharmacology* 189 (1): 68-71.
- Ko, A. I., M. Galvão Reis, C. M. Ribeiro Dourado, W. D. Johnson, et L. W. Riley. 1999. « Urban Epidemic of Severe Leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. » *Lancet* 354 (9181): 820-25.
- Ko, A. I., C. Goarant, et M. Picardeau. 2009. « *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. » *Nat Rev Microbiol* 7: 736-47.
- Koizumi, N., M. Muto, T. Tanikawa, H. Mizutani, Y. Sohmura, E. Hayashi et al. 2009. « Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. » *J Med Microbiol* 58 : 1227-30.
- Krawczyk, M. 2005. « Serological Evidence of Leptospirosis in Animals in Northern Poland. » *The Veterinary Record* 156 (3): 88-89.
- Krojgaard, L. H., S. Villumsen, M. D. Markussen, J. S. Jensen, H. Leirs, et A. C. Heiberg. 2009. « High prevalence of *Leptospira* spp. in sewer rats (*Rattus norvegicus*). » *Epidemiol Infect* 137: 1586-92.
- Kuiken, T., J. E. van Dijk, W. J. Terpstra, et B. A. Bokhout. 1991. « The Role of the Common Vole (*Microtus Arvalis*) in the Epidemiology of Bovine Infection with *Leptospira Interrogans* Serovar Hardjo. » *Veterinary Microbiology* 28 (4): 353-61.
- Lau, C. L., L. D. Smythe, S. B. Craig, et P. Weinstein. 2010. « Climate Change, Flooding, Urbanisation and Leptospirosis: Fuelling the Fire? » *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 104 (10): 631-38. doi:10.1016/j.trstmh.2010.07.002.
- Lau, C., L. Smythe, et P. Weinstein. 2010. « Leptospirosis: An Emerging Disease in Travellers. » *Travel Medicine and Infectious Disease* 8 (1): 33-39. doi:10.1016/j.tmaid.2009.12.002.
- Lee, H. S., L. Guptill, A. J. Johnson, et G. E. Moore. 2014. « Signalment Changes in Canine Leptospirosis between 1970 and 2009. » *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 28 (2): 294-99. doi:10.1111/jvim.12273.
- Lee, H. S., M. Levine, C. Guptill-Yoran, A. J. Johnson, P. von Kamecke, et G. E. Moore. 2014. « Regional and Temporal Variations of *Leptospira* Seropositivity

- in Dogs in the United States, 2000-2010. » *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 28 (3): 779-88. doi:10.1111/jvim.12335.
- Levett, P. N. 2001. « Leptospirosis. » *Clin Microbiol Rev* 14 : 296-326.
- Levett, P. N. 2003. « Usefulness of Serologic Analysis as a Predictor of the Infecting Serovar in Patients with Severe Leptospirosis ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 36 (4): 447-52. doi:10.1086/346208.
- Levett, P. N. 2015. « Systematics of Leptospiraceae. » *Current Topics in Microbiology and Immunology* 387: 11-20. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_2.
- Louarn, H. L., et J.-P. Quéré. 2003. *Les rongeurs de France: faunistique et biologie*. Editions Quae.
- Lourdault, K., F. Aviat, et M. Picardeau. 2009. « Use of quantitative real-time PCR for studying the dissemination of *Leptospira interrogans* in the guinea pig infection model of leptospirosis. » *J Med Microbiol* 58 : 648-55.
- Luzzi, G. A., L. M. Milne, et S. A. Waitkins. 1987. « Rat-Bite Acquired Leptospirosis. » *The Journal of Infection* 15 (1): 57-60.
- Majed, Z., E. Bellenger, D. Postic, C. Pourcel, G. Baranton, et M. Picardeau. 2005. « Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto*. » *Journal of Clinical Microbiology* 43 : 539-45.
- Marshall, R. B. 1976. « The Route of Entry of Leptospire into the Kidney Tubule. » *Journal of Medical Microbiology* 9 (2): 149-52.
- Martin, L., et A. Pettit. 1918. « Sero-diagnostic de la spirochaetose ictero-haémorrhagique. » *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 42: 672-75.
- Mastrorilli, C., F. Dondi, C. Agnoli, M. E. Turba, E. Vezzali, et F. Gentilini. 2007. « Clinicopathologic Features and Outcome Predictors of *Leptospira Interrogans Australis* Serogroup Infection in Dogs: A Retrospective Study of 20 Cases (2001-2004). » *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 21 (1): 3-10.
- Matsui, M., V. Rouleau, L. Bruyère-Ostells, et C. Goarant. 2011. « Gene Expression Profiles of Immune Mediators and Histopathological Findings in Animal Models of Leptospirosis: Comparison between Susceptible Hamsters and Resistant Mice. » *Infection and Immunity* 79 (11): 4480-92. doi:10.1128/IAI.05727-11.
- Matsui, M., M.-E. Soupé, J. Becam, et C. Goarant. 2012. « Differential in Vivo Gene Expression of Major *Leptospira* Proteins in Resistant or Susceptible Animal Models. » *Applied and Environmental Microbiology* 78 (17): 6372-76. doi:10.1128/AEM.00911-12.
- McBride, A. J. A., D. A. Athanazio, M. G. Reis, et A. I. Ko. 2005. « Leptospirosis. » *Current Opinion in Infectious Diseases* 18 (5): 376-86.
- Merien, F., D. Portnoi, P. Bourhy, F. Charavay, A. Berlioz-Arthaud, et G. Baranton. 2005. « A Rapid and Quantitative Method for the Detection of *Leptospira* Species in Human Leptospirosis. » *FEMS Microbiology Letters* 249 (1): 139-47. doi:10.1016/j.femsle.2005.06.011.

- Millán, J., M. G. Candela, J. V. López-Bao, M. Pereira, M. A. Jiménez, et L. León-Vizcaíno. 2009. « Leptospirosis in Wild and Domestic Carnivores in Natural Areas in Andalusia, Spain. » *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 9 (5): 549-54. doi:10.1089/vbz.2008.0081.
- Min, Y. W., et P.-L. Rhee. 2015. « The Role of Microbiota on the Gut Immunology. » *Clinical Therapeutics* 37 (5): 968-75. doi:10.1016/j.clinthera.2015.03.009.
- Mohan Rao, A. 2006. « Preventive Measures for Leptospirosis: Rodent Control. » *Indian Journal of Medical Microbiology* 24 (4): 325-28.
- Moinet, M., C. Fournier-Chambrillon, G. Andre-Fontaine, S. Aulagnier, A. Mesplede, B. Blanchard et al. 2010. « Leptospirosis in free-ranging endangered European mink (*Mustela lutreola*) and other small carnivores (*Mustelidae*, *Viverridae*) from southwestern France. » *J Wildl Dis* 46 : 1141-51.
- Monahan, A. M., J. J. Callanan, et J. E. Nally. 2009. « Review paper: Host-pathogen interactions in the kidney during chronic leptospirosis. » *Vet Pathol* 46 : 792-99.
- Monahan, A. M., I. S. Miller, et J. E. Nally. 2009. « Leptospirosis: Risks during Recreational Activities. » *Journal of Applied Microbiology* 107 (3): 707-16. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04220.x.
- Monahan, A. M., J. J. Callanan, et J. E. Nally. 2008. « Proteomic Analysis of *Leptospira Interrogans* Shed in Urine of Chronically Infected Hosts. » *Infection and Immunity* 76 (11): 4952-58. doi:10.1128/IAI.00511-08.
- Morand, S., F. Bordes, H.-W. Chen, J. Claude, J.-F. Cosson, M. Galan et al. 2015. « Global Parasite and Rattus Rodent Invasions: The Consequences for Rodent-Borne Diseases. » *Integrative Zoology*, June - 2. doi:10.1111/1749-4877.12143.
- Morgan, J., S. L. Bornstein, A. M. Karpati, M. Bruce, C. A. Bolin, C. C. Austin et al. 2002. « Outbreak of Leptospirosis among Triathlon Participants and Community Residents in Springfield, Illinois, 1998. » *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 34 (12): 1593-99. doi:10.1086/340615.
- Muslich, L. T., S. Y. A. M. Villanueva, M. Y. Amran, T. Segawa, M. Saito, et S. Yoshida. 2015. « Characterization of *Leptospira* Infection in Suckling and Weaning Rat Pups. » *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 38 : 47-55. doi:10.1016/j.cimid.2014.11.001.
- Nally, J. E., C. Chantranuwat, X. Y. Wu, M. C. Fishbein, M. M. Pereira, J. J. Da Silva et al. 2004. « Alveolar septal deposition of immunoglobulin and complement parallels pulmonary hemorrhage in a guinea pig model of severe pulmonary leptospirosis. » *Am J Pathol* 164 : 1115-27.
- Nally, J. E., E. Chow, M. C. Fishbein, D. R. Blanco, et M. A. Lovett. 2005. « Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. » *Infect Immun* 73 : 3251-60.

- Nardone, A., I. Capek, G. Baranton, C. Campèse, D. Postic, V. Vaillant et al. 2004. « Risk Factors for Leptospirosis in Metropolitan France: Results of a National Case-Control Study, 1999-2000. » *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 39 (5): 751-53. doi:10.1086/423272.
- Naze, F., A. Desvars, M. Picardeau, P. Bourhy, et A. Michault. 2015. « Use of a New High Resolution Melting Method for Genotyping Pathogenic *Leptospira* Spp ». *PloS One* 10 (7): e0127430. doi:10.1371/journal.pone.0127430.
- Panthier, J.-J., X. Montagutelli, J.-L. Guénet, et F. Jacob. 2003. *Les organismes modèles: génétique de la souris*. Paris, France: Belin.
- Pappas, G., P. Papadimitriou, V. Siozopoulou, L. Christou, et N. Akritidis. 2008. « The Globalization of Leptospirosis: Worldwide Incidence Trends. » *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases* 12 (4): 351-57. doi:10.1016/j.ijid.2007.09.011.
- Pavan, M. E., F. Cairo, M. J. Pettinari, L. Samartino, et B. Brihuega. 2011. « Genotyping of *Leptospira interrogans* strains from Argentina by Multiple-Locus Variable-number tandem repeat Analysis (MLVA). » *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 34 : 135-41.
- Perea, A., R. Garcia, A. Maldonado, M. C. Tarradas, I. Luque, R. Astorga et al. 1994. « Prevalence of Antibodies to Different *Leptospira Interrogans* Serovars in Pigs on Large Farms. » *Zentralblatt Für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B* 41 (7-8): 512-16.
- Pereira, M. M., J. J. Pereira Da Silva, M. A. Pinto, M. F. Da Silva, M. P. Machado, H. L. Lenzi et al. 2005. « Experimental Leptospirosis in Marmoset Monkeys (*Callithrix jacchus*): A New Model for Studies of Severe Pulmonary Leptospirosis. » *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72 (1): 13-20.
- Perez, J., F. Brescia, J. Becam, C. Mauron, et C. Goarant. 2011. « Rodent abundance dynamics and leptospirosis carriage in an area of hyper-endemicity in New Caledonia. » *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 : e1361.
- Perez, J., et C. Goarant. 2010. « Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. » *BMC Microbiol* 10: 325.
- Picardeau, M. 2013. « Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. » *Med Mal Infect* 43 : 1-9.
- Pinne, M., et D. A. Haake. 2013. « LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira Interrogans*: Presentation of New Data and Reevaluation of Previous Studies. » *PloS One* 8 (1): e51025. doi:10.1371/journal.pone.0051025.
- Pischke, S., U. Ehmer, I. Schedel, W. F. Gratz, H. Wedemeyer, S. Ziesing et al. 2010. « Of Guinea Pigs and Men--an Unusual Case of Jaundice. » *Zeitschrift Für Gastroenterologie* 48 (1): 33-37. doi:10.1055/s-0028-1109776.
- Ratet, G., F. J. Veyrier, M. Fanton d'Andon, X. Kammerscheit, M.-A. Nicola, M. Picardeau et al. 2014. « Live Imaging of Bioluminescent *Leptospira*

