



HAL
open science

Gestion de populations de rongeurs dans un contexte leptospirosique

Aurélie Marquez

► **To cite this version:**

Aurélie Marquez. Gestion de populations de rongeurs dans un contexte leptospirosique. Génétique des populations [q-bio.PE]. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1010 . tel-03120916

HAL Id: tel-03120916

<https://theses.hal.science/tel-03120916>

Submitted on 26 Jan 2021

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

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



N°d'ordre NNT : 2019LYSE1010

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale <<EDISS>> ED 205

(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science-Santé)

Spécialité de doctorat : SCIENCES DE LA VIE

Soutenue publiquement le 25/01/2019, par :

Aurélie Anne Dominique MARQUEZ

Gestion de populations de rongeurs dans un contexte leptospirosique

Devant le jury composé de :

Payen-Gay, Léa Professeure des Universités Université Lyon 1

Présidente

Davoust, Bernard Docteur Vétérinaire UMR Aix-Marseille Université - IRD

Rapporteur

Fichet-Calvet, Elisabeth Chercheure Institute of Tropical Medicine

Rapporteuse

Petit, Claude Professeur des ENV INP-ENVT

Rapporteur

Keller, Matthieu Directeur de Recherche Université de Tours

Examineur

Kodjo, Angeli Professeur des ENV Vetagro Sup Directeur de thèse

Directeur de thèse

Lattard, Virginie Directrice de Recherche INRA Vetagro Sup

Co-directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. le Professeur Frédéric FLEURY

Président du Conseil Académique

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Didier REVEL

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

Vice-président de la Commission Recherche

M. Fabrice VALLÉE

Directrice Générale des Services

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le docteur Bernard Davoust, la docteure Elisabeth Fichet-Calvet et le professeur Claude Petit d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit.

Je tiens à remercier également le docteur Matthieu Keller et la professeure Léa Payen-Gay d'avoir accepté d'être membres du jury.

Je remercie le professeur Angeli Kodjo d'avoir été mon directeur de thèse et d'avoir permis que les travaux puissent se faire.

Je remercie également la docteure Virginie Lattard d'avoir co-encadré cette thèse et d'avoir également permis que les travaux puissent se faire.

Je remercie le professeur Étienne Benoit ainsi que toute l'unité USC 1233 pour leur accueil dans les deux équipes : anticoagulants et leptospires.

Je remercie les membres du laboratoire des leptospires et aussi les anciens membres Audrey Busserolles, Tristan Ulivieri, Adrien Reyjon et Amanda Del Rio pour leur accueil.

Je remercie également plus largement toute l'équipe de Vetagro Sup.

RÉSUMÉ

Gestion de populations de rongeurs dans un contexte leptospirosique

La gestion de populations de rongeurs est importante car ils peuvent causer divers problèmes économiques, écologiques et sanitaires. Cette gestion s'appuie sur des méthodes de prévention, celles-ci étant des mesures architecturales, hygiéniques et des pratiques agricoles. Elle s'appuie également sur des méthodes de lutte biologique, chimique et mécanique. La lutte chimique se fait principalement avec l'utilisation de rodenticides anticoagulants qui agissent plusieurs heures après ingestion permettant d'éviter l'éviction alimentaire. L'utilisation excessive de ces molécules a entraîné la sélection de résistance chez certains individus rendant leur utilisation peu efficace. Il y a alors eu le développement de nouvelles molécules, mais celles-ci sont plus écotoxiques. Nous nous sommes intéressés dans ces travaux de thèse à la gestion de populations de rongeurs dans un cadre de risque sanitaire leptospirosique. Les rongeurs sont les principaux réservoirs de leptospires pathogènes, des bactéries Spirochètes responsables de la leptospirose. La leptospirose est une zoonose ré-émergente à répartition mondiale dont le nombre de cas annuel est évalué à approximativement un million et dont il y a eu une augmentation du nombre de cas ces dernières années. Elle est endémique en régions tropicales. C'est une maladie dont l'incidence réelle est sous-estimée en raison notamment de la grande variabilité de symptômes possibles allant du syndrome grippal à des formes rénales. Le taux de mortalité est élevé aux alentours de 10% mais pouvant aller jusqu'à 50% dans certains cas avec des complications pulmonaires. De nombreux facteurs influent sur le cycle complexe de transmission de la leptospirose. Il peut y avoir un risque sanitaire lié à la présence de rongeurs porteurs de leptospires pathogènes, qui peut être difficile à contrôler si les rongeurs sont résistants aux rodenticides anticoagulants utilisés pour réguler leurs populations. De plus, il peut y avoir des problèmes d'exposition à des risques écotoxiques lors de mise en place de traitements chimiques.

Nous avons étudié plusieurs cas concrets montrant la difficulté dans la prise de décision liée à la gestion des rongeurs dans des contextes divers. Dans un contexte de problèmes économiques, nous avons analysé le portage de leptospires pathogènes par des campagnols des champs et des campagnols terrestres ainsi que la résistance de cible à la bromadiolone, molécule utilisée en lutte chimique à basse densité de population. Nous nous sommes intéressés à l'influence de la perception sociétale sur le risque sanitaire lié à des souris dans un élevage bovin dans lequel il

y a des cas de leptospirose humaine et de leptospirose bovine. Dans le cadre d'un projet visant à étudier l'efficacité de gestion de populations de rongeurs commensaux en Martinique dans un contexte leptospirosique, nous avons regardé l'exposition des rongeurs aux AVKs et la résistance de cible aux AVKs.

Pour le portage de leptospires pathogènes par les campagnols nous avons trouvé des prévalences allant de 3% à 53% selon la zone étudiée. Il y avait 3 mutations sur le gène *vkorc1* amenant peu de résistance de cible à la bromadiolone. Dans l'élevage bovin nous avons notamment trouvé que la perception sociétale de l'éleveur sous-estimait le risque lié aux souris dont 41% étaient porteuses de leptospires pathogènes et 50% étaient porteuses de mutations du gène *vkorc1* amenant de la résistance de cible aux AVKs. En Martinique nous avons trouvé que 54% des individus analysés avaient été exposé à au moins une molécule AVKs et qu'il y avait plusieurs mutations du gène *vkorc1* dont certaines pas encore caractérisées amenant de la résistance de cible aux AVKs.

La gestion des rongeurs est un problème complexe avec plusieurs facteurs à prendre en compte que ce soient les risques liés à l'exposition aux rongeurs ou ceux liés à l'utilisation de rodenticides anticoagulants. De plus, la notion de risque est scientifique mais la perception qui est subjective participe à la prise de décision d'un moyen de gestion.

ABSTRACT

Management of rodent populations in leptospirosis context

Management of rodent populations is important because they can cause various economic, ecologic and health problems. This management relies on prevention methods, these ones being architectural, hygienic and agricultural practices. It relies on biologic, chemical and mechanic control methods. Chemical control methods are made mainly with the use of anticoagulant rodenticide acting several hours after ingestion to provide food eviction. Excessive use of these molecules led to resistance selection of some individuals yielding their use underperforming. Then there has been new molecules development, but they are more ecotoxic. In these thesis works we are interested in management of rodent populations within a framework of health risk of leptospirosis. Rodents are main reservoirs of pathogenic leptospire, Spirochete bacterias responsible of leptospirosis. Leptospirosis is a worldwide re-emerging zoonosis of which there are approximately one million of cases each year and of which there is an increasing number of cases these last years. It is endemic in tropical regions. It is a disease of which real incidence is underestimated because of especially large variability of possible symptoms ranging from flu syndrome to renal forms. Mortality rate is high around 10% and up to 50% in certain cases with pulmonary complications. Numerous factors influence on complex transmission cycle of leptospirosis. There can be health risk associated with presence of rodent carriers of pathogenic leptospire, which can be difficult to control if rodents are resistant to anticoagulant rodenticides used to regulate their populations. Furthermore, there can have exposition problems to ecotoxic risks throughout establishment of chemical treatment.

We studied several concrete cases showing the difficulty in decision-making relied with rodent management in various contexts. In a context of economic problems, we analysed pathogenic leptospire carriage by meadow voles and ground voles as well as target resistance to bromadiolone, used molecule in chemical control of low population density. We are interested in influence of societal perception on health risk relied with mice in bovine farming in which there are human and bovine leptospirosis cases. In framework of a project leading to study efficiency of commensal rodent populations management in Martinique in a leptospirosis context, we looked rodent exposition to AVKs and target resistance to AVKs.

For pathogenic leptospires carriage by voles we found prevalence ranging from 3% to 53% according to studied area. There were 3 mutations on *vkorc1* gene leading to few target resistances to bromadiolone. In the bovine farming we found especially that societal perception of the breeder underestimated risk relied with mice of which 41% were carriers of pathogenic leptospires and 50% were carriers of *vkorc1* gene mutations leading to target resistance to AVKs. In Martinique we found that 54% of analysed individuals have been exposed to at least one AVKs molecules and that there were several *vkorc1* gene mutations in which certain were not characterised yet leading to target resistance to AVKs.

Rodent management is a complex problem with several factors to take into account whether risks relied with rodent exposition or those relied with the use of anticoagulant rodenticides. Furthermore, the concept of risk is scientific but the perception which is subjective participates in decision-making of a way of management.

MOTS-CLÉS : Gestion de populations de rongeurs, leptospires pathogènes, lutte chimique, résistance aux AVKs et zoonose.

KEY-WORDS: Rodent populations management, pathogenic leptospires, chemical control, AVKs resistance and zoonosis.

USC 1233 Rongeurs Sauvages – Risques Sanitaires et Gestion des Populations

Vetagro Sup,

1, avenue Bourgelat

69280 Marcy L'Étoile

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|----|
| REMERCIEMENTS | 3 |
| RÉSUMÉ..... | 4 |
| ABSTRACT | 6 |
| TABLE DES MATIÈRES | 8 |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | 12 |
| INDEX DES FIGURES | 13 |
| INDEX DES TABLEAUX | 15 |
| INTRODUCTION GENERALE..... | 17 |
| I- Les leptospires | 17 |
| 1. Morphologie et structure..... | 17 |
| a) Morphologie..... | 17 |
| b) Structure..... | 17 |
| c) Antigènes protéiques impliqués dans la virulence | 18 |
| d) Antigènes de surface | 18 |
| 2. Classifications des leptospires | 19 |
| a) Classification et sérologie | 20 |
| b) Classification génétique | 20 |
| c) Diagnostic de la leptospirose, détection et caractérisation des leptospires | 22 |
| II – La leptospirose, une zoonose au cycle de transmission complexe | 47 |
| 1. Aspects cliniques associés à la leptospirose | 47 |
| a) Humaine | 47 |
| b) Animale..... | 47 |
| 2. Physiopathologie de la leptospirose..... | 49 |
| a) Voies d’entrée | 50 |

| | |
|---|----|
| b) Réceptivité et sensibilité des espèces..... | 50 |
| c) Voies d'excrétion | 52 |
| d) Réponse immunitaire de l'hôte | 52 |
| 3. Épidémiologie | 53 |
| a) Une zoonose à répartition mondiale..... | 53 |
| b) Cycle de transmission | 54 |
| 4. Facteurs de risques | 57 |
| III - Les rongeurs : réservoirs de leptospires pathogènes | 61 |
| 1. Rôle des rongeurs dans la transmission de leptospires pathogènes | 61 |
| 2. Les rongeurs faisant l'objet d'une régulation chimique | 62 |
| a) Campagnol des champs (<i>Microtus arvalis</i>) | 63 |
| b) Campagnol terrestre (<i>Arvicola terrestris</i>) | 63 |
| c) Rat brun (<i>Rattus norvegicus</i>)..... | 65 |
| d) Rat noir (<i>Rattus rattus</i>)..... | 66 |
| e) Souris domestique (<i>Mus musculus domesticus</i>) | 66 |
| 3. Autres problèmes liés aux rongeurs | 67 |
| a) Autres problèmes sanitaires | 67 |
| b) Problèmes économiques..... | 69 |
| IV – Méthodes de gestion..... | 71 |
| 1. Présentation de la boîte à outils | 71 |
| 2. Mesures préventives..... | 72 |
| a) Pratiques agricoles | 72 |
| b) Mesures architecturales..... | 73 |
| 3. Méthodes de lutte | 73 |
| a) Lutte biologique | 74 |
| b) Mesures physiques | 74 |
| c) Lutte chimique | 75 |

