



HAL
open science

Immunopathologie de la leptospirose humaine : exploration de la réponse immunitaire innée.

Loïc Raffray

► **To cite this version:**

Loïc Raffray. Immunopathologie de la leptospirose humaine : exploration de la réponse immunitaire innée.. Biochimie [q-bio.BM]. Université de la Réunion, 2017. Français. NNT : 2017LARE0006 . tel-01623628

HAL Id: tel-01623628

<https://theses.hal.science/tel-01623628>

Submitted on 25 Oct 2017

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.



THESE DE DOCTORAT

De l'UNIVERSITE de LA REUNION

Ecole doctorale Sciences Technologies Santé

Spécialité Biologie Médecine Santé

Présentée par M. Loïc RAFFRAY

Le 30 mai 2017

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université

Immunopathologie de la leptospirose humaine : exploration de la réponse immunitaire innée

Unité de recherche : UMR PIMIT Unité Mixte Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical - Université de La Réunion, CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249, CHU de La Réunion, Adresse : Plateforme Technologique CYROI, Sainte-Clotilde, La Réunion, France

Composition du jury

Catherine WERTS	Directeur de Recherches, Institut Pasteur Paris	Rapporteur
Axel PERIANIN	Directeur de Recherches, INSERM UMRS-1149, Paris	Rapporteur
Jean-Luc PELLEGRIN	Professeur de médecine, Université de Bordeaux	Examineur
Pablo TORTOSA	Maître de Conférences, Université de la Réunion	Examineur
Marie-Christine JAFFAR-BANDJEE	Docteur, Habilitation à diriger des Recherches, CHU Réunion	Co-directeur
Philippe GASQUE	Professeur, Université et CHU de La Réunion	Directeur

Résumé

La leptospirose est une zoonose causée par les bactéries du genre *Leptospira*. Elle touche près de 1 million d'individus par an dans le monde entier et sévit à l'état endémique dans les pays au climat tropical tel que La Réunion. Les manifestations habituelles sont variables d'un individu à l'autre et englobent une simple fièvre jusqu'aux défaillances poly-viscérales avec mortalité dans 5 à 10% des cas. Sa physiopathologie est encore mal comprise, en particulier la part que joue une réponse immunitaire inappropriée dans la genèse des manifestations graves qui surviennent en quelques heures, et avant la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative propre à éliminer le microorganisme. Si l'échappement de la bactérie au système du complément est bien documenté, le rôle des acteurs cellulaires du système immunitaire inné reste à étayer. Notre étude avait donc pour objectif d'explorer l'immunopathologie de la leptospirose humaine dans la phase initiale de l'infection.

Notre méthodologie s'est appuyée principalement sur des analyses quantitatives et qualitatives des acteurs cellulaires du système immunitaire inné à partir de prélèvements sanguins en phase précoce de la maladie, et comparaison avec la phase de convalescence et des sujets contrôles. Dans un premier temps nous avons montré qu'une population particulière de lymphocytes T impliquée dans la réponse immune innée, les lymphocytes T $\gamma\delta$, avaient un taux abaissé et que cette baisse était corrélée à la charge bactérienne ainsi qu'à l'intensité de l'atteinte hépatique classiquement retrouvée lors de la leptospirose. Dans un deuxième temps, nous avons analysé les polynucléaires neutrophiles circulants dont le taux augmente d'autant plus que la maladie est sévère, mais sans pour autant présenter de modification de certains marqueurs d'activation ou de recrutement tissulaire (CD15, CD11b, CD182). Une des principales chimiokines des neutrophiles, l'interleukine 8, était à taux peu élevés. Les derniers travaux concernent les principales formes solubles issues des molécules membranaires impliquées dans le processus de recrutement/diapédèse leucocytaire. Nous retrouvons de manière isolée une forte élévation des formes solubles d'E-sélectine et ICAM-1 qui sont notamment exprimées par les cellules endothéliales. Ces augmentations n'étaient pas corrélées aux marqueurs de gravité de la maladie. La signification biologique de cette élévation n'est pas encore connue lors de la leptospirose.

L'ensemble de nos données permet d'apporter des informations nouvelles sur des acteurs du système immunitaire inné présents dans le compartiment vasculaire lors de la leptospirose humaine. Cette réponse immunitaire semble inadaptée pour permettre une clairance du pathogène au stade de dissémination hématogène.

Mots-clés : leptospirose, *Leptospira*, relation hôte-pathogène, être humain, immunité innée, lymphocytes T $\gamma\delta$, polynucléaires neutrophiles, cellules endothéliales, recrutement cellulaire.

Summary

Title: Immunopathphysiology of human leptospirosis: study of innate immune response

Leptospirosis is a bacterial zoonosis caused by *Leptospira* and affecting 1 million people each year worldwide and mainly in tropical areas such as Reunion Island. Usual presentations encompass flu-like syndrome to multiorgan failure with mortality rate between 5 to 10%. To date, pathophysiology in humans is poorly understood, notably the capacity of innate immunity to mount a robust response to clear pathogen or to induce tissue damages and contributing to disease severity. Our study aimed at assessing the role of innate immune cells and molecules within the first days of leptospiral infection.

Using blood samples, we performed quantitative and qualitative assessment of circulating innate immune cells from leptospirosis cases and healthy controls. The first study explored the levels of gamma-delta T-cells ($\gamma\delta$ T-cells), a subset of unconventional T cells with innate immune functions. Gamma-delta T cells were found deeply decreased and levels were inversely correlated to bacterial burden and liver damage. The second study focused on membrane bound receptors indicative of activation and tissue migration ability of neutrophil polymorphonuclear cells: CD15, CD11b, and CD182. Although neutrophil rates were high in leptospirosis cases, the levels of studied receptors were either lower (CD15) or identical to healthy controls (CD11b, CD182). In addition, only low levels of interleukin-8, a key chemokine for neutrophils, was detected in patients. Lastly, we ascertained the plasmatic levels of several shed cell adhesion molecules notably expressed by endothelial cells. The levels of soluble E-selectin and ICAM-1 were significantly increased compared to controls, while P-selectin level was lower. We did not find any correlation with disease severity or organ failure. This finding indicates that endothelial cell may be activated but further experiments are warranted to explain the functional impact of our findings.

Altogether, our results add to the field of knowledge of leptospirosis pathophysiology, and in particular the implication of key innate immune cells at the stage of plasmatic bacterial dissemination. Our findings will support the view that there is an inappropriate immune response to *Leptospira*.

Keywords: leptospirosis, *Leptospira*, Humans, innate immunity, host-pathogen relation, gamma-delta T-cells ($\gamma\delta$ T-cells), polymorphonuclear neutrophils, endothelial cells, cell migration.

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement mes encadrants :

Cher Philippe, sois assuré de ma profonde gratitude pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu m'as accompagné tout au long de ce travail de thèse, tu as nourri mes attentes de chercheur et tu es un modèle pour moi dans ce domaine. Je te remercie aussi pour ce que tu m'as apporté au-delà de cette thèse et ta bienveillance pour mon parcours présent et à venir. J'espère pouvoir travailler longtemps avec toi.

Chère Marie-Christine, je te remercie de ton encadrement et ton aide précieuse tout au long de ce parcours de thèse. Ton exemple, médecin et chercheur à la fois, m'a conforté dans mes choix.

Je souhaite remercier les personnes ayant accepté de juger ce travail :

Madame Werts, vous êtes une référence dans le domaine de la leptospirose et de l'immunologie. Je suis très honoré que vous jugiez ce travail. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance pour votre implication en tant que rapporteur.

Monsieur Périanin, votre connaissance de l'immunologie est un exemple pour moi. Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail. Soyez assuré de mon profond respect pour votre expertise.

Monsieur Pellegrin, vous êtes un exemple et un guide pour moi. Soyez assuré de ma gratitude pour votre participation à ce jury et votre implication dans mon parcours professionnel depuis mes débuts. Vous resterez un de mes Maîtres bordelais et j'en suis fier.

Monsieur Tortosa. Pablo, je te remercie pour ton implication dans ce jury. Merci aussi pour nos échanges passés sur la leptospirose, et j'espère qu'il y en aura de nombreux à venir.

Je remercie aussi les personnes du laboratoire et de l'hôpital qui ont rendu ce travail possible :

Mes collègues du service de médecine interne et dermatologie qui ont fait des sacrifices pour que je puisse me libérer de l'activité clinique et développer cette activité de recherche. Sans vous rien de tout ceci n'aurait vu le jour. Une mention spéciale pour les Dr Yvin et Ferrandiz qui m'ont fait confiance et pressenti la possibilité de ce cheminement bien avant que je n'y croie moi-même.

Les collègues cliniciens et biologistes, de la réanimation au service de maladies infectieuses en passant par la néphrologie et la microbiologie...chacun de vous a apporté une pierre à cet édifice en m'aidant tout au long de ces années avec l'inclusion des patients.

Au personnel des laboratoires de l'hôpital Félix Guyon qui m'ont épaulé régulièrement pour l'accès à l'information, aux prélèvements des patients, au matériel technique. Je continuerai à venir vous voir et faire quelques gâteaux...

Aux collègues du laboratoire de recherche, en particulier ceux qui m'ont encadré à la paillasse pour mes débuts à la Réunion : Claude Giry, Pascale Krejbich-Trotot et Jean-Jacques Hoarau. Un clin d'œil particulier pour Claude : j'aime ta passion pour la recherche et ton investissement dans ce domaine. Merci pour nos échanges réguliers et ton compagnonnage.

Aux responsables de ma structure de recherche, Dr Mavingui et Pr Desprès. Je vous remercie de votre accueil et de votre aide dans ce projet.

Ma gratitude et mon affection vont aussi aux « personnes de l'ombre », mes proches qui sont impliqués indirectement pour le soutien qu'ils m'apportent, leurs encouragements dans cette longue route qu'a été le travail de thèse. « Une thèse ? Tu n'as pas déjà passé ta thèse pour médecine ?... ».

Merci donc à ma famille et belle-famille. Un « big up » spécial pour mon épouse Walé : merci de m'accepter comme homme, époux, père, médecin et maintenant chercheur...le meilleur est à venir. Isn't it ?

J'aimerais dédier ce travail à mon père, chercheur et docteur en sciences en son temps.

Papa, je crois que la réalisation de cette thèse a requis des qualités que tu aurais appréciées reconnaître à ton fils, qualités dont je vous suis redevable Maman et toi. Tu es de ceux qui m'ont poussé vers ce parcours : tes paroles résonnent encore en moi.

TABLE DES MATIERES

Résumé	2
Summary	4
TABLE DES MATIERES	8
Table des figures	10
Table des tableaux	11
Abréviations	12
INTRODUCTION.....	14
I. Généralités sur la leptospirose	14
1- Epidémiologie	14
1.1- Situation dans le monde	14
1.2- Situation dans la zone Sud-Ouest de l’Océan Indien et à La Réunion.....	17
2- Caractéristiques microbiologiques	19
2.1- Taxonomie et classifications	19
2.2- Caractéristiques morphologiques et métaboliques	23
2.3- Génomique bactérienne	24
2.4- Cycle de transmission et réservoirs	26
2.5- Particularités de la zone Sud Ouest de l’Océan Indien SOOI	27
3- Clinique	28
3.1- Présentations cliniques de la leptospirose humaine	28
3.2- Leptospirose : clinique à la Réunion	32
3.3- Facteurs pronostiques de mortalité et de leptospirose grave	33
4- Diagnostic.....	38
5- Traitement	41
5.1- Traitement curatif	41
5.2- Traitement préventif	43
6- Formes chroniques et complications à moyen terme	44
II. Relation hôte pathogène : immunopathologie de la leptospirose	46
1- Modèles d’étude	47
2- Mécanismes d’entrée et de diffusion du pathogène	50
2.1- Voies d’entrée et barrières naturelles	50
2.2- Diffusion hématogène	52
2.3- Echappement au complément.....	54

2.4-	Atteintes d'organes.....	58
3-	Réponse immunitaire.....	65
3.1-	Facteurs de susceptibilité en lien avec le système immunitaire de l'hôte.....	65
3.2-	Réponse immunitaire innée.....	66
3.3-	Réponse immunitaire adaptative.....	81
HYPOTHESE et OBJECTIFS		86
RÉSULTATS		88
I.	Etude des lymphocytes T $\gamma\delta$	88
1-	Contexte	88
2-	Hypothèse et objectifs	89
3-	Article 1.....	90
4-	Résultats principaux	96
II.	Etude des polynucléaires neutrophiles (PNN).....	97
1-	Contexte	97
2-	Hypothèse et objectifs	100
3-	Article 2.....	101
4-	Résultats principaux	116
III.	Etude des marqueurs d'activité des cellules endothéliales.....	117
1-	Contexte	117
2-	Hypothèse et objectifs	118
3-	Article 3.....	118
4-	Résultats principaux	144
DISCUSSION		145
I.	Discussions spécifiques de chaque article	145
1-	Taux des lymphocytes T $\gamma\delta$	145
2-	Phénotype des polynucléaires neutrophiles :	147
3-	Marqueurs d'adhésion solubles issus des cellules endothéliales	150
II.	Discussion : éléments de réflexion générale.....	152
1-	Points forts:	153
2-	Limites du modèle d'étude :.....	154
CONCLUSION et PERSPECTIVES		157
REFERENCES.....		160

Table des figures

Figure 1 : incidence de la leptospirose dans le monde.....	15
Figure 2: impact de la leptospirose en termes de nombre d'années de vie corrigé du facteur d'invalidité (DALYs) pour 100 000 habitants	16
Figure 3: nombre de cas de leptospirose déclarés en France métropolitaine et territoires d'Outre-Mer entre 2006 et 2014.....	17
Figure 4: observation de leptospores en microscopie électronique.....	23
Figure 5 : cycle d'infection de la leptospirose.	27
Figure 6: évolution de la charge bactérienne et mise en place de la réponse immunitaire humorale.....	31
Figure 7: phases de la leptospirose et principaux moyens diagnostiques selon la chronologie de la maladie	40
Figure 8: physiopathologie multifactorielle de la leptospirose	47
Figure 9 : étapes initiales de pénétration et diffusion hématogène des leptospores pathogènes.....	54
Figure 10: mécanismes d'échappement au système du complément développés par la bactérie <i>Leptospira</i>	57
Figure 11: coupe histologique de foie de cochon d'Inde infecté par un isolat clinique de <i>Leptospira interrogans</i>	60
Figure 12 : mécanisme d'invasion des leptospores dans les travées d'hépatocytes.....	61
Figure 13 : structures biochimiques du LPS de <i>Escherichia coli</i> et de <i>Leptospira interrogans</i>	68
Figure 14 : étape du processus de recrutement tissulaire et diapédèse des leucocytes.	99
Figure 15: schéma de synthèse des résultats principaux de nos études.....	157

Table des tableaux

Tableau 1: classification sérologique des espèces de <i>Leptospira</i>	21
Tableau 2: classification génomique des espèces de <i>Leptospira</i> reconnues en 2017	22
Tableau 3: synthèse des principales études analysant les facteurs pronostiques de la leptospirose humaine.....	35

Abréviations

ALAT	Alanine amino-transférase
ARS	Agence régionale de santé
ASAT	Aspartate amino-transférase
CAM	Cell adhesion molecule
CD	Cluster of differentiation
CIRE OI	Cellule de l'Institut de Veille Sanitaire en Région Océan Indien
CLR	C-type lectin receptor
CNR	Centre national de référence
CPK (ou CK)	Creatinine phosphokinase
CRP	C-reactive protein
CXCL-8	Chemokine (c-X-C motif) ligand 8
DC-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DAMP	Danger-associated molecular pattern
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HLA	Human leukocyte antigen
ICAM	Intercellular cell adhesion molecule
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LB	Lymphocyte B
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LERG	Leptospirosis burden epidemiology reference group
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LT $\gamma\delta$	Lymphocyte T gamma-delta
MAT	Microscopic agglutination test

MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
Mce	Mammalian cell entry
MEC	Matrice extracellulaire
NET	Neutrophil extracellular trap
NK	Natural killer
NLR	NACHT and leucin rich proteins
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase chain reaction
PCT	Procalcitonine
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PNN	Polynucléaires neutrophiles
PRR	Pattern recognition receptor
RLR	RIG-I-like receptor
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Real time-polymerase chain reaction
sE-sélectine	Forme soluble de E-sélectine
sICAM-1	Forme soluble de ICAM-1
SOOI	Sud Ouest de l'Océan Indien
sP-sélectine	Forme soluble de P-sélectine
TCR	T cell receptor
TLR	Toll-like receptor
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
UMR PIMIT	Unité mixte de recherche Processus infectieux en milieu insulaire tropical
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
WHO	World health organization

INTRODUCTION

I. Généralités sur la leptospirose

Cette première partie a pour but de situer la leptospirose dans le domaine de la santé, en particulier humaine. Il ne s'agit pas d'une revue exhaustive des connaissances mais d'un préambule nécessaire à la compréhension de la problématique de mon travail de recherche, dans le contexte réunionnais de cette pathologie.

1- Epidémiologie

1.1- Situation dans le monde

La leptospirose est une infection bactérienne zoonotique c'est-à-dire transmise naturellement des animaux vertébrés à l'homme, et vice-versa. La répartition est mondiale mais prédomine dans certaines zones en fonction des conditions climatiques, de salubrité et de facteurs de risques d'exposition aux réservoirs animaux et d'environnement. Elle constitue un enjeu de santé publique pour l'homme et les animaux (Picardeau 2015b). La plus récente évaluation d'incidence mondiale d'après une revue de littérature de 80 études rapporte une estimation de 1,03 million de cas annuels, soit un taux d'incidence moyen de 14 cas pour 100 000 habitants et une mortalité de 7% (Costa et al. 2015). Ces chiffres sont possiblement sous-évalués par manque d'information pour certaines zones du globe non pourvus en moyens diagnostiques. Les zones les plus touchées sont celles présentant des conditions climatiques de type tropicales ou subtropicales (Asie du Sud et du Sud-Est, Caraïbes, Amérique centrale, Océanie et Afrique sub-saharienne) où l'incidence varie de 13 à 150 cas pour 100 000 habitants par an. Cette incidence apparaît plus élevée dans les zones à faible niveau de vie, avec 2 catégories de groupe particulièrement à risque pour ces pays en voie de développement : les personnes du monde agricole, et les personnes vivant dans des conditions insalubres (bidonvilles, défaut d'évacuation des eaux usées). Les personnes atteintes sont dans 80% des cas des hommes et pour moitié dans la tranche d'âge des 20-50 ans.

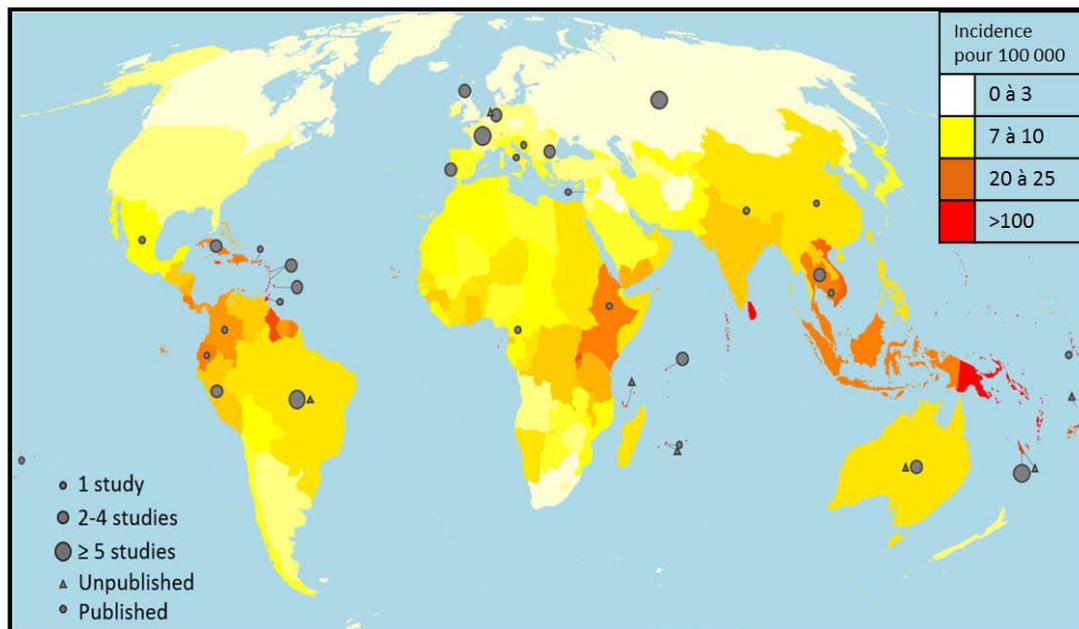


Figure 1 : incidence de la leptospirose dans le monde selon Costa et al. 2015.

La leptospirose est ainsi considérée comme une des zoonoses les plus fréquentes, et affecte plus particulièrement les populations vulnérables. A ce titre, l’OMS a engagé des travaux d’évaluation concernant l’impact de la leptospirose afin d’améliorer la recherche et les actions contre la maladie chez l’Homme. Ces travaux sont coordonnés par le groupe de référence de l’impact épidémiologique de la leptospirose (LERG : Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group) (WHO 2010). Suite à la revue des études permettant d’estimer l’incidence de la maladie (Costa et al. 2015), son impact a été évalué en terme de nombre d’années de vie corrigé du facteur d’invalidité (DALYs pour Disability-Adjusted Life Years). Ce critère de DALYs combine pour tous les patients affectés le nombre d’années de vie perdues en cas de décès et le nombre d’années perdues par invalidité consécutive à la maladie. Le taux de DALYs a été estimé à près de 3 millions pour la leptospirose (Torgerson et al. 2015). Pour comparaison, ce taux de DALYs situe la leptospirose à un niveau proche des leishmanioses, bilharzioses et du choléra ; et reste nettement inférieur au paludisme. Ces indicateurs rendent compte de l’importance mondiale de la leptospirose et justifient les efforts de recherche en termes d’épidémiologie, de physiopathologie et de traitement.

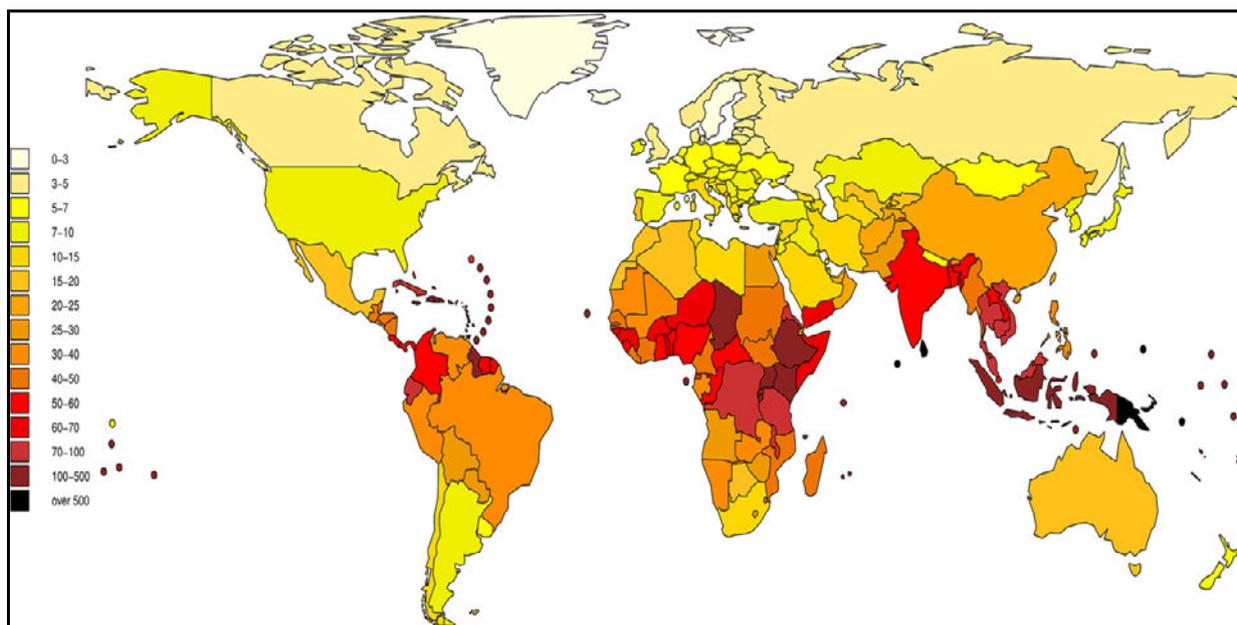


Figure 2: impact de la leptospirose en termes de nombre d'années de vie corrigé du facteur d'invalidité (DALYs) pour 100 000 habitants (issu de Torgerson 2015)

Les travaux du LERG ont aussi permis de réévaluer les déterminants de la transmission de la leptospirose en terme d'environnement et de comportements à risque (Mwachui et al. 2015). Les facteurs les plus significatifs sont : une exposition à l'eau douce, aux rongeurs, au bétail. Pour l'exposition à l'eau il s'agit essentiellement des mauvaises conditions sanitaires (défaut d'évacuation des eaux usées), des inondations et fortes précipitations dans les pays pauvres, et des activités récréatives en pays développés (pêche, canyoning). Comme explicité à la section microbiologie, la bactérie survivrait mieux dans l'environnement en cas de forte humidité et de température élevée ce qui explique une majoration du risque de contamination dans les situations précédentes.

A la Réunion les études réalisées retrouvent ce même type de facteurs de risque, avec une proportion plus conséquente de cas liés à des activités récréatives en eau douce comparativement aux pays en voie de développement. Ainsi sur 350 cas avérés, les principaux facteurs d'exposition retrouvés étaient : habitat en milieu rural (70%), activités de jardinage au domicile (64%) ou d'agriculture (50%), élevage domestique de volaille (45%), contact avec des rats (38%), baignade en eau douce (24%) ou pêche (21%) (Frédéric Pagès et al. 2014). Des épidémies ont même été décrites lors d'activité de triathlon (F. Pagès et al. 2016). Concernant le risque majoré du fait des conditions climatiques, il est observé une recrudescence des cas entre janvier et avril, ce qui correspond à la saison chaude à forte

pluviométrie (Amélie Desvars, Jégo, et al. 2011). Les cas sont d'ailleurs fréquemment observés dans les régions les plus pluvieuses de l'île (Frédéric Pagès et al. 2014).

1.2- Situation dans la zone Sud- Ouest de l'Océan Indien et à La Réunion

En France métropolitaine l'incidence moyenne en 2014 était de 0.9 pour 100 000 habitants tandis que dans les Département d'Outre-Mer français (DOM), la leptospirose est une affection endémique et son incidence est nettement supérieure à celle de la métropole pour des raisons climatiques essentiellement (CNR de la Leptospirose 2014). L'incidence est ainsi de 10 fois (La Réunion, Nouvelle-Calédonie) à plus de 30 fois (Polynésie Française, Mayotte, Guyane, Guadeloupe, Martinique) plus élevée dans les DOM par rapport à la Métropole. On retrouve le caractère saisonnier de la leptospirose avec l'apparition de pics épidémiques lors de la saison des pluies ou de phénomènes climatiques inhabituels tels que les ouragans.

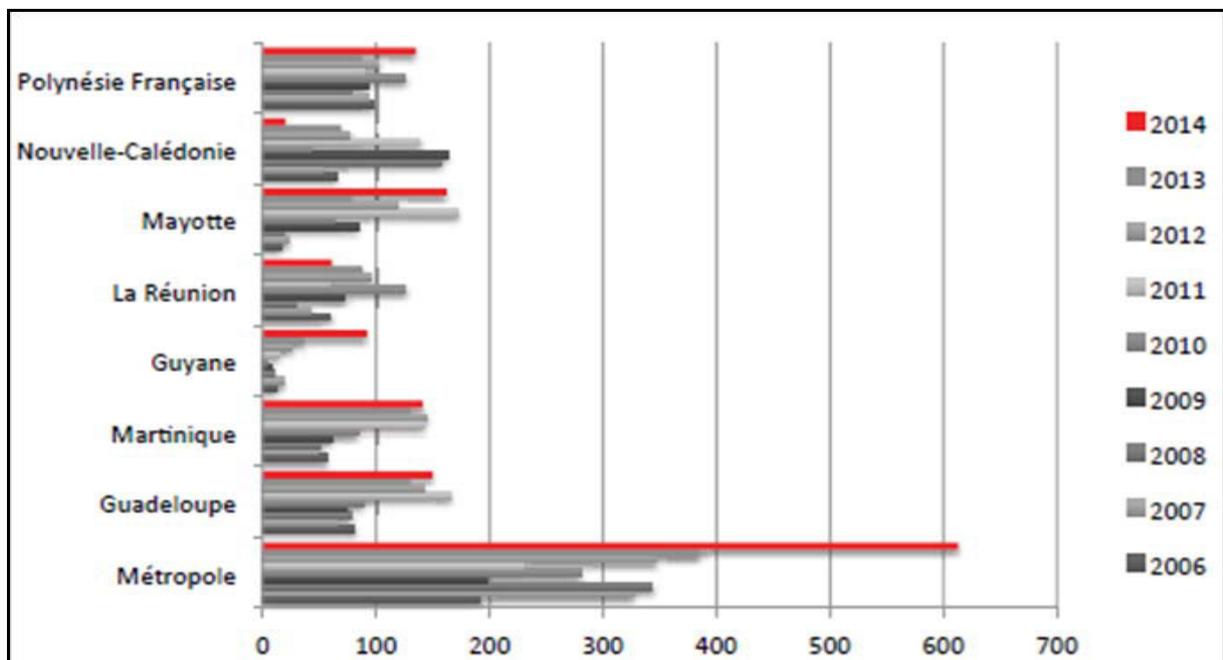


Figure 3: nombre de cas de leptospirose déclarés en France métropolitaine et territoires d'Outre-Mer entre 2006 et 2014 d'après le CNR leptospirose 2014

Ces éléments font de la leptospirose une maladie à déclaration obligatoire auprès des autorités de santé dans les DOM, avec une mise en œuvre depuis 2004 à la Réunion. Les données colligées par l'Agence Régionale de Santé (ARS) sont analysées par la Cellule de l'Institut de Veille Sanitaire en Région Océan Indien (CIRE-OI) avec un rapport transmis annuellement. Le nombre de cas notifiés évolue entre 40 et 80 par an soit une incidence variant de 5 à 10 pour 100 000. Près de 90% des cas confirmés ont été hospitalisés et plus d'un tiers des patients ont séjourné en réanimation (CIRE Océan Indien 2016a; Frédéric Pagès et al. 2014). Une étude en population générale à la Réunion réalisée en 2006 rapporte une séroprévalence de la leptospirose de 0,66% +/- 0.34 d'après une détermination par le test MAT (microscopic agglutination test) (Amélie Desvars, Gigan, et al. 2011). La mortalité à la Réunion sur les dernières années est globalement stable à 4-5% des cas diagnostiqués/déclarés.

Les données issues des autres territoires de la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien confirment une incidence plus forte dans les pays plus proches de l'équateur, tels Mayotte et les Seychelles (Yersin et al. 1998). Néanmoins, nous ne disposons pas de données publiées sur les taux d'incidence pour Madagascar, l'Ile Maurice et les Comores (Amélie Desvars, Michault, et Bourhy 2013). Le défaut de moyens diagnostiques et/ou de système de surveillance systématique de la maladie sont probablement responsables de ce biais d'information, puisque la maladie y est présente car décrite dans des études de séroprévalence pour les Comores (Gomard et al. 2014) et Madagascar (Ratsitorahina et al. 2015), ainsi que chez des voyageurs en retour de ces zones (Simon et al. 2012; Frédéric Pagès et al. 2015).

L'ensemble de ces données indique une importance relative de la leptospirose en termes d'épidémiologie dans la zone Sud-Ouest de l'Océan Indien. Afin de mieux situer la place de la leptospirose parmi les maladies infectieuses tropicales rencontrées à la Réunion, voici quelques données sur les autres maladies rencontrées localement. Les maladies telles que le paludisme, les bilharzioses, la fièvre jaune, sont absentes de la Réunion. Les principales maladies tropicales rencontrées sont les arboviroses, évoluant en général sur un mode épidémique ou bien par micro-foyers. Cela concerne en particulier le virus du Chikungunya et les virus de la dengue. Le chikungunya a été responsable d'une épidémie de grande ampleur avec plus de 240 000 cas rapportés, soit plus d'un tiers des réunionnais touchés en 2005-2006 (Renault et al. 2007; Balleydier, D'Ortenzio, et Renault 2008; Gérardin et al. 2008). Depuis, cette infection a été nettement contrôlée et aucun cas autochtone n'a été diagnostiqué à partir

de 2010. Concernant la dengue, on recense une trentaine de cas par an, en général autour de foyers bien localisés, et avec une extension limitée grâce aux mesures sanitaires préventives appliquées sur les vecteurs (moustiques). En 2016, une épidémie de 213 cas de dengue autochtones ont été dénombrés (CIRE Océan Indien 2016b). Le virus zika responsable d'une épidémie mondiale depuis 2013 n'a pas affecté la Réunion en dehors de quelques cas importés.

La leptospirose, bien que peu fréquente à la Réunion (moins de 100 cas diagnostiqués par an), reste une maladie préoccupant localement les acteurs de santé publique (ARS, CIRE-OI) de par son caractère endémique, sa potentielle gravité et l'existence de moyens de prévention. Cette préoccupation est aussi celle des cliniciens en établissements de soins qui sont régulièrement confrontés à cette maladie dont près de 90% des cas diagnostiqués sont hospitalisés. Ces éléments expliquent la place de la leptospirose dans les thématiques de recherche locales, au sein du CHU comme de l'UMR PIMIT qui œuvrent pour mieux apprécier les déterminants de la physiopathologie de l'infection de manière transversale : réservoirs et biodiversité, pouvoir de virulence de la bactérie et les relations hôte-pathogène. C'est dans la continuité de cet effort collectif que s'inscrit mon travail de recherche.

2- Caractéristiques microbiologiques

2.1- Taxonomie et classifications

La leptospirose est causée par des agents infectieux bactériens du genre *Leptospira*, famille des Leptospiraceae. Ces bactéries sont de la famille des spirochètes (phylum Spirochaetes) au même titre que les agents de la maladie de Lyme (*Borrelia burgdorferi*) et de la syphilis (*Treponema pallidum*). Les spirochètes sont des bactéries hélicoïdales, caractérisées par une paroi bactérienne particulière : elles comportent un filament axial, assemblage de flagelles internes, situé entre la membrane plasmique et la membrane externe. Ce filament axial leur confère une grande mobilité.

Le genre *Leptospira* comporte trois catégories de bactéries : saprophytes, pathogènes et intermédiaires. Les premières ne sont pas responsables de pathologies humaines ou animales contrairement aux secondes, et les dernières n'ont pas été démontrées comme pathogènes expérimentalement. Pour chacune de ces catégories plusieurs espèces ont été identifiées, que

ce soit selon les méthodes historiques sérologiques avec des sérogroupes regroupant des sérovars, ou selon les méthodes plus récentes de génomiques. On peut citer pour les plus connues : *L. biflexa* pour le groupe saprophyte, *L. interrogans*, *L. kirschneri* et *L. borgpetersenii* pour le groupe pathogène. Ces deux méthodes de classification, sérologique et génomique, ne sont pas superposables comme détaillé ci-dessous.

La classification sérologique (Tableau 1) repose sur l'identification phénotypique des antigènes bactériens à l'aide d'anticorps issus de sérums selon la technique MAT (Microscopic agglutination test). Les antigènes reconnus sont donc sur la paroi bactérienne et principalement issus du LPS (lipopolysaccharide). Le séroroupe le plus connu est *L. interrogans* sérovar Icterohaemorrhagiae, dont le nom illustre bien un tableau clinique répandu de la maladie associant alors ictère et saignements, notamment pulmonaires. Cette classification est complexe car plus de 300 sérovars ont été décrits, et surtout plusieurs espèces peuvent correspondre à un même séroroupe, tandis que certains sérovars correspondraient à une même espèce selon les données issues de la génomique (Picardeau 2013; P. N. Levett 2001).

Tableau 1: classification sérologique des espèces de *Leptospira* (issu de Picardeau 2013)

Species	Serogroup	Serovar	Strain
Pathogenic			
<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	L 60
<i>L. alstonii</i>	ND	Sichuan	79,601
<i>L. kmetyi</i>	ND	ND	Bejo-Iso 9
Intermediate			
<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. fainei</i>	Hurstbridge	Hurstbridge	BUT6
<i>L. broomii</i>	Undesignated	ND	5399
Saprophytes			
<i>L. wolbachii</i>	Codice	Codice	CDC
<i>L. meyeri</i>	Semaranga	Semaranga	Veldrat
<i>L. biflexa</i>	Semaranga	Patoc	Patoc 1
<i>L. vanthielii</i>	Holland	Holland	WaZ Holland
<i>L. terpstrae</i>	ND	ND	LT 11-33
<i>L. yanagawae</i>	Semaranga	Saopaulo	Sao Paulo

ND: not determined.

La classification génomique ou moléculaire repose sur des analyses issues de gènes bactériens, en particulier l'ARN ribosomal 16S (*locus rrs2*). Elle est plus récente que la classification sérologique du fait du recours à la biologie moléculaire et son essor dans les années 1980. Elle identifie à l'heure actuelle 22 espèces (ou génomo-espèces) d'après la dernière mise à jour établie (Paul N Levett 2015) et les publications récentes décrivant une autre espèce pathogène identifiée chez l'homme sur l'île de Mayotte : *L. mayottensis* (Pascale Bourhy et al. 2014). Etant donné les progrès de la génomique il est probable que d'autres espèces seront identifiées à l'avenir, ou bien reclassées en fonction des données issues des analyses de génomique comparative (Fouts et al. 2016).

Tableau 2: classification génomique des espèces de *Leptospira* reconnues en 2017

Espèces pathogènes (groupe I)	Espèces pathogènes intermédiaires (groupe II)	Espèces saprophytes (groupe III)
<i>L. interrogans</i>	<i>L. inadai</i>	<i>L. biflexa</i>
<i>L. kirschneri</i>	<i>L. broomii</i>	<i>L. wolbachii</i>
<i>L. borgpetersenii</i>	<i>L. fainei</i>	<i>L. meyeri</i>
<i>L. santarosai</i>	<i>L. wolffii</i>	<i>L. vanthielii</i>
<i>L. noguchii</i>	<i>L. licerasiae</i>	<i>L. terpstrae</i>
<i>L. weilii</i>		<i>L. idonii</i>
<i>L. alexanderi</i>		<i>L. yanagawae</i>
<i>L. kmetyi</i>		
<i>L. alstonii</i>		
<i>L. mayottensis</i>		

Il existe de nombreuses discordances entre les méthodes de classification génomiques et sérologiques. Certaines souches classifiées pathogènes selon la première méthode ont été historiquement identifiées comme saprophytes selon la seconde, et inversement (P. N. Levett 2001). La classification génomique devrait être utilisée à l'avenir afin de permettre de faciliter les comparaisons entre études, d'améliorer les connaissances sur l'épidémiologie et la physiopathologie de la maladie (Paul N Levett 2015; Fouts et al. 2016). En effet, au-delà de la classification, les connaissances issues de la génomique permettent à présent d'identifier les gènes qui sont associés à la pathogénicité des souches grâce à la génomique comparative.

A la Réunion, les espèces pathogènes identifiées sont principalement *L. interrogans* séro-groupe Icterohaemorrhagiae selon la classification sérologique (Frédéric Pagès et al. 2014). Les données plus récentes permettent d'identifier, au sein de la classification génomique, qu'il s'agit de *Leptospira interrogans* dans plus de 95% des isolats cliniques, sinon de *Leptospira borgpetersenii* (Naze et al. 2015; Guernier et al. 2016). Cette écologie bactérienne peut être très différente d'une île à l'autre. A Mayotte, il a été identifié une plus grande variété d'espèces : *Leptospira interrogans*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira kirschneri*, et *Leptospira mayottensis*, la dernière espèce décrite de la classification génétique (P. Bourhy et al. 2012; Pascale Bourhy et al. 2014).

2.2- Caractéristiques morphologiques et métaboliques

Les leptospires sont des bactéries allongées de 6 à 20 μm de long et fines de 0,1-0,15 μm de large. Elles ont un aspect hélicoïdal, ou spiralé, et peuvent avoir un aspect recourbé aux deux extrémités leur conférant un aspect de crochet ou de point d'interrogation ayant valu le nom de genre *L. interrogans* (Figure 4). Tout comme les bactéries à Gram négatif, les leptospires ont deux membranes : interne (ou cytoplasmique) à laquelle est accolée le peptidoglycane, et externe qui comporte le LPS et les protéines de membrane. Entre ces deux membranes se trouvent 2 flagelles périplasmiques (ou endoflagelles) indépendants qui assurent la mobilité de la bactérie. Celle-ci est ainsi capable de se mouvoir dans des milieux visqueux, ou encore sur le sol en milieu humide par des mouvements de type reptation (Cameron 2015). La composition de la membrane externe, les particularités des flagelles internes font des leptospires des bactéries uniques en comparaison aux bactéries à Gram négatif en général, mais aussi des autres spirochètes. Par exemple le LPS des leptospires a une composition particulière qui le distingue des LPS des autres genres bactériens (Haake et Zückert 2015; Catherine Werts 2010). Cette singularité a possiblement des conséquences en termes de physiopathologie pour le pouvoir pathogène (virulence, fonction d'endotoxine) et la reconnaissance du microorganisme par l'hôte (Kelesidis 2014). Ceci sera développé plus avant dans la seconde partie de l'introduction.

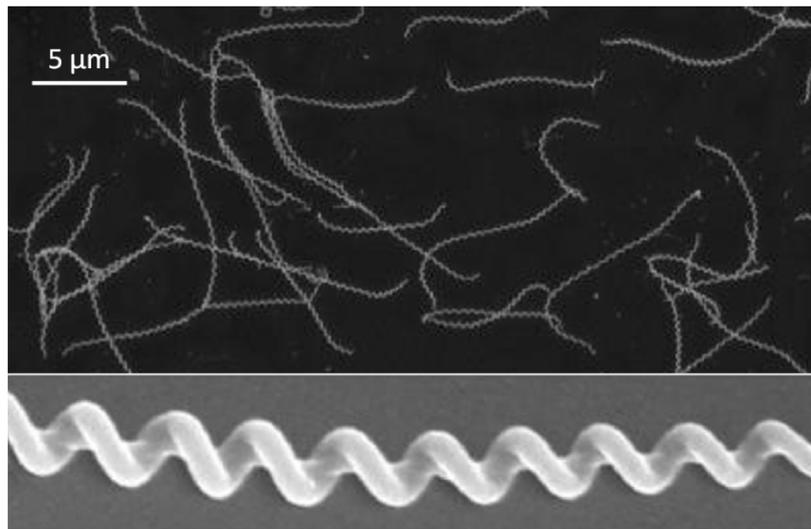


Figure 4: observation de leptospires en microscopie électronique, tiré de Picardeau 2013

La bactérie est aérobie obligatoire avec une croissance optimale à 28-30°C. Cette température est celle utilisée pour cultiver la bactérie *in vitro* sur milieux spéciaux à des fins de diagnostic ou de recherche, mais la bactérie peut survivre à des températures plus extrêmes : 37°C pour les pathogènes et 10-13°C pour les saprophytes de l'environnement (Cameron 2015). Cette température optimale de pousse explique que la bactérie soit plus fréquemment responsable d'infections dans les milieux tropicaux et donc la répartition décrite au paragraphe 1.1. Certaines souches pathogènes peuvent de plus survivre plusieurs semaines ou mois dans l'environnement et ainsi maintenir des cycles de réinfestation d'hôtes plus facilement.

Le génome bactérien code pour tous les gènes de synthèse des acides aminés, de la machinerie de synthèse des acides nucléiques, ainsi que différentes vitamines utiles au métabolisme protéique. Bien que la bactérie soit capable de réaliser un métabolisme complet des glucides, elle tire sa principale source d'énergie de la beta-oxydation des acides gras à longues chaînes issus de l'environnement.

2.3- Génomique bactérienne

La taille du génome varie entre 3,9 et 4,6 Mb selon les espèces. La bactérie comporte deux chromosomes circulaires, l'un de grande taille, l'autre nettement plus réduit : 4,3 Mb et 350 kb respectivement pour *L. interrogans*. Pour les souches saprophytes il existe un troisième réplicon circulaire supplémentaire de 74 kb (Picardeau 2015a).

Les génomes de plusieurs bactéries ont été séquencés, au sein des 3 classes de leptospires : pathogéniques (*L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. santarosai*) intermédiaires (*L. licerasiae*) et saprophytes (*L. biflexa*) (Picardeau 2015a). L'analyse comparative permet de mettre en évidence les gènes communs aux 3 groupes, mais aussi ceux qui diffèrent et indiquent d'éventuels facteurs de virulence, de métabolisme entre autres. Ainsi *L. borgpetersenii* a un génome amputé de 700 kb par rapport à *L. interrogans* : les gènes concernés seraient ceux participant au métabolisme des nutriments pour l'aide à la survie prolongée dans l'environnement. Il en résulterait que la génomo-espèce *L. borgpetersenii* aurait un désavantage de maintien en dehors des hôtes habituels et nécessiterait un cycle de transmission hôte-hôte plus direct (Bulach et al. 2006).

L'approche génétique constitue un tournant dans la compréhension de la maladie. Les outils génétiques accessibles à présent ont permis de faire avancer rapidement les connaissances sur la physiologie des leptospires, leurs potentiels facteurs de virulence, ainsi que les mécanismes de phylogénie à l'échelle de larges territoires et d'adaptation à un ou plusieurs hôtes (Lehmann et al. 2014; Fouts et al. 2016). Parmi les outils utilisés ces 2 dernières décennies, on peut citer ceux de la mutagenèse aléatoire et dirigée associés à l'étude de la virulence *in vitro* et sur des modèles animaux. La perte de fonction des gènes mutés est corrélée à la modification du phénotype au sens large, incluant les fonctions bactériennes telles que motilité, métabolisme, adhésion et infiltration au sein des tissus de l'hôte. Néanmoins ces travaux sont complexes et peu rentables sur le genre *Leptospira* contrairement aux bactéries plus « conventionnelles » notamment à cause des conditions de culture fastidieuses (Picardeau 2015a).

Du fait d'un nombre croissant de génomo-espèces séquencées et des capacités d'analyse actuelles de ces métadonnées, les chercheurs ont pu commencer à procéder à des analyses comparatives (Lehmann et al. 2014). L'étude récente de (Fouts et al. 2016) illustre très bien cette mise à profit pour *Leptospira*. Dans ce travail de large ampleur, les auteurs ont repris les génomes des bactéries complètement ou partiellement séquencées et les ont analysés en catégorisant les gènes selon l'appartenance à des groupes pathogéniques ou saprophytes. Les principaux enseignements issus de cette étude remarquable sont :

- Les *Leptospira* pathogènes possèdent une meilleure expression du système CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats ou courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées), suggérant que ce système de réparation de l'ADN leur confère un atout pour la virulence et explique potentiellement les difficultés à générer des mutations dirigées.
- La confirmation de certains éléments associés à la pathogénicité des leptospires, tels que des systèmes de sécrétion protéiques, des molécules d'adhésion, des facteurs de mobilité et chimiotactisme. Le travail a aussi permis la découverte de nouveaux éléments prometteurs : nouveau gène de virulence VM (pour virulence modifying), mécanismes spécifiques de modifications et sécrétions de protéines et lipoprotéines.
- D'un point de vue phylogénique : d'après les prédictions basées sur les gènes concernant le métabolisme bactérien, les leptospires pathogènes ont pu s'adapter à certains hôtes mammifères et à l'environnement grâce à la présence de gènes

concernant le métabolisme des porphyrines, de la vitamine B12 et de l'acide sialique.

Ce travail vient renforcer la classification génomique des bactéries du genre *Leptospira* telle que décrite au Tableau 2, page 22.

2.4- Cycle de transmission et réservoirs

En tant que zoonose la leptospirose est transmise soit directement entre deux animaux, soit indirectement par le biais de l'environnement : eau ou sols contaminés. Classiquement on distinguait 2 modèles d'infection : certains animaux peuvent présenter une infestation chronique, avec portage de leptospires qui persistent au sein des tubules rénaux (hôtes réservoirs); d'autres sont considérés comme des hôtes accidentels et présentent généralement des signes d'infection aiguë sans portage chronique. Les animaux porteurs sains sont d'excellents vecteurs de la bactérie car elle s'y réplique et elle est disséminée régulièrement dans l'environnement au travers des urines excrétées. Ceci est particulièrement vrai pour les rats qui sont l'hôte emblématique de la leptospirose, parfois appelée « maladie des rats ». Néanmoins de nombreux autres réservoirs ont été démontrés parmi les animaux domestiques et sauvages : chiens, bétail, chauve-souris, rongeurs terrestres, etc. ceci explique la présence de la bactérie sur tous les continents et quasiment toutes les latitudes (Bharti et al. 2003). Néanmoins cette distinction d'hôtes accidentels et réservoirs asymptomatiques n'est pas toujours si claire et le paradigme a évolué. En effet certains modèles animaux classés comme réservoirs peuvent être infectés de manière bruyante et succomber à l'infection, tel les hamsters (Matsui et al. 2016). A contrario il a été retrouvé un portage rénal (excrétion urinaire en fait) chez l'être humain à distance de toute infection aiguë (Ganoza et al. 2010).

Le cycle d'infection comporte ainsi : une excrétion urinaire avec persistance de la bactérie dans l'environnement, une infection d'un nouvel hôte via la peau ou les muqueuses, une dissémination de la bactérie par voie hématogène vers les organes cibles, et enfin une atteinte des reins avec la présence de bactéries à plus ou moins long terme selon l'hôte. Ce cycle est schématisé dans la Figure 5. Ces éléments expliquent les facteurs d'exposition à risque reconnus : contacts avec des rongeurs, des eaux usées, de l'eau douce, des zones inondées ou à forte pluviométrie/humidité (cf. paragraphe 1.1). L'ensemble de ces facteurs

(environnement, réservoirs) et le type de bactérie déterminent l'épidémiologie de la leptospirose en fonction des pays.

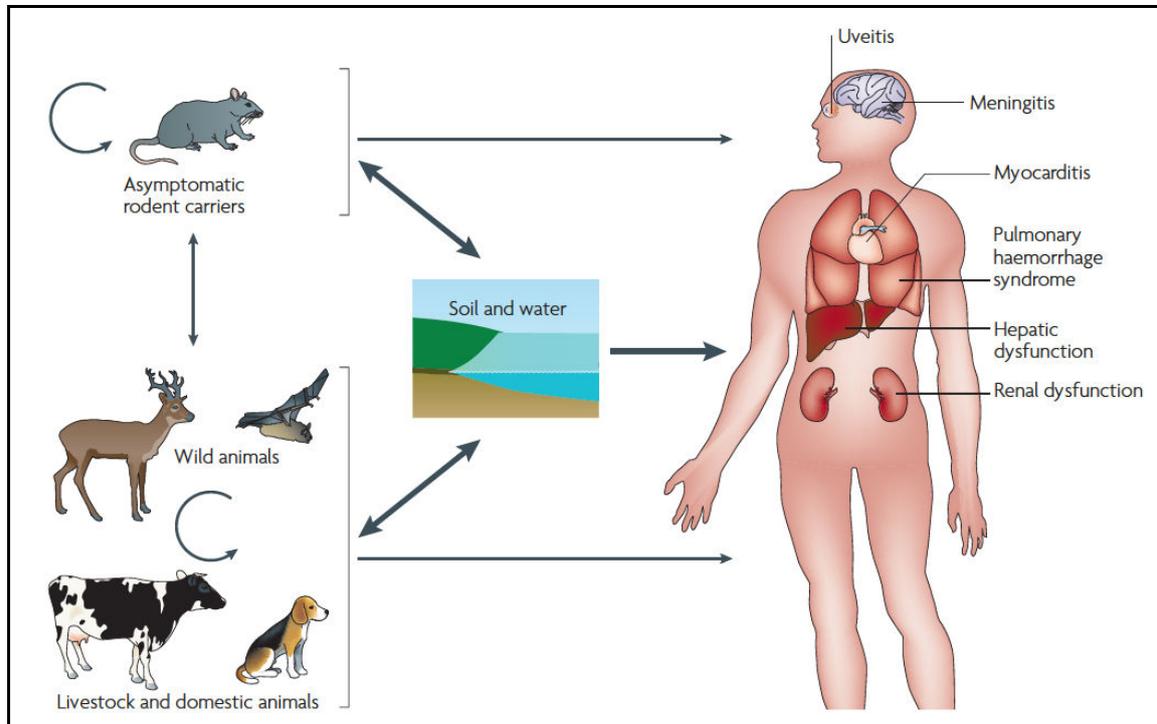


Figure 5 : cycle d'infection de la leptospirose issu de (Albert I. Ko, Goarant, et Picardeau 2009).

2.5- Particularités de la zone Sud Ouest de l'Océan Indien SOOI

L'écologie de la leptospirose au sein de la zone SSOI comporte quelques singularités liées à la géographie, notamment îles éparses avec réservoirs parfois distincts et évolution d'espèces bactériennes différentes selon les localisations.

Les réservoirs potentiels ont été assez bien étudiés dans la plupart des zones du SSOI où la pathologie humaine a été analysée (cf. paragraphe 1.2). A la Réunion, les réservoirs classiques que sont les rongeurs sont prédominants et les autres mammifères démontrés sont classiquement, les chiens, chats, caprins, bovins comme cela a été signalé dans l'étude de séroprévalence et de portage rénal réalisée sur ces animaux à la Réunion (A. Desvars et al. 2013). On peut citer certains réservoirs originaux tels que le tangué (tenrec en anglais), petit rongeur ressemblant à un hérisson, qui est présent à la Réunion, Mayotte, Madagascar, l'Ile

Maurice et aux Comores. Les chauves-souris sont aussi un réservoir potentiel avec des animaux retrouvés dans tous ces territoires et différentes espèces présentes à Madagascar qui est une île de forte biodiversité (Lagadec et al. 2012; Dietrich et al. 2014). Malgré cette forte biodiversité malgache, le réservoir principal à Madagascar reste probablement le rat (Rahelinirina et al. 2010). Il n'existe pas ou peu de données pour les Seychelles et l'île Maurice (Amélie Desvars, Michault, et Bourhy 2013).

Bien que de nombreux animaux semblent pouvoir être porteurs chroniques de leptospires, la transmission à l'homme ne semble pas pouvoir se faire pour toutes les espèces identifiées chez ces animaux vecteurs. Par exemple, une étude réalisée à la Réunion entre les correspondances d'espèces identifiées au niveau génomique pour les cas humains et les réservoirs potentiels met en évidence que les humains s'infectent principalement par le biais de leptospires retrouvées chez les rats, et dans une moindre mesure, chez les chiens. Les autres animaux réservoirs n'apparaissent pas comme une source de contamination (Guernier et al. 2016). Des résultats similaires ont été observés dans une étude réalisée à Mayotte avec une prédominance de la concordance pour les leptospires issues des rats (Amélie Desvars et al. 2012).

L'apport des informations concernant l'identification des espèces bactériennes chez l'homme et l'animal est majeur en termes de : politique de santé publique, compréhension des mécanismes d'adaptation hôte/pathogène et phylogénie. On peut citer l'exemple de l'évolution parallèle des tangués à Mayotte (issus de Madagascar) et de l'espèce nouvellement décrite sur cette île et qui semble unique au monde : *L. mayottensis* (Pascale Bourhy et al. 2014). L'hôte unique retrouvé de cette espèce bactérienne est constitué du tangué, bien que d'autres espèces bactériennes circulent à Mayotte (cf. paragraphe 2.1) et puissent aussi infecter l'homme (Lagadec et al. 2016).

3- Clinique

3.1- Présentations cliniques de la leptospirose humaine

La leptospirose est une maladie de présentation protéiforme. Elle est classiquement décrite comme pouvant induire un éventail de manifestations allant d'un simple syndrome grippal spontanément résolutif jusqu'à une défaillance multi-viscérale avec risque léthal (P. N.

Levett 2001; Bharti et al. 2003). Ces éléments rendent le diagnostic difficile : il est estimé que de nombreux cas de leptospirose ne sont pas diagnostiqués et pris à tort pour une autre infection.

Après une phase d'incubation moyenne de 7-10 jours (extrêmes de 2 à 20 jours), les symptômes initiaux comprennent essentiellement de la fièvre et des myalgies, dans une moindre fréquence des céphalées, douleurs abdominales, une suffusion conjonctivale et une éventuelle éruption cutanée évanescence. A la phase d'état, ces symptômes peuvent persister et s'associer à ceux de diverses atteintes d'organes témoignant de la dissémination de l'infection. La fréquence de ces manifestations d'organes est difficile à apprécier car elle varie grandement d'une série à l'autre, et dépend de la population d'étude (formes graves hospitalisées uniquement analysées ou bien formes pauci-symptomatiques vues en ambulatoire aussi incluses) (P. N. Levett 2001).

Parmi les complications d'atteintes d'organes les plus fréquentes on peut citer :

-l'atteinte rénale, responsable d'un tableau de néphropathie tubulo-interstitielle englobant des manifestations allant de la simple protéinurie modérée à l'insuffisance rénale aiguë anurique nécessitant le recours à l'épuration extra-rénale. Sa fréquence est estimée à 16 à 40%.