- Interrogans in Mice Reveals Renal Colonization as a Stealth Escape from the Blood Defenses and Antibiotics. » *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (12): e3359. doi:10.1371/journal.pntd.0003359.
- Réactifs RAL. 2004. « Protocole de coloration 67: Coloration Warthin-Starry. » Réactifs RAL Site Montesquieu, Martillac, France.
- Reis, R. B., G. S. Ribeiro, R. D. Felzemburgh, F. S. Santana, S. Mohr, A. X. Melendez et al. 2008. « Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. » *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2: e228.
- Ristow, P., P. Bourhy, S. Kerneis, C. Schmitt, M.-C. Prevost, W. Lilenbaum et al. 2008. « Biofilm Formation by Saprophytic and Pathogenic *Leptospira*s. » *Microbiology* 154 (Pt5) : 1309-17. doi:10.1099/mic.0.2007/014746-0.
- Ristow, P., P. Bourhy, F. W. da Cruz McBride, C. P. Figueira, M. Huerre, P. Ave et al. 2007. « The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. » *PLoS Pathog* 3 : e97.
- Roczek, A., C. Forster, H. Raschel, S. Hörmansdorfer, K.-H. Bogner, A. Hafner-Marx et al. 2008. « Severe Course of Rat Bite-Associated Weil's Disease in a Patient Diagnosed with a New *Leptospira*-Specific Real-Time Quantitative LUX-PCR. » *Journal of Medical Microbiology* 57 (Pt 5): 658-63. doi:10.1099/jmm.0.47677-0.
- Rojas, P., A. M. Monahan, S. Schuller, I. S. Miller, B. K. Markey, et J. E. Nally. 2010. « Detection and Quantification of *Leptospira*s in Urine of Dogs: A Maintenance Host for the Zoonotic Disease Leptospirosis. » *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 29 (10): 1305-9. doi:10.1007/s10096-010-0991-2.
- Ryan, E. G., N. Leonard, L. O'Grady, M. L. Doherty, et S. J. More. 2012. « Herd-Level Risk Factors Associated with *Leptospira* Hardjo Seroprevalence in Beef/Suckler Herds in the Republic of Ireland. » *Irish Veterinary Journal* 65: 6. doi:10.1186/2046-0481-65-6.
- Saito, M., S. Y. Villanueva, Y. Kawamura, K. I. Iida, J. Tomida, T. Kanemaru et al. 2012. « *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from an environmental water in Fukuoka, Japan. » *Int J Syst Evol Microbiol* 63(Pt 7) : 2457-62.
- Salaun, L., F. Merien, S. Gurianova, G. Baranton, et M. Picardeau. 2006. « Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. » *Journal of Clinical Microbiology* 44 : 3954-62.
- Sanhueza, J. M., C. Heuer, et D. West. 2013. « Contribution of *Leptospira*, *Neospora Caninum* and Bovine Viral Diarrhea Virus to Fetal Loss of Beef Cattle in New Zealand. » *Preventive Veterinary Medicine* 112 (1-2): 90-98. doi:10.1016/j.prevetmed.2013.07.009.

- Schmiedel, D., H.-J. Epple, C. Loddenkemper, R. Ignatius, J. Wagner, B. Hammer et al. 2009. « Rapid and Accurate Diagnosis of Human Intestinal Spirochetosis by Fluorescence in Situ Hybridization. » *Journal of Clinical Microbiology* 47 (5): 1393-1401. doi:10.1128/JCM.02469-08.
- Schuller, S., T. Francey, K. Hartmann, M. Hugonnard, B. Kohn, J. E. Nally et al. 2015. « European Consensus Statement on Leptospirosis in Dogs and Cats. » *The Journal of Small Animal Practice* 56 (3): 159-79. doi:10.1111/jsap.12328.
- Sejvar, J., E. Bancroft, K. Winthrop, J. Bettinger, M. Bajani, S. Bragg, et al. 2003. « Leptospirosis in “Eco-Challenge” Athletes, Malaysian Borneo, 2000 ». *Emerging Infectious Diseases* 9 (6): 702-7. doi:10.3201/eid0906.020751.
- Slack, A. T., M. F. Dohnt, M. L. Symonds, et L. D. Smythe. 2005. « Development of a Multiple-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* and its application to *Leptospira interrogans* serovar Australis isolates from Far North Queensland, Australia. » *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 4: 10.
- Socolovschi, C., E. Angelakis, A. Renvoise, P. E. Fournier, J. L. Marie, B. Davoust et al. 2011. « Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. » *Int J Infect Dis* 15: e710-15.
- Stavitsky, A. B. 1945. « Studies on the Mechanism of Host Resistance in Experimental Leptospirosis Icterohemorrhagica. » *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 51 : 397-419.
- Steinen, A. C., J. L. Schuurman, C. Gravekamp, H. Korver, et W. J. Terpstra. 1992. « Muskrats as Carriers of Pathogenic Leptospire in The Netherlands. » *Antonie Van Leeuwenhoek* 61 (1): 43-50.
- Sterling, C. R., et A. B. Thiermann. 1981. « Urban Rats as Chronic Carriers of Leptospirosis: An Ultrastructural Investigation. » *Veterinary Pathology* 18 (5): 628-37.
- Storer, T. I., et D. E. Davis. 1953. « Studies on Rat Reproduction in San Francisco. » *Journal of Mammalogy* 34 (3): 365-73. doi:10.2307/1375845.
- Suckow, M. A., S. H. Weisbroth, et C. L. Franklin. 2005. *The Laboratory Rat*. Academic Press.
- Thaipadungpanit, J., V. Wuthiekanun, W. Chierakul, L. D. Smythe, W. Petkanchanapong, R. Limpiboon et al. 2007. « A dominant clone of *Leptospira interrogans* associated with an outbreak of human leptospirosis in Thailand. » *PLoS Negl Trop Dis* 1: e56.
- Thiermann, A. B. 1981. « The Norway Rat as a Selective Chronic Carrier of *Leptospira Icterohaemorrhagiae*. » *Journal of Wildlife Diseases* 17 (1): 39-43.
- Thomson, V., K. P. Aplin, A. Cooper, S. Hisheh, H. Suzuki, I. Maryanto et al. 2014. « Molecular Genetic Evidence for the Place of Origin of the Pacific Rat, *Rattus exulans*. » *PLoS ONE* 9 (3): e91356. doi:10.1371/journal.pone.0091356.
- Timoney, J. F., N. Kalimuthusamy, S. Velineni, J. M. Donahue, S. C. Artiushin, et M. Fettinger. 2011. « A Unique Genotype of *Leptospira Interrogans* Serovar

- Pomona Type Kennewicki Is Associated with Equine Abortion. » *Veterinary Microbiology* 150 (3-4): 349-53. doi:10.1016/j.vetmic.2011.02.049.
- Toma, B. 1996. *Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures*. Association pour l'étude de l'épidémiologie des maladies animales.
- Traweger, D., R. Travnitzky, C. Moser, C. Walzer, et G. Bernatzky. 2006. « Habitat Preferences and Distribution of the Brown Rat (*Rattus Norvegicus* Berk.) in the City of Salzburg (Austria): Implications for an Urban Rat Management. » *Journal of Pest Science* 79 (3): 113-25. doi:10.1007/s10340-006-0123-z.
- Trueba, G., S. Zapata, K. Madrid, P. Cullen, et D. Haake. 2004. « Cell Aggregation: A Mechanism of Pathogenic *Leptospira* to Survive in Fresh Water. » *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 7 (1): 35-40.
- Tucunduva de Faria, M., D. A. Athanzio, E. A. Goncalves Ramos, E. F. Silva, M. G. Reis, et A. I. Ko. 2007. « Morphological alterations in the kidney of rats with natural and experimental *Leptospira* infection. » *J Comp Pathol* 137 : 231-38.
- Tulsiani, S. M., C. L. Lau, G. C. Graham, A. F. Van Den Hurk, C. C. Jansen, L. D. Smythe et al. 2010. « Emerging Tropical Diseases in Australia. Part 1. Leptospirosis. » *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 104 (7): 543-56. doi:10.1179/136485910X12851868779867.
- Turk, N., Z. Milas, J. Margaletic, V. Staresina, A. Slavica, N. Riquelme-Sertour et al. 2003. « Molecular characterization of *Leptospira* spp. strains isolated from small rodents in Croatia. » *Epidemiol Infect* 130 : 159-66.
- Turk, N., Z. Milas, V. Mojcec, E. Ruzic-Sabljić, V. Staresina, Z. Stritof et al. 2009. « Molecular analysis of *Leptospira* spp. isolated from humans by restriction fragment length polymorphism, real-time PCR and pulsed-field gel electrophoresis. » *FEMS Microbiol Lett* 300 : 174-79.
- Vadell, M. V., R. Cavia, et O. V. Suárez. 2010. « Abundance, age structure and reproductive patterns of *Rattus norvegicus* and *Mus musculus* in two areas of the city of Buenos Aires. » *International Journal of Pest Management* 56 (4): 327-36. doi:10.1080/09670874.2010.499479.
- Van Der Hoeden, J. 1958. « Epizootiology of leptospirosis. » *Adv. Vet. Sci.* 4: 277-338.
- van Schaik, G., Y. H. Schukken, M. Nielen, A. A. Dijkhuizen, H. W. Barkema, et G. Benedictus. 2002. « Probability of and Risk Factors for Introduction of Infectious Diseases into Dutch SPF Dairy Farms: A Cohort Study. » *Preventive Veterinary Medicine* 54 (3): 279-89.
- Vein, J., A. Leblond, P. Belli, A. Kodjo, et P. J. Berny. 2013. « The Role of the Coypu (*Myocastor Coypus*), an Invasive Aquatic Rodent Species, in the Epidemiological Cycle of Leptospirosis: A Study in Two Wetlands in the East of France. » *European Journal of Wildlife Research* 60 (1): 125-33. doi:10.1007/s10344-013-0758-z.

- Verma, A., P. Kumar, K. Babb, J. F. Timoney, et B. Stevenson. 2010. « Cross-Reactivity of Antibodies against Leptospiral Recurrent Uveitis-Associated Proteins A and B (LruA and LruB) with Eye Proteins. » *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (8): e778. doi:10.1371/journal.pntd.0000778.
- Verma, A., B. Stevenson, et B. Adler. 2013. « Leptospirosis in Horses. » *Veterinary Microbiology* 167 (1-2): 61-66. doi:10.1016/j.vetmic.2013.04.012.
- Viana, M., R. Mancy, R. Biek, S. Cleaveland, P. C. Cross, J. O. Lloyd-Smith et al. 2014. « Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. » *Trends in Ecology & Evolution* 29 (5): 270-79. doi:10.1016/j.tree.2014.03.002.
- Vigne, J. D., et P. Villié. 1995. « Une preuve archéologique du transport d'animaux par bateau: le crâne de Rat surmulot (*Rattus norvegicus*) de l'épave du 'Ça Ira'(Saint-Florent, Haute Corse—fin du XVIIIème siècle). » In *L'Homme Méditerranéen. Mélange offert à Gabriel Camp*, 411-16. Chenorkian R. Ed., Publication de l'Université d'Aix-en-Provence.
- Vijayachari, P., S. C. Sehgal, M. G. Goris, W. J. Terpstra, et R. A. Hartskeerl. 2003. « *Leptospira interrogans* serovar Valbuzzi: a cause of severe pulmonary haemorrhages in the Andaman Islands. » *J Med Microbiol* 52 (octobre): 913-18.
- Vijayachari, P., A. P. Sugunan, et A. N. Shriram. 2008. « Leptospirosis: An Emerging Global Public Health Problem. » *Journal of Biosciences* 33 (4): 557-69.
- Villanueva, S. Y. A. M., M. Saito, R. A. Baterna, C. A. M. Estrada, A. K. B. Rivera, M. C. Dato et al. 2014. « *Leptospira*-Rat-Human Relationship in Luzon, Philippines. » *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 16 (11): 902-10. doi:10.1016/j.micinf.2014.07.001.
- Villanueva, S. Y., H. Ezoe, R. A. Baterna, Y. Yanagihara, M. Muto, N. Koizumi et al. 2010. « Serologic and molecular studies of *Leptospira* and leptospirosis among rats in the Philippines. » *Am J Trop Med Hyg* 82: 889-98.
- Vincent, C., C. Munger, et O. Labrecque. 2007. « La leptospirose: Cas de transmission d'un chien à un humain. » *Reseau d'Alerte et d'Information Zoosanitaire (RAIZO) Bulletin Zoosanitaire* 51: 1-4.
- Wasiński, B., et J. Dutkiewicz. 2013. « Leptospirosis--Current Risk Factors Connected with Human Activity and the Environment. » *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM* 20 (2): 239-44.
- Webster, J. P., W. A. Ellis, et D. W. Macdonald. 1995. « Prevalence of *Leptospira* spp. in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. » *Epidemiol Infect* 114 : 195-201.
- Weil, A. 1886. « Über eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende, acute Infectionskrankheit. » *Deutsches Arch. klin. Med.* 39:209.
- Werts, C. 2010. « Leptospirosis: A Toll Road from B Lymphocytes. » *Chang Gung Medical Journal* 33 (6): 591-601.

- WHO. 2003. *Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control*. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Wilson, S., C. Stirling, A. Thomas, V. King, E. Plevová, L. Chromá et al. 2013. « Duration of immunity of a multivalent (DHPPi/L4R) canine vaccine against four *Leptospira* serovars. » *Vaccine* 31 (31): 3126-30. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.043.
- Wolff, J. W. 1965. « THE RELATION OF ANIMAL HOSTS OF PARASITIC LEPTOSPIRES IN THE NETHERLANDS WITH HUMAN LEPTOSPIROSIS. » *Tropical and Geographical Medicine* 17 : 2-8.
- Wood, JLN, et HGG Townsend. 1999. « Leptospiral infections associated with disease and fertility in horses. » *J Anim Breed* 3: 39-45.
- Zhang, Y., X.-L. Lou, H.-L. Yang, X.-K. Guo, X.-Y. Zhang, P. He et al. 2012. « Establishment of a Leptospirosis Model in Guinea Pigs Using an Epicutaneous Inoculations Route. » *BMC Infectious Diseases* 12: 20. doi:10.1186/1471-2334-12-20.
- Ziporyn, T., et M. K. McClintock. 1991. « Passing as an Indicator of Social Dominance Among Female Wild and Domestic Norway Rats. » *Behaviour* 118 (1): 26-41. doi:10.1163/156853991X00184.
- Zuerner, R. L. 2005. « Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. » *Curr Protoc Microbiol* Chapter 12 (octobre): Unit 12E 1.