| | |
|--|-----|
| V – Les anticoagulants anti-vitamines K..... | 77 |
| 1. Historique..... | 77 |
| 2. Les molécules..... | 77 |
| 3. Mécanisme d'action | 78 |
| a) Historique..... | 78 |
| b) Rôle de la vitamine K dans la coagulation..... | 79 |
| c) Cycle de la vitamine K..... | 81 |
| d) Inhibition du cycle de la vitamine K par les AVKs | 82 |
| 4. Métabolisme des AVKs | 82 |
| VI - Résistance aux AVKs..... | 84 |
| 1. Historique..... | 84 |
| 2. La résistance de cible | 84 |
| a) Le rat brun | 85 |
| b) La souris domestique | 86 |
| 3. La résistance métabolique..... | 86 |
| OBJECTIFS DE LA THÈSE | 88 |
| PROJETS DE LA THÈSE | 90 |
| I) Étude du portage leptospirosique et de la résistance aux AVKs chez le Campagnol terrestre | 90 |
| 1. Contexte et objectifs de l'étude..... | 90 |
| 2. Principaux résultats de l'étude et discussion | 91 |
| a) Méthodologie | 91 |
| b) Résultats..... | 92 |
| II. La souris comme menace sanitaire dans un élevage bovin..... | 113 |
| 1. Contexte et objectifs de l'étude..... | 113 |
| 2. Principaux résultats de l'étude | 113 |
| III. Étude de la résistance aux AVKs chez des rongeurs dans un contexte leptospirosique en Martinique | 138 |

| | |
|--|-----|
| 1. Contexte et objectifs de l'étude..... | 138 |
| 2. Principaux résultats de l'étude | 138 |
| DISCUSSION GENERALE DE LA THESE | 166 |
| I. Les dangers liés aux rongeurs | 166 |
| 1. Dangers sanitaires | 166 |
| 2. Dangers économiques | 168 |
| 3. Dangers environnementaux..... | 169 |
| II) Problématique de l'exposition aux rongeurs, les risques liés aux rongeurs | 170 |
| 1. La notion de risque..... | 170 |
| III) Gestion de population de rongeurs | 171 |
| 1. Une boîte à outils complexe..... | 171 |
| 2. La gestion chimique des rongeurs : des dangers supplémentaires ?..... | 172 |
| IV) Évaluation des risques liés aux rongeurs et à la maîtrise de leurs populations. Trois cas concrets. | 173 |
| 1. Une ferme à haut risque infectieux | 173 |
| 2. Une région tropicale à fort risque leptospirosique : la Martinique | 176 |
| 3. Campagnols, une gestion de populations à adapter aux situations | 179 |
| PERSPECTIVES DE LA THESE..... | 182 |
| CONCLUSION GENERALE DE LA THESE | 185 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES DE LA THESE | 187 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

AVK : anticoagulant anti-vitamine K

CYP-450 : Cytochrome P450

GGCX : Gamma Glutamyl Carboxylase

LPS : lipopolysaccharide

MAT : Micro-Agglutination Test

MLST : MultiLocus Sequence Typing

MST : Multispacer Sequence Typing

PCR : polymérase chain reaction

PVKD : Protéine Vitamine K Dépendante

Récepteur TLR : Toll-like récepteur

VKORC1 : Vitamine K Époxyde Réductase

VNTR : Variable-Number Tandem Repeat

INDEX DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1. Leptospires par balayage en microscopie électronique..... | 17 |
| Figure 2. Schéma d'une coupe transversale d'un leptospire | 18 |
| Figure 3. Phases d'évolution de la leptospirose lors d'une infection | 51 |
| Figure 4. Inactivation par <i>Leptospira</i> des voies du système du complément | 52 |
| Figure 5. Nombres de cas de leptospirose selon la zone en France..... | 53 |
| Figure 6. Cas de leptospirose en France métropolitaine ; noter la saisonnalité..... | 53 |
| Figure 7. Incidence de la leptospirose selon les espèces | 54 |
| Figure 8. Incidence de la leptospirose en France métropolitaine | 54 |
| Figure 9. Cycle de transmission des leptospires pathogènes..... | 54 |
| Figure 10. Schéma des points de maintenance des leptospires | 56 |
| Figure 11. Facteurs de risques associés à la leptospirose | 57 |
| Figure 12. Facteurs influençant l'augmentation de l'incidence de la leptospirose humaine | 58 |
| Figure 13. Points de contrôles potentiels dans le cycle de transmission des leptospires pathogènes | 59 |
| Figure 14. Photo d'un Campagnol des champs | 63 |
| Figure 15. Photo d'un Campagnol terrestre..... | 64 |
| Figure 16. Cycle de pullulation des Campagnols terrestres | 64 |
| Figure 17. Photo d'un Rat brun | 65 |
| Figure 18. Répartition mondiale du rat brun | 65 |
| Figure 19. Photo d'un Rat noir | 66 |
| Figure 20. Répartition mondiale du rat noir | 66 |
| Figure 21. Exemples de titres d'articles liés aux problèmes causés par des rongeurs | 67 |
| Figure 22. Voies de passage de rongeurs | 73 |

| | |
|--|-----|
| Figure 23. Structures de différentes molécules d'AVKs..... | 78 |
| Figure 24. Structures des différentes vitamines K..... | 78 |
| Figure 25. Cycle de recyclage de la vitamine K..... | 81 |
| Figure 26. Mécanisme d'action des AVKs sur le cycle de la vitamine K..... | 82 |
| Figure 27. Mutations VKORC1 chez le rat brun en Europe | 85 |
| Figure 28. Mutations VKORC1 chez le rat brun en France | 85 |
| Figure 29. Mutations VKORC1 chez la souris domestique en France..... | 86 |
| Figure 30. Cartes de répartition des différents sites de piégeage des campagnols | 90 |
| Figure 31. Cartes du portage de leptospires et de mutations vkorc1 chez les Campagnols terrestres..... | 94 |
| Figure 32. Schéma présentant les points de gestion du cycle de transmission de la leptospirose sur le site de l'élevage | 114 |
| Figure 33. Carte de répartition des génotypes VKORC1 codants chez les 3 espèces commensales étudiées..... | 139 |
| Figure 34. Présentation des moyens de gestion de populations de rongeurs..... | 172 |

INDEX DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau 1. Nature et rôles des antigènes de leptospires pathogènes..... | 19 |
| Tableau 2. Liste non exhaustive de sérogroupes selon les trois espèces présentes en France métropolitaine..... | 20 |
| Tableau 3. Caractéristiques de classifications de leptospires | 21 |
| Tableau 4. Caractéristique de la leptospirose chez certaines espèces animales..... | 49 |
| Tableau 5. Liste de rongeurs non exhaustive et leur implication dans le cycle de la leptospirose | 62 |
| Tableau 6. Liste de pathogènes pouvant être transmis par les rongeurs | 68 |
| Tableau 7. Moyens de gestions de populations de rongeurs non chimiques et non létaux..... | 72 |
| Tableau 8. Présentation des différents types de lutte contre les rongeurs..... | 73 |
| Tableau 9. Les différentes PVKD connues à ce jour | 79 |
| Tableau 10. Description des facteurs de coagulation..... | 80 |
| Tableau 11. Caractéristiques de molécules AVKs chez le rat | 83 |
| Tableau 12. Mutations du gène <i>vkorc1</i> et niveaux de résistances à des molécules d'AVKs associées | 84 |
| Tableau 13. Nombre de campagnols terrestres capturés par zone de piégeage en Auvergne..... | 91 |
| Tableau 14. Nombre de campagnols des champs capturés par parcelle en Franche Comté..... | 92 |
| Tableau 15. Données sur le portage des leptospires par les Campagnols..... | 93 |
| Tableau 16. Caractéristiques des mutations <i>vkorc1</i> des Campagnols terrestres | 94 |
| Tableau 17. Fréquences alléliques des mutations <i>vkorc1</i> des campagnols terrestres | 94 |
| Tableau 18. Caractéristiques des mutations <i>vkorc1</i> trouvées chez les souris du site analysées | 114 |

Tableau 19. Caractéristiques des mutations codantes de vkorc1 139

INTRODUCTION GENERALE

I- Les leptospires

1. Morphologie et structure

a) Morphologie

Les leptospires font parties des bactéries à Gram négatif, de l'ordre des Spirochètes. Elles appartiennent à la famille des *Leptospiraceae* et au genre *Leptospira*. Les Spirochètes ont divergé rapidement durant l'évolution bactérienne (1,2) ce qui peut expliquer leurs particularités. En effet elles sont de forme hélicoïdale et sont longues (6 à 20 µm) (Figure 1). Elles sont très mobiles car elles ont deux flagelles situés dans l'espace périplasmique. Ceux-ci leur permettent d'échapper facilement au système immunitaire des organismes qu'elles infectent. Les protéines FlaA et FlaB forment respectivement l'enveloppe et le noyau des flagelles. Les leptospires sont fines avec un diamètre d'environ 0,1 µm.

Figure 1. Leptospires par balayage en microscopie électronique (3)

b) Structure

Les leptospires ont une double membrane entourant le peptidoglycane (Figure 2). Le peptidoglycane est une glycoprotéine, une molécule de la paroi cellulaire avec un squelette glucidique et des tétrapeptides latéraux. Sur la membrane externe des leptospires il y a plusieurs types de protéines de surface ainsi que leurs principaux antigènes, les lipopolysaccharides de surface ou LPS. Ces lipoprotéines ne sont présentes que sur la membrane externe des spirochètes pathogènes dont les leptospires (4).

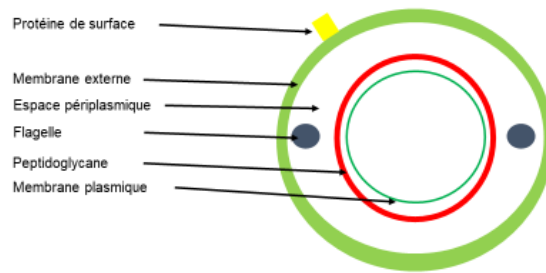


Figure 2. Schéma d'une coupe transversale d'un leptospire

c) Antigènes protéiques impliqués dans la virulence

Les hémolysines et les porines sont des facteurs de virulence. La mobilité en est également un (5). En effet l'inactivation de certains gènes impliqués dans la virulence baisse la pathogénicité. L'hème oxygénase (HemO) facilite l'acquisition d'hème de fer (6,7) et est impliqué dans la virulence. La catalase leptospirale KatE (8) et la chaperone moléculaire ClpB (9) sont impliquées dans la susceptibilité au stress oxydatif et dans la virulence. Les sphingomyélinases semblent également être impliquées dans la virulence même si cela n'a pas été démontré génétiquement (5).

d) Antigènes de surface

Il y a également des antigènes de surface situés sur la membrane externe des leptospires. Certains comme les protéines Lig (Tableau 1) sont impliqués dans les interactions avec les cellules des hôtes. Lip121 est reconnue par le système immunitaire de l'hôte pour la production d'anticorps spécifiques. La reconnaissance de certains antigènes par les anticorps est utilisée en sérologie. En effet la sérologie permet de classer les souches selon leurs antigènes de surface.