-l'atteinte hépatique. La cytolysse est souvent précoce et modérée tandis que la cholestase est plus retardée avec une normalisation lente sur plusieurs semaines. L'élévation de la bilirubine est un facteur de gravité fréquemment retrouvé (Hochedez et al. 2015; Tantitanawat et Tanjatham 2003). Sa fréquence a été décrite de 0% jusqu'à 95% des cas illustrant la disparité des informations issues des grandes séries cliniques (P. N. Levett 2001).

-l'atteinte respiratoire. Lors de la leptospirose ont été décrites des atteintes pulmonaires diffuses responsables d'hémoptygies, d'œdème pulmonaire aigu non cardiogénique (SDRA) ou encore d'hémorragies intra-alvéolaires (Helmerhorst et al. 2012). La gravité de cette atteinte est illustrée par les forts taux de mortalité associés, supérieurs à 50%, surtout dans les pays pauvres en moyens de réanimation adéquats.

-l'atteinte hématologique se caractérise essentiellement par une profonde thrombopénie associée à des saignements cliniques, notamment pulmonaires (Daher et al. 2014; J. F. P. Wagenaar et al. 2010). L'association à un état de coagulation intra-vasculaire disséminé induit par la bactérie elle-même est débattu (Chierakul et al. 2008; Mônica L. Vieira et al. 2016;

Edwards et al. 1986; J. F. P. Wagenaar et al. 2010). En dehors de la thrombopénie, on retrouve aussi une modification modérée des taux de leucocytes avec d'une part une ascension des polynucléaires neutrophiles (PNN), et d'autre part une baisse des lymphocytes (De Silva et al. 2014).

-les autres atteintes viscérales, plus anecdotiques : atteinte cérébro-méningée, atteinte cardiaque (myocardite), pancréatite ou encore des douleurs articulaires. Ces différentes localisations illustrent bien le caractère systémique de l'infection.

Historiquement, la forme considérée comme la plus grave a été décrite par Weil en 1886 et associée ictère et insuffisance rénale aiguë (Weil 1886). Cette association assez évocatrice de leptospirose, à présent dénommée syndrome de Weil (Weil's disease pour les anglophones), serait associée à une mortalité supérieure à 50%. Néanmoins, le syndrome de Weil n'est pas l'apanage des formes graves de leptospirose : les patients peuvent décéder suite à une détresse respiratoire, un choc hémodynamique, une atteinte neurologique centrale, sans pour autant présenter un ictère ou une atteinte rénale avancée. Actuellement la dénomination de syndrome de Weil semble utilisée pour toutes les formes graves de leptospirose, dépassant la définition initiale de forme hépato-rénale sévère.

Dans la lignée de cette distinction historique, il est utile de rappeler qu'une conception très répandue de la maladie est celle d'une évolution biphasique de la maladie. La première phase, appelée phase initiale, correspondrait à la période septicémique de diffusion de la bactérie par voie hématogène. La bactérie gagnerait alors les organes cibles induisant les diverses manifestations décrites ci-avant. Cette phase durerait en moyenne 7 jours. La seconde phase, aussi appelée phase immune, serait celle de la réponse humorale avec production d'anticorps dirigés contre les leptospires et de manière contemporaine une excrétion des leptospires dans les urines (Figure 6 et Figure 7). Cette distinction historique très schématique a été d'abord rapportée par Turner en 1969 (Turner 1969) puis largement reprise et relayée dans la littérature internationale comme en témoignent la revue la plus citée ces 15 dernières années : Levett 2001, avec 1148 citations en date du 06 février 2017 selon le site web of science (www.webofknowledge.com). Néanmoins cette dichotomie ne semble pas correspondre à la majorité des situations où ces deux phases, ou processus, se déroulent de manière superposée. De plus cette vision peut laisser croire que les manifestations précoces sont le fruit de l'agent pathogène, tandis que celles du deuxième septénaire seraient plutôt

celles de la réponse de l'hôte, en l'occurrence du système immunitaire. Or à ce jour la part de ces deux mécanismes dans la physiopathologie de la maladie n'est pas claire. Cet élément sera discuté de manière plus approfondie dans la seconde partie de l'introduction.

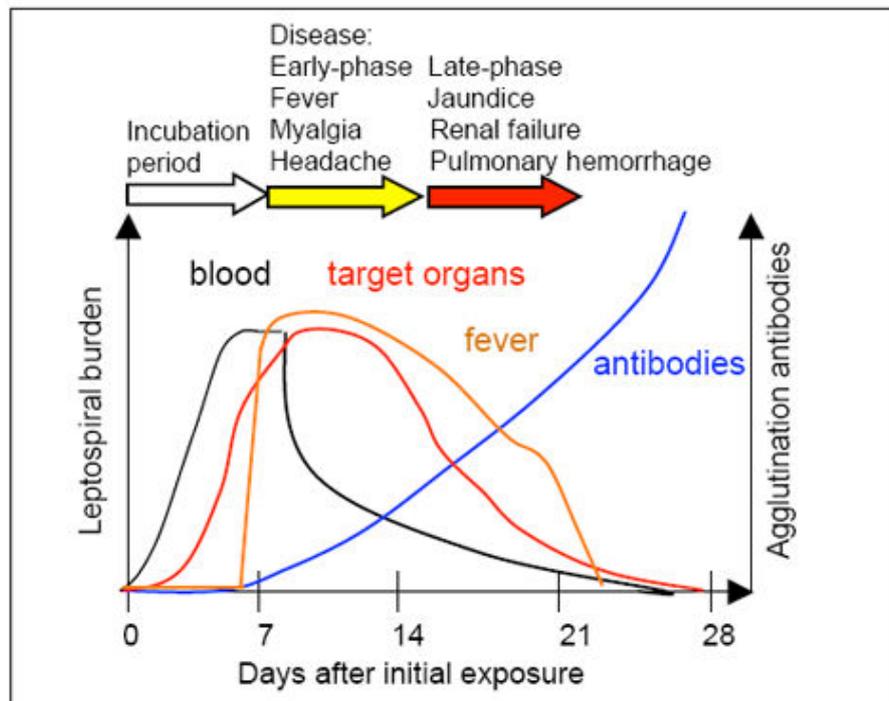


Figure 6: évolution de la charge bactérienne et mise en place de la réponse immunitaire humorale selon (Albert I. Ko, Goarant, et Picardeau 2009).

Les courbes noire et rouge indiquent la charge bactérienne dans le sang et les organes-cibles respectivement, la courbe orange la fièvre et la bleue les taux d'anticorps protecteurs

L'hétérogénéité des présentations cliniques rend le diagnostic difficile dans des situations épidémiologiques où d'autres maladies peuvent induire les mêmes symptômes telles la grippe, les arboviroses ou le paludisme pour n'en citer que quelques-unes en milieu tropical. A la Réunion, le diagnostic différentiel se pose surtout avec les infections virales que sont la grippe, les arboviroses. En pays tempérés, une présentation proche est retrouvée lors des infections à hantavirus qui peuvent induire des atteintes pulmonaires et rénales sévères concomitantes, aussi appelées syndrome pneumo-rénal (Clement et al. 2014).

3.2- Leptospirose : clinique à la Réunion

Si l'on s'intéresse aux données épidémiologiques collectées à la Réunion on retrouve les principales manifestations décrites pour les séries d'autres parties du globe, dans des proportions assez similaires. En effet la compilation des données de surveillance systématique orchestrée par l'ARS depuis 2004 met en évidence sur une période de 8 ans, et 414 cas (Frédéric Pagès et al. 2014), que les principales atteintes à la phase d'état sont:

- présence de fièvre dans 80 % des cas
- atteinte hépatique dans près de 66% des cas
- atteinte rénale dans 60%
- thrombopénie dans près de 60%
- atteinte pulmonaire dans 25%

Dans une étude rétrospective menée plus anciennement à la Réunion (1992-2003) et portant sur 147 cas hospitaliers, il est fait mention de 85% de patients fébriles, 76% avec ictère, 65% avec un taux de créatinine supérieur à 200 $\mu\text{mol/l}$ et 85% de formes pulmonaires (Paganin et al. 2007). Si ce dernier paramètre apparait particulièrement élevé, il peut être discuté de la définition retenue : beaucoup de patients présentaient soit une toux isolée, soit une anomalie à la radiographie de thorax sans forcément d'anomalie clinique associée.

Une étude plus ancienne menée à la Réunion rapporte 249 cas avec pour principales manifestations: thrombopénie dans 73% des cas, cytolysse hépatique dans 71%, insuffisance rénale dans 71% pour un seuil de créatinine à 150 $\mu\text{mol/l}$ et de 42% pour un seuil de 500 $\mu\text{mol/l}$, élévation de la bilirubine supérieure à la norme (25 $\mu\text{mol/l}$) pour 87% et élévation supérieure à 200 $\mu\text{mol/l}$ dans 50% des cas (Pertuiset et al. 1988). Le taux de mortalité dans cette étude était de 13%, principalement lié à des manifestations pulmonaires.

La leptospirose à la Réunion apparait donc globalement de présentation stable dans le temps sur les 3 dernières décennies et comparable aux formes décrites de par le monde.

3.3- Facteurs pronostiques de mortalité et de leptospirose grave

Un des éléments marquants des leptospiroses humaines est le caractère imprévisible de l'infection. En effet, celle-ci va toucher des sujets souvent jeunes et en bonne santé apparente et induire tantôt une affection bénigne, tantôt une défaillance multi-viscérale avec possible décès. De plus pour certains sujets si une première évaluation semble rassurante quant à l'éventuelle gravité, il n'est pas rare de voir se développer en quelques heures un tableau engageant le pronostic vital ce qui pousse certains auteurs à recommander une réévaluation systématique à 24 heures (Mikulski et al. 2014). De fait, de nombreuses études se sont attachées à définir les facteurs associés à la mortalité de l'infection, ou encore prédictifs de formes graves potentiellement létales. La possibilité pour les cliniciens de disposer d'outils simples, cliniques ou biologiques, pour prévoir l'issue de la maladie apparaît comme une aide précieuse à l'amélioration de la prise en charge des patients. Ceci permettrait d'adapter une surveillance plus étroite et/ou une mise en œuvre rapide des traitements symptomatiques adaptés ; ou au contraire de raccourcir la durée d'hospitalisation le cas échéant.

Concernant la mortalité, diverses études peuvent être citées, généralement rétrospectives et centrées sur une zone géographique unique. Pour certaines études, la mortalité étant faible, les auteurs utilisent un critère de jugement intermédiaire qui est la survenue de forme grave de la maladie dont la définition n'est pas consensuelle. Les facteurs associés à une plus forte mortalité et/ou la survenue de formes dites graves se recoupent dans certaines de ces études et sont reportés dans le tableau 3:

-facteurs liés au terrain : l'âge avancé semble être un facteur associé à la mortalité dans plusieurs études, et pour certains un tabagisme actif le serait aussi (Costa et al. 2015; Paganin et al. 2007; Tubiana et al. 2013; A. S. Spichler et al. 2008; A. I. Ko et al. 1999).

-facteurs liés à la présentation de la maladie, les organes touchés : la présence d'atteinte respiratoire ou rénale principalement, mais aussi hépatique a été régulièrement décrite comme facteur de gravité, bien que les définitions des degrés d'atteinte varient d'une étude à l'autre et rendent les comparaisons difficiles (Abgueguen et al. 2008; Mikulski et al. 2014; Tubiana et al. 2013; Paganin et al. 2007; Hochedez et al. 2015; Tantitanawat et Tanjatham 2003; A. S. Spichler et al. 2008; Dupont et al. 1997; Panaphut, Domrongkitchaiporn, et Thinkamrop 2002). On retrouve donc les atteintes caractéristiques de la leptospirose mais l'absence de

définition consensuelle de la gravité n'a pas permis à ce jour de déterminer quels critères précis retenir, ni même quel algorithme utiliser pour mieux cerner précocement les patients à risque d'évolution défavorable dès leur évaluation initiale.

A noter que d'autres études se sont focalisées sur les facteurs prédictifs d'un aspect particulier de la maladie tel que l'hémorragie pulmonaire (Marotto et al. 2010) ou encore l'insuffisance rénale (Dassanayake et al. 2012).

-facteurs liés à la bactérie : les données concernant l'éventuelle corrélation entre souche bactérienne et gravité/létalité sont discordantes. Anciennement, on rattachait certaines présentations cliniques à des infections consécutives à des sérovars particuliers, notamment *Icterohaemorrhagiae*, mais ces données n'ont pas été reproduites de manière constante (P. N. Levett 2001; Haake et Levett 2015). Indépendamment du sérovar ou de l'espèce concernée, la quantité de bactérie présente à la phase de dissémination sanguine a été évaluée à plusieurs reprises. Cette quantité est déduite des résultats de PCR sanguine obtenus en phase bactériémique. Si quelques études ont pu montrer une association significative entre la leptospirémie et la gravité avec des seuils variants de 10^2 à 10^4 bactéries/ml de sang (Hochedez et al. 2015; Tubiana et al. 2013; Truccolo et al. 2001; Lindow et al. 2016), ce résultat n'a pas été reproduit dans d'autres études explorant les facteurs pronostiques avec valeurs de PCR disponibles pour un nombre suffisant de patients (Agampodi et al. 2012; Mikulski et al. 2014). Des études complémentaires sur une plus large population paraissent utiles pour conclure.

-facteurs immunologiques : le postulat de manifestations graves de la maladie secondaires à une réponse immunitaire inappropriée, par excès ou déficience, a amené beaucoup d'équipes à travailler sur la caractérisation de facteurs immunobiologiques en tant que facteurs pronostiques. Ces éléments sont développés dans la seconde partie de l'introduction.

Tableau 3: synthèse des principales études analysant les facteurs pronostiques de la leptospirose humaine

1er auteur, année de publication	Lopes 2004	Pappachan 2004	Daher 1999	Paganin 2007	Abgueuen 2008	Ko 1999	Panaphut 2002	Spichler 2008
Pays	Brésil	Inde	Brésil	Réunion	France	Brésil	Thaïlande	Brésil
Période	1993-1997	2002	1995-1996	1992-2003	1995-2005	1996	1999	2004-2006
Type d'étude	Rétrospective cas/témoins	Rétrospective multivariée	Rétrospective multivariée	rétrospective	rétrospective	Rétrospective Décès/survivants	Prospective Décès/survivants	Rétrospective (cas/témoins : Décès/survivants)
Nombre de patients	740 adultes 100 enfants (<19 ans)	282	110	167	62	193	121	370
dont sévères	118 décès/740 adultes 3 décès/100 enfants	17 décès	24 décès	83	15	50	17 décès	89 décès
Définition de cas	Critères OMS de 1982	MAT	ND	sérologie (MAT)	Microbiologie classique (ex, culture) ou sérologie (MAT)	MAT/culture	Critères OMS de 1982 Sérologie	ELISA/MAT/ culture/autopsies
Nombre de cas confirmés		282	ND	167	35	133	121	370
Nombre de cas probables	740 adultes 100 enfants (<19 ans)	0	ND	0	27	60	0	
Définition de la sévérité	Décès	Décès	Décès	Décès ou admission en réanimation	Réanimation ou dialyse	Décès	Décès	Décès
Critères cliniques								
	Corrélation positive à l'âge	Atteinte pulmonaire : hémoptysie	Oligurie	Age >46 ans	Ictère	Age >37 ans	Râles pulmonaires	Age>40 ans
	Corrélation positive au taux de créatinine	Atteinte neurologique : méningite		Choc	Atteinte cardiaque	Hypovigilance	Hypotension	Oligurie
				Détresse respiratoire		Insuffisance rénale	Oligurie	Atteinte pulmonaire
				Ventilation mécanique		Insuffisance respiratoire		
bio/paracliniques								
				Créatinine>200	Perturbation ECG		hyperkaliémie	Créatinine>265 Plaquettes <70 G/l

Légendes : ALAT= alanine amino-transférase; ASAT = aspartate amino-transférase; créatinine, unité en $\mu\text{mol/l}$; ECG : électrocardiogramme; HIA = hémorragie intra-alvéolaire; IL= interleukin; Lepto IH = *Leptospira* séro-groupe Icterohaemorrhagiae; MAT= microscopic agglutination test; PTX3= pentraxine, SAPS= simplified acute physiology score; SOFA = sepsis-related organ failure assessment; TP=taux de prothrombine; VM= ventilation mécanique;

Tableau 3 : suite

1er auteur, année de publication	Mikulski 2014	Tubiana 2013	Herrmann 2010	Hochedez 2015	Tantitanawat 2003	Dupont 1997
Pays	Nouvelle Calédonie	Nouvelle Calédonie	Guadeloupe	Martinique	Thaïlande	Antilles (Guadeloupe)
Période	2009-2011	2008-2011	2003-2004	2010-2013	1998-2001	1989-1993
Type d'étude	Prospective	Rétrospective	Prospective	Rétrospective	Rétrospective	Rétrospective (cas/témoins : Décès/survivants)
Nombre de patients dont sévères	47 25	176 71	168 24	102 12	362 148	68 12 décès
Définition de cas	PCR et sérologie	PCR et sérologie (MAT)	Culture Sérologie MAT	PCR	Sérologie et MAT	ELISA/MAT
Nombre de cas confirmés	47	152	168	102	362	68
Nombre de cas probables	0	24	0	0	ND	0
Définition de la sévérité	Décès, dialyse ou ventilation mécanique	Décès ou insuffisance d'organes: -dialyse -VM -choc avec amines -saignement et transfusions -HIA	Décès Recours dialyse ou VM	Décès ou insuffisance d'organe: -dialyse -VM -choc avec amines -saignement avec transfusions	Décès ou créatinine>264 µmol/l ou insuffisance respiratoire	Décès
Critères cliniques						
	Choc septique	Tabagisme	Délai antibiotiques >10j	Ictère	Hémoptyisie	Dyspnée
		Délai traitement>2j	HTA et Alcoolisme	Hypotension	Insuffisance respiratoire	Oligurie
			Hémorragie	Oligurie	Oligurie	
			Oligurie	Auscultation thoracique anormale		
			Auscultation thoracique anormale			
bio/paracliniques						
	Lactate	Lepto IH	Lepto IH	Lepto IH	Plaquettes<100 G/l	Perturbation ECG
	Bilirubine Total	Plaquettes <50 G/l	ASAT > 102 UI/l	Plaquettes<92G/l	GB>13G/l	Syndrome interstitiel en radiographie
	Lipase	Créatinine>200	Amylase > 285 U/l	TP<68%	Hématocrite<30%	Globules blancs >12.9 G/l
	Ratio ASAT/ALAT	Lactate >2.2		Leptospirémie>3.1 x10 ⁶ bactéries/ml	Bicarbonates<20 mmol/l	
	Baisse ratio IL10/TNF□	Amylase>250			Bilirubine totale >43 µmol/l	
	PTX3 et IL1□	Leptospirémie >10 ³ /ml				
Composites						
	SAPS II et SOFA					

4- Diagnostic

Actuellement, le diagnostic de la leptospirose repose sur 3 domaines principalement : mise en évidence de la bactérie par microbiologie standard (examen microscopique et culture), techniques sérologiques, et techniques de biologie moléculaire (Picardeau 2013; Rajapakse et al. 2015; Haake et Levett 2015). Voici un rappel sur l'utilisation de ces techniques en pratique courante :

-Les méthodes dites de microbiologie classique sont les plus anciennement utilisées. Elles comprennent la recherche des bactéries sur les prélèvements biologiques issus des patients (sang, LCR, urines) à l'aide d'un microscope spécifique : microscope à fond noir. Avec cet outil le biologiste peut voir les leptospires à la forme hélicoïdale caractéristique se mouvoir ce qui est très évocateur du diagnostic dans un contexte clinique compatible, bien que non spécifique. Néanmoins la technique est peu sensible car les prélèvements contiennent souvent peu de microorganismes : un seuil de 10^4 leptospires/ml semble requis, et des faux positifs sont possibles (débris cellulaires) (Picardeau 2013). Son usage est de plus en plus restreint (laboratoires non équipés, biologistes non entraînés), au profit des autres techniques. L'examen direct au microscope à fond noir est complété par la mise en culture des bactéries dont les conditions de culture sont réputées fastidieuses, et donc la réussite incertaine. Le milieu de culture spécifique le plus utilisé est le milieu EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) avec une incubation à 30°C. Le temps de génération est lent, plusieurs semaines jusqu'à 2 mois sont requis. En pratique elle est rarement mise en œuvre car elle n'apporte pas d'information rapide et sensible utile au diagnostic en phase aiguë, mais elle est recommandée lorsqu'on cherche à avoir une identification précise de la bactérie en cause : identification secondaire par sérogroupage ou biologie moléculaire.

-La technique sérologique est la plus pratiquée dans le monde car offre des avantages en terme de rapidité de réponse diagnostique, faible coût et sensibilité (Signorini et al. 2013). Elles reposent sur la détection directe ou indirecte d'anticorps dirigés contre la bactérie.

La technique sérologique de référence, qui fait office de gold standard pour le diagnostic, est le test d'agglutination microscopique ou MAT. Ce test met le sérum du patient en présence de différentes souches bactériennes vivantes afin d'induire une agglutination des bactéries entre elles si elles ont été reconnues par des anticorps anti-leptospires (formation de complexes immuns). Les différentes souches bactériennes utilisées permettent d'identifier le

sérogroupe concerné par la réaction immune contre le panel d'antigènes constitué par les bactéries cultivées. Le résultat rendu est quantitatif : il indique la dernière dilution du sérum induisant 50% d'agglutination des bactéries. Le seuil retenu est de 1/100 en France métropolitaine et 1/400 pour les DOM. Si cette technique offre l'avantage d'identifier le sérogroupe, elle a pour inconvénient une certaine lourdeur de mise en œuvre puisque nécessite de garder en culture de nombreuses souches bactériennes. De plus l'interprétation en est difficile et requiert une bonne expérience. A ce titre peu de laboratoires la pratiquent et en France métropolitaine elle est essentiellement gérée par le CNR.

La technique de dosage des IgM anti-leptospire par ELISA est très répandue, que ce soit avec l'usage de kits commerciaux ou de techniques dites « maison » utilisant des antigènes bactériens issus des souches locales. La technique a pour avantage d'être positive plus tôt que le MAT mais est souvent moins sensible. Il est recommandé de l'utiliser comme dépistage et si positive de confirmer par une autre technique et/ou une seconde sérologie montrant une ascension du titre des IgM (Haake et Levett 2015). Pour répondre au besoin de tests rapides utilisables au lit du patient dans les pays en voie de développement, d'autres tests sérologiques basés sur des méthodes différentes ont été évalués sans apporter de méthode satisfaisante à ce jour (Goris et al. 2013).

-Les techniques de biologie moléculaire reposent sur la détection du génome bactérien, par PCR ou RT-PCR. Différents gènes spécifiques de leptospires pathogènes ont été ciblés pour cette méthode : ARN16S, ARN 23S, LipL32 pour citer les principaux. La PCR permet de détecter de faibles quantités de bactéries dans le sang ou les urines (plus rarement LCR, humeur aqueuse) : dès 10^1 à 10^2 leptospires/ml (Fabrice Merien et al. 2005; Smythe et al. 2002; Paul N. Levett et al. 2005). Cette technique est de plus en plus répandue car elle est très spécifique, sensible et permet un diagnostic rapide, dès les premiers jours de la maladie. Le principal inconvénient est le coût de mise en œuvre qui en limite l'emploi dans les zones les plus pauvres, où l'incidence est pourtant plus élevée.

Outre les avantages et inconvénients de chaque technique décrits ci-dessus, il faut prendre en compte la fenêtre d'opportunité pour l'emploi de chaque test. Schématiquement durant la première semaine de la maladie la bactérie est présente dans le sang et détectable par microbiologie classique ou PCR. A partir de la deuxième semaine, la bactérie peut être mise en évidence par ces mêmes techniques sur prélèvement d'urines, ou encore on peut employer les techniques sérologiques puisque les anticorps apparaissent après quelques jours

d'infection. Les examens diagnostics devront donc être demandés en fonction du stade suspecté de la maladie, généralement défini avec la date de début des symptômes.

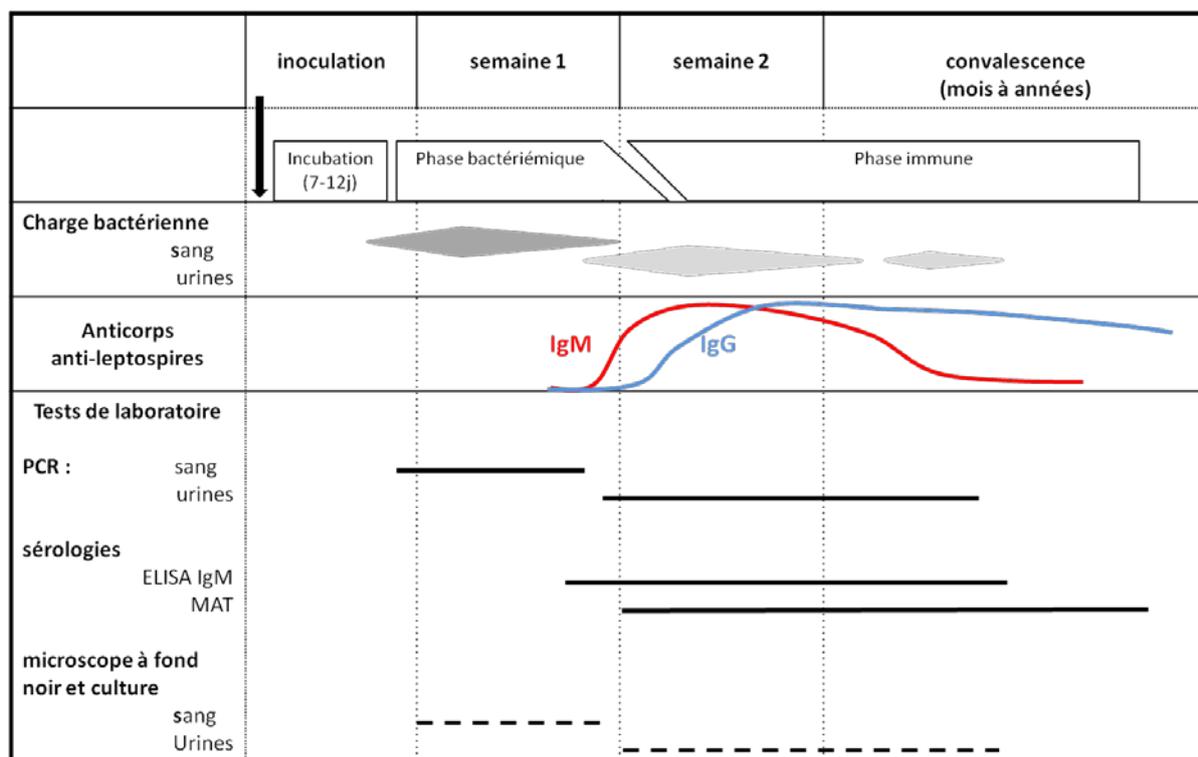


Figure 7: phases de la leptospirose et principaux moyens diagnostiques selon la chronologie de la maladie

A la Réunion la technique la plus répandue est la PCR, les laboratoires de microbiologie du CHU (St Denis et St Pierre) assurant les analyses pour l'ensemble du territoire. Les sérologies sont aussi réalisées, en fonction du délai de prélèvement par rapport au début des symptômes et un éventuel résultat de PCR négative au préalable. Le test MAT était pratiqué sur le site Sud du CHU (St Pierre) jusqu'en 2016. Les analyses sont depuis adressées au CNR. Il faut noter que ces évolutions de pratique vers l'usage en priorité de la PCR, en France et dans les DOM, sont aussi conditionnées par un changement de la nomenclature des actes de biologie médicale pour le diagnostic de la leptospirose. La technique de MAT n'est plus remboursée tandis que la PCR et l'ELISA IgM sont maintenant remboursés par l'assurance maladie. Selon le CNR, cette modification devrait entraîner, à court terme, une perte d'information sur les souches qui circulent ; en effet, seul le MAT peut aujourd'hui permettre d'identifier le sérotype (CNR de la Leptospirose 2014).

5- Traitement

5.1- Traitement curatif

Le traitement de la leptospirose repose sur l'antibiothérapie et les soins de support des éventuelles atteintes d'organe, soins de réanimation en particulier (ventilation mécanique, épuration extra-rénale, amines vasopressives par exemple).

Les antibiotiques réputés efficaces appartiennent aux familles des pénicillines, céphalosporines et cyclines. Ils sont utilisés aux doses usuelles des infections à pyogènes (ex : amoxicilline 1g x 3/jour) pour une durée de 7 à 10 jours. La littérature ne fait pas état de résistances développées à l'égard de ces catégories d'antibiotiques largement utilisées dans cette indication, sous réserve d'une évaluation rendue laborieuse par la croissance lente du microorganisme *in vitro*. Peu d'études solides ont permis d'évaluer leur utilité en phase aiguë de la leptospirose et les résultats sont contradictoires. On peut citer l'étude de 42 patients chez qui la pénicilline G a permis de raccourcir la durée de la période fébrile, de l'élévation de la créatinine, de l'excrétion urinaire de bactéries et la durée d'hospitalisation comparativement à un placebo (Watt et al. 1988). Par contre pour l'étude contre placebo de Edwards et collaborateurs, l'effet de la pénicilline G est jugé minime avec disparition de l'excrétion urinaire de leptospires mais avec une absence d'effet sur la mortalité, la fièvre et les atteintes d'organes (Edwards et al. 1988).

Les méta-analyses réalisées par l'institut Cochrane concluent à l'absence de bénéfice évident de l'antibiothérapie en terme de mortalité et durée de fièvre et ne permettent pas de conclure sur l'utilité ou l'inutilité des antibiotiques en dehors d'une tendance au raccourcissement de certains symptômes (Brett-Major et Coldren 2012). Une méta-analyse en réseau, comparant toutes les études sur le sujet, a récemment été publiée. Elle porte sur 7 essais contrôlés évaluant la pénicilline, les céphalosporines, la doxycycline et le cas échéant un placebo. Les auteurs concluent que si les antibiotiques sont peut-être efficaces, le meilleur bénéfice attendu provient alors de l'usage de la pénicilline (Naing, Reid, et Aung 2017). Pour toutes ces études il n'était pas retrouvé d'effet indésirable majeur attribuable aux antibiotiques. On peut tout de même signaler dans certaines séries un phénomène de Jarisch-

Herxheimer, éruption cutanée faisant suite à l'antibiothérapie lors d'infection par spirochètes, avec une fréquence de 20 à 80% (Guerrier et al. 2017; Tsuha et al. 2016).

Au-delà des essais cliniques, d'autres éléments permettent de questionner l'utilité des antibiotiques :

-dans une revue de littérature sur 3390 patients non traités par antibiotiques (avant les années 1950), le taux de mortalité médian des patients est évalué à 2,2%, soit inférieur au taux des estimations les plus récentes (Taylor, Paris, et Newton 2015). Des biais de recueil et de diagnostic pour cette époque sont bien sûr possibles.

-l'évaluation des délais de mise en route du traitement antibiotique comme facteur prédictif de mortalité/gravité donnent des résultats discordants. Pour certains un délai prolongé est un facteur péjoratif (Tubiana et al. 2013; Herrmann-Storck et al. 2010), pour d'autres c'est l'inverse (A. S. Spichler et al. 2008) ou bien il n'y a pas d'association statistique retrouvée (Hochedez et al. 2015; Panaphut, Domrongkitchaiporn, et Thinkamrop 2002).

-la charge bactérienne plasmatique n'est pas clairement corrélée à la sévérité de la maladie. Depuis 2 décennies, l'emploi de plus en plus large de la biologie moléculaire comme outil diagnostique a permis d'évaluer la quantité de bactéries circulantes à la phase initiale de la maladie. Si quelques études ont pu montrer une association significative entre la leptospirémie et la gravité avec des seuils différents (Hochedez et al. 2015; Tubiana et al. 2013; Truccolo et al. 2001), ce résultat n'a pas été reproduit dans la plupart des autres études explorant les facteurs pronostiques (cf. paragraphe 3.3).

Ces éléments interpellent donc sur l'utilité potentielle des antibiotiques. Néanmoins leur rapport bénéfices/risques semble favorable et la mise en œuvre d'études spécifiques sur ce sujet semble difficile. Sans vouloir entrer dans un débat probablement insoluble sur l'intérêt de les mettre en œuvre ou pas, ces considérations rejoignent l'hypothèse de manifestations de la maladie en partie liées à des facteurs issus de l'hôte et non de la bactérie elle-même. Ces facteurs de l'hôte sont notamment la réponse immunitaire, qui est par certains décrite comme inappropriée : soit par défaut d'activation, soit à l'inverse par réponse excessive délétère. De fait, certains travaux ont exploré la piste d'un traitement modulant l'immunité, et en particulier l'usage de corticoïdes.

Une étude contrôlée contre placebo décrit l'emploi de corticoïdes pour corriger les thrombopénies (Alian et al. 2014). La corticothérapie a un effet modeste avec raccourcissement de 1 jour de la durée d'hospitalisation et de la thrombopénie. D'autres études ont évalué l'intérêt des corticoïdes lors de manifestations graves telles les atteintes pulmonaires : dans une étude ouverte avec 3 bras (traitement standard ou ajout de dexaméthasone ou ajout de desmopressine) il n'est pas retrouvé de modification de mortalité pour les 68 patients ayant participé mais une majoration des infections dans le groupe traité par corticoïdes (Ni wattayakul et al. 2010). Un essai contrôlé contre placebo aurait été mis en place, mais sans résultat publié à ce jour (Azevedo et al. 2011). Une revue de la littérature des quelques études portant sur l'utilisation des corticoïdes dans la leptospirose conclut à l'absence de bénéfice évident (Rodrigo et al. 2014). Néanmoins l'utilisation des corticoïdes dans les formes pulmonaires graves de leptospirose semble assez répandue dans certains pays.

5.2- Traitement préventif

Le traitement préventif repose sur les mesures visant à diminuer l'exposition au pathogène et sur la vaccination.

Concernant les mesures ciblant l'exposition, elles s'adressent aux populations les plus exposées, notamment professionnels en contact direct avec des rats ou avec des eaux risquant d'être contaminées (exemple : égouts, pisciculture, loisirs en eau vive en zone d'endémie). Le conseil supérieur de l'hygiène publique recommande ainsi que lorsqu'une activité professionnelle fait courir le risque d'un contact régulier avec des urines de rongeurs, ou un environnement infesté de rongeurs, d'adopter les mesures suivantes (CSHP 2005a):

- le port de gants, de bottes, de cuissardes, de vêtements protecteurs, voire de lunettes anti projections si nécessaire,

- la désinfection à l'eau potable et au savon ou à l'aide d'une solution antiseptique de toute plaie ou égratignure, ainsi que la protection ultérieure de cette plaie ou égratignure par un pansement imperméable.

Concernant la vaccination il existe un unique vaccin commercialisé en France pour l'être humain, sous la spécialité Spirolept®. Il s'agit d'un vaccin entier inactivé issu de souche de *Leptospira icterohaemorrhagiae*. L'antigène vaccinal correspond au LPS, et l'immunisation est donc spécifique d'un sérovar. Le schéma vaccinal comporte 2 injections à 15 jours d'intervalle puis rappels à 6 mois et tous les 2 ans (ANSM 2017). Etant donné la relative rareté de l'infection et son spectre étroit (ne protégerait que contre *Leptospira icterohaemorrhagiae*), il n'a pas sa place d'une manière générale en France métropolitaine et doit être réservé à des populations présentant des activités professionnelles à risque (égoutiers, travailleurs agricoles ou pisciculture, vétérinaires) en particulier dans les territoires de forte endémie (DOM) (CSHP 2005b). Aucune étude contrôlée n'a établi clairement son efficacité clinique. Néanmoins la vaccination systématique des égoutiers de Paris a permis de faire diminuer drastiquement le nombre de cas depuis les années 1970 (CSHP 2004) et une étude a démontré une efficacité en terme d'induction d'anticorps supposés protecteurs chez des sujets sains (Laurichesse et al. 2007). Sur le plan international, la plupart des pays industrialisés ne commercialisent pas de vaccin pour la leptospirose étant donné la faible incidence, le spectre étroit et la possibilité de recourir à des méthodes préventives de l'exposition. A Cuba, un vaccin évalué sur 50 000 individus en comparaison d'un groupe contrôle a montré une baisse des infections de près de 80% et une tolérance relativement bonne (Martínez et al. 2004).

Les vaccins actuellement disponibles ont plusieurs limites : coût, schéma d'administration contraignant, persistance d'une immunité seuil apparaissant faible à long terme, spécificité pour un séro groupe unique. Ceci laisse entrevoir une place utile pour la recherche dans ce domaine, et donc la nécessité de mieux comprendre les déterminants de la réponse immunitaire dans cette infection (Koizumi et Watanabe 2005).

6- Formes chroniques et complications à moyen terme

La leptospirose est classiquement identifiée comme une infection aiguë, résolutive en 1 à 3 semaines après l'atteinte décrite au paragraphe 3. Néanmoins chez l'homme il est fait mention de complications à moyen ou long terme dans de rares travaux publiés sur le sujet. Les manifestations décrites concernent principalement l'appareil ophtalmologique, en la description d'uvéites uni- ou bilatérales, uniques ou à rechute, développées quelques semaines

à années après la phase aiguë. Ces uvéites, inflammation de certaines portions de l'œil, sont décrites essentiellement dans des séries indiennes (Rathinam 2002) et issues de Nouvelle Calédonie (Mancel et al. 1999). L'absence de description dans d'autres parties du globe peut faire pencher pour un mécanisme spécifique de la souche bactérienne en cause dans ces régions, ou l'absence d'étude systématique de cette possible complication ailleurs. Le mécanisme responsable est lui aussi incertain puisque pour certains il est la conséquence de la bactérie présente dans l'humeur aqueuse de l'œil (F. Merien et al. 1993), et pour d'autres une réaction auto-immune faisant suite à une réaction croisée après l'infection. Cette hypothèse est appuyée par plusieurs travaux menés chez l'animal dans le cadre des uvéites équinees liées à la leptospirose (Verma et al. 2008; Verma et Stevenson 2012).

Bien que peu fournie, la littérature portant sur d'éventuelles complications à long terme fait état d'autres atteintes possibles à distance de la phase initiale : fatigue chronique, risque majoré d'insuffisance rénale, portage rénal chronique avec excrétion urinaire de leptospires (Ganoza et al. 2010; H.-Y. Yang et al. 2015; Shpilberg et al. 1990). Ainsi, de nombreux cliniciens ont observé une détérioration des capacités physiques plusieurs semaines après l'infection exprimée en terme de fatigue générale ou d'impotence fonctionnelle. Le syndrome de fatigue post-infectieux est une entité classique compliquant la phase aiguë des principales maladies infectieuses. Il n'a cependant pas été encore décrit dans la leptospirose. Dans une étude portant sur 47 patients brésiliens, 50% avaient des symptômes généraux persistants à 20 jours, puis 10% sur les 22 étudiés vers 40 jours en moyenne (A. Spichler et al. 2011). Une étude hollandaise rapporte quant à elle 21% de patients ayant des symptômes généraux persistants (fatigue extrême, myalgies, faiblesse musculaire) jusque 24 mois après la phase initiale.

II. Relation hôte pathogène : immunopathologie de la leptospirose

Dans la première partie de l'introduction, ont été mis en avant l'importance épidémiologique de la leptospirose, la clinique très hétérogène de la maladie, les grandes caractéristiques bactériologiques de l'agent pathogène. Ceci permet de dresser un constat : la physiopathologie de la maladie n'est pas complètement comprise. Si les progrès sur le génome bactérien et les fonctions des gènes des bactéries du groupe pathogène progressent rapidement il n'en reste pas moins que la réponse de l'hôte doit être explorée en parallèle pour dresser un tableau complet de cette physiopathologie.

Les éléments simples qui font avancer l'hypothèse d'une réponse de l'hôte influençant le phénotype de la maladie sont qu'une même espèce pathogène peut induire au sein de différents hôtes des manifestations hautement variables. Nous avons déjà souligné l'hétérogénéité des présentations chez les êtres humains, on peut aussi mettre en avant le fait qu'une même espèce est pathologique pour l'homme alors qu'elle semble donner peu/pas de manifestations pour des animaux qui font souvent office de réservoir tels les rats. Actuellement, la part des manifestations liées à la bactérie, et celles liées à une réponse immune inadaptée n'est pas claire. Il est probable qu'il s'agisse d'une combinaison de ces facteurs comme exposé dans le schéma suivant.

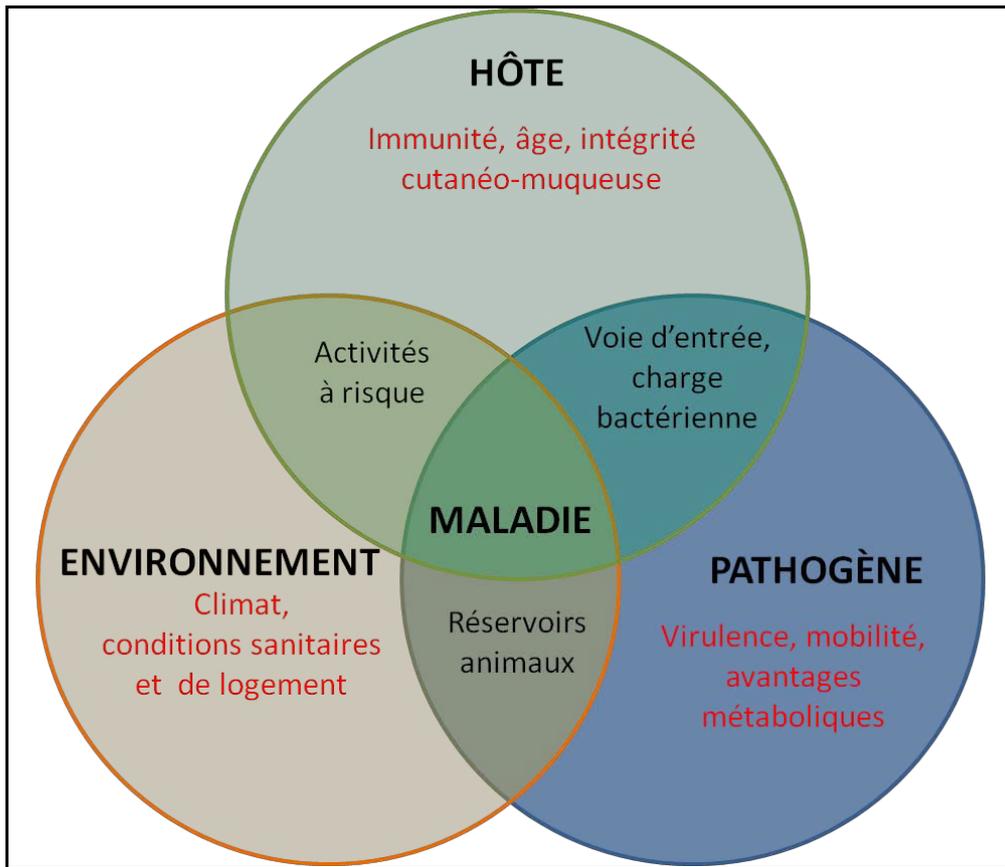


Figure 8: physiopathologie multifactorielle de la leptospirose

Dans cette seconde partie de l'introduction seront détaillés les principaux éléments connus de l'immunopathologie de la leptospirose. Pour rester le plus proche possible de mon travail de thèse je développerai essentiellement les aspects connus issus de la leptospirose humaine, et m'appuierai sur les études animales et *in vitro* en cas de données insuffisantes chez l'être humain.

1- Modèles d'étude

Dans cette section sont exposés les principaux types de modèles d'étude de la physiopathologie de la leptospirose. Ceci permet de notifier d'emblée les inconvénients de ces modèles, et donc relativiser les données présentées dans les sections portant sur les différents acteurs de la physiopathologie de l'infection.

La réponse de l'hôte à l'infection par *Leptospira* peut être évaluée directement à partir de l'être humain, ou bien à partir de modèles animaux ou encore de modèles cellulaires *in vitro*.

Ces derniers sont bien sûr plus éloignés de la réalité et de la complexité de la réaction mise en œuvre lors de l'infection humaine, mais ils ont le mérite d'apporter des réponses potentielles sur des aspects qui semblent difficiles ou impossibles à étudier directement sur l'humain.

Les données chez l'être humain sont le plus souvent issues d'évaluation *ex vivo* à partir de liquides biologiques (sang, urines principalement) et plus rarement de biopsies d'organes ou d'autopsies. Ces dernières pratiques ont été mises en œuvre dans les années 50-60 (Areal 1962) pour mieux caractériser les lésions de cette maladie systémique mais n'ont plus cours à l'heure actuelle si ce n'est de manière sporadique (Shintaku, Itoh, et Tsutsumi 2014). En effet les lésions histologiques ont été caractérisées et il ne semble pas éthique d'exposer les patients à un prélèvement qui ne modifiera pas leur prise en charge tout en leur faisant courir un risque conséquent (hémorragie, surinfection) du fait de leur caractère invasif. Ainsi les données chez l'être humain sont limitées aux prélèvements d'accès aisés que sont les liquides biologiques. Les données sont donc assez restreintes puisque la plupart des organes cibles ne sont pas aisément accessibles, à l'exception du liquide céphalo-rachidien et du liquide de lavage alvéolaire. La plupart des travaux portent donc sur l'analyse de facteurs extraits du sang. Soit les analyses sont réalisées directement sur les éléments extraits, soit après mise en culture/contact de ces éléments sanguins avec des leptospires. Une pratique illustrative est l'étude des PBMC (Peripheral blood mononuclear cells) mises en culture en présence de *Leptospira* pathogène ou saprophyte, ou encore de LPS ou protéines issues de bactéries.

Le caractère limité des études humaines font des modèles animaux une aide précieuse pour améliorer nos connaissances de la leptospirose (Zuerner 2015). Les rongeurs sont fréquemment infectés ou bien constituent des réservoirs et c'est donc naturellement que les modèles portent sur le rat, la souris, ou d'autres rongeurs tels que le cochon d'Inde, le hamster ou la gerbille. Les animaux de rente (bétail) sont des modèles potentiels, en particulier pour la vaccination car il existe des enjeux économiques pour l'agro-alimentaire. Il est alors possible d'étudier la réponse de l'hôte sous divers aspects : cinétique de l'infection, effet dose de l'inoculum, histologie des organes touchés, caractéristiques de la réponse immune, et comparaison de différentes espèces bactériennes ou souches voire de souches avec mutations ciblées. Les animaux avec une composante génétique modifiée (KO ciblant certains gènes) sont aussi une source d'étude majeure pour mieux caractériser les éléments-clés de la réponse immunitaire, en particulier les souris qui sont en règles résistantes à l'infection en dehors de modèles transgéniques développés ces dernières décennies. La plupart des connaissances

acquises sont issues des modèles animaux. Il est important de souligner que comme pour d'autres maladies la transposition de ces connaissances à l'être humain doit être prudente. En effet, il existe de nombreuses différences dans les systèmes immunitaires des animaux et de l'être humain. Ces différences expliquent en grande partie le phénotype hautement variable d'une espèce à l'autre. Par exemple les rats ne semblent pas présenter d'infection sévère (en tout cas pas à des doses d'inoculum classiques) et sont porteurs chroniques au sein des tubules rénaux. A l'opposé, les hamsters sont représentatifs des infections à risque léthal mais pas du portage rénal (Haake 2006). Ces écarts entre humains et modèles animaux ont été pointés du doigt dans de nombreuses maladies. Dans le cadre de la leptospirose on peut citer deux travaux qui illustrent ces écarts entre humains et rongeurs pour deux aspects essentiels de la réponse immune innée lors de cette infection. Le premier est celui des différences notables d'expression de gènes entre les monocytes/macrophages humains et ceux issus de souris en cas de co-culture avec des leptospires (Xue et al. 2013; Li et al. 2010). Le second correspond à la perception différente du LPS : le TLR4 (Toll-like receptor 4) de souris reconnaît bien le LPS de *Leptospira* tandis que les cellules humaines le reconnaissent mal, le récepteur préférentiel étant TLR2 (C. Werts et al. 2001; Nahori et al. 2005). L'autre limite de ces modèles vient des bactéries utilisées : les passages *in vitro* tendent à sélectionner des bactéries ayant perdu leur virulence ou du moins avec une expression moindre de facteurs de virulence possiblement du fait de modifications physiologiques métaboliques induites par la culture. Les apports historiques des modèles animaux, souris et hamster en particulier, dans la compréhension de la physiopathologie de la leptospirose sont détaillés dans une revue récente de littérature (Gomes-Solecki, Santecchia, et Werts 2017).

Le dernier grand modèle d'étude correspond aux cultures cellulaires *in vitro*. Les interactions entre *Leptospira* et les cellules issues des tissus cibles peuvent ainsi être analysées : attachement, infectivité, induction d'apoptose ou de sécrétions de molécules (protéases, cytokines). A notre connaissance ce type de travaux a porté essentiellement sur des cellules d'origine rénale, endothéliale, monocytaires, ou de type fibroblastes (Xue et al. 2013; Li et al. 2010; Martinez-Lopez, Fahey, et Coburn 2010; Evangelista et al. 2014; Monica L. Vieira et al. 2007; Barocchi et al. 2002; Kassegne et al. 2014). Les résultats sont encore plus complexes à transposer à l'humain puisqu'il s'agit de modèles très parcellaires ne reproduisant pas la complexité des interactions cellulaires et moléculaires au sein d'un être

vivant tel qu'un mammifère. De plus les modèles cellulaires sont souvent issus de lignées établies à partir de cellules cancéreuses, avec de nombreuses mutations les éloignant encore plus des cellules originelles.

2- Mécanismes d'entrée et de diffusion du pathogène

Dans notre travail nous nous sommes intéressés à la place de la réponse immunitaire innée de l'hôte lors de la phase aiguë de la leptospirose. La réponse immunitaire innée correspond à l'ensemble des acteurs (cellulaires, moléculaires) capables d'induire une défense rapide et peu spécifique à l'encontre d'un agent pathogène extérieur. Ce mécanisme de défense est par essence d'installation rapide, sans phénomène anamnétique (mémoire immunitaire) et se produit dès les premières secondes de la rencontre entre microorganisme et hôte. Au-delà des cellules de l'immunité innée (ex : neutrophiles, monocytes/macrophages) et des acteurs moléculaires de ce processus (complément, cytokines, chimiokines), on peut identifier des mécanismes de défense de l'hôte n'appartenant pas stricto sensu à l'immunité innée. Dans les sections suivantes ce sont ces mécanismes « non-professionnels » (exception faite du complément) que nous allons exposer en suivant l'ordre chronologique de l'entrée des leptospires dans le corps humain à la diffusion aux organes cibles.

2.1 - Voies d'entrée et barrières naturelles

Le plus souvent, la bactérie peut pénétrer dans l'organisme par des zones de faiblesse, muqueuses ou plaies, mais une pénétration au travers d'une barrière cutanée normale n'est pas exclue. Ceci n'a pas été montré par des travaux *in vivo* (Murray 2015) mais les études épidémiologiques confirment un risque accru d'infection à exposition égale lorsque les individus ont des blessures cutanées exposées, ou encore un contact de muqueuses (bouche, yeux) avec de l'eau ou de la boue potentiellement vectrices des bactéries (F. Pagès et al. 2016; Lingappa et al. 2004; Mwachui et al. 2015; Kamath et al. 2014; Morgan et al. 2002). Ce constat est à la base des recommandations de ports de vêtements couvrants ou protection de zones blessées en cas d'activité à risque d'exposition à des sources contaminantes (animaux, eaux vives, agriculture, égouts).

Des études *in vitro* ont démontré que les leptospires étaient capables de fixer les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) de l'hôte ainsi qu'à différents types de cellules

épithéliales (Figueira et al. 2011; Robbins et al. 2015; Ballard et al. 1986) et des fibroblastes murins (Vinh, Faine, et Adler 1984). Les données issues des modèles animaux et sur cultures cellulaires sont en faveur d'un microorganisme se déplaçant entre les cellules. Rarement il a été décrit un passage au travers des cellules épithéliales, par mécanisme d'endocytose ou bien avec une bactérie libre au sein du cytoplasme (Barocchi et al. 2002; Thomas et Higbie 1990). Néanmoins, à notre connaissance aucun travail n'a été réalisé sur des modèles cellulaires issus ou dérivés de tissu cutané. La capacité des leptospires à pénétrer la peau, même saine, reste donc à être étayée.

Une fois la bactérie ayant passé les barrières naturelles de l'organisme, divers éléments participent à sa capacité à gagner le courant sanguin :

- les bactéries sont douées d'une importante mobilité comme décrit dans la première partie de l'introduction (paragraphe 2.2- page 23).

- les bactéries pathogènes sont pourvues de protéines leur permettant de détecter dans leur environnement des molécules les guidant vers des sources de nutriments, et potentiellement vers l'hémoglobine, donc le sang de l'hôte infecté (Ren et al. 2003; Yuri et al. 1993).

- les leptospires sont dotées de diverses protéines membranaires capables de se lier aux composants protéiques et glucidiques (glycosaminoglycanes) de la MEC de l'hôte. Ainsi on recense des protéines capables de se lier à la fibronectine (Lsa66, LigB), à la laminine (protéines du groupe Len) et à l'élastine (LigB, OmpL37, OmpL47) pour citer les plus étudiées (Murray 2015). Certaines de ces protéines de *Leptospira* capables de fixer les protéines de la MEC ont la capacité de fixer d'autres ligands et ainsi endosser d'autres fonctions. On peut citer par exemple LigB qui peut se lier à des protéines régulatrices du complément (facteurs H et I, C4BP), ou encore la protéine LenA qui fixe le facteur H régulateur du complément et le plasminogène (Murray 2015).

- Les bactéries utilisent des protéases spécifiques ou détournent celles de l'hôte telles que le plasminogène, ce qui leur permet de détruire certains composants de la MEC et ainsi d'y progresser (Kassegne et al. 2014; Monica L. Vieira et al. 2009).

2.2- Diffusion hémotogène

Une fois la bactérie au sein du compartiment vasculaire sanguin elle a la possibilité de diffuser au travers des vaisseaux vers l'ensemble de l'organisme de l'hôte et ainsi gagner les organes cibles de l'infection. Ce passage au sein du sang est associé à un environnement totalement différent puisque la bactérie est alors en présence des principaux acteurs de l'immunité innée et du système de coagulation entre autres.

La présence de la bactérie dans le sang est une étape bien démontrée chez l'humain et lors des modèles animaux, que ce soit par les techniques de mise en culture du sang ou bien encore par l'utilisation plus répandue de la biologie moléculaire. Pour la première fois des *Leptospira* pathogènes ont été marquées par bioluminescence et l'infection suivie au travers d'imagerie permettant sa détection sur modèle murin : après injection intra-péritonéale, la bactérie se multiplie et diffuse par le sang à travers tout l'organisme (Ratet et al. 2014). Le passage sanguin se fait durant les 7-8 premiers jours suite à l'infection/contact avec la bactérie et va correspondre à la survenue des premiers signes tels que fièvre, myalgies comme détaillé en Figure 6 page 31 et Figure 7 page 40. Les analyses faites à partir de PCR en temps réel permettent d'évaluer que la charge bactérienne s'élève jusqu'à 10^6 bactéries/ml (Agampodi et al. 2012). Les corrélations de ce taux avec la gravité de la maladie en pathologie humaine ont été discutées en paragraphe 3.3- page 33. Il est intéressant de comparer ces taux très élevés avec d'autres infections bactériennes. Si des taux similaires ont été retrouvés chez des bactéries de la même famille, telles que les spirochètes de type *Borrelia*, ces taux paraissent très supérieurs à ceux mis en évidence lors d'infections par des bactéries pyogènes plus conventionnelles. En effet les bactériémies à *Escherichia coli* ou autres entérobactéries correspondent à des charges de bactéries généralement inférieures à 10 par millilitre, justifiant l'analyse de plusieurs décilitres de sang pour les examens d'hémocultures (Yagupsky et Nolte 1990). Les raisons de telles différences sont probablement à chercher en partie dans les écarts de réponse immune innée pour ces différents types de pathogènes. Ces éléments seront discutés dans les paragraphes suivants.

Lors de cette phase de diffusion hémotogène les leptospires peuvent aussi interagir avec la cascade des protéines de la coagulation et les plaquettes. En effet, l'atteinte hématologique se caractérise par une profonde thrombopénie associée à des saignements cliniques, notamment pulmonaires (Daher et al. 2014; J. F. P. Wagenaar et al. 2010). Le mécanisme de cette thrombopénie est incertain et plusieurs éléments ont été avancés : défaut de production

médullaire, destruction des plaquettes et excès de consommation des plaquettes lors d'état de coagulation intra-vasculaire disséminé (CIVD). Pour cette dernière hypothèse, les données sont discordantes, puisque les marqueurs de CIVD (baisse du fibrinogène, du temps de prothrombine et des plaquettes, élévation des D-dimères) sont présents dans certaines études, mais pas d'autres (Chierakul et al. 2008; Mônica L. Vieira et al. 2016; Edwards et al. 1986; J. F. P. Wagenaar et al. 2010). Néanmoins différents travaux *in vitro* soulignent la capacité des *Leptospira* à activer la coagulation ou encore de bloquer les mécanismes compensateurs de formation de caillots, notamment par le biais du détournement des protéines de l'hôte que la bactérie peut lier : plasminogène, fibrinogène (Castiblanco-Valencia et al. 2016; Cosate et al. 2016; Monica L. Vieira et al. 2009; Choy et al. 2007).