ANNEXE

Annexe I : Tableau des principaux sérovars appartenant au sérogroupe *Icterohaemorrhagiae*

Annexe II : Protocole des colorations histologiques réalisées au cours de ce travail dans l'UP Pathologie Morphologique et Clinique de VetAgro Sup.

Annexe III : Protocole de la PCR en temps-réel SYBR Green réalisée au cours de la phase expérimentale de ce travail.

Annexe IV : Caractéristiques morphométriques de la population lyonnaise de rat et analyse statistique des individus de chaque colonie

Annexe V : Surveillance ciblée de la leptospirose au sein de la faune sauvage par l'Entente de Lutte Interdépartementale contre les Zoonoses

Annexe VI : Article « The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats: a survey in Rhône, France (2010-2012) » ; Ayrat F, Artois J, Zilber AL, Widén F, Pounder KC, Aubert D, Bicout DJ, Artois M. ; Epidemiol Infect. 2015

Annexe I : Tableau des principaux sérovars appartenant au sérogroupe Icterohaemorrhagiae

Espèce génomique	Sérogroupe	Sérovar	Références bibliographiques*
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	(Bharti et al. 2003; Salaun et al. 2006)
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	(Bharti et al. 2003; Salaun et al. 2006)
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Lai	(Bharti et al. 2003; Salaun et al. 2006)
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Birkini	(Salaun et al. 2006; Naze et al. 2015)
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Naam	(Salaun et al. 2006)
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Smithi	(Salaun et al. 2006)
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Tonkini	(Salaun et al. 2006)
<i>L. kirschneri</i>	Icterohaemorrhagiae	Bogvere	(Salaun et al. 2006; Naze et al. 2015)
<i>L. kirschneri</i>	Icterohaemorrhagiae	Dakota	(Salaun et al. 2006)
<i>L. kirschneri</i>	Icterohaemorrhagiae	Mwogolo	(Salaun et al. 2006; Naze et al. 2015)
<i>L. kirschneri</i>	Icterohaemorrhagiae	Ndahambukuje	(Salaun et al. 2006; Naze et al. 2015)
<i>L. kirschneri</i>	Icterohaemorrhagiae	Ndambari	(Salaun et al. 2006; Naze et al. 2015)

* basé sur les références des nouveaux outils de typage moléculaire développés ces 15 dernières années.

Annexe II : Protocole des colorations histologiques réalisées au cours de ce travail dans l'UP Pathologie Morphologique et Clinique de VetAgro Sup

Une partie de chaque organe prélevé a été transférée dans du formol à 10% pendant 24h, puis dans de l'alcool à 70°, afin de limiter la destruction des antigènes d'intérêt. Ensuite, pour chaque rat, deux blocs de paraffine ont été confectionnés : le premier contenant le rein, le foie, la rate et le poumon et le second contenant le cœur, la glande salivaire, le cerveau et un globe oculaire. Pour chaque bloc, trois sections tissulaires de 3 µm ont été colorées soit par coloration hémalun-phloxine, soit par coloration argentique Warthin-Starry, soit par immunohistochimie.

1- Coloration hémalun-phloxine

La coloration hémalun-phloxine est une technique couramment utilisée dans les laboratoires d'histologie afin de détecter les lésions anatomo-pathologiques. L'hémalun permet une coloration nucléaire bleu-violet et la phloxine colore en rose les composés cytoplasmiques. Chaque section a été soumise au protocole suivant pour le déparaffinage, la coloration hémalun-phloxine et la déshydratation (tableau I).

Tableau I : Protocole de la technique de coloration par hémalun-phloxine.

Bain	Temps
Ottix	3 x 10 min
Shapper	2 min
Alcool	1 min
Eau	2 bains de 30 sec
Hemalun	5 min
Eau	3 bains de 30 sec
HCl	Passage
Eau	1 bain
Eau Lithinée	Passage
Eau	1 bain

Phloxine	5 min
Eau	5 bains de 30 sec
Alcool	Passage
Shapper	30 sec
Ottix	3 x 5 min

2- Coloration argentique Warthin-Starry

La coloration argentique Warthin-Starry est une technique histologique permettant de colorer les spirochètes en noirs, grâce aux sels d'argent, et les tissus en marron. Cette technique a été mise au point dans les années 60 par Faine (Faine 1965). Depuis cette date, plusieurs variantes ont été développées. Lors d'une phase préliminaire, nous avons comparé deux protocoles de coloration argentique (Hould et Collège d'enseignement général et professionnel 1984; Réactifs RAL 2004), pour choisir le protocole RAL, permettant une bonne coloration des leptospires et des tissus avec peu d'artéfact de coloration et ayant une préparation technique des tampons plus simple.

Après un déparaffinage, les lames ont été placées dans une solution de nitrate d'argent à 1% à 50°C pendant 30 min. Puis, les coupes ont été recouvertes d'une solution de nitrate d'hydroquinone fraîchement préparée, et laissées à 50°C jusqu'à ce que les sections prennent une coloration jaune ou brunâtre. Enfin, les lames ont été rincées rapidement et énergiquement dans de l'eau puis dans de l'eau distillée, avant d'être déshydratées.

3- Coloration immunohistochimique

La coloration immunohistochimique est une coloration spécifique grâce à l'emploi d'un anticorps polyclonal anti-leptospire, spécifique de la souche infectante *L. interrogans* Copenhageni Fiocruz L1-130. Un nouveau protocole a été mis en place pour cette étude à partir de celui publié par l'Institut Pasteur (Ristow et al. 2007), afin d'optimiser la suppression des antigènes non spécifiques, tout en conservant au mieux les antigènes des leptospires.

Après un déparaffinage, les lames ont été mises à incuber dans un bain de citrate pH 6 pendant 1h à 95°C, puis dans un bain d'H₂O₂ pendant 10min, afin d'éliminer une partie des antigènes non spécifiques. Les coupes ont alors été mises en contact avec le Super Block (UltraTek HRP, ScyTek Laboratories, Logan, USA) pendant 30 min à température ambiante, puis ont été recouvertes d'un Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (dilution 1:1000) pendant 10 min à température ambiante, afin de bloquer les antigènes non spécifiques restant, dont ceux de l'hôte. Les lames ont été mises à incuber avec l'anticorps primaire anti-leptospire durant une nuit à 4°C. Le lendemain, les coupes ont été mises en contact avec l'anticorps secondaire UltraTek Anti-Polyvalent (ScyTek Laboratories) dilué au 1/2 pendant 30 min, puis avec le complexe UltraTek HRP (ScyTek Laboratories) pendant 30 min. Les complexes liés ont été mis en évidence grâce à un contact de 2 min à température ambiante avec du Peroxidase Substrate Kit (Vector NovaRED, Vector Laboratories, Peterborough, United Kingdom). Les lames ont ensuite été colorées à l'hémalum pendant 1 min puis déshydratées.

Annexe III : Protocole de la PCR en temps-réel SYBR Green réalisée au cours de la phase expérimentale de ce travail

1- L'extraction d'ADN des organes et matrices prélevés

L'ADN des organes (rein, foie, rate, poumon, cœur, cerveau, glande salivaire et œil) et des matrices (sang et urine) ont été extraits grâce au QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Trente milligrammes de chaque organe ont été broyés à la seringue ou coupés au scalpel, puis ont été incubés avec 180 µl de tampon ATL et 20 µl de protéinase K. Le temps d'incubation et la méthode de broyage pour chaque organe est récapitulé dans le Tableau I.

Tableau I : Temps d'incubation et type de broyage des différents types d'organes prélevés, lors de la phase de lyse des tissus durant l'extraction d'ADN.

Organe	Temps d'incubation (70°C)	Méthode de broyage
Rein	1h30	Seringue
Foie	1h30	Seringue
Poumon	2h	Découpe fine au scalpel
Rate	2h	Découpe fine au scalpel
Coeur	2h	Découpe fine au scalpel
Glande Saliv.	2h	Découpe fine au scalpel
Œil	2h	Découpe fine au scalpel
Cerveau	1h30	Seringue

Pour le sang, l'extraction d'ADN a été réalisée sur 200 µl de sang EDTA. Pour l'urine, 200 µl d'urine ont été centrifugés et rincés avec du PBS. L'extraction a été réalisée sur le culot.

Les différents produits de lyse ou de matrice ont été soumis au même protocole d'extraction d'ADN conforme à celui proposé par le fournisseur. La concentration d'ADN de chaque extrait a ensuite été contrôlée par spectrophotométrie, grâce à une mesure de l'absorbance à 260/280nm avec un nanodrop 2000 (Thermo Fischer

Scientific, Illkirch, France). Les concentrations d'ADN obtenues ont ainsi été comparées aux intervalles de confiance de concentration d'ADN extrait de matrices identiques contenant un contrôle interne d'extraction validé.

2- La PCR quantitative en temps-réel SYBR Green

Les extraits d'ADN ont été analysés par qPCR SYBR Green sur le Rotor-Gene Q (Qiagen). Les PCR quantitatives ont été réalisées sur un volume final de 20µl contenant 12µl de Master Mix Rotor-Gene SYBR Green PCR kit (Qiagen), 1µl de d'amorce forward, 1µl d'amorce reverse et 6µl d'eau. Les amorces utilisées permettaient d'amplifier le gène *Lfb1* (Merien et al. 2005) spécifique des leptospires pathogènes, qui code pour une protéine de fonction inconnue. Ces amorces (Tableau II) présentaient une bonne sensibilité de détection, associée à un système SYBR Green (Bourhy et al. 2011).

Tableau II : Amorce du gène *Lfb1* (Merien et al. 2005) et température d'hybridation utilisée.

Amorce	Séquence 5'-3'	T° Hybridation
Lfb1-F	CAT.TCA.TGT.TTC.GAA.TCA.TTT.CAA.A	61°C
Lfb1-R	GGC.CCA.AGT.TCC.TTC.TAA.AAG	

Le programme d'amplification du thermocycleur pour la PCR quantitative est repris dans le Tableau III.

Tableau III : Programme d'amplification de la PCR quantitative SYBR Green sur le gène *Lfb1* avec le Rotor-Gene Q.

Step (SYBR Mix Qiagen)	Temps	Température	Nb de cycle
Step1	95°C	5 min	
Cycle	95°C	10 sec	45
	61°C	40 sec	
Melt Curve	65-95°C	Mesure tous les 0,5°C	

Pour déterminer la concentration en ADN de leptospires des échantillons, une courbe standard a été créée à partir d'une solution mère contenant 1.10^7 *L. interrogans* Copenhageni Fiocruz dans 200 μ l d'éluant. Une série de dilution de 10 en 10 a été réalisée par l'ajout de tampon TE (Ambion Life Technologies, Saint Aubin, France), afin d'obtenir une gamme standard de dilution de 10^7 à 10^1 leptospires. Dans la solution mère, 1 μ l d'extrait d'ADN contient $1,25.10^6$ copies génomiques. La taille du génome de *L. interrogans* Copenhageni Fiocruz étant de 4,6 Mb, une copie génomique pèse environ 5 fg d'ADN génomique.

Annexe IV : Caractéristiques morphométriques de la population lyonnaise de rat et analyse statistique des individus de chaque colonie

(Tableau issu de la version précédente de l'article du chapitre 2 partie III, soumis au journal PlosOne, présentant une analyse statistique des variables correspondant aux caractéristiques morphométriques des individus piégés)

Table: Morphometric characteristics of a population of wild Norway rats with different multispacer sequence typing profiles and statistical comparisons of their distributions between the serovars [strains] Copenhagen [Wijnberg/M20] and Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion], with the latter being the reference strain.