Tableau 1. Nature et rôles des antigènes de leptospires pathogènes

| ANTIGENE | CARACTERISTIQUES |
|---|--|
| LIPL32 (PROTEINE ASSOCIEE A L'HEMOLYSE 1) | <ul style="list-style-type: none"> - protéine la plus abondante du protéome des leptospires pathogènes - fixe la fibronectine et le collagène de type 4 |
| PROTEINES LEPTOSPIRALES IMMUNOGLOBULINE-LIKE (PROTEINES LIG) LIGA, LIGB ET LIGC DECRITES | <ul style="list-style-type: none"> - protéines très conservées et présentes dans toutes les souches pathogènes (10,11) - Interactions avec différentes protéines de la matrice extra-cellulaire des hôtes comme la fibronectine, le fibrinogène, le collagène et la laminine pouvant possiblement agir sur le processus de rattachement aux cellules des hôtes (12,13) |
| OMPL1 | <ul style="list-style-type: none"> - protéine de la membrane externe se fixant à la fibronectine, la laminine et plus efficacement au plasminogène (14) - quand elle est exprimée pendant une infection elle pourrait jouer un rôle dans la pathogénicité (15) |
| LIPL41 | <ul style="list-style-type: none"> - protéine très conservée (16,17) - protéine exprimée durant une infection et qui est exposée à la surface des leptospires pathogènes (18) |
| LIPL21 | <ul style="list-style-type: none"> - lipoprotéine exposée de surface importante - lors des infections cette protéine agit comme une adhésine et est spécifiquement reconnue par le système immunitaire de l'hôte pour la production d'anticorps spécifiques (19) |
| LIPL45 | <ul style="list-style-type: none"> - protéine de la membrane externe rapportée comme étant associée à la virulence et détectée uniquement dans souches à faible passage (20) - cette protéine serait un composant important dans processus d'infection et pourrait être un déterminant de virulence (21,22) |
| OMPL37 | <ul style="list-style-type: none"> - protéine exposée à la surface cellulaire des leptospires pathogènes, elle a affinité connue pour la peau et l'élastine vasculaire et pourrait être impliquée significativement dans le début du processus d'invasion (23) - l'expression de cette protéine serait régulée à la hausse durant l'infection (24) |

2. Classifications des leptospires

a) Classification et sérologie

Elle se base sur la structure des lipopolysaccharides de surface (LPS) et de leur réactivité vis-à-vis des anticorps anti-leptospires (25). Les souches sont réparties en plus de 300 sérovars. Le sérovar est l'unité taxonomique de référence, défini sur les différences du composé carboné du LPS identifié avec le Cross Agglutination Absorption Test (CAAT) (26). Les sérovars ayant des antigènes majeurs communs font partie du même séro groupe (27), il y en a 24 (28). Cette classification est indépendante, non corrélée à la classification génétique (1). En effet, deux sérovars d'espèces différentes peuvent appartenir au même séro groupe (26) de même que 2 espèces différentes peuvent intégrer un même sérovar, comme le montre le tableau 2. La classification sérologique est utilisée par les épidémiologistes et les cliniciens (28) mais elle est imprécise d'où la nécessité de développer une nouvelle classification.

Tableau 2. Liste non exhaustive de sérogroupes selon les trois espèces présentes en France métropolitaine

| Espèce | Sérogroupe principaux |
|--------------------------|---|
| <i>L. borgpetersenii</i> | Autumnalis, Pyrogenes, Sejroe et Tarassovi |
| <i>L. interrogans</i> | Autumnalis, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pyrogenes et Sejroe |
| <i>L. kirschneri</i> | Autumnalis, Cynopteri, Grippytyphosa et Icterohaemorrhagiae |

b) Classification génétique

La classification génétique se développe depuis une trentaine d'années, notamment suite aux évolutions technologiques ayant eu lieu dans les années 1990. Celles-ci permettent d'explorer les séquences de l'ADN et ainsi de pouvoir observer les différences entre deux organismes ou plus et d'identifier leurs particularités. La classification génétique qui se base sur le pourcentage d'hybridation ADN-ADN entre deux bactéries (26) a permis d'identifier pour le moment 22 espèces génomiques distinctes comme le montre le tableau 3. Ces espèces sont réparties en catégories de pathogénicité (29,30) :

- 10 sont pathogènes c'est-à-dire qu'elles peuvent infecter des animaux et des humains

- 5 sont intermédiaires ce qui signifie que leur pathogénie n'a pas été démontrée expérimentalement (25)
- 7 sont saprophytes et non pathogènes.

En France il y a 3 espèces pathogènes présentes : *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira interrogans* et *Leptospira kirschneri*. Cette classification est de plus en plus utilisée grâce aux méthodes de biologie moléculaire.

Tableau 3. Caractéristiques de classifications de leptospires

| Statut | Espèce | Sérogroupe | Sérovar |
|----------------------|----------------|---------------------|---------------------|
| Pathogène | alexanderi | Manhao | Manhao 3 |
| | alstonii | ND | Sichuan |
| | borgpetersenii | Sejroe | Sejroe |
| | interrogans | Icterohaemorrhagiae | Icterohaemorrhagiae |
| | kirschneri | Grippotyphosa | Vanderhoedoni |
| | kmetyi | ND | ND |
| | mayottensis | | |
| | noguchii | Panama | Panama |
| | santarosai | Tarassovi | Atlantae |
| | weilii | Celledoni | Celledoni |
| Intermédiaire | broomii | Undesignated | ND |
| | fanei | Hurstbridge | Hurstbridge |
| | inadai | Tarassovi | Kaup |
| | licerasiae | ND | Varillal |
| | wolffii | ND | ND |
| Saprophyte | biflexa | Semaranga | Patoc |
| | idonii | | |
| | meyeri | Semaranga | Semaranga |
| | terpstrae | ND | ND |
| | vanthielii | Holland | Holland |
| | wolbachii | Codice | Codice |
| | yanagawae | Semaranga | Saopaulo |

c) Diagnostic de la leptospirose, détection et caractérisation des leptospires

Cette partie a fait l'objet d'un article de revue intitulé : « Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and identify and type leptospires » présenté ci-dessous qui a été publié dans le journal International Microbiology.

Objectifs :

Cet article a pour but de regrouper les différentes méthodes utilisées en diagnostic de laboratoire pour la détection des leptospires pathogènes en cas de suspicion de leptospirose mais également de présenter les principales méthodes d'épidémiologie utilisées pour connaître les sérogroupes circulant dans l'environnement afin d'améliorer la couverture vaccinale en préventif.

Résumé :

La leptospirose est une zoonose virulente à répartition mondiale. Des Spirochètes pathogènes du genre *Leptospira* sont responsables de la maladie, et leurs principaux réservoirs animaux sont les rongeurs. Les contacts directs et indirects avec de l'urine infectée constituent les principales voies de transmission. L'insuffisance rénale et des avortements avancés sont fréquemment observés chez les animaux affectés par la leptospirose, ce qui provoque de graves problèmes pour les exploitations agricoles. Chez les humains, il y a un haut taux de mortalité (10%), et les agriculteurs et les personnes en contact avec de l'eau sont fréquemment exposés. Toutefois, des vaccins et des mesures strictes de prévention confèrent une protection contre la leptospirose. Des tests sérologiques facilitent la détection et l'identification de souches de leptospires. Ces tests sont basés sur la reconnaissance d'antigènes spécifiques de surface et sont utilisés pour des analyses cliniques. Pour déterminer quelles souches circulent dans l'environnement, les leptospires doivent être typées. Des méthodes moléculaires, comme des techniques de restrictions enzymatiques et le séquençage de régions spécifiques, permettent l'identification de sérovar. Malheureusement, malgré le fait qu'il y ait beaucoup de techniques, elles ne sont pas très efficaces, et donc, de nouvelles méthodes doivent être développées. Avec l'avènement du séquençage génomique, une importante quantité d'informations concernant les génomes de leptospires est maintenant disponible, facilitant la sélection de régions distinguant les souches. Le typage est important pour des fins épidémiologiques, des analyses cliniques et la mise à jour des vaccins.

ARTICLE 1

Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and identify and type leptospire

Aurélie MARQUEZ (USC 1233 INRA/VAS, Établissement Vetagro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Étoile, France)

Zoheira Djelouadji (USC 1233 INRA/VAS, Équipe Leptospire, Campus de Lyon, Marcy L'Étoile)

Virginie LATTARD (USC 1233 INRA/VAS, Équipe Anticoagulants, Campus de Lyon, Marcy L'Étoile)

Angéli KODJO (USC 1233 INRA/VAS, Équipe Leptospire, Campus de Lyon, Marcy L'Étoile, France)

Summary

Leptospirosis is a virulent zoonosis with a global distribution. Pathogenic spirochetes of the genus *Leptospira* are responsible for this disease, and the primary animal reservoirs are rodents. Direct and indirect contact with infected urine constitutes the main route of transmission. Renal failure and advanced abortions are frequently observed in animals affected by leptospirosis, causing serious problems for farms. In humans, there is a high rate of mortality (10 percent), and farmers and persons in contact with water are frequently exposed. However, vaccines and strict prevention measures confer protection against leptospirosis. Serological tests facilitate the detection and identification of leptospire strains. Such tests are based on specific surface antigen recognition and are used for clinical analyses. To determine which serovars circulate in the environment, leptospire must be typed. Molecular methods, such as restriction enzyme-based techniques and the sequencing of specific regions, permit serovar identification. Unfortunately, although there are numerous techniques, they are not very efficient, and thus, new methods must be developed. With the advent of genomic sequencing, a substantial amount of information regarding leptospire genomes is now available, facilitating the selection of regions to discriminate between strains. Typing is important for both epidemiologic purposes and clinical analyses.

Introduction

Leptospirosis is a worldwide zoonosis [28] and is considered a re-emerging disease [9]. Leptospirosis affects a large variety of animal species, including humans [9, 28], and is caused by leptospire [2, 28], which are bacteria that belong to the order *Spirochaetae*. The primary reservoirs are rodents, particularly rats [2, 28, 38, 54]. Generally, these pathogens are carried asymptomatically in the kidney or liver. However, leptospire cause internal injuries to rats, such as lymphoplasmocytic inflammatory infiltration and cell hyperplasia, which have been observed in kidney tubules [5, 33, 49]. Various wildlife species, such as coypus and small mammals (hedgehogs, badgers, etc.), [58] contribute to the environmental persistence and dissemination of leptospire. Many studies have investigated the leptospire carrier status of small mammals [45, 50]. Animal reservoirs accumulate leptospire in their kidneys before excreting them into urine. Contamination-sensitive animals and humans primarily acquire leptospire via indirect contact with infected urine in water and in the environment [9]. However, direct contamination may also occur. The most frequently exposed people are farmers and those who professionally practise aquatic leisure activities. In other populations, the incidence of acquired leptospirosis has begun to decrease.

Leptospirosis presents a wide array of symptoms [28], ranging from benign to major disorders and infections. In animals, leptospire provoke symptoms such as abortion or milk-drop syndrome, which result in significant economic losses for breeders. Human infections are characterised by fever, renal failure or hepatic failure. In some cases, meningitis and pulmonary haemorrhages occur. Overall, the global mortality rate is estimated at approximately 10%, with a maximum of up to 25% in developing countries. Outbreaks are frequently observed in tropical regions, particularly in India [25] and Brazil [32]. Furthermore, the incidence of this disease is increasing in certain tropical regions, such as Malaysia [8]. The World Health Organisation (WHO) estimates the number of severe human cases at approximately 1,000,000 per year [14, 21]. Among European countries, France is the most heavily affected with 600 cases per year, which is the highest number in overseas territories.