Le schéma suivant, tiré d'une revue récente sur les facteurs de virulence des *Leptospira* pathogènes (Picardeau 2017), reprend les grandes étapes de la pénétration de la bactérie et l'interaction avec l'endothélium et le compartiment vasculaire détaillés dans les 2 sections précédentes :

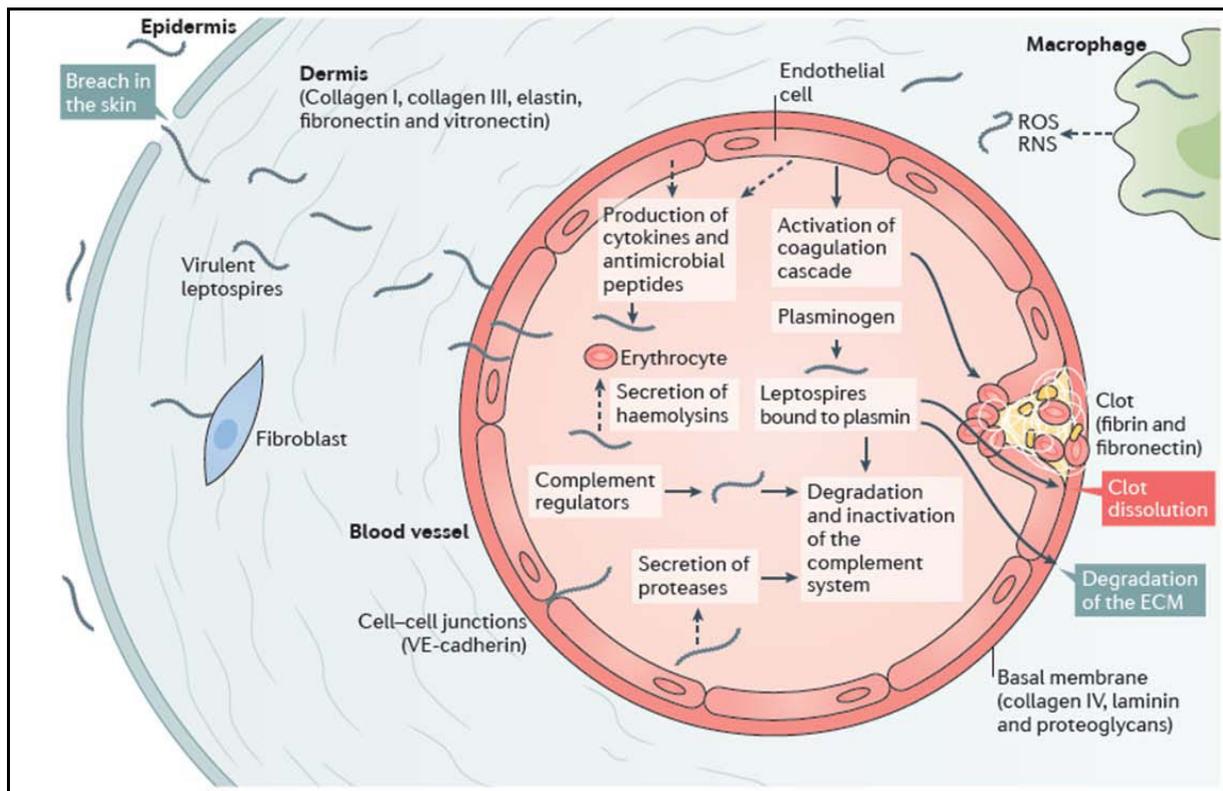


Figure 9 : étapes initiales de pénétration et diffusion hématogène des leptospires pathogènes, issu de Picardeau 2017.

Légendes: Les *Leptospira* pathogènes pénètrent dans l'organisme par la peau lésée, se déplacent au sein du tissu sous-cutané grâce à leur mobilité et capacité à fixer et dégrader les éléments de la MEC. La capacité des leptospires à interagir avec les cellules cutanées (exemple : fibroblaste du derme) et initier une réponse immune innée locale reste à être explorée. Les leptospires atteignent les vaisseaux où plusieurs mécanismes pathogéniques peuvent être mis en jeu : échappement au complément, activation de la coagulation, sécrétion de protéases endommageant les structures cellulaires et moléculaires de l'hôte. Une réponse antibactérienne est mise en œuvre par les cellules endothéliales et cellules immunitaires innées tels les macrophages. ECM: extracellular matrix (MEC : matrice extracellulaire), ROS: reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène), RNS: reactive nitrogen species (espèces réactives du nitrogène).

2.3- Echappement au complément

Le système du complément est l'association de plus de 30 protéines sériques solubles et protéines membranaires interagissant pour constituer une défense anti-infectieuse de première ligne, bien que les fonctions du complément aillent au-delà de la protection anti-infectieuse (Ricklin et Lambris 2013). Au stade de diffusion hématogène les leptospires sont donc en

présence de la majorité des constituants du complément qui devraient tuer la bactérie et en limiter la propagation.

Le complément est un système enzymatique finement régulé, avec différentes voies d'activation possibles, mais aussi des systèmes inhibiteurs multiples pour limiter un potentiel emballement enzymatique pouvant conduire à une cascade inflammatoire délétère (Gasque 2004). On distingue classiquement 3 voies d'activation et de stimuli du complément : la voie classique, via les anticorps ayant reconnu leur antigène cible ; la voie alterne via une auto-activation spontanée à bas bruit; et la voie lectine initiée par la reconnaissance de mannose porté par des microorganismes. Ces 3 voies d'activation peuvent mener à une voie commune finale dite terminale qui correspond à la fixation de protéines du complément organisées en véritable pore au sein de la membrane cellulaire ciblée. Il s'ensuit une lyse de la cellule en question, par un complexe d'attaque membranaire. En contrepartie, le système immunitaire de l'hôte comprend des inhibiteurs (régulateurs) spécifiques à chaque voie d'activation (Harris et al. 2012).

Le système du complément est un élément-clé pour la distinction des leptospire pathogènes et non pathogènes. Les données les plus anciennes concernant l'importance du complément lors de la leptospirose remontent aux années 1960 avec la mise en évidence du rôle des anticorps spécifiques pour tuer la bactérie *in vitro*, en conjonction avec le système du complément (Johnson et Muschel 1966). Ces premiers travaux mettent en évidence que les bactéries pathogènes ont une relative résistance à l'action de lyse médiée par le complément, que celle-ci soit le fait d'anticorps spécifiques (voie classique) ou de l'activation de la voie alterne. Différents microorganismes ont développé des mécanismes d'échappement au complément lors de leur évolution. Les bactéries du genre *Leptospira* ne sont pas en reste et peuvent être considérées même comme une illustration de cette capacité des bactéries de détourner les défenses de l'hôte. Cet échappement au système immunitaire de l'hôte a été de mieux en mieux caractérisé lors des deux dernières décennies où un grand nombre de données ont été collectées sur les mécanismes en jeu dans cette « évasion immune ». Les données sont surtout issues de modèles *in vitro* avec utilisation de mutations ciblées et des protéines recombinantes du complément. Ces mécanismes d'échappement ont été détaillés dans une revue récente de la littérature (Fraga, Isaac, et Barbosa 2016), et sont schématisés dans la **Figure 10:**

-les *Leptospira* d'espèces pathogènes ont la capacité d'induire une liaison sur leur membrane de protéines régulatrices de l'hôte. Ces protéines ainsi adsorbées à la surface bactérienne protègent la bactérie d'une activation de la cascade du complément. Il a ainsi été décrit que les leptospires pouvaient fixer les éléments régulateurs inhibiteurs suivants : la C4BP (C4b binding protein) des voies classique et lectine, le facteur H et le facteur H-like-1 de la voie alterne ainsi que la vitronectine, régulateur de la voie terminale. Les protéines de *Leptospira* impliquées sont LigA et LigB, Lsa23, Lsa30, LcpA, Len A et LenB.

-la bactérie peut aussi sécréter des protéases clivant directement des enzymes/protéines d'importance majeure pour la cascade du complément : le C2, le C4, le C3, le facteur B. Les protéines dégradées sont rendues inactives.

-les leptospires peuvent aussi détourner les protéases de l'hôte pour cliver certaines fractions du complément. C'est ce qui a été décrit pour le plasminogène qui une fois activé va être transformé en plasmine qui à son tour dégrade des fractions actives de la cascade du complément (C3b, C4b, C5).

Les conséquences d'un tel dysfonctionnement du complément ont un impact sur les différentes voies effectrices du complément : lyse bactérienne, l'opsonisation des bactéries pour faciliter leur phagocytose, diminution du chimiotactisme et de l'activation des acteurs cellulaires de l'immunité innée.

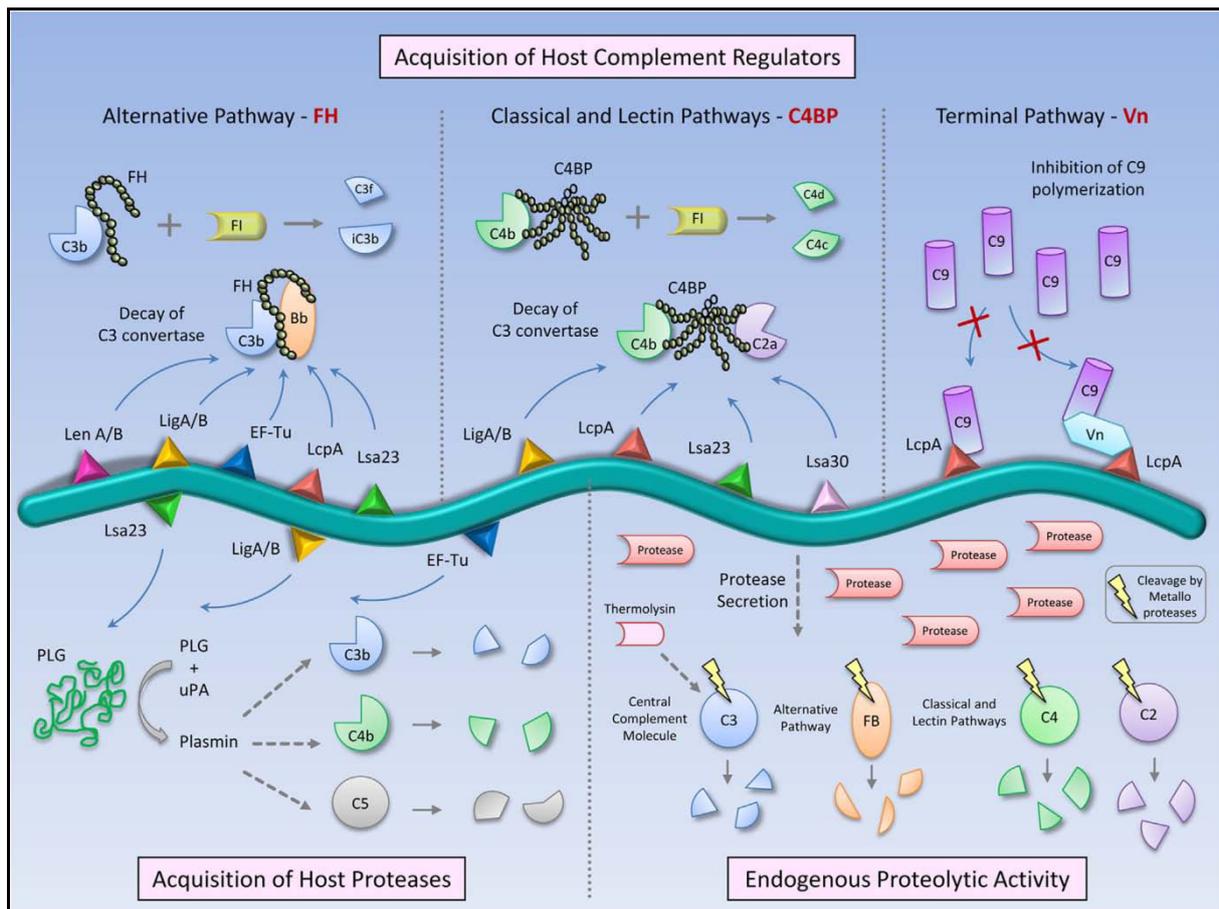


Figure 10: mécanismes d'échappement au système du complément développés par la bactérie *Leptospira*. Issu de (Fraga, Isaac, et Barbosa 2016).

Légendes : *Leptospira* représentée au centre du schéma interagit avec le complément à différents niveaux par des protéines membranaires (triangles colorés) ou des protéines sécrétées. La partie haute du schéma indique les interactions avec les régulateurs naturels du complément : voie alterne à gauche, la voie classique et des lectines au centre et la voie terminale à droite. La partie inférieure rend compte de la dégradation de fraction du complément par le détournement du plasminogène à gauche, et par l'action directe de protéases bactériennes à droite. C4BP : C4 binding protein; FB : facteur B; FH : facteur H; FI : facteur I; PLG : plasminogène; uPA : Urokinase-type plasminogen activator; Vn : vitronectin.

Il est intéressant de noter que dans diverses pathologies infectieuses ou inflammatoires où le complément est impliqué, il a été mis en évidence une susceptibilité génétique avec divers polymorphismes retrouvés (Harris et al. 2012). La conjonction de plusieurs polymorphismes particuliers serait à même de modifier l'expression ou la fonction des constituants du système du complément vers un défaut d'activation ou au contraire une inflammation excessive : on

parle de « complotype ». Ces défauts perturbant l'homéostasie du complément ne sont pas décelables à l'échelle quantitative pour un seul constituant pris à part mais doivent comporter une analyse globale de plusieurs molécules-clés. Des polymorphismes ont ainsi été associés à des risque pour des infections : méningocoque (gène du facteur H), fièvre jaune ou typhoïde (gène du C3) (Harris et al. 2012). Ce type d'analyse n'a jamais été réalisé dans le cadre de la leptospirose, alors même que le système du complément semble avoir un rôle majeur dans la physiopathologie de la maladie.

2.4- Atteintes d'organes

a. Interaction avec l'endothélium

Lors de cette circulation dans le compartiment vasculaire, les leptospires vont être en contact étroit avec l'endothélium. Cette interaction avec l'endothélium est probablement un moment clé de la physiopathologie de la leptospirose car elle a pour conséquences potentielles : la diffusion de la bactérie dans les organes cibles, l'induction de lésions endothéliales avec risque d'hémorragies, l'activation des cellules endothéliales en vue d'initier une réponse inflammatoire et le recrutement des cellules immunitaires dans les tissus infectés et une activation de la voie extrinsèque de la coagulation. Le contact entre leptospires et endothélium se fait possiblement par le biais des protéines membranaires de la bactérie capable de lier les molécules à la surface des cellules endothéliales : fibronectine, glycosaminoglycanes, cadhérines comme cité en paragraphe 2.1-. La liaison de *Leptospira* aux molécules de type intégrines CD11a/CD18 et CD11b/CD18 est aussi suggérée par une étude récente détaillant les fonctions de la protéine Mce (mammalian cell entry) des leptospires (Cosate et al. 2016). De plus comme évoqué pour la progression de la bactérie au sein de la MEC, diverses protéases (plasminogène, métalloprotéase) peuvent favoriser le passage de la bactérie au travers des espaces intercellulaires de l'endothélium (Monica L. Vieira et al. 2013).

Les études à notre disposition pour définir le rôle de l'endothélium chez l'être humain sont très limitées lors de la phase aiguë de la leptospirose : les données sont extrapolées à partir de mesures indirectes telles que des marqueurs d'activation des cellules endothéliales retrouvés dans le sang et des données issues de modèles *in vitro*. Pour ces derniers, on peut citer les études montrant que *Leptospira* induit une perte des adhésions intercellulaires

endothéliales donc une perte de l'architecture normale de la couche cellulaire avec perte de la fonction de barrière possiblement (Martinez-Lopez, Fahey, et Coburn 2010; Evangelista et al. 2014). D'un autre côté, les molécules de surface engagées dans l'adhésion des cellules immunitaires sont plus exprimées à la surface des cellules endothéliales en culture : molécules de type CAM (cell adhesion molecules) ou sélectines (Monica L. Vieira et al. 2007; Atzingen et al. 2009; Gómez et al. 2008; Dobrina et al. 1995; Goeijenbier et al. 2015).

Chez l'être humain, une étude basée sur une série d'autopsies montre une expression plus importante de certaines CAM sur l'endothélium pulmonaire de patients en comparaison à des contrôles non affectés par la leptospire, en particulier les molécules de type ICAM et VCAM (Del Carlo Bernardi et al. 2012). Les autres travaux correspondent essentiellement à l'analyse des formes solubles de molécules de surface de l'endothélium impliquées dans les fonctions d'activation et de recrutement: ICAM-1, E-sélectine (Paris et al. 2008; Libório et al. 2015; Goeijenbier et al. 2015). Il a été retrouvé une corrélation entre les niveaux élevés de ces biomarqueurs et la sévérité de la maladie, telle que l'atteinte rénale ou la mortalité (Libório et al. 2015; Goeijenbier et al. 2015). Ces données indiquent une possible activation des cellules endothéliales, sans qu'il soit possible d'écarter la possibilité de dommages subis par les cellules endothéliales, ou encore d'une action protéolytique exercée directement par la bactérie.

b. Foie

Le foie est un organe filtrant de grandes quantités de sang et a aussi pour particularité une fonction immunitaire propre avec des cellules de la lignée macrophagique, les cellules de Kupffer. Les hépatocytes et les cellules fibroblastes du foie jouent également un rôle important dans la réponse immune innée (Crispe 2009). Les analyses anatomopathologiques de tissus hépatiques en phase aiguë de cas de leptospirose humaine mettent en évidence une désorganisation architecturale, des lésions des cellules résidentes avec parfois nécrose et une congestion vasculaire avec parfois hémorragies focales, une infiltration de cellules immunitaires : neutrophiles, monocytes (Arean 1962; Shintaku, Itoh, et Tsutsumi 2014). Les analyses sur modèles animaux confortent ces données et montrent la présence de nombreuses leptospires paraissant se localiser entre les travées d'hépatocytes (Nally et al. 2004; Alves et al. 1992). La désorganisation retrouvée au sein du foie est associée à une perte d'expression

de la cadhérine de type E, impliquée dans les contacts intercellulaires des hépatocytes (De Brito et al. 2006).

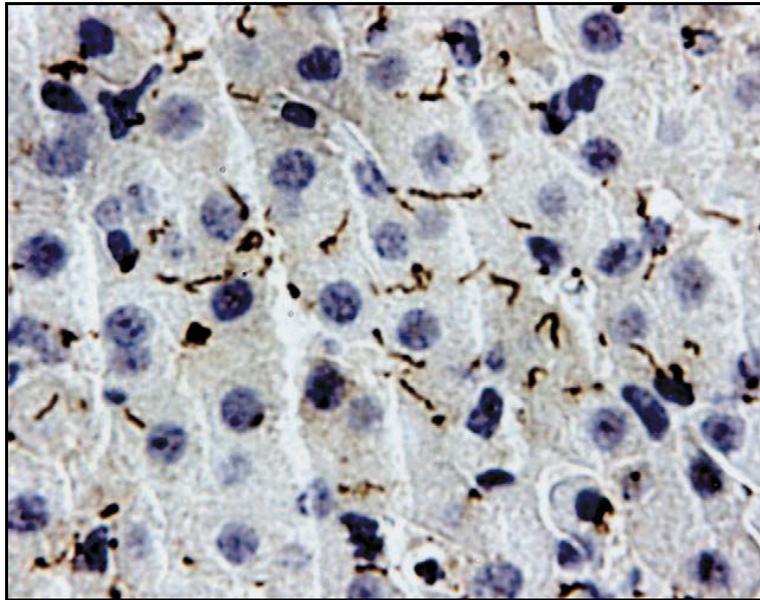


Figure 11: coupe histologique de foie de cochon d'Inde infecté par un isolat clinique de *Leptospira interrogans*, image issue de (Bharti et al. 2003). Les cellules hépatiques au noyau bleuté sont disposées en rangées et délimitent les travées hépatocytaires où sont présentes des bactéries allongées prenant une coloration marron foncée : les leptospires.

Des données complémentaires sur l'atteinte du foie sur modèle animal de hamster montrent que les bactéries pathogènes induisent une perte de cohésion entre hépatocytes, désorganisant la constitution des canalicules biliaires et aboutissant au défaut d'élimination de la bile donc un ictère (Miyahara et al. 2014). On peut avancer l'hypothèse de protéases propres à la bactérie capables de cliver les jonctions intercellulaires et ainsi induire les lésions décrites. De manière marginale, une unique étude indique un excès d'apoptose sur les cellules hépatiques à 48h de l'infection (modèle cochon d'Inde), mais le taux indiqué était relativement discret, de l'ordre de 5%, quoique significativement différent des autres organes-cibles étudiés (F Merien et al. 1998). Sur le modèle murin, il est retrouvé une possible induction d'apoptose au sein du foie, mais également des reins et poumons, de manière étonnamment décalée après 14 jours d'infection et selon un mécanisme dépendant de la caspase-3 (Marinho et al. 2015).

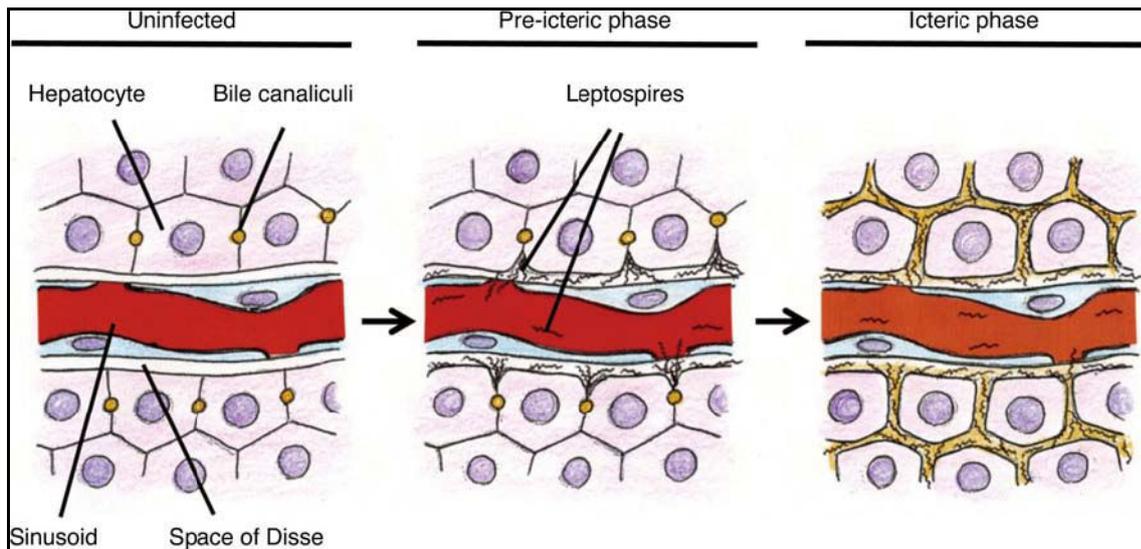


Figure 12 : mécanisme d'invasion des leptospires dans les travées d'hépatocytes.

Les leptospires pénètrent l'espace de Disse puis induisent une désorganisation des jonctions intercellulaires des hépatocytes avec perte de l'architecture des canalicules biliaires. Issu de (Miyahara et al. 2014)

A notre connaissance il a été publié une unique étude réalisée *in vitro* sur des cellules hépatiques humaines, la lignée L-02, où les auteurs associent la pathogénicité des souches bactériennes testées à l'induction d'apoptose et de cytotoxicité qui implique une sphingomyélinase (Y.-X. Zhang et al. 2008).

c. Poumon

Le poumon est un des organes cibles les plus étudiés, probablement car l'atteinte pulmonaire est assez emblématique de l'infection et associée à une mortalité élevée, supérieure à 50% (P. N. Levett 2001). De plus c'est pour cet organe qu'on retrouve le plus de travaux appuyant l'hypothèse d'une réponse immunitaire exagérée favorisant des atteintes tissulaires délétères, justifiant pour certains de recourir aux corticoïdes comme explicité en section 5.1- page 41 et dans une revue de la littérature (Dolhnikoff et al. 2007). Les travaux anciens d'autopsies de cas humains létaux mettent en avant les lésions hémorragiques et à un moindre degré un infiltrat composé de cellules lymphoïdes et plasmiques (Arean 1962). Pour appuyer l'hypothèse d'une réponse immunitaire exagérée responsable des lésions pulmonaires, on peut citer le travail de Del Carlo Bernardi et al. qui montre une expression

plus importante des molécules d'adhésion ICAM et VCAM, et du TLR2 sur l'endothélium pulmonaire en comparaison à des contrôles sans pathologie pulmonaire, ou avec hémorragie alvéolaire d'une autre nature qu'infectieuse. Il a été aussi mis en évidence une augmentation de l'expression de ICAM et du récepteur au C3a au sein des septa alvéolaires (Del Carlo Bernardi et al. 2012). Cette étude comparative suggère que le mécanisme de recrutement de cellules immunitaires pourrait participer aux lésions pulmonaires sans qu'il soit possible de le confirmer. Dans une autre étude, ce sont les dépôts d'immunoglobulines et de l'opsonine C3 du complément au sein des alvéoles qui vient étayer cette hypothèse (Croda et al. 2010). Néanmoins une autre étude appuie à l'inverse l'hypothèse de lésions induites par l'excès de bactéries : une série de quelques cas suggère une plus forte mortalité par hémorragie alvéolaire en cas de charge bactérienne plasmatique et/ou pulmonaire élevée (Segura et al. 2005).

Sur le modèle animal (cochon d'Inde) il est retrouvé une faible quantité de bactéries au sein du poumon (Dolhnikoff et al. 2007) ainsi que des dépôts d'immunoglobulines et de complément dont l'intensité est proportionnelle à l'intensité de l'hémorragie alvéolaire (Nally et al. 2004).

Tout comme pour les hépatocytes nous n'avons pas connaissance de modèle *in vitro* de cellules issues du poumon utilisées pour approfondir les connaissances sur les mécanismes de la réponse immunitaire engagée par les leptospires.

d. Rein

Le rein est classiquement affecté soit de manière aiguë avec un tableau pouvant aller jusqu'à l'insuffisance rénale anurique, soit de manière chronique peu/pas symptomatique avec portage et excréctions de bactéries. Cette distinction, peut-être trop schématique, rend tout de même compte des tableaux variés rencontrés en pathologie humaine et animale où certains hôtes dits accidentels présentent une infection marquée, et d'autres sont peu affectés et considérés comme réservoirs (ex : souris, rats) avec une excrétion prolongée de bactéries attestée par les analyses urinaires de PCR ou culture (Monahan, Callanan, et Nally 2008; Gomes-Solecki, Santecchia, et Werts 2017). Les études dans le domaine portent surtout sur le portage rénal chronique et les raisons des défauts d'élimination du pathogène, les relations avec la réponse de l'hôte en phase chronique et donc cet échappement immunitaire.

Pour l'étude de l'atteinte en phase aiguë, les lésions détaillées historiquement lors d'une série de cas fatals chez l'être humain sont celles d'une nécrose tubulaire, avec des foyers d'hémorragie et d'infiltrats leucocytaires polymorphes, tandis que les glomérules semblent épargnés (Arean 1962). Ces données indiquaient déjà un tropisme particulier des leptospires pour les tubules rénaux qui ne semble pas uniquement la conséquence d'une zone du rein très vascularisée, puisque les glomérules le sont aussi, sans qu'ils soient touchés. La question de ce tropisme si particulier pour les tubules rénaux, et en particulier le tube contourné proximal, n'est pas élucidée.

Les tubules rénaux sont des zones d'échange d'ions et réabsorption d'eau. Chez l'animal, le tropisme pour les tubules proximaux est associé à un défaut de fonction de certains transporteurs d'ions (ex : NKCC2) et induit des pertes urinaires, notamment en potassium et sel (Wu et al. 2004). Outre les possibles dégâts propres à la présence bactérienne (désorganisation architecturale secondaire à l'action des protéases, sécrétion de toxines, lésions hémorragiques), une réaction inflammatoire peut être initiée avec la reconnaissance soit du LPS, soit de protéines membranaires (OMP pour outer membrane protein) ou encore des lipoprotéines telles que LipL32 par des récepteurs de type TLR. Dans un modèle d'étude de cellules rénales in vitro, cette initiation de la réponse immune innée conduirait à la production importante de l'enzyme iNOS, de cytokines et chimiokines (MCP-1/CCL2, IL-8/CXCL8) qui favoriseraient à leur tour le recrutement des leucocytes (C.-W. Yang 2007). Il s'ensuit ce qui est qualifié de néphrite avec un dysfonctionnement rénal global contemporain d'une infiltration de cellules immunes dans l'espace tubulo-interstitiel. Néanmoins ces données sont extrapolées à partir de lignées cellulaires in vitro sans constatation claire issues de tissus humains. Des interventions thérapeutiques visant à réduire cette phase de recrutement ont été envisagées avec le recours à la dialyse précoce pour épurer le sang des médiateurs de l'inflammation (Andrade, Cleto, et Seguro 2007). Chez les hôtes accidentels tel l'être humain, cette atteinte se résout généralement en 2 semaines, mais peut laisser des séquelles à plus long terme avec à 1 an 9% d'insuffisance rénale (Herath et al. 2014). De plus, dans les pays d'endémie, il est retrouvé un surrisque d'insuffisance rénale chronique en cas de forte exposition à *Leptospira* (H.-Y. Yang et al. 2015). Ces lésions chroniques sont néanmoins plutôt observées chez les animaux réservoirs chez qui la bactérie induit peu de lésions aiguës et avec la capacité de persister et se répliquer à long terme au sein des tubules rénaux. Signalons que le rein est l'organe emblématique de la phase chronique de la leptospirose puisque c'est généralement le seul organe pour lequel la persistance a été

fréquemment retrouvée chez les animaux porteurs. L'étude des bactéries marquées et détectées par bioluminescence atteste de cette spécificité, tout du moins pour le modèle étudié : la souris (Ratet et al. 2014).

Pour ce qui est de cette atteinte en phase chronique on retrouve une réponse de l'hôte inappropriée avec un défaut d'élimination du pathogène et possiblement une réaction immunitaire aboutissant à de la fibrose tissulaire et donc une dysfonction rénale progressive. Le mécanisme d'installation de cette fibrose semble atypique car indépendant du TGF- β et de la réponse immunitaire adaptative (Matsui et al. 2016; Fanton d'Andon et al. 2014a). Pour certains la fibrose est la conséquence de la persistance bactérienne, pour d'autres le fait des lésions inflammatoires à la phase aiguë et qui surviennent malgré la persistance bactérienne. Pour cette dernière hypothèse on peut citer une étude comparant deux modèles animaux, souris porteuses chroniques asymptomatiques et hamsters avec néphrite initiale puis persistance. Les lésions de fibrose sont décrites uniquement chez le hamster (Matsui et al. 2016). Les mécanismes de maintenance de la bactérie et d'échappement au système immunitaire sont mal connus. Il existe probablement une évolution des bactéries spécifiques aux hôtes réservoirs leur ayant permis de s'adapter et de devenir presque commensales pour ces animaux. Néanmoins les mécanismes moléculaires d'échappement sont incertains. En ce qui concerne l'échappement aux anticorps, considérés comme le principal moyen de défense en phase chronique, on ne sait pourquoi les bactéries au sein des tubules ne sont pas ciblées puis éliminées. La localisation dans les tubules, donc à l'extérieur de l'organisme et de hors d'accès par des anticorps intègre est une hypothèse avancée. Les modifications des antigènes de surface exprimés sont une explication avancée : moins d'antigènes de surface exprimés ou modifications quantitatives telle que la composition du LPS (Monahan, Callanan, et Nally 2008; Zuerner 2015).

La réponse à l'infection apparait donc variable selon le type d'hôte et l'organe considéré. Certaines différences sont sans doute liées aux écarts qui existent entre les systèmes immunitaires de ces hôtes. Nous nous proposons de détailler les données portant sur les composantes cellulaires et moléculaires du système immunitaire engagé lors de la phase aiguë de la leptospirose.

3- Réponse immunitaire

Le cœur de mon travail de recherche a porté sur la réponse du système immunitaire inné lors de la phase initiale de la leptospirose. Ce système est en connexion étroite avec le système dit immunitaire adaptatif qui, par opposition, a la particularité d'être de mise en œuvre plus lente, plus spécifique et pouvant se maintenir à long terme au travers du phénomène de mémoire immunitaire. Dans les sections suivantes sont détaillées les données qui nous apparaissent comme pertinentes concernant l'immunopathologie de la leptospirose, et ce afin de mieux replacer mes travaux dans leur contexte. Dans un premier temps sont abordés les facteurs de susceptibilité immunitaire, puis successivement les réponses immunes innée et adaptative.

3.1- Facteurs de susceptibilité en lien avec le système immunitaire de l'hôte

Dans diverses infections, il a été démontré que la réponse immunitaire de l'hôte conditionnait la sévérité de la maladie, notamment en cas de déficit immunitaire. Ces prédispositions souvent génétiques, peuvent avoir un caractère monogénique fort (ex : déficit en properdine et infections à *Neisseria*) ou encore un caractère plurigénique, alors beaucoup plus complexe à mettre en évidence surtout lorsqu'il s'agit de polymorphisme génétique à l'échelle nucléotidique (SNPs : single nucleotide polymorphisms).

Le constat d'une incidence accrue de cas de leptospirose chez des hommes jeunes peut faire soulever l'hypothèse de facteurs génétiques prédisposant, ou de facteurs hormonaux liés au genre. Néanmoins cette incidence accrue pourrait n'être que le biais d'une exposition plus importante de cette population à la bactérie, en particulier pour les professions à risque dans le monde agricole où les hommes sont plus employés. Les études d'incidence comparées exposition/maladie plaident plutôt en faveur de l'hypothèse de facteurs environnementaux et non liés à une prédisposition inhérente au sexe masculin (Guerra-Silveira et Abad-Franch 2013).

En dehors de prédisposition génétique associée au genre de l'individu affecté par la leptospirose, certains travaux ont recherché les possibles associations génétiques en lien avec le système immunitaire, et une éventuelle prédisposition à la maladie, ou à sa gravité. Les

principales études réalisées dans le domaine se sont portées sur l'étude du HLA chez des humains :

- une étude réalisée chez des triathlètes après une épidémie suite à une compétition met en évidence que les personnes porteuses du HLA de classe 2 HLA-DQ6, déterminé par technique sérologique, sont plus à risque de développer la maladie à niveau d'exposition considéré égal (Lingappa et al. 2004).
- l'analyse de polymorphismes des gènes du HLA de classe I a pu être associée à un sur-risque de leptospirose, mais pas ceux du HLA de classe II dans une autre étude (Fialho et al. 2009).
- une étude cas/témoins a été réalisée sur un polymorphisme de TLR2 décrit comme associé à un défaut de fonction : TLR2 G/A. Les patients porteurs de ce polymorphisme avaient un risque relatif multiplié par 10 de développer une leptospirose, et un risque encore majoré d'atteinte hépatique. Dans la même étude des résultats proches avec risque moindres de leptospirose étaient décrits pour un polymorphisme de TLR1 (Cédola et al. 2015).

Ces données issues de la génétique de l'hôte humain montrent que des modifications du HLA d'un individu à l'autre peuvent être associées à des modifications du phénotype de la maladie. Etant donné la fonction du HLA dans la présentation de l'antigène, ceci suggère un impact sur l'immunité adaptative principalement.

Les risques majorés d'infection en lien avec certains polymorphismes du TLR2 illustrent la place importante de ce TLR dans la réponse immunitaire innée à l'encontre du pathogène, et donc le rôle des acteurs cellulaires porteurs de ce TLR qui agissent comme première ligne de défense.

3.2- Réponse immunitaire innée

a. Mécanismes de reconnaissance du pathogène

Les microorganismes sont reconnus par les cellules de l'hôte infecté grâce à des récepteurs identifiant des motifs moléculaires génériques portés par les agents pathogènes et dénommés PAMP (pathogen-associated molecular patterns). Les récepteurs dénommés PRR

(pattern recognition receptor) sont membranaires ou intracellulaires et actuellement classés selon 4 catégories : les TLR (Toll-like receptor), CLR (C-type lectin receptor), RLR (RIG-I-like receptor) et NLR (NACHT and leucin rich proteins). Les plus connus en général sont les TLR. Ce sont aussi ceux les plus étudiés lors de la leptospirose. Outre les PAMP, les PRR peuvent répondre à des signaux de danger dénommés DAMPs (danger-associated molecular patterns), qui sont dérivés des débris cellulaires en présence ou en absence d'un processus infectieux (allergie, cancer et inflammation) afin de maintenir l'homéostasie cellulaire.

➤ **Rôle des TLR :**

Les TLR sont des récepteurs transmembranaires, présents à la surface cellulaire ou sur la membrane d'endosomes et peuvent reconnaître des motifs moléculaires aussi variés que l'ADN bactérien, l'ARN double ou simple brin, le LPS, la flagelline et le peptidoglycane (Akira et Takeda 2004). A ce jour 13 TLR ont été décrits chez les mammifères, dix étant présents chez l'être humain. La reconnaissance des PAMP par les TLR induit une signalisation intracellulaire aboutissant à l'expression de gènes aboutissant à la sécrétion de cytokines, chimiokines et à l'activation des cellules immunitaires en vue de débarrasser l'organisme du pathogène. Chaque TLR reconnaît un ou plusieurs motifs moléculaires précis et certains motifs peuvent être reconnus par 2 TLR différents associés en hétérodimères (ex : acide lipotéichoïque avec LTR 2 et 6). Dans le cadre de la leptospirose ce sont les TLR 2 et 4 qui sont prédominants dans la reconnaissance de la bactérie, du moins les plus étudiés et ce sont ces aspects qui sont développés ci-après.

Le TLR4 est le principal récepteur du LPS, du moins le LPS classique des bactéries à Gram négatif. C'est un récepteur exprimé à la membrane de la cellule, et associé à deux corécepteurs CD14 et MD-2, pour former le complexe de liaison au LPS et permettre la transduction du signal de reconnaissance. Les autres ligands du TLR4 sont le mannose, le taxol, des protéines chaperonnes de l'hôte telles que HMGB1 (high-mobility group box 1 protein), HSP60 (heat shock protein), HSP70. La signalisation intracellulaire provoquée par l'engagement du TLR4 avec son ligand induit l'activation de NF- κ B, puis de MAP kinases aboutissant à la synthèse de cytokines telles que l'IL-1, IL-6 et TNF α (tumor necrosis factor alpha).

TLR2 a de nombreux ligands, possiblement car il est fonctionnel en tant qu'hétérodimère avec TLR1 ou TLR6 principalement et peut-être TLR10 (Akira et Takeda 2004). On a ainsi pu décrire une liaison à diverses molécules et de manière non exhaustive : l'acide lipotéchoïque, lipoprotéines, LPS atypique tel que celui de *Leptospira*.

En effet, le LPS de *Leptospira* a une composition singulière différant de celle des bactéries à Gram négatif dites « classiques » avec pour la portion lipidique (lipide A) plusieurs particularités : acides gras de longueurs différentes et parfois insaturés, présence de certains motifs disaccharides modifiés et présence d'un résidu phosphate méthylé à l'extrémité du lipide A (Que-Gewirth et al. 2004; Haake et Zückert 2015).

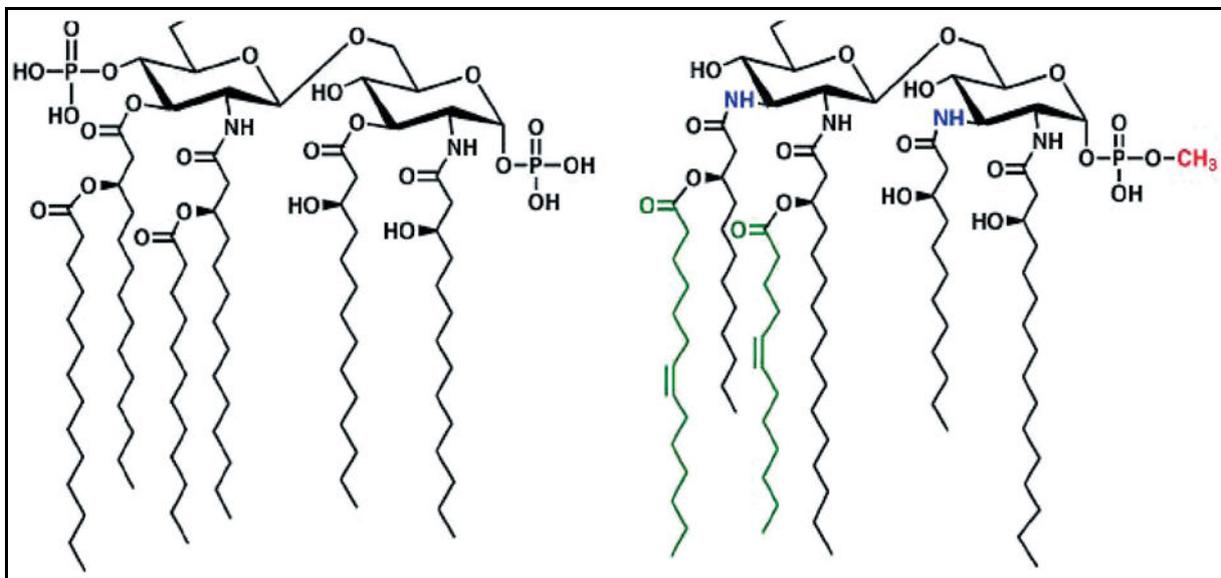


Figure 13 : structures biochimiques du LPS d'*Escherichia coli* et de *Leptospira interrogans* issu de Werts 2010.

Les différences de structures du LPS de *Leptospira* sont indiquées en couleur : acides gras à longues chaînes insaturés de longueurs différentes en vert, groupement méthyle additionnel en rouge. Il est à noter aussi l'absence de phosphate sur une extrémité du disaccharide.

Le LPS est le principal composant de la membrane externe des leptospires, avec les lipoprotéines, donc l'un des principaux constituants que le système immunitaire de l'hôte va reconnaître comme étranger lors de l'infection. Le mécanisme de reconnaissance du LPS par les TLR constitue donc la clé de voûte de la reconnaissance du pathogène et orchestrera une part importante de la réponse immunitaire. Si la reconnaissance s'opère par le TLR4 comme

attendu pour du LPS, il a été montré que pour le LPS de *Leptospira* le TLR prépondérant était TLR2 alors que le TLR2 humain ne reconnaît pas le LPS « classique » en principe. Pour le LPS de *Leptospira*, c'est la portion lipidique (lipide A) qui est reconnue par le TLR4 murin, tandis que le TLR4 humain ne reconnaît pas ce motif moléculaire. Cette partie lipide A n'est pas non plus reconnue par le TLR2, et c'est donc une autre partie de ce LPS de leptospire qui est reconnu par le TLR2 humain. Cet écart entre LPS des bacilles à Gram négatifs et les leptopires est perçu comme l'élément expliquant la rareté du choc septique lors de la leptospirose, à l'inverse des bactériémies à bactéries à Gram négatif où le LPS exerce un effet d'endotoxine aux complications bruyantes même pour une faible quantité de bactéries circulantes. Les données ci-après étayent ce paradigme si particulier à la leptospirose, même au sein de la famille des spirochètes puisque ni *Borrelia*, ni *Treponema* n'expriment de LPS.

Les principales données sur la reconnaissance du LPS de *Leptospira* proviennent des expériences sur lignées cellulaires *in vitro* et des modèles animaux notamment murins. Dès 2001, les travaux de Catherine Werts et collaborateurs mettent en avant le fait que les cellules monocytaires d'origine humaine THP-1-CD14 reconnaissent le LPS des leptopires par TLR2 et non TLR4 (C. Werts et al. 2001). Cette distinction n'est pas retrouvée chez les macrophages de souris pour qui les deux TLR semblent importants (Nahori et al. 2005). Ce défaut de reconnaissance du LPS de *Leptospira* serait dû à la modification du lipide A constituant le LPS (Nahori et al. 2005). Les expériences menées sur des modèles murins avec des KO de TLR2, TLR4 ou des deux TLR rendant les souris susceptibles à l'infection, montrent que ces deux TLR participent à la défense antibactérienne en induisant *in fine* une réponse lymphocytaire B adaptée pour éliminer le pathogène (Chassin et al. 2009). Cette importante différence de fonction du TLR4 entre humain et souris pourrait expliquer que les rongeurs aient une meilleure réponse à l'infection et ce qui limiterait les atteintes viscérales, contrairement aux hôtes accidentels, tels les humains (Catherine Werts 2010). Il est intéressant de rappeler les résultats de cette étude cas/témoins analysant des polymorphismes du gène de TLR2 chez l'être humain qui montre un risque relatif multiplié par 10 de développer une leptospirose, et un risque encore majoré d'atteinte hépatique (Cédola et al. 2015). A notre connaissance aucune étude en dehors de celle-ci n'a évalué TLR2 directement chez l'homme, en termes de taux d'expression et d'activités fonctionnelles lors de l'infection.

Outre la place prépondérante du LPS dans la réaction inflammatoire due à *Leptospira*, il faut citer le rôle des lipoprotéines qui constituent une part importante de la composition de la membrane bactérienne externe. Des travaux ont montré que les lipoprotéines de leptospires induisaient la sécrétion de chimiokines facilitant le recrutement des neutrophiles via un mécanisme TLR2 dépendant, et que la principale lipoprotéine probablement impliquée serait LipL32 (C.-W. Yang et al. 2006; C.-C. Hung et al. 2006; Cheng-Chieh Hung et al. 2006). Des mutations dirigées sur LipL32 au site de fixation avec TLR2 induisent une baisse des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires IL-8, MCP-1 et TNF α (Lo et al. 2013). D'une manière générale les lipoprotéines et lipopeptides stimulent les TLR1 et TLR2, et ceci a été démontré pour *Leptospira* comme pour les autres spirochètes dont la membrane est composée de tels constituants (Kelesidis 2014).

Par ailleurs, dans les modèles murins, TLR4 a un rôle important de contrôle de l'infection qui ne passe pas uniquement par la reconnaissance du LPS mais impliquant d'autres ligands potentiels de TLR4 sans qu'ils aient pu être identifiés à ce jour (Viriyakosol et al. 2006).

➤ Rôles des autres PRR :

Au sein des PRR non-TLR, les NLR sont des récepteurs intracellulaires. Les Nods reconnaissent notamment des constituants du peptidoglycane (bactéries à Gram positif et négatif), en particulier les fragments muopeptidiques de ce peptidoglycane. Le possible passage intracellulaire de *Leptospira* pourrait donc induire une liaison aux récepteurs de type NOD. Les CLR se lient à des sucres et sont par contre exprimés à la membrane cellulaire des cellules immunitaires essentiellement : monocytes, neutrophiles, cellules dendritiques.

Les données spécifiques aux PRR non TLR dans la leptospirose sont très pauvres. Leur rôle a été suspecté d'après les constatations de lésions inflammatoires et expression de cytokines/chimiokines au sein de tissus de souris infectés KO pour les TLR2 et 4, après avoir écarté le rôle potentiel d'autres TLR (Chassin et al. 2009). Dans une autre étude cette inflammation dépendante des TLR2 et 4 a pu aussi être rapportée à l'activation de récepteurs de la famille des NLR : *Leptospira* engage NLRP3, constituant de l'inflammasome, et pouvant ainsi induire une sécrétion d'IL-1 β au sein de reins infectés de souris ou bien *in vitro* (Lacroix-Lamandé et al. 2012). Récemment ce même groupe a proposé que l'induction de la

fibrose rénale sur modèle murin d'infection chronique pourrait être liée à un mécanisme indépendant des TLR et NLR (Fantom d'Andon et al. 2014b).

Concernant les CLR on peut citer une étude mettant en évidence que les cellules dendritiques via le récepteur DC-SIGN (ou CD209) se lient aux sucres portés par *Leptospira* ce qui participe à l'activation de ces cellules et à la production de cytokines (Gaudart et al. 2008).

Des études supplémentaires seront nécessaires pour mieux caractériser les interactions entre leptospires et PRR de type non TLR.

b. Acteurs cellulaires

➤ Polynucléaires neutrophiles

Les neutrophiles sont des acteurs centraux de l'immunité innée antibactérienne (Nathan 2006). Ils sont capables de tuer ou lyser les bactéries par le biais d'enzymes protéolytiques, de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), de la phagocytose, ou encore de les piéger au sein de filaments composés d'ADN et de protéines appelés NET (neutrophil extracellular traps) et qui sont également associées à des peptides antibactériens (Brinkmann et al. 2004). Certains de ces mécanismes de défense peuvent provoquer des dégâts collatéraux au sein des tissus où siège la réaction inflammatoire anti-infectieuse.

Lors de la leptospirose humaine, plusieurs publications font état d'une élévation du taux de neutrophiles circulants, et pour certaines d'une corrélation à la sévérité de la maladie chez l'être humain (Craig et al. 2013; De Silva et al. 2014; Craig et al. 2009). Savoir si cette élévation est la conséquence d'un état septique plus grave ou à l'inverse envisager que c'est cette élévation qui contribue à des lésions tissulaires plus graves n'est pas possible en l'état actuel des connaissances. Parmi les autres données issues des études humaines on retrouve lors de l'infection une élévation des taux sanguins des ROS dont l'origine cellulaire n'a pas été déterminée (Araújo et al. 2014). Le mécanisme de mise en place des NET a lieu aussi pour cette infection. Dans l'étude de Scharrig et al. basée sur des expériences utilisant des neutrophiles humains *ex vivo*, et également sur modèle murin, il a été mis en évidence, une élévation des NET contemporaine de l'infection, un effet bactéricide des NET et un contrôle partiel de la charge bactérienne sanguine (Scharrig et al. 2015).

Dans une étude analysant le transcriptome des cellules sanguines de 16 patients en phase aiguë de leptospirose il est retrouvé une baisse des marqueurs associés à la réponse immune innée et adaptative pour les 3 individus décédés (Lindow et al. 2016). Cette baisse implique plusieurs éléments mais les auteurs montrent que la baisse d'expression de la cathélicidine, peptide antibactérien, apparaît comme majeure dans ce défaut de réponse immunitaire et ils confirment une baisse des taux sériques sur 45 autres patients. Les données humaines sont complétées par l'analyse d'infections expérimentales de hamsters avec ou sans administration de LL-37, le fragment actif de la cathélicidine : le peptide bactérien limite la létalité de l'infection en même temps que la charge bactérienne (Lindow et al. 2016). Les données antérieures sur la cathélicidine montrent qu'il s'agit d'un peptide issu majoritairement des PNN : la forme intégrale inactive hCAP-18 est contenue dans les granules des PNN et elle est clivée en LL-37 après dégranulation (Sørensen et al. 2001). Ces données suggèrent donc un rôle central des neutrophiles lors des premiers jours de l'infection, par contre la cause de ce défaut de formes actives de cathélicidine n'est pas connue.

A partir d'études menées *in vitro* on sait que les leptospires peuvent être tuées par les principaux mécanismes d'action des neutrophiles : phagocytose (B. Wang et al. 1984b; Murgia, Garcia, et Cinco 2002; McGrath et al. 1984), peptides antibactériens (Scocchi, Romeo, et Cinco 1993), et action des ROS (M. Cinco et al. 1993; Murgia, Garcia, et Cinco 2002). Néanmoins, la plupart de ces travaux indiquent un certain degré d'échappement des leptospires pathogènes à ces mécanismes en comparaison aux souches saprophytes. Dans l'étude des NET lors de la leptospirose, les expériences sur souris déplétées en PNN par anticorps bloquant montrent des différences de charges bactériennes sanguines mais pas de différence sur l'intensité de la néphrite (Scharrig et al. 2015). A notre connaissance il n'existe pas d'autre donnée publiée sur le rôle des neutrophiles dans les modèles animaux. Dans un article de revue, il est fait mention de l'absence d'effet du blocage des neutrophiles (par un anticorps déplétant) sur les paramètres de l'infection murine mais ces données n'ont pas fait l'objet de publication (Catherine Werts 2010). La transposition de ces données à la réalité de l'infection au sein du corps humain ne peut être réalisée et des études plus approfondies du rôle des neutrophiles en situation d'infection humaine semblent importantes. De plus, il n'existe pas à notre connaissance de données sur les fonctions de migration des neutrophiles au sein des tissus alors que le chimiotactisme et la diapédèse sont des fonctions indispensables aux neutrophiles pour exercer leur action antibactérienne au sein des tissus infectés. L'approfondissement de ces connaissances semble important à l'heure de thérapies

émergentes pouvant bloquer de manière ciblée certaines fonctions des PNN, telle la NADPH oxydase inhibée par des peptides (El-Benna, Dang, et Périanin 2012).

Nos travaux portant sur l'activation et les possibilités de migration/recrutement des PNN font l'objet du deuxième article présenté dans la thèse.

➤ **Macrophages :**

Les cellules de la lignée monocyte macrophage sont des acteurs majeurs de la réponse immunitaire innée (Gordon, Plüddemann, et Martinez Estrada 2014), et sont ceux les plus étudiés. Ces cellules ont des fonctions antibactériennes directes via la phagocytose principalement, mais aussi une fonction de présentation de l'antigène pour engager la réponse immune adaptative.

La plupart des données proviennent d'études sur modèle animal ou *in vitro* à partir de lignées cellulaires ou de cellules monocytaires issues de la souris notamment. Ces travaux montrent que les leptospires interagissent physiquement avec les macrophages soit par adhérence à la paroi membranaire, soit le plus souvent par internalisation via un processus de phagocytose (Liu et al. 2014) ou d'endocytose (F. Merien, Baranton, et Perolat 1997) :

-En ce qui concerne la phagocytose elle se fait selon un mécanisme classique d'opsonisation bactérienne, par le biais des anticorps principalement. En présence d'anticorps spécifiques de *Leptospira* les macrophages phagocytent et tuent la majorité des bactéries, ce qui n'est pas le cas en l'absence d'anticorps spécifique *in vitro* (B. Wang et al. 1984a). Le délai de mise en place des anticorps est néanmoins de plusieurs jours suite à l'infection et la bactérie peut probablement échapper à ce mécanisme de défense durant la phase de bactériémie. De plus ce mécanisme de phagocytose semble différer entre les macrophages humains et murins comme cité en préambule paragraphe 1- page 47. En effet les macrophages murins phagocytent les bactéries *Leptospira* pour aboutir à leur destruction tandis que les macrophages humains les internalisent indépendamment de la phagocytose et ne parviennent pas à les éliminer (Li et al. 2010). Cette différence pourrait rendre compte d'un mécanisme d'échappement bactérien et constituer un des éléments expliquant une infection mieux contrôlée chez les rongeurs comparativement à l'être humain, hôte accidentel.

De plus, lors du processus de phagocytose, les bactéries sont en principe dégradées par l'intermédiaire des 2 voies du processus oxydatif que sont la voie NADPH et la voie iNOS (inducible nitric oxyde synthase) (Fang 2004). Plusieurs éléments permettent d'avancer que les *Leptospira* pathogènes ont la capacité d'échapper à ces phénomènes : elles ont une activité de neutralisation de l' H_2O_2 50 fois supérieure à celle des *L. biflexa* (Corin et Cox 1980) qui sont ainsi plus susceptibles à la dégradation (Murgia, Garcia, et Cinco 2002). Cette « protection » serait médiée par une catalase plus exprimée dans les espèces pathogènes : la catalase KatE (Eshghi et al. 2012). Lors de l'exposition de macrophages murins à des *Leptospira* pathogènes il a été noté une augmentation d'expression de catalases bactériennes pouvant participer à ce mécanisme de défense (Xue et al. 2010). Par ailleurs, la protéine chaperonne ClpB conférerait aux bactéries pathogènes une résistance aux conditions de stress métaboliques, oxydatif, sans que le mécanisme en soit élucidé (Lourdault et al. 2011).

-En ce qui concerne l'internalisation par endocytose, plusieurs études mettent en avant le rôle d'une protéine membranaire des leptospires, Mce, qui confère une capacité d'adhésion à différentes cellules de l'hôte, incluant les monocytes, via une liaison aux intégrines CD11a/CD18 et CD11b/CD18 portées par les cellules immunitaires (Cosate et al. 2016; L. Zhang et al. 2012). D'autres protéines de la membrane bactérienne ont été décrites comme impliquées dans le processus d'internalisation bactérienne telles que LMB216 and LigB (Toma et al. 2014). Ce mécanisme d'entrée de la bactérie dans les cellules leur permet d'échapper à la destruction qui a habituellement cours au sein des phagolysosomes. De fait certains considèrent qu'il s'agit d'un mécanisme d'échappement immunitaire de la bactérie qui peut diffuser plus aisément à travers l'organisme (Toma et al. 2011).

Au-delà des fonctions de phagocytose et de métabolisme oxydatif, les monocytes et macrophages peuvent exercer leurs fonctions antibactériennes par d'autres mécanismes, tels l'induction d'apoptose et d'autophagie des cellules infectées :

-Les *Leptospira* sont capables d'induire l'apoptose des macrophages *in vitro*, via la voie de signalisation caspase-8 principalement (F. Merien, Baranton, et Perolat 1997; Jin et al. 2009). Une fois encore il existe des différences entre modèles murins et humains puisque les macrophages humains semblent moins bien éliminer les bactéries et présentent un excès d'apoptose (Li et al. 2010; Toma et al. 2011). Lorsqu'elle est retrouvée, l'apoptose semble

secondaire à l'action d'une sphingomyélinase (Y.-X. Zhang et al. 2008) ou encore par un afflux de calcium intracellulaire induit par une phospholipase bactérienne, comme expérimenté sur des lignées monocytaires humaines et murines (Zhao et al. 2013). Si ce mécanisme d'apoptose a été relié à la virulence des bactéries, sa portée n'est pas claire puisque l'apoptose participe à la défense antibactérienne mais peut aussi être considérée comme un processus délétère de paralysie immunitaire pour l'hôte.