Characteristic	Leptospira strains				Statistical analysis			
	Copenhagen [M20/Wijnberg] (n=26)	Icterohaemorrhagiae [CHU Réunion] (n=7)	Copenhagen [Shibaura 9] (n=1)	Icterohaemorrhagiae [R1] (n=1)	Fisher's Exact Test OR [95% CI]	p-value	SLR OR [95% CI]	p-value
Sex								
Female	10	2	0	0	-			
Male	16	5	1	1	1.5 [0.2 -19]	0.99		
Sexual maturity								
Immature	1	0	0	0	-			
mature	25	7	1	1	a			
Weight (g)								
Median	244.3	387.0	374	267			0.17	0.0131
(IQR)	(204.8-287.0)	(273.5-431.0)	(^a)	(^a)			[0.05-0.55]	
Length (cm)								
Median	22.7	25	24.5	23.3			0.06	0.0203
(IQR)	(22.0-23.9)	(23.5-26.7)	(^a)	(^a)			[0.01-0.44]	
Body condition								
-	-	-	-	-			0.98	0.0976
							[0.97 -0.99]	

^a: insufficient number of rats to estimate the interquartile range (IQR)

Annexe V : Surveillance ciblée de la leptospirose au sein de la faune sauvage par l'Entente de Lutte Interdépartementale contre les Zoonoses

1- Objectif

Leptospira pouvant se maintenir dans le rein de nombreux mammifères, l'objectif de cette étude était de déterminer quelles sont les espèces réservoirs et/ou vectrices de la leptospirose dans la faune sauvage française, en dehors des rongeurs. Pour se faire, le portage rénal a été investigué et associé à un typage moléculaire des ADN de *Leptospira* correspondant.

2- Matériels et Méthodes

- Echantillonnage

Le réseau de l'Entente de Lutte Interdépartementale contre les Zoonoses (ELIZ) en relation avec les fédérations de départementales de chasseur a entrepris cette étude. Les espèces cibles appartiennent pour moitié à des espèces de mammifères chassées (cerf, chevreuil, sanglier, renard, lièvre brun, lapin de garenne, martre et fouine), l'autre moitié est constituée de certaines espèces « hors chasse » (blaireau, belette, raton laveur, chamois mouflon, daims, chat forestier, chat haret, putois, vison, castor, hermine, écureuil, genette, bouquetin, lynx, loup,...). Les espèces appartenant aux rongeurs, comme le rat, le rat musqué et le ragondin, ont été écartées de l'étude car elles avaient déjà fait l'objet de précédentes investigations publiées (Aviat et al. 2009; Vein et al. 2013).

Trente départements français principalement situés au nord-est de la France ont participé à cette étude. Dans chaque département, 10 échantillons par espèces chassées ont été prélevés et 60 échantillons d'espèces « hors chasse » avec un nombre d'échantillons par espèce hétérogène. Pour chaque animal, un rein entier a été prélevé à l'aide d'un scalpel. Les échantillons ont ensuite été envoyés au

Laboratoire Vétérinaire Départementale (LVD) correspondant dans les 24-48 heures pour les analyses de détection de leptospires.

- **Extraction d'ADN et détection par qPCR dans les LVD**

Chaque LVD a réalisé une extraction d'ADN sur les prélèvements de rein envoyés grâce au QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), selon le protocole établi par le Laboratoire des Leptospires et repris dans la partie expérimentale et épidémiologique de ce travail de thèse.

Chaque extrait d'ADN a été analysé par qPCR grâce au kit TaqVet PathoLept (LSI, Lissieu, France), pour détecter la présence d'ADN de *Leptospira* pathogène. L'ajout de contrôles positif et négatif adapté a été réalisé, comme repris dans la partie épidémiologique de ce travail de thèse. Les échantillons présentant un Ct < 40, étaient considérés comme positifs et envoyés au Laboratoire des Leptospires pour un typage moléculaire.

- **Typage moléculaire**

L'identification des leptospires s'est déroulée en deux phases (Figure 1). La première consistait en l'identification de l'espèce de *Leptospira* par séquençage du produit d'amplification du gène *rrs* (16S). La seconde était un typage moléculaire par Variable-Number Tandem-Repeat (VNTR) et/ou par Multispacer Sequence Typing (MST), pour identifier les sérogroupes et sérovars des espèces *Leptospira interrogans*, *L. kirschneri* et *L. borgpetersenii*.

Les détails des protocoles sont identiques à ceux présentés dans le chapitre II partie 1 et 2 de ce travail de thèse.

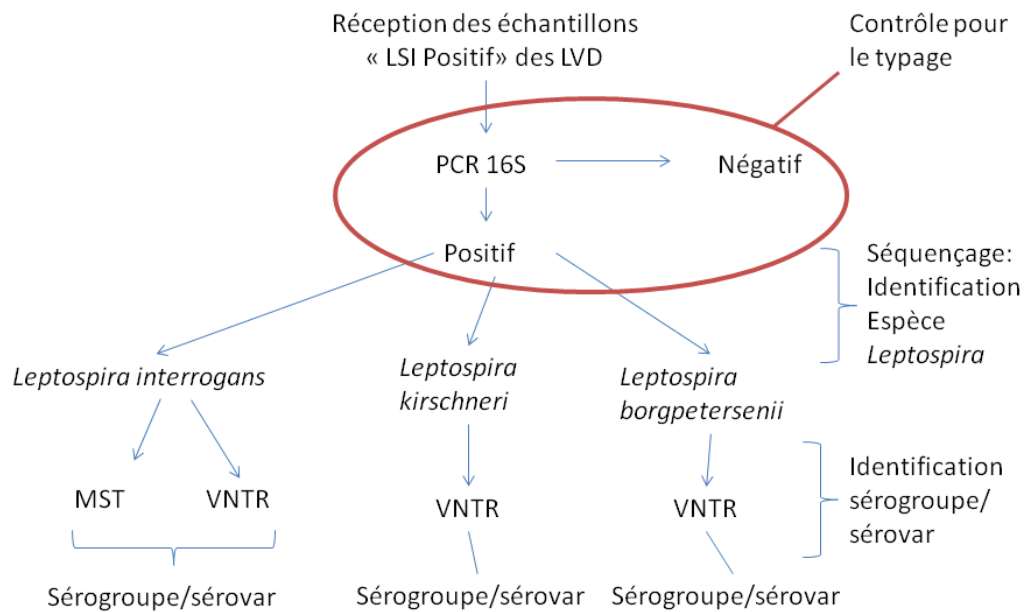


Figure 1 : Schéma des analyses de typage moléculaire effectuées sur les échantillons positifs envoyés au Laboratoire des Leptospires.

3- Résultats

- Détection par qPCR

Au cours des deux années de l'étude, 3690 reins ont été récoltés et analysés par les LVD. Sur l'ensemble des échantillons, 198 ont été testés positifs par qPCR, soit un taux de prévalence global de 5,4 %. Cependant, les prévalences étaient fortement hétérogènes en fonction des espèces considérées. Les ongulés présentaient une très faible prévalence, dont certaines espèces n'étaient pas porteuses de leptospires. Le groupe des espèces de mustélidés présentait une prévalence moyenne de 12 %. Les hérissons et les castors présentaient une prévalence respective de 33 % et 37 %. Ces résultats sont repris dans le Tableau I qui a été présenté par Mr V. Raton lors de la Journée Nationale sur la Leptospirose (Clermont-Ferrand, mars 2015).

Tableau I : Prévalence observée du portage rénal de *Leptospira* pathogène pour chaque espèce animale cible lors de l'étude ELIZ

Espèce	nb analysé	positif	Prévalence
hérisson	111	42	37,8%
castor	9	3	33,3%
belette	34	7	20,6%
martre	167	27	16,2%
putois	107	16	15,0%
fouine	204	29	14,2%
blaireau	313	27	8,6%
hermine	24	2	8,3%
raton laveur	52	4	7,7%
chat forestier	30	2	6,7%
renard	352	19	5,4%
chat haret	88	4	4,5%
lièvre brun	359	5	1,4%
chevreuil	494	7	1,4%
sanglier	503	2	0,4%
lapin de garenne	311	1	0,4%
cerf élaphe	323	1	0,3%
bouquetin	4	0	0,0%
chamois	64	0	0,0%
daim	14	0	0,0%
mouflon	32	0	0,0%
Lièvre variable	2	0	0,0%
loup	6	0	0,0%
lynx	7	0	0,0%
écureuil+loir+marmotte	65+3+3	0	0,0%
Total général	3690	198	5,4%

Source : ELIZ, présentation lors de la Journée Nationale d'information sur la Leptospirose (Clermont-Ferrand, mars 2015)

Un total de 173 échantillons a été expédié par les LVD, au cours de la période d'analyse de ce travail.

- Identification de l'espèce de *Leptospira*

Les 173 échantillons ont été amplifiés par PCR ciblant le gène *rrs* (16S). Cependant, 7 échantillons n'ont pas pu être séquencés par manque de produit d'amplification, car les Ct étaient supérieurs à 35. L'identification de l'espèce de *Leptospira* a donc été réalisée sur 166 échantillons. Parmi ces échantillons, nous avons obtenu une prédominance de l'espèce *L. interrogans*, suivi de *L. kirschneri* et *L. borgpetersenii*. Aucune autre espèce pathogène de leptospires n'a été identifiée parmi les échantillons de la faune sauvage. Le détail des résultats est présenté dans la Figure 2.

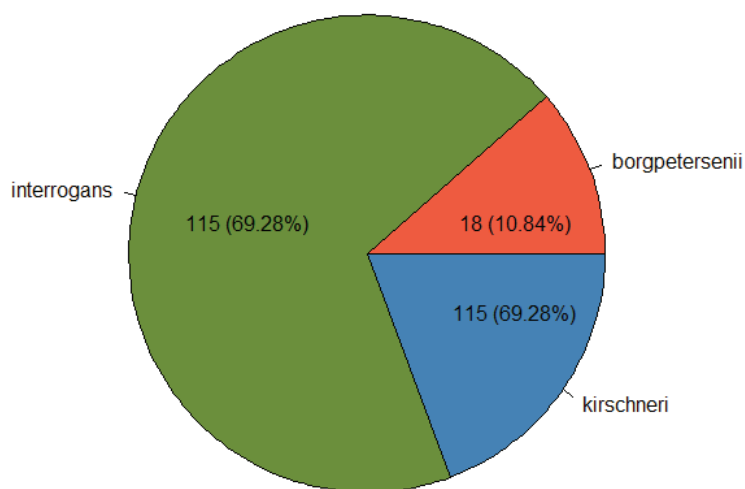


Figure 2 : répartition des espèces de *Leptospira* identifiées au sein des 166 échantillons positifs de la faune sauvage.

- Identification des sérogroupes/sérovars

Au cours de l'étude ELIZ, 10 sérogroupes différents ont pu être différenciés au sein de la faune sauvage, avec une prédominance pour les sérogroupes Australis, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa et Djasiman. Environ un tiers des échantillons présentait un nouveau profil qui n'était pas encore référencé dans les bases de données de la VNTR et de la MST. Nous n'avons pas pu déterminer le séro groupe et le sérovar chez 24 % des échantillons. Ceci était dû à un manque d'information lors de l'élaboration du profil pour des échantillons faiblement positifs, ou à des échantillons impurs.

Les répartitions des sérogroupes des échantillons par espèces animales et par espèces génomiques de leptospires, sont présentées dans la Figure 3.

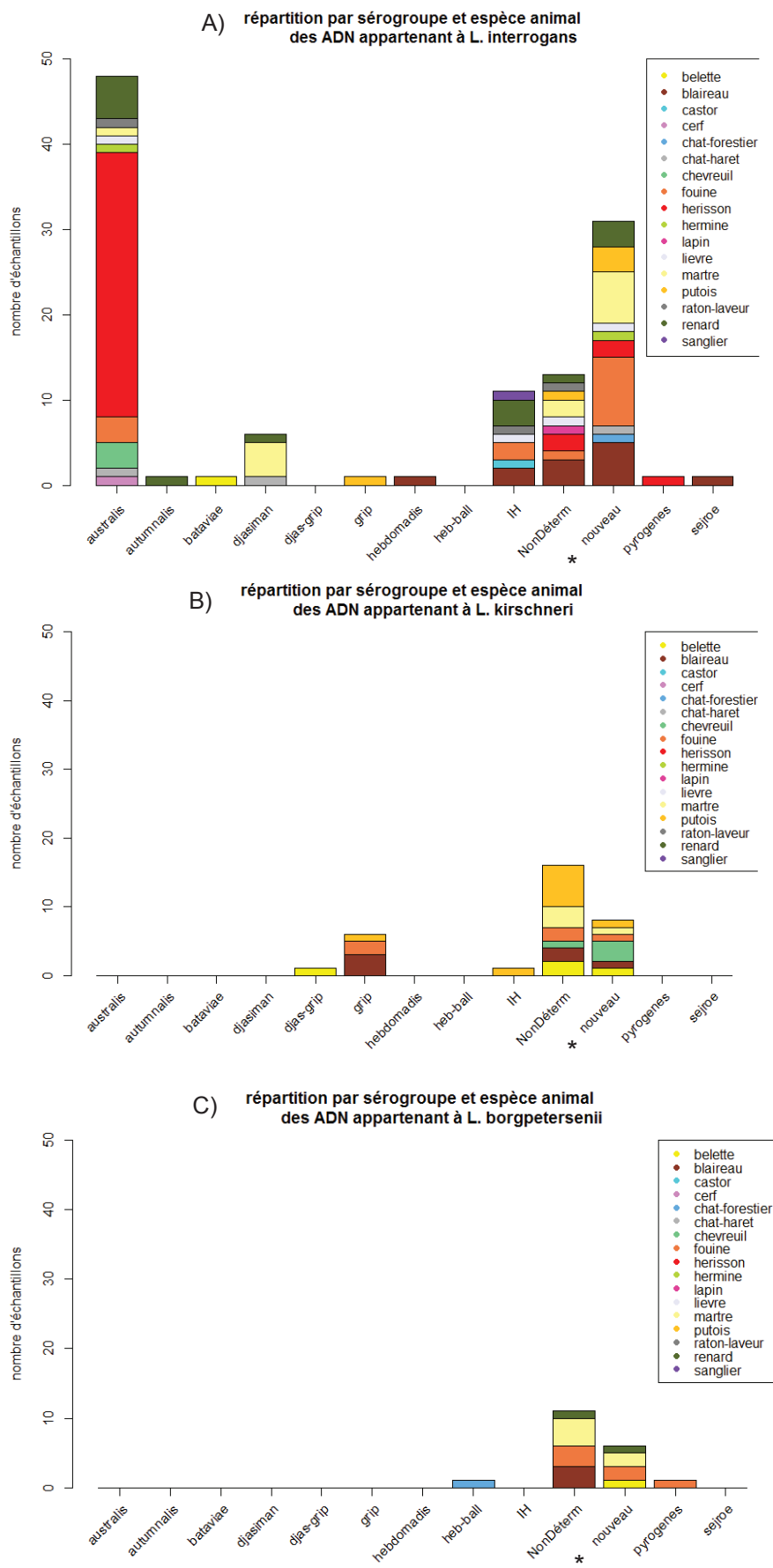


Figure 3 : Répartition des échantillons identifiés en fonction de leur sérotype et de l'espèce animale considérée, chez *L. interrogans* (A), *L. kirschneri* (B) et *L. borgpetersenii* (C).