The control of leptospirosis is complicated due to the large number of serovars, infection sources and variable transmission conditions. Furthermore, control is dependent on local environmental conditions (moisture, temperature, etc.). Control is achieved by regulating reservoirs or reducing infection in animal reservoir populations, such as in dogs or livestock, in addition to human vaccination. To achieve vaccine efficiency, the serovars circulating in a particular region must be identified. Currently, there are only 2 commercially available

inactivated human vaccines. The Cuban vaccine (Vax Spiral®) contains whole bacterial cells of the Canicola, Icterohaemorrhagiae and Mozdok serovars, whereas the French vaccine (Spiroleptc®) contains only inactivated Icterohaemorrhagiae cells. In animals, vaccination is available for livestock and dogs, and the composition of commercially available vaccines depends on locally circulating serogroups and regulatory administration. In Europe, the available formulations for livestock contain the unique serovar Hardjo. In the United States, vaccines used on pig farms contain either the single serovar Hardjo or five serovars including Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae and Hardjo. In New Zealand, vaccines are composed of 2 serovars, Hardjo and Pomona, or 3 serovars, comprising Hardjo and Pomona as well as Copenhageni. Dog vaccination includes 2 (Canicola and Icterohaemorrhagiae), 3 (Canicola, Icterohaemorrhagiae, and Grippotyphosa), or 4 serovars (Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, and Pomona or Australis depending on the continent). A recently manufactured horse vaccine derived from Pomona bacterin is currently available in the United States. Generally, Bratislava, Pomona and/or Tarassovi are included in commercially available swine vaccines, which are part of the recommended vaccination programmes for pig farms in the United States, Australia and New Zealand.

In both humans and dogs, penicillin and doxycycline are used to treat leptospirosis, but their efficacy is low if administered late during disease. Streptomycin is recommended by the World Organisation for Animal Health (OIE) for the treatment of leptospirosis in horses, cattle and other farm animals.

Leptospire must be detected quickly due to the risks of infection and for epidemiologic studies. However, there is no rapid detection method for leptospire. It is possible to perform serologic tests on blood samples obtained during the first week of infection, but testing rarely occurs. Thus, the number of infections induced by leptospire is likely underestimated.

Leptospire, the causative agents of Leptospirosis

Weil described leptospirosis as severe jaundice in 1886; Weil's disease was characterised by renal failure and severe haemorrhage [4, 41]. However, he did not isolate or identify the causative agent.

Several years later, in 1914, Inada and Ido were the first scientists to identify leptospire after they inoculated a guinea pig liver with the blood of a patient suffering from jaundice and observed a spirochete, naming it *Leptospira haemorrhagiae*. In 1915, they published a paper

describing their discovery and suggested this spirochete as the causative agent of Weil's disease [26].

Leptospire are long and motile bacteria. They have a diameter of 0.1 μm and are 6 to 20 μm in length. The ends of the bacteria are hooked. In the periplasmic space, two flagella are responsible for motility. The flagella are composed of the FlaA and FlaB proteins [2]. Additionally, leptospire have a double membrane structure: an outer membrane that envelops the cytoplasmic membrane and a peptidoglycan cell wall [15]. The outer membrane is composed of lipopolysaccharides (LPS), which are the primary leptospire antigen. Many of the structural and functional proteins found in this membrane are lipoproteins (LipL32, LipL21 and LipL41), integral membrane proteins and the type two secretion system (T2SS) protein secretin.

Leptospire are obligate aerobes and grow optimally at 30°C in medium containing vitamins B1 and B12, ammonium salts and long-chain fatty acids as the sole carbon source. These acids are metabolised via beta-oxidation [18]. Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium containing oleic acid, bovine serum and polysorbate is often used in culture.

One-percent sodium hypochlorite solutions, 70% ethanol, iodine-based and quaternary ammonium disinfectants, 10% formaldehyde, detergents and acids are used to disinfect and inactivate leptospire. Leptospire are sensitive to moist heat (121°C for a minimum of 15 minutes) and are killed by Pasteurisation according to a guideline from the Centre for Food Security and Public Health (CFSPH).

Leptospire are detectable in urine and tissues using culture, dark field microscopy (DFM), immuno-staining or PCR techniques [9, 18, 28]. However, leptospirosis diagnosis is difficult due to the wide diversity of symptoms associated with the disease. The quality of diagnosis depends on the analytical parameters. The degree of precision of specific antibody detection tests such as immuno-specific enzymatic assays (ELISAs) or micro-agglutination tests (MATs) represents an important bias because greater or diminished sensitivity determines the relevance of the results; therefore, the choice of test is an important parameter that must be considered. PCR assays to detect the 16S rRNA gene are efficient during early infection [31].

Classifications: nomenclature

In 1907, Stimson discovered a spirochete in the kidney of a patient that died from yellow fever. He named the bacteria *Spirochaeta interrogans*. Until 1989, leptospire were classified as one

of two species: saprophytic (*Leptospira biflexa*) and pathogenic (*Leptospira interrogans*) [28]. These 2 species were distinguished by serological classification based on their LPS structure and strain reactivity against antibodies; LPS carbohydrate fragments give rise to antigenic diversity. A serogroup includes serovars with overlapping antigenic factors [17]. Cross agglutination absorption test (CAAT) analysis, which involves the recognition of antibodies with associated antigens, facilitates the identification of a strain serovar or the comparison of two or more strains. Two strains with more than 10% heterogeneity are considered associated with different serovars. More than 300 serovars have been identified to date [53]. The serovar Icterohaemorrhagiae is most frequently implicated in human infections. Serovars have been grouped into 24 leptospire serogroups. Both serogroups and serovars are determined using a serology reference test and a MAT. These methods will be discussed in detail in this article.

To identify circulating serovars in different regions, different typing methods are employed. It is important to characterise serovar distribution for epidemiologic purposes and vaccine design.

Leptospire genomic classification is based on DNA-DNA hybridisation and has permitted the separation of the two previously described species into 22 distinct genomospecies. The genus *Leptospira* is composed of 10 pathogenic species, 5 potentially pathogenic species (also called intermediate) and 7 saprophytic species [2, 11] (Table 1).

Table 1: Genomic species of genus *Leptospira* and associated reference strains

| Categories | Species | Serogroup | Serovar | Type 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 | L60 |
| | <i>L. alstonii</i> | ND | Sichuan | 79,601 |
| | <i>L. kmetyi</i> | ND | ND | Bejo-Iso 9 |
| | <i>L. mayottensis</i> | - | - | 200901116T |
| 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. fanei</i> | Hurstbridge | Hurstbridge | BUT6 |
| | <i>L. broomii</i> | Undesignated | ND | 5399 |
| Saprophyte | <i>L. wolbachii</i> | Codice | Codice | CDC |
| | <i>L. meyeri</i> | Semarang | Semarang | Veldrat |
| | <i>L. biflexa</i> | Semarang | Patoc | Patoc I |
| | <i>L. vanthielii</i> | Holland | Holland | WaZ Holland |
| | <i>L. terpstrae</i> | ND | ND | LT 11-33 |
| | <i>L. yanagawae</i> | Semarang | Saopaulo | Sao Paulo |
| | <i>L. idonii</i> | - | - | Eri-1 (T) |

Leptospire species are geographically distributed. For example, in metropolitan France, leptospirosis in both humans and animals is attributable to strains belonging either to *Leptospira interrogans*, *Leptospira kirschneri* or *Leptospira borgpetersenii*. Genomic and serological classifications are independent and uncorrelated, but a species name and serovar name must be given for a characterised strain.

A large variety of methods have been used to characterise the serologic and genomic diversity of leptospire strains. These methods are useful for epidemiologic purposes and to track outbreaks. The first techniques were developed to identify and type leptospiral isolates because the information provided by serological classification was insufficient. This review will list and

explain the diagnostic and typing methods used for leptospiral analysis and serovar discrimination because serovars are the taxonomic reference units.

Laboratory diagnosis of Leptospirosis

Direct observation

When leptospirosis is suspected due to symptoms such as renal insufficiency, patient blood, cerebrospinal fluid and urine samples are observed under a microscope to detect the presence of bacteria. Leptospire are easily and quickly detected, allowing serologic tests to be avoided. Furthermore, it is possible to administer specific treatments to patients in a short period of time. However, if the bacterial numbers are low, bacteria may not be observed in samples, and thus, other test are required (culture, PCR, and serology). Notably, the direct observation of leptospire requires technical skill. Therefore, this method is not routinely employed.

Culture in specific medium

Leptospire replicate in media enriched with B1 and B12 vitamins, long-chain fatty acids and ammonium salts [2]. Usually, cultures in EMJH medium are performed to detect leptospire in fresh tissues, blood or urine, but leptospire must be cultured before antibiotic treatment is applied. Some contaminants are inhibited by 5-fluorouracil [24, 37], although its limited antibacterial spectrum permits other contaminants to grow [52, 59, 65]. Other antimicrobial agents are also applicable [18, 28]. Cultures are incubated for up to 13 weeks at 30°C and regularly examined by DFM to determine if a sample is negative for leptospire. As such, cultures are not useful as a routine diagnostic test for individual patients, but they allow strains to be isolated and analysed for epidemiological studies.

Serology

MATs for routine analyses

To detect leptospirosis, specialised laboratories perform MATs on patient sera. MATs involve the detection of leptospire-specific patient antibodies that recognise antigens from known strains. This recognition results in agglutination that is observable by DFM. Several serogroups are routinely tested. The MAT test determines the serogroup but is not sufficiently precise to

identify serovars because cross-reactivity frequently occurs between serovars within a given serogroup as well as between serogroups. As a serological reference test, the MAT test is highly sensitive and specific but requires live cultures of different serovars from specific geographical areas as controls. Furthermore, this technique does not discriminate between antibodies derived from infection or vaccination, and thus, it is important to know the vaccination history of the patient, including for the veterinary diagnosis of animal leptospirosis because vaccination is widely spread, particularly in dogs. Certain quality assurance programmes, such as the International Leptospirosis MAT, are endorsed by the International Leptospirosis Society (ILS) to ensure reliability and standardisation between laboratories.

ELISA

ELISA tests involve the detection of leptospire-specific IgM and/or IgG in patient sera. This test is advantageous in that it does not require the maintenance of live cultures. Although ELISA tests detect leptospire-specific antibodies, results must be confirmed by MAT tests. Therefore, ELISA tests alone do not assure a definitive diagnosis. ELISAs have been developed for numerous antigen preparations and for leptospiral recombinant lipoproteins, such as LipL32 or LigA. IgM is detectable 5 to 7 days after infection; thus, ELISA assays must be performed at the proper time, resulting in a certain degree of difficulty [1, 7, 44, 47] (Table 2).

Table 2. Comparison of MAT, ELISA and Immunomigration sensitivity and specificity values in percentages

| Days | Sensitivity | | Specificity | | Sensitivity | | Specificity | | Sensitivity | Specificity |
|-----------|-----------------|---------------|-----------------|-----------------|-------------|-------|-------------|-------|-----------------|-----------------|
| | MAT | ELISA | MAT | ELISA | MAT | ELISA | MAT | ELISA | Immunomigration | Immunomigration |
| 1-7 | 41 | 71,1 | / | 86,4 | / | 86,5 | 97,3 | 97 | 98 | 93,5 |
| 8-30 | 82 | 88,2 | | 85,8 | 48,7 | 48,7 | | | | |
| >30 | 96 | 76,2 | | 95,5 | 93,8 | 75 | | | | |
| Reference | [48] | | | | [7] | | | | [28] | |
| Days | MAT | ELISA | MAT | ELISA | MAT | ELISA | MAT | ELISA | | |
| 1-7 | 65,6 et 54,9 | 83 et 85,7 | 97,7 et 97,3 | 98,5 et 99,1 | 30 | 52 | 99 | 95 | | |
| 8-30 | | | | | 63 | 89 | 98 | 98 | | |
| >30 | | | | | 76 | 93 | 97 | 94 | | |
| Reference | [47] | | | | [16] | | | | | |

Immunofluorescence to detect leptospire

The principle underlying immunofluorescence is the recognition of a leptospiral surface protein, such as OmpL54 [40], by specific antibodies. Secondary antibodies coupled to a fluorescent stain then bind host-specific antibodies. When samples are observed under a fluorescence

microscope, bacterial profiles are detectable. This assay facilitates the rapid identification of leptospires and requires the availability of leptospiral OmpL54-specific antibodies, which recognise surface-exposed protein epitopes. However, these antibodies may not recognise surface protein epitopes in the context of recombinant proteins.