-L'autophagie est un processus physiologique correspondant à la dégradation intracellulaire de constituants du cytoplasme par des lysosomes (Mizushima et al. 2008). Ce processus joue un rôle important dans l'homéostasie cellulaire mais aussi pour les défenses antimicrobiennes des pathogènes intracellulaires. Bien que les *Leptospira* ne soient pas des pathogènes strictement intracellulaires, nous avons déjà rapporté plusieurs éléments montrant leur présence au sein du cytoplasme de manière libre dans des cellules épithéliales ou au sein des monocytes et macrophages (Toma et al. 2011; F. Merien, Baranton, et Perolat 1997). Ainsi le processus d'autophagie pourrait être un mécanisme de défense contre *Leptospira* mais à notre connaissance la littérature ne fait état d'aucune évaluation de ce processus lors de la leptospirose.

Parmi les autres fonctions des monocytes/macrophages, il faut citer celles de présentation de l'antigène aux cellules de l'immunité adaptative, la sécrétion de cytokines pro- ou anti-inflammatoires. Les 2 phénotypes schématiquement distingués sont ceux des macrophages M1 et M2, les premiers étant activés par l'interféron- γ et les TLR et généralement considérés comme antibactériens, surtout pour les germes intracellulaires (Sica et Mantovani 2012). Le phénotype des monocytes et macrophages a été peu étudié en phase aiguë de la leptospirose humaine. Dans une étude portant sur les PBMC de sujets sains il est montré que l'exposition à des glycolipoprotéines issues de *Leptospira* pathogènes induisait pour les monocytes une expression membranaire des marqueurs d'activation CD69 et HLA-DR (Diament et al. 2002). Cette activation était associée à une sécrétion de TNF α et d'IL-10. Cet élément rejoint une étude plus ancienne montrant aussi que les monocytes issus de PBMC mis en présence de peptidoglycane de *Leptospira* induisent la production de TNF α (M. Cinco et al. 1996) ainsi qu'une étude montrant une sécrétion d'IL-6 dépendante des monocytes en cas d'exposition aux glycolipoprotéines (Dorigatti et al. 2005). Ces quelques données *in vitro* suggèrent une reconnaissance et une activation possible des monocytes humains en contact avec les

leptospire, et favorisant un phénotype de type plutôt M1. Néanmoins la réponse d'une lignée monocyttaire humaine, THP-1, est nettement plus faible que celle d'une lignée murine, RAW 264.7, en termes de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires : IL-1, IL-6 et TNF α (Jongyota et al. 2008). De plus, une étude comparant les réponses génomiques des monocytes murins et humains avec des micro-puces indique une activation plus nette des cellules murines pour les fonctions de présentation de l'antigène, sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, et d'expression de la protéine C3 du complément (Xue et al. 2013). Cependant l'existence d'une réponse insuffisante des monocytes humains *in vivo* n'a jamais été explorée à notre connaissance, ni même le phénotype monocyttaire avec l'éventuelle polarisation M1/M2.

➤ **Cellules dendritiques :**

Les cellules dendritiques assurent un rôle majeur pour faire le lien entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif (Banchereau et al. 2003)(Bancherau, steinman). Elles ont une fonction de cellule présentatrice d'antigène (CPA), charnière pour orienter la réponse cellulaire T et B en fonction de l'environnement inflammatoire et sont pourvues de multiples PRR leur permettant de reconnaître les pathogènes (Ueno et al. 2010). Dans le cadre de la leptospirose nous n'avons recensé qu'une étude portant spécifiquement sur les cellules dendritiques (Gaudart et al. 2008). Sur la base de travaux *in vitro*, il a été montré que les leptospire possèdent de multiples carbohydrates de paroi capable de fixer les cellules dendritiques par le biais d'un récepteur PRR de type lectine spécifique : DC-SIGN mais l'effet d'une telle liaison n'a pas été étudié en terme de production de cytokines pro-inflammatoires. La transposition de ces résultats *in vivo* n'a pas été établie. Des études sur le rôle des cellules dendritiques au sein des voies d'entrée du pathogène (peau, muqueuse) seraient utiles notamment pour comprendre les mécanismes d'engagement de la réponse immune adaptative.

➤ **Cellules natural killer (NK)**

Les cellules NK sont impliquées dans les défenses contre les pathogènes intracellulaires. Bien que *Leptospira* ne soit pas un pathogène intracellulaire, les données décrites précédemment indiquent un possible passage intracellulaire et de fait l'engagement des NK

peut être requis lors de l'infection. Néanmoins ce rôle supposé n'a presque pas été exploré chez l'être humain, puisque les données sont issues de modèles animaux ou d'études sur PBMC de sujets sains. On peut ainsi citer une étude d'un vaccin sur le bétail qui montre une expansion de la population NK, et ces NK exposés aux souches bactériennes produisent en réponse de l'interféron γ (Zuerner et al. 2011). L'étude de PBMC humains mis en présence de souche pathogène induirait une prolifération des NK et $LT\gamma\delta$ uniquement en cas de forte quantité de bactéries (Klimpel, Matthias, et Vinetz 2003). D'autres études seraient utiles pour mieux préciser la place éventuelle des cellules NK dans l'immunopathologie de la leptospirose.

c. Molécules solubles : cytokines, chimiokines

Une fois un pathogène reconnu par les PRR, la signalisation intracellulaire aboutit à l'expression de gènes induisant un profil inflammatoire de la cellule concernée et généralement la production de cytokines et chimiokines. Ces messagers solubles circulants sont des molécules centrales pour amplifier la réaction inflammatoire et assurer la migration et le recrutement des cellules immunitaires au sein des tissus infectés. Dans le cadre de la leptospirose de nombreuses études ont été réalisées à partir du sérum des patients, source d'échantillon biologique d'accès facile. Néanmoins les résultats donnent une information globale sans pouvoir généralement détailler les acteurs cellulaires importants dans cette réponse moléculaire. Les études animales et *in vitro* permettent de mieux cerner le rôle des cellules immunitaires et des PAMP/PRR, ainsi que les réponses *in situ* dans certains organes.

Les données sur les cytokines et chimiokines sont parfois contradictoires d'une étude à l'autre et il semble difficile de dresser un tableau clair et homogène de la situation réelle. Plusieurs éléments peuvent rendre compte de résultats inconsistants ou discordants : le délai de l'analyse par rapport au début des symptômes, la variabilité de l'état de gravité clinique des malades considérés ainsi que la charge bactérienne et une éventuelle différence de la réponse entre les souches infectieuses.

Pour illustrer cette réponse cytokines/chimiokines nous prenons l'exemple de quelques molécules emblématiques :

-le $TNF\alpha$: est une cytokine majeure de la phase inflammatoire. Elle est membranaire ou soluble, issue surtout des monocytes macrophages et des cellules endothéliales. Dans diverses

études sur du sérum humain il est décrit une élévation de cette cytokine. Une des premières publications fait état de taux élevés pour 10 patients en comparaison à des contrôles sains (Estavoyer et al. 1991) et une autre établie à partir de 4 patients parmi 18 cas de leptospirose retrouve une association avec la mortalité et sévérité (Tajiki et Salomão 1996), sous réserve d'un faible effectif. Une étude sur des effectifs plus conséquents (n=68) ne montre pas d'élévation du TNF α à l'admission des patients (Jiri F P Wagenaar et al. 2009). Il en est de même pour d'autres travaux du même format (Chirathaworn et al. 2016; Rizvi et al. 2011). Pour une étude avec un effectif de 172 cas, le TNF α est élevé pour les cas considérés sévères (hospitalisés) mais n'est pas relié à la mortalité contrairement à l'IL-6 et l'IL-10 (Reis et al. 2013). Des telles discordances sont peut-être dues à des évaluations réalisées à des temps distincts lors de la phase aiguë : dans une étude analysant la cinétique des cytokines le TNF α a été retrouvé élevé surtout dans les 5 premiers jours (Papa et Kotrotsiou 2015). Pour certains auteurs ce taux de TNF α pris isolément n'est pas un marqueur de sévérité mais combiné à l'IL-10 il est montré une corrélation à la sévérité pour des ratio IL-10/TNF α bas (Mikulski et al. 2014).

Lors d'une comparaison entre 28 cas de leptospirose et autant de cas humains de typhus murins (maladie induite par *Orientia tsutsugamushi*, pathogène intracellulaire strict) il est retrouvé une élévation du TNF α pour quelques cas isolés : l'élévation hypothétique du TNF α n'apparaît pas comme une marque constante de l'infection (Chierakul et al. 2004).

Ainsi si des travaux anciens font état d'un « orage cytokinique » avec une forte élévation du TNF α , ces données ne sont pas confirmées dans de multiples études plus récentes et à plus grande échelle. Cette augmentation inconstante ou modérée tient potentiellement des singularités qui existent pour les PAMP de *Leptospira*, notamment la composition particulière du LPS comme décrit au paragraphe 3.2.a en page 66. L'activation des cellules monocytaires humaines se fait par le TLR2 préférentiellement et non le TLR4, alors que pour les bacilles à Gram négatif le LPS induit une forte sécrétion de TNF α via TLR4.

Les analyses de sécrétion de cytokines à partir de PBMC humains mis en présence de souches de *Leptospira* ou d'extraits bactériens montrent une sécrétion de TNF α , dépendante des monocytes principalement, et induite par le peptidoglycane ou le GLP (glycolipoprotéine) (M. Cinco et al. 1996; de Fost et al. 2003). Cette sécrétion serait dépendante des TLR2, TLR4 mais aussi TLR5 (Goris et al. 2011). Sur quelques patients une participation des LT CD4+ dans la sécrétion de TNF α est suggérée mais l'effectif nous semble trop faible pour dresser

des conclusions (Volz et al. 2015). Les modèles d'infection animale permettent d'évaluer la production de cytokines au sein des tissus infectés. Ainsi sur des modèles de souris susceptibles à l'infection il est montré une expression (ARNm) de TNF α au sein des reins et poumons, mais de manière tardive contrairement à la chimiokine CXCL2 (MIP-2) (J. B. da Silva et al. 2012). Cette élévation de TNF α n'est qu'en partie dépendante de mécanismes de signalisation engageant TLR2 et TLR4, et d'autres mécanismes semblent être à l'œuvre (Chassin et al. 2009).

-interleukine-1 beta (IL-1 β) : à notre connaissance une seule étude retrouvait un taux bas ou diminué par rapport à des contrôles sains non infectés (Jiri F P Wagenaar et al. 2009), tandis que plusieurs études montrent une élévation de cette cytokine (Reis et al. 2013; H. Wang et al. 2012). Dans le travail de Wang et al. des analyses sur macrophages humains et murins montre que cette sécrétion est initiée par des mécanismes dépendants des TLR2 et TLR4.

-interleukine 6 (IL-6) : les dosages sériques lors des cas humains de leptospirose montrent une élévation de cette cytokine, et une corrélation à la mortalité (Reis et al. 2013; Tajiki et Salomão 1996; Jiri F. P. Wagenaar et al. 2009; Jiri F P Wagenaar et al. 2009; Chirathaworn et al. 2016). Sur PBMC stimulés *in vitro* avec des glycolipoprotéines de *Leptospira* il est retrouvé une sécrétion accrue de l'IL-6 par les monocytes (Dorigatti et al. 2005).

-interleukine 8 : l'IL-8 (CXCL8) est une chimiokine majeure du recrutement des PNN. Son taux a été retrouvé régulièrement élevé lors des cas humains de leptospirose (Chirathaworn et al. 2016; Jiri F P Wagenaar et al. 2009; Rizvi et al. 2011). Il a même été associé à la mortalité de la maladie (Reis et al. 2013; Jiri F. P. Wagenaar et al. 2009). Néanmoins cette élévation n'a pas été retrouvée dans une autre étude (Kyriakidis, Samara, et Papa 2011), ou bien apparaît dans la deuxième semaine après l'infection (Papa et Kotrotsiou 2015). Sur le modèle murin, MIP2 (CXCL2) un des homologues de l'IL-8, a un taux sérique et des taux au sein des organes cibles élevés (J. B. da Silva et al. 2009).

-MCP-1 : MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1 ou CCL2) est une chimiokine majeure pour le recrutement des monocytes/macrophages. Peu d'études ont évalué son taux en pathologie humaine lors de la leptospirose, contrastant avec les nombreuses études faites sur les macrophages lors de la leptospirose. Une analyse de taux sériques de multiples cytokines réalisée sur 3 patients et contrôles montre une élévation modeste de MCP-1 (1,5 fois les contrôles) (H. Wang et al. 2012). Les principales études concernant MCP-1 ont été réalisées sur des modèles de culture cellulaires *in vitro* et en particulier de cellules rénales. Ces travaux montrent que certaines protéines ou lipoprotéines de la membrane externe des leptospires, en particulier LipL32 et Loa22, sont à même d'induire la synthèse et sécrétion de MCP-1 selon un mécanisme dépendant de TLR2 pour LipL32 (Y. Zhang et al. 2010; Lo et al. 2013; C.-W. Yang et al. 2006; Cheng-Chieh Hung et al. 2006). Sur le modèle murin, son taux sérique et son taux au sein des organes cibles sont élevés, potentiellement corrélé à la sévérité (J. B. da Silva et al. 2009).

-interleukine-10 : l'IL-10 est élevée dans la plupart des études qui ont évalué cette cytokine dans le sérum humain en phase aiguë (Kyriakidis, Samara, et Papa 2011; Jiri F P Wagenaar et al. 2009; Chirathaworn et al. 2016), et une corrélation positive entre le taux et la sévérité/mortalité est avancée (Reis et al. 2013; Tajiki et Salomão 1996).

L'ensemble de ces données indique que plusieurs cytokines sont régulièrement élevées lors de la phase aiguë d'une leptospirose chez l'être humain, en particulier IL-1, IL-8, IL-10. Les résultats sont plus contrastés pour le TNF α , et il n'y a que peu de données pour MCP-1. La corrélation à la gravité est inconstante et sa possible signification sujette à interprétation : élévation secondaire à la gravité (forte charge bactérienne avec PAMP induisant la cascade inflammatoire) ou bien participant à la gravité par le biais d'une réaction inflammatoire exagérée potentiellement délétère ? En tout cas on n'assiste pas à un « orage cytokinique » comme décrit dans les chocs septiques à bacilles à Gram négatif. Des études complémentaires semblent donc utiles pour mieux préciser le rôle des cytokines et chimiokines, et les replacer dans leur contexte de messagers cellulaires : quel est l'impact de ces molécules sur l'infiltration des organes cibles ?

3.3- Réponse immunitaire adaptative

a. Réponse des lymphocytes T

Peu d'études ont documenté le rôle des LT lors de la leptospirose en pathologie humaine. Un travail des années 1990 montrant une baisse des LT (CD4+ et CD8+) circulants comparativement à des donneurs sains, baisse plus conséquente lors d'insuffisance rénale (Yamashiro-Kanashiro et al. 1991). Les LT étant les principaux constituants du compartiment lymphocytaire sanguin, cette observation renvoie à la fréquente lymphopénie observée au début de l'infection (De Silva et al. 2014). L'analyse des micropuces (transcriptome) entreprise par Lindow et al 2016 et déjà discutée pour les composants de l'immunité innée pour indique une baisse des facteurs associés à la maturation des LT pour les cas létaux, sous réserve d'effectifs très faibles. Ci-dessous sont indiquées les données pour les 2 principales catégories connues de LT dont le TCR est de type $\alpha\beta$: LT CD4+ et LT CD8+.

Concernant la sous-population de LT CD8+, une étude rapporte une élévation du taux de granzyme B plasmatique, mais pas de granzyme A, pour 44 patients en comparaison de contrôles (De Fost et al. 2007). Cette étude suggère donc une activation de LT CD8+ cytotoxiques en phase aiguë de la leptospirose. En complément, on peut citer un travail sur 5 patients, associé à des analyses sur modèle murin, qui expose l'existence de LT cytotoxiques dont le récepteur à l'antigène (TCR) est spécifique d'une séquence peptidique issue de LigA, protéine de membrane spécifique de *Leptospira*, dans les suites de l'infection (Guo, Wang, et Sun 2010). La présence de lymphocytes T CD8 spécifiques de *Leptospira* apparaît assez étonnante puisque les LT cytotoxiques sont généralement retrouvés lors d'infection par des pathogènes intracellulaires. Si la leptospire est classiquement extracellulaire, il a été décrit la présence intra-cytoplasmique de la bactérie sur des modèles cellulaires *in vitro* : fibroblastes, macrophages (F. Merien, Baranton, et Perolat 1997).

Pour les LT CD4+, on peut citer une expérience menée sur les PBMC des patients affectés de leptospirose, à distance de l'infection (Tuero, Vinetz, et Klimpel 2010). Malgré une expansion *in vitro* des LT en présence de souches de *Leptospira*, ou de fragments antigéniques, les auteurs ne trouvaient pas de différence entre les patients et les témoins et

concluait à une absence de LT mémoires. Un marqueur indirect d'activation des LT, le récepteur soluble de l'IL-2, était rapporté plus élevé et corrélé à la gravité de l'infection, dans une cohorte de 52 patients thaïlandais (Goeijenbier et al. 2015). Un travail mené *in vitro* sur des PBMC issus de patients affectés de leptospirose à environ 3 semaines et 5 mois après l'infection montre une réponse cytokinique dépendante des LT CD4+ d'après des marquages intracellulaires et en réponse aux stimulations avec des leptospires. Ces LT CD4+ activés expriment de l'interféron- γ et du TNF α (Volz et al. 2015).

A noter que dans ce domaine d'exploration des LT, les données issues des modèles animaux semblent assez différentes des données humaines. Pour certains modèles murins ce sont les populations CD4+ et CD8+ qui joueraient un rôle majeur dans le contrôle des atteintes sévères : rein, poumons (Pereira et al. 1998). Par contre de nombreux travaux de vaccination sur le bétail font état d'une expansion préférentielle de la population de LT $\alpha\beta$ CD4+ et des lymphocytes LT $\gamma\delta$ (Naiman et al. 2001; Blumerman et al. 2007). La population de LT $\delta\gamma$ est une population particulière de LT qui se rapproche plutôt de l'immunité innée. L'expansion de cette population *in vitro* lors de l'exposition de PBMC à des souches de *Leptospira* a déjà été décrite (Klimpel, Matthias, et Vinetz 2003), mais les données *in vivo* sont contradictoires et peu documentées. Leur rôle potentiel dans la leptospirose est discuté pour le 1^{er} article présenté dans cette thèse.

b. Réponse des lymphocytes B et anticorps

Les données issues de la littérature concernant les lymphocytes B (LB) sont surtout déduites des résultats analysant les taux et fonctions des anticorps qu'ils produisent. Les anticorps dirigés contre les antigènes bactériens sont habituellement perçus comme le principal élément permettant d'obtenir une immunité efficace avec la résolution de l'infection. Les arguments pour un tel postulat sont : l'évolution inverse de la charge bactérienne et du taux d'anticorps (cf. Figure 6), la protection supposée induite par l'immunité humorale post-vaccinale (cf. paragraphe 5.2) et le rôle des anticorps pour participer à la lyse bactérienne comme principal mécanisme de défense contre l'infection. Néanmoins les données sur la réponse des LB eux-mêmes et la persistance d'anticorps protecteurs à long terme sont pauvres chez l'être humain.

Les données les plus anciennes concernant les lymphocytes B lors de la leptospirose remontent aux années 1960 avec la mise en évidence de l'importance des anticorps spécifiques pour tuer la bactérie *in vitro*, en conjonction avec le système du complément (Johnson et Muschel 1966). Dans un travail de phénotypage des lymphocytes circulants en phase aiguë sur 44 patients comparés à des sujets sains, les auteurs constatent une augmentation du nombre de LB contrastant avec une baisse des LT. Le taux d'immunoglobulines circulantes restait identique aux contrôles. Les caractéristiques phénotypiques de ces LB n'ont pas été explorées dans cette étude (Yamashiro-Kanashiro et al. 1991). A notre connaissance, les données issues de cohortes humaines analysant la population de LB semblent inexistantes entre cette publication et celle de Lindow et al en 2016. Dans ce travail les auteurs mettent en évidence sur deux cohortes indépendantes (16 et 45 patients) que les patients avec formes létales de leptospirose présentaient une expression plus basse de cathélicidine (Lindow et al. 2016) Lindow *et al.* 2016). Si le travail est centré sur la cathélicidine il a été exploré en parallèle les niveaux d'expression de nombreux gènes impliqués dans la défense antibactérienne et l'immunité au sens large. Il se trouve que sur la cohorte où des analyses de transcriptome ont été réalisées (13 survivants, 3 décès) il existe une claire distinction entre les 2 catégories de patients pour de nombreux gènes directement en lien avec la réponse des LB et des anticorps (maturation, présentation d'antigène, synthèse d'immunoglobulines). Ces résultats font écho directement à des phénotypes de LB circulants et avec la mesure des taux d'Ig circulantes réalisés sur la même cohorte. Les auteurs concluent à l'implication d'une réponse immunitaire adaptative de qualité pour limiter les atteintes sévères, surtout pulmonaires, et les décès (Lindow et al. 2016).

Concernant la réponse des anticorps spécifiques, les IgM anti-leptospire apparaissent dès le 2^e jour des symptômes, et les IgG sont rarement positives au 7^e jour des symptômes (M. V. Silva et al. 1995) comme attendu selon le schéma classique de la réponse humorale. Le maintien des anticorps à distance de l'infection a été étudié dans quelques séries prospectives avec des évaluations périodiques (IgM, IgG avec test MAT) jusqu'à 6 ans après la phase aiguë de la leptospirose. Le nombre de patients variait de 10 à 321 (Lupidi et al. 1991; M. V. Silva et al. 1995; Everard et Bennett 1990; Cumberland et al. 2001). Les taux d'IgM baissent rapidement sur les premiers mois et restent rarement positifs au-delà de 1 an. Les IgG ont un taux maximal vers le 3^e mois pour ensuite persister à des taux assez faibles chez une minorité de patients. Par contraste, les taux d'agglutinines peuvent persister plusieurs années avec des titres assez élevés pour certains sérovars. Cette discordance est possiblement due à une

différence de sensibilité dans les techniques, les seuils définis pour la positivité. Néanmoins ces données suggèrent l'absence de maintien d'anticorps à des taux importants sur le long terme chez une majorité de patients. Le seuil protecteur n'a jamais été défini chez les humains (pour les ELISA ou MAT) du fait des études insuffisantes en vaccinologie humaine et des difficultés à entreprendre des études sur la réexposition.

Lors de l'infection à *Leptospira*, les anticorps reconnaissent principalement le LPS pour les IgM, et des protéines pour les IgG. Les antigènes reconnus par ces derniers sont constitués de manière prédominante par des protéines membranaires telles que LipL32 et LipL41, et des protéines cytoplasmiques (protéines chaperonnes HSP GroEL et DnaK) selon l'analyse de sérums de 105 patients brésiliens ayant présenté une leptospirose (Guerreiro et al. 2001). Ces résultats ont été confortés par une seconde étude indépendante en Inde (Natarajaseenivasan et al. 2004). Ces résultats expliquent les tentatives de développement de tests diagnostiques ELISA avec des antigènes spécifiques (synthétiques ou recombinants) ciblant ces protéines immuno-dominantes. Néanmoins ces tests ne semblent pas apporter d'amélioration notable en comparaison des tests classiques, produits avec des lysats bactériens (multiples antigènes) (Signorini et al. 2013). De plus, les anticorps dirigés contre le LPS sont spécifiques des sérovars et n'apportent pas un répertoire assez large pour reconnaître toutes les espèces de *Leptospira*. Ceci pose problème pour des tests diagnostiques universels et la mise en place d'une réponse vaccinale adaptée pour toutes les spécificités d'espèces en fonction de la zone géographique.

Pour les éléments insuffisamment démontrés en pathologie humaine on peut se reporter aux modèles animaux. L'importance des anticorps spécifiques pour protéger d'une infection a été démontrée dans plusieurs études de vaccination ou transfert passif d'anticorps (Adler et al. 1980; Jost et al. 1986; Challa et al. 2011; Zuerner 2015). D'un point de vue mécanistique, les modèles murins pointent le rôle central des TLR2 et TLR4 dans la mise en place d'une réponse LB/ anticorps de qualité (Chassin et al. 2009) tandis que les modèles vaccinaux sur le bétail plaident plus pour une réponse cellulaire T prépondérante que l'utilité des anticorps (Blumerman et al. 2007; Naiman et al. 2001).

Les rôle des lymphocytes B et d'anticorps adaptés qualitativement et quantitativement apparaissent donc capitaux pour une réponse adaptée prolongée mais la réponse LB est surtout T indépendante et sans réponse mémoire efficace (Catherine Werts 2010). Les perspectives en termes de vaccination sont majeures, l'implication pour la thérapeutique à la

phase aiguë semble plus complexe à mettre en œuvre étant donné le délai de mise en place de la réponse LB mais certains auteurs suggèrent l'utilisation d'immunoglobulines spécifiques anti-leptospires pour les cas sévères (Lindow et al. 2016).

HYPOTHESE et OBJECTIFS

Au terme de cette introduction on peut constater que la leptospirose humaine est une maladie fréquente, potentiellement grave car létale, avec une physiopathologie insuffisamment comprise. Si une partie des manifestations est secondaire à la bactérie elle-même et sa pathogénicité, plusieurs indicateurs permettent d'avancer l'hypothèse que certaines complications de la maladie sont liées à des facteurs en lien avec la réponse de l'hôte.

Il en est ainsi des éléments indiquant une réponse immunitaire insuffisante chez les hôtes accidentels tel que l'être humain. Nous avons détaillé divers facteurs génétiques déterminés ou suspectés comme potentiellement enclins à favoriser l'infection et sa sévérité chez l'être humain. Nous avons aussi listé les mécanismes d'échappement au système immunitaire de l'hôte actuellement connus, en particulier ceux ayant trait au complément et à la phagocytose. Néanmoins différents acteurs cellulaires et moléculaires du système immunitaire ont été peu ou pas étudiés lors de la leptospirose et des études complémentaires semblent indispensables à cet égard.

A l'inverse d'un système immunitaire peu réactif, certaines complications pourraient également être liées à une réponse inadaptée dans l'excès avec des dommages collatéraux produits par la réponse immune. En l'état actuel des connaissances, il nous semble qu'un tel mécanisme lésionnel puisse être avancé pour les atteintes pulmonaires de la maladie, et les complications hématologiques telles que la thrombopénie et les troubles de coagulation. Pour les autres atteintes d'organe (foie et reins) la balance pathogénicité bactérienne/immunologique nous semble moins claire et les deux processus sont probablement à l'œuvre de manière concomitante et non distinguables.

Nous proposons l'hypothèse que la réponse immunitaire envers le pathogène semble inadaptée dans les premiers jours de l'infection, permettant à la bactérie de survivre dans le sang et de se disséminer aux différents organes. Ceci indique un défaut du système immunitaire inné puisque la réponse adaptative est plus tardive. En dehors du complément et des cellules monocytes/macrophages, il nous est apparu que le système immunitaire inné avait été peu étudié dans le contexte initial de la maladie, et en particulier chez l'être humain. Mon

travail de thèse a porté sur ce dernier aspect. J'ai débuté mes travaux de recherche au sein de l'unité d'accueil GRI (groupe de recherche en immunopathologie infectieuse dirigé par le Pr Gasque) puis les ai poursuivis avec l'unité PIMIT (dirigée par Dr Mavingui) qui travaille sur les aspects immunitaires des infections en pathologie humaine, mais aussi les éléments environnementaux et animaliers de cette zoonose.

L'objectif général de mes travaux était de caractériser certains des aspects de la réponse immunitaire innée de l'hôte humain en phase aiguë de la leptospirose. Plus particulièrement je me suis intéressé aux acteurs de l'immunité innée lors de la phase bactériémique de la maladie avec pour objectif de caractériser leur nombre, état d'activation/inertie et leurs liens potentiels avec le tissu vasculaire endothélial, point de passage clé vers les tissus infectés.

Ces travaux ont donné lieu à 3 articles : 2 publiés, 1 en cours de soumission dont le manuscrit est inclus dans la thèse. Le premier article a trait aux LT $\gamma\delta$, le second aux PNN et le dernier à des marqueurs en lien avec les cellules endothéliales. La méthodologie est assez similaire pour les 3 articles. Elle s'appuie sur une analyse quantitative et qualitative du type cellulaire étudié, au travers de marqueurs membranaires (phénotypage par cytométrie de flux), ou de molécules issues de ce type cellulaire pour le cas de figure des cellules endothéliales. Toutes les analyses sont réalisées à partir d'échantillons biologiques de patients en phase aiguë de leptospirose, provenant de deux hôpitaux de l'île de la Réunion : GHER (Groupe Hospitalier Est de la Réunion) de Saint Benoit et CHU de St Denis. Le groupe de comparaison correspond à des témoins sains non infectés. Les données des malades sont colligées pour établir d'éventuelles corrélations entre la réponse immune et la présentation clinique de la maladie. Lorsque cela a été possible des patients ont été revus à 1 mois de l'infection pour bénéficier d'un deuxième prélèvement et établir une comparaison avec la période bactériémique. Toutes ces expériences ont été menées avec le consentement des patients et en accord avec un comité d'éthique local (R15018).

Dans la partie résultats, sont présentés successivement chacun de ces travaux, avec une partie introductive propre à chaque article. Dans la partie discussion sont développés les résultats de chaque article puis de manière plus globale avant de dégager les perspectives de recherches futures.

RÉSULTATS

I. Etude des lymphocytes T $\gamma\delta$

1- Contexte

➤ Contexte général :

A côté des LT « classiques » existe un groupe de LT qui se démarquent des caractéristiques canoniques des cellules de l'immunité adaptative : les LT $\gamma\delta$ appartiennent à ce groupe émergent de LT non conventionnels (Godfrey et al. 2015). Différentes caractéristiques font des LT $\gamma\delta$ des LT particuliers : comme tous les LT ils portent un récepteur à l'antigène, TCR, mais dont les 2 chaînes constitutives sont de type γ et δ contrairement aux lymphocytes circulants prédominant porteur de l'hétérodimère $\alpha\beta$. Si les LT $\gamma\delta$ correspondent habituellement à moins de 5% des LT circulants, cette proportion peut atteindre jusqu'à plus de 50% dans certains tissus, en particulier peau et tractus digestif. Les LT $\gamma\delta$ ont ceci de particulier que les antigènes reconnues ne sont pas en grand nombre et correspondraient le plus souvent à des molécules non peptidiques de type PAMP lipidiques ou motifs phosphoantigènes ou encore molécules du soi qui agiraient comme signaux de danger. De plus la reconnaissance de l'antigène n'est pas obligatoirement restreinte à une présentation par le CMH, comme cela est réalisé pour les LT $\alpha\beta$ classiques (Godfrey et al. 2015). Ces éléments expliquent que les LT $\gamma\delta$ puissent répondre rapidement à un stimulus et leur confèrent des caractéristiques les classant plutôt comme acteurs de l'immunité innée (Tyler et al. 2015).

Les LT $\gamma\delta$ ont été étudiés dans divers contextes anti-infectieux et dans l'immunité anti-tumorale principalement. Ils exercent leurs fonctions au travers de la cytotoxicité et leurs capacités régulatrices (Payne 2016). Concernant les pathologies infectieuses il a été montré que les métabolites phosphorylés tels que HMBPP (4-hydroxy-3-méthyl-but-2-enyl pyrophosphate) issus de certaines bactéries étaient à même d'activer les LT $\gamma\delta$ (Liuzzi et al. 2015). Cette voie métabolique est commune à de nombreux bacilles à Gram négatif mais n'a

pas été décrite pour *Leptospira* à notre connaissance (Morita et al. 2007). Il ne nous est pas possible d'affirmer si *Leptospira* est capable de produire le principal métabolite reconnu par les LT γ δ . Par ailleurs il est intéressant de rappeler que bien que les fonctions des LT γ δ s'exerçaient surtout au niveau tissulaire, il a été montré dans divers infections que le taux de LT γ δ sanguins reflétait bien l'activation et l'implication des LT γ δ dans les défenses immunitaires.

➤ **Contexte des LT γ δ spécifique à la leptospirose :**

Les études sur modèles vaccinaux du bétail par des souches de *Leptospira* pathogènes montre une élévation franche et prolongée des LT γ δ (Blumerman et al. 2007; Brown et al. 2003; Naiman et al. 2001), mais ceci pourrait être spécifique à l'homéostasie des LT γ δ au sein de ces animaux puisque les taux de LT γ δ circulants sont constitutivement plus élevés que chez l'être humain (Godfrey et al. 2015). A l'époque de la réalisation de ce travail nous ne disposions de données que sur 4 cas humains de leptospirose pour lesquels il avait été observé une augmentation des LT γ δ (Klimpel, Matthias, et Vinetz 2003; Barry et al. 2006). Il n'existait pas de travail ayant exploré cette population lymphocytaire de manière systématique et prospective.

2- Hypothèse et objectifs

Les données de la littérature antérieures à ce travail indiquaient une augmentation des taux de LT γ δ circulants jusqu'à 30% des LT sanguins en pathologie humaine (Klimpel, Matthias, et Vinetz 2003; Barry et al. 2006). Le rôle des LT γ δ lors des défenses anti-infectieuses laissait donc entrevoir une possible participation des LT γ δ lors de la leptospirose humaine. Notre hypothèse était donc que les LT γ δ participaient à la défense contre *Leptospira* et que le taux de LT γ δ circulants serait un reflet de cette potentielle activation, une élévation étant alors attendue.

L'objectif du travail était d'évaluer la proportion de LT γ δ parmi les LT chez les humains affectés de leptospirose ; et en cas de modification, l'objectif secondaire était d'établir une éventuelle relation avec les manifestations de la maladie.

3- Article 1

Ma contribution à ce travail a consisté en la réalisation d'une partie des phénotypages (initiés par mon collègue Claude Giry avant ma venue au laboratoire) sur les prélèvements des patients et témoins, ainsi que le recueil des données clinico-biologiques des patients, l'analyse des données et la réalisation des statistiques.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Microbes and Infection* en 2015 sous la référence suivante :

High leptospiremia is associated with low gamma-delta T cell counts.

Raffray L, Giry C, Thirapathi Y, Binois F, Moiton MP, Lagrange-Xelot M, Ferrandiz D, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P.

Microbes and Infection. 2015 Jun;17(6):451-5.

DOI: 10.1016/j.micinf.2015.04.001.

L'article est présenté ci-après sous sa forme finale publiée.

Short communication

High leptospiremia is associated with low gamma–delta T cell counts

Loïc Raffray^{a,b,*}, Claude Giry^{a,c}, Yoga Thirapathi^d, François Binois^d, Marie-Pierre Moiton^e,
Marie Lagrange-Xelot^e, Dominique Ferrandiz^b, Marie-Christine Jaffar-Bandjee^{a,c},
Philippe Gasque^a

^a Immunopathology and Infection Research Grouping (IRG), EA4517, UMR PIMIT, Université de la Réunion, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, 97405 St Denis Cedex, La Réunion, France

^b Internal Medicine and Dermatology Unit, CHU Félix Guyon, St Denis, 97400 La Reunion, France

^c Microbiology/Virology Laboratory, Félix Guyon University Hospital of La Reunion, 97400 St Denis, La Reunion, France

^d Internal Medicine Unit, GHER Hospital, 97470 St Benoit, La Reunion, France

^e Infectious Disease Unit, CHU Félix Guyon, 97400 St Denis, La Reunion, France

Received 13 January 2015; accepted 10 April 2015

Available online 18 April 2015

Abstract

The role of innate immune cells either to mount appropriate defense mechanisms or to drive uncontrolled tissue injuries during acute leptospirosis is poorly understood. This study aimed at characterizing the selective mobilization of innate immune cells and the level of target organ injuries in response to leptospiremia. We focused on gamma–delta (γ – δ) T cells. Patients were prospectively assessed for cell count by cytometry, for bacterial load by PCR in plasma samples and for levels of soluble acute phase tissue enzymes. We found that the level of γ – δ T cells was low and inversely correlated to liver injuries and leptospiremia.

© 2015 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Leptospirosis; Innate immunity; Gamma–delta T cells antigen receptors; Liver; Bacteremia

1. Introduction

Leptospirosis is a zoonotic disease worldwide distributed [1,2]. Several innate immune molecules have major roles in host defense during the acute phase of leptospirosis although bacterial resistance to complement activation is a key feature of immune escape [3–5]. In contrast, less is known about the implication of the cellular actors of innate immunity against these extracellular pathogens. For instance, data regarding the contribution of neutrophils, monocytes and gamma–delta (γ – δ) TCR T cells in leptospirosis are scarce.

Polymorphonuclear neutrophils are able to phagocyte *Leptospira*, and produce bactericidal reactive oxygen species [6,7]. Although activated monocytes and macrophages can release pro-inflammatory cytokines and chemokines involved in the initiation of a protective adaptive immune response in response to *Leptospira*, it has also been shown that these cellular activities can be dramatically downregulated through a unique programmed cell death mechanism [8,9].

To date, few studies have demonstrated a possible contribution of γ – δ T cells during leptospirosis. Vinetz and collaborators were the first to show in two case report studies (involving one to three patients) that these cells could increase from 3–5% to 10–28% of circulating lymphocytes in infected leptospirosis patients [10,11]. However, we don't know whether this expansion is systematically found in all leptospirosis cases and is somehow linked to pathogenesis. *In vitro*, stimulation of human PBMCs with pathogenic *Leptospira* isolate induced preferential expansion of γ – δ T cells

* Corresponding author. IRG, EA4517 Immunopathology and Infection Research Grouping, UMR PIMIT, Université de la Réunion, Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, 97405, St Denis Cedex, La Réunion, France. Tel.: +33 262 (0) 2 62 90 54 50; fax: +33 262 (0) 2 62 90 54 61.

E-mail address: loic.raffray@chu-reunion.fr (L. Raffray).

compared to alpha-beta TCR T cells [11,12]. Animal studies of vaccine protocols with leptospiral antigens are systematically accompanied by an increase in γ - δ T cells subsets [13–15].

The aim of our study was to determine if the raise of γ - δ T cells described in prior case reports of acute leptospirosis could be related to pathogenesis as ascertained by the levels of biomarkers of tissue injuries and when compared to the level of leptospiremia (PCR data).

2. Material and methods

2.1. Cohort study and ethics

Our study was conducted in the Hospital of Reunion Island: 10 healthy subjects (workers at the hospital) and 12 patients undergoing confirmed leptospirosis (PCR) were enrolled. Patients were hospitalized either in the intensive care unit or the internal medicine units. The study was approved by the local Human Ethics Committee (Ref. 2008-A00151-54) and written informed consent was obtained from each individual.

2.2. Biological and bacterial qPCR analyses for diagnosis of leptospirosis

Total genomic DNA was extracted from 200 μ l of EDTA plasma using the easyMAG instrument (BIOMERIEUX), according to the manufacturer's protocol, and yielded 50 μ l of eluate. Leptospire in plasma (bacteremia) were detected by quantitative real-time PCR (qPCR) using the Light cycler LC480 system (Roche). Real-time PCR assays were performed to amplify the 23S rRNA gene and albumin as the internal control with a protocol adapted from Ref. [16]. qRT-PCR was performed in a final volume of 25 μ l containing 5 μ l of extracted DNA, 12.5 μ l of 2X TaqMan[®] Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, Cat Nr.: 4304437) containing AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, Uracil-DNA Glycosylase, dNTPs with dUTP, 10 μ M of 23S rRNA gene primers (Forward primer: AGAATTGGGATGAGGTGTG-GATAG, Reverse primer: CTACCCCGCAACTAAACAA CTG), 5 μ M of 23S rRNA probe (6 Fam -AGCTGGTTC TCTCCGAAATAGGTTTAGGCCT -Tamra), 10 μ M of albumin primers (Forward primer: GCTGTCATCTCTTGTGGG CTGT, Reverse primer: AACTCATGGGAGCTGCTGGTT), 5 μ M of albumin probe (6 Fam - CCTGTCATGCCACA-CAAATCTCTCC -Tamra). qRT-PCRs was carried out in the LightCycler machine (version LC480, Roche[®]) with the following steps: activation of Uracil-DNA Glycosylase at 50 °C for 2 min to prevent carry-over contamination, pre-PCR denaturation at 95 °C for 10 min, 45 PCR cycles consisting of 2 steps, denaturation at 95 °C for 5 s, annealing and primer extension including a discontinuous fluorescence reading, at 60 °C for 1 min. Samples with a threshold cycle (Ct) value >40 were considered negative.

For quantification of bacterial burden by PCR, serial dilutions of genomic DNA extracts from *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni were

performed. These dilutions corresponded to concentrations from 4×10^6 to 4×10^1 bacteria/ml and the number of bacteria per ml in serum samples were inferred from the Ct values of PCR according to a log-transformed standard curve, as detailed in previous reports [17,18].

2.3. Flow cytometry analysis

Peripheral blood was collected from 10 healthy controls and 12 patients with acute leptospirosis confirmed by PCR in plasma. A total 100 μ l whole blood was mixed with monoclonal antibody against human TCR PAN gamma/delta-PC5 (Beckman Coulter, IM2662). After 30 min of incubation at room temperature in the dark, red blood cells were lysed with Beckman ImmunoPrep[™] Reagent System using TQ-Prep[™] Workstation. Cells were analyzed by flow cytometry (Beckman Coulter, Epics XL-MCL, System II acquisition software and CXP analysis software, version 2.2). Results about gamma-delta T cells are given as the percentage of lymphocytes gated according to FS/SS standards.

2.4. Statistics

Data are expressed as medians and interquartile ranges. Statistical significance of difference between groups was determined by non-parametric Mann–Whitney U-test for continuous variables and by Khi-2 square test for categorical variables. The Spearman test was used to analyze correlations among variables. P-values below 0.05 were considered statistically significant. Statistics were performed with Statview software, version 5.0, SAS Institute.

3. Results

The main clinical characteristics of the twelve patients included in the study are reported in Table 1. Reported biological data were collected at admission prior to antibiotic therapy. Thrombocytopenia, elevated creatinemia, liver and muscle enzyme elevations were the most common features of leptospirosis, and they were significantly different from the ten healthy individuals. Only one patient was hospitalized in intensive care unit and underwent extrarenal epuration for acute kidney failure. None had acute respiratory distress syndrome or hemorrhage, and all patients survived and received antibiotics.

The 5 patients with a quantification of bacteria above 3×10^3 /ml according to PCR were considered as 'high bacteremia' group (values of 7.9×10^3 , 4×10^3 , 3×10^3 , 2 and 1.9×10^3 bacteria/ml), while seven patients in 'low bacteremia' group had less than 3×10^3 bacteria/ml (9.3×10^2 , 8.8×10^2 , 3.9×10^2 , 1.7×10^2 , 8.2×10^1 , 7.3×10^1 , and 3.6×10^1 bacteria/ml). Interestingly, the group with highest bacterial burden showed significant increase in liver and muscle enzyme levels in blood (respectively AST and CPK) compared to 'low bacteremia group', as presented in Fig. 1A. Furthermore, bacterial load was correlated to AST level: P value of 0.04 and r value at 0.69 with Spearman test

Table 1
Laboratory findings at admittance of hospitalized patients with confirmed leptospirosis.

Parameters and units (physiological values)	Leptospirosis cases ^{a,b}	Healthy donors ^a	P values ^c
Number of individuals	12	10	
Male	12 (100%)	8 (80%)	NS
Age in years	49 (37–54)	39 (32–52)	NS
Leukocytes 10 ⁹ /l (3.0–10.0)	7.9 (7.1–10.8)	6.4 (6.1–7.7)	0.048
Neutrophils 10 ⁹ /l (1.4–7)	6.3 (5.8–8)	3.5 (3.3–3.9)	0.006
Lymphocytes 10 ⁹ /l (1.2–4)	0.77 (0.55–0.9)	2.2 (1.9–2.2)	<0.0001
Monocytes 10 ⁹ /l (0.1–1)	0.48 (0.33–0.55)	0.64 (0.52–0.8)	0.03
γ - δ T Cells (% of lymphocytes)	0.16 (0.03–1.98)	1.5 (0.92–4.6)	0.07
Platelets 10 ⁹ /l (150–450)	76 (49–136)	233 (215–275)	0.001
CRP mg/l (<10)	242 (208–311)	3 (2–5)	0.0001
Creatinine μ mol/l (65–120)	111 (95–203)	77 (76–80)	0.0003
Total bilirubin μ mol/l (1–17)	16 (10–25)	15 (11–17)	NS
AST IU/l (8–37)	57 (49–178)	21 (18–24)	<0.0001
ALT IU/l (7–41)	65 (37–74)	17 (15–18)	0.0003
CPK IU/l (10–200)	1290 (340–2120)	156 (133–175)	0.002

^a Data are expressed as median (interquartile) and were available for all patients except for one missing CPK value in leptospirosis group.

^b All twelve patients had leptospirosis as confirmed by PCR on blood samples.

^c Statistics between 2 groups are performed with Mann–Whitney U-test for quantitative variables, and with Khi-2 square test for categorical data. P value inferior to 0.05 was considered significant. (AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase; CPK = creatinine phosphokinase; CRP = C-reactive protein; γ - δ = gamma-delta T cells; NS = not significant).

(data not shown). However, although platelets levels appeared to be severely decreased in the group with ‘high bacteremia’ this was not of statistical relevance when compared to the group with low bacteremia ($P = 0.12$).

The analysis of circulating immune cell counts between disease group and controls showed several differences: [Table 1](#). Total leukocyte counts were slightly more elevated in the leptospirosis group, as a consequence of significant neutrophilia. In contrast, monocytes and even more lymphocytes counts were decreased. The median value of γ - δ T cell count for leptospirosis group was less than 0.2% of total lymphocytes, with a maximum of 5.1%. If a trend in γ - δ T cell depletion in leptospirosis group appears possible, this was not statistically significant ($P = 0.07$).

We then tested the relationship between innate immune cell counts and the severity of organs involvements. Analysis with low and high AST levels (>2 fold increase above normal superior range) indicated a lower count of γ - δ T cells among the group with higher abnormal levels of hepatic enzyme: [Fig. 1B](#) ($P = 0.03$). In addition, the percentage of γ - δ T cells was lower in the ‘high bacteremia’ group as compared with low bacterial load ([Fig. 1C](#)) with a correlation coefficient equal to $r = 0.61$ according to Spearman test ($P = 0.02$, data not shown). Levels of neutrophils and monocytes did not significantly correlate with AST levels or plasmatic bacterial load.

4. Discussion

In our study, we found that the level of γ - δ T cells was not increased at the initial period of acute human leptospirosis. In contrast, the percentage of these cells seemed to be more profoundly reduced in the patterns of the disease associated with more severe liver and muscle injuries.

These results contrast with previous reports indicating an increase in γ - δ T cells subsets in a number of limited cases of

leptospirosis. These reports were scarce with less than ten cases over many different laboratory reports suggesting γ - δ T cells expansion during early stages of human leptospirosis [10,11,19]. Klimpel et al. demonstrated *in vitro* expansion of γ - δ T cells when incubating PBMC of healthy individuals with leptospiral antigen preparation [11]. In the same article they reported 3 cases of febrile patients with a mean elevation of γ - δ T cells up to 15% of T cells, but the molecular diagnosis of leptospirosis and the clinical hallmarks were not disclosed. Barry et al. described an isolated case where γ - δ T cells increase paralleled the symptoms of a mild form of *Leptospira* infection [10]. In sharp contrast, in the study of Damasco et al., two patients among 15 with atypical lymphocytosis experienced no significant increase of γ - δ T cells [19].

Some of the discrepancies between the literature and our study could be explained as follows. First, this may be due to different pathogenic properties of the bacterial strains. Indeed, the predominant *Leptospira* species diagnosed in La Reunion are mainly *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni and to a lesser extent *L. interrogans* serogroups Canicola and Pyrogenes [20], while serovars Copenhageni and Louisiana were identified in Vinetz case report studies. Moreover, they clearly indicated that the level of γ - δ T cells can greatly fluctuate during the course of leptospirosis with an increase from normal level up to 28% of PBMC and then a slow decrease. All our patients were sampled at hospital admission, therefore if the hypothetical γ - δ T cell increase is delayed, it could have been unnoticed in the current setting of our study. Finally, all our patients survived and did not present the multiorgan failures possibly leading to death as described in the other cohort studies.

Interestingly, our study revealed an association between higher levels of bacterial burden and reduced levels of γ - δ T cells in blood together with increased liver dysfunction (AST

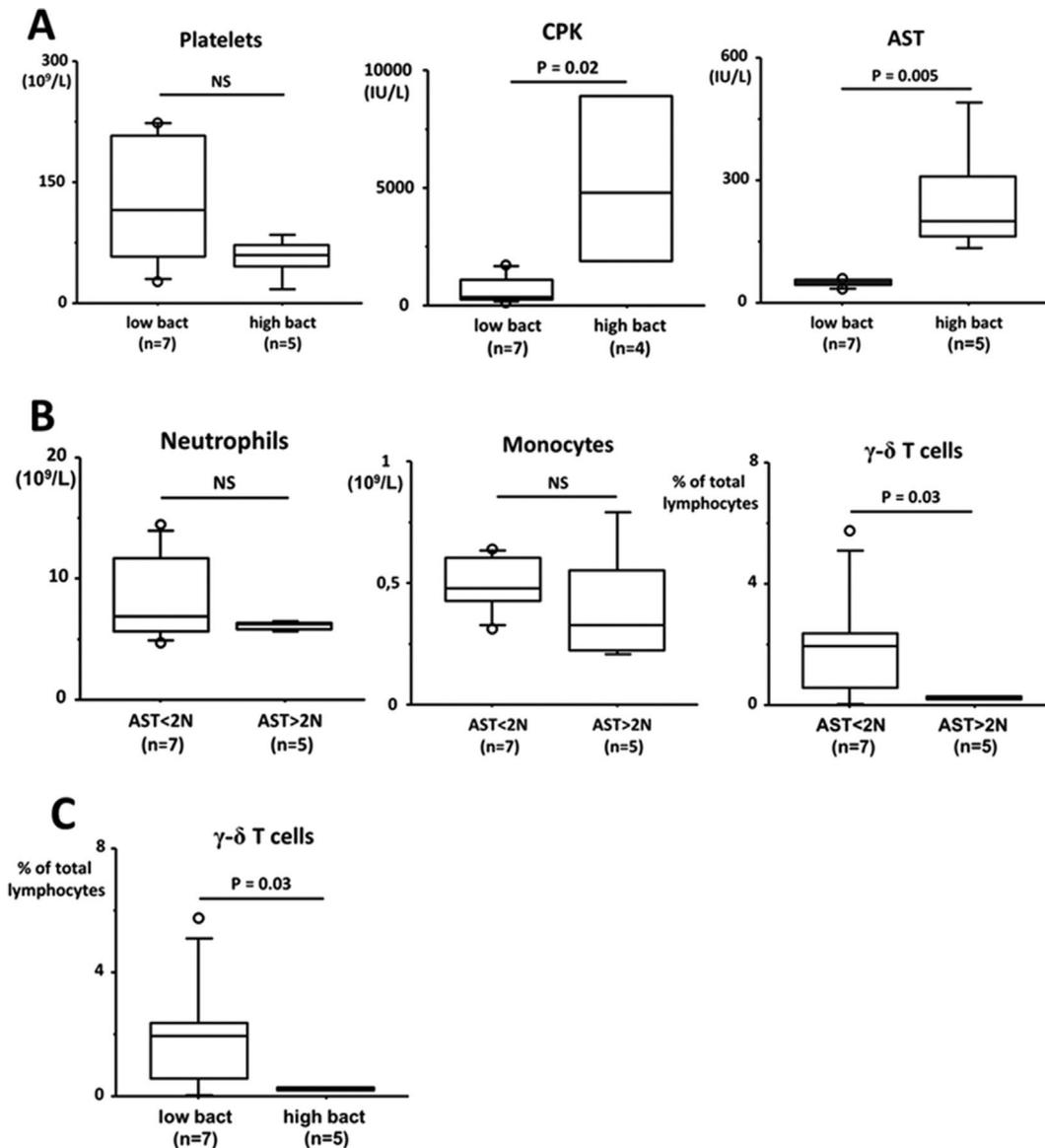


Fig. 1. The γ - δ T cell counts are inversely correlated to hepatic injury and bacteremia in hospitalized leptospirosis. **A- Elevations of hepatic and muscle enzymes in blood are associated with bacterial burden.** Liver and muscle injuries are evaluated by the blood levels of AST and CPK enzyme respectively. Groups correspond either to individuals with a low bacterial load in blood (low bacteremia or 'low bact') or a high bacterial load ('high bact') according to the low or high values of cycle threshold (Ct) of PCR specific for *Leptospira* and which was performed at admission. The cut-off value was a Ct of 29 to define the two groups. Values of hematological and biochemical markers were determined at admission and were available for all patients except for one missing CPK value in high bacteremia group. **B- Innate immune cell counts are differentially affected in leptospirosis associated with mild or severe hepatic injury.** Groups correspond either to individuals who presented AST inferior to 2 fold-increase ('AST<2N') or AST superior to 2 fold-increase ('AST>2N') above upper normal range at admission. The values for monocytes, neutrophils and γ - δ T cells were determined by cytometry. **C- The highest bacteremia associated to the lowest levels of γ - δ T cells.** Statistics between 2 groups are performed with Mann-Whitney U-test. P value inferior to 0.05 was considered significant. (AST = aspartate aminotransferase; CPK = creatinine phosphokinase; γ - δ = gamma-delta T cell receptor; NS = not significant).

levels), a characteristic hallmark of the infection [2,21]. This observation argues for a possible role of γ - δ T cells to control bacteremia. The accumulation of γ - δ T cells in peripheral tissues in response to bacterial infection is presumably beneficial for clearance but has also been shown to contribute to tissue damage [22,23]. In our patients, we propose that the reduced circulating levels of these cells could be linked to a major recruitment at the site of tissue infection and contribute to damage as evidenced by elevated AST and CPK levels, as reported herein. Hence, it will be important in further studies

to perform histological assessment - for example of muscle biopsies - to ascertain for the mobilization of γ - δ T cells in leptospirosis and at sites of tissue injuries.

The raise of γ - δ T cells in blood is neither a prominent feature nor a biomarker in the early phase of acute human leptospirosis. Furthermore γ - δ T cells seem to decrease even more in the most severe forms, in particular with liver and muscle injuries. Further studies are warranted to assess γ - δ T cells level after resolution of leptospirosis infection and including immunological studies of biopsy samples.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors thank members of the team (GRI, EA4517) and the microbiology laboratories. We thank especially Dr Jean Jacques Hoarau, Ghislaine Li-Pat-Yuen and Dr Philippe Rondeau for technical helps. This study was supported financially by « Contrat de Projets État-Région/Fonds Européen de Développement Régional » (CPER/FEDER) grant to PG. LR has obtained a fellowship 'prime d'intéressement à la recherche' from the CHU of La Reunion to carry on this work and as part of his PhD training.

References

- [1] Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:736–47.
- [2] Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira spp.* in humans. *Microbes Infect* 2000;2:1265–76.
- [3] Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. *Microb Pathog* 2005;39:139–47.
- [4] Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol* 2011;73:408–19.
- [5] Fraga TR, Courrol DDS, Castiblanco-Valencia MM, Hirata IY, Vasconcellos SA, Juliano L, et al. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. *J Infect Dis* 2014;209:876–86.
- [6] Wang B, Sullivan J, Sullivan GW, Mandell GL. Interaction of leptospires with human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* 1984;44:459–64.
- [7] Murgia R, Garcia R, Cinco M. Leptospires are killed in vitro by both oxygen-dependent and -independent reactions. *Infect Immun* 2002;70:7172–5.
- [8] Nahori M-A, Fournié-Amazouz E, Que-Gewirth NS, Balloy V, Chignard M, Raetz CRH, et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. *J Immunol* 2005;175:6022–31.
- [9] Merien F, Baranton G, Perolat P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect Immun* 1997;65:729–38.
- [10] Barry M, Wisniewski AV, Matthias MA, Inouye SK, Vinetz JM. Suburban leptospirosis: atypical lymphocytosis and gamma-delta T cell response. *Clin Infect Dis* 2006;43:1304–7.
- [11] Klimpel GR, Matthias MA, Vinetz JM. *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells: preferential expansion of TCR gamma delta+ T cells vs TCR alpha beta+ T cells. *J Immunol* 2003;171:1447–55.
- [12] Tuero I, Vinetz JM, Klimpel GR. Lack of demonstrable memory T cell responses in humans who have spontaneously recovered from leptospirosis in the Peruvian Amazon. *J Infect Dis* 2010;201:420–7.
- [13] Brown RA, Blumerman S, Gay C, Bolin C, Duby R, Baldwin CL. Comparison of three different leptospiral vaccines for induction of a type 1 immune response to *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. *Vaccine* 2003;21:4448–58.
- [14] Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. *Infect Immun* 2001;69:7550–8.
- [15] Blumerman SL, Herzig CTA, Baldwin CL. WC1+ gammadelta T cell memory population is induced by killed bacterial vaccine. *Eur J Immunol* 2007;37:1204–16.
- [16] Woo TH, Smythe LD, Symonds ML, Norris MA, Dohnt MF, Patel BK. Rapid distinction between *Leptospira interrogans* and *Leptospira biflexa* by PCR amplification of 23S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol Lett* 1997;150:9–18.
- [17] Merien F, Portnoi D, Bourhy P, Charavay F, Berlioz-Arthaud A, Baranton G. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett* 2005;249:139–47.
- [18] Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 2005;54:45–9.
- [19] Damasco PV, Avila CAL, Barbosa AT, Ribeiro Carvalho M de M, Pereira GMB, ERS de Lemos, et al. Atypical lymphocytosis in leptospirosis: a cohort of hospitalized cases between 1996 and 2009 in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011;44:611–5.
- [20] Pagès F, Polycarpe D, Dehecq J-S, Picardeau M, Caillère N, Jaffar-Bandjee M-C, et al. Human leptospirosis on Reunion Island: past and current burden. *Int J Environ Res Public Health* 2014;11:968–82.
- [21] Abgueguen P, Delbos V, Blanvillain J, Chennebault JM, Cottin J, Fanello S, et al. Clinical aspects and prognostic factors of leptospirosis in adults. Retrospective study in France. *J Infect* 2008;57:171–8.
- [22] Cheng P, Liu T, Zhou W-Y, Zhuang Y, Peng L, Zhang J-Y, et al. Role of gamma-delta T cells in host response against *Staphylococcus aureus*-induced pneumonia. *BMC Immunol* 2012;13:38.
- [23] Chien Y, Meyer C, Bonneville M. $\gamma\delta$ T cells: first line of defense and beyond. *Annu Rev Immunol* 2014;32:121–55.