* La catégorie « nouveau » est constituée d'échantillons ayant des profils non référencés pouvant probablement être des nouveaux profils.

4- Discussion

Ce travail est la première étude réalisée sur une population de grande taille et ciblant plusieurs espèces de mammifères de la faune sauvage en France. De plus, elle est basée intégralement sur l'analyse et le typage moléculaire permettant une caractérisation plus précise des leptospires chez les espèces cibles. Ceci permet d'éviter les biais existant lors de l'utilisation des techniques sérologiques.

Nous avons mis en évidence le fait que le hérisson serait un porteur de *L. interrogans* séro groupe Australis et les mustélidés seraient porteurs de leptospires de manière générale. La recrudescence de certains sérogroupes, comme Australis, pourrait être due à des réservoirs présents dans la faune sauvage et qui maintiennent les leptospires dans l'environnement, augmentant ainsi la probabilité des contacts entre les leptospires et les hôtes accidentels, tel que l'homme et les animaux domestiques.

Nous avons également identifié de probables « nouveaux » profils qui ne sont pas encore référencés dans les bases de données. Ces ADN pourraient appartenir potentiellement à de nouvelles souches de leptospires qui n'ont pas encore infecté l'homme. Les bases de référence des méthodes de typage VNTR et MST ont été principalement établies à partir de leptospires isolés de cas de leptospirose humaine. Ceci pourrait expliquer le manque de profil correspondant à nos souches issues de la faune sauvage de ces bases de données. Nous pouvons nous interroger sur l'émergence potentielle de ces souches dans un futur proche, suite notamment à l'augmentation des zones de contact entre l'homme et la faune sauvage par une urbanisation des environnements ruraux.

Annexe VI: Article « The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats: a survey in Rhône, France (2010-2012) » ; Ayrat F, Artois J, Zilber AL, Widén F, Pounder KC, Aubert D, Bicout DJ, Artois M. ; Epidemiol Infect. 2015

The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats: a survey in Rhône, France (2010–2012)

F. AYRAL^{1*}, J. ARTOIS², A.-L. ZILBER¹, F. WIDÉN³, K.C. POUNDER⁴,
D. AUBERT⁵, D. J. BICOUT⁶ AND M. ARTOIS¹

¹ WildTech, PERS, Université de Lyon-VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France

² Université de Rennes 2, Rennes Cedex, France

³ The National Veterinary Institute (SVA), Department of Virology, Immunobiology and Parasitology, Uppsala, Sweden

⁴ Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Liverpool, UK

⁵ Laboratory of Parasitology, EA 3800, SFR CAP-Santé FED 4231, National Reference Centre on Toxoplasmosis, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims Cédex, France

⁶ Biomathématiques et Epidémiologie, EPSP-TTMC, UMR CNRS 5525, UFJ, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile

Received 13 December 2013; Final revision 24 March 2014; Accepted 21 April 2014

SUMMARY

Leptospira interrogans, hantaviruses (particularly Seoul virus), hepatitis E virus (HEV), and *Toxoplasma gondii* are rat-associated zoonoses that are responsible for human morbidity and mortality worldwide. This study aimed to describe the infection patterns of these four pathogens in wild rats (*Rattus norvegicus*) across socioeconomic levels in neighbourhoods in Lyon, France. The infection or exposure status was determined using polymerase chain reaction or serology for 178 wild rats captured in 23 locations; additionally, confirmatory culture or mouse inoculation was performed. Multivariate logistic regression analyses were used to investigate whether morphological and socioeconomic data could predict the infection status of the rats. This study revealed that the rat colony's age structure may influence the prevalence of *L. interrogans*, hantavirus, and HEV. In addition, areas with high human population densities and low incomes may be associated with a greater number of infected rats and an increased risk of disease transmission.

Key words: Hepatitis E virus, *Leptospira interrogans*, Norway rats, *Toxoplasma gondii*, Seoul virus.

INTRODUCTION

Wildlife is estimated to be responsible for 72% of emerging infectious diseases in humans [1]. Key among wildlife species, *Rattus norvegicus* is prevalent worldwide and harbours rat-borne zoonoses (RBZs) [2], such as *Leptospira interrogans*, hantaviruses,

hepatitis E virus (HEV), and *Toxoplasma gondii*. These RBZs are responsible for potentially life-threatening human infections and have raised public health concerns in Europe.

Leptospirosis (caused by *L. interrogans sensu lato*), an acute bacterial infection in humans, was recently recognized as an emerging public health problem [3]. *Leptospira* are maintained by a wide range of hosts, and *R. norvegicus* is reportedly the primary carrier [4]. The bacteria are shed in the hosts' urine and can survive for prolonged periods. Occupational

* Author for correspondence: Dr. F. Ayral, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy l'Etoile, France.
(Email: florence.ayral@vetagro-sup.fr)

and recreational exposures to contaminated water bodies in proximity to various host species are commonly reported risk factors. However, cities, particularly environments with poor hygiene, are the primary source of rat-associated leptospirosis [5].

Haemorrhagic fever with renal syndrome is a mild to severe human disease caused by viruses from the genus *Hantavirus*, family Bunyaviridae [6]. Each hantavirus species is carried by a specific rodent host species; Seoul virus (SEOV) has been found to be carried by *R. norvegicus* worldwide [2]. Unlike in Asia, few confirmed occurrences were reported in Europe before the recent emergence in the UK and France [7, 8]. Hantavirus is shed in the excreta of infected hosts, and the primary transmission pathways are the inhalation of suspensions of contaminated dust and the passage of infected saliva through bites [9]. Areas with growing rodent populations are at increased risk for human infection [10].

HEV is widespread and causes acute hepatitis in humans. A variety of HEV strains have been identified in Norway rats from Europe without any evidence of zoonotic pathogenicity [11, 12]. However, zoonotic HEV has been reported in the USA [13], confusing the role of rats as a disease reservoir for humans and livestock.

Toxoplasmosis is a highly prevalent parasitic disease worldwide and is caused by the protozoan *T. gondii*. Humans become infected after ingesting food contaminated with *T. gondii* oocysts. Vertical transmission is particularly concerning for humans, as *in utero* infection can cause abortion or congenital defects [14]. Although cats are the only hosts known to excrete the infectious form, the parasite cycle involves most warm-blooded vertebrate species, including Norway rats. As felids' prey, rats are important in the parasite life cycle and in human toxoplasmosis epidemiology.

The Norway rat is a synanthropic species that uses human habitats for shelter and food. Impoverished inner cities have been targeted for RBZ investigations because it is assumed that poor hygiene conditions, infrastructure disrepair, and low health status may lead to contact between rats and humans, and potentially to RBZ transmission [15]. Conditions in impoverished cities may also be related to high numbers of infected and shedder rats, which are responsible for rapidly spreading pathogens in human habitats and increased human exposure. However, no previous studies have investigated whether impoverished inner cities have a higher prevalence of infected rats.

A description of RBZ carriage in Norway rats across socioeconomic indices increases the knowledge of the related health risks. A more complete understanding of zoonotic infection in rats would mitigate their role in spreading zoonotic diseases by increasing awareness among healthcare professionals and supporting the development of appropriate surveillance.

The aims of the present study were (1) to describe the prevalence of the four pathogens in the Lyon region, France, (2) to identify the risk factors for infection in Norway rats, and (3) to define the potential socioeconomic indicators for human exposure in the Lyon region. Thus, trapping was performed on an urbanization gradient in and around Lyon. Multivariate models were built to predict the pathogen carriage status of the rats; morphological and socioeconomic data were used as independent variables.

METHODS

Study area

The study area comprised 23 locations in the Rhône department (i.e. administrative spatial unit) of France, which encompasses the city of Lyon and 14 farms within 30 km of our laboratory (45° 47' 30-93' N; 4° 42' 30-28' E). This area contains a range of urbanization levels. Farms were requested to participate based on their inclusion in previous surveys, and all agreed. The dwellings and public areas were selected based on high rat concentrations reported by the Hygiene Service of Lyon.

Most farms were medium to large size (i.e. >100 animals) with mixed livestock. The nine urban trapping locations were distributed in dwelling areas, public gardens, waste disposal areas, and an industrial area in the city centre and suburbs.

Sampling

The survey was subdivided into 6-month periods: (1) September 2010 to February 2011 and (2) October 2011 to March 2012. To account for possible seasonal variation in the pathogen prevalence, the two periods encompassed the same season. The sampling size ($n \approx 90$) was calculated using a 95% confidence level, a relative accuracy of 50%, and an expected prevalence of 10–30% [16]. To account for possible variation in the pathogen prevalence among different urbanization levels, the same sample size was used

in areas of low and high population density. During the two periods, 178 free-living Norway rats were trapped in areas of low ($n = 94$) and high ($n = 84$) population density.

Most rats were captured with small (28 cm × 9 cm × 9 cm) or large (50 cm × 15 cm × 15 cm) single-catch rat traps. The captured rats were transported to the laboratory and immediately anaesthetized using isoflurane. A blood sample was obtained by cardiac puncture. Subsequently, the rats were sacrificed by cervical dislocation. The rats that succumbed to capture were frozen at -20°C and thawed on the day of dissection. Data were recorded on weight, size, sex, sexual maturity (i.e. the presence of seminal vesicles in males and a developed uterus in females) and pregnancy. Lung and liver lobe fragments weighing between 50 and 100 mg were collected, and the kidney was removed. The heart was incorporated in an antibiotic solution with 1.2×10^{-5} g/ml amoxicillin (Amoxicilline Panpharma, France), 120 UI/ml penicillin and 120 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (Pen-Strep Liq 10000, Gibco, USA). Faecal samples were collected from the rectum, and all tissue and faecal samples were stored at -80°C immediately following collection.

The authors assert that all procedures contributing to this work comply with the ethical standards of the relevant national and institutional guides on the care and use of laboratory animals (agreement no. 69-020931).

Screening protocols

L. interrogans colonization of the kidney was assessed via culture [17] and a pathogen-specific *L. interrogans* TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR) kit (TaqVet PathoLept kit, LSI, France); additionally, the *rpoB* gene was targeted. Lung tissues were screened for hantavirus using a nested pan-hantavirus reverse transcription (RT)-PCR selective for partial polymerase large segment (L) gene sequences, subsequent molecular typing was performed to determine the hantavirus species as previously described [18]. The HEV viral load in the liver and faeces was analysed using TaqMan real-time PCR reagents specific to rat-strain HEV and genotypes 1–4 [19]. Sera extracted from blood-soaked blotters were tested for *T. gondii* antibodies using a modified agglutination test (MAT) that detects *T. gondii*-specific IgG antibodies [20]. The hearts of animals with a positive agglutination (starting dilution 1:6) were bioassayed in mice to isolate viable *T. gondii* [21].

Prevalence calculation

L. interrogans, SEOV, and HEV were screened based detecting pathogen nucleic acid sequences or the microorganism itself; rats testing positive were considered to be infected and potential shedders of the pathogens. The rats with MAT-positive results were considered to be exposed because the presence of antibodies against the pathogen could result from previous or current contact with the pathogen. The prevalence of infected or exposed rats was defined as the proportion of rats with any positive test results. The apparent prevalence was restricted to the population sampled since and the administrative unit of the Rhône department

Variables

Two categories of explanatory covariates were considered: rat-related and socioeconomic covariates. Rat survival during the trapping was also considered, as death and freeze–thaw cycles before dissection could alter the sample quality and underestimate the prevalence.