Immunomigration

Rapid immunomigration tests permit the detection of IgM antibodies against pathogenic leptospires in dogs with suspected leptospirosis [27]. This test is performed on blood, plasma and serum samples. The samples and chase buffer are deposited on a test strip and migrate to a line where their antigens are impregnated. If there is sufficient anti-leptospira IgM present in the sample, antibody-antigen complexes accumulate, and a visible coloured band appears. The results are read in ten minutes. Clinical signs exhibited by a dog in association with test positivity indicate clinical leptospirosis. Notably, this test does not detect vaccine-induced antibodies. Furthermore, the test is advantageous in that it may be performed in vet clinics. However, the test may be negative during the very early stage of infection due to low antibody levels. Additional serological tests should then be performed. Importantly, immunomigration tests do not provide information on infecting serovars. Therefore, this test has no epidemiological value and should be reserved only for in-clinic utilisation.

PCR methods

Classic PCR

A PCR assay involving the amplification of an *rrs* gene fragment has been developed, permitting the identification of bacterial strains from the genus *Leptospira*; DNA from other spirochetes, such as *Borrelia*, is not amplified. This method is applicable for blood, urine and tissue samples [31]. The PCR amplification of ribosomal RNA 16S subunit sequences identified by Mérien et al. in 1992 provides highly significant results for leptospire detection and species identification but not for serovar classification. To distinguish between pathogenic and non-pathogenic strains, the amplified DNA should be sequenced.

It is feasible to sequence a whole bacterial genome and compare it to a database to determine whether it is a leptospire, but this test is not used routinely.

Detection of leptospires by real-time PCR

Currently, it is possible to diagnose leptospirosis from paired serum samples by detecting seroconversion in conjunction with the MAT test. PCR assays were developed due to the need

for a rapid and precise molecular diagnostic to detect pathogenic leptospires. Classic PCR analyses, particularly sequencing, are time consuming, which is problematic if rapid diagnosis is required. Medical and veterinary practitioners must be informed early in the case of infection. Thus, real-time PCR assays are specialised to target different genes to distinguish between pathogenic or non-pathogenic leptospires via simple curve interpretation. SYBR Green fluorescence assays utilising the *lipL32* gene, which encodes the outer membrane LipL32 protein, employ a target sequence of 423 base pairs [22] due to gene conservation among pathogenic serovars. Analytical tests are performed on human serum and urine [29] and animal urine, blood, serum and kidney samples. Assays employing the *secY* gene have also been performed; all 56 strains tested were amplified. The advantages of this method include its speed, quantitative results, minimal sample contamination, high sensitivity and specificity and standardisation. However, it is expensive and requires specific materials [34].

Serotyping

Serotyping is important in epidemiology because it allows the identification of the serogroup or serovar carried by an animal reservoir [11]. MAT is used for epidemiologic purposes to identify unknown strains. In this test, a panel of serovar-specific antibodies produced in rabbit serum is tested against a sample to observe any agglutination. The strain in a sample belongs to the serovar demonstrating agglutination; if there is more than one agglutination reaction, the sample belongs to the serogroup demonstrating the highest antibody titres. This method requires the growth of bacteria to obtain sufficient concentrations for testing.

Molecular methods to type leptospires

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) techniques

The restriction endonuclease analysis (REA) method has been extensively used as a molecular typing method to differentiate between bacterial strains [19, 46]. Restriction enzyme methods allow the direct comparison of strain profiles in agarose or acrylamide gels. Briefly, total bacterial DNA undergoes endonuclease restriction by endonucleases followed by fragment separation on gels. It is difficult to detect polymorphisms in total genomes, and therefore, alternative methods, such as PCR amplification followed by restriction enzyme adjunction, have been developed. For example, *EcoRI* and *HhaI* have been used to type *Leptospira*

interrogans [63]. DNA fragments are separated in an agarose gel, facilitating the detection of several zones associated with polymorphisms. The method is able to differentiate between 29 serovars [16, 43]; there are no differences between two strains belonging to the same serovar [63]. Furthermore, this method is used to characterise pathogenic species but not saprophytes. Advantageously, DNA sequences are not required, costs are lower than MAT, and results are easily reproducible [16].

RFLP analysis of rRNA genes is used for to identify and characterise leptospire species in sample isolates [23, 39], a technique called ribotyping. Ribotyping permits determination at the species level but not the subspecies level, e.g., serovars [51]. Extracted DNA is digested by one or more restriction enzymes. Fragments are separated on an agarose gel, and the denatured DNA is hybridised to a membrane with a 16 rRNA probe. Variations are introduced by alternating the restriction enzymes, resulting in a bank of profiles for each enzyme. Ribotyping correlates well with the phylogenetic classification of 11 leptospire species. The use of three restrictions enzymes with PCR products generates patterns that permit serovar discrimination. However, this method does not distinguish between the Icterohaemorrhagiae and Copenhageni serovars, which is problematic in epidemiologic investigations [23]. Additionally, designed primers do not discriminate between pathogenic and non-pathogenic species of leptospires. Therefore, this assay does not detect sample contamination by saprophytic bacteria. The primers designed by Gravekamp et al. in 1991 do not amplify *Leptospira kirschneri* serovars. Therefore, two pairs of primers must be used to detect all leptospire serovars [12]. rRNA RFLP is performed to generate bacterial phylogenetic trees. It is possible to PCR amplify fragments of interest before performing RFLP to ensure protocol optimisation, thus permitting readable bands to be obtained.

Amplification fragment length polymorphism (AFLP) involves the PCR amplification of restriction fragments selected from total genomic DNA [55]. The protocol consists of three steps. First, DNA matrix restriction and adapter ligation are performed. Second, restriction fragment sets are amplified. Finally, amplified fragments are analysed on a gel to read the results. The adapter and restriction site sequences are target sites for primer annealing at the end of PCR amplification of restriction fragments, at which point the primers amplify only nucleotides in close proximity to restriction sites. Using this method, it is possible to study restriction fragments without knowing their nucleotide sequences. Many fragments undergo co-amplification, and approximately 50 to 100 restriction fragments may be analysed simultaneously on polyacrylamide gels depending on the capacity of the detection system.

Samples are grouped by computers for analysis, although this approach requires large amounts of purified DNA. Additionally, this technique permits the study of DNA of various origins.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

PFGE is the standard method for molecular typing and involves the in-gel enzymatic digestion and electrophoretic separation of different DNA fragments. Both DNA liberation after cell lysis and DNA digestion are performed in a gel after embedding bacteria in agarose. Enzymes such as *NotI* cut rare DNA sequences, generating high-molecular-weight fragments, which are further separated by pulsed-field electrophoresis. This facilitates the simple comparison of profiles and therefore it is the reference method for typing. PFGE is a powerful method for species identification. To increase the efficiency of this technique, scientists have developed gel analysis software to compare strain profiles between laboratories using dendrograms [20]. However, this method does not work when there are fewer than 3 generated fragments. Additionally, approximately 10 percent of serovars cannot be identified [20]. *Leptospira* are difficult to culture, causing difficulty when an environmental strain must be isolated and cultured for PFGE. Furthermore, PFGE requires a whole bacterial genome to identify the serovar of a strain.

Insertion sequence (IS) typing methods

IS elements are useful for typing, particularly for epidemiologic purposes. The first element identified for pathogenic *Leptospira interrogans* was IS1500, which has been found in two closed serovars. Nucleotide sequence revealed a 1236-bp element surrounded by a 1159-bp region containing four open reading frames (orfA-orfD). This sequence has been found in all pathogenic strains but not in saprophytes such as *Leptospira biflexa* [10]. Therefore, it is valuable for the identification of pathogenic *Leptospira*. The second IS, IS1502, contains 19 ORFs [64]. IS1502 is found only in some strains. Additionally, IS1533 was identified in *Leptospira borgpetersenii* [61] and is used to identify leptospire serovars.

Arbitrarily primed PCR (AP PCR) [56] and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) [57]

These two methods are based on hazard priming PCR and allow the rapid identification of species as well as serovar comparison [13]. These techniques were used for epidemiologic studies in India [36]. Briefly, primers with arbitrary sequences that have few chances of undergoing auto-amplification and variable G-C percentages (between 40 and 80%) are chosen.

For AP PCR, bacterial DNA is amplified by performing low stringency PCR, which, in contrast to high stringency PCR, consists of decreasing hybridisation temperatures and increasing concentrations of MgCl₂ in the reaction mix. After the amplification of sequence targets by PCR with these primers, the results are read on an agarose or polyacrylamide gel. Forty-eight reference leptospiral strains have been classified using AP PCR [42]. For the RAPD method, one pair of primers is used to amplify random DNA fragments. Although they are highly efficient, these tools demonstrate weak value for serovar typing because of their low reproducibility.

Variable number tandem repeat (VNTR)

The VNTR method was developed for epidemiologic studies to speculate on strain circulation between animal species in the environment. VNTR describes the profiles of 94 serovars based on the repetition of short sequences located in three to five genomic regions (Figure 1). These genomic regions consist of short patterns repeated different numbers of times depending on the locus, and the number of repetitions is serovar-specific. DNA extracted from samples is amplified by PCR with specific primer pairs for each locus. Then, the samples are run on an agarose gel using low voltage for four hours to ensure maximum precision. The profiles are read using UV and compared with known profiles in a database to deduce the infecting serovar. VNTR was used to define a new and unique group of *Leptospira interrogans* serovars, called Pomona, in California sea lions [62]. VNTR is reproducible, easily standardised, and permits the identification of strains from three species, specifically *Leptospira interrogans*, *Leptospira borgpetersenii* and *Leptospira kirschneri*, which are the only species present in France according to a recent study of 28 wild species [6].

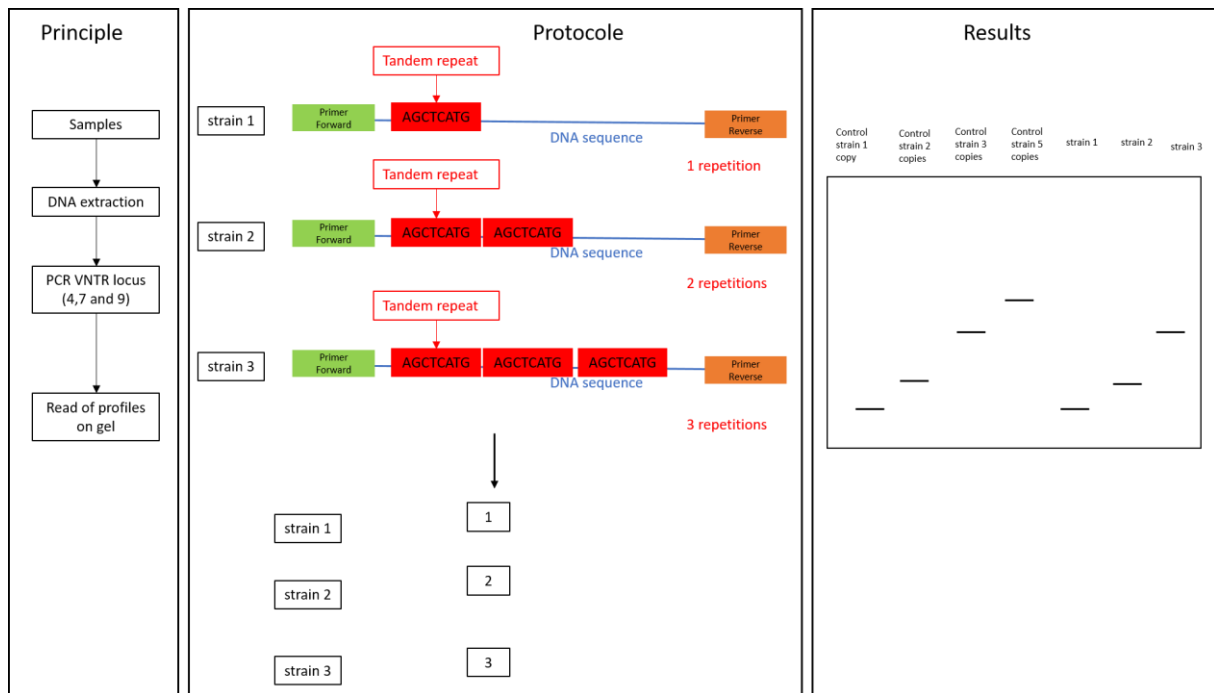


Figure 1. Schema of Variable Number Tandem Repeat (VNTR)

Multi-locus VNTR analysis (MLVA)

MLVA was initially developed to study strains from the *Leptospira interrogans* serovar Australis in Australia. Scientists searched for tandem repeat sequences in the genome of the strain *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni strain Fiocruz L1-130 [35] and evaluated them for diversity. They selected six loci for analysis and identified thirty-nine distinct patterns within thirty-nine reference strains. When applied to serovar Australis, three clusters were distinguished from different animal and human hosts.