4- Résultats principaux

Pour la première fois, notre étude explore de manière systématique le taux de LT $\gamma\delta$ sanguins en phase aiguë de leptospirose humaine pour tous les patients diagnostiqués consécutivement. Contrairement à ce que nous attendions au vu des rares publications antérieures, **nous n'avons pas retrouvé d'élévation du taux sanguin de LT $\gamma\delta$. Au contraire ce taux apparaissait bas, d'autant plus bas que la charge bactérienne était élevée dans le sang. Cette baisse semblait associée à une cytolyse hépatique et une rhabdomyolyse plus franches.**

II. Etude des polynucléaires neutrophiles (PNN)

1- Contexte

➤ Contexte général

Les PNN sont des cellules d'importance dans la défense antibactérienne (Nathan 2006). Leurs fonctions s'exercent surtout dans les tissus infectés tandis que le sang est un lieu de passage temporaire de quelques heures (J. Wang et Arase 2014). La migration du compartiment vasculaire vers les tissus infectés est donc une étape-clé du processus de défense antibactérienne pour les PNN. Ce processus fait appel à plusieurs étapes successives finement régulées faisant interagir les PNN, les cellules endothéliales et des facteurs solubles chimiotactiques (Ley et al. 2007; Phillipson et Kubes 2011). Ce processus de recrutement comporte :

-une migration vers le tissu infecté grâce au chimiotactisme : les chimiokines en concentrations plus élevées au site inflammatoire attirent les PNN selon un gradient de concentrations. Une chimiokine majeure de cette étape est l'IL-8. Dès cette étape les PNN circulants à l'état de quiescence dans le sang peuvent s'activer sous divers stimuli et exprimer des récepteurs membranaires propres à favoriser les étapes suivantes.

-les PNN engagent un contact avec les cellules endothéliales, interface avec le tissu où siège la réaction inflammatoire. Ce contact se fait au travers de molécules d'adhésion et dans un premier temps de molécules de faible adhésion pour constituer l'étape de roulement (rolling des anglo-saxons). A ce niveau, interagissent des molécules endothéliales de type sélectines (CD62, P-, E- et L- sélectines) avec leur contrepartie, le CD15 (antigène Lewis X) exprimé par les PNN.

-une phase d'adhésion plus ferme entre PNN et endothélium, médiée par des récepteurs de plus forte affinité : les intégrines. Les intégrines sont des hétérodimères composés d'une sous-unité alpha et une sous-unité beta. La chaîne β est constante : $\beta 2$ intégrine (ou CD18), tandis que plusieurs chaînes α sont possibles pour les 3 intégrines connues : CD11a pour former LFA-1 (leukocyte function-associated antigen 1) avec la chaîne β , CD11b pour former CR3 (complement receptor type 3, aussi appelé Mac-1) et CD11c pour former p150/95

(CR4). Ces intégrines sont principalement exprimées lorsque les PNN sont activés ou suite à leur dégranulation (Ley et al. 2007). Elles participent aussi à leurs fonctions de phagocytose. Ces molécules interagissent avec les CAM exprimées par les cellules endothéliales, notamment ICAM-1, ICAM-3 et VCAM mais également avec les opsonines de la molécule C3 du complément.

-un passage des PNN au travers de l'endothélium, par les espaces intercellulaires, appelé diapédèse. Ici interagissent les intégrines, PECAM-1 (CD31) et des molécules dénommées JAMs (junctional adhesion molecules).

-une migration au sein du tissu infecté grâce au chimiotactisme local et la capacité de mobilité des PNN qui peuvent dégrader les structures de la MEC.

L'évaluation du statut d'activation des PNN au sein du compartiment vasculaire constitue donc un indicateur des capacités des PNN à être recrutés au sein des tissus infectés, comme démontré pour le sepsis (Chishti et al. 2004). A l'inverse un défaut d'activation et d'expression des molécules impliquées dans le recrutement pourrait traduire une moindre capacité des PNN à se rendre au siège de l'inflammation.

:

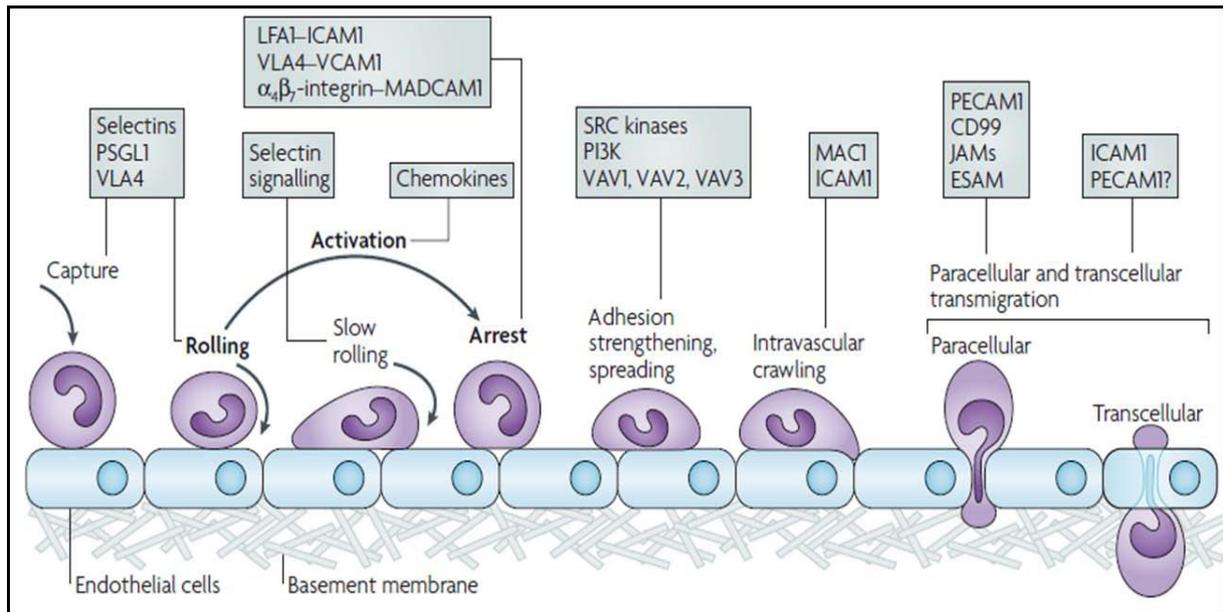


Figure 14 : étape du processus de recrutement tissulaire et diapédèse des leucocytes selon Ley et al. 2007.

Les différentes phases du passage des leucocytes du compartiment sanguin au tissu inflammatoire sont de gauche à droite : la capture, le roulement, l'adhésion ferme et la diapédèse. ESAM: endothelial cell-selective adhesion molecule; ICAM: intercellular cell adhesion molecule; JAMs: junctional adhesion molecules; LFA: leukocyte function-associated antigen 1; MAC1: macrophage antigen 1; MADCAM1: mucosal vascular addressin CAM; PECAM: platelet and endothelial CAM; PSGL1: P-selectin glycoprotein ligand 1; VCAM: vascular CAM; VLA4: very late antigen 4.

➤ Contexte des neutrophiles lors de la leptospirose

Les données de la littérature concernant le rôle général des PNN lors de la leptospirose ont été détaillées dans les sections 3.2.b (acteurs cellulaires immunité innée page 71) et la partie 3.2.c (chimiokines et cytokines page 77) de la partie relation hôte-pathogène. Pour rappel synthétique : les PNN semblent pouvoir être engagés dans la défense contre *Leptospira* via leurs fonctions de dégranulation avec enzymes protéolytiques et formes réactives de l'oxygène, via la phagocytose, ou encore la formation des NET. Néanmoins *Leptospira* semble avoir développé des mécanismes d'échappement aux défenses produites par les neutrophiles et il a été montré en pathologie humaine que le peptide antibactérien cathélicidine, habituellement produite par les PNN, pouvait être exprimé en quantité insuffisante et ainsi conduire à une infection plus sévère voire létale chez l'homme comme chez la souris (Lindow et al. 2016). Les taux d'IL-8 sont décrits comme élevés dans les cas

humains de leptospirose (Chirathaworn et al. 2016; Jiri F P Wagenaar et al. 2009; Rizvi et al. 2011), surtout pour les formes sévères mortelles (Reis et al. 2013; Jiri F. P. Wagenaar et al. 2009). Pour une autre étude, cette élévation est absente (Kyriakidis, Samara, et Papa 2011) et pour une autre d'apparition décalée à la deuxième semaine de l'infection (Papa et Kotrotsiou 2015).

Le travail présenté ici porte plus particulièrement sur les PNN circulants et leurs marqueurs d'activation ainsi que ceux impliqués dans le recrutement tissulaire. Dans ce cadre spécifique, les données antérieures étaient limitées à des travaux *in vitro* portant sur les cellules endothéliales qui semblent s'activer au contact de souches de *Leptospira* et avec un phénotype permettant l'adhésion des PNN (Dobrina et al. 1995; Goeijenbier et al. 2015; Atzingen et al. 2009). Dans un travail portant sur la pentraxine PTX3, il a été montré que les patients avec une leptospirose présentaient une élévation de ce marqueur biologique (Jiri F. P. Wagenaar et al. 2009). De plus, il a été montré en dehors de la leptospirose que la pentraxine PTX3 libérée par les PNN pouvait réguler négativement l'adhésion à l'endothélium de par une fonction antagoniste sur la P-sélectine (Deban et al. 2010). Néanmoins aucune donnée de la littérature n'était disponible concernant les PNN eux-mêmes dans ce processus d'activation et recrutement tissulaire. Des explorations de cet aspect des fonctions des PNN nous apparaissaient donc utiles.

2- Hypothèse et objectifs

Notre hypothèse principale était que les PNN ont un rôle à jouer dans la phase bactériémique de la leptospirose, par le biais d'une activation permettant leur recrutement aux sites de l'infection dans les organes cibles (reins, foie, poumons pour les principaux) afin de participer à l'élimination du pathogène extracellulaire.

L'objectif était donc de caractériser l'état d'activation des PNN au travers de molécules membranaires impliquées dans le chimiotactisme et le processus de recrutement tissulaire (adhérence, diapédèse). Les molécules étudiées étaient : CD15 (ligand des sélectines), CD11b (chaîne alpha de l'intégrine CR3), le récepteur de l'IL-8 (CD182 ou CXCR2). Nous nous sommes également intéressés à déterminer le niveau d'expression de TLR2 par les PNN.

3- Article 2

Tout comme pour le premier article ma contribution à ce travail était transversale : expériences des phénotypes (cytométrie), recueil de données clinico-biologiques des patients infectés avec obtention du consentement de participation à la recherche, analyses des données incluant les études statistiques.

Cet article a fait l'objet d'une publication dans la revue PLOS ONE en 2016 sous la référence suivante :

Major Neutrophilia Observed in Acute Phase of Human Leptospirosis Is Not Associated with Increased Expression of Granulocyte Cell Activation Markers.

Raffray L, Giry C, Vandroux D, Kuli B, Randrianjohany A, Pequin AM, Renou F, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P.

PLoS One. 2016 Nov 1;11(11):e0165716.

DOI: 10.1371/journal.pone.0165716.

L'article est inséré dans les pages qui suivent.

RESEARCH ARTICLE

Major Neutrophilia Observed in Acute Phase of Human Leptospirosis Is Not Associated with Increased Expression of Granulocyte Cell Activation Markers

Loic Raffray^{1,2,3*}, Claude Giry^{1,4}, David Vandroux⁵, Barbara Kuli⁶, Andry Randrianjohany⁷, Anne-Marie Pequin⁸, Frédéric Renou³, Marie-Christine Jaffar-Bandjee^{1,4}, Philippe Gasque^{1,2}

1 Université de La Réunion, CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249, CHU de La Réunion, Unité Mixte Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Plateforme Technologique CYROI, Sainte-Clotilde, La Réunion, France, **2** Laboratoire d'immunologie clinique et expérimentale ZOI (LICE OI), CHU La Réunion site Félix Guyon, St Denis, La Réunion, France, **3** Internal Medicine Unit, CHU La Réunion site Félix Guyon, St Denis, La Réunion, France, **4** Microbiology/Virology Laboratory, CHU La Réunion site Félix Guyon, St Denis, La Réunion, France, **5** Intensive Care Unit, CHU La Réunion site Félix Guyon, St Denis, La Réunion, France, **6** Infectious Diseases Unit, CHU La Réunion site Félix Guyon, St Denis, La Réunion, France, **7** Internal Medicine Unit, GHER Hospital, St Benoit, La Réunion, France, **8** Hematology laboratory, CHU La Réunion site Félix Guyon, St Denis, La Réunion, France

* loic.raffray@chu-reunion.fr



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Raffray L, Giry C, Vandroux D, Kuli B, Randrianjohany A, Pequin A-M, et al. (2016) Major Neutrophilia Observed in Acute Phase of Human Leptospirosis Is Not Associated with Increased Expression of Granulocyte Cell Activation Markers. PLoS ONE 11(11): e0165716. doi:10.1371/journal.pone.0165716

Editor: Yung-Fu Chang, Cornell University, UNITED STATES

Received: August 22, 2016

Accepted: October 17, 2016

Published: November 1, 2016

Copyright: © 2016 Raffray 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 FCS files (cytometry data) are available from the FlowRepository database (accession URL: <https://flowrepository.org/id/RvFrikTWmvLIMexq8aLzze9zXb9fJ1kWAAtVbFtUMQbMpX1isPFWZxcjVOYmneg83>).

Funding: This study was supported financially by "Contrat de Projets État-Région/Fonds Européen de Développement Régional" (CPER/FEDER), grant number 32648 coordinated by PG.

Abstract

It has long been known that pathogenic *Leptospira* can mobilize the immune system but the specific contribution of neutrophils to control the infectious challenge remains to be clarified. We herein analyzed the phenotype of circulating neutrophils of patients with leptospirosis and healthy controls for the expression of toll-like receptor (TLR) type 2 (TLR2, to sense the leptospiral LPS) and several activation markers: interleukin 8 chemokine receptor CD182 (CXCR2), CD11b of the integrin/opsonin complement receptor type 3 (CR3) and CD15 (ligand of the selectin). The plasmatic level of the main CD182 ligand, interleukin 8 (CXCL8), was measured by ELISA. Hospitalized leptospirosis cases showed marked neutrophilia, particularly in the most severe cases. Interestingly, TLR2 was significantly increased in leptospirosis but identical levels of CD182 and CD11b were detected when compared to controls. CD15 was significantly decreased on neutrophils in leptospirosis but returned to normal within 1 month. Basal levels of IL-8 were measured in control subjects and were not increased in leptospirosis cases at the initial stage of the disease. In conclusion, we observed that neutrophils failed to regulate the expression of several of the receptors involved in cell activation and recruitment. This study further emphasizes the paradigm that neutrophils may be impaired in their overall capacity to thwart bacterial infection in leptospirosis patients.

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

Introduction

Leptospirosis is a worldwide infectious disease caused by *Leptospira* species, with a recent estimate of 1 million cases per year [1]. This spirochaetal zoonosis is potentially life-threatening with mortality rates ranging from 5% to 15% [1,2]. The course of the disease includes a broad spectrum of manifestations, encompassing asymptomatic or influenza-like illness to multi-organ failure with icteric hepatitis, acute renal failure and intra-alveolar hemorrhage notably [2]. Although detrimental complement evasion is increasingly documented [3], there are relatively few data regarding the role of innate immune phagocytic cells such as polymorphonuclear neutrophils (PMN).

During the first two weeks of leptospirosis, PMN count is usually characterized by a moderate increase and is correlated to disease severity [4–6]. This is also a non-specific feature of acute sepsis and bacteremia in general. PMN may act against *Leptospira* using soluble factors like antimicrobial peptides or oxidative stress [7–9]. The production of reactive oxygen species (ROS) seems to be more elevated in leptospirosis patients compared to controls, and is correlated to levels of markers of tissue injury, although the source of ROS and the contribution of PMN was not evaluated [10]. Recent findings suggest that the production of neutrophil's extracellular traps (NETosis) could be a reliable mechanism of defense to prevent bacterial dissemination [11]. Beside these weapons, pathogenic leptospires are able to evade the immune response of PMN. A study has shown that the pathogenic strains are adherent to the granulocyte cell surfaces but are barely phagocytized by PMN [12]. In addition, *Leptospira* is able to exploit pyruvate to rescue H₂O₂ killing *in vitro*, and avoiding H₂O₂ killing [13]. A clearer understanding of the role of PMN during leptospirosis warrants further studies.

After the initial phase of bacteremia, *Leptospira* invades several organs, including liver, kidneys and lungs. Recruitment of PMN in inflamed tissues is a complex and coordinated sequence of events mediated by multiple soluble and cellular factors such as chemokines, selectins and integrins [14,15]. A tight regulation of PMN migration is mandatory to permit pathogen elimination in the inflamed tissues. While few studies have indicated that endothelial cells can be activated in leptospirosis [16–18], little is known about the capacity of PMN to be activated and mobilized from the circulation to adhere to vessels and to infiltrate target organs.

Canonically, during sepsis and septic shock mediated by Gram-negative bacteria, one major chemokine implicated in PMN chemotaxis is interleukin 8 (CXCL8), and its receptor, CD182 (CXCR2), is critical for the recruitment of PMNs [19,20]. During infection, CXCL8 is up-regulated at the site of inflammation, allowing the immune system to direct PMN in inflamed tissues via CD182 [21]. However, in severe sepsis, in humans and animal models of septic shock, it has been shown that the expression of CD182 was decreased, possibly altering the recruitment of PMN [22,23]. This down-regulation of CD182 may be explained by its internalization in the presence of high levels of circulating CXCL8, but it can also be a consequence of TLR2 stimulation as demonstrated in several reports [24,25]. Strikingly, TLR2 is the obligate receptor of LPS from *Leptospira* [26]. To date, the levels of the cellular molecules (markers) implicated in PMN response to LPS (TLR2) and cell activation (CD11b, CD15 and CD182) to mediate a robust innate immune response have not been studied in the setting of acute leptospirosis in humans. This was the main objective of this study.

Material and Methods

Cohort study and ethics

Our study was conducted in a medical center of the University Hospital of Reunion Island: 13 healthy subjects and 15 patients with confirmed leptospirosis (by PCR or serology) were

enrolled. Patients were hospitalized in the intensive care unit or conventional medical units. They were treated according to the standards of care. Clinical and laboratory data were recorded until the point of discharge or death.

Definitions of the disease hallmarks:

- Severe leptospirosis was defined as a disease associated with severe organ injury and corresponded to patients fulfilling at least one of the following criteria: either jaundice (bilirubin $> 50 \mu\text{mol/L}$), aspartate aminotransferase increase (> 3 fold the upper normal limit), acute renal failure with creatinine clearance inferior to 30 ml/min (MDRD) or requirement of hemodialysis, mechanical ventilation or oxygen requirement, hypotension requiring fluid resuscitation.
- Leptospirosis stages: patients were enrolled during the first days after onset of symptoms and were defined as acute phase or M0 (month 0). Biological and immunological evaluations were also performed 1 month later after discharge of the patient and defined as convalescent phase or M1 (month 1).

Healthy controls (workers at the hospital) were matched with patients for age and sex. This study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki and was approved by the local human ethic committee of “CHU de La Réunion” (number R15018). All patients provided written informed consent for the collection of samples and subsequent analyses were performed anonymously.

Real-time quantitative PCR analyses for diagnosis and quantification of leptospirosis

Biological specimens for diagnosis of leptospirosis were sampled at admittance of patients. Leptospire in plasma or urine were detected by quantitative real-time PCR (qPCR) using the Light cycler LC480 system (Roche), and TaqMan® Universal PCR Mastermix with primers and probe specific for 23S rRNA gene of *Leptospira* as detailed before [27]. For quantification of bacterial burden in plasma by PCR, serial dilutions of genomic DNA extracts from *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni were performed. These dilutions corresponded to concentrations from 4×10^6 to 4 bacteria/ml and the number of bacteria per ml in plasma samples were inferred from the cycle threshold (Ct) values of PCR according to the log-transformed standard curve, as detailed in previous reports [28].

Serological testing for leptospirosis

For patients with a strong suspicion for acute leptospirosis but negative by PCR in blood or urine samples, we have performed serological testing. If the detection of anti-leptospiral IgM antibodies by ELISA (SERION) was positive ($>50 \text{ U/mL}$), the testing was completed with a micro-agglutination test (MAT) performed by the national reference centre of Pasteur Institute in Paris. Patients were considered positive above a MAT titer of 1/400. The MAT was also used to identify the serovars in several patients after the convalescent phase.

Flow cytometry analyses

Peripheral blood was collected in EDTA vacutainer tubes from 13 healthy controls and 15 patients with acute leptospirosis confirmed by PCR or serology. Within 6 hours after sampling on tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 100 μL of whole blood was mixed with 5 μL monoclonal antibodies against different cell surface markers. The following antibodies were used: isotypic controls coupled with FITC (fluorescein isothiocyanate,

Biolegend 400108) and PE (phycoerythrin, Biolegend 400212), anti-CD16-ECD (Beckman Coulter A33098), anti-CD182-FITC (Biolegend 320704), anti-CD11b-FITC (Beckman Coulter IM 0503), anti-CD15-PE (Biolegend 323006) and anti-TLR2-PE (Biolegend 309708). Tubes were vortexed after adding each antibody. After 30 minutes of incubation at room temperature in the dark, red blood cells were lysed with Beckman ImmunoPrep™ Reagent System (Beckman Coulter ref 7546999) using TQ-Prep™ Workstation. Cells surface markers data were acquired by flow cytometry (Beckman Coulter, Navios™ Cytometer and Navios™ acquisition software, version 1.2) and analyzed with Kaluza® Analysis Software version 1.3 (Beckman Coulter™). PMN were gated according to FSC and SSC characteristics, and then CD16+ cells were considered for further analysis. The mean fluorescence intensity (MFI) values are evaluated after adjusting cytometer to obtain MFI of isotypic controls to 10^{-1} .

ELISA

Interleukin 8 (CXCL8) chemokine levels were measured in plasma from healthy subjects and leptospirosis patients. Plasma were conserved at -80°C and tested by ELISA using the kit from eBioscience™ (Human ELISA Ready-Set-Go ref. 88-8086-88).

Statistics

Data are expressed as medians and interquartile ranges for quantitative variables; and as numbers and percentages for qualitative variables. Owing to non-Gaussian distribution, statistical significance of difference between groups was determined by non-parametric Mann-Whitney U-test for continuous variables and by Khi-2 square test for qualitative variables. For paired data the Wilcoxon non-parametrical test was used. The Spearman test was used to analyze correlations among variables. *P*-values below 0.05 were considered statistically significant. Statistics were performed with GraphPad Prism™.

Results

Population study

Patients were included in the study prospectively between February and June 2015, during the rainy season in Réunion Island. Among the 15 hospitalized patients, 14 were male and the median age was 46.8 years (IQR = interquartile range: 28.2–61.4), see [Table 1](#). The source of contamination was recreational activities for 9 patients: bathing in rivers ($n = 5$), gardening ($n = 3$) or hunting ($n = 1$). The 6 patients exposed to professional risks were farmers ($n = 4$) or green space workers ($n = 2$). Seven patients had at least one additional risk with residential exposure to rats in the neighborhood, or living in a rural area. All patients had influenza-like illnesses or isolated fever as a first sign of illness. The median time frame to hospitalization was 5 days (ranges 1–7). Patients presented with markers of classical organ damages: jaundice ($n = 6$), acute renal failure ($n = 8$), and rhabdomyolysis with creatinine kinase >1000 UI/L ($n = 9$). Patients presented also thrombocytopenia ($<100.10^9/\text{L}$) ($n = 10$). The values of biological data recorded at admittance were significantly different from the healthy subject controls ([Table 1](#)), and systematically associated to the more severe cases of leptospirosis ($n = 10$) compared to milder forms ($n = 5$). Among the 10 severe forms, 9 patients were hospitalized in intensive care unit as they required dialysis ($n = 6$), mechanical ventilation ($n = 3$) and/or vasopressor drugs support ($n = 3$). Despite receiving antibiotics, 1 patient died because of septic shock complicated by multiorgan failure within 48 hours after admittance. All other patients received antibiotic course, mainly amoxicillin, and had a favorable outcome after median stay in hospital of 6 days (ranges 2–25).

Table 1. Characteristics of leptospirosis patients group at admittance and comparison to controls.

Characteristic (units)	Controls	Leptospirosis cases	Mild leptospirosis	Severe leptospirosis	P value	
					controls vs. leptospirosis	mild vs. severe
Number of individuals	13	15	5	10		
Ratio M/F	12/1	14/1	5/0	9/1	NS	NS
Age (years)	34.1 (25.8–48.6)	46.8 (28.2–61.4)	46 (24.6–46.8)	52.5 (28.6–61.9)	NS	NS
Neutrophils (10 ⁹ /L)	3.4 (2.6–3.8)	8.9 (7.4–9.8)	9 (8.9–9.2)	8.7 (7.3–11.6)	<0.0001	NS
Lymphocytes (10 ⁹ /L)	2.0(1.9–2.7)	0.62 (0.53–0.92)	0.69 (0.56–0.84)	0.59 (0.42–0.91)	<0.0001	NS
Monocytes (10 ⁹ /L)	0.48(0.35–0.64)	0.61 (0.39–0.74)	0.65 (0.61–0.76)	0.52 (0.38–0.71)	NS	NS
Platelets (10 ⁹ /L)	236 (226–260)	50 (34–103)	101 (95–194)	37.5 (30–49)	0.0001	0.02
Creatinine (μmol/L)	84 (81–91)	151 (99–341)	103 (96–112)	282 (115–399)	0.001	NS
Total bilirubin (μmol/L)	11 (9–12)	41 (25–89)	16 (14–23)	53 (41–126)	0.0002	0.005
AST (IU/L)	26 (18–31)	70 (39–146)	39 (36–56)	97 (66–198)	0.0003	0.049
CPK (IU/L)	128 (106–216)	1273 (845–2378)	714 (324–1080)	1960 (1264–4911)	0.0013	NS
CRP (mg/L)	0.5 (0.4–2)	194 (187–215) (n = 9)	194 (151–215)	203 (192–256) (n = 4)	0.0001	NS
Plasma bacterial load* (bact./mL)	NA	262 (67–1560) (n = 12)	52 (24–163) (n = 4)	1002 (92–2689) (n = 8)	NA	0.04

Data are expressed as medians (interquartile ranges). Statistics between 2 groups are performed with nonparametric unpaired tests (Mann-Whitney U-test) for quantitative variables, and with Chi-2 square test for categorical data. P value inferior to 0.05 was considered significant.

*Plasma bacterial load is inferred from plasma PCR values according to the log-transformed standard curve.

(AST = aspartate aminotransferase; CPK = creatinine phosphokinase; CRP = C-reactive protein; NS = not significant)

doi:10.1371/journal.pone.0165716.t001

The diagnostic was established by plasma real-time PCR for 12 patients, urine PCR analysis for 2 patients, and serological testing for 1 patient (IgM+) for whom PCR were negative. One patient was positive by PCR in blood and urine samples. Of note, the bacterial burden established from PCR data was more elevated in the severe group: P = 0.04 (Fig 1). For 9 convalescent individuals, a complementary analysis was performed 1 month after hospital discharge (M1 patients) in order to identify the *Leptospira* species implicated. The MAT screening at M1 indicated infection consecutive to *L. Icterohaemorrhagiae* in 5 cases, while it was impossible to conclude in 4 cases, as a consequence of test positivity (titer > 1:400) associated to multiple serovars: *L. Icterohaemorrhagiae*, *L. canicola*, and one for *L. ballum*.

Unique neutrophilia during the course of leptospirosis in patients

The quantification of circulating immune cells at admittance (M0) showed marked lymphopenia, no significant change in monocytes count, while there was a significant increase in PMN cells to 8.9 x10⁹/L on average (7.4–9.8) in patients with leptospirosis, Fig 2A. Notably, there was no difference between severe and mild forms regarding PMN counts determined at admittance (Table 1). We further analyzed PMN count and possible links with clinical hallmarks. There were no correlations between PMN counts in leptospirosis patients with either age, duration of hospital stay, or number of damaged organs. Along the same lines, PMN count was not linked to the levels of the markers associated with organ injury such as AST, bilirubin, platelets, creatinine or creatinine phosphokinase levels. Moreover, PMN count was not statistically correlated to plasma bacterial load at admittance for 12 of leptospirosis patients.

plasmatic bacterial load

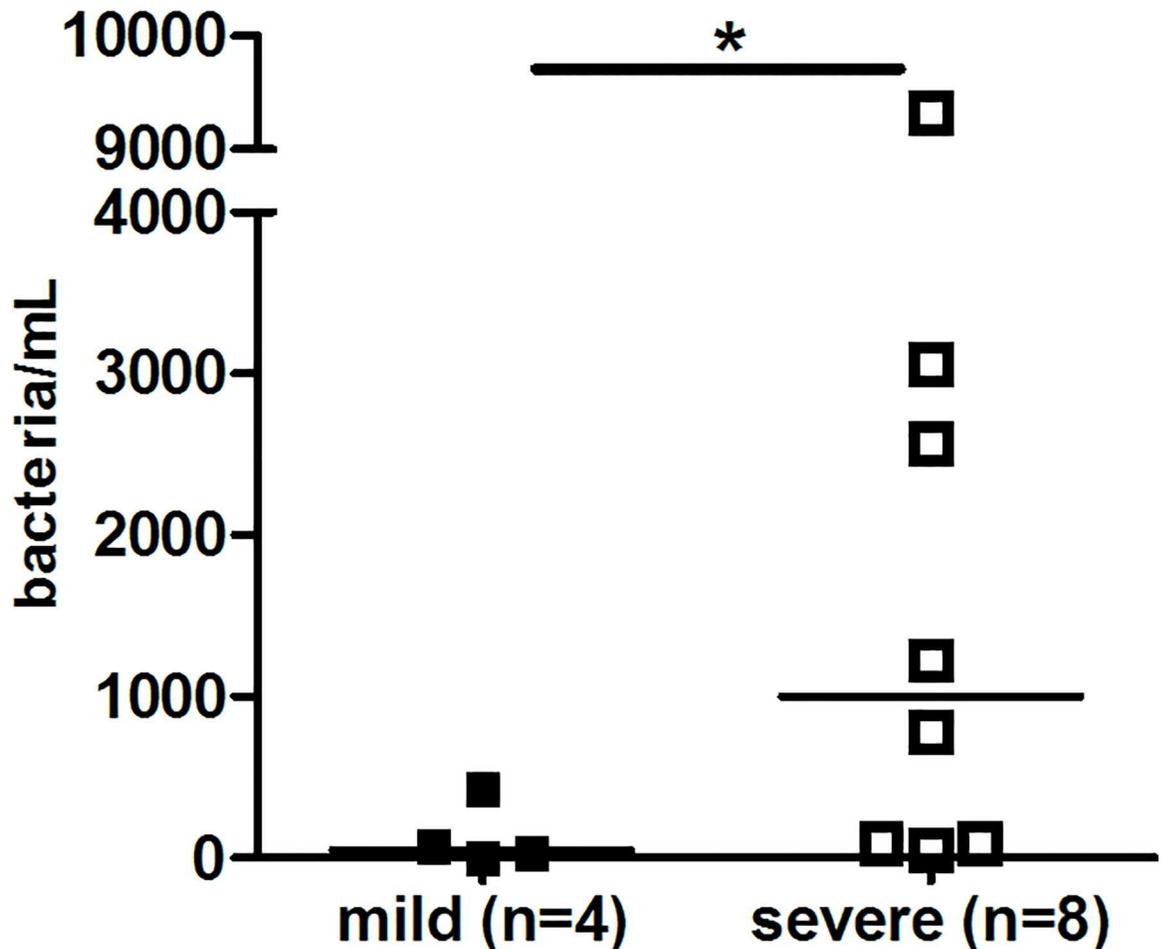


Fig 1. Bacterial burden is higher in severe leptospirosis. Plasma bacterial load is established from the plasma PCR values (n = 12) and using the log-transformed standard curve as described [27]. Horizontal bars indicate the median. Comparison with non-parametric Mann-Whitney test. * indicates P-value inferior to 0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0165716.g001

In contrast, bacterial load was found to be positively correlated to the length of hospital stay (P = 0.03, r value at 0.8 with Spearman test) or the level of bilirubin (P = 0.03 and r = 0.64) and negatively correlated to the platelet counts (P = 0.02, r = 0.36).

Given that the duration of the disease prior to hospitalization was different from one patient to another, we also performed analyses with the maximal values of PMN counts during the disease course. The maximal values of PMN were at a median of $9.7 \times 10^9/L$ (9–15.4), and these values were observed in median at the second day after admittance (IQR 1–4). This corresponded to the 7th day (6–9) from the onset of symptoms (fever and myalgia).

The severe forms had a greater increase in PMN counts (P = 0.04) when considering the maximal value of PMN during hospitalization (Fig 2B). Moreover, the maximal value of PMN count presented a significant correlation with the maximal value of creatinine: r = 0.72, P = 0.002 (Fig 2C).

Expression of TLR2 and markers of cell activation on PMN in leptospirosis

Next, we investigated the expression of selected PMN cell surface molecules implicated in LPS sensing, and cell activation (chemotaxis, adhesion and phagocytosis) for patients in the acute phase of the disease (M0) (Fig 3A).

Focusing on TLR2 expression levels on PMN, we observed a significant increase in the leptospirosis group (P = 0.001). The MFI values were 0.92 (0.75–1.21) versus 0.57 (0.48–0.63) in healthy controls.

In contrast, we found no differences between controls and leptospirosis cases at M0 regarding CD182 and CD11b surface levels on PMN identified by the CD16 counterstaining. Concerning CD15, the expression in leptospirosis group was decreased compared to controls.

The changes in the expression levels of CD182, CD11b, CD15 and TLR2 were not correlated to any of the clinical and biological markers of disease and tissue injuries. The levels of expression of these receptors and PMN counts were further obtained from convalescent patients evaluated at 1 month after discharge (M1). The median value of PMN decreased at M1: 4.7×10^9 cells/L (4.1–6.1) compared to 8.9×10^9 cells/L (7.5–10.3) at M0 (P = 0.04). The levels for CD182 and CD11b between M0 and M1 remained identical. The level of CD15 expression on PMN at 1 month was significantly higher compared to the acute phase of leptospirosis: P = 0.02 with non-parametrical Wilcoxon test for paired data, Fig 3B. Of note, the MFI values at M1 post infection were not significantly different from the healthy controls and indicating a return to basal levels of expression for all PMN markers analyzed in our study.

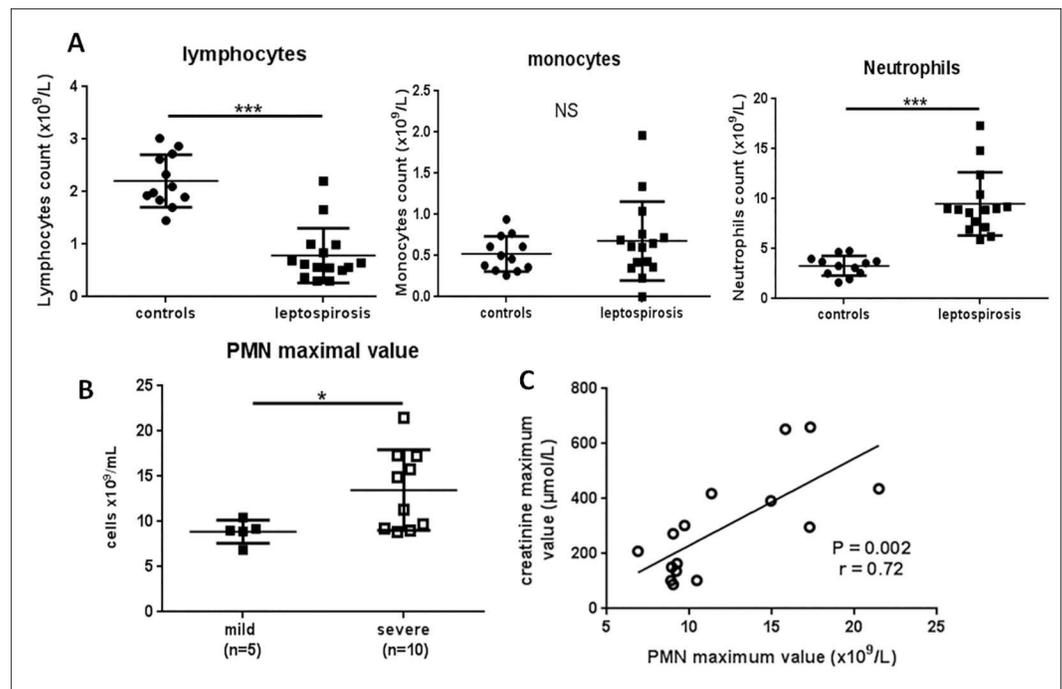


Fig 2. Neutrophil levels at admittance and during the disease course of leptospirosis patients. (A) Counts of immune cells for healthy controls (circles) and leptospirosis patients (squares) at admittance (M0). (B) The maximal value of PMN count reached during hospital stay was compared between mild and severe forms. For A and B, the largest horizontal bars indicate the median value, upper and lower bars the interquartile ranges. Comparisons with non-parametric Mann-Whitney test. *, *** indicate P-value inferior to 0.05 and 0.0001 respectively. (C) Among the patients with leptospirosis, the maximal value of PMN was correlated to the maximal value of creatinine with Spearman test.

doi:10.1371/journal.pone.0165716.g002

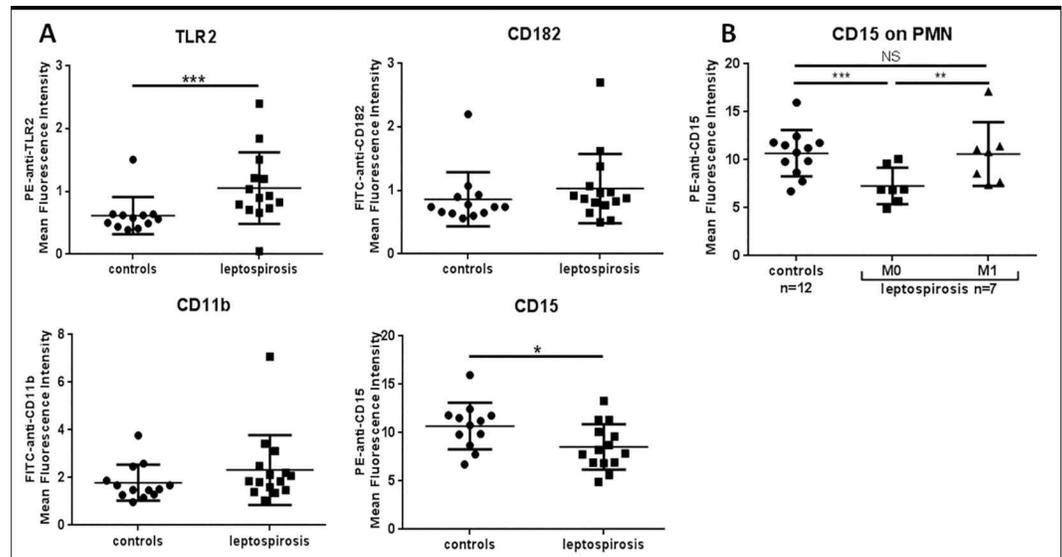


Fig 3. Expression of cell surface molecules implicated in PMN recruitment and activation during leptospirosis. (A) Expression levels of receptors and ligands on circulating PMN at admittance, assessed by flow cytometry. The mean fluorescence intensity (MFI) values were evaluated while isotopic negative controls were set with an MFI of 10^{-1} . One value is missing for CD15. (B) Evolution of CD15 expression among 7 leptospirosis patients and comparison between admittance (M0) and at 1-month (M1) post infection. Largest horizontal bars indicate the median value, upper and lower bars the interquartile ranges. Comparison of the patient group and healthy donor group with non-parametric Mann-Whitney test, and comparison within patients between M0 and M1 with non-parametric Wilcoxon paired test. *, **, *** indicate P-value inferior to 0.05, 0.001 and 0.0001 respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0165716.g003

Finally, we investigated the levels of CXCL8 in plasma of the 15 patients and 13 healthy controls. The chemokine was barely detectable (<10 pg/mL), except for four of the severe leptospirosis cases with values of 21, 34, 219 and 330 pg/mL (Fig 4). Three of these patients had septic shock with multiorgan failure and one of them died.

Discussion

Innate immune cells such as PMN play a critical role to control bacterial infection. In this study we showed that the expression of several cell surface PMN molecules, implicated in chemotaxis and recruitment to inflamed tissues, were either not upregulated when compared to healthy subject controls, or decreased. Moreover, CXCL8, a major chemokine for leukocyte recruitment was barely elevated in leptospirosis. Counterintuitively, only four patients with severe forms of the disease had elevated levels of CXCL8.

To our knowledge, this is the first study assessing the capacity of circulating PMN to be activated during the acute phase of leptospirosis in humans. With the limits of partial exploration of the complex process implicated in the chemotaxis, adhesion and phagocytosis of PMN, our results indicate unique behavior between leptospirosis patients and those with classical Gram-negative multiple organ infection, as discussed below.

The studied population presented mild and severe forms of leptospirosis. Cases were confirmed by PCR or IgM serological assay. Although the number of individuals included in the study is limited, this number is sufficient to evaluate significant variations in cell counts and cell immunophenotyping.

The observed neutrophilia during the acute phase of leptospirosis was in agreement with previous reports. Moderate increase of PMN counts have been reported in patients with

CXCL8 plasma levels

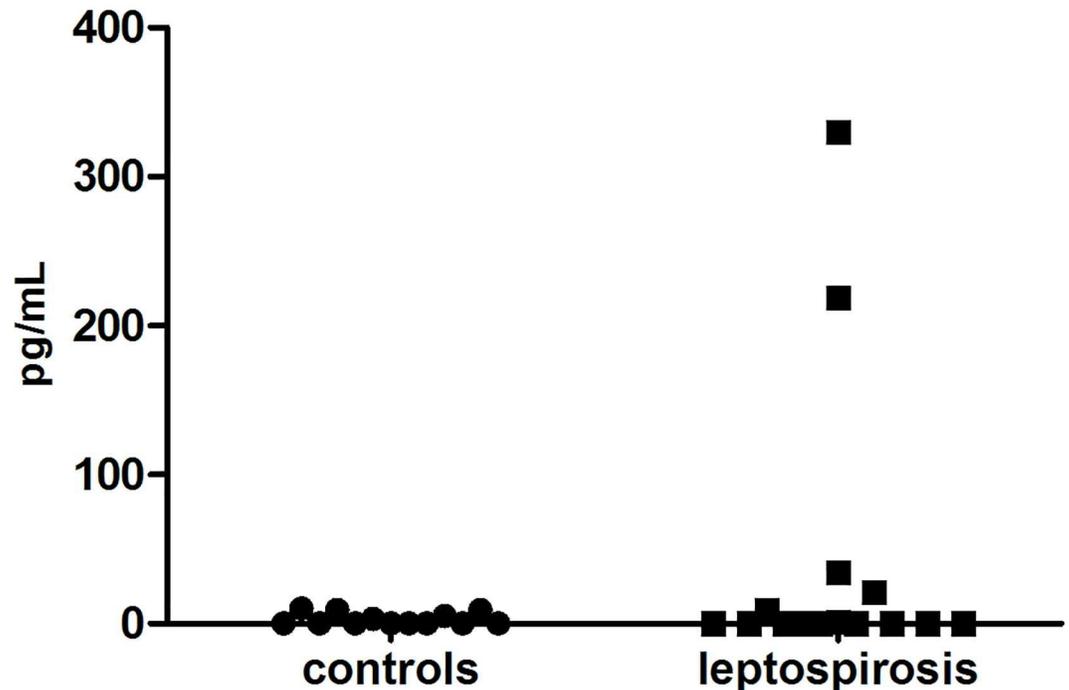


Fig 4. Circulating CXCL8 (interleukin 8) levels are not significantly elevated in leptospirosis cases. CXCL8 levels were assessed by ELISA of plasma from healthy control individuals (circles, $n = 13$) and leptospirosis cases (squares, $n = 15$). For leptospirosis cases, assessment was performed with sampling at hospital admittance corresponding to acute phase (M0), with PCR positive patients. Comparison between two groups with non-parametric Mann-Whitney U-test showed no significant difference.

doi:10.1371/journal.pone.0165716.g004

Leptospira and particularly in the most severe forms [4–6]. Neutrophilia has also been found in other Gram-negative bacterial infection and to control the infectious challenge and to limit tissue damage [29,30].

Interestingly, we found that this neutrophilia in blood sampled at admittance (M0 stage) was not correlated to the level of major organ injuries either at the clinical or biological levels. In contrast, a significant association was observed between the maximal PMN count and the maximum creatinine level during the disease course of leptospirosis.

Interestingly, the levels of CXCL8 was low in our leptospirosis cohort and contrasting to data published for classical Gram-negative severe sepsis cases [19]. CXCL8 was increased only in 4 patients and in the context of the more severe forms of the disease. Literature data have also indicated low levels of CXCL8 in human leptospirosis [31] but several other reports demonstrated increased levels and correlation to severity and mortality [32–34]. How can we possibly reconcile such discrepancies? The differences may be a consequence of different infecting serovars and this information is unfortunately lacking in many of the published studies. Another explanation may be that CXCL8 levels may be fluctuating during the disease course. Papa et al. recently demonstrated that CXCL8 peaked at 6–10 days post-infection [35]. In our study we sampled CXCL8 levels at 5 days post-infection in median. It would be interesting to study whether other chemokines are differentially expressed in leptospirosis. Experiments along these lines are now highly warranted.

TLR2 and TLR4 regulate important PMN functions such as release of chemokines, production of reactive oxygen species (ROS), and activation of major proinflammatory signaling pathways [36]. The expression levels of cell surface TLR2 and TLR4 on PMN is usually up-regulated upon stimulation by bacterial products, LPS or lipopeptides, as well as during sepsis [36,37]. TLR expression levels on PMN during infection by *Leptospira* have never been reported. It has been demonstrated that LPS of *Leptospira* could signal through murine TLR4 and TLR2 but that human TLR2 is the major receptor for leptospiral LPS [26,38]. Noticeably, it has been shown that a specific polymorphism in human TLR2 gene was associated with an increased risk of leptospirosis and influencing its severity [39]. Hence, we focused on TLR2 expression and showed that it was significantly up-regulated during leptospirosis. It has been found that TLR2 is upregulated on endothelial cells in lung samples of fatal leptospirosis [40]. TLR2 stimulation by LPS should induce CXCL8 synthesis and secretion at least *in vitro* [36] and yet this was not detected in our patients. This would indicate that the innate immune response of circulating PMN in the presence of LPS from *Leptospira* is tightly regulated.

With regards to the activation status of PMN, this work indicates no major changes in the expression of CD182, CD11b while CD15 expression was decreased. The number of receptors studied is limited and other key effectors molecules should also be considered and studied. The membrane-bound receptors studied are nevertheless representative of the main steps of the PMN adhesion cascade to an activated endothelium [15,21]. It remains to be ascertained whether the levels of LFA-1 (integrin CD11a/CD18) or PSGL1, the P-selectin glycoprotein ligand 1 are affected on PMN during the course of leptospirosis. CD15 is a glycoprotein that binds to the major P-, E- and L-selectins indispensable for the rolling step of PMN [41]. Data from other studies regarding CD15 expression in the setting of sepsis are scarce but clearly indicated a basal or increased CD15 expression [42,43]. Thus, the decrease of CD15 level in leptospirosis cases might reflect a poor capacity of circulating PMN to be recruited to the tissues infected by *Leptospira*. CD11b (alpha subunit of CR3) is crucial for the slow rolling, adherence and transendothelial migration towards inflamed tissues as well as phagocytosis of complement opsonized-bacteria [15]. During the coordinated response to canonical bacterial sepsis, PMN activation is accompanied by CD11b up-regulation [44–46]. Moreover, infection by the spirochete *Borrelia burgdorferi* demonstrated an activation state of PMN with an increase of CR3 expression [47]. In our study we did not observe such increase. This unique observation adds to the plausible impaired innate immune function of PMN in leptospirosis.

CD182 is a receptor for several important CXCL chemokines, including CXCL8, and it induces activation of PMN during the rolling step next to an activated endothelium. As mentioned previously, sepsis is usually associated with CD182 down-regulation [22,23,45], a mechanism thought to participate to immune paralysis during sepsis and septic shock. This down-regulation may be induced either by high amounts of CXCL8, the most potent ligand of CXCR2 or by TLR2 stimulation as demonstrated by Alves-Filho et al [24]. This feed-back loop would allow PMN to respond to high CXCL8 gradient released by the vasculature and in order to invade inflamed tissues [21]. Of note, CXCL8 and CD182 are not the only ligand/receptor to engage PMN chemotaxis and lower expression of CD182 is not inevitably associated to chemotaxis impairment as demonstrated by Sabroe et al [25]. As a note of caution, we have studied the phenotype of circulating PMN at a given time of the disease process (acute phase of the disease-M0- and in convalescent phase-M1) and longitudinal studies are now warranted. Interestingly, the levels of PMN cell markers returned to control basal levels at M1 post infection. The activation status of PMN can change greatly between bloodstream and inflamed tissues [48] and despite the difficulties in performing such studies in humans, experiments along these lines are warranted.

Conclusion

Our study provides unique information regarding the phenotype and possible functional impairments of PMN during the process of *Leptospira* infection. In sharp contrast to the paradigm reported in Gram-negative sepsis, CD182 expression remained at basal levels, CD11b expression did not increase and CD15 level was down regulated. Taken together our novel observations question the ability of PMN to be mobilized into inflamed target-tissues during leptospirosis; PMN migration and phagocytic functions may also be impaired. Further studies should be performed to address the expression of other receptors essential for PMN's mobilization as well as performing functional phagocytic assays in the presence of *Leptospira*.

Acknowledgments

The authors thank the practitioners implicated in the patients' care as well as the members of the microbiology laboratory of St Denis, La Réunion. We also thank the French national reference centre of leptospirosis, Pasteur Institute in Paris, for performing MAT testing.

Author Contributions

Conceptualization: LR PG MCJB.

Data curation: LR PG.

Formal analysis: LR PG.

Funding acquisition: PG.

Investigation: LR CG.

Methodology: LR PG MCJB AMP.

Resources: LR DV BK FR AR.

Software: LR CG AMP.

Validation: LR PG CG AMP.

Writing – original draft: LR PG MCJB.

Writing – review & editing: LR CG MCJB PG.