The rat data included the species (determined by external morphology and macroscopic observations), sex, weight, size, and approximate age, based on sexual maturity and pregnancy. A body mass metric was constructed from the residuals that resulted from the regression of weight on size [22]. The capture success, a proxy of the population size, was accurately defined in five sites by

$$\text{capture success} = \frac{n_i}{t_i \times d_i},$$

where n_i is the number of rats captured, t_i the number of traps set and d_i the number of days of trapping at the site i .

The extent and features of urbanization were characterized using the socioeconomic data. Eleven candidate variables were extracted from the 2009 national census data provided by the Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques. Remotely sensed data were obtained at the smallest geographical unit, which is the Ilot Regroupé pour l'Information Statistique (IRIS). Each IRIS contains 2000 inhabitants. The socioeconomic variables are displayed in Table 1.

Spatial analysis

The location and number of rats in each trapping area that tested positive and negative were mapped using

Table 1. Description of socioeconomic covariates

Covariates	Name of covariate	Definition
Human population density	Human population	Population/surface (km) ²
Median income of the population	Income	Median incomes of the population included in the IRIS
Population growth from 1999 to 2009	Population growth	Population in 2009/population in 1999
Percentage of 20–64 years age group	Population age	20–64 years age group/total population
Percentage of flats	Per cent flat	Number of flats/number of flats+ houses
Percentage of small flats	Per cent small flat	Number of 1- and 2-room dwellings/number of dwellings
Ratio of renters and owners	Ratio renter/owner	Number of renters/number of owner of their residency
Ratio of low-income dwellings (LID)	ratio LID	Number of LID rented/number of other rented dwellings
Percentage of ungraduated population	Level of graduation	Population aged >15 years without a diploma/population aged >15 years
Ratio of large and small families	Family size	Family with at least three children/family with two or fewer children
Ratio of unemployment	Rate of unemployment	Number of unemployed people/number of employed people

ArcGIS version 9.3 (ESRI, USA). Spatial clusters of high and low pathogen prevalence were identified using the Getis-Ord G_i^* statistic. The local sum for features and the feature's neighbours were compared proportionally to the sum of all features. When the local sum was statistically significantly different from the expectation, the region was denoted as having low or high prevalence.

To identify the potential socioeconomic proxies of RBZ, the candidate variables from the census data sets were extracted from the IRIS units with trapping locations. An approach using various boundaries for the quadrats when extracting data was implemented to verify the effects of different spatial scales on the risk factors [23]. The socioeconomic data were extracted using four quadrat sizes: 100 m × 100 m, 200 m × 200 m, 400 m × 400 m, and 800 m × 800 m. The socioeconomic metrics for each quadrat were calculated by weighting the remotely sensed data by the percentage of the IRIS surface that was included in the quadrat. For each spatial level of analysis, a new data set was obtained by spatial query using the software R project version 3.0.1 (R Development Core Team, Austria) and ArcGIS version 9.3 (ESRI, Redland, CA, USA).

Statistical analysis

To identify the characteristics associated with each pathogen's carriage status, distributions of the explanatory variables were examined within the samples

testing positive and negative. χ^2 tests and Wilcoxon tests were used, as appropriate, and an alpha level of 0.05 was used to reject the null hypothesis. For each pathogen, the potential effect of the population size on the number of infected rats in the trapping sites was assessed by testing the Pearson correlation between the capture success and the related number of infected rats. An α -level of 0.05 was used to reject the absence of correlation. The result obtained determined whether the capture success had to be considered in the models.

Statistical modelling was performed to evaluate the use of rat-related criteria and socioeconomic indices as predictors of exposure or infection in rats. All remotely sensed data were transformed to be normally distributed when they were incorporated into the models, and missing data were not considered. Simple logistic regression (SLR) was used to examine the relationship between each pathogen's prevalence and the explanatory variables. Covariates that were significantly associated with pathogen infection or exposure at an α -level of 0.10 were considered for further analysis. To select independent variables, rat-related covariates were tested for multicollinearity using Spearman's rank correlation ($\rho > 0.7$) with the Hmisc package in R, whereas socioeconomic covariates were described with a principal component analysis (PCA) using the FactoMineR package in R. From the PCA result, one variable per main axis was chosen based on the comprehensiveness of the data. Selected covariates were incorporated into multivariate models.

Table 2. The percentage of positive tests for each pathogen and the distribution of positive test results among the performed tests

Pathogens (no. of rats tested)	<i>L. interrogans</i> (n = 171)	SEOV (n = 127)	HEV (n = 142)	<i>T. gondii</i> (n = 77)
Percentage of positive tests	26% (n = 45/171)	14% (n = 18/127)	14% (n = 20/142)	8% (n = 6/77)
95% Confidence intervals	20–33%	8–20%	8–20%	2–14%
Tests	RT-PCR	Nested PCR	RT-PCR	RT-PCR
Materials	Kidney	Lung	Liver	Feces
No. of positive tests	44	18	18	12
				MAT
				Blood blot
				6
				Bioassay
				Heart
				0

The variation inflation factors were calculated with the car package in R to verify a low effect of potential collinearity (<5).

When the effect of rat death during capture was significantly associated with the infection status in SLRs, the data set was adjusted to account for a possible sample alteration effect.

For each pathogen, two multivariate logistic regression models were implemented. The selected covariates were incorporated into a generalized linear model (GLM) as fixed effects. The final GLM was selected using Aikake's Information Criterion (AIC) to balance model fit and parsimony. Then, the adjusted effects of the variables included in the final GLM were estimated with a generalized linear mixed model (GLMM) to control for the random effect of trapping locations and to account for the potential effects of clustering.

The remotely sensed data extracted from the quadrats were considered for each socioeconomic variable included in the final GLMs. A new set of models was created to account for the possible influence of changing spatial scales on the adjusted effects.

RESULTS

Rat population

During the two collection periods (37 and 39 days), 178 rats were trapped and sampled (54% male). About two-thirds (63%) of the rats were adults, and 18 of the 58 adult females were pregnant (31%). The ratio of sexually immature to mature rats was similar between the farm (ratio = 40:54) and city centre (ratio = 43:58) sites. However, at the city centre sites, the ratio was lower in dwellings (ratio = 5:37) than in industrial areas (ratio = 19:4).

Pathogen detection

Norway rats were the primary carrier and potential shedder of *L. interrogans* (26% prevalence), SEOV (14%), and rat-specific-HEV (14%). Eight per cent of the rats with a MAT titre of $\geq 1:6$ were previously exposed to *T. gondii*. Among the 77 hearts, 58 were bioassayed in mice. Twenty-four bioassays were inconclusive because the mice did not survive past 48 h post-infection, and *T. gondii* was not isolated from the 34 other bioassays (Table 2).

Among 120 Norway rats screened for *L. interrogans*, SEOV, and HEV, 50 (42%) were infected with at least one pathogen. A single pathogen was detected

in the majority of infected rats ($n=31/50$); the rest were co-infected with at least two agents. The proportion of rats infected with SEOV or HEV ($n=34$) and co-infected with *L. interrogans* ($n=19$) was significantly higher than the proportion of rats infected by *L. interrogans* alone (Pearson's $\chi^2=14.63$, D.F.=1, $P=0.0001$); the odds ratio (OR) of being co-infected by *L. interrogans* and SEOV or HEV was 5.54 [95% confidence interval (CI) 2.1–14.4]. Three of the infected rats were simultaneously carrying *L. interrogans*, SEOV, and HEV (see Supplementary online material).

The percentage of infected rats at the trapping sites varied: 0–65% for *L. interrogans*, 0–30% for SEOV, 0–61% for HEV, and 0–25% for *T. gondii*. The spatial distribution of sites with significantly higher or lower infected rats differed among the four pathogens. Nevertheless, high prevalence clusters were encountered for each pathogen in the Lyon region (Fig. 1).

For each pathogen, Pearson's coefficient which characterized the relationship between the capture success and the number of infected rats was not significantly different from zero (all P values >0.14). Thus, no correlation between the capture success and the number of infected individuals could be demonstrated.

Characterization of infection correlates in rats

L. interrogans carriage

From the SLR models, the OR of testing positive for *L. interrogans* was greater in sexually mature rats than in sexually immature rats. However, no significant relationship was observed between the infected rats and gender, body condition, or pregnancy (Table 3). The relationship between 10 normalized socioeconomic covariates and *L. interrogans* positivity was statistically significant (all P values ≤ 0.05).

The multivariate analyses incorporated sexual maturity, human population density (HPD), and median income as independent covariates (multicollinearity test results are not shown). In the final GLM, the OR of being *L. interrogans*-positive was greater in adults than juveniles (OR 4.0, 95% CI 1.6–9.9), and the OR increased with increasing normalized HPD (OR 1.8, 95% CI 1.2–2.7) and decreasing normalized income (OR 0.6, 95% CI 0.4–0.9). The relationship between these variables and *L. interrogans* positivity aligned but with decreased magnitude compared to the SLR. After controlling for clustering trapping locations using GLMMs, the ORs were nearly identical to the ORs obtained with a GLM. The estimated

variance for the random effect of trapping locations was 0.007% of the total residual variance. The GLM was maintained for further analysis and used as the simplest model.

Among 155 rats analysed, 30% ($n=47$) died after trapping and were frozen and thawed before dissection. The OR of being *L. interrogans*-positive was greater for the surviving rats and the fresh samples compared to the frozen rats. Because there was a strong correlation between rat freezing and rat survival in the field, the effects of freezing and survival could not be differentiated. After adjusting the model for rat survival, the relationships between explanatory variables and *L. interrogans* positivity were similar to the results from the model that was not adjusted for survival. The relationships from the adjusted model were as follows: sexual maturity (OR 3.4, 95% CI 1.3–8.5), normalized HPD (OR 1.9, 95% CI 1.2–2.8), and normalized income (OR 0.6, 95% CI 0.4–0.8).

SEOV carriage

The results from the SLR models suggested that the OR of being SEOV-positive was greater in sexually mature rats than in sexually immature rats. There was no significant difference in the relationships between body condition, gender or pregnancy, and SEOV positivity. The relationships between seven normalized socioeconomic covariates and SEOV positivity were statistically significant (all P values ≤ 0.05).

The multivariate analyses incorporated sexual maturity, HPD, and income as independent covariates. In the final GLM, sexual maturity and the normalized incomes of the population were retained. The OR of being SEOV-positive increased with decreasing normalized income (OR 0.5, 95% CI 0.3–0.8) and appeared to be greater in adults than juveniles, although not statistically significant (OR 6.2, 95% CI 1.1–34) for the latter group. In bivariate analyses, the relationship between these variables and SEOV positivity aligned but with increased magnitude. Similar results were obtained by accounting for clustering of the trapping locations in a GLMM. In the selected GLMM, the estimated variance for the random effect of trapping locations was 8.88, accounting for 99% of the total residual variance.

HEV carriage

The results from the SLR models suggested that the OR of being HEV-positive was greater in sexually



Distribution of infected rats in the Rhône including the city of Lyon

Sample size*

☆	☆	☆	High level of infected rats
▲	▲	▲	Low level of infected rats
○	○	○	Not significant
<div style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #333; border: 1px solid #000;"></div> Lyon city centre			
<div style="display: inline-block; width: 15px; height: 15px; background-color: #ccc; border: 1px solid #000;"></div> Rhône department			

*Sample size: small=[1-6] rats; middle=[7-12] rats; large=[13-23] rats



Fig. 1. The distribution of clusters of low (full triangle) and high (star) prevalences of the four pathogens detected in rats trapped in the Rhône department, France.