MLVA was further applied in Argentina to analyse the relationships between leptospire infections over 45 years. Researchers studied genetic diversity in a collection of 16 strains of *Leptospira interrogans* serovar Pomona and analysed 7 loci using VNTR as described by Majed et al. [30]. The VNTR4 locus presented four different alleles that demonstrated the highest diversity within the tested group of loci. Clustering analysis permitted four new MLVA genotypes to be distinguished, one of which dominated over the other three. Like VNTR, this method is useful for both diagnostic and epidemiological analyses.

Multi-locus sequence typing (MLST)

MLST is a method based on the PCR amplification of DNA sequences to study the allelic diversity of selected genes. There are two types of MLST. MLST was first developed to genotype leptospires based on the DNA sequences of 4 housekeeping genes and two gene

candidates: *adk*, *icdA*, *lipL32*, *lipL41*, *rrs* and *secY*. Scientists analysed a set of 120 strains and 41 references from different locations and found the six most variable genes included *adk*, *icdA* and *secY* [3]. Another study identified *pntA*, *sucA*, *pfkB*, *tpiA*, *mreA*, *glmU* and *fadD* [48]. This method, which is used to identify clusters among outbreak isolates, does not require much purified DNA, offering an advantage. However, MLST does not differentiate between serovars Copenhageni and Icterohaemorrhagiae. Despite this shortcoming, it is useful as a routine technique to easily obtain and interpret results.

Multi-spacer typing (MST)

MST was developed to type strains from the genomic species *Leptospira interrogans* and has been employed to identify four dominant serovars in France, specifically, Icterohaemorrhagiae, Australis, Canicola and Grippotyphosa [60]. This technique involves the sequencing of 3 intergenic regions with low selection pressure but with punctual mutations (Figure 2). A genotype number is assigned to the sequence for each region, and a profile is generated for each strain. MST can differentiate between the serovars Copenhageni and Icterohaemorrhagiae. Furthermore, it has been developed for 33 strains that each have been assigned a specific number for each genotype by region and is thus useful for epidemiologic analyses.

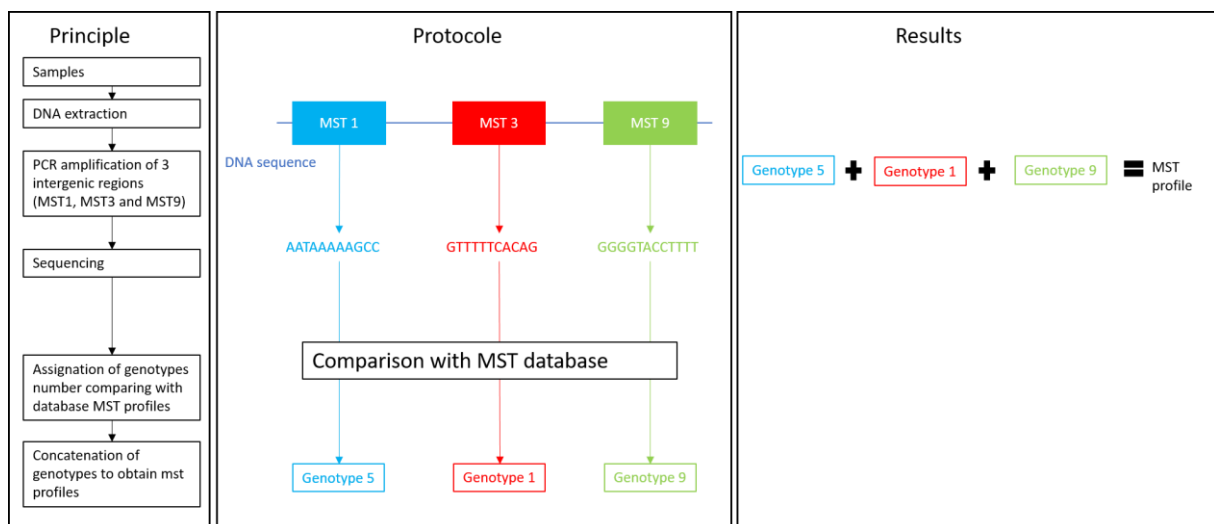


Figure 2. Schema of Multi Spacer Typing

Conclusions

Leptospirosis is an underestimated disease. With current global warming and climate change conditions, the expansion of leptospire appears more favourable. Infections by these bacteria are highly virulent, particularly in poor countries. Indeed, the development of suburbs and

sanitary measures has brought rodents, such as rats, into close contact with humans. The subsequent exposure of populations to leptospirosis agents increases the risk of contamination. Wet weather and contact with puddles promote the cycle of contamination. As mentioned above, wildlife are important maintaining and contaminating of domestic animals, and studies have been conducted to elucidate their role in the leptospirosis cycle. Overall, this pathogen is of great concern and threatens all populations around the world. However, it is unclear whether we possess the tools to combat and prevent leptospirosis. Typing is very important for epidemiologic studies. Knowledge of the serovars circulating in different regions allows us to adapt prevention measures. It is essential to obtain this information to develop efficient vaccines. To prevent leptospirosis, vaccines are available for humans and domestic dogs, cattle and horses. Clinically, these vaccines hold no real value because antibiotics are used to treat all serovars. However, not all serovars possess equivalent virulence, and thus, it is important to characterise the pathogenicity of different serovars.

In conclusion, leptospirosis is an important pathological disease caused by a virulent bacterium. Leptospire colonise many animal species, and there is a large variety of potential hosts in which they can proliferate. Additionally, these bacteria can survive for long periods of time in water and affect many organisms over time. Infections are becoming more severe and are responsible for serious adverse outcomes, affecting persons and animals all over the world. In poor countries, humans come into contact with rats and are readily exposed to leptospirosis due to a lack of hygiene and proximity to waste. The diagnosis of the disease represents a significant problem because bacterial isolation is often required. This step presents real difficulties because leptospire are very fragile, and cultures derived from biological specimens, particularly from animals, may be contaminated. Therefore, molecular methods have attracted great interest in the past decade. However, all typing methods possess certain limitations, specifically the requirement for a large quantity of purified DNA, which is usually difficult to obtain from field samples. Thus, we must continue to develop the sensitivity of these tools.

Acknowledgements

We would like to thank support programme of USC 1233 INRA/VAS and all members of this unit. We would like to thank American Journal Experts for their expertise in english correcting and editing.

Competing interests

None declared.

References

1. Adler B, Murphy AM, Locarnini SA, Faine S (1980) Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 11:452–457
2. Adler B, de la Peña Moctezuma A (2010) *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol* 140:287–296
3. Ahmed N, Devi SM, Valverde M de los A, Vijayachari P, Machang'u RS, Ellis WA, Hartskeerl RA (2006) Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5:28
4. Areal VM (1962) The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *Am J Pathol* 40:393
5. Athanazio DA, Silva EF, Santos CS, Rocha GM, Vannier-Santos MA, McBride AJA, Ko AI, Reis MG (2008) *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Trop* 105:176–180
6. Ayrál F, Djelouadji Z, Raton V, Zilber A-L, Gasqui P, Faure E, Baurier F, Vourc'h G, Kodjo A, Combes B (2016) Hedgehogs and Mustelid Species: Major Carriers of Pathogenic *Leptospira*, a Survey in 28 Animal Species in France (2012–2015). *PloS One* 11:e0162549
7. Bajani MD, Ashford DA, Bragg SL, Woods CW, Aye T, Spiegel RA, Plikaytis BD, Perkins BA, Phelan M, Levett PN, Weyant RS (2003) Evaluation of four commercially available rapid serologic tests for diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol* 41:803–809
8. Benacer D, Thong KL, Min NC, Verasahib KB, Galloway RL, Hartskeerl RA, Souris M, Zain SNM (2016) Epidemiology of human leptospirosis in Malaysia, 2004–2012. *Acta Trop* 157:162–168
9. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM (2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis* 3:757–771

10. Boursaux-Eude C, Saint Girons I, Zuerner R (1995) IS1500, an IS3-like element from *Leptospira interrogans*. *Microbiol Read Engl* 141 (Pt 9):2165–2173
11. Cerqueira GM, Picardeau M (2009) A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol* 9:760–768
12. C Gravekamp HV de K (1993) Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *Journal of General Microbiology*, 139, 1691-1700. *J Gen Microbiol* 139:1691–700
13. Corney BG, Colley J, Djordjevic SP, Whittington R, Graham GC (1993) Rapid identification of some *Leptospira* isolates from cattle by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 31:2927–2932
14. Cosson J-F, Picardeau M, Mielcarek M, Tatard C, Chaval Y, Suputtamongkol Y, Buchy P, Jittapalpong S, Herbreteau V, Morand S (2014) Epidemiology of leptospira transmitted by rodents in southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2902
15. Cullen PA, Haake DA, Adler B (2004) Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol Rev* 28:291–318
16. Ellis WA, Montgomery JM, Thiermann AB (1991) Restriction endonuclease analysis as a taxonomic tool in the study of pig isolates belonging to the Australis serogroup of *Leptospira interrogans*. *J Clin Microbiol* 29:957–961
17. Evangelista KV, Coburn J (2010) *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol* 5:1413–1425
18. Faine S (1999) *Leptospira* and leptospirosis. MediSci, Melbourne, Australia
19. Feresu SB, Bolin CA, Korver H, Van de Kemp H (1995) Identification of leptospires of the Pomona and Grippotyphosa serogroups isolated from cattle in Zimbabwe. *Res Vet Sci* 59:92–94
20. Galloway RL, Levett PN (2008) Evaluation of a Modified Pulsed-Field Gel Electrophoresis Approach for the Identification of *Leptospira* Serovars. *Am J Trop Med Hyg* 78:628–632

21. Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho ALF, Aires TSF, Villasboas-Bisneto JC, Queirroz A, Santos AC, Salgado K, Reis MG, Ko AI (2008) Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis* 14:505–508
22. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA (2000) The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. *Infect Immun* 68:2276–2285
23. Hookey JV (1993) Characterization of Leptospiraceae by 16S DNA restriction fragment length polymorphisms. *J Gen Microbiol* 139:1681–1689
24. Johnson RC, Rogers P (1964) 5-FLUOROURACIL AS A SELECTIVE AGENT FOR GROWTH OF LEPTOSPIRAE. *J Bacteriol* 87:422–426
25. Kanagavel M, Princy Margreat AA, Arunkumar M, Prabhakaran SG, Shanmughapriya S, Natarajaseenivasan K (2016) Multilocus sequence typing (MLST) of leptospiral strains isolated from two geographic locations of Tamil Nadu, India. *Infect Genet Evol* 37:123–128
26. Kobayashi Y (2001) Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. *J Infect Chemother* 7:10–15
27. Kodjo A, Calleja C, Loenser M, Lin D, Lizer J (2016) A Rapid In-Clinic Test Detects Acute Leptospirosis in Dogs with High Sensitivity and Specificity. *BioMed Res Int* 2016:e3760191
28. Levett PN (2001) Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14:296–326
29. Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW (2005) Detection of pathogenic leptospire by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol* 54:45–49
30. Majed Z, Bellenger E, Postic D, Pourcel C, Baranton G, Picardeau M (2005) Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Leptospira interrogans* Sensu Stricto. *J Clin Microbiol* 43:539–545