References

1. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9: e0003898. doi: [10.1371/journal.pntd.0003898](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898) PMID: [26379143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26379143/)
2. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14: 296–326. doi: [10.1128/CMR.14.2.296-326.2001](https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001) PMID: [11292640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11292640/)
3. Meri T, Murgia R, Stefanel P, Meri S, Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospire. *Microb Pathog*. 2005; 39: 139–147. doi: [10.1016/j.micpath.2005.07.003](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2005.07.003) PMID: [16169184](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16169184/)
4. Craig SB, Collet TA, Wynwood SJ, Smythe LD, Weier SL, McKay DB. Neutrophil counts in leptospirosis patients infected with different serovars. *Trop Biomed*. 2013; 30: 579–583. PMID: [24522125](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24522125/)
5. De Silva NL, Niloofa M, Fernando N, Karunanayake L, Rodrigo C, De Silva HJ, et al. Changes in full blood count parameters in leptospirosis: a prospective study. *Int Arch Med*. 2014; 7: 31. doi: [10.1186/1755-7682-7-31](https://doi.org/10.1186/1755-7682-7-31) PMID: [25018781](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25018781/)
6. Craig SB, Graham GC, Burns M-A, Dohnt MF, Smythe LD, McKay DB. Haematological and clinical-chemistry markers in patients presenting with leptospirosis: a comparison of the findings from

- uncomplicated cases with those seen in the severe disease. *Ann Trop Med Parasitol*. 2009; 103: 333–341. doi: [10.1179/136485909X435058](https://doi.org/10.1179/136485909X435058) PMID: [19508751](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19508751/)
7. Scocchi M, Romeo D, Cinco M. Antimicrobial activity of two bacterenecins against spirochetes. *Infect Immun*. 1993; 61: 3081–3083. PMID: [8514417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8514417/)
 8. Murgia R, Garcia R, Cinco M. Leptospire are killed in vitro by both oxygen-dependent and -independent reactions. *Infect Immun*. 2002; 70: 7172–7175. doi: [10.1128/IAI.70.12.7172-7175.2002](https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.7172-7175.2002) PMID: [12438405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12438405/)
 9. Cinco M, Perticarari S, Presani G, Dobrina A, Liut F. Biological activity of a peptidoglycan extracted from *Leptospira interrogans*: in vitro studies. *J Gen Microbiol*. 1993; 139: 2959–2964. doi: [10.1099/00221287-139-12-2959](https://doi.org/10.1099/00221287-139-12-2959) PMID: [8126423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8126423/)
 10. Araújo AM, Reis EAG, Athanazio DA, Ribeiro GS, Hagan JE, Araujo GC, et al. Oxidative stress markers correlate with renal dysfunction and thrombocytopenia in severe leptospirosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2014; 90: 719–723. doi: [10.4269/ajtmh.13-0667](https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0667) PMID: [24493675](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24493675/)
 11. Scharrig E, Carestia A, Ferrer MF, Cédola M, Pretre G, Drut R, et al. Neutrophil Extracellular Traps are Involved in the Innate Immune Response to Infection with *Leptospira*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9: e0003927. doi: [10.1371/journal.pntd.0003927](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003927) PMID: [26161745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26161745/)
 12. Wang B, Sullivan J, Sullivan GW, Mandell GL. Interaction of leptospire with human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun*. 1984; 44: 459–464. PMID: [6715045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6715045/)
 13. Troxell B, Zhang J-J, Bourret TJ, Zeng MY, Blum J, Gherardini F, et al. Pyruvate protects pathogenic spirochetes from H₂O₂ killing. *PLoS ONE*. 2014; 9: e84625. doi: [10.1371/journal.pone.0084625](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084625) PMID: [24392147](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24392147/)
 14. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010; 140: 771–776. doi: [10.1016/j.cell.2010.03.006](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006) PMID: [20303867](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20303867/)
 15. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 678–689. doi: [10.1038/nri2156](https://doi.org/10.1038/nri2156) PMID: [17717539](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17717539/)
 16. Dobrina A, Nardon E, Vecile E, Cinco M, Patriarca P. *Leptospira icterohemorrhagiae* and leptospire peptidoglycans induce endothelial cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*. 1995; 63: 2995–2999. PMID: [7542637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7542637/)
 17. Goeijenbier M, Gasem MH, Meijers JCM, Hartskeerl RA, Ahmed A, Goris MGA, et al. Markers of endothelial cell activation and immune activation are increased in patients with severe leptospirosis and associated with disease severity. *J Infect*. 2015; 71: 437–446. doi: [10.1016/j.jinf.2015.05.016](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.05.016) PMID: [26048204](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26048204/)
 18. Atzingen MV, Gómez RM, Schattner M, Pretre G, Gonçalves AP, de Moraes ZM, et al. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. *J Infect*. 2009; 59: 264–276. doi: [10.1016/j.jinf.2009.07.010](https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.07.010) PMID: [19665803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19665803/)
 19. Jean-Baptiste E. Cellular mechanisms in sepsis. *J Intensive Care Med*. 2007; 22: 63–72. doi: [10.1177/0885066606297123](https://doi.org/10.1177/0885066606297123) PMID: [17456726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17456726/)
 20. Remick DG. Interleukin-8. *Crit Care Med*. 2005; 33: S466–467. PMID: [16340423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16340423/)
 21. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*. 2011; 17: 1381–1390. doi: [10.1038/nm.2514](https://doi.org/10.1038/nm.2514) PMID: [22064428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22064428/)
 22. Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, et al. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J Immunol*. 1999; 162: 2341–2346. PMID: [9973513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9973513/)
 23. Stadtmann A, Zarbock A. CXCR2: From Bench to Bedside. *Front Immunol*. 2012; 3: 263. doi: [10.3389/fimmu.2012.00263](https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00263) PMID: [22936934](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22936934/)
 24. Alves-Filho JC, Freitas A, Souto FO, Spiller F, Paula-Neto H, Silva JS, et al. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 4018–4023. doi: [10.1073/pnas.0900196106](https://doi.org/10.1073/pnas.0900196106) PMID: [19234125](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19234125/)
 25. Sabroe I, Jones EC, Whyte MKB, Dower SK. Regulation of human neutrophil chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Immunology*. 2005; 115: 90–98. doi: [10.1111/j.1365-2567.2005.02133.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02133.x) PMID: [15819701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15819701/)
 26. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*. 2001; 2: 346–352. doi: [10.1038/86354](https://doi.org/10.1038/86354) PMID: [11276206](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11276206/)
 27. Raffray L, Giry C, Thirapathi Y, Binois F, Moiton M-P, Lagrange-Xelot M, et al. High leptospiremia is associated with low gamma-delta T cell counts. *Microbes Infect*. 2015; 17: 451–455. doi: [10.1016/j.micinf.2015.04.001](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.04.001) PMID: [25899947](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25899947/)

28. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol*. 2005; 54: 45–49. doi: [10.1099/jmm.0.45860-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.45860-0) PMID: [15591254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15591254/)
29. Alves-Filho JC, de Freitas A, Spiller F, Souto FO, Cunha FQ. The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock*. 2008; 30 Suppl 1: 3–9. doi: [10.1097/SHK.0b013e3181818466](https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181818466) PMID: [18704017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18704017/)
30. Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ, Hultgren SJ. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 8829–8835. PMID: [10922042](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10922042/)
31. Kyriakidis I, Samara P, Papa A. Serum TNF- α , sTNFR1, IL-6, IL-8 and IL-10 levels in Weil's syndrome. *Cytokine*. 2011; 54: 117–120. doi: [10.1016/j.cyto.2011.01.014](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.01.014) PMID: [21316985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21316985/)
32. Rizvi M, Azam M, Ajmal MR, Shukla I, Malik A. Prevalence of leptospira in acute hepatitis syndrome and assessment of IL-8 and TNF-alpha level in leptospiral hepatitis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011; 105: 499–506. doi: [10.1179/1364859411Y.0000000041](https://doi.org/10.1179/1364859411Y.0000000041) PMID: [22185944](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22185944/)
33. Reis EAG, Hagan JE, Ribeiro GS, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Montgomery RR, et al. Cytokine response signatures in disease progression and development of severe clinical outcomes for leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7: e2457. doi: [10.1371/journal.pntd.0002457](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002457) PMID: [24069500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24069500/)
34. Wagenaar JFP, Gasem MH, Goris MGA, Leeflang M, Hartskeerl RA, van der Poll T, et al. Soluble ST2 levels are associated with bleeding in patients with severe Leptospirosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3: e453. doi: [10.1371/journal.pntd.0000453](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000453) PMID: [19488407](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19488407/)
35. Papa A, Kotrotsiou T. Cytokines in human leptospirosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015; 109: 749–754. doi: [10.1093/trstmh/trv095](https://doi.org/10.1093/trstmh/trv095) PMID: [26626338](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26626338/)
36. Sabroe I, Dower SK, Whyte MKB. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis*. 2005; 41 Suppl 7: S421–426. doi: [10.1086/431992](https://doi.org/10.1086/431992) PMID: [16237641](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16237641/)
37. Härter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M. Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. *Shock*. 2004; 22: 403–409. PMID: [15489631](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15489631/)
38. Goris MGA, Wagenaar JFP, Hartskeerl RA, van Gorp ECM, Schuller S, Monahan AM, et al. Potent innate immune response to pathogenic leptospira in human whole blood. *PLoS ONE*. 2011; 6: e18279. doi: [10.1371/journal.pone.0018279](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018279) PMID: [21483834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21483834/)
39. Cédola M, Chiani Y, Pretre G, Alberdi L, Vanasco B, Gómez RM. Association of Toll-like receptor 2 Arg753Gln and Toll-like receptor 1 Ile602Ser single-nucleotide polymorphisms with leptospirosis in an Argentine population. *Acta Trop*. 2015; 146: 73–80. doi: [10.1016/j.actatropica.2015.03.007](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.007) PMID: [25784560](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25784560/)
40. Del Carlo Bernardi F, Ctenas B, da Silva LFF, Nicodemo AC, Saldiva PHN, Dolhnikoff M, et al. Immune receptors and adhesion molecules in human pulmonary leptospirosis. *Hum Pathol*. 2012; 43: 1601–1610. doi: [10.1016/j.humpath.2011.11.017](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.11.017) PMID: [22436623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22436623/)
41. Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M, et al. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J Cell Biol*. 1992; 117: 895–902. PMID: [1374413](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1374413/)
42. Weinschenk NP, Farina A, Bianchi DW. Premature infants respond to early-onset and late-onset sepsis with leukocyte activation. *J Pediatr*. 2000; 137: 345–350. doi: [10.1067/mpd.2000.107846](https://doi.org/10.1067/mpd.2000.107846) PMID: [10969258](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10969258/)
43. Januszkiewicz A, Loré K, Essén P, Andersson B, McNurlan MA, Garlick PJ, et al. Response of in vivo protein synthesis in T lymphocytes and leucocytes to an endotoxin challenge in healthy volunteers. *Clin Exp Immunol*. 2002; 130: 263–270. doi: [10.1046/j.1365-2249.2002.01983.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01983.x) PMID: [12390314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12390314/)
44. Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MKB, Dower SK. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol*. 2002; 168: 4701–4710. PMID: [11971020](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11971020/)
45. Chishti AD, Shenton BK, Kirby JA, Baudouin SV. Neutrophil chemotaxis and receptor expression in clinical septic shock. *Intensive Care Med*. 2004; 30: 605–611. doi: [10.1007/s00134-004-2175-y](https://doi.org/10.1007/s00134-004-2175-y) PMID: [14991094](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14991094/)
46. Russwurm S, Vickers J, Meier-Hellmann A, Spangenberg P, Bredle D, Reinhart K, et al. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock*. 2002; 17: 263–268. PMID: [11954824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11954824/)
47. Cinco M, Panfili E, Presani G, Peticarari S. Interaction with *Borrelia burgdorferi* causes increased expression of the CR3 integrin and increased binding affinity to fibronectin via CR3. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2000; 2: 575–579. PMID: [11075934](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11075934/)

48. Fortunati E, Kazemier KM, Grutters JC, Koenderman L, Van den Bosch van JMM. Human neutrophils switch to an activated phenotype after homing to the lung irrespective of inflammatory disease. *Clin Exp Immunol.* 2009; 155: 559–566. doi: [10.1111/j.1365-2249.2008.03791.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03791.x) PMID: [19077082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19077082/)

4- Résultats principaux

Notre étude rapporte pour la première fois des données *ex vivo* sur l'expression de récepteurs clés impliqués dans le processus de recrutement des PNN circulants lors de la leptospirose humaine. **Ces données descriptives indiquent un phénotype des PNN pour le moins inattendu avec le niveau d'expression d'un marqueur abaissé, le CD15 – qui participe à l'étape de roulement. Les autres marqueurs sont exprimés à des taux comparables aux contrôles non infectés alors qu'une élévation était hypothétiquement attendue. Aucune augmentation significative du taux d'IL-8 n'a été observée dans les cas de leptospirose. TLR2 apparaît plus exprimé à la surface des PNN lors de la leptospirose**

III. Etude des marqueurs d'activité des cellules endothéliales

1- Contexte

➤ Contexte général

Les cellules endothéliales sont à l'interface des éléments figurés du sang et les tissus. Elles sont impliquées dans des fonctions de recrutement cellulaire, de régulation de la coagulation et d'intégrité de la barrière du secteur vasculaire avec potentiel risque hémorragique en cas de lésions. Nous avons déjà donné un aperçu général du processus de recrutement dans la présentation de l'article précédent, nous détaillons donc à présent les éléments connus concernant les cellules endothéliales lors de la leptospirose puisque ce 3^e article est aussi axé sur les marqueurs d'activation et de recrutement.

➤ Contexte spécifique à la leptospirose

La place des cellules endothéliales lors de la leptospirose a été détaillée dans un chapitre spécifique de l'introduction: voir page 58. Rappelons brièvement que plusieurs données proviennent d'études *in vitro* et indiquent qu'en présence de *Leptospira* ou de certains constituants moléculaires des leptospires (LPS, peptidoglycane, Omp) les cellules endothéliales expriment plus certains récepteurs associés au recrutement cellulaire : ICAM-1 et E-sélectine (Dobrina et al. 1995; Atzingen et al. 2009; Monica L. Vieira et al. 2007; Gómez et al. 2008).

De plus, les analyses réalisées *ex vivo* au cours de la leptospirose chez l'être humain sont en faveur de l'élévation de certaines molécules d'adhésion solubles réputées traduire l'activation des cellules endothéliales: E-sélectine et ICAM-1 en particulier (Goeijenbier et al. 2015; Paris et al. 2008; Libório et al. 2015).

On peut aussi citer l'analyse des tissus pulmonaires sur cadavres humains suite à une leptospirose létale: les marqueurs ICAM-1 et VCAM-1 sont exprimés en grande quantité dans le tissu pulmonaire endothélial (Del Carlo Bernardi et al. 2012).

2- Hypothèse et objectifs

Notre hypothèse est que les cellules endothéliales constituent une cible à part entière lors de la leptospirose et ont un rôle clé, à l'interface entre les phénomènes de recrutement, d'activation de la coagulation et de lésions architecturales propres à induire des saignements des organes cibles.

L'objectif de ce travail était de mieux caractériser les fonctions de recrutement et de régulation immunitaire des cellules endothéliales lors de la leptospirose humaine. Le critère de jugement était indirect, l'analyse directement des cellules endothéliales semblant infaisable en pathologie humaine en dehors de prélèvements de tissus qui n'ont plus cours de nos jours (biopsies) ou bien rarement (autopsies). Ce travail est une suite logique au deuxième article portant sur les fonctions d'activation et de recrutement des neutrophiles.

3- Article 3

Ma contribution dans ce travail est identique à l'article 2: expériences en cytométrie de flux avec dosages de marqueurs en multiplex à partir des échantillons sanguins des patients et sujets contrôles indemnes d'infection. A partir des analyses de cytométrie j'ai établi des corrélations avec les données issues de la cohorte de patients suite à l'analyse des dossiers médicaux.

Cet article était en cours de soumission dans le journal *PLOS ONE* à la date de soutenance de thèse et a depuis été accepté pour publication en date du 16/06/2017. Le manuscrit est présenté ci-après.

Title page

Title

Increased levels of Soluble Forms of E-Selectin and ICAM-1 Adhesion Molecules during Human Leptospirosis

Short title

Release of Soluble Adhesion Molecules during Human Leptospirosis

Authors

Loic Raffray^{1,2,3*}, Claude Giry⁴, Yoga Thirapathi⁵, Anne-Hélène Reboux⁶, Marie-Christine Jaffar-Bandjee^{1,4}, Philippe Gasque^{1,2*}.

Affiliations

¹ Université de La Réunion, CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249, UMR PIMIT, CHU de La Réunion, Unité Mixte Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Plateforme Technologique CYROI, Sainte-Clotilde, La Réunion, France;

² Laboratoire de Biologie, CHU La Réunion site Félix Guyon, St Denis, La Réunion, France;

³ Internal Medicine Unit, CHU La Réunion site Félix Guyon, St Denis, La Réunion, France;

⁴ Microbiology/Virology Laboratory, CHU La Réunion site Félix Guyon, St Denis, La Réunion, France;

⁵ Internal Medicine Unit, GHER Hospital, St Benoit, La Réunion, France;

⁶ Nephrology Dialysis and Transplantation Unit, CHU La Réunion site Félix Guyon, St Denis, La Réunion, France;

***Corresponding author:** loic.raffray@chu-reunion.fr (LR) or philippe.gasque@chu-reunion.fr (PG)

Abstract

Leptospirosis is a multisystemic zoonotic disease with infiltration of visceral organs by *Leptospira*. The capacity of the vascular endothelium to grant immune cell recruitment and activation in target organs during the disease course remains poorly characterized. We ascertained the levels of expression of several soluble cell adhesion molecules (CAM) notably expressed by endothelial cells in human leptospirosis. We prospectively enrolled 20 hospitalized patients and compared them to 10 healthy controls. Disease severity was defined by one or more organ failures, or death. Plasmatic concentrations of soluble CAM were assessed by multiplex bead assay at the time of patient presentation (M0) and 1 month after hospital discharge. The levels of soluble E-selectin (sCD62E) and soluble intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1, sCD53) were significantly increased in patients compared to controls ($p < 0.0001$) and at 1 month ($p < 0.0001$) with median values at 978 ng/ml (interquartile ranges 787-1164; sCD62E) and 1021 ng/ml (690-1428; sCD53). At M0, Soluble P-selectin level (sCD62P) was found to be decreased with levels at 60 ng/ml (0-631) versus 711 ng/ml (343-1113) for healthy controls ($p < 0.05$). Levels of sICAM-3 (sCD50), sVCAM-1 (vascular cell adhesion molecule, sCD106) and sPECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule, sCD31) were not different from healthy subjects at M0. This study shows that two adhesion molecules, shed as soluble forms, are elevated during the acute phase of leptospirosis : E-selectin and s-ICAM1. These molecules may have decoy functions and interfering with the process of immune cell recruitment to clear *Leptospira* at tissue levels.

Author summary

Leptospirosis is a zoonosis distributed world-wide and with life-threatening features due to Gram-negative bacteria: *Leptospira spp.* Canonically and critically, circulating leukocytes follow a fine regulated process to reach infected tissues after adhesion to the vascular endothelium. Using a cohort of human leptospirosis hospitalized cases, we explored the levels of soluble (shed) adhesion molecules implicated in the immune cell recruitment. When comparing to healthy subjects we found a significant transient elevation of the levels of two out of six soluble adhesion molecules known to be expressed by endothelial cells: sE-selectin and sICAM-1. These molecules are naturally membrane-bound while soluble isoforms have the ability to play a decoy function. To which extent those soluble molecules may counter-regulate the process of immune cell recruitment to clear *Leptospira* at tissue levels remains to be ascertained.

Introduction

Leptospirosis is a zoonotic disease caused by *Leptospira* species, with a recent estimate of 1 million cases per year [1]. The course of the disease includes a broad spectrum of manifestations, from influenza-like illness to multi-organ failure with icteric hepatitis, deep thrombocytopenia, acute renal failure and more rarely intra-alveolar hemorrhage [2]. The mortality ranges from 5% to 15% especially during lung hemorrhage [1,2]. Despite increasing evidence regarding the pathological mechanisms of the disease, much remains to be demonstrated to have a better understanding of this multisystemic disease, and specially the host-pathogen interactions [3].

During the first days of the disease course, pathogenic bacteria reach the blood and evade the host immune system to disseminate to target organs [4]. The vascular endothelium is thus a key-actor during the bacteriemic phase of leptospirosis and particularly in light of its role to allow the recruitment of immune cells in tissues. Widespread endothelial damage may be a possible contributing factor to explain organ injuries, notably at the level of the lungs [5]. Endothelial cell layer disruption has been demonstrated in endothelial cell culture models [6] and in response to adhesion of the spirochete to endothelial monolayer cells [7]. Other *in vitro* studies reported a direct effect of live *Leptospira*, leptospiral components such as peptidoglycan, or recombinant proteins on the activation status of endothelial cells leading to increased expression of cell adhesion molecules (CAM) [8–11]. This was mainly demonstrated for selectins, intercellular and vascular CAMs (ICAM and VCAM respectively). Moreover, histopathologic studies of human leptospirosis fatal cases showed an increased expression of ICAM and VCAM on lung endothelial cells compared to healthy controls and other non-infectious hemorrhagic cases [12].

During a canonical inflammatory response, many of the adhesion molecules expressed by endothelial cells to grant immune cell recruitment are shed from cell surfaces and accumulate as circulating soluble isoforms in plasma [13]. The expression of soluble adhesion molecules have been extensively analyzed in the setting of sepsis and septic shock as biological prognosis markers [13] but little is known in the context of human leptospirosis and as discussed later [14–16]. We were interested to evaluate the levels of several soluble adhesion molecules during the course of hospitalized cases of leptospirosis. We describe herein a prospective cohort study of acute human leptospiral infections and including an assessment of the levels of soluble sE-selectin, sP-selectin, sICAM-1, sICAM3, sPECAM-1, sVCAM-1 during the acute (M0) and convalescent (M1) phases of the disease.

Material and methods

Cohort study and ethics

Our study was conducted in a medical center of the University Hospital of Reunion Island: 10 healthy subjects and 20 patients undergoing PCR-confirmed leptospirosis were enrolled. Patients were hospitalized either in the intensive care unit or conventional medical units. They were treated according to the standards of care. Clinical and laboratory data were recorded until the point of discharge or death.

Definitions of the disease hallmarks:

-Severe leptospirosis was defined as a disease associated with death or severe organ injury. In the latter case it corresponded to patients fulfilling at least one of the following criteria during disease course: either jaundice (bilirubin > 50 $\mu\text{mol/L}$); aspartate aminotransferase (AST) increase (> 3 fold the upper normal limit); acute renal failure defined according to RIFLE “Failure” definition [17] or requirement of hemodialysis; mechanical ventilation or oxygen requirement; hypotension requiring fluid resuscitation. Patients not fulfilling these criteria were defined as non-severe leptospirosis cases.

-Leptospirosis stages: patients were enrolled during the first days after onset of symptoms and were defined as acute phase or M0 group (month 0). Biological and immunological evaluations were also performed 1 month later after patient’s discharge and defined as convalescent phase or M1 group (month 1).

- Hemorrhage was defined by presence of hemoptysis, intra-alveolar hemorrhage, purpura or other clinical bleeding: hematuria, epistaxis, rectorragia.

- Oxygen requirement was defined as use of oxygen to maintain PaO₂ above 600 mmHg or SpO₂ above 92%.

- Septic shock was defined according to international recognized criteria of ACP/SCCM Consensus Conference Committee [18].

-Severe thrombocytopenia was defined as platelets inferior to 50 G/l threshold according to previous study in leptospirosis [19].

Workers at the hospital served as healthy controls and were matched with patients for age and sex.

This study was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki and was approved by the local human ethic committee of “CHU de La Réunion” (R15018). All patients provided written informed consent for the collection of samples and subsequent analyses, performed anonymously.

Real-time quantitative PCR analyses for diagnosis and quantification of leptospirosis

Biological specimens for diagnosis of leptospirosis were sampled at admittance of patients. Leptospire in plasma or urine were detected by quantitative real-time PCR (qPCR) using the Light cycler LC480® system (Roche), and TaqMan® Universal PCR Mastermix with primers and probe specific for 23S rRNA gene of *Leptospira* as detailed before [20]. For quantification of bacterial burden in plasma by PCR, serial dilutions of genomic DNA extracts from *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Copenhageni were performed. These dilutions corresponded to concentrations from 4×10^6 to 4 bacteria/ml and the number of bacteria per ml in plasma samples were inferred from the cycle threshold (Ct) values of PCR according to the log-transformed standard curve, as detailed in previous reports [21].

Multiplex soluble adhesion molecule measurements

The quantitative evaluation of relevant soluble adhesion molecules was performed with the commercial bead based assay FlowCytomix Human Adhesion 6plex kit (ref. BMS812FF,

Bender MedSystems®) on blood sampled at admission. Procedure was performed according to manufacturer's indications and enabled to measure the concentrations of 6 soluble factors: sE-selectin, sP-selectin, sICAM-1, sICAM-3, sPECAM-1, sVCAM-1. Briefly, plasma was incubated with beads coated with specific antibodies toward the soluble factors. After washing to eliminate free beads, phycoerythrin-conjugated antibodies specific for the soluble factors were incubated with the mixture. After washing, the beads are distinguished with a flow cytometer according to their size and specific autofluorescence while the mean fluorescence intensity (MFI) of PE-antibodies linked to soluble factors is determined. The concentrations of each soluble factor were inferred from MFI, according to standard curves. Cytometry analysis was performed with the Becton Dickinson C6 accury™ flow cytometer, and data extracted from BD Accury™ C6 software version 1.0.

Statistics

Data are expressed as medians and interquartile ranges for quantitative variables; and as numbers and percentages for qualitative variables. Owing non-Gaussian distribution, statistical significance of difference between groups was determined by non-parametric Mann-Whitney U-test for continuous variables and by Khi-2 square test for qualitative variables. For paired data the Wilcoxon non-parametrical test was used. The Spearman test was used to analyze correlations among variables. *P*-values below 0.05 were considered statistically significant. Statistics were performed with GraphPad Prism™.

Results

Cohort and patients' clinical and biological data

The clinico-biological data of leptospirosis patients and age- and sex-matched healthy controls are indicated in **Table 1**. Patients exhibited classical hallmarks of acute leptospirosis with moderate to severe organ injuries. From the time of reported first symptoms the median delays to hospitalization and antibiotic treatment were 5 days (interquartile 4-5). Among the infected patients, 14 were considered as severe leptospirosis cases according to the definition of an infectious disease with organ failure as indicated above. These severe cases corresponded to: 11 cases of severe acute renal failure among which 9 required renal replacement therapy during a median of 3 days (2.8-6); 7 cases had hemodynamic failure among which 4 required vasopressor drugs; 6 cases required oxygen administration and 3 had mechanical ventilation. One patient deceased with multi-organ failure and as a consequence of septic shock within 2 days of medical care. When comparing the groups of severe (14) and non-severe (6) leptospirosis patients we found additional significant differences for surrogate markers that were not used initially in the definition of severe cases: thrombocytopenia ($p < 0.001$), neutrophilia ($p = 0.01$) and creatinine phosphokinase (CPK) levels ($p = 0.009$) which were significantly more pronounced in the severe cases compared to non-severe forms of leptospirosis. Bleeding was also significantly associated to low platelet counts ($p = 0.02$). Plasma bacterial load inferred from PCR Ct values was higher in the severe group although not reaching statistical significance: median of 7.8×10^2 /ml compared to 5.2×10^1 /ml ($p = 0.054$). The length of hospital stay was also longer for severe cases: 7 days in median instead of 4 days ($p = 0.005$). Noteworthy, the time to initiate the antibiotic treatment was not significantly different between the two groups with 5 days in median for severe and non-severe leptospirosis groups.

Table 1. Characteristics of leptospirosis patient group at admittance and comparison to healthy subjects

characteristic (units)	Controls	Leptospirosis cases	control vs. leptospirosis
Number of individuals	10	20	
Ratio M/F	9/1	19/1	NS
Age (years)	43.4 (29.3-53.6)	44.3 (27.5-55.8)	NS
Neutrophils ($10^9/L$)	3.6 (3.2-3.9)	9 (7.3-10.3)	<0.0001
Lymphocytes ($10^9/L$)	2.2 (1.8-2.7)	0.6 (0.5-0.9)	<0.0001
Monocytes ($10^9/L$)	0.5 (0.4-0.6)	0.6 (0.4-0.8)	NS
Platelets ($10^9/L$)	233 (214-253)	53 (37-102)	<0.0001
Creatinine ($\mu\text{mol/L}$)	83 (20-89)	152 (103-394)	<0.0001
Total bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	9 (7-11)	41 (27-123)	<0.0001
AST (IU/L)	25 (22-31)	89 (52-169)	0.0002
CPK (IU/L)	140 (115-206)	1410 (910-4365)	0.0006
CRP (mg/L)	1 (0.4-2)	212 (187-304)	<0.0001
Plasmatic bacterial load* (bact./ml)	NA	344 (61-2566)	

Data are expressed as medians (interquartile ranges). Statistics between 2 groups are performed with nonparametric unpaired tests (Mann-Whitney U-test) for quantitative variables, and with Khi-2 square test for categorical data. P value inferior to 0.05 was considered significant. *Plasmatic bacterial load is inferred from plasmatic PCR Ct values

according to the log-transformed standard curve. (AST=aspartate aminotransferase; CPK=creatine phosphokinase; CRP= C-reactive protein; NS=not significant)

Among the 20 patients, 10 patients agreed to be evaluated 1 month after hospital discharge, of whom 7 were considered as severe cases at M0. The assessment of M1 outpatient group indicated a rapid correction of the symptoms and biological alterations were not significantly different from those of the control group (**Fig 1**).

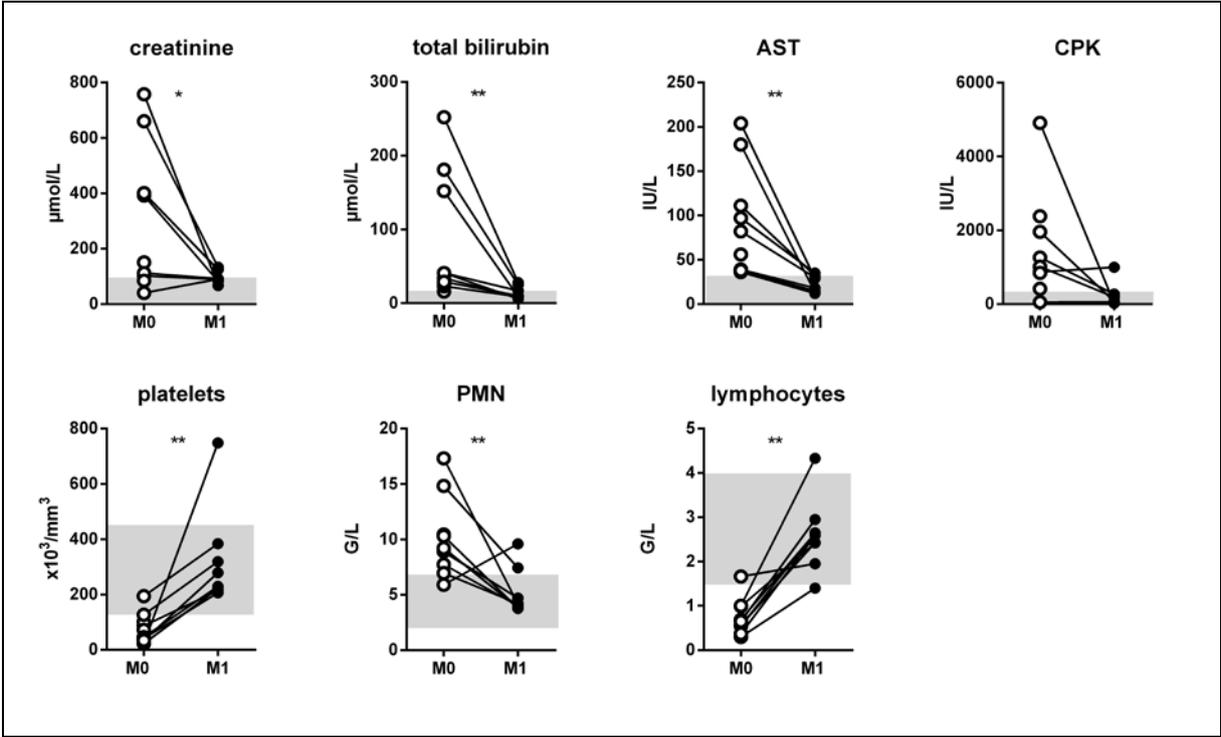


Fig 1. Correction of blood cell counts and tissue-injury biomarkers at 1 month post-leptospirosis. Caption: evolution of blood cell counts and surrogate biomarkers of tissue injury between acute (M0, empty circles) and convalescent phase, 1 month later (M1, black circles) for 10 patients. Gray areas indicate normal values ranges. Two values for M1 patient CPK (creatine phosphokinase) measurement could not be included. Comparisons with non-

parametric Wilcoxon paired test. * and ** indicate P-value inferior to 0.05 and 0.01 respectively.

Shedding of adhesion molecules into soluble forms during leptospirosis

The levels of soluble adhesion factors implicated in leukocyte recruitment are indicated in **Fig 2**. We found a clear increase for sE-selectin and sICAM-1 levels when comparing leptospirosis patients at M0 and healthy subjects (controls) ($p < 0.0001$). The levels of soluble E-selectin were 978 ng/ml in median for patients (interquartile ranges 787-1164) and 314 ng/ml (236-412) for healthy controls. sICAM-1 levels were also elevated with median values of 1021 ng/ml (690-1428) for patients and 155 ng/ml (111-216) for controls. These elevated values returned to the levels of the control group for the evaluation at M1 after discharge. Concerning sVCAM-1, there was a trend to higher levels in patients with leptospirosis, although not of statistical significance; whereas the values at M1 were lower when compared to controls and M0 patient group. sP-selectin was the only tested molecule with lower expression levels during the acute phase of the disease compared to controls: 60 ng/ml (0-631) versus 711 ng/ml (343-1113) ($p < 0.05$).

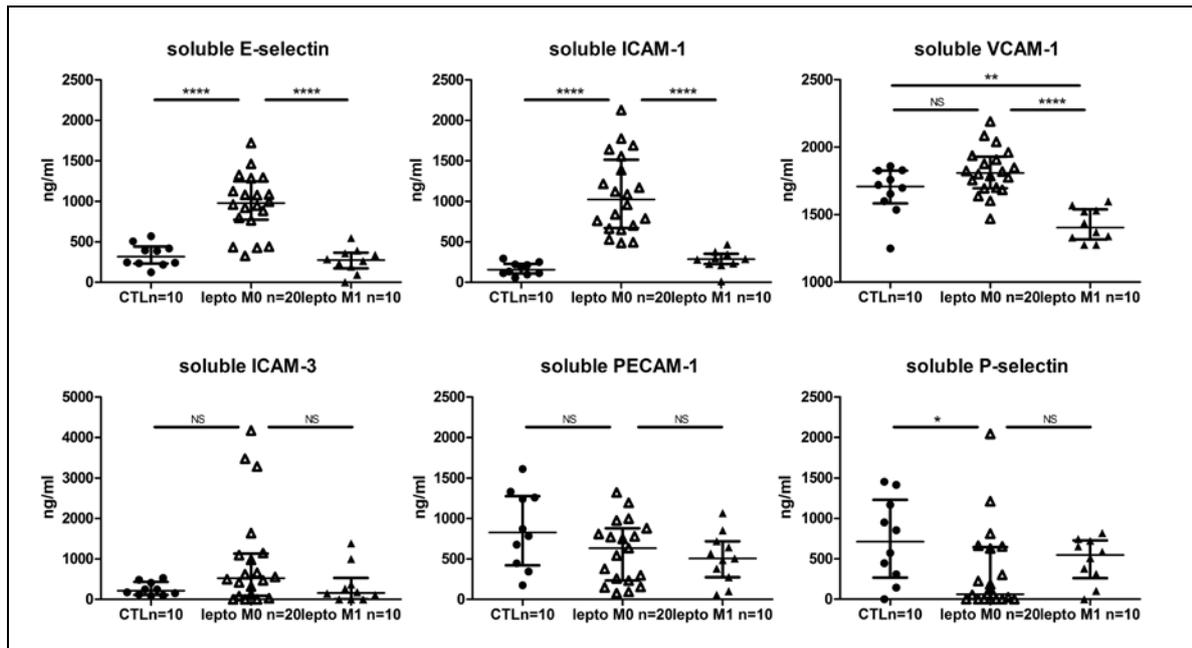


Fig 2. Levels of soluble E-selectin and soluble ICAM-1 are increased during the acute phase of human leptospirosis. Caption: Levels of soluble (shed) adhesion molecules are determined in patients and controls using multiplex microbeads array. Circles represent controls (n=10), empty triangles: patients during acute phase (n=20) and black triangles: patients at M1 convalescent phase (n=10). The largest horizontal bars indicate the median value, upper and lower bars the interquartile ranges. Comparisons with non-parametric Mann-Whitney test. *, **, **** indicate P-value inferior to 0.05, 0.01 and 0.0001 respectively.

Comparison between the severe leptospirosis cases (n=14) and non severe cases (6) showed no difference for the levels of each of the adhesion molecules soluble forms tested. Of critical note, the severity of the disease was established from a clinical standpoint (i.e. organ failure as aforementioned). Moreover, the elevated levels of the adhesion molecules were not associated with hospitalization in intensive care units or hospitalization length.

We next further analyzed whether the levels of sCAMs were possibly associated to the different organs, or surrogate markers, affected in leptospirosis (**Fig 3 and S1 Table**).

Counterintuitively, we found that patients in the group with very low platelet counts (<50 G/L) had low levels of sE-selectin when compared to patients with higher platelet counts (>50 G/L) ($p= 0.02$) (Figure 3). This association was also observed for sP-selectin levels and platelet counts. Thus, we found a positive correlation between platelet counts and sP-selectin levels: $p=0.02$ and $r=+0.25$. When we used bilirubin as another biomarker of disease severity we found a significant association between low levels of sICAM-3, sP-selectin and high levels of bilirubin (>50 $\mu\text{mol/L}$) (Fig 3). A significant correlation was found also between sICAM-1 and oxygen requirement as well as between levels of sP-selectin and CPK. The amount of circulating bacteria (assessed by PCR) was inversely correlated to sICAM-3 values ($p=0.014$, $r=-0.47$) and not correlated to other soluble adhesion molecules.

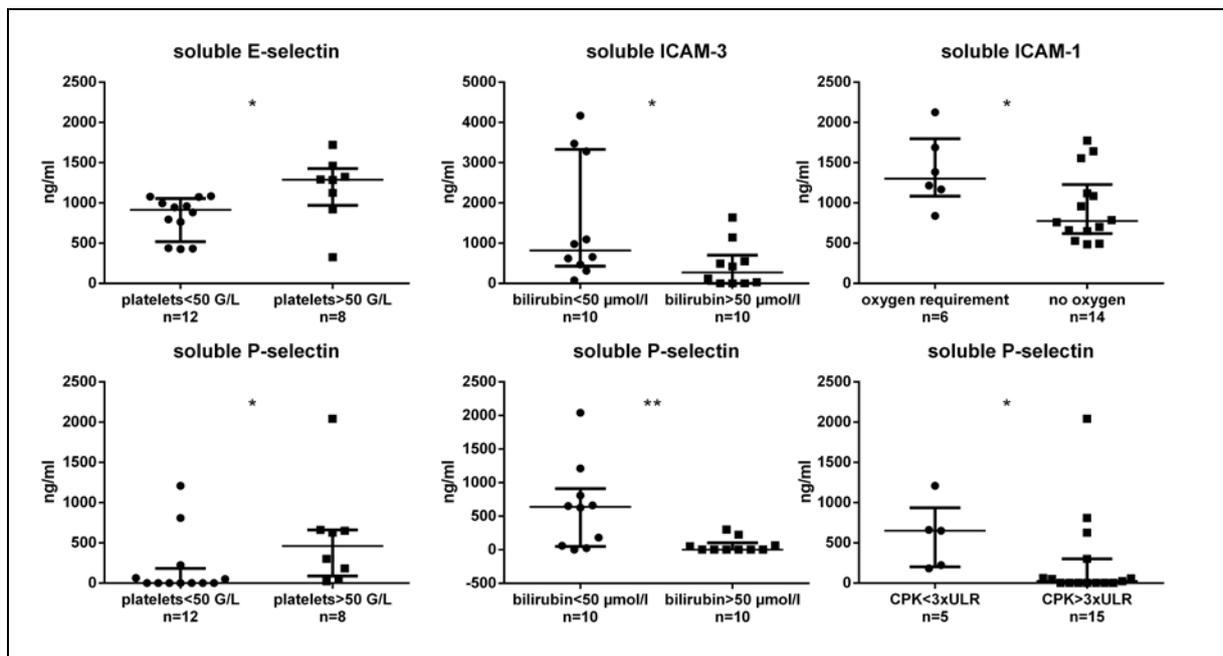


Fig 3. Distinct associations between shed adhesion molecules and organ injuries in 20 leptospirosis patients. Caption: Levels of soluble (shed) adhesion molecules are determined among leptospirosis M0 group (n=20) using multiplex microbeads array. The largest horizontal bars indicate the median value, upper and lower bars the interquartile ranges.

Comparisons with non-parametric Mann-Whitney test. * and ** indicate P-value inferior to 0.05 and 0.01 respectively. CPK=creatine phosphokinase; ULR= upper limit range

S1 table 1. Correlation between levels of soluble adhesion molecules and clinicobiological biomarkers in 20 leptospirosis patients

	sE- selectin	sICAM- 1	sICAM- 3	sPCAM -1	sP- selectin	sVCAM -1
Hemorrhage (n=5)	NS	NS	0.06	NS	NS	NS
Platelets<50 G/l (n=12)	0.02	NS	NS	NS	0.03	NS
Bilirubinemia>50 µmol/l (n=10)	0.07	NS	0.04	NS	0.01	NS
Liver enzymes >3xULR (n=10)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Muscle enzymes >3xULR (n=15)	NS	NS	NS	NS	0.03	NS
Acute renal failure according to RIFLE (n=11)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Renal replacement therapy (n=9)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Oxygen requirement (n=6)	NS	0.03	NS	NS	NS	NS
Septic shock (n=5)	NS	NS	0.08	NS	NS	NS

Caption: comparisons with non-parametric Mann-Whitney test between the group with and without the indicated organ injury. ULR= upper limit range; other definitions: see methods section.

Discussion

The aim of this study was to assess indirectly the relative contribution of vascular endothelial cells in human leptospirosis by measuring the levels of several soluble CAMs in blood. We analyzed plasma levels of several of the key CAMs shed as soluble forms. These sCAMs have been considered prognostic biomarkers of severity of systemic inflammation but the clinical importance of monitoring such changes remains to be established [22]. We herein report a major increase in sE-selectin and sICAM-1 levels in patients with leptospirosis, whereas sP-selectin levels were lower compared to control healthy subjects. Our results indicate that endothelial cells may be activated during leptospirosis and that yet ill-characterized mechanisms are likely to contribute to the release of soluble forms of the CAMs through the activity of sheddases, membrane-bound proteases or caspases.

E-selectin is the most specific CAM expressed by endothelial cells, together with ICAM-1 and VCAM-1. E-selectin belongs to the selectin family of CAM and mediates the first step of leukocytes (e.g. PMN) and platelets rolling onto the endothelium through its ligands P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL1) mainly and E-selectin ligand (ESL1) [23,24]. Expression of E-selectin is upregulated upon inflammatory conditions and this cell surface molecule can be cleaved through an active process of shedding mediated by caspases and giving rise to soluble isoforms. It is recognized that sE-selectin level reflects the activation status of endothelial cells [25]. Interestingly, sE-selectin in sera has been shown to retain the ability to adhere to its ligand on circulating leukocytes, thus decreasing the ability of immune cells to be mobilized at the site of inflammation. This decoy mechanism is thought to constitute a self-limiting process to avoid detrimental inflammation due to uncontrolled leukocyte recruitment in tissues. We believe that this paradigm proposed in many infectious diseases could also be involved as a mechanism to control leukocyte recruitment in leptospirosis.

Shedding has also been described for the other CAM studied here [13]. ICAM-1 and VCAM-1 are members of the immunoglobulin superfamily and bind to integrins LFA-1 (CD11a/CD18), CR3 (CD11b/CD18), and VLA-4 during the firm adhesion and transendothelial migration steps. Expression of these CAMs is constitutive and also inducible after the action of inflammatory cytokines (TNF α , IL-1, and IFN γ) or LPS exposure [13].

In vivo studies addressing the mechanisms of endothelial cell activation/damage during leptospirosis are scarce but have already yielded insightful information. In a study comparing « typhus-like » infectious diseases in Thai patients, the authors found elevation of sE-selectin, sICAM-1 and sVCAM-1 levels in 24 leptospirosis cases compared to healthy subject controls. Leptospirosis patients had high levels of sE-selectin and sICAM-1, but these parameters were not assessed as prognosis markers for leptospirosis [15]. However, in Liborio et al.'s study, the significant elevation of sICAM-1 and glyocalix in leptospirosis patients was correlated to renal damage and possibly as a consequence of endothelial damage rather than the activation status according to the authors [14]. Moreover, Goeijenbier et al. observed that Von Willebrand factor and soluble E-selectin plasma levels were elevated within the 14 days period following initial symptoms of leptospirosis in humans [16]. Soluble E-selectin levels were correlated to mortality, even though not linked to bleeding. Surprisingly, these authors experienced *in vitro* that *Leptospira*-treated human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) did not express increased levels of sE-selectin and sICAM-1, although data were not shown. *In vivo* and in the context of a vascular inflammation, the process of shedding may likely be mobilized by activated immune cells to cleave the CAMs expressed by endothelial cells. Sheddases are cell-derived enzymes that cleave extracellular portions of the endothelial CAMs. The expression and plausible roles of specific sheddases in leptospirosis are unknown and experiments along these lines are now highly warranted.

Our results largely corroborate with previously published data [14–16]. We demonstrated that sE-selectin and sICAM-1 levels were increased during non-severe and severe forms of human leptospirosis. We did not find a correlation between the levels of sE-selectin and global clinical disease severity (multiple organ failure or death) in contrast to the data reported in the Indonesian's cohort [16]. Of note, the Indonesian's study included 14/52 fatal cases compared to one death in our cohort and they did not assess other severity factors and therefore comparison between both studies is not possible. Of note, high sE-selectin levels have also been linked to severe outcome in other sepsis studies [13,26]. A new element described in our study is the normalization of sE-selectin levels within 1 month after initial assessment. At that time patients had probably recovered from the main tissue injuries as well as from the systemic inflammatory response. Therefore, our patients can be considered as their own control to demonstrate that the process of shedding to modulate the expression and possibly the function of endothelial CAM is contemporary to leptospiral infectious process.

The increase level of sICAM-1 is consistent with previous results of the Thai patients [15] and of a study performed on 46 patients during a leptospirosis outbreak in Brazil [14]. Our results indicated values 3 times superior to the two previous studies. These studies reported a 2-fold increase over control and compared to a 6-fold increase in our work. The discrepancies are possibly depending on several factors such as differences in measurement techniques, the disease severity or the bacterial strain. Liborio et al. demonstrated a positive and independent association between sICAM-1 and acute kidney injury defined by KDIGO criteria. We did not observe this association when we used renal replacement therapy and the definition of acute renal failure according to RIFLE criteria and which are commonly used to define critical kidney illnesses [17]. The only association that we found for sICAM-1 in our cohort was the need for oxygen. This could be linked to the activation status of pulmonary

endothelial cells as observed in the autopsy analysis carried out by Del Carlo Bernardi and colleagues [12].

To our knowledge, soluble P-selectin levels had never been explored in leptospirosis prior to our study. Counterintuitively, levels of this CAM were decreased. Moreover several patients had below detectable levels of sP-selectin in their plasma. sP-selectin is usually up-regulated in plasma of septic patients [13,27]. The degree to which sP-selectin in plasma is derived from platelets or endothelial cells is difficult to address. Indeed, other cells of the vascular bed could release soluble CAMs: platelets are abundant sources of membrane and soluble forms of P-selectin as well as PECAM-1. Leukocytes (monocytes, neutrophils, lymphocytes) are known to express high levels of ICAM-3 and to a lesser extent PECAM-1. Hence, the interpretation of our results may be more complex taking into account the contribution of several cell types releasing soluble forms of the CAM. Interestingly, we found a correlation between the levels of sP-selectin and platelets indicating a plausible role for shedding of P-selectin from platelets. Moreover low sP-selectins levels were associated with high bilirubinemia and muscle enzymes (CPK) increases. As major thrombocytopenia is a hallmark of severe acute leptospirosis [28,29], the low levels of sP-selectin observed here are possibly a consequence of platelet decrease. Data from Hantavirus infection, a viral hemorrhagic fever with profound thrombocytopenia, revealed a positive correlation between platelet cell counts and sP-selectin levels, paralleling our results [30].

As stated above, the measurement of the levels of soluble CAMs does not allow distinguishing whether this is due to either endothelial cell activation or other causes such as cell damage or cell death. Moreover, these sCAMs may also be derived from activated platelets. In leptospirosis, we could also speculate that active shedding may be due to leptospiral proteases as described [31,32]. Studies of other endothelial activation markers in

the setting of leptospirosis, such as angiopoietin and dimethylarginin, should be important to address the link with pathogenesis [33].

In conclusion, our study provides new data regarding the monitoring of six major soluble adhesion molecules that may be important to explain the pathophysiological mechanisms of leptospirosis. We did not find a strong correlation between the levels of these soluble CAMs and the canonical cellular and molecular biomarkers of clinical disease severity. The main changes in molecule levels were observed for CAMs specific of endothelial cells such as soluble E-selectin and ICAM-1. If the changes are not specifically associated to global clinical disease severity, they clearly indicate an important role of the endothelium during the infectious process. CAMs derived from platelets and the capacity of *Leptospira* to control platelet's functions may also be involved in pathogenesis of leptospirosis and should be addressed in further studies.

Acknowledgments

The authors thank the practitioners implicated in the patients' care as well as the members of the microbiology laboratory of St Denis, La Réunion.

References

1. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9: e0003898. doi:10.1371/journal.pntd.0003898
2. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14: 296–326. doi:10.1128/CMR.14.2.296-326.2001
3. Adler B, editor. *Leptospira and Leptospirosis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. Available: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-45059-8>

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.
5. De Brito T, Aiello VD, da Silva LFF, Gonçalves da Silva AM, Ferreira da Silva WL, Castelli JB, et al. Human hemorrhagic pulmonary leptospirosis: pathological findings and pathophysiological correlations. *PloS One.* 2013;8: e71743. doi:10.1371/journal.pone.0071743
6. Martinez-Lopez DG, Fahey M, Coburn J. Responses of human endothelial cells to pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4: e918. doi:10.1371/journal.pntd.0000918
7. Evangelista K, Franco R, Schwab A, Coburn J. *Leptospira interrogans* binds to cadherins. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8: e2672. doi:10.1371/journal.pntd.0002672
8. Vieira ML, D’Atri LP, Schattner M, Habarta AM, Barbosa AS, de Moraes ZM, et al. A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;276: 172–180. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00924.x
9. Atzingen MV, Gómez RM, Schattner M, Pretre G, Gonçalves AP, de Moraes ZM, et al. Lp95, a novel leptospiral protein that binds extracellular matrix components and activates e-selectin on endothelial cells. *J Infect.* 2009;59: 264–276. doi:10.1016/j.jinf.2009.07.010
10. Gómez RM, Vieira ML, Schattner M, Malaver E, Watanabe MM, Barbosa AS, et al. Putative outer membrane proteins of *Leptospira interrogans* stimulate human umbilical vein endothelial cells (HUVECS) and express during infection. *Microb Pathog.* 2008;45: 315–322. doi:10.1016/j.micpath.2008.08.004
11. Dobrina A, Nardon E, Vecile E, Cinco M, Patriarca P. *Leptospira icterohemorrhagiae* and leptospire peptidoglycans induce endothelial cell adhesiveness for polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* 1995;63: 2995–2999.
12. Del Carlo Bernardi F, Ctenas B, da Silva LFF, Nicodemo AC, Saldiva PHN, Dolhnikoff M, et al. Immune receptors and adhesion molecules in human pulmonary leptospirosis. *Hum Pathol.* 2012;43: 1601–1610. doi:10.1016/j.humpath.2011.11.017
13. Zonneveld R, Martinelli R, Shapiro NI, Kuijpers TW, Plötz FB, Carman CV. Soluble adhesion molecules as markers for sepsis and the potential pathophysiological discrepancy in neonates, children and adults. *Crit Care Lond Engl.* 2014;18: 204. doi:10.1186/cc13733

14. Libório AB, Braz MBM, Seguro AC, Meneses GC, Neves FM de O, Pedrosa DC, et al. Endothelial glycocalyx damage is associated with leptospirosis acute kidney injury. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92: 611–616. doi:10.4269/ajtmh.14-0232
15. Paris DH, Jenjaroen K, Blacksell SD, Phetsouvanh R, Wuthiekanun V, Newton PN, et al. Differential patterns of endothelial and leucocyte activation in “typhus-like” illnesses in Laos and Thailand. *Clin Exp Immunol.* 2008;153: 63–67. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03673.x
16. Goeijenbier M, Gasem MH, Meijers JCM, Hartskeerl RA, Ahmed A, Goris MGA, et al. Markers of endothelial cell activation and immune activation are increased in patients with severe leptospirosis and associated with disease severity. *J Infect.* 2015;71: 437–446. doi:10.1016/j.jinf.2015.05.016
17. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P, Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care Lond Engl.* 2004;8: R204-212. doi:10.1186/cc2872
18. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992;101: 1644–1655.
19. Tubiana S, Mikulski M, Becam J, Lacassin F, Lefèvre P, Gourinat A-C, et al. Risk factors and predictors of severe leptospirosis in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7: e1991. doi:10.1371/journal.pntd.0001991
20. Raffray L, Giry C, Thirapathi Y, Binois F, Moiton M-P, Lagrange-Xelot M, et al. High leptospiremia is associated with low gamma-delta T cell counts. *Microbes Infect.* 2015;17: 451–455. doi:10.1016/j.micinf.2015.04.001
21. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW. Detection of pathogenic leptospire by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 2005;54: 45–49.
22. Xing K, Murthy S, Liles WC, Singh JM. Clinical utility of biomarkers of endothelial activation in sepsis--a systematic review. *Crit Care Lond Engl.* 2012;16: R7. doi:10.1186/cc11145
23. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7: 678–689. doi:10.1038/nri2156

24. Ley K, Kansas GS. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2004;4: 325–335. doi:10.1038/nri1351
25. Smith CW. Potential significance of circulating E-selectin. *Circulation.* 1997;95: 1986–1988.
26. Page AV, Liles WC. Biomarkers of endothelial activation/dysfunction in infectious diseases. *Virulence.* 2013;4: 507–516. doi:10.4161/viru.24530
27. Fijnheer R, Frijns CJ, Korteweg J, Rommes H, Peters JH, Sixma JJ, et al. The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb Haemost.* 1997;77: 1081–1085.
28. Hochedez P, Theodose R, Olive C, Bourhy P, Hurtrel G, Vignier N, et al. Factors Associated with Severe Leptospirosis, Martinique, 2010-2013. *Emerg Infect Dis.* 2015;21: 2221–2224. doi:10.3201/eid2112.141099
29. Tantitanawat S, Tanjatham S. Prognostic factors associated with severe leptospirosis. *J Med Assoc Thai Chotmaihet Thangphaet.* 2003;86: 925–931.
30. Connolly-Andersen A-M, Sundberg E, Ahlm C, Hultdin J, Baudin M, Larsson J, et al. Increased Thrombopoiesis and Platelet Activation in Hantavirus-Infected Patients. *J Infect Dis.* 2015;212: 1061–1069. doi:10.1093/infdis/jiv161
31. Fraga TR, Courrol DDS, Castiblanco-Valencia MM, Hirata IY, Vasconcellos SA, Juliano L, et al. Immune evasion by pathogenic *Leptospira* strains: the secretion of proteases that directly cleave complement proteins. *J Infect Dis.* 2014;209: 876–886. doi:10.1093/infdis/jit569
32. Hashimoto VL, Abreu P a. E, Carvalho E, Gonçalves AP, Morais ZM, Vasconcellos SA, et al. Evaluation of the elastinolytic activity and protective effect of Leptallo I, a protein composed by metalloprotease and FA5/8C domains, from *Leptospira interrogans Copenhageni*. *Microb Pathog.* 2013;61–62: 29–36. doi:10.1016/j.micpath.2013.04.011
33. Lukasz A, Hoffmeister B, Graf B, Wölk B, Noeckler K, Bode-Böger SM, et al. Association of angiopoietin-2 and dimethylarginines with complicated course in patients with leptospirosis. *PloS One.* 2014;9: e87490. doi:10.1371/journal.pone.0087490

4- Résultats principaux

Nos résultats montrent une élévation marquée des fractions solubles d'E-sélectine et ICAM-1, tandis que P-sélectine est abaissée. Ces données sur E-sélectine et ICAM-1 confortent les résultats produits antérieurement sur un modèle similaire mais avec des échantillons plus conséquents (Goeijenbier et al. 2015; Paris et al. 2008; Libório et al. 2015). La donnée sur P-sélectine est nouvelle dans le cas de figure de la leptospirose et assez étonnante lorsqu'on part du principe général que ces molécules d'adhésion sont plus exprimées et plus clivées en phase inflammatoire.

DISCUSSION

Mon travail de thèse apporte des informations nouvelles sur la réponse immunitaire innée lors de la leptospirose humaine en phase aigüe. **Les principaux résultats sont :**

-une baisse des $LT\gamma\delta$ lors de la phase précoce de l'infection, baisse associée à une charge bactérienne plus élevée et des atteintes hépatiques et musculaires plus intenses.

-une augmentation du taux de neutrophiles sanguins contrastant avec un phénotype proche des cellules PNN quiescentes des sujets contrôles pour les récepteurs membranaires impliqués dans l'activation et le recrutement tissulaire via les cellules endothéliales.

-une élévation différentielle des formes solubles des molécules impliquées dans les fonctions de recrutement immunitaire par les cellules endothéliales. Les taux des formes solubles d'E-sélectine (sP-sélectine) et de sICAM-1 sont plus élevés alors que le niveau de sP-sélectine est abaissé à la phase aigüe avant de revenir à des taux identiques aux contrôles 1 mois après l'infection.

Chacun de ces résultats est discuté spécifiquement avant une discussion plus générale où nous pourrions mettre en avant les apports globaux de notre travail, ainsi que les limites et avantages de notre modèle d'étude.

I. Discussions spécifiques de chaque article

1- Taux des lymphocytes $T\gamma\delta$

Notre travail est le premier à analyser de manière systématique le taux de $LT\gamma\delta$ lors de la leptospirose. Contrairement aux données de la littérature, nous n'avons pas retrouvé d'élévation du taux sanguin de $LT\gamma\delta$ en phase aigüe de la maladie. Au contraire, ce taux

apparaissait bas, d'autant plus bas que la charge bactérienne était élevée dans le sang. Cette baisse est associée à une cytolysse hépatique et une rhabdomyolyse plus franches.

Il ne s'agit que d'une étude observationnelle et il n'est donc pas possible de tirer des conclusions claires sur le rôle des $LT\gamma\delta$ mais certains éléments peuvent néanmoins être discutés.

Le principal résultat tient au fait que le taux de $LT\gamma\delta$ circulants n'est pas élevé en phase aiguë de la leptospirose dans le contexte réunionnais d'un échantillon de 12 personnes. Les constatations antérieures d'élévation des $LT\gamma\delta$ tiennent peut-être à des spécificités propres aux souches bactériennes dans d'autres parties du globe. Néanmoins à notre avis l'élévation des $LT\gamma\delta$ n'est pas une caractéristique fréquente lors de la leptospirose.

De manière inattendue nous trouvons une baisse des $LT\gamma\delta$. Nous formulons différentes hypothèses qui pourraient expliquer cette baisse :

-Une chute du taux des $s\ LT\gamma\delta$ circulants pourrait s'expliquer par un mécanisme majeur de recrutement au sein des tissus infectés pour y exercer une défense anti-infectieuse tout en contribuant à des atteintes tissulaires. La baisse du taux des $LT\gamma\delta$ circulants constatée dans notre étude se fait en parallèle d'une majoration des signes de souffrance hépatique et ce qui pourrait donc corroborer notre hypothèse (infiltration hépatique). Ceci n'est pas vérifiable en l'absence de biopsie hépatique. De plus l'élévation des marqueurs de souffrance hépatiques est un possible facteur confondant avec la gravité globale qui peut en elle-même perturber l'homéostasie des $LT\gamma\delta$.

-les $LT\gamma\delta$ sont détruits par apoptose ou nécrose. Il a été démontré que lors des chocs septiques il existe une mort cellulaire accrue des lymphocytes (R S Hotchkiss et al. 2001; Richard S. Hotchkiss et Nicholson 2006). Notre série de cas et celles décrites par d'autres auteurs indiquent une lymphopénie globale fréquente lors de la leptospirose (De Silva et al. 2014) et dont le mécanisme reste à préciser. Néanmoins cette lymphopénie était plus marquée pour des taux de bactéries plus forts, ce qui peut faire avancer l'hypothèse d'une toxicité directe ou indirecte des pathogènes sur les lymphocytes.

En ce qui concerne les limites de ce travail, on peut avancer le faible effectif et l'absence de réévaluation à distance de l'infection afin de rechercher une élévation tardive des $LT\gamma\delta$. Bien que non montré ici et non disponibles à l'époque de la publication, j'ai depuis poursuivi

des études phénotypiques sur une quinzaine d'autres cas de leptospirose en y associant une évaluation à 1 mois de la sortie d'hospitalisation. Je n'ai pas retrouvé d'augmentation des $LT\gamma\delta$ pour ces deux temps de mesure.

2- Phénotype des polynucléaires neutrophiles :

Mon étude rapporte pour la première fois des données *ex vivo* sur les molécules impliquées dans le processus de recrutement des PNN circulants lors de la leptospirose humaine. **Ces données descriptives indiquent un phénotype des PNN pour le moins inattendu avec un marqueur exprimé plus faiblement, le CD15 – qui participe à l'étape de roulement, alors que les autres sont exprimés à des taux comparables aux contrôles non infectés alors qu'une élévation était attendue.**

Cette étude a plusieurs limites, dont certaines sont inhérentes à ce modèle d'étude qui est restreint en termes de possibilités chez l'être humain :

- un effectif limité, mais suffisant pour mettre en évidence des différences significatives entre contrôles et cas de leptospirose

- une exploration partielle des ligands et récepteurs impliqués dans le processus de recrutement, avec un choix nécessaire qui a porté sur des molécules que nous considérons comme majeures

- une évaluation à un temps T de l'infection qui correspond possiblement à des moments plus ou moins avancés dans la phase de bactériémie selon les patients.