Table 3. Unadjusted and adjusted odds ratios for testing positive for *Leptospira interrogans*, *SEOV*, *HEV* or *Toxoplasma gondii* among Norway rats

Covariates	Modes	<i>L. interrogans</i> status (n=171)				SEOV status (n=127)				HEV status (n=142)				<i>T. gondii</i> status (n=77)				
		SLR	GLM	GLMM*	GLMM†	SLR	GLM	GLMM†	GLMM‡	SLR	GLM	GLMM†	GLMM‡	SLR	GLM	GLMM	GLMM	
		OR	aOR	aOR	aOR	OR	aOR	aOR	aOR	OR	aOR	aOR	aOR	OR	aOR	aOR	aOR	aOR
Survival after trapping	Dead	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	—
	Alive	2 (1.1-3.6)	—	—	—	2.2 (0.9-5.2)	—	—	—	2.2 (0.5-2.8)	—	—	—	1.2 (0.5-2.8)	—	—	—	—
Rat preservatives	Frozen	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	—
	Fresh	3.3 (1.5-7.4)	—	—	—	1.7 (0.6-4.5)	—	—	—	1.2 (0.5-3.1)	—	—	—	1.2 (0.5-3.1)	—	—	—	—
Sex	Female	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	—
	Male	1.7 (0.9-3.2)	—	—	—	1.5 (0.6-3.6)	—	—	—	1 (0.4-2.4)	—	—	—	1 (0.4-2.4)	—	—	—	—
Maturity	Juvenile	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	—
	Adult	7.3 (3.1-16.6)	4.0 (1.6-9.9)	4.0 (1.3-11.9)	—	9 (1.6-55)	6.2 (1.1-34)	10.5 (0.8-138)	—	4.4 (1.5-14.3)	2.2 (0.7-7)	2.6 (0.5-14.7)	—	4.4 (1.5-14.3)	—	—	—	—
Pregnancy	No	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	Ref.	—	—	—	—
	Yes	1.5 (0.5-4.1)	—	—	—	0.4 (0.1-2.5)	—	—	—	1.1 (0.2-5)	—	—	—	1.1 (0.2-5)	—	—	—	—
Body condition	Human population	1 (0.9-1.0)	—	—	—	1 (0.9-1)	—	—	—	0.9 (0.9-1.0)	—	—	—	0.9 (0.9-1.0)	—	—	—	—
	Incomes (median)	3.2 (2.3-4.3)	1.8 (1.2-2.7)	1.8 (1.1-2.9)	—	1.9 (1.3-2.7)	0.5 (0.3-0.8)	0.4 (0.1-2.1)	—	1.7 (1.2-2.4)	0.3 (0.2-0.5)	0.3 (0.1-0.8)	—	1.2 (0.7-2.3)	1-02 (1-01-1-03)	—	—	—
Population expansion	Population age	1.1 (0.8-1.5)	—	—	—	1.4 (0.9-2.3)	—	—	—	1.4 (0.9-2.2)	—	—	—	1.3 (0.8-2.2)	—	—	—	—
	Per cent flat	0.6 (0.4-0.9)	—	—	—	0.2 (0.02-1.3)	—	—	—	0.1 (0.01-1.2)	—	—	—	0.7 (0.4-1.4)	—	—	—	—
	Per cent small flat	2.6 (1.9-3.6)	—	—	—	1.6 (0.9-2.5)	—	—	—	1.5 (0.9-2.2)	—	—	—	0.7 (0.3-1.6)	—	—	—	—
Ratio renter/owner	Ratio LID	3.0 (2.1-4.2)	—	—	—	1.6 (1.1-2.6)	—	—	—	1.5 (1.0-2.3)	—	—	—	1.1 (0.4-2.8)	—	—	—	—
	Level of graduation	4.2 (2.2-8.0)	—	—	—	0.6 (0.3-1.1)	—	—	—	0.5 (0.3-1.1)	—	—	—	1.2 (0.8-2.0)	—	—	—	—
Family size	Rate of unemployment	3.1 (2.3-4.3)	—	—	—	2.7 (1.7-4.2)	—	—	—	2.4 (1.6-3.6)	—	—	—	0.9 (0.5-1.6)	—	—	—	—
	Rate of unemployment	2.8 (2.1-3.8)	—	—	—	2.2 (1.5-3.2)	—	—	—	2.8 (1.8-4.1)	—	—	—	0.1 (0.0-7.3)	—	—	—	—
	Rate of unemployment	3.1 (2.3-3.4)	—	—	—	2.6 (1.7-4.1)	—	—	—	2.6 (1.7-3.9)	—	—	—	0.8 (0.5-1.5)	—	—	—	—
	Rate of unemployment	3.1 (2.3-4.2)	—	—	—	2.3 (1.5-3.4)	—	—	—	2.5 (1.7-3.8)	—	—	—	0.8 (0.5-1.4)	—	—	—	—

SLR, Simple logistic regression; GLM, generalized linear model; GLMM, generalized linear mixed model; OR, odds ratio; aOR, adjusted odds ratio; n.a., not applicable; LID, low-income dwelling.

* Variance of the random effect = 0.007.

† Variance of the random effect = 1.7.

‡ Variance of the random effect = 8.9.

All results in bold were significantly different from 1 at $\alpha \leq 0.05$.

Table 4. Adjusted odds ratios using the final GLM or GLMM and incorporating the human population density (HPD) and median income (MI) by quadrat (a, b, c, d)

Covariates		<i>L. interrogans</i> status*			SEOV status†			HEV status‡		
		aOR	95% CI	P	aOR	95% CI	P	aOR	95% CI	P
Maturity	Juveniles	Ref.			Ref.			Ref.		
	Adults	3.4	(1.4-8.5)	0.01	9.3	(0.7-124)	0.09	2.1	(0.4-11.4)	0.38
HPD (a)		2.0	(1.4-2.9)	0.01	—	—	—	—	—	—
MI (a)		0.7	(0.5-1.0)	0.19	0.4	(0.03-5.8)	0.44	0.3	(0.1-0.7)	0.007
Maturity	Juveniles	Ref.			Ref.			Ref.		
	Adults	3.6	(1.8-8.9)	0.02	7.9	(0.6-100)	0.11	3.9	(0.6-24.8)	0.14
HPD (b)		2.1	(1.5-3.0)	<0.001	—	—	—	—	—	—
MI (b)		0.6	(0.4-0.8)	0.02	0.01	(0.0-1.7)	0.08	0.5	(0.1-2.1)	0.38
Maturity	Juveniles	Ref.			Ref.			Ref.		
	Adults	3.2	(1.3-8.3)	0.04	7.9	(0.6-100)	0.11	4.6	(0.8-27)	0.03
HPD (c)		2.8	(2.0-4.1)	<0.001	—	—	—	—	—	—
MI (c)		0.4	(0.3-0.7)	0.007	0.006	(0.0-0.6)	0.03	0.6	(0.1-2.1)	0.41
Maturity	Juveniles	Ref.			Ref.			Ref.		
	Adults	3.8	(1.5-9.3)	0.01	6.8	(0.5-84)	0.13	4.3	(0.7-27.9)	0.126
HPD (d)		2.3	(1.6-3.4)	<0.001	—	—	—	—	—	—
MI (d)		0.5	(0.3-0.8)	0.02	0.02	(0.0-0.4)	0.009	0.7	(0.2-2.6)	0.63

aOR, Adjusted odds ratio; CI, confidence interval.

* aOR, 95% CI and *P* values obtained using the final *L. interrogans* GLM.

† aOR, 95% CI and *P* values obtained using the final SEOV GLMM.

‡ aOR, 95% CI and *P* values obtained using the final HEV GLMM.

mature rats than sexually immature rats. The relationships between eight normalized socioeconomic covariates and HEV positivity were statistically significant (all *P* values ≤ 0.05).

The multivariate analyses used sexual maturity, HPD, and income as independent covariates. In the final GLM, sexual maturity and normalized income were retained. The OR of being HEV-positive increased with decreasing normalized income (OR 0.4, 95% CI 0.2-0.6) and appeared to be greater in adults than juveniles, although results in the latter group were not statistically significant (OR 2.2, 95% CI 0.7-7). In bivariate analyses, the relationship between these variables and HEV positivity aligned but with increased magnitude. Similar results were obtained by accounting for clustering trapping locations using a GLMM. In the selected GLMM, the estimated variance for the random effect of trapping locations was 1.631, accounting for 7% of the total residual variance.

T. gondii exposure

The results from the SLR models suggested that only body mass was significantly higher in rats exposed to

T. gondii ($P \leq 0.05$). Thus, the multivariate analysis was not investigated.

Test of the spatial extents of remotely sensed extracted data

The new datasets extracted from the four quadrats were incorporated into the final models selected for *L. interrogans* infection status (see Supplementary online material). The *P* values associated with the relationship between infection status and the covariates decreased with increasing quadrat size. Larger quadrats displayed a better goodness-of-fit model (Table 4). Spatial distributions of the covariates are shown in Figure 2; areas of higher and lower levels of *L. interrogans* infection were mainly located in densely populated and low-income areas.

DISCUSSION

This study evaluated the risks of four potentially zoonotic pathogens in Norway rats in Lyon. We demonstrated that rats in human habitats were infected or exposed and probably shed *L. interrogans*, SEOV, HEV, and *T. gondii*. Based on logistic regression

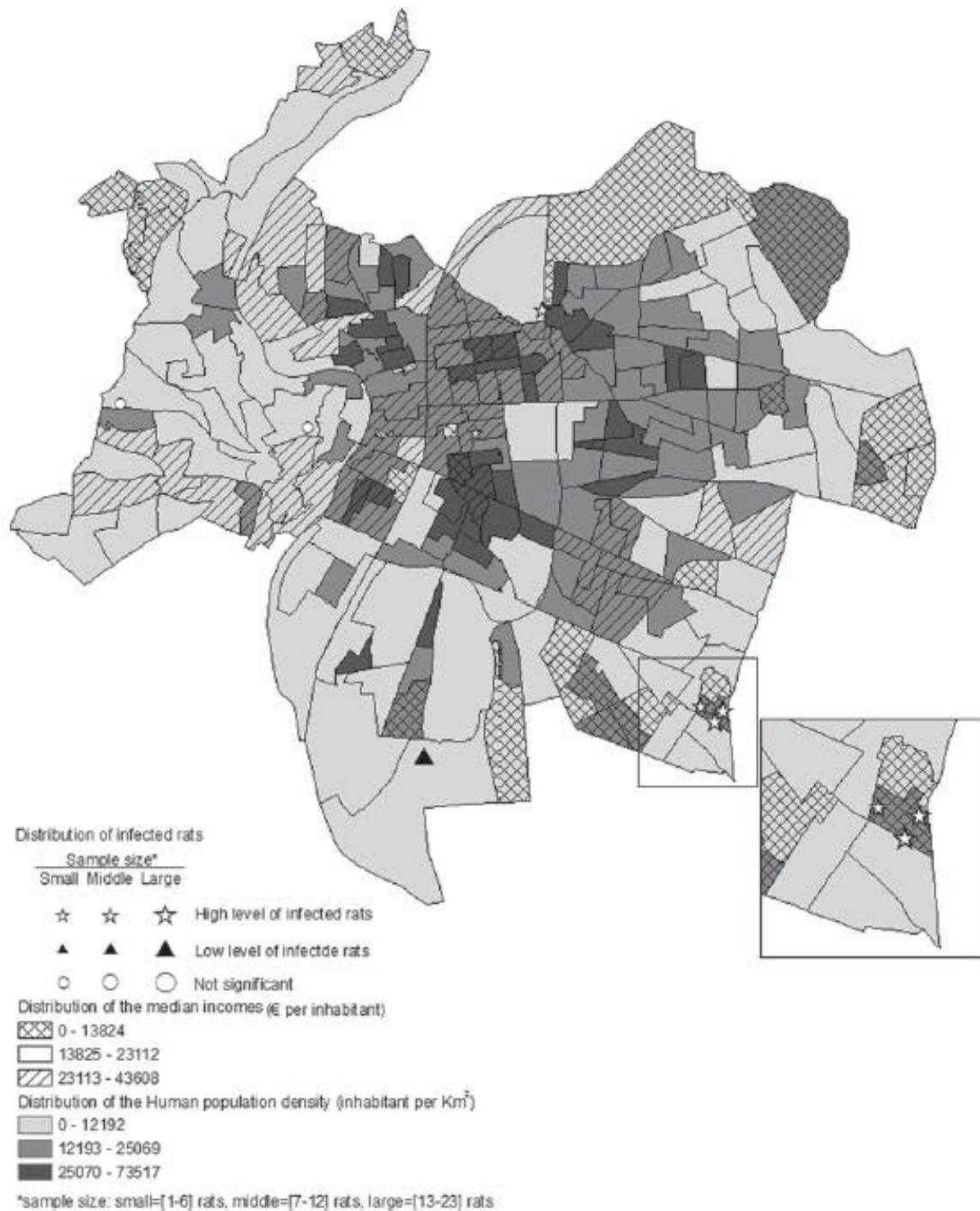


Fig. 2. The spatial distribution of human population density and median incomes in Lyon city centre overlaid with high and low prevalence of *L. interrogans* carriage in Norway rats.

models, our study suggests that populated and/or low-income areas of the Rhône department may encompass an increased number of infected rats. Below, the spatially explicit approach and detection methods are expanded upon to explain how the identified risk factors might be used in targeted surveillances.

Spatial analysis methodology

The risk analysis demonstrated an overlap of densely populated, low-income urbanized areas and Norway rats with *L. interrogans*, SEOV, and HEV infections. Socioeconomic data collected by the INSEE census are most commonly aggregated at the administrative

boundary or census areal unit level. Spatial scale can affect the strength and significance of statistical associations, which is known as the modifiable areal unit problem (MAUP) [23]. To minimize the MAUP effect in statistical inference, the covariates can be analysed at hierarchical levels of areal units from the finest to the coarsest resolution to confirm consistent model results [24]. Five hierarchical levels of census units were used in this study. Only the smallest unit failed to confirm the relationship between socioeconomic data and *L. interrogans* positivity, suggesting that HPD and median incomes are robust covariates in predicting the *L. interrogans* infection status in rats, as the ORs were similar when the spatial scale was changed. The ability of HPD and income to predict *L. interrogans* infection in rats aligns with previous studies demonstrating the distribution of human leptospirosis in impoverished inner-city areas [25].