31. Mérien F, Amouriaux P, Perolat P, Baranton G, Saint Girons I (1992) Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol* 30:2219–2224
32. Miraglia F, Matsuo M, Morais ZM, Dellagostin OA, Seixas FK, Freitas JC, Hartskeerl R, Moreno LZ, Costa BL, Souza GO, Vasconcellos SA, Moreno AM (2013) Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 77:195–199
33. Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE (2009) Review Paper: Host-Pathogen Interactions in the Kidney during Chronic Leptospirosis. *Vet Pathol Online* 46:792–799
34. Musso D, Lascola B (2013) Diagnostic biologique de la leptospirose. *Rev Francoph Lab* 2013:39–46
35. Nascimento ALTO, Ko AI, Martins E a. L, Monteiro-Vitorello CB, Ho PL, Haake DA, Verjovski-Almeida S, Hartskeerl RA, Marques MV, Oliveira MC, Menck CFM, Leite LCC, Carrer H, Coutinho LL, Degraeve WM, Dellagostin OA, El-Dorry H, Ferro ES, Ferro MIT, Furlan LR, Gamberini M, Gigliotti EA, Góes-Neto A, Goldman GH, Goldman MHS, Harakava R, Jerônimo SMB, Junqueira-de-Azevedo ILM, Kimura ET, Kuramae EE, Lemos EGM, Lemos MVF, Marino CL, Nunes LR, de Oliveira RC, Pereira GG, Reis MS, Schriefer A, Siqueira WJ, Sommer P, Tsai SM, Simpson AJG, Ferro JA, Camargo LEA, Kitajima JP, Setubal JC, Van Sluys MA (2004) Comparative genomics of two *Leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. *J Bacteriol* 186:2164–2172
36. Natarajaseenivasan K, Vijayachari P, Sharma S, Roy S, Sugunan AP, Biswas D, Sehgal SC (2005) Phylogenetic relatedness among leptospiral strains belonging to same serovar recovered from patients with different clinical syndromes. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 5:185–191
37. Oie S, Koshiro A, Konishi H, Yoshii Z (1986) In vitro evaluation of combined usage of fosfomicin and 5-fluorouracil for selective isolation of *Leptospira* species. *J Clin Microbiol* 23:1084–1087

38. Perez J, Brescia F, Becam J, Mauron C, Goarant C (2011) Rodent Abundance Dynamics and Leptospirosis Carriage in an Area of Hyper-Endemicity in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1361
39. Perolat P, Lecuyer I, Postic D, Baranton G (1993) Diversity of ribosomal DNA fingerprints of *Leptospira* serovars provides a database for subtyping and species assignment. *Res Microbiol* 144:5–15
40. Pinne M, Haake D (2011) Immuno-fluorescence Assay of Leptospiral Surface-exposed Proteins. *J Vis Exp JoVE*. doi: 10.3791/2805
41. Plank R, Dean D (2000) Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect* 2:1265–1276
42. Ralph D, McClelland M, Welsh J, Baranton G, Perolat P (1993) *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes. *J Bacteriol* 175:973–981
43. Savio ML, Rossi C, Fusi P, Tagliabue S, Pacciarini ML (1994) Detection and identification of *Leptospira interrogans* serovars by PCR coupled with restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *J Clin Microbiol* 32:935–941
44. Smits HL, Ananyina YV, Cheresky A, Dancel L, Lai-A-Fat RF, Chee HD, Levett PN, Masuzawa T, Yanagihara Y, Muthusethupathi MA, Sanders EJ, Sasaki DM, Domen H, Yersin C, Aye T, Bragg SL, Gussenhoven GC, Goris MG, Terpstra WJ, Hartskeerl RA (1999) International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. *J Clin Microbiol* 37:2904–2909
45. Stritof Majetic Z, Galloway R, Ruzic Sabljic E, Milas Z, Mojcec Perko V, Habus J, Margaletic J, Pernar R, Turk N (2014) Epizootiological survey of small mammals as *Leptospira* spp. reservoirs in Eastern Croatia. *Acta Trop* 131:111–116
46. Terpstra WJ, Korver H, Schoone GJ, Leeuwen J v., Schönemann CE, De Jonge-Aglibut S, Kolk AHJ (1987) Comparative classification of *leptospira* serovars of the Pomona group by monoclonal antibodies and restriction-endonuclease analysis. *Zentralblatt Für Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene Ser Medizinische Mikrobiologie Infektionskrankheiten Virologie Parasitologie* 266:412–421

47. Terpstra WJ, Ligthart GS, Schoone GJ (1985) ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *J Gen Microbiol* 131:377–385
48. Thaipadungpanit J, Wuthiekanun V, Chierakul W, Smythe LD, Petkanchanapong W, Limpai boon R, Apiwatanaporn A, Slack AT, Suputtamongkol Y, White NJ, Feil EJ, Day NPJ, Peacock SJ (2007) A Dominant Clone of *Leptospira interrogans* Associated with an Outbreak of Human Leptospirosis in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*. doi: 10.1371/journal.pntd.0000056
49. Torres-Castro M, Guillermo-Cordero L, Hernández-Betancourt S, Gutiérrez-Ruíz E, Agudelo-Flórez P, Peláez-Sánchez R, Zavala-Castro J, Puerto FI First histopathological study in kidneys of rodents naturally infected with *Leptospira* pathogenic species from Yucatan, Mexico. *Asian Pac J Trop Med*. doi: 10.1016/j.apjtm.2016.01.018
50. Turk N, Milas Z, Margaletic J, Staresina V, Slavica A, Riquelme-Sertour N, Bellenger E, Baranton G, Postic D (2003) Molecular characterization of *Leptospira* spp. strains isolated from small rodents in Croatia. *Epidemiol Infect* 130:159–166
51. Turk N, Milas Z, Mojcec V, Ruzic-Sabljić E, Staresina V, Stritof Z, Habus J, Postic D (2009) Molecular analysis of *Leptospira* spp. isolated from humans by restriction fragment length polymorphism, real-time PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 300:174–179
52. Turner LH (1970) Leptospirosis III Maintenance, isolation and demonstration of leptospire. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 64:623–646
53. Victoriano AFB, Smythe LD, Gloriani-Barzaga N, Cavinta LL, Kasai T, Limpakarnjanarat K, Ong BL, Gongal G, Hall J, Coulombe CA, Yanagihara Y, Yoshida S, Adler B (2009) Leptospirosis in the Asia Pacific region. *BMC Infect Dis* 9:147
54. Vinetz JM (2001) Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 14:527–538
55. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee T van de, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23:4407–4414

56. Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18:7213–7218
57. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18:6531–6535
58. Wong M, Katz AR, Li D, Wilcox BA (2012) *Leptospira* Infection Prevalence in Small Mammal Host Populations on Three Hawaiian Islands. *Am J Trop Med Hyg* 87:337–341
59. Yasuda Y, Togo T, Unemi N, Watanabe S, Harima K, Suzue T (1973) Distribution, Excretion and Metabolism of N¹-(2-Tetrahydrofuryl)-5-Fluorouracil (ft-207) by a Bioassay Method. *Chemotherapy* 21:1171–1178
60. Zilber A-L, Picardeau M, Ayrat F, Artois M, Demont P, Kodjo A, Djelouadji Z (2014) High-Resolution Typing of *Leptospira interrogans* Strains by Multispacer Sequence Typing. *J Clin Microbiol* 52:564–571
61. Zuerner RL (1994) Nucleotide sequence analysis of IS1533 from *Leptospira borgpetersenii*: identification and expression of two IS-encoded proteins. *Plasmid* 31:1–11
62. Zuerner RL, Alt DP (2009) Variable Nucleotide Tandem-Repeat Analysis Revealing a Unique Group of *Leptospira interrogans* Serovar Pomona Isolates Associated with California Sea Lions. *J Clin Microbiol* 47:1202–1205
63. Zuerner RL, Bolin CA (1990) Nucleic acid probe characterizes *Leptospira interrogans* serovars by restriction fragment length polymorphisms. *Vet Microbiol* 24:355–366
64. Zuerner R l., Huang W m. (2002) Analysis of a *Leptospira interrogans* locus containing DNA replication genes and a new IS, IS1502. *FEMS Microbiol Lett* 215:175–182
65. (1967) Current problems in leptospirosis research. Report of a WHO Expert Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 380:1–32

II – La leptospirose, une zoonose au cycle de transmission complexe

1. Aspects cliniques associés à la leptospirose

a) Humaine

Le médecin allemand Alfred Weil décrit pour la première fois la leptospirose à partir d'un grave cas de jaunisse en 1886. Appelée maladie de Weil, elle fut décrite en tant que syndrome ictérique caractérisé par de sévères atteintes rénales associées à une grave hémorragie (31,32). L'agent pathogène, une bactérie du genre *Leptospira* fut identifiée au Japon en 1914 par Inada et Ido (33) et appelé *Leptospira haemorrhagiae*. Le rat fut identifié comme vecteur quelques temps plus tard (34). Les leptospires peuvent se transmettre de l'animal vecteur à animal sensible ou à l'humain ce qui fait d'elle une zoonose. L'incubation dure entre 4 et 14 jours. La leptospirose a un tableau clinique très large allant du syndrome grippal banal jusqu'à des complications graves pour les formes anictériques. Certaines formes peuvent évoluer vers des atteintes rénales, hépatiques, méningées ou pulmonaires (3) et dans des cas graves des hospitalisations peuvent s'avérer nécessaires. Lors d'infections des antibiothérapies à base de pénicilline ou doxycycline peuvent être prescrites. Le taux de mortalité est d'environ 10% mais il peut aller jusqu'à 50% dans des cas de complications pulmonaires. Le sérotype le plus fréquemment retrouvé dans les infections humaines est *Icterohaemorrhagiae* responsable de problèmes rénaux. Mais ces dernières années l'incidence de *Grippotyphosa* a augmenté ; celui-ci provoquant des problèmes hépatiques.

b) Animale

La leptospirose est présente chez de nombreuses espèces du règne animal avec un tableau clinique pouvant varier selon l'espèce. Des animaux sauvages et domestiques sont susceptibles d'attraper la maladie ou de participer à sa transmission selon leur statut.

Chez les bovins, la forme clinique chronique de la leptospirose provoque des problèmes reproductifs (35,36) ou une infection persistante du tractus génital (37). Les avortements et les

baisses de production de lait posent de nombreux problèmes économiques pour les éleveurs. Comme le montre le tableau 4, il existe un vaccin en France qui protège contre le sérovar Hardjo et un vaccin aux États-Unis protégeant contre les sérovares Hardjo et Grippytyphosa. C'est le sérovar Hardjo qui est le plus impliqué (38). Il y a plusieurs facteurs de risques qui ont été identifiés pour la leptospirose bovine comme la présence de chiens dans les propriétés rurales (39,40) et la présence de rongeurs en contact direct avec la nourriture des bovins comme cela a été observé chez des bovins positifs en sérologie (40,41).