- la réalisation d'une « photographie » des PNN circulants alors que leur statut est susceptible d'évoluer au contact de l'endothélium lors de leur attachement. Néanmoins la capacité à visualiser cette interaction *in vivo* chez l'être humain nous semble très difficile en dehors de réalisation de biopsies mais qui n'ont quasiment plus cours pour les soins courants de cette infection.

- une comparaison à des contrôles sains uniquement, et pas d'infections d'autre nature. Certains résultats attendus « normalement » sont extrapolés à partir des données de la

littérature pour les infections et sepsis, en particulier à bacilles à Gram négatif, mais n'ont pas été expérimentés ici.

Au-delà de ces limites, notre étude apporte tout de même certaines informations nouvelles et utiles pour mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques de l'infection. Le fait que les informations soient tirées au plus près du modèle vivant et chez l'homme a son importance. Comme détaillé dans divers aspects de la réponse immunitaire mis en œuvre lors de la leptospirose, les modèles d'étude ont un certain nombre de limitations qui ne permettent pas toujours d'extrapoler les résultats des hôtes non humains (cf. par exemple « modèles d'étude » page 47). Ceci tient en grande partie aux différences inhérentes aux systèmes immunitaires propres à chaque hôte et en particulier aux mécanismes de reconnaissance des PAMP par le système immunitaire inné. Cet élément a encore été illustré récemment par une étude sur les PNN chez les bovins où *Leptospira* semblent très adaptés à l'hôte et capables de persister de manière chronique sans entraîner de signe majeur d'infection (Wilson-Welder et al. 2016). Dans cette étude, l'évaluation des PNN *in vitro* en présence de *Leptospira* indiquait des réponses conservées mais moindres que celles induites par *E. coli* pour certaines grandes fonctions des PNN : formation de NET, production de ROS et capacité à tuer la bactérie. Les données que nous apportons ici sont certes limitées mais originales dans le contexte de l'infection humaine, fait important à souligner.

Quelques éléments observés lors de notre travail méritent d'être discutés :

-nos résultats confirment la forte augmentation des taux de PNN circulant constatée dans d'autres études (Craig et al. 2013; De Silva et al. 2014; Craig et al. 2009). Cette élévation est classique dans les infections bactériennes systémiques et fait appel à un processus de « granulopoïèse de secours ». Ce processus permet de mobiliser rapidement les PNN quiescents marginés dans le réseau vasculaire et ceux présents au sein de la moelle osseuse afin d'engager leurs fonctions antibactériennes (Manz et Boettcher 2014). Les mécanismes impliqués sont dépendant principalement du facteur de croissance granulocytaire G-CSF, libéré par différents types cellulaires en cas d'activation via des voies TLR4 dépendantes. A notre connaissance aucune étude n'a rapporté d'élévation du G-CSF en cas de leptospirose humaine et nous ne pouvons que faire l'hypothèse que le schéma classiquement décrit est reproduit pour ce pathogène dont la reconnaissance par le TLR4 est bien décrite (cf.

paragraphe 3.2-a, page 66). D'autres mécanismes sont possibles puisque différentes cytokines et voies de signalisation sont redondantes pour assurer cette polynucléose en contexte de danger (Manz et Boettcher 2014).

-les modifications des molécules étudiées pour le recrutement des PNN ne suivent pas le schéma attendu pour les infections à bacilles à Gram négatif (Sabroe et al. 2002; Chishti et al. 2004; Russwurm et al. 2002) ou à *Borrelia*, autre agent de la famille des spirochètes (M. Cinco et al. 2000). Au-delà de cette simple observation nous n'avons pas d'étude mécanistique pour comprendre les mécanismes de reconnaissance du pathogène mis en œuvre et éventuellement déficients chez l'être humain. Etant donné la littérature abondante sur les TLR et leur place prépondérante dans la reconnaissance de *Leptospira*, on peut formuler l'hypothèse que ces différences s'expliquent au moins en partie par la nature biochimique spéciale du LPS de *Leptospira*. Des études analysant spécifiquement ces marqueurs d'activation des PNN réalisés *in vitro* sur les PNN humains en présence de souches bactériennes seraient utiles pour conforter nos résultats. Les voies de signalisation engagées pourraient être évaluées par des expériences avec anticorps bloquant les TLR, et aussi l'emploi de PAMP majeurs de la bactérie tels le LPS et LipL32.

-les résultats de notre étude, sous réserve d'une exploration très partielle du processus de migration/recrutement, suggèrent que les PNN pourraient être insuffisamment recrutés au sein des tissus infectés. Cet élément indiquerait alors un nouvel argument pour étayer l'hypothèse d'une réponse immunitaire insuffisante chez l'être humain.

-Notre étude évalue les taux de TLR2 exprimés par les PNN circulants. A notre connaissance il s'agit de la première observation de ce type chez l'être humain tandis que les TLR ont été étudiés de manière étendue sur les modèles animaux, mais peu sur les PNN de ces animaux spécifiquement. Notre travail montre une élévation de ce TLR, considéré comme l'un des deux principaux TLR impliqués dans la reconnaissance du LPS de *Leptospira* chez l'humain avec TLR4 dans une moindre mesure. Le caractère observationnel de notre étude ne permet pas de préjuger des facteurs impliqués dans cette élévation.

-Bien que l'IL-8 sérique ait été étudiée dans plusieurs séries de patients, il s'agit de la première confrontant cette chimiokine et le taux de son principal récepteur, CD182. Dans

notre travail les valeurs de l'IL-8 étaient le plus souvent basses tandis que les taux de CD182 étaient identiques au contrôle.

Au-delà du processus de recrutement stricto sensu, quelques études ont montré que *Leptospira* et une protéine des leptospires Mce avaient la capacité de fixer les intégrines LFA-1 et CR3 (Marina Cinco et al. 2002; Cosate et al. 2016). Dans quel mesure cet attachement entre *Leptospira* et les intégrines portées par les PNN, et monocytes entre autres, confère un avantage à la bactérie en termes de dissémination n'est pas élucidé.

Bien sûr nos travaux nécessiteraient des études complémentaires afin de mieux étayer ces données et déterminer les mécanismes mis en jeu dans la relation entre *Leptospira* et neutrophiles chez l'être humain. De plus le processus de recrutement est un processus dynamique avec comme élément central l'interaction avec les cellules endothéliales, ce qui n'était pas exploré dans cette étude. Dans le travail présenté dans le 3^e article nous avons voulu explorer indirectement les cellules endothéliales lors de la leptospirose humaine.

3- Marqueurs d'adhésion solubles issus des cellules endothéliales

Notre travail ne portait pas uniquement sur les marqueurs solubles issus de cellules endothéliales puisque d'autres types cellulaires peuvent exprimer les molécules évaluées dans notre travail. Néanmoins le résultat principal porte sur ICAM-1 et E-sélectine, molécules spécifiques des cellules endothéliales et c'est donc à ce sujet que ma discussion sera orientée.

La principale limite de ce travail tient au fait que l'interprétation des taux des molécules solubles retrouvées dans la circulation sanguine est complexe et sujette à controverse. En effet le taux peut être élevé pour trois principales raisons : activation des cellules endothéliales puis clivage, clivage sans activation préalable, destruction cellulaire et relargage des formes membranaires dans le sang (Zonneveld et al. 2014). Notre protocole d'étude ne permet pas de

distinguer ces différentes possibilités. Néanmoins s'il s'agissait du dernier cas de figure, on pourrait s'attendre à ce que tous les marqueurs aient des niveaux plus élevés. Les processus ordonnés d'activation cellulaire avec expression nouvelle ou majorée des molécules d'adhésion puis processus de clivages de ces molécules exprimées en surface sont des processus actifs et indépendants. Le taux d'une molécule membranaire puis soluble semble intuitivement corrélé à l'état d'activation mais il n'existe pas toujours une relation directe entre taux exprimés en surface et taux des fractions solubles (Zonneveld et al. 2014).

Une autre limite concerne la source des récepteurs solubles puisque certains sont portés par divers types cellulaires. Il en est ainsi de sP-sélectine, sICAM-3 et sPECAM-1. Ceci vient complexifier l'interprétation des résultats car ne permet pas de tirer des conclusions quant à la source cellulaire de ces biomarqueurs. En ce qui concerne P-sélectine, elle est exprimée à la fois par les plaquettes et les cellules endothéliales. La baisse retrouvée de la formes soluble pourrait indiquer une baisse de la forme membranaire, et dans le cas de figure de la leptospirose, à une baisse consécutive à la chute du taux de plaquettes puisque la thrombopénie est fréquente et profonde. Néanmoins il ne s'agit que de supputations qui ne peuvent être étayées par notre schéma d'étude.

Concernant les résultats principaux, ils corroborent ceux des études antérieures qui exploraient un nombre plus limité de marqueurs solubles de ce type. Ainsi sE-sélectine et sICAM-1 apparaissent élevées dans plusieurs études sur la leptospirose, mais aussi dans de nombreuses études de sepsis et chocs septiques d'étiologies diverses comme listé dans une revue (Zonneveld et al. 2014).

Dans notre étude nous n'avons pas retrouvé de corrélation statistiquement significative entre les taux des récepteurs sous formes solubles et la sévérité de la maladie. Ceci contraste avec 2 études qui avaient retrouvé un tel lien lors de la leptospirose : soit avec la mortalité pour sE-sélectine (Goeijenbier et al. 2015), soit avec l'atteinte rénale pour sICAM-1 (Libório et al. 2015). Dans notre étude nous n'avons pas de lien entre le taux des molécules analysées et la sévérité globale ou encore les atteintes d'organe. Il faut préciser que les études ayant montré ces associations avaient été réalisées sur de plus grands effectifs. De plus la sévérité était parfois définie sur la mortalité, tandis que nous avons choisi un critère composite incluant les défaillances d'organe jugées graves. Par ailleurs, étant donné notre petit effectif, il

n'y avait qu'un seul décès. Cette définition différente rend plus complexe les comparaisons d'une étude à l'autre et renvoie à un problème récurrent dans l'étude de la leptospirose : la définition de la sévérité. A l'heure où l'OMS et le LERG ont entrepris d'améliorer la connaissance de la maladie et sa prise en charge il serait opportun d'obtenir un consensus international de la définition de la sévérité dans cette maladie.

De notre point de vue, les marqueurs étudiés dans notre étude ne sont pas de bons candidats comme marqueurs du pronostic. En effet le peu d'études issues de la leptospirose et les nombreuses études du sepsis en général sont en faveur d'une augmentation régulière de nombre de ces marqueurs mais pas suffisamment sensible et spécifique pour en faire des marqueurs pour le soin courant. Ils nous apparaissent plus comme des éléments utiles à l'amélioration de la compréhension de la maladie.

Des études complémentaires analysant d'autres marqueurs d'activation/mort cellulaire des cellules endothéliales seraient intéressantes pour avoir plus de documentation de l'activation de ces cellules lors de la leptospirose humaine. De même des compléments d'études *in vitro* de culture de cellules endothéliales en présence de *Leptospira* avec une analyse conjointe des marqueurs à la fois membranaires et solubles à différents temps d'incubation pourraient améliorer notre compréhension des phénomènes mis en œuvre. Les *Leptospira* disposant de diverses protéases il serait utile d'évaluer si elles ont un impact sur le processus de clivage membranaire, habituellement médié par des enzymes de l'hôte. En effet, le clivage des molécules membranaires induit l'apparition de molécules solubles qui ont une fonction de leurre car elles fixent les ligands des cellules immunitaires circulantes pour limiter leur recrutement. Il serait intéressant d'explorer l'hypothèse d'un autre mécanisme d'échappement de *Leptospira* : le clivage des récepteurs membranaires avec induction de molécules solubles antagonistes du phénomène de recrutement tissulaire.

II. Discussion : éléments de réflexion générale

1- Points forts:

Plusieurs points forts de mes travaux méritent d'être soulignés :

- Notre modèle d'étude avec l'évaluation *ex vivo* quantitative et qualitative (phénotype) des cellules immunitaires circulantes, permet d'obtenir des informations au plus près de la réalité de l'infection *in vivo* chez l'être humain.

- Les patients infectés de nos cohortes sont représentatifs de la maladie en ce qui concerne les présentations cliniques et complications de la maladie : type de symptômes, complications viscérales telles que les atteintes rénales et hépatiques. En effet les principales présentations retrouvées étaient la fièvre, les myalgies pour les symptômes initiaux et pour la phase d'état nous notions dans près de deux tiers des cas : une atteinte hépatique (cytolyse ou ictère), une insuffisance rénale avec élévation de la créatinine $> 150 \mu\text{mol/l}$ ou encore une thrombopénie $< 100 \text{ G/l}$. Les atteintes pulmonaires de type hémorragie alvéolaire étaient retrouvées dans 15 à 30% des cas sur les 3 cohortes différentes correspondant à chaque étude. Sur les 48 patients étudiés au total, 2 sont décédés, soit une mortalité de près de 4%. Ces chiffres de morbi-mortalité sont en accord avec ceux des grandes séries cliniques de la Réunion (Paganin et al. 2007; Pertuiset et al. 1988; Frédéric Pagès et al. 2014) et les données plus générales de par le monde (P. N. Levett 2001; Costa et al. 2015). De fait, la population d'étude apparaît comme représentative des cas de leptospirose de par le monde.

- De telles données sont rares et apportent des informations utiles. A notre connaissance peu d'études ont exploré le rôle des cellules immunitaires de cette façon lors de la leptospirose. On peut citer le travail ancien de Yamashiro-Kanashiro *et al.* dans les années 90 qui se limitait à distinguer les taux de LT CD4+ et CD8+, ainsi que l'étude plus récente de Lindow et al. où les auteurs cherchaient à confirmer sur 13 patients des résultats obtenus avec des analyses de génomique (Yamashiro-Kanashiro et al. 1991; Lindow et al. 2016).

- Pour chaque étude nous avons réalisé des recueils de données chez les patients afin de confronter les données immunologiques aux autres éléments de la maladie : présentation clinique, atteintes d'organe, sévérité, charge bactérienne. Cet aspect transversal permet de mettre en perspective les informations issues du système immunitaire inné avec divers aspects de la maladie.

2- Limites du modèle d'étude :

Bien sur nos résultats doivent être intégrés avec précaution au champ des données de la physiopathologie de l'infection, certaines limites étant associées à ces expériences :

-d'une manière globale pour chacune des cohortes décrites dans les trois articles, le nombre de sujets peut être considéré comme faible. Néanmoins ce petit nombre peut être suffisant pour mettre en évidence des différences significatives dans le cadre d'études exploratoires. Il en est ainsi des travaux de (Lindow et al. 2016) réalisés sur 16 patients avec une démarche scientifique complémentaire poursuivie sur d'autres patients et un modèle animal.

-le point de référence de nos cohortes était constitué de groupes contrôles sains. Ces sujets sains étaient sélectionnés pour être indemne de pathologie, et appariés pour l'âge et le sexe avec nos cas. Ce contrôle peut être considéré comme insuffisant et pas assez pertinent. Il serait aussi intéressant de développer des expériences avec un autre groupe contrôle constitué de sujets en phase bactériémique d'infections différentes de la leptospirose, et en particulier infections à bacilles à Gram négatif. Ce groupe de bactéries est en effet à la fois proche et différent de *Leptospira* en termes de constitution, donc de PAMP et de l'adressage de la réponse immunitaire.

-notre étude est observationnelle et se limite aux phénotypes et quantifications des acteurs cellulaires et moléculaires. Elle ne peut donc pas donner d'indications sur les fonctionnalités des cellules et molécules étudiées, ni les mécanismes régissant les interactions entre ces acteurs. A ce stade nous ne pouvons que faire des hypothèses basées sur les fonctions des éléments étudiés. Des études complémentaires réalisées éventuellement *in vitro* seraient utiles pour mieux décortiquer la mécanistique mise en jeu. On peut ainsi imaginer incuber des PNN en présence de *Leptospira* pathogènes ou non, et observer la modification des récepteurs de surface tels que ceux étudiés dans notre étude (CD15, CD11b, TLR2), en complétant par des analyses de neutralisation de TLR et autres PRR, et en analysant les fonctions des PNN.

- L'évaluation qui est faite est réalisée sur les cellules circulantes. Les processus d'activation et de recrutement sont des processus dynamiques, évolutifs. La « photographie » que nous prenons avec nos analyses *ex vivo* donne une information sur ce moment et ne présage pas des modifications à venir sur les paramètres explorées. Notamment nous ne

savons pas quel est le phénotype réel et la quantité de cellules (Ly Φ , PNN) recrutés au sein des tissus des patients.

-une autre limite de la cytométrie est la discordance entre le taux de marqueurs réellement exprimés *in vivo* et celui évalué expérimentalement. Des écarts sont possibles entre les deux pour diverses raisons : les anticorps utilisés en cytométrie sont de mauvaise qualité, la cible antigénique est modifiée et la liaison antigène testé/anticorps employé se fait à moindre affinité en cas d'épitope masqué ou altéré lors de l'infection, ou des conditions pré-analytiques (transport, méthode de marquage). De plus, l'étude des formes intracytoplasmiques de molécules étudiées serait utile pour mieux apprécier l'expression cellulaire globale de ces marqueurs. Afin de conforter nos résultats il serait intéressant de les confronter à une évaluation par une autre technique : synthèse de ces marqueurs évaluée d'après leur ARN messager (RT-PCR), expression cellulaire globale d'après la méthode semi-quantitative des taux de protéines en immuno-empreinte.

-Nos travaux ont été réalisés uniquement sur des cohortes de patients de la Réunion où les souches infectantes chez l'homme sont *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* selon la classification en génomo-espèces (Guernier et al. 2016). Les variations génomiques d'une espèce à l'autre peuvent modifier les facteurs de virulence, la composition des antigènes de surface majeurs (LPS, Omp) et donc potentiellement induire une réaction immunitaire différente selon la souche infectante. Il serait intéressant de pouvoir réaliser les travaux futurs sur à partir de patients infectés par d'autres souches, comme les patients de Mayotte pour qui *L. mayottensis* est la souche prédominante et génétiquement éloignée des souches réunionnaises.

-Pour tenter d'évaluer une association entre les marqueurs étudiés et la gravité de la maladie nous avons dû choisir une définition en l'absence de consensus international pour définir un cas de leptospirose grave. En effet si la mortalité semble un critère évident de gravité, beaucoup d'auteurs y associent les atteintes d'organe sévères ou le passage en service de réanimation. Néanmoins il n'y a pas de définition standardisée des atteintes d'organe graves ce qui amène beaucoup de questionnements, par exemple: quel taux de créatinine retenir? Quelles caractéristiques de l'atteinte pulmonaire : recours à l'oxygène, ou la ventilation ? Inclusion de la thrombopénie et alors avec quel seuil ? Notre définition de la sévérité ne pouvait faire appel uniquement à la mortalité puisque très faible (<5%) et nous nous sommes reposés sur les critères de différentes études sur le sujet, avec une définition qui s'est affinée au fur et à mesure des études mais restait globalement comparable. Cette

difficulté illustre la nécessité d'un consensus international sur une définition précise de la leptospirose grave. En effet à l'heure où l'OMS et le LERG veulent améliorer la prise en charge de cette maladie, disposer de telles définitions permettrait d'améliorer la qualité des études internationales et les possibilités de comparaison.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

Nos travaux permettent d'apporter des informations nouvelles sur la physiopathologie de l'infection chez l'être humain. Malgré certaines limites qui ne permettent pas d'avancer des conclusions définitives, nos travaux indiquent certaines données intéressantes sur divers acteurs de l'immunité innée impliqués dans les défenses antibactériennes comme montré en figure de synthèse (figure 15). Il en est ainsi de l'exploration des taux de lymphocytes $T\gamma\delta$ et des molécules d'activation/recrutement des neutrophiles circulants. Les lymphocytes $T\gamma\delta$ sont en faible nombre (partie 1 de la figure), et l'absence d'expansion de ce groupe de cellules au sein du compartiment vasculaire va à l'encontre d'une implication forte des $LT\gamma\delta$ pour cette maladie. Pour les neutrophiles nous avons mis en évidence un phénotype qui pourrait indiquer un défaut de recrutement dans les tissus infectés, et une faible activation (partie 2). Les résultats pour les molécules solubles montrent que les marqueurs élevés sont ceux des cellules endothéliales et confortent le postulat d'un rôle pivot de l'endothélium dans la maladie. Prises ensemble ces données laissent à penser que ces acteurs de l'immunité innée pourraient être insuffisamment engagés lors de la phase bactériémique de l'infection, tout au moins au sein du compartiment vasculaire, malgré une activation endothéliale adaptée.

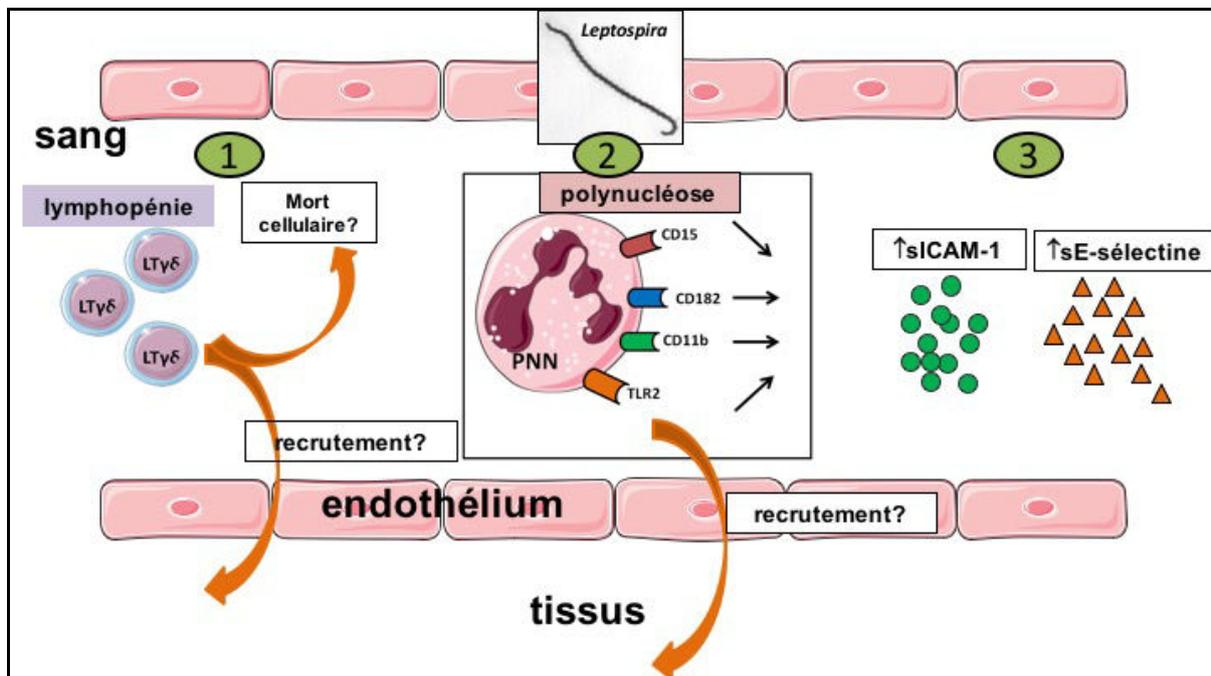


Figure 15: schéma de synthèse des résultats principaux de nos études

Ces résultats mériteraient d'être approfondis et complétés. A ce titre nous souhaitons poursuivre des études sur le même modèle d'analyse des phénotypes des cellules immunitaires circulantes en phase aiguë de la maladie et à distance. Nos prochaines études s'attacheront à déterminer l'état d'activation des monocytes, des cellules NK et des lymphocytes B dans la phase aiguë de la leptospirose. Nous avons une étude en cours sur la persistance à long terme des anticorps dirigés contre *Leptospira*, étude Sero7lepto. Cette étude permettra d'évaluer le maintien des anticorps spécifiques IgM et IgG à long terme. Compléter ces données par des analyses de phénotypages des LB sera intéressant.

Une autre perspective est d'étudier la place des signaux de danger de type alarmines (DAMP) qui peuvent être impliqués dans la leptospirose. En effet, il apparaît que différents « dégâts collatéraux » pourraient se produire lors de la dissémination bactérienne et la réponse immune inadaptée puisque les deux peuvent générer de la mort cellulaire, en particulier par apoptose. Les alarmines ont un rôle important pour signaler ces dommages collatéraux et induire une réponse immunitaire visant à rétablir l'homéostasie (Yanai et al. 2009). Afin de faire le lien avec des travaux antérieurs menés par des chercheurs de l'équipe, nous souhaiterions explorer des molécules telles que HMGB-1, ou encore les histones libérés par apoptose et nécrose cellulaire comme décrit dans le choc septique (Raffray et al. 2015). Ces aspects ont été très peu explorés en pathologie humaine alors qu'il y a beaucoup de travaux sur l'induction d'apoptose *in vitro* et sur modèles animaux.

Afin d'augmenter nos effectifs de patients un projet de cohorte multicentrique (4 centres hospitaliers de l'île) est en cours de constitution, en partenariat avec le CHU, l'UMR PIMIT et le CIC (centre d'investigation clinique) de la Réunion. Cette cohorte sera constituée de manière prospective avec les patients en phase aiguë de leptospirose, permettant un accès à des échantillons biologiques en plus grande quantité puisque multicentrique. De plus, un suivi à distance de l'infection est prévu ce qui assurera une réévaluation du statut immunitaire des patients à distance. Des groupes contrôles seront également constitués, incluant des patients infectés par des bactéries pyogènes classiques. Cette cohorte permettra donc de s'affranchir de 2 des limites que nous avons détaillées pour notre modèle d'étude.

Au-delà des patients atteints de leptospirose à la Réunion, nous souhaiterions pouvoir élargir la population d'étude à Mayotte. Comme discuté précédemment, Mayotte a une écologie particulière pour les leptospires avec une espèce spécifique qui est la principale responsable des cas humains : *L. mayottensis*. Nous ne disposons pas à ce jour d'étude

clinique pour définir si les manifestations cliniques de cette espèce sont similaires ou différentes de *L. interrogans*, principale espèce infectante dans le monde. Pouvoir comparer les manifestations cliniques mais aussi les éléments de la réponse immunitaire à cette espèce à ceux de *L. interrogans* serait un apport certain pour enrichir nos données.

En cas de données *ex vivo* intéressantes, les données nouvelles seraient complétées par des études *in vitro* sur les cellules concernées. Ces expériences *in vitro* consisteront en la réalisation d'incubation des cellules avec des souches de *Leptospira* issues d'isolats cliniques ou des PAMP (LPS, Lip132, Omp) afin d'obtenir des informations sur les mécanismes de reconnaissance du pathogène par ces acteurs de l'immunité. La mise en œuvre du modèle animal sur le hamster est en cours d'élaboration au sein du laboratoire PIMIT au sein de la plateforme du CYROI.

REFERENCES

- Abgueguen, Pierre, Valerie Delbos, Jerome Blanvillain, Jean Marie Chennebault, Jane Cottin, Serge Fanello, et Eric Pichard. 2008. « Clinical Aspects and Prognostic Factors of Leptospirosis in Adults. Retrospective Study in France ». *The Journal of Infection* 57 (3): 171-178. doi:10.1016/j.jinf.2008.06.010.
- Adler, B., S. Faine, H. K. Muller, et D. E. Green. 1980. « Maturation of Humoral Immune Response Determines the Susceptibility of Guinea-Pigs to Leptospirosis ». *Pathology* 12 (4): 529-538.
- Agampodi, Suneth B., Michael A. Matthias, Angelo C. Moreno, et Joseph M. Vinetz. 2012. « Utility of Quantitative Polymerase Chain Reaction in Leptospirosis Diagnosis: Association of Level of Leptospiremia and Clinical Manifestations in Sri Lanka ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 54 (9): 1249-1255. doi:10.1093/cid/cis035.
- Akira, Shizuo, et Kiyoshi Takeda. 2004. « Toll-like Receptor Signalling ». *Nature Reviews. Immunology* 4 (7): 499-511. doi:10.1038/nri1391.
- Alian, Shahriar, Hasan Asghari, Narges Najafi, Alireza Davoudi, et Jamshid Yazdani. 2014. « Corticosteroid in the Treatment of Moderate to Severe Thrombocytopenia due to Leptospirosis ». *Iranian Red Crescent Medical Journal* 16 (10): e16030. doi:10.5812/ircmj.16030.
- Alves, V A, L C Gayotto, T De Brito, R T Santos, A Wakamatsu, M R Vianna, et E E Sakata. 1992. « Leptospiral Antigens in the Liver of Experimentally Infected Guinea Pig and Their Relation to the Morphogenesis of Liver Damage ». *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Für Toxikologische Pathologie* 44 (7): 425-434. doi:10.1016/S0940-2993(11)80185-5.
- Andrade, Lúcia, Sérgio Cleto, et Antonio C. Seguro. 2007. « Door-to-Dialysis Time and Daily Hemodialysis in Patients with Leptospirosis: Impact on Mortality ». *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN* 2 (4): 739-744. doi:10.2215/CJN.00680207.
- ANSM. 2017. « Spirolept. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). » Consulté le février 9. <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/frames.php?specid=64175998&typedoc=N&ref=N0190416.htm>.
- Araújo, Alan M., Eliana A. G. Reis, Daniel A. Athanzio, Guilherme S. Ribeiro, José E. Hagan, Guilherme C. Araujo, Alcineia O. Damião, et al. 2014. « Oxidative Stress Markers Correlate with Renal Dysfunction and Thrombocytopenia in Severe Leptospirosis ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 90 (4): 719-723. doi:10.4269/ajtmh.13-0667.
- Arean, V. M. 1962. « The Pathologic Anatomy and Pathogenesis of Fatal Human Leptospirosis (Weil's Disease) ». *The American Journal of Pathology* 40 (avril): 393-423.
- Atzingen, Marina V., Ricardo M. Gómez, Mirta Schattner, Gabriela Pretre, Amane P. Gonçalves, Zenaide M. de Moraes, Silvio A. Vasconcellos, et Ana L. T. O. Nascimento. 2009. « Lp95, a Novel Leptospiral Protein That Binds Extracellular Matrix Components and Activates E-Selectin on Endothelial Cells ». *The Journal of Infection* 59 (4): 264-276. doi:10.1016/j.jinf.2009.07.010.

- Azevedo, Ana Flávia C., Demócrito de B. Miranda-Filho, Gustavo T. Henriques-Filho, Alfredo Leite, et Ricardo A. A. Ximenes. 2011. « Randomized Controlled Trial of Pulse Methyl Prednisolone × Placebo in Treatment of Pulmonary Involvement Associated with Severe Leptospirosis. [ISRCTN74625030] ». *BMC Infectious Diseases* 11: 186. doi:10.1186/1471-2334-11-186.
- Ballard, S. A., M. Williamson, B. Adler, T. Vinh, et S. Faine. 1986. « Interactions of Virulent and Avirulent Leptospire with Primary Cultures of Renal Epithelial Cells ». *Journal of Medical Microbiology* 21 (1): 59-67. doi:10.1099/00222615-21-1-59.
- Balleydier, E, E D'Ortenzio, et P Renault. 2008. « Épidémiologie du chikungunya à la Réunion – Bilan d'une année de surveillance – 19 avril 2007 – 18 avril 2008 ». InVS : Institut de Veille Sanitaire. www.invs.sante.fr.
- Banchereau, Jacques, Sophie Paczesny, Patrick Blanco, Lynda Bennett, Virginia Pascual, Joseph Fay, et A Karolina Palucka. 2003. « Dendritic Cells: Controllers of the Immune System and a New Promise for Immunotherapy ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 987 (avril): 180-187.
- Barocchi, Michele A., Albert I. Ko, Mitermayer Galvão Reis, Kent L. McDonald, et Lee W. Riley. 2002. « Rapid Translocation of Polarized MDCK Cell Monolayers by Leptospira Interrogans, an Invasive but Nonintracellular Pathogen ». *Infection and Immunity* 70 (12): 6926-6932.
- Barry, Michele, Adam V. Wisnewski, Michael A. Matthias, Sharon K. Inouye, et Joseph M. Vinetz. 2006. « Suburban Leptospirosis: Atypical Lymphocytosis and Gamma-Delta T Cell Response ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 43 (10): 1304-1307. doi:10.1086/508537.
- Bharti, Ajay R, Jarlath E Nally, Jessica N Ricaldi, Michael A Matthias, Monica M Diaz, Michael A Lovett, Paul N Levett, et al. 2003. « Leptospirosis: A Zoonotic Disease of Global Importance ». *The Lancet Infectious Diseases* 3 (12): 757-771.
- Blumerman, Seth L., Carolyn T. A. Herzig, Fei Wang, Paul M. Coussens, et Cynthia L. Baldwin. 2007. « Comparison of Gene Expression by Co-Cultured WC1+ Gammadelta and CD4+ Alphabeta T Cells Exhibiting a Recall Response to Bacterial Antigen ». *Molecular Immunology* 44 (8): 2023-2035. doi:10.1016/j.molimm.2006.09.020.
- Bourhy, P., L. Collet, T. Lernout, F. Zinini, R. A. Hartskeerl, Hans van der Linden, J. M. Thiberge, et al. 2012. « Human Leptospira Isolates Circulating in Mayotte (Indian Ocean) Have Unique Serological and Molecular Features ». *Journal of Clinical Microbiology* 50 (2): 307-311. doi:10.1128/JCM.05931-11.
- Bourhy, Pascale, Louis Collet, Sylvain Brisse, et Mathieu 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): 4061-4067. doi:10.1099/ijs.0.066597-0.
- Brett-Major, David M., et Rodney Coldren. 2012. « Antibiotics for Leptospirosis ». *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2: CD008264. doi:10.1002/14651858.CD008264.pub2.
- Brinkmann, Volker, Ulrike Reichard, Christian Goosmann, Beatrix Fauler, Yvonne Uhlemann, David S Weiss, Yvette Weinrauch, et Arturo Zychlinsky. 2004. « Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria ». *Science (New York, N.Y.)* 303 (5663): 1532-1535. doi:10.1126/science.1092385.
- Brown, Rachel A., Seth Blumerman, Cyril Gay, Carole Bolin, Robert Duby, et Cynthia L. Baldwin. 2003. « Comparison of Three Different Leptospiral Vaccines for Induction

- of a Type 1 Immune Response to *Leptospira Borgpetersenii* Serovar Hardjo ». *Vaccine* 21 (27-30): 4448-4458.
- Bulach, Dieter M., Richard L. Zuerner, Peter Wilson, Torsten Seemann, Annette McGrath, Paul A. Cullen, John Davis, et al. 2006. « Genome Reduction in *Leptospira Borgpetersenii* Reflects Limited Transmission Potential ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (39): 14560-14565. doi:10.1073/pnas.0603979103.
- Cameron, Caroline E. 2015. « Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 387: 21-41. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_3.
- Castiblanco-Valencia, Mónica Marcela, Tatiana Rodrigues Fraga, Ana Helena Pagotto, Solange Maria de Toledo Serrano, Patricia Antonia Estima Abreu, Angela Silva Barbosa, et Lourdes Isaac. 2016. « Plasmin Cleaves Fibrinogen and the Human Complement Proteins C3b and C5 in the Presence of *Leptospira Interrogans* Proteins: A New Role of LigA and LigB in Invasion and Complement Immune Evasion ». *Immunobiology* 221 (5): 679-689. doi:10.1016/j.imbio.2016.01.001.
- Cédola, Maia, Yosena Chiani, Gabriela Pretre, Lucrecia Alberdi, Bibiana Vanasco, et Ricardo M. Gómez. 2015. « Association of Toll-like Receptor 2 Arg753Gln and Toll-like Receptor 1 Ile602Ser Single-Nucleotide Polymorphisms with Leptospirosis in an Argentine Population ». *Acta Tropica* 146 (juin): 73-80. doi:10.1016/j.actatropica.2015.03.007.
- Challa, Sreerupa, Jarlath E. Nally, Carroll Jones, et Abhineet S. Sheoran. 2011. « Passive Immunization with *Leptospira* LPS-Specific Agglutinating but Not Non-Agglutinating Monoclonal Antibodies Protect Guinea Pigs from Fatal Pulmonary Hemorrhages Induced by Serovar Copenhageni Challenge ». *Vaccine* 29 (27): 4431-4434. doi:10.1016/j.vaccine.2011.04.041.
- Chassin, Cécilia, Mathieu Picardeau, Jean-Michel Goujon, Pascale Bourhy, Nathalie Quellard, Sylvie Darche, Edgar Badell, et al. 2009. « TLR4- and TLR2-Mediated B Cell Responses Control the Clearance of the Bacterial Pathogen, *Leptospira Interrogans* ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183 (4): 2669-2677. doi:10.4049/jimmunol.0900506.
- Chierakul, Wirongrong, Maaike de Fost, Yupin Suputtamongkol, Roongreung Limpai boon, Arjen Dondorp, Nicholas J. White, et Tom van der Poll. 2004. « Differential Expression of Interferon-Gamma and Interferon-Gamma-Inducing Cytokines in Thai Patients with Scrub Typhus or Leptospirosis ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 113 (2): 140-144. doi:10.1016/j.clim.2004.08.006.
- Chierakul, Wirongrong, Panatsaya Tientadakul, Yupin Suputtamongkol, Vanaporn Wuthiekanun, Kriangsak Phimda, Roongreung Limpai boon, Nisarath Opartkiattikul, Nicholas J. White, Sharon J. Peacock, et Nicholas P. Day. 2008. « Activation of the Coagulation Cascade in Patients with Leptospirosis ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 (2): 254-260. doi:10.1086/524664.
- Chirathaworn, C., Y. Suputtamongkol, S. Lertmaharit, et Y. Poovorawan. 2016. « Cytokine Levels as Biomarkers for Leptospirosis Patients ». *Cytokine* 85 (juin): 80-82. doi:10.1016/j.cyto.2016.06.007.
- Chishti, Ahmad D., Brian K. Shenton, John A. Kirby, et Simon V. Baudouin. 2004. « Neutrophil Chemotaxis and Receptor Expression in Clinical Septic Shock ». *Intensive Care Medicine* 30 (4): 605-611. doi:10.1007/s00134-004-2175-y.

- Choy, Henry A., Melissa M. Kelley, Tammy L. Chen, Annette K. Møller, James Matsunaga, et David A. Haake. 2007. « Physiological Osmotic Induction of *Leptospira Interrogans* Adhesion: LigA and LigB Bind Extracellular Matrix Proteins and Fibrinogen ». *Infection and Immunity* 75 (5): 2441-2450. doi:10.1128/IAI.01635-06.
- Cinco, M., E. Panfili, G. Presani, et S. Perticarari. 2000. « Interaction with *Borrelia burgdorferi* Causes Increased Expression of the CR3 Integrin and Increased Binding Affinity to Fibronectin via CR3 ». *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2 (4): 575-579.
- Cinco, M., S. Perticarari, G. Presani, A. Dobrina, et F. Liut. 1993. « Biological Activity of a Peptidoglycan Extracted from *Leptospira Interrogans*: In Vitro Studies ». *Journal of General Microbiology* 139 (12): 2959-2964. doi:10.1099/00221287-139-12-2959.
- Cinco, M., E. Vecile, R. Murgia, P. Dobrina, et A. Dobrina. 1996. « *Leptospira Interrogans* and *Leptospira* Peptidoglycans Induce the Release of Tumor Necrosis Factor Alpha from Human Monocytes ». *FEMS Microbiology Letters* 138 (2-3): 211-214.
- Cinco, Marina, Barbara Cini, Sra Perticarari, et Gianni Presani. 2002. « *Leptospira Interrogans* Binds to the CR3 Receptor on Mammalian Cells ». *Microbial Pathogenesis* 33 (6): 299-305.
- CIRE Océan Indien. 2016a. « Surveillance de la leptospirose à La Réunion. Point épidémiologique au 11 février 2016. www.ars.ocean-indien.sante.fr/.../leptospirose/12_2016_PE_lepto_Reunion.pdf ».
- CIRE Océan Indien. 2016b. « Situation épidémiologique de la dengue à La Réunion. Point épidémiologique N° 78 du 07 octobre 2016. https://www.ocean-indien.ars.sante.fr/sites/default/files/2016-12/78_2016_PE_dengue_Reunion_0.pdf ».
- Clement, J., M. Van Esbroeck, K. Lagrou, J. Verschuere, N. P. Sunil-Chandra, et M. Van Ranst. 2014. « Leptospirosis versus Hantavirus Infections in the Netherlands and in Belgium, 2000 to 2014 ». *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 19 (38).
- CNR de la Leptospirose. 2014. « Rapport d'activité du CNR de la leptospirose. <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/leptospirose/rapports-d-activite> ». <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/leptospirose/rapports-d-activite>.
- Corin, R. E., et C. D. Cox. 1980. « Characterization of *Leptospiral* Catalase and Peroxidase ». *Canadian Journal of Microbiology* 26 (2): 121-129.
- Cosate, Maria Raquel, Gabriela Hase Siqueira, Gisele Oliveira de Souza, Silvio Arruda Vasconcellos, et Ana Lucia T. O. Nascimento. 2016. « Mammalian Cell Entry (Mce) Protein of *Leptospira Interrogans* Binds Extracellular Matrix Components, Plasminogen and β 2 Integrin ». *Microbiology and Immunology* 60 (9): 586-598. doi:10.1111/1348-0421.12406.
- Costa, Federico, José E. Hagan, Juan Calcagno, Michael Kane, Paul Torgerson, Martha S. Martinez-Silveira, Claudia Stein, Bernadette Abela-Ridder, et Albert I. Ko. 2015. « Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (9): e0003898. doi:10.1371/journal.pntd.0003898.
- Craig, S. B., T. A. Collet, S. J. Wynwood, L. D. Smythe, S. L. Weier, et D. B. McKay. 2013. « Neutrophil Counts in Leptospirosis Patients Infected with Different Serovars ». *Tropical Biomedicine* 30 (4): 579-583.
- Craig, S. B., G. C. Graham, M.-A. Burns, M. F. Dohnt, L. D. Smythe, et D. B. McKay. 2009. « Haematological and Clinical-Chemistry Markers in Patients Presenting with Leptospirosis: A Comparison of the Findings from Uncomplicated Cases with Those

- Seen in the Severe Disease ». *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 103 (4): 333-341. doi:10.1179/136485909X435058.
- Crispe, Ian Nicholas. 2009. « The Liver as a Lymphoid Organ ». *Annual Review of Immunology* 27 (1): 147-163. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132629.
- Croda, J., A. N. D. Neto, R. A. Brasil, C. Pagliari, A. C. Nicodemo, et M. I. S. Duarte. 2010. « Leptospirosis Pulmonary Haemorrhage Syndrome Is Associated with Linear Deposition of Immunoglobulin and Complement on the Alveolar Surface ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16 (6): 593-599. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02916.x.
- CSHP. 2004. « Rapport du groupe de travail du Conseil supérieur d'hygiène publique de France : nouvelles recommandations relatives à la prévention du risque chez les personnes exposées à la leptospirose ». <http://www.hcsp.fr>.
- CSHP. 2005a. « Rapport du groupe de travail du Conseil supérieur d'hygiène publique de France : recommandations pour la prévention de la leptospirose en cas d'activité professionnelle à risque ». <http://www.hcsp.fr>.
- CSHP. 2005b. « Rapport du groupe de travail du Conseil supérieur d'hygiène publique de France : recommandations pour la prévention de la leptospirose en population générale ». <http://www.hcsp.fr>.
- Cumberland, P., C. O. Everard, J. G. Wheeler, et P. N. Levett. 2001. « Persistence of Anti-Leptospiral IgM, IgG and Agglutinating Antibodies in Patients Presenting with Acute Febrile Illness in Barbados 1979-1989 ». *European Journal of Epidemiology* 17 (7): 601-608.
- da Silva, Josefa B., Enéas Carvalho, Ambart E. Covarrubias, Ana Tung C. Ching, Vania G. M. Mattaraia, Delhi Paiva, Marcelo de Franco, et al. 2012. « Induction of TNF- α and CXCL-2 mRNAs in Different Organs of Mice Infected with Pathogenic *Leptospira* ». *Microbial Pathogenesis* 52 (4): 206-216. doi:10.1016/j.micpath.2012.01.002.
- da Silva, Josefa B., Tatiane M. V. Ramos, Marcelo de Franco, Delhi Paiva, Paulo Lee Ho, Elizabeth A. L. Martins, et Martha M. Pereira. 2009. « Chemokines Expression during *Leptospira Interrogans* Serovar Copenhageni Infection in Resistant BALB/C and Susceptible C3H/HeJ Mice ». *Microbial Pathogenesis* 47 (2): 87-93. doi:10.1016/j.micpath.2009.05.002.
- Daher, Elizabeth F., Geraldo B. Silva, Charles O. Silveira, Felipe S. Falcão, Marília P. Alves, Jório A. A. A. Mota, Joyce B. Lima, et al. 2014. « Factors Associated with Thrombocytopenia in Severe Leptospirosis (Weil's Disease) ». *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* 69 (2): 106-110. doi:10.6061/clinics/2014(02)06.
- Dassanayake, Dinesh L. B., Harith Wimalaratna, Damith Nandadewa, Asanka Nugaliyadda, Champa N. Ratnatunga, et Suneth B. Agampodi. 2012. « Predictors of the Development of Myocarditis or Acute Renal Failure in Patients with Leptospirosis: An Observational Study ». *BMC Infectious Diseases* 12: 4. doi:10.1186/1471-2334-12-4.
- De Brito, T., L. F. Menezes, Dirce M. C. Lima, Silvia Lourenço, Ana Maria 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): 576-583. doi:10.1007/s00428-006-0163-z.
- De Fost, M., W. Chierakul, R. Limpaboon, A. Dondorp, N. J. White, et T. van Der Poll. 2007. « Release of Granzymes and Chemokines in Thai Patients with Leptospirosis ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society*

- of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 13 (4): 433-436. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01640.x.
- de Fost, Maaïke, Rudy A. Hartskeerl, Martijn R. Groenendijk, et Tom van der Poll. 2003. « Interleukin 12 in Part Regulates Gamma Interferon Release in Human Whole Blood Stimulated with *Leptospira Interrogans* ». *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10 (2): 332-335.
- De Silva, Nipun Lakshitha, Mjr Niloofa, Narmada Fernando, Lilani Karunanayake, Chaturaka Rodrigo, H. Janaka De Silva, Sunil Premawansa, Shiroma M. Handunnetti, et Senaka Rajapakse. 2014. « Changes in Full Blood Count Parameters in Leptospirosis: A Prospective Study ». *International Archives of Medicine* 7: 31. doi:10.1186/1755-7682-7-31.
- Deban, Livija, Remo Castro Russo, Marina Sironi, Federica Moalli, Margherita Scanziani, Vanessa Zambelli, Ivan Cuccovillo, et al. 2010. « Regulation of Leukocyte Recruitment by the Long Pentraxin PTX3 ». *Nature Immunology* 11 (4): 328-334. doi:10.1038/ni.1854.
- Del Carlo Bernardi, Fabiola, Bruno Ctenas, Luiz Fernando Ferraz da Silva, Antonio Carlos Nicodemo, Paulo Hilário Nascimento Saldiva, Marisa Dolhnikoff, et Thais Mauad. 2012. « Immune Receptors and Adhesion Molecules in Human Pulmonary Leptospirosis ». *Human Pathology* 43 (10): 1601-1610. doi:10.1016/j.humpath.2011.11.017.
- Desvars, A., F. Naze, A. Benneveau, E. Cardinale, et A. Michault. 2013. « Endemicity of Leptospirosis in Domestic and Wild Animal Species from Reunion Island (Indian Ocean) ». *Epidemiology and Infection* 141 (6): 1154-1165. doi:10.1017/S0950268812002075.
- Desvars, Amélie, Jimmy Gigan, Géraldine Hoarau, Patrick Gérardin, François Favier, et Alain Michault. 2011. « Short Report: Seroprevalence of Human Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) Assessed by Microscopic Agglutination Test on Paper Disc-Absorbed Whole Blood ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85 (6): 1097-1099. doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0470.
- Desvars, Amélie, Sylvaine Jégo, Frédéric Chiroleu, Pascale Bourhy, Eric Cardinale, et Alain Michault. 2011. « Seasonality of Human Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) and Its Association with Meteorological Data ». *PloS One* 6 (5): e20377. doi:10.1371/journal.pone.0020377.
- Desvars, Amélie, Alain Michault, et Pascale Bourhy. 2013. « Leptospirosis in the Western Indian Ocean Islands: What Is Known so Far? » *Veterinary Research* 44 (septembre): 80. doi:10.1186/1297-9716-44-80.
- Desvars, Amélie, Florence Naze, Gwenaél Vourc'h, Eric Cardinale, Mathieu Picardeau, Alain Michault, et Pascale Bourhy. 2012. « Similarities in *Leptospira* Serogroup and Species Distribution in Animals and Humans in the Indian Ocean Island of Mayotte ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87 (1): 134-140. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0102.
- Diament, Decio, Milena Karina Colo Brunialti, Eliete Calo Romero, Esper Georges Kallas, et Reinaldo Salomao. 2002. « Peripheral Blood Mononuclear Cell Activation Induced by *Leptospira Interrogans* Glycolipoprotein ». *Infection and Immunity* 70 (4): 1677-1683.
- Dietrich, Muriel, David A. Wilkinson, Voahangy Soarimalala, Steven M. Goodman, Koussay Dellagi, et Pablo Tortosa. 2014. « Diversification of an Emerging Pathogen in a Biodiversity Hotspot: *Leptospira* in Endemic Small Mammals of Madagascar ». *Molecular Ecology* 23 (11): 2783-2796. doi:10.1111/mec.12777.

- Dobrina, A., E. Nardon, E. Vecile, M. Cinco, et P. Patriarca. 1995. « Leptospira Icterohemorrhagiae and Leptospire Peptidoglycans Induce Endothelial Cell Adhesiveness for Polymorphonuclear Leukocytes ». *Infection and Immunity* 63 (8): 2995-2999.
- Dolhnikoff, Marisa, Thais Mauad, Eduardo P. Bethlem, et Carlos Roberto Ribeiro Carvalho. 2007. « Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis ». *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 11 (1): 142-148. doi:10.1590/S1413-86702007000100029.
- Dorigatti, F., M. K. C. Brunialti, E. C. Romero, E. G. Kallas, et R. Salomão. 2005. « Leptospira Interrogans Activation of Peripheral Blood Monocyte Glycolipoprotein Demonstrated in Whole Blood by the Release of IL-6 ». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas* 38 (6): 909-914. doi:/S0100-879X2005000600013.
- Dupont, H., D. Dupont-Perdrizet, J. L. Perie, S. Zehner-Hansen, B. Jarrige, et J. B. Daijardin. 1997. « Leptospirosis: Prognostic Factors Associated with Mortality ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 25 (3): 720-724.
- Edwards, C. N., G. D. Nicholson, T. A. Hassell, C. O. Everard, et J. Callender. 1986. « Thrombocytopenia in Leptospirosis: The Absence of Evidence for Disseminated Intravascular Coagulation ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35 (2): 352-354.
- Edwards, C. N., G. D. Nicholson, T. A. Hassell, C. O. Everard, et J. Callender. 1988. « Penicillin Therapy in Icteric Leptospirosis ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 39 (4): 388-390.
- El-Benna, Jamel, Pham My-Chan Dang, et Axel Périanin. 2012. « Towards Specific NADPH Oxidase Inhibition by Small Synthetic Peptides ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69 (14): 2307-2314. doi:10.1007/s00018-012-1008-3.
- Eshghi, Azad, Kristel Lourdault, Gerald L. Murray, Thanatchaporn Bartpho, Rasana W. Sermswan, Mathieu Picardeau, Ben Adler, Brendan Snarr, Richard L. Zuerner, et Caroline E. Cameron. 2012. « Leptospira Interrogans Catalase Is Required for Resistance to H₂O₂ and for Virulence ». *Infection and Immunity* 80 (11): 3892-3899. doi:10.1128/IAI.00466-12.
- Estavoyer, J. M., E. Racadot, G. Couetdic, J. Leroy, et L. Groperrin. 1991. « Tumor Necrosis Factor in Patients with Leptospirosis ». *Reviews of Infectious Diseases* 13 (6): 1245-1246.
- Evangelista, Karen, Ricardo Franco, Andrew Schwab, et Jenifer Coburn. 2014. « Leptospira Interrogans Binds to Cadherins ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (1): e2672. doi:10.1371/journal.pntd.0002672.
- Everard, C. O., et S. Bennett. 1990. « Persistence of Leptospiral Agglutinins in Trinidadian Survey Subjects ». *European Journal of Epidemiology* 6 (1): 40-44.
- Fang, Ferric C. 2004. « Antimicrobial Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Concepts and Controversies ». *Nature Reviews. Microbiology* 2 (10): 820-832. doi:10.1038/nrmicro1004.
- Fanton d'Andon, Martine, Nathalie Quellard, Béatrice Fernandez, Gwenn Ratet, Sonia Lacroix-Lamandé, Alain Vandewalle, Ivo G. Boneca, Jean-Michel Goujon, et Catherine Werts. 2014a. « Leptospira Interrogans Induces Fibrosis in the Mouse Kidney through Inos-Dependent, TLR- and NLR-Independent Signaling Pathways ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (1): e2664. doi:10.1371/journal.pntd.0002664.