Pathogen detection

Generally, screening tests used in wildlife species were developed for humans or domestic species and do not have gold standards, as in the case of wild rats. Bacteria recovery from an individual kidney by bacteriological culture was used as the definitive diagnostic of *L. interrogans* and was considered to be appropriate for early detection because kidney colonisation occurs in the first week of *Leptospira* infection [26]. However, this culturing method is insensitive, and the bacterial isolation frequency is typically low. Thus, qPCR was also performed because it is reportedly the most sensitive human analysis [27]. False negatives can still be obtained when PCR is used for undescribed pathogenic strains [28] or the bacteria are aggregated in an unsampled part of the kidney. Therefore, a combination of culture and qPCR was relevant; one positive culture and negative PCR were observed in this study. This combination is expected to provide a reliable reflection of *Leptospira* infection in rats. Nevertheless, we found that negative tests were more likely to occur in dead rats for which PCR inhibitors might be responsible for false-negative results [29]. This result suggests that the prevalence, although consistent with a previous survey in France, might be underestimated [4].

The previously reported sequences of SEOV and HEV [18, 19] demonstrate their presence in individuals. Although several lung and liver lobes were sampled, detection may fail when the viral load is not homogeneously distributed throughout the

organs, and areas clear of infection are collected. The combination of HEV-PCR detection on liver and faeces optimized HEV RNA detection; indeed, two individuals were liver-negative and faeces-positive, suggesting that this study may provide an appropriate reflection of rat infection. In addition, the observed prevalence was consistent with previous surveys [30, 31]. Conversely, the prevalence of SEOV might be underestimated.

In domestic animals, the MAT titres of 1:20–1:25 have been validated to detect IgG antibodies to *T. gondii* in sera [32]. The choice of cut-off is usually raised when interpreting serological tests developed for domestic species or humans. In other wildlife species, 1:6 is a biologically relevant threshold because many individuals with titres of 1:6 carry *Toxoplasma* cysts [33]. However, given the low antibody levels of some individuals, all individuals were bioassayed when possible. The absence of *Toxoplasma* detection in mice could be caused by a previous infection that resulted in persistent antibodies, the absence of the parasite in the heart, or parasite death during sample transport. Nonetheless, the 8% of rats exposed to *T. gondii* in the Lyon region and the variation between sites was in agreement with a recent survey in France [34].

Towards a RBZ-targeted surveillance

Considering the propensity of rats to carry zoonotic pathogens, a public health surveillance programme should be developed. However, using aggregated data may misestimate the prevalence, as aggregate data have a heterogeneous spatial distribution. Thus, risk-based surveillance combining the risk of zoonotic pathogen shedding in rats and the risk of rat-human proximity should be developed to assess and mitigate the spread of RBZs. As the transmission of the four pathogens in rats relies on direct (i.e. behavioural) and indirect (i.e. environmental) contacts, both features should be considered to target surveillance and interpret results.

The zoonosis carriage risk in rats appears to be influenced by the colony's age structure. In our study, sexual maturity (particularly increased age) was identified as a risk factor for *L. interrogans*, SEOV, and HEV, as previously described [35, 36]. The potential influence of age on infection status may result from the presence of maternal antibodies, which can persist for several months in rat neonates [37]. Rat infections are also more likely to be acquired with exploratory

behaviour development, which increases with sexual maturity. No male bias was revealed in this study although the likelihood of males acquiring SEOV would be greater due to them having more aggressive encounters and as wounds would be the primary route of SEOV transmission between adult males [38]. Nevertheless, a longitudinal study on rodents revealed that the male bias observed in the prevalence of antibody to hantaviruses varied among trapping sites and was more likely due to habitat, social structure or behavioural variations [39]. The absence of male bias in the present study may be related to its short-term design or to site criteria. Thus, stratified sampling and the colony's age structure should be considered to provide a relevant estimate of RBZ carriage.

We observed a robust relationship between rat infection and socioeconomic covariates which more likely results from a confounding effect of the socioeconomic factors with genuine causal factors. The micro-environment features are suspected to be a causal factor involved in pathogen transmission. As Himsworth *et al.* suggested regarding the relationship between micro-environmental features and *Leptospira* prevalence (i.e. environmental factors likely related to variations in *Leptospira* prevalence) [40], our study additionally suggests to focus on environments associated with dense populations and areas with lower incomes. In this way, the results obtained partially answer a previous report on RBZs highlighting the necessity for public health officials to define environmental features that promote pathogen transmission in rats [41]. By suggesting the infected rat distribution patterns, the socio-economic factors could aid targeting and enhancing surveillance. In addition, the effect of socio-economic factors could result from the related effect of rat population size which may increase in lower income areas because of lower hygiene and lower pest control measures. In our study, the effect of the capture success on the number of infected rats was not revealed and could be explained by its low ability to estimate the population size or specific transmission schemes not population-size-related. Indeed, the rat capture success does not merely depend on population size but also on resources, shelter, age structure of the population or pre-poisoning. Furthermore, the usual method of rodent trapping using grids or transects may not be adapted to urban environments since there are a number of physical barriers as well as adverse effects of human activities. The understanding of the potential ways of

pathogen transmissions (vertical vs. horizontal, direct contact vs. environment) and their relative importance is limited. The population density effect on pathogen prevalence might not be the rule in rat colonies as previously suggested for *L. interrogans* infections [40] although it may depend on the pathogens or colonies. As there is no standard to assess the urban rat population size, a critical lack of information limits our study to exploratory work dedicated to suggesting new approaches for the study of RBZ risks.

CONCLUSION

This study enhances knowledge of the spatial distribution of zoonotic pathogens in Norway rats from the Rhône department. The results suggest that the risk of RBZs is greater in densely populated and lower income areas of Rhône. Given the unprecedented rate of global urbanization and poverty, this study suggests the development of appropriate risk-based surveillance of zoonotic pathogens in Norway rats by targeting reliable indicators of areas with high exposure risks. Although further investigations are required to confirm and refine these findings and to assess the exposure risk in humans, this type of surveillance is required to assess and mitigate the spread of RBZs and to control their potential transmission to humans.

As part of a comprehensive risk assessment, this study should improve prevention measures in the context of a typical 'One Health' approach.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

For supplementary material accompanying this paper visit <http://dx.doi.org/10.1017/S0950268814001137>.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the city of Lyon and its 'Service d'hygiène' (Dr. Gilbert Gault), the waste plant UIOM de Lyon (M Joël Baud), the Parc de la Tête d'Or managers (Dr. David Gomis and Dr. Guillaume Douay), and the Agence d'urbanisation for assisting with rat and census data collection. We thank Philippe Berny and Joffrey Goullois for assisting with rat collections, Emmanuelle Gilot-Fromont for assisting with diagnosis and analysis, Zorée Djelouadji and Lorraine McElhinney (AHVLA) for assisting with screening for *Leptospira* and Seoul virus, respectively, and the Institut National Géographique et Forestière (IGN)

for providing census data. The hantavirus identification was funded by the Defra Surveillance Project SV3037.

This project was supported by the European Commission under the Food, Agriculture and Fisheries and the Biotechnology theme of the Seventh Framework Programme for Research and Technological Development (grant no. 222633), WildTech project WP6 Epidemiology and Risk assessment.

DECLARATION OF INTEREST

None.

REFERENCES

- Jones KE, *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; **451**: 990–993.
- Meerburg BG, Singleton GR, Kijlstra A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Critical Reviews in Microbiology* 2009; **35**: 221–270.
- Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *Journal of Biosciences* 2008; **33**: 557–569.
- Aviat F, *et al.* Leptospira exposure in the human environment in France: a survey in feral rodents and in fresh water. *Comparative Immunology, Microbiology, and Infectious Diseases* 2009; **32**: 463–476.
- Socolovschi C, *et al.* Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France. *International Journal of Infectious Diseases* 2011; **15**: e710–e715.
- Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *The Journal of General Virology* 1996; **77**: 2677–2687.
- Jameson LJ, *et al.* The continued emergence of hantaviruses: isolation of a Seoul virus implicated in human disease, United Kingdom, October 2012. *Eurosurveillance* 2013; **18**: 4–7.
- Macé G, *et al.* Severe Seoul hantavirus infection in a pregnant woman, France, October 2012. *Eurosurveillance* 2013; **18**: 20464.
- Krüger DH, Schönrich G, Klempa B. Human pathogenic Hantaviruses and prevention of infection. *Human Vaccines* 2011; **7**: 685–693.
- Olsson GE, *et al.* Demographic factors associated with hantavirus infection in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerging Infectious Diseases* 2002; **8**: 924–929.
- Johne R, *et al.* Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 2010; **16**: 1452–1455.
- Wolf S, *et al.* The simultaneous occurrence of human norovirus and Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Archives of Virology* 2013; **158**: 1575–1578.
- Lack JB, Volk K, Van Den Bussche RA. Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States. *Emerging Infectious Diseases* 2012; **18**: 1268–1273.
- Jones J, Lopez A, Wilson M. Congenital toxoplasmosis. *American Family Physician* 2003; **67**: 2131–2138.
- Sarkar U, *et al.* Population-based case-control investigation of risk factors for leptospirosis during an urban epidemic. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; **66**: 605–610.
- Thurdfield M. *Veterinary Epidemiology*, 3rd edn. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2007, pp. 232–242.
- Zuerner RL. Laboratory maintenance of pathogenic *Leptospira*. *Current Protocols in Microbiology* 2005; chapter 12: unit 12E.1.
- Dupinay T, *et al.* Detection and genetic characterization of Seoul virus from commensal brown rats in France. *Virology Journal* 2014; **11**: 32.
- Widén F, *et al.* Detection of potentially zoonotic hepatitis E virus in rats captured in an urban area in Lyon France during 2011 and 2012. *Virology Journal* (in press).
- Dubey JP, Desmots G. Serological responses to equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Equine Veterinary Journal* 1987; **19**: 337–339.
- Villena I, *et al.* Evaluation of a strategy for *Toxoplasma gondii* oocyst detection in water. *Applied and Environmental Microbiology* 2004; **70**: 4035–4039.
- Sokal RR, Rohlf FS. *Biometry*. New York: W. H. Freeman, 1981.
- Diez-Roux AV. Multilevel analysis in public health research. *Annual Review of Public Health* 2000; **21**: 191–192.
- Unwin DJ. GIS spatial analysis and spatial statistics. *Progress in Human Geography* 1996; **20**: 540.
- Oliveira DS, *et al.* The socio-demographic, environmental and reservoir factors associated with leptospirosis in an urban area of north-eastern Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 2009; **103**: 149–157.
- Athanazio DA, *et al.* *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonisation by pathogenic *Leptospira* interrogans. *Acta Tropica* 2008; **105**: 176–180.
- Bharti AR, *et al.* Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Diseases* 2003; **3**: 757–771.
- Bourhy P, *et al.* Comparison of real-time PCR assays for detection of pathogenic *Leptospira* spp. in blood and identification of variations in target sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; **49**: 2154–2160.
- Alaeddini R. Forensic implications of PCR inhibition – a review. *Forensic Science International: Genetics* 2012; **6**: 297–305.
- Zhang YZ, *et al.* Hantavirus infections in humans and animals, China. *Emerging Infectious Diseases* 2010; **16**: 1195–1203.
- Kanai Y, *et al.* Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around a pig farm. *BMC Research Notes* 2012; **5**: 4.
- Dubey JP. Validation of the specificity of the modified agglutination test for toxoplasmosis in pigs. *Veterinary Parasitology* 1997; **71**: 307–310.

33. **Richomme C, et al.** Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Veterinary Parasitology* 2009; **164**: 296–300.
34. **Gotteland C, et al.** Species or local environment, what determines the infection of rodents by *Toxoplasma gondii*? *Parasitology* 2013; **18**: 1–10.
35. **Easterbrook JD, et al.** A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA. *Epidemiology and Infection* 2007; **135**: 1192–1199.
36. **Hannah MF, Bajic VB, Klein SL.** Sex differences in the recognition of and innate antiviral responses to Seoul virus in Norway rats. *Brain, Behavior, and Immunity* 2008; **22**: 503–516.
37. **Dohmae K, Nishimune Y.** Protection against hantavirus infection by dam's immunity transferred vertically to neonates. *Archives of Virology* 1995; **140**: 165–172.
38. **Hinson ER, et al.** Wounding: the primary mode of Seoul virus transmission among male Norway rats. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2004; **70**: 310–317.
39. **Calisher CH, Wagoner K.** Demographic factors associated with prevalence of antibody to Sin Nombre virus in deer mice in the Western United States. *Journal of Wildlife Diseases* 2007; **43**: 1–11.
40. **Himsworth CG, et al.** Ecology of *Leptospira interrogans* in Norway rats (*Rattus norvegicus*) in an inner-city neighborhood of Vancouver, Canada. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2013; **7**: e2270.
41. **Himsworth CG, et al.** Rats, cities, people, and pathogens: a systematic review and narrative synthesis of literature regarding the ecology of rat-associated zoonoses in urban centers. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 2013; **13**: 349–359.