- Fanton d'Andon, Martine, Nathalie Quellard, Béatrice Fernandez, Gwenn Ratet, Sonia Lacroix-Lamandé, Alain Vandewalle, Ivo G. Boneca, Jean-Michel Goujon, et Catherine Werts. 2014b. « Leptospira Interrogans Induces Fibrosis in the Mouse Kidney through Inos-Dependent, TLR- and NLR-Independent Signaling Pathways ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (1): e2664. doi:10.1371/journal.pntd.0002664.
- Fialho, Raquel Nunes, Luís Martins, João Paulo Pinheiro, Bruno Filipe Bettencourt, Ana Rita Couto, Margarida Rodrigues Santos, Maria José Peixoto, et al. 2009. « Role of Human Leukocyte Antigen, Killer-Cell Immunoglobulin-like Receptors, and Cytokine Gene Polymorphisms in Leptospirosis ». *Human Immunology* 70 (11): 915-920. doi:10.1016/j.humimm.2009.08.007.
- Figueira, Cláudio Pereira, Julio Croda, Henry A. Choy, David A. Haake, Mitermayer G. Reis, Albert I. Ko, et Mathieu Picardeau. 2011. « Heterologous Expression of Pathogen-Specific Genes ligA and ligB in the Saprophyte Leptospira Biflexa Confers Enhanced Adhesion to Cultured Cells and Fibronectin ». *BMC Microbiology* 11: 129. doi:10.1186/1471-2180-11-129.
- Fouts, Derrick E., Michael A. Matthias, Haritha Adhikarla, Ben Adler, Luciane Amorim-Santos, Douglas E. Berg, Dieter Bulach, et al. 2016. « What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus Leptospira ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (2): e0004403. doi:10.1371/journal.pntd.0004403.
- Fraga, Tatiana Rodrigues, Lourdes Isaac, et Angela Silva Barbosa. 2016. « Complement Evasion by Pathogenic Leptospira ». *Frontiers in Immunology* 7: 623. doi:10.3389/fimmu.2016.00623.
- Ganoza, Christian A., Michael A. Matthias, Mayuko Saito, Manuel Cespedes, Eduardo Gotuzzo, et Joseph M. Vinetz. 2010. « Asymptomatic Renal Colonization of Humans in the Peruvian Amazon by Leptospira ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (2): e612. doi:10.1371/journal.pntd.0000612.
- Gasque, Philippe. 2004. « Complement: A Unique Innate Immune Sensor for Danger Signals ». *Molecular Immunology* 41 (11): 1089-1098. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.011.
- Gaudart, Narintorn, Pattama Ekpo, Kovit Pattanapanyasat, Yvette van Kooyk, et Anneke Engering. 2008. « Leptospira Interrogans Is Recognized through DC-SIGN and Induces Maturation and Cytokine Production by Human Dendritic Cells ». *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 53 (3): 359-367. doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00437.x.
- Gérardin, Patrick, Vanina Guernier, Joëlle Perrau, Adrian Fianu, Karin Le Roux, Philippe Grivard, Alain Michault, Xavier de Lamballerie, Antoine Flahault, et François Favier. 2008. « Estimating Chikungunya Prevalence in La Réunion Island Outbreak by Serosurveys: Two Methods for Two Critical Times of the Epidemic ». *BMC Infectious Diseases* 8 (juillet): 99. doi:10.1186/1471-2334-8-99.
- Godfrey, Dale I., Adam P. Uldrich, James McCluskey, Jamie Rossjohn, et D. Branch Moody. 2015. « The Burgeoning Family of Unconventional T Cells ». *Nature Immunology* 16 (11): 1114-1123. doi:10.1038/ni.3298.
- Goeijenbier, Marco, M. Hussein Gasem, Joost C. M. Meijers, Rudy A. Hartskeerl, Ahmed Ahmed, Marga G. A. Goris, Bambang Isbandrio, et al. 2015. « Markers of Endothelial Cell Activation and Immune Activation Are Increased in Patients with Severe Leptospirosis and Associated with Disease Severity ». *The Journal of Infection* 71 (4): 437-446. doi:10.1016/j.jinf.2015.05.016.
- Gomard, Yann, Rahamatou Silai, Géraldine Hoarau, Ketty Bon, Florelle Gonneau, Amina Yssouf, Alain Michault, Koussay Dellagi, et Pablo Tortosa. 2014. « Serologic

- Evidence of Leptospirosis in Humans, Union of the Comoros, 2011 ». *Emerging Infectious Diseases* 20 (4): 720-722. doi:10.3201/eid2004.131207.
- Gomes-Solecki, Maria, Ignacio Santecchia, et Catherine Werts. 2017. « Animal Models of Leptospirosis: Of Mice and Hamsters ». *Frontiers in Immunology* 8: 58. doi:10.3389/fimmu.2017.00058.
- Gómez, Ricardo M., Monica L. Vieira, Mirta Schattner, Elisa Malaver, Monica M. Watanabe, Angela S. Barbosa, Patricia A. E. Abreu, et al. 2008. « Putative Outer Membrane Proteins of *Leptospira interrogans* Stimulate Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECS) and Express during Infection ». *Microbial Pathogenesis* 45 (5-6): 315-322. doi:10.1016/j.micpath.2008.08.004.
- Gordon, Siamon, Annette Plüddemann, et Fernando Martinez Estrada. 2014. « Macrophage Heterogeneity in Tissues: Phenotypic Diversity and Functions ». *Immunological Reviews* 262 (1): 36-55. doi:10.1111/imr.12223.
- Goris, Marga G. A., Mariska M. G. Leeftang, Martin Loden, Jiri F. P. Wagenaar, Paul R. Klatser, Rudy A. Hartskeerl, et Kimberly R. Boer. 2013. « Prospective Evaluation of Three Rapid Diagnostic Tests for Diagnosis of Human Leptospirosis ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (7): e2290. doi:10.1371/journal.pntd.0002290.
- Goris, Marga G A, Jiri F P Wagenaar, Rudy A Hartskeerl, Eric C M van Gorp, Simone Schuller, Avril M Monahan, Jarlath E Nally, Tom van der Poll, et Cornelis van 't Veer. 2011. « Potent Innate Immune Response to Pathogenic *Leptospira* in Human Whole Blood ». *PloS One* 6 (3): e18279. doi:10.1371/journal.pone.0018279.
- Guernier, Vanina, Erwan Lagadec, Colette Cordonin, Gildas Le Minter, Yann Gomard, Frédéric Pagès, Marie-Christine Jaffar-Bandjee, Alain Michault, Pablo Tortosa, et Koussay Dellagi. 2016. « Human Leptospirosis on Reunion Island, Indian Ocean: Are Rodents the (Only) Ones to Blame? ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (6): e0004733. doi:10.1371/journal.pntd.0004733.
- Guerra-Silveira, Felipe, et Fernando Abad-Franch. 2013. « Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes ». *PloS One* 8 (4): e62390. doi:10.1371/journal.pone.0062390.
- Guerreiro, H., J. Croda, B. Flannery, M. Mazel, J. Matsunaga, M. Galvão Reis, P. N. Levett, A. I. Ko, et D. A. Haake. 2001. « Leptospiral Proteins Recognized during the Humoral Immune Response to Leptospirosis in Humans ». *Infection and Immunity* 69 (8): 4958-4968. doi:10.1128/IAI.69.8.4958-4968.2001.
- Guerrier, Gilles, Patrick Lefèvre, Chantal Chouvin, et Eric D'Ortenzio. 2017. « Jarisch-Herxheimer Reaction Among Patients with Leptospirosis: Incidence and Risk Factors ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, janvier. doi:10.4269/ajtmh.16-0457.
- Guo, Ying-Jun, Kai-Yu Wang, et Shu-Han Sun. 2010. « Identification of an HLA-A*0201-Restricted CD8(+) T-Cell Epitope Encoded within Leptospiral Immunoglobulin-like Protein A ». *Microbes and Infection* 12 (5): 364-373. doi:10.1016/j.micinf.2010.01.010.
- Haake, David A. 2006. « Hamster Model of Leptospirosis ». *Current Protocols in Microbiology* Chapter 12 (septembre): Unit 12E.2. doi:10.1002/9780471729259.mc12e02s02.
- Haake, David A., et Paul N. Levett. 2015. « Leptospirosis in Humans ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 387: 65-97. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_5.
- Haake, David A., et Wolfram R. Zückert. 2015. « The Leptospiral Outer Membrane ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 387: 187-221. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_8.

- Harris, Claire L., Meike Heurich, Santiago Rodriguez de Cordoba, et B. Paul Morgan. 2012. « The Complotype: Dictating Risk for Inflammation and Infection ». *Trends in Immunology* 33 (10): 513-521. doi:10.1016/j.it.2012.06.001.
- Helmerhorst, H. J. F., E. N. van Tol, P. R. Tuinman, P. J. de Vries, R. A. Hartskeerl, M. P. Grobusch, et J. W. Hovius. 2012. « Severe Pulmonary Manifestation of Leptospirosis ». *The Netherlands Journal of Medicine* 70 (5): 215-221.
- Herath, Nalaka J., Senanayake A. M. Kularatne, Kosala G. A. D. Weerakoon, Abdul Wazil, Nilakshi Subasinghe, et Neelakanthi V. I. Ratnatunga. 2014. « Long Term Outcome of Acute Kidney Injury due to Leptospirosis? A Longitudinal Study in Sri Lanka ». *BMC Research Notes* 7: 398. doi:10.1186/1756-0500-7-398.
- Herrmann-Storck, Cecile, Magalie Saint-Louis, Tania Foucand, Isabelle Lamaury, Jacqueline Deloumeaux, Guy Baranton, Maurice Simonetti, et al. 2010. « Severe Leptospirosis in Hospitalized Patients, Guadeloupe ». *Emerging Infectious Diseases* 16 (2): 331-334. doi:10.3201/eid1602.090139.
- Hochedez, Patrick, Rafaele Theodose, Claude Olive, Pascale Bourhy, Guillaume Hurtrel, Nicolas Vignier, Hossein Mehdaoui, et al. 2015. « Factors Associated with Severe Leptospirosis, Martinique, 2010-2013 ». *Emerging Infectious Diseases* 21 (12): 2221-2224. doi:10.3201/eid2112.141099.
- Hotchkiss, R S, K W Tinsley, P E Swanson, R E Schmiegl Jr, J J Hui, K C Chang, D F Osborne, et al. 2001. « Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and CD4+ T Lymphocytes in Humans ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166 (11): 6952-6963.
- Hotchkiss, Richard S., et Donald W. Nicholson. 2006. « Apoptosis and Caspases Regulate Death and Inflammation in Sepsis ». *Nature Reviews. Immunology* 6 (11): 813-822. doi:10.1038/nri1943.
- Hung, C.-C., C.-T. Chang, K.-H. Chen, Y.-C. Tian, M.-S. Wu, M.-J. Pan, A. Vandewalle, et C.-W. Yang. 2006. « Upregulation of Chemokine CXCL1/KC by Leptospiral Membrane Lipoprotein Preparation in Renal Tubule Epithelial Cells ». *Kidney International* 69 (10): 1814-1822. doi:10.1038/sj.ki.5000362.
- Hung, Cheng-Chieh, Chiz-Tzung Chang, Ya-Chung Tian, Mai-Szu Wu, Chun-Chen Yu, Ming-Jeng Pan, Alain Vandewalle, et Chih-Wei Yang. 2006. « Leptospiral Membrane Proteins Stimulate pro-Inflammatory Chemokines Secretion by Renal Tubule Epithelial Cells through Toll-like Receptor 2 and p38 Mitogen Activated Protein Kinase ». *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 21 (4): 898-910. doi:10.1093/ndt/gfi316.
- Jin, Dandan, David M. Ojcius, Dexter Sun, Haiyan Dong, Yihui Luo, Yafei Mao, et Jie Yan. 2009. « Leptospira Interrogans Induces Apoptosis in Macrophages via Caspase-8- and Caspase-3-Dependent Pathways ». *Infection and Immunity* 77 (2): 799-809. doi:10.1128/IAI.00914-08.
- Johnson, R C, et L H Muschel. 1966. « Antileptospiral Activity of Serum. I. Normal and Immune Serum ». *Journal of Bacteriology* 91 (4): 1403-1409.
- Jongyota, Woranart, Chantiwa Wigraipat, Suwanna Nontapa, Suwimol Taweekhaisupapong, Nawarat C. Wara-Aswapati, Surasakdi Wongratanacheewin, et Rasana W. Sermswan. 2008. « Differential Response of Cytokines Induced by Leptospira Interrogans, Serogroup Pomona, Serovar Pomona, in Mouse and Human Cell Lines ». *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 26 (4): 229-236.
- Jost, B. H., B. Adler, T. Vinh, et S. Faine. 1986. « A Monoclonal Antibody Reacting with a Determinant on Leptospiral Lipopolysaccharide Protects Guinea Pigs against

- Leptospirosis ». *Journal of Medical Microbiology* 22 (3): 269-275. doi:10.1099/00222615-22-3-269.
- Kamath, Ramachandra, Subhashisa Swain, Sanjay Pattanshetty, et N. Sreekumaran Nair. 2014. « Studying Risk Factors Associated with Human Leptospirosis ». *Journal of Global Infectious Diseases* 6 (1): 3-9. doi:10.4103/0974-777X.127941.
- Kassegne, Kokouvi, Weilin Hu, David M. Ojcius, Dexter Sun, Yumei Ge, Jinfang Zhao, X. Frank Yang, Lanjuan Li, et Jie Yan. 2014. « Identification of Collagenase as a Critical Virulence Factor for Invasiveness and Transmission of Pathogenic *Leptospira* Species ». *The Journal of Infectious Diseases* 209 (7): 1105-1115. doi:10.1093/infdis/jit659.
- Kelesidis, Theodoros. 2014. « The Cross-Talk between Spirochetal Lipoproteins and Immunity ». *Frontiers in Immunology* 5: 310. doi:10.3389/fimmu.2014.00310.
- Klimpel, Gary R., Michael A. Matthias, et Joseph M. Vinetz. 2003. « *Leptospira* Interrogans Activation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Preferential Expansion of TCR Gamma Delta+ T Cells vs TCR Alpha Beta+ T Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (3): 1447-1455.
- 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 (London, England)* 354 (9181): 820-825.
- Ko, Albert I., Cyrille Goarant, et Mathieu Picardeau. 2009. « *Leptospira*: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen ». *Nature Reviews. Microbiology* 7 (10): 736-747. doi:10.1038/nrmicro2208.
- Koizumi, N., et H. Watanabe. 2005. « Leptospirosis Vaccines: Past, Present, and Future ». *Journal of Postgraduate Medicine* 51 (3): 210-214.
- Kyriakidis, Ioannis, Pinelopi Samara, et Anna Papa. 2011. « Serum TNF-A, sTNFR1, IL-6, IL-8 and IL-10 Levels in Weil's Syndrome ». *Cytokine* 54 (2): 117-120. doi:10.1016/j.cyto.2011.01.014.
- Lacroix-Lamandé, Sonia, Martine Fanton d'Andon, Eric Michel, Gwenn Ratet, Dana J. Philpott, Stephen E. Girardin, Ivo G. Boneca, Alain Vandewalle, et Catherine Werts. 2012. « Downregulation of the Na/K-ATPase Pump by Leptospiral Glycolipoprotein Activates the NLRP3 Inflammasome ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 188 (6): 2805-2814. doi:10.4049/jimmunol.1101987.
- Lagadec, Erwan, Yann Gomard, Vanina Guernier, Muriel Dietrich, Hervé Pascalis, Sarah Temmam, Beza Ramasindrazana, Steven M. Goodman, Pablo Tortosa, et Koussay Dellagi. 2012. « Pathogenic *Leptospira* Spp. in Bats, Madagascar and Union of the Comoros ». *Emerging Infectious Diseases* 18 (10): 1696-1698. doi:10.3201/eid1810.111898.
- Lagadec, Erwan, Yann Gomard, Gildas Le Minter, Colette Cordonin, Eric Cardinale, Beza Ramasindrazana, Muriel Dietrich, Steven M. Goodman, Pablo Tortosa, et Koussay Dellagi. 2016. « Identification of *Tenrec Ecaudatus*, a Wild Mammal Introduced to Mayotte Island, as a Reservoir of the Newly Identified Human Pathogenic *Leptospira* *Mayottensis* ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (8): e0004933. doi:10.1371/journal.pntd.0004933.
- Laurichesse, H., F. Gourdon, H. L. Smits, T. H. Abdoe, J. M. Estavoyer, H. Rebika, P. Pouliquen, P. Catalina, C. Dubray, et J. Beytout. 2007. « Safety and Immunogenicity of Subcutaneous or Intramuscular Administration of a Monovalent Inactivated Vaccine against *Leptospira Interrogans* Serogroup Icterohaemorrhagiae in Healthy Volunteers ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the*

- European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 13 (4): 395-403. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01662.x.
- Lehmann, Jason S., Michael A. Matthias, Joseph M. Vinetz, et Derrick E. Fouts. 2014. « Leptospiral Pathogenomics ». *Pathogens (Basel, Switzerland)* 3 (2): 280-308. doi:10.3390/pathogens3020280.
- Levett, P. N. 2001. « Leptospirosis ». *Clinical Microbiology Reviews* 14 (2): 296-326. doi:10.1128/CMR.14.2.296-326.2001.
- Levett, Paul N. 2015. « Systematics of Leptosiraceae ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 387: 11-20. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_2.
- Levett, Paul N., Roger E. Morey, Renee L. Galloway, Danielle E. Turner, Arnold G. Steigerwalt, et Leonard W. Mayer. 2005. « Detection of Pathogenic Leptospire by Real-Time Quantitative PCR ». *Journal of Medical Microbiology* 54 (Pt 1): 45-49.
- Ley, Klaus, Carlo Laudanna, Myron I. Cybulsky, et Sussan Nourshargh. 2007. « Getting to the Site of Inflammation: The Leukocyte Adhesion Cascade Updated ». *Nature Reviews. Immunology* 7 (9): 678-689. doi:10.1038/nri2156.
- Li, Shijun, David M. Ojcius, Sumei Liao, Liwei Li, Feng Xue, Haiyan Dong, et Jie Yan. 2010. « Replication or Death: Distinct Fates of Pathogenic Leptospira Strain Lai within Macrophages of Human or Mouse Origin ». *Innate Immunity* 16 (2): 80-92. doi:10.1177/1753425909105580.
- Libório, Alexandre Braga, Marcelo Boecker Munoz Braz, Antonio Carlos Seguro, Gdayllon C. Meneses, Fernanda Macedo de Oliveira Neves, Danielle Carvalho Pedrosa, Luciano Pamplona de Góes Cavalcanti, Alice Maria Costa Martins, et Elizabeth de Francesco Daher. 2015. « Endothelial Glycocalyx Damage Is Associated with Leptospirosis Acute Kidney Injury ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 92 (3): 611-616. doi:10.4269/ajtmh.14-0232.
- Lindow, Janet C., Elsie A. Wunder, Stephen J. Popper, Jin-Na Min, Praveen Mannam, Anup Srivastava, Yi Yao, et al. 2016. « Cathelicidin Insufficiency in Patients with Fatal Leptospirosis ». *PLoS Pathogens* 12 (11): e1005943. doi:10.1371/journal.ppat.1005943.
- Lingappa, J., T. Kuffner, J. Tappero, W. Whitworth, A. Mize, R. Kaiser, et J. McNicholl. 2004. « HLA-DQ6 and Ingestion of Contaminated Water: Possible Gene-Environment Interaction in an Outbreak of Leptospirosis ». *Genes and Immunity* 5 (3): 197-202. doi:10.1038/sj.gene.6364058.
- Liu, Boyu, Yanchun Wang, Xiaokui Guo, Weinan Zhu, Yan Zhang, et Ping He. 2014. « Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester Labeling Method to Study the Interaction between Leptospira and Macrophages ». *Journal of Microbiological Methods* 107 (décembre): 205-213. doi:10.1016/j.mimet.2014.10.005.
- Liuzzi, Anna Rita, James E McLaren, David A Price, et Matthias Eberl. 2015. « Early Innate Responses to Pathogens: Pattern Recognition by Unconventional Human T-Cells ». *Current Opinion in Immunology* 36 (octobre): 31-37. doi:10.1016/j.coi.2015.06.002.
- Lo, Yueh-Yu, Shen-Hsing Hsu, Yi-Ching Ko, Cheng-Chieh Hung, Ming-Yang Chang, Hsiang-Hao Hsu, Ming-Jeng Pan, et al. 2013. « Essential Calcium-Binding Cluster of Leptospira LipL32 Protein for Inflammatory Responses through the Toll-like Receptor 2 Pathway ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (17): 12335-12344. doi:10.1074/jbc.M112.418699.
- Lourdault, Kristel, Gustavo M. Cerqueira, Elsie A. Wunder, et Mathieu Picardeau. 2011. « Inactivation of clpB in the Pathogen Leptospira Interrogans Reduces Virulence and Resistance to Stress Conditions ». *Infection and Immunity* 79 (9): 3711-3717. doi:10.1128/IAI.05168-11.

- Lupidi, R., M. Cinco, D. Balanzin, E. Delprete, et P. E. Varaldo. 1991. « Serological Follow-up of Patients Involved in a Localized Outbreak of Leptospirosis ». *Journal of Clinical Microbiology* 29 (4): 805-809.
- Mancel, E., F. Merien, L. Pesenti, D. Salino, G. Angibaud, et P. Perolat. 1999. « Clinical Aspects of Ocular Leptospirosis in New Caledonia (South Pacific) ». *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology* 27 (6): 380-386.
- Manz, Markus G., et Steffen Boettcher. 2014. « Emergency Granulopoiesis ». *Nature Reviews. Immunology* 14 (5): 302-314. doi:10.1038/nri3660.
- Marinho, Márcia, Cilene Vidovix Táparo, Itamar S. Oliveira-Júnior, Silvia Helena Venturoli Perri, et Tereza Cristina Cardoso. 2015. « Tissue Apoptosis in Mice Infected with *Leptospira Interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae ». *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 21: 22. doi:10.1186/s40409-015-0022-y.
- Marotto, Paulo C. F., Albert I. Ko, Cristiane Murta-Nascimento, Antonio C. Seguro, Rogerio R. Prado, Marcia C. Barbosa, Sergio A. Cleto, et José Eluf-Neto. 2010. « Early Identification of Leptospirosis-Associated Pulmonary Hemorrhage Syndrome by Use of a Validated Prediction Model ». *The Journal of Infection* 60 (3): 218-223. doi:10.1016/j.jinf.2009.12.005.
- Martínez, Raydel, Alberto Pérez, María del C. Quiñones, Raúl Cruz, Angel Alvarez, Marlén Armesto, Carmen Fernández, et al. 2004. « [Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba] ». *Revista Panamericana De Salud Publica = Pan American Journal of Public Health* 15 (4): 249-255.
- Martinez-Lopez, Denise G., Mark Fahey, et Jenifer Coburn. 2010. « Responses of Human Endothelial Cells to Pathogenic and Non-Pathogenic *Leptospira* Species ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (12): e918. doi:10.1371/journal.pntd.0000918.
- Matsui, Mariko, Louise Roche, Sophie Geroult, Marie-Estelle Soupé-Gilbert, Didier Monchy, Michel Huerre, et Cyrille Goarant. 2016. « Cytokine and Chemokine Expression in Kidneys during Chronic Leptospirosis in Reservoir and Susceptible Animal Models ». *PloS One* 11 (5): e0156084. doi:10.1371/journal.pone.0156084.
- McGrath, H., B. Adler, T. Vinh, et S. Faine. 1984. « Phagocytosis of Virulent and Avirulent *Leptospira* by Guinea-Pig and Human Polymorphonuclear Leukocytes in Vitro ». *Pathology* 16 (3): 243-249.
- Merien, F., G. Baranton, et P. Perolat. 1997. « Invasion of Vero Cells and Induction of Apoptosis in Macrophages by Pathogenic *Leptospira Interrogans* Are Correlated with Virulence ». *Infection and Immunity* 65 (2): 729-738.
- Merien, F., P. Perolat, E. Mancel, D. Persan, et G. Baranton. 1993. « Detection of *Leptospira* DNA by Polymerase Chain Reaction in Aqueous Humor of a Patient with Unilateral Uveitis ». *The Journal of Infectious Diseases* 168 (5): 1335-1336.
- Merien, F., J Truccolo, Y Rougier, G Baranton, et P Perolat. 1998. « In Vivo Apoptosis of Hepatocytes in Guinea Pigs Infected with *Leptospira Interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae ». *FEMS Microbiology Letters* 169 (1): 95-102.
- Merien, Fabrice, Denis Portnoi, Pascale Bourhy, Françoise Charavay, Alain Berlioz-Arthaud, et Guy Baranton. 2005. « A Rapid and Quantitative Method for the Detection of *Leptospira* Species in Human Leptospirosis ». *FEMS Microbiology Letters* 249 (1): 139-147. doi:10.1016/j.femsle.2005.06.011.
- Mikulski, M., P. Boisier, F. Lacassin, M.-E. Soupé-Gilbert, C. Mauron, L. Bruyere-Ostells, D. Bonte, et al. 2014. « Severity Markers in Severe Leptospirosis: A Cohort Study ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official*

- Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, novembre.
doi:10.1007/s10096-014-2275-8.
- Miyahara, Satoshi, Mitsumasa Saito, Takaaki Kanemaru, Sharon Y. A. M. Villanueva, Nina G. Gloriani, et Shin-ichi Yoshida. 2014. « Destruction of the Hepatocyte Junction by Intercellular Invasion of *Leptospira* Causes Jaundice in a Hamster Model of Weil's Disease ». *International Journal of Experimental Pathology* 95 (4): 271-281. doi:10.1111/iep.12085.
- Mizushima, Noboru, Beth Levine, Ana Maria Cuervo, et Daniel J. Klionsky. 2008. « Autophagy Fights Disease through Cellular Self-Digestion ». *Nature* 451 (7182): 1069-1075. doi:10.1038/nature06639.
- Monahan, Avril M., John J. Callanan, et Jarlath E. Nally. 2008. « Proteomic Analysis of *Leptospira Interrogans* Shed in Urine of Chronically Infected Hosts ». *Infection and Immunity* 76 (11): 4952-4958. doi:10.1128/IAI.00511-08.
- Morgan, Juliette, Shari L. Bornstein, Adam M. Karpati, Michael Bruce, Carole A. Bolin, Constance C. Austin, Christopher W. Woods, 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): 1593-1599. doi:10.1086/340615.
- Morita, Craig T., Chenggang Jin, Ghanashyam Sarikonda, et Hong Wang. 2007. « Nonpeptide Antigens, Presentation Mechanisms, and Immunological Memory of Human V γ 2V δ 2 T Cells: Discriminating Friend from Foe through the Recognition of Prenyl Pyrophosphate Antigens ». *Immunological Reviews* 215 (1): 59-76. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00479.x.
- Murgia, Rossella, Rodolfo Garcia, et Marina Cinco. 2002. « Leptospire Are Killed in Vitro by Both Oxygen-Dependent and -Independent Reactions ». *Infection and Immunity* 70 (12): 7172-7175.
- Murray, Gerald L. 2015. « The Molecular Basis of Leptospiral Pathogenesis ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 387: 139-185. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_7.
- Mwachui, Mwanajaa Abdalla, Lisa Crump, Rudy Hartskeerl, Jakob Zinsstag, et Jan Hattendorf. 2015. « Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (9): e0003843. doi:10.1371/journal.pntd.0003843.
- Nahori, Marie-Anne, Edith Fournié-Amazouz, Nanette S. Que-Gewirth, Viviane Balloy, Michel Chignard, Christian R. H. Raetz, Isabelle Saint Girons, et Catherine Werts. 2005. « Differential TLR Recognition of Leptospiral Lipid A and Lipopolysaccharide in Murine and Human Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 175 (9): 6022-6031.
- Naiman, B. M., D. Alt, C. A. Bolin, R. Zuerner, et C. L. Baldwin. 2001. « Protective Killed *Leptospira Borgpetersenii* Vaccine Induces Potent Th1 Immunity Comprising Responses by CD4 and Gammadelta T Lymphocytes ». *Infection and Immunity* 69 (12): 7550-7558. doi:10.1128/IAI.69.12.7550-7558.2001.
- Naing, Cho, Simon A. Reid, et Kyan Aung. 2017. « Comparing Antibiotic Treatment for Leptospirosis Using Network Meta-Analysis: A Tutorial ». *BMC Infectious Diseases* 17 (1): 29. doi:10.1186/s12879-016-2145-3.
- Nally, Jarlath E., Chavit Chantranuwat, Xiao-Yang Wu, Michael C. Fishbein, Martha M. Pereira, João José Pereira Da Silva, David R. Blanco, et Michael A. Lovett. 2004. « Alveolar Septal Deposition of Immunoglobulin and Complement Parallels Pulmonary Hemorrhage in a Guinea Pig Model of Severe Pulmonary Leptospirosis ».

- The American Journal of Pathology* 164 (3): 1115-1127. doi:10.1016/S0002-9440(10)63198-7.
- Natarajaseenivasan, K., P. Vijayachari, A. P. Sugunan, S. Sharma, et S. C. Sehgal. 2004. « Leptospiral Proteins Expressed during Acute & Convalescent Phases of Human Leptospirosis ». *The Indian Journal of Medical Research* 120 (3): 151-159.
- Nathan, Carl. 2006. « Neutrophils and Immunity: Challenges and Opportunities ». *Nature Reviews. Immunology* 6 (3): 173-182. doi:10.1038/nri1785.
- Naze, Florence, Amélie Desvars, Mathieu Picardeau, Pascale Bourhy, et Alain 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.
- Niwattayakul, K., S. Kaewtasi, S. Chueasuwanchai, S. Hoontrakul, S. Chareonwat, C. Suttinont, K. Phimda, W. Chierakul, S. Silpasakorn, et Y. Suputtamongkol. 2010. « An Open Randomized Controlled Trial of Desmopressin and Pulse Dexamethasone as Adjunct Therapy in Patients with Pulmonary Involvement Associated with Severe Leptospirosis ». *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16 (8): 1207-1212. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03037.x.
- Paganin, Fabrice, Arnaud Bourdin, Cécile Dalban, Jean-Paul Courtin, Patrice Poubeau, Gianandrea Borgherini, Alain Michault, et al. 2007. « Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean): Analysis of Factors Associated with Severity in 147 Confirmed Cases ». *Intensive Care Medicine* 33 (11): 1959-1966. doi:10.1007/s00134-007-0776-y.
- Pagès, F., S. Larrieu, J. Simoes, P. Lenabat, B. Kurtkowiak, V. Guernier, G. Le Minter, et al. 2016. « Investigation of a Leptospirosis Outbreak in Triathlon Participants, Réunion Island, 2013 ». *Epidemiology and Infection* 144 (3): 661-669. doi:10.1017/S0950268815001740.
- Pagès, Frédéric, Barbara Kuli, Marie-Pierre Moiton, Cyrille Goarant, et Marie-Christine Jaffar-Bandjee. 2015. « Leptospirosis after a Stay in Madagascar ». *Journal of Travel Medicine* 22 (2): 136-139. doi:10.1111/jtm.12163.
- Pagès, Frédéric, Dominique Polycarpe, Jean-Sébastien Dehecq, Mathieu Picardeau, Nadège Caillère, Marie-Christine Jaffar-Bandjee, Alain Michault, et Laurent Filleul. 2014. « Human Leptospirosis on Reunion Island: Past and Current Burden ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11 (1): 968-982. doi:10.3390/ijerph110100968.
- Panaphut, Thanachai, Somnuek Domrongkitchaiporn, et Bandit Thinkamrop. 2002. « Prognostic Factors of Death in Leptospirosis: A Prospective Cohort Study in Khon Kaen, Thailand ». *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases* 6 (1): 52-59.
- Papa, Anna, et Tzimoula Kotrotsiou. 2015. « Cytokines in Human Leptospirosis ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 109 (12): 749-754. doi:10.1093/trstmh/trv095.
- Paris, D. H., K. Jenjaroen, S. D. Blacksell, R. Phetsouvanh, V. Wuthiekanun, P. N. Newton, N. P. J. Day, et G. D. H. Turner. 2008. « Differential Patterns of Endothelial and Leucocyte Activation in “Typhus-Like” Illnesses in Laos and Thailand ». *Clinical and Experimental Immunology* 153 (1): 63-67. doi:10.1111/j.1365-2249.2008.03673.x.
- Payne, Kyle K. 2016. « Lymphocyte-Mediated Immune Regulation in Health and Disease: The Treg and $\Gamma\delta$ T Cell Co-Conspiracy ». *Immunological Investigations* 45 (8): 767-775. doi:10.1080/08820139.2016.1213278.

- Pereira, M. M., J. Andrade, R. S. Marchevsky, et R. Ribeiro dos Santos. 1998. « Morphological Characterization of Lung and Kidney Lesions in C3H/HeJ Mice Infected with *Leptospira Interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae: Defect of CD4+ and CD8+ T-Cells Are Prognosticators of the Disease Progression ». *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie* 50 (3): 191-198. doi:10.1016/S0940-2993(98)80083-3.
- Pertuiset, E., M. Fen Chong, G. Duval, et R. Génin. 1988. « Aspects cliniques et facteurs pronostiques des leptospiroses ictéro-hémorragiques de l'adulte. A propos de 249 cas observés à la Reunion. » *La Revue De Medecine Interne* 9 (5): 487-493.
- Phillipson, Mia, et Paul Kubes. 2011. « The Neutrophil in Vascular Inflammation ». *Nature Medicine* 17 (11): 1381-1390. doi:10.1038/nm.2514.
- Picardeau, Mathieu. 2013. « Diagnosis and Epidemiology of Leptospirosis ». *Médecine Et Maladies Infectieuses* 43 (1): 1-9. doi:10.1016/j.medmal.2012.11.005.
- Picardeau, Mathieu. 2015a. « Genomics, Proteomics, and Genetics of *Leptospira* ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 387: 43-63. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_4.
- Picardeau, Mathieu. 2015b. « Leptospirosis: Updating the Global Picture of an Emerging Neglected Disease ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9 (9): e0004039. doi:10.1371/journal.pntd.0004039.
- Picardeau, Mathieu. 2017. « Virulence of the Zoonotic Agent of Leptospirosis: Still Terra Incognita? » *Nature Reviews. Microbiology*, mars. doi:10.1038/nrmicro.2017.5.
- Que-Gewirth, Nanette L. S., Anthony A. Ribeiro, Suzanne R. Kalb, Robert J. Cotter, Dieter M. Bulach, Ben Adler, Isabelle Saint Girons, Catherine Werts, et Christian R. H. Raetz. 2004. « A Methylated Phosphate Group and Four Amide-Linked Acyl Chains in *Leptospira Interrogans* Lipid A. The Membrane Anchor of an Unusual Lipopolysaccharide That Activates TLR2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (24): 25420-25429. doi:10.1074/jbc.M400598200.
- Raffray, Loic, Isabelle Douchet, Jean-Francois Augusto, Jihad Youssef, Cecile Contin-Bordes, Christophe Richez, Pierre Duffau, et al. 2015. « Septic Shock Sera Containing Circulating Histones Induce Dendritic Cell-Regulated Necrosis in Fatal Septic Shock Patients ». *Critical Care Medicine* 43 (4): e107-116. doi:10.1097/CCM.0000000000000879.
- Rahelinirina, Soanandrasana, Albertine Léon, Rudy A. Harstskeerl, Natacha Sertour, Ahmed Ahmed, Claudine Raharimanana, Elisabeth Ferquel, et al. 2010. « First Isolation and Direct Evidence for the Existence of Large Small-Mammal Reservoirs of *Leptospira* Sp. in Madagascar ». *PloS One* 5 (11): e14111. doi:10.1371/journal.pone.0014111.
- Rajapakse, Senaka, Chaturaka Rodrigo, Shiroma M. Handunnetti, et Sumadhya Deepika Fernando. 2015. « Current Immunological and Molecular Tools for Leptospirosis: Diagnostics, Vaccine Design, and Biomarkers for Predicting Severity ». *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 14 (janvier): 2. doi:10.1186/s12941-014-0060-2.
- Ratet, Gwenn, Frédéric J. Veyrier, Martine Fanton d'Andon, Xavier Kammerscheit, Marie-Anne Nicola, Mathieu Picardeau, Ivo G. Boneca, et Catherine Werts. 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.
- Rathinam, S. R. 2002. « Ocular Leptospirosis ». *Current Opinion in Ophthalmology* 13 (6): 381-386.

- Ratsitorahina, Maherisoa, Soanandrasana Rahelinirina, Alain Michault, Minoarisoa Rajerison, Soatiana Rajatonirina, Vincent Richard, et 2011 Surveillance Workshop group. 2015. « Has Madagascar Lost Its Exceptional Leptospirosis Free-Like Status? » *PLoS One* 10 (4): e0122683. doi:10.1371/journal.pone.0122683.
- Reis, Eliana A. G., José E. Hagan, Guilherme S. Ribeiro, Andrea Teixeira-Carvalho, Olindo A. Martins-Filho, Ruth R. Montgomery, Albert C. Shaw, Albert I. Ko, et Mitermayer G. Reis. 2013. « Cytokine Response Signatures in Disease Progression and Development of Severe Clinical Outcomes for Leptospirosis ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (9): e2457. doi:10.1371/journal.pntd.0002457.
- Ren, Shuang-Xi, Gang Fu, Xiu-Gao Jiang, Rong Zeng, You-Gang Miao, Hai Xu, Yi-Xuan Zhang, et al. 2003. « Unique Physiological and Pathogenic Features of *Leptospira Interrogans* Revealed by Whole-Genome Sequencing ». *Nature* 422 (6934): 888-893. doi:10.1038/nature01597.
- Renault, Philippe, Jean-Louis Solet, Daouda Sissoko, Elsa Balleydier, Sophie Larrieu, Laurent Filleul, Christian Lassalle, et al. 2007. « A Major Epidemic of Chikungunya Virus Infection on Reunion Island, France, 2005-2006 ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77 (4): 727-731.
- Ricklin, Daniel, et John D. Lambris. 2013. « Complement in Immune and Inflammatory Disorders: Pathophysiological Mechanisms ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190 (8): 3831-3838. doi:10.4049/jimmunol.1203487.
- Rizvi, M., M. Azam, M. R. Ajmal, I. Shukla, et A. Malik. 2011. « Prevalence of *Leptospira* in Acute Hepatitis Syndrome and Assessment of IL-8 and TNF-Alpha Level in Leptospiral Hepatitis ». *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 105 (7): 499-506. doi:10.1179/1364859411Y.0000000041.
- Robbins, Gregory T., Beth L. Hahn, Karen V. Evangelista, Lavinia Padmore, Patrick S. Aranda, et Jenifer Coburn. 2015. « Evaluation of Cell Binding Activities of *Leptospira* ECM Adhesins ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (4): e0003712. doi:10.1371/journal.pntd.0003712.
- Rodrigo, Chaturaka, Nipun Lakshitha de Silva, Ravindi Goonaratne, Keshinie Samarasekara, Indika Wijesinghe, B. Parththipan, et Senaka Rajapakse. 2014. « High Dose Corticosteroids in Severe Leptospirosis: A Systematic Review ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 108 (12): 743-750. doi:10.1093/trstmh/tru148.
- Russwurm, Stefan, James Vickers, Andreas Meier-Hellmann, Peter Spangenberg, Don Bredle, Konrad Reinhart, et Wolfgang Lösche. 2002. « Platelet and Leukocyte Activation Correlate with the Severity of Septic Organ Dysfunction ». *Shock (Augusta, Ga.)* 17 (4): 263-268.
- Sabroe, Ian, Elizabeth C. Jones, Lynne R. Usher, Moira K. B. Whyte, et Steven K. Dower. 2002. « Toll-like Receptor (TLR)2 and TLR4 in Human Peripheral Blood Granulocytes: A Critical Role for Monocytes in Leukocyte Lipopolysaccharide Responses ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (9): 4701-4710.
- Scharrig, Emilia, Agostina Carestia, María F. Ferrer, Maia Cédola, Gabriela Pretre, Ricardo Drut, Mathieu Picardeau, Mirta Schattner, et Ricardo M. Gómez. 2015. « Neutrophil Extracellular Traps Are Involved in the Innate Immune Response to Infection with *Leptospira* ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (7): e0003927. doi:10.1371/journal.pntd.0003927.
- Scocchi, M., D. Romeo, et M. Cinco. 1993. « Antimicrobial Activity of Two Bactenecins against Spirochetes ». *Infection and Immunity* 61 (7): 3081-3083.

- Segura, Eddy R., Christian A. Ganoza, Kalina Campos, Jessica N. Ricaldi, Sonia Torres, Hermann Silva, Manuel J. Céspedes, et al. 2005. « Clinical Spectrum of Pulmonary Involvement in Leptospirosis in a Region of Endemicity, with Quantification of Leptospiral Burden ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 40 (3): 343-351. doi:10.1086/427110.
- Shintaku, Masayuki, Hirotaka Itoh, et Yutaka Tsutsumi. 2014. « Weil's Disease (Leptospirosis) Manifesting as Fulminant Hepatic Failure: Report of an Autopsy Case ». *Pathology, Research and Practice* 210 (12): 1134-1137. doi:10.1016/j.prp.2014.05.002.
- Shpilberg, O., Y. Shaked, M. K. Maier, D. Samra, et Y. Samra. 1990. « Long-Term Follow-up after Leptospirosis ». *Southern Medical Journal* 83 (4): 405-407.
- Sica, Antonio, et Alberto Mantovani. 2012. « Macrophage Plasticity and Polarization: In Vivo Veritas ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (3): 787-795. doi:10.1172/JCI59643.
- Signorini, M. L., J. Lottersberger, H. D. Tarabla, et N. B. Vanasco. 2013. « Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Diagnose Human Leptospirosis: A Meta-Analysis of the Published Literature ». *Epidemiology and Infection* 141 (1): 22-32. doi:10.1017/S0950268812001951.
- Silva, M. V., E. D. Camargo, L. Batista, A. J. Vaz, A. P. Brandão, P. M. Nakamura, et J. M. Negrão. 1995. « Behaviour of Specific IgM, IgG and IgA Class Antibodies in Human Leptospirosis during the Acute Phase of the Disease and during Convalescence ». *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 98 (4): 268-272.
- Simon, Fabrice, Gabriel Morand, Céline Roche, Thierry Coton, Philippe Kraemer, Pierre-Edouard Fournier, et Philippe Gautret. 2012. « Leptospirosis in a French Traveler Returning from Mauritius ». *Journal of Travel Medicine* 19 (1): 69-71. doi:10.1111/j.1708-8305.2011.00573.x.
- Smythe, Lee D., Ina L. Smith, Greg A. Smith, Michael F. Dohnt, Meegan L. Symonds, Leonie J. Barnett, et David B. McKay. 2002. « A Quantitative PCR (TaqMan) Assay for Pathogenic *Leptospira* Spp ». *BMC Infectious Diseases* 2 (juillet): 13.
- Sørensen, O. E., P. Follin, A. H. Johnsen, J. Calafat, G. S. Tjabringa, P. S. Hiemstra, et N. Borregaard. 2001. « Human Cathelicidin, hCAP-18, Is Processed to the Antimicrobial Peptide LL-37 by Extracellular Cleavage with Proteinase 3 ». *Blood* 97 (12): 3951-3959.
- Spichler, Anne, Daniel Athanazio, Antonio C. Seguro, et Joseph M. Vinetz. 2011. « Outpatient Follow-up of Patients Hospitalized for Acute Leptospirosis ». *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases* 15 (7): e486-490. doi:10.1016/j.ijid.2011.03.020.
- Spichler, Anne S., Pedro J. Vilaça, Daniel A. Athanazio, Jose O. M. Albuquerque, Marcia Buzzar, Bronislawa Castro, Antonio Seguro, et Joseph M. Vinetz. 2008. « Predictors of Lethality in Severe Leptospirosis in Urban Brazil ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79 (6): 911-914.
- Tajiki, H., et R. Salomão. 1996. « Association of Plasma Levels of Tumor Necrosis Factor Alpha with Severity of Disease and Mortality among Patients with Leptospirosis ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 23 (5): 1177-1178.
- Tantitanawat, Sompong, et Sansanee Tanjatham. 2003. « Prognostic Factors Associated with Severe Leptospirosis ». *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmai het Thangphaet* 86 (10): 925-931.

- Taylor, Andrew J., Daniel H. Paris, et Paul N. Newton. 2015. « A Systematic Review of the Mortality from Untreated Leptospirosis ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (6): e0003866. doi:10.1371/journal.pntd.0003866.
- Thomas, D. D., et L. M. Hignite. 1990. « In Vitro Association of Leptospire with Host Cells ». *Infection and Immunity* 58 (3): 581-585.
- Toma, Claudia, Gerald L. Murray, Toshitsugu Nohara, Masaru Mizuyama, Nobuo Koizumi, Ben Adler, et Toshihiko Suzuki. 2014. « Leptospiral Outer Membrane Protein LMB216 Is Involved in Enhancement of Phagocytic Uptake by Macrophages ». *Cellular Microbiology* 16 (9): 1366-1377. doi:10.1111/cmi.12296.
- Toma, Claudia, Nobuhiko Okura, Chitoshi Takayama, et Toshihiko Suzuki. 2011. « Characteristic Features of Intracellular Pathogenic Leptospira in Infected Murine Macrophages ». *Cellular Microbiology* 13 (11): 1783-1792. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01660.x.
- Torgerson, Paul R., José E. Hagan, Federico Costa, Juan Calcagno, Michael Kane, Martha S. Martinez-Silveira, Marga G. A. Goris, Claudia Stein, Albert I. Ko, et Bernadette Abela-Ridder. 2015. « Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (10): e0004122. doi:10.1371/journal.pntd.0004122.
- Truccolo, J., O. Serais, F. Merien, et P. Perolat. 2001. « Following the Course of Human Leptospirosis: Evidence of a Critical Threshold for the Vital Prognosis Using a Quantitative PCR Assay ». *FEMS Microbiology Letters* 204 (2): 317-321.
- Tsuha, Sanefumi, Tomohiro Taniguchi, Soichi Shiiki, Masashi Narita, et Daniel T. Leung. 2016. « Clinical Characteristics of Laboratory-Confirmed Leptospirosis in Okinawa, Japan, 1974-2015: High Incidence of Jarisch-Herxheimer Reaction ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 110 (9): 558-565. doi:10.1093/trstmh/trw061.
- Tubiana, Sarah, Marc Mikulski, Jérôme Becam, Flore Lacassin, Patrick Lefèvre, Ann-Claire Gourinat, Cyrille Goarant, et Eric D'Ortenzio. 2013. « Risk Factors and Predictors of Severe Leptospirosis in New Caledonia ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (1): e1991. doi:10.1371/journal.pntd.0001991.
- Tuero, Iskra, Joseph M. Vinetz, et Gary R. Klimpel. 2010. « Lack of Demonstrable Memory T Cell Responses in Humans Who Have Spontaneously Recovered from Leptospirosis in the Peruvian Amazon ». *The Journal of Infectious Diseases* 201 (3): 420-427. doi:10.1086/650300.
- Turner, L. H. 1969. « Leptospirosis. » *British Medical Journal* 1 (5638): 231-235.
- Tyler, Christopher J., Derek G. Doherty, Bernhard Moser, et Matthias Eberl. 2015. « Human V γ 9/V δ 2 T Cells: Innate Adaptors of the Immune System ». *Cellular Immunology* 296 (1): 10-21. doi:10.1016/j.cellimm.2015.01.008.
- Ueno, Hideki, Nathalie Schmitt, Eynav Klechevsky, Alexander Pedroza-Gonzalez, Toshimichi Matsui, Gerard Zurawski, SangKon Oh, et al. 2010. « Harnessing Human Dendritic Cell Subsets for Medicine ». *Immunological Reviews* 234 (1): 199-212. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00884.x.
- Verma, A, S. R. Rathinam, C. Gowri Priya, V. R. Muthukkaruppan, Brian Stevenson, et John F. Timoney. 2008. « LruA and LruB Antibodies in Sera of Humans with Leptospiral Uveitis ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 15 (6): 1019-1023. doi:10.1128/ CVI.00203-07.
- Verma, A., et B. Stevenson. 2012. « Leptospiral Uveitis - There Is More to It than Meets the Eye! » *Zoonoses and Public Health* 59 Suppl 2 (septembre): 132-141. doi:10.1111/j.1863-2378.2011.01445.x.

- Vieira, Monica L., Miryam P. Alvarez-Flores, Karin Kirchgatter, Eliete C. Romero, Ivy J. Alves, Zenaide M. de Moraes, Silvio A. Vasconcellos, Ana M. Chudzinski-Tavassi, et Ana L. T. O. Nascimento. 2013. « Interaction of *Leptospira Interrogans* with Human Proteolytic Systems Enhances Dissemination through Endothelial Cells and Protease Levels ». *Infection and Immunity* 81 (5): 1764-1774. doi:10.1128/IAI.00020-13.
- Vieira, Monica L., Lina P. D'Atri, Mirta Schattner, Alejandra M. Habarta, Angela S. Barbosa, Zenaide M. de Moraes, Silvio A. Vasconcellos, Patricia A. E. Abreu, Ricardo M. Gómez, et Ana L. T. O. Nascimento. 2007. « A Novel Leptospiral Protein Increases ICAM-1 and E-Selectin Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells ». *FEMS Microbiology Letters* 276 (2): 172-180. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00924.x.
- Vieira, Mônica L., Clément Naudin, Matthias Mörgelin, Eliete C. Romero, Ana Lucia T. O. Nascimento, et Heiko Herwald. 2016. « Modulation of Hemostatic and Inflammatory Responses by *Leptospira* Spp ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (5): e0004713. doi:10.1371/journal.pntd.0004713.
- Vieira, Monica L., Silvio A. Vasconcellos, Amane P. Gonçalves, Zenaide M. de Moraes, et Ana L. T. O. Nascimento. 2009. « Plasminogen Acquisition and Activation at the Surface of *Leptospira* Species Lead to Fibronectin Degradation ». *Infection and Immunity* 77 (9): 4092-4101. doi:10.1128/IAI.00353-09.
- Vinh, T., S. Faine, et B. Adler. 1984. « Adhesion of *Leptospira* to Mouse Fibroblasts (L929) and Its Enhancement by Specific Antibody ». *Journal of Medical Microbiology* 18 (1): 73-85. doi:10.1099/00222615-18-1-73.
- Viriyakosol, Suganya, Michael A. Matthias, Mark A. Swancutt, Theo N. Kirkland, et Joseph M. Vinetz. 2006. « Toll-like Receptor 4 Protects against Lethal *Leptospira Interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae Infection and Contributes to in Vivo Control of Leptospiral Burden ». *Infection and Immunity* 74 (2): 887-895. doi:10.1128/IAI.74.2.887-895.2006.
- Volz, Magdalena Sarah, Verena Moos, Kristina Allers, Enno Luge, Anne Mayer-Scholl, Karsten Nöckler, Christoph Loddenkemper, Andreas Jansen, et Thomas Schneider. 2015. « Specific CD4+ T-Cell Reactivity and Cytokine Release in Different Clinical Presentations of Leptospirosis ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 22 (12): 1276-1284. doi:10.1128/CVI.00397-15.
- Wagenaar, J. F. P., M. G. A. Goris, D. L. Partiningrum, B. Isbandrio, R. A. Hartskeerl, D. P. M. Brandjes, J. C. M. Meijers, M. H. Gasem, et E. C. M. van Gorp. 2010. « Coagulation Disorders in Patients with Severe Leptospirosis Are Associated with Severe Bleeding and Mortality ». *Tropical Medicine & International Health: TM & IH* 15 (2): 152-159. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02434.x.
- Wagenaar, Jiri F P, M Hussein Gasem, Marga G A Goris, Mariska Leeflang, Rudy A Hartskeerl, Tom van der Poll, Cornelis van 't Veer, et Eric C M van Gorp. 2009. « Soluble ST2 Levels Are Associated with Bleeding in Patients with Severe Leptospirosis ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3 (6): e453. doi:10.1371/journal.pntd.0000453.
- Wagenaar, Jiri F. P., Marga G. A. Goris, M. Hussein Gasem, Bambang Isbandrio, Federica Moalli, Alberto Mantovani, Kimberly R. Boer, Rudy A. Hartskeerl, Cecilia Garlanda, et Eric C. M. van Gorp. 2009. « Long Pentraxin PTX3 Is Associated with Mortality and Disease Severity in Severe Leptospirosis ». *The Journal of Infection* 58 (6): 425-432. doi:10.1016/j.jinf.2009.04.004.

- Wang, B., J. A. Sullivan, G. W. Sullivan, et G. L. Mandell. 1984a. « Role of Specific Antibody in Interaction of Leptospire with Human Monocytes and Monocyte-Derived Macrophages ». *Infection and Immunity* 46 (3): 809-813.
- Wang, B., J. Sullivan, G. W. Sullivan, et G. L. Mandell. 1984b. « Interaction of Leptospire with Human Polymorphonuclear Neutrophils ». *Infection and Immunity* 44 (2): 459-464.
- Wang, Huan, Yifei Wu, David M. Ojcius, X. Frank Yang, Chenglin Zhang, Shibiao Ding, Xu 'ai Lin, et Jie Yan. 2012. « Leptospiral Hemolysins Induce Proinflammatory Cytokines through Toll-like Receptor 2-and 4-Mediated JNK and NF- κ B Signaling Pathways ». *PLoS One* 7 (8): e42266. doi:10.1371/journal.pone.0042266.
- Wang, Jing, et Hisashi Arase. 2014. « Regulation of Immune Responses by Neutrophils ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1319 (juin): 66-81. doi:10.1111/nyas.12445.
- Watt, G., L. P. Padre, M. L. Tuazon, C. Calubaquib, E. Santiago, C. P. Ranoa, et L. W. Laughlin. 1988. « Placebo-Controlled Trial of Intravenous Penicillin for Severe and Late Leptospirosis ». *Lancet (London, England)* 1 (8583): 433-435.
- Weil, A. 1886. « Ueber eine eigentümliche, mit Milztumor, Icterus und Nephritis einhergehende, acute Infectionskrankheit. » *Dtsch Arch Klin Med* 39:209.
- Werts, C., R. I. Tapping, J. C. Mathison, T. H. Chuang, V. Kravchenko, I. Saint Girons, D. A. Haake, et al. 2001. « Leptospiral Lipopolysaccharide Activates Cells through a TLR2-Dependent Mechanism ». *Nature Immunology* 2 (4): 346-352. doi:10.1038/86354.
- Werts, Catherine. 2010. « Leptospirosis: A Toll Road from B Lymphocytes ». *Chang Gung Medical Journal* 33 (6): 591-601.
- WHO. 2010. « WHO | Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group (LERG) ». WHO. <http://www.who.int/zoonoses/diseases/lerg/en/>.
- Wilson-Welder, Jennifer H., Ami T. Frank, Richard L. Hornsby, Steven C. Olsen, et David P. Alt. 2016. « Interaction of Bovine Peripheral Blood Polymorphonuclear Cells and Leptospira Species; Innate Responses in the Natural Bovine Reservoir Host ». *Frontiers in Microbiology* 7: 1110. doi:10.3389/fmicb.2016.01110.
- Wu, Mai-Szu, Chih-Wei Yang, Ming-Jen Pan, Chiz-Tzung Chang, et Yung-Chih Chen. 2004. « Reduced Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ Co-Transporter Activity and Inhibited NKCC2 mRNA Expression by Leptospira Shermani: From Bed-Side to Bench ». *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 19 (10): 2472-2479. doi:10.1093/ndt/gfh452.
- Xue, Feng, Haiyan Dong, Jinyu Wu, Zuwei Wu, Weilin Hu, Aihua Sun, Bryan Troxell, X Frank Yang, et Jie Yan. 2010. « Transcriptional Responses of Leptospira Interrogans to Host Innate Immunity: Significant Changes in Metabolism, Oxygen Tolerance, and Outer Membrane ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (10): e857. doi:10.1371/journal.pntd.0000857.
- Xue, Feng, Xinghui Zhao, Yingchao Yang, Jinping Zhao, Yutao Yang, Yongguo Cao, Cailing Hong, et al. 2013. « Responses of Murine and Human Macrophages to Leptospiral Infection: A Study Using Comparative Array Analysis ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (10): e2477. doi:10.1371/journal.pntd.0002477.
- Yagupsky, P., et F. S. Nolte. 1990. « Quantitative Aspects of Septicemia ». *Clinical Microbiology Reviews* 3 (3): 269-279.
- Yamashiro-Kanashiro, E. H., G. Benard, M. N. Sato, A. C. Seguro, et A. J. Duarte. 1991. « Cellular Immune Response Analysis of Patients with Leptospirosis ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 45 (1): 138-145.

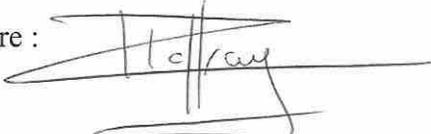
- Yanai, Hideyuki, Tatsuma Ban, ZhiChao Wang, Myoung Kwon Choi, Takeshi Kawamura, Hideo Negishi, Makoto Nakasato, et al. 2009. « HMGB Proteins Function as Universal Sentinels for Nucleic-Acid-Mediated Innate Immune Responses ». *Nature* 462 (7269): 99-103. doi:10.1038/nature08512.
- Yang, C.-W. 2007. « Leptospirosis Renal Disease: Understanding the Initiation by Toll-like Receptors ». *Kidney International* 72 (8): 918-925. doi:10.1038/sj.ki.5002393.
- Yang, C.-W., C.-C. Hung, M.-S. Wu, Y.-C. Tian, C.-T. Chang, M.-J. Pan, et A. Vandewalle. 2006. « Toll-like Receptor 2 Mediates Early Inflammation by Leptospiral Outer Membrane Proteins in Proximal Tubule Cells ». *Kidney International* 69 (5): 815-822. doi:10.1038/sj.ki.5000119.
- Yang, Huang-Yu, Cheng-Chieh Hung, Su-Hsun Liu, Yi-Gen Guo, Yung-Chang Chen, Yi-Ching Ko, Chiung-Tseng Huang, et al. 2015. « Overlooked Risk for Chronic Kidney Disease after Leptospiral Infection: A Population-Based Survey and Epidemiological Cohort Evidence ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (10): e0004105. doi:10.1371/journal.pntd.0004105.
- Yersin, C., P. Bovet, F. Mérien, T. Wong, J. Panowsky, et P. Perolat. 1998. « Human Leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): A Population-Based Study ». *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59 (6): 933-940.
- Yuri, K., Y. Takamoto, M. Okada, T. Hiramune, N. Kikuchi, et R. Yanagawa. 1993. « Chemotaxis of Leptospire to Hemoglobin in Relation to Virulence ». *Infection and Immunity* 61 (5): 2270-2272.
- Zhang, Lei, Chenglin Zhang, David M. Ojcius, Dexter Sun, Jinfang Zhao, Xuai Lin, Liwei Li, Lanjuan Li, et Jie Yan. 2012. « The Mammalian Cell Entry (Mce) Protein of Pathogenic Leptospira Species Is Responsible for RGD Motif-Dependent Infection of Cells and Animals ». *Molecular Microbiology* 83 (5): 1006-1023. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.07985.x.
- Zhang, Ying, Lang Bao, Hailong Zhu, Bi Huang, et Huidong Zhang. 2010. « OmpA-like Protein Loa22 from Leptospira Interrogans Serovar Lai Is Cytotoxic to Cultured Rat Renal Cells and Promotes Inflammatory Responses ». *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 42 (1): 70-79.
- Zhang, Yi-Xuan, Yan Geng, Jun-Wei Yang, Xiao-Kui Guo, et Guo-Ping Zhao. 2008. « Cytotoxic Activity and Probable Apoptotic Effect of Sph2, a Sphingomyelinase Hemolysin from Leptospira Interrogans Strain Lai ». *BMB Reports* 41 (2): 119-125.
- Zhao, Jing-Fang, Hong-Hu Chen, David M Ojcius, Xin Zhao, Dexter Sun, Yu-Mei Ge, Lin-Li Zheng, Xu 'ai Lin, Lan-Juan Li, et Jie Yan. 2013. « Identification of Leptospira Interrogans Phospholipase C as a Novel Virulence Factor Responsible for Intracellular Free Calcium Ion Elevation during Macrophage Death ». *PloS One* 8 (10): e75652. doi:10.1371/journal.pone.0075652.
- Zonneveld, Rens, Roberta Martinelli, Nathan I. Shapiro, Taco W. Kuijpers, Frans B. Plötz, et Christopher V. Carman. 2014. « Soluble Adhesion Molecules as Markers for Sepsis and the Potential Pathophysiological Discrepancy in Neonates, Children and Adults ». *Critical Care (London, England)* 18 (2): 204. doi:10.1186/cc13733.
- Zuerner, Richard L. 2015. « Host Response to Leptospira Infection ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 387: 223-250. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_9.
- Zuerner, Richard L., David P. Alt, Mitchell V. Palmer, Tyler C. Thacker, et Steven C. Olsen. 2011. « A Leptospira Borgpetersenii Serovar Hardjo Vaccine Induces a Th1 Response, Activates NK Cells, and Reduces Renal Colonization ». *Clinical and Vaccine Immunology: CVI* 18 (4): 684-691. doi:10.1128/CVI.00288-10.



LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

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

Fait à ... St Denis, le (date) 30/03/2017

Signature : 

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

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

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

En conséquence, chaque utilisateur doit :

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

La contrefaçon et le faux

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

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

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

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

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

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