Chez les chevaux la leptospirose peut avoir plusieurs formes. Les formes graves rénales se retrouvent principalement chez les poulains (42). La leptospirose peut également provoquer chez les juments gestantes des problèmes graves comme des placentites et des avortements tardifs (42) et morts-nés (43). Plusieurs mois après l'infection initiale il peut y avoir des problèmes ophtalmiques comme des uvéites récurrentes (42,44) accompagnées de la présence d'anticorps spécifiques dans l'humeur aqueuse et vitrée (45). Il y a un vaccin aux États-Unis protégeant contre le sérovar Pomona.

Chez le chien il y a une saisonnalité et une différence selon les régions de la fréquence de la leptospirose (46). Il y a de nombreux symptômes dont les formes graves peuvent être des atteintes rénales et hépatiques. Depuis quelques années en Europe il y a augmentation d'un syndrome hémorragique pulmonaire avec un tableau clinique classique (47). Les sources de contamination peuvent être de l'eau et le contact indirect avec la faune sauvage (48). En France il y a plusieurs vaccins disponibles comme le montre le tableau 4.

Chez les porcs la leptospirose clinique a pour effet une baisse de la reproduction avec potentiellement des avortements (49). L'antibiothérapie est à base de streptomycine. Les principaux sérovares associées à la leptospirose porcine sont Bratislava, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae et Canicola (44). Il y a plusieurs vaccins dont deux aux États-Unis protégeant contre Hardjo ou 5 sérovares dont Canicola, Grippytyphosa, Icterohaemorrhagiae et Hardjo, deux en Nouvelle-Zélande contre Hardjo et Pomona ou Copenhageni, Hardjo et Pomona.

Tableau 4. Caractéristique de la leptospirose chez certaines espèces animales

| Espèce | Symptômes | Traitement | Vaccins | Sérogroupe | Source |
|---------|---|---|---|--|---------------|
| Chat | Lésions inflammatoires diverses et localisées, protéinurie importante, azotémie pré rénale et néphromégalie | Céfovécine et méthylprednisolone puis doxycycline | Aucun | SJ | (50) |
| Chien | Atteintes rénales et atteintes hépatiques | Pénicilline et doxycycline | 2 sérovars (CAN et IH) 3 sérovars (CAN, IH et GRIPP) 4 sérovars (CAN, IH, GRIPP et POM/AUS) | Europe (IH, AUS, CAN, GRIPP et SJ) Malaysia (AUS, BAT et JAV) | (51) |
| Bovins | Problèmes reproductifs (avortements et mort-nés) et baisse de production de lait | Streptomycine | France (HJ) États-Unis (HJ et GRIPP) | GRIPP, HJ, IH, POM et SJ | (40) |
| Porcs | Problèmes reproductifs (avortements) | Streptomycine | États-Unis (HJ ou 5 sérovars dont CAN, GRIPP, IH et HJ) Nouvelle Zélande (HJ et POM ou COP, HJ et POM) Suisse (BRAT et POM/TAR) | CAN, GRIPP et IH | (28,44,52) |
| Chevaux | Détresse respiratoire aiguë, uvéites, atteintes rénales, atteintes hépatiques, problèmes reproductifs (avortements et mort-nés) | Streptomycine et/ou pénicilline ou tétracyclines | États-Unis (POM) | Italie (BRAT, IH ou POM) Brésil (COP) Corée (SJ et BRAT) Pays-Bas (BRAT et COP) Suède (BRAT et IH) Amérique du Nord (POM) Irlande du Nord (BRAT) | (42,43,53-57) |

Légende :

AUS : Australis, BRAT : Bratislava, CAN : Canicola, COP : Copenhageni, GRIPP : Grippotyphosa, HJ : Hardjo, IH : Icterohaemorrhagiae, JAV : Javanica, POM : Pomona, SJ : Sejroe et TAR : Tarassovi.

2. Physiopathologie de la leptospirose

a) Voies d'entrée

Les leptospires entrent dans les organismes par la peau abrasée ou les muqueuses (buccales, oculaires ou nasales) (58). Une étude a montré qu'en fonction de la voie d'entrée (conjonctivale ou sous-cutanée) chez le rat il y avait des différences lors de l'infection leptospirosique. En effet par voie conjonctivale 50% des individus avaient une colonisation rénale et une excrétion urinaire durant la 4ème semaine ; par voie sous-cutanée seul 12% des individus avaient une colonisation rénale et une excrétion urinaire durant la 4ème semaine. La réponse sérologique était indépendante du taux de colonisation rénale pour les deux voies d'entrée (59).

b) Réceptivité et sensibilité des espèces

Pour le rat qui est une espèce réservoir, une étude a montré qu'après leur entrée dans l'organisme les leptospires vont dans tous les organes jusqu'à J5 (60). Il y a ensuite une clairance sauf dans les reins et cette clairance pourrait être associée à une production d'immunoglobulines détectables à partir de J7 (61). À partir de J9 les leptospires survivent dans les tubules rénaux. Puis, elles sont excrétées par voie urinaire (60–62). Dans une autre étude, des leptospires ont été détectées dans des tissus pulmonaires de rats sauvages et dans des reins sans lésions de ces organes. Il y aurait plusieurs hypothèses expliquant cette concomitance dans deux organes, la première étant que des souches provoquant une infection naturelle chez des rats évolueraient de la même manière que celles d'infections aiguës chez des animaux sensibles. La seconde serait un effet de l'environnement par une fragilisation de défenses immunitaires au niveau pulmonaire par un autre pathogène présent chez l'animal.

La réponse sérologique des rats serait moins importante que celle d'animaux sensibles lors d'infections aiguës (63). Il pourrait y avoir plusieurs explications à savoir, premièrement une adaptation hôte-pathogène des leptospires avec une régulation spécifique des protéines FlaB, LigB, LipL32 et OmpL37 dans un environnement in vivo murin (24). La seconde explication serait une adaptation hôte-pathogène des hôtes limitant la prolifération des leptospires via une réponse inflammatoire et humorale adaptée, une surexpression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. IL-10 limite la réponse pro-inflammatoire et active la production d'immunoglobulines par des lymphocytes B qui reconnaissent le lipide A du LPS par les Toll-

like récepteurs 4 (TLR4) (64,65). La troisième explication serait un fort tropisme rénal qui pourrait expliquer l'évitement des leptospires à la clairance des lymphocytes B (62,64).

Les LPS des bactéries à Gram négatif ont pour récepteur principal TLR4 exprimé à la surface de la membrane de la cellule. TLR4 a deux corécepteurs CD14 et MD-2 (66). Les TLR 4 sont activés chez les animaux résistants aux leptospires pathogènes. Cette activation pourrait être en partie une explication de cette résistance. Une étude s'est intéressée au rôle des TLR4 chez des souris résistantes en modèle *in vivo* (67). D'après cette étude, la réponse inflammatoire des cytokines serait moins forte et le nombre de leptospires serait plus important dans certains organes dont les poumons et les reins chez les animaux déficients en TLR4 par rapport aux animaux de type sauvage.

Le signal TLR4 contribue au contrôle de l'accumulation de leptospires dans les tissus. La différence de capacité des cellules humaines par rapport aux cellules de souris à répondre aux organismes à Gram négatif par une voie TLR4 dépendante et la spécificité de reconnaissance des espèces vient de la molécule adaptatrice aux TLR4 MD-2 qui se fixe directement au ligand (68). Les espèces sensibles et les espèces résistantes auraient donc des différences dans la reconnaissance des LPS par TLR4 MD-2 qui pourraient avoir un rôle dans la détection du LPS des leptospires et la sensibilité à la leptospirose (69).

Pour des espèces sensibles, le processus infectieux se passe ainsi. Après l'entrée dans l'organisme il y a une phase de leptospirémie et une phase de vascularite jusqu'à J7 durant laquelle des syndromes fébriles, troubles hémorragiques voire décès peuvent survenir. Puis il y a une phase de dissémination et de répliation tissulaire dans des organes (reins, poumons par exemple) durant laquelle il peut y avoir un tableau clinique varié, des décès et l'augmentation de la production d'anticorps. Il y a ensuite une phase de leptospirurie différée et prolongée qui peut durer quelques semaines à quelques années avec plusieurs états possibles soit une guérison soit un portage sain. La figure 3 illustre les phases de l'infection leptospirosique.

Figure 3. Phases d'évolution de la leptospirose lors d'une infection (70)

Les leptospires ont plusieurs stratégies d'évitement au système immunitaire de l'hôte. Cela leur permet de persister dans les organes qu'elles infectent. Elles peuvent notamment agir sur le système du complément en l'inactivant (Figure 4) par liaison au facteur H et à la protéine de liaison C4 b, des régulateurs négatifs des voies alternative et classique du complément (71).

Elles peuvent également sécréter des protéases inactivant les protéines du complément (72). Ainsi, moins opsonisé, le pathogène est moins exposé aux cellules immunitaires et subit moins de lyse directe par le système du complément.

Figure 4. Inactivation par *Leptospira* des voies du système du complément (73)

Les leptospires peuvent coloniser des lieux immunoprivilégiés comme les tubules rénaux (58). La colonisation persistante de ces sites est liée à la régulation négative de l'expression de protéines antigéniques (73). Il y a également des suppositions sur le fait que les leptospires pourraient persister dans les macrophages (74) et seraient capables de se transloquer à travers les couches de cellules (75) pour atteindre rapidement le sang et ainsi éviter d'être tuées par les cellules immunitaires des hôtes (76).

c) Voies d'excrétion

La principale voie d'excrétion des leptospires est urinaire. D'autres voies d'excrétion sont à l'étude et notamment la voie salivaire mais cela n'a pas été démontré. Chez les espèces réservoirs, les leptospires sont excrétées à fortes concentrations et pendant longtemps. Cela peut expliquer leur prolifération dans l'environnement et la contamination entre individus.

d) Réponse immunitaire de l'hôte

Lors de l'infection leptospirosique, une reconnaissance des LPS (76,77) peut se faire par des récepteurs spécifiques de motifs moléculaires associés aux pathogènes (pathogen-associated molecular patterns) de l'hôte. Les LPS activent les macrophages en stimulant les Toll-like récepteurs 2 (TLR2) des organismes sensibles. Cela serait dû à la structure spécifique des LPS des leptospires qui serait moins endotoxique que celles des autres organismes à Gram négatif. Les TLR2 stimulent la production d'interleukine 6 qui favorise l'activation des macrophages et leur activation favorise le détachement des cellules endothéliales. Parce que les leptospires font

Intervenir les TLR2, ils se rapprocheraient des organismes à Gram positif. Chez les animaux résistants aux leptospires pathogènes elles activent aussi des Toll-like récepteurs 4 (TLR4). Agir pour inhiber les TLR4 pourrait être une piste pour le contrôle de la leptospirose chez eux (69,76).

3. Épidémiologie

a) Une zoonose à répartition mondiale

La leptospirose est une maladie endémique dans beaucoup de zones tropicales et subtropicales (78) car l'environnement propice au développement des leptospires est un climat chaud et humide. Elle peut se trouver sur tous les continents, excepté en Antarctique (79). Elle impacte des zones urbaines de pays industrialisés mais aussi rurales de pays en développement (1). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) il y a environ un million de cas humains chaque année (80,81). Le taux de mortalité est aux alentours de 10 %, ce qui est élevé. Dans une étude les auteurs estiment à 1,03 millions le nombre de cas et 58 000 morts par an (82). En Europe, c'est la France qui est le pays le plus touché. Il y a en France environ 600 cas par an, le plus grand nombre de cas se déclarant dans les territoires d'outre-mer. Il y a peu de cas en Guyane française mais beaucoup dans les autres territoires d'outre-mer comme montré sur la figure 5.

Figure 5. Nombres de cas de leptospirose selon la zone en France ((25) et d'après les données du Leptospirosis National Reference Center)

Sur la figure 6 nous pouvons remarquer une saisonnalité des cas en France métropolitaine avec peu de cas au printemps et des pics en automne. Il y aurait également un pic en septembre (25) d'après les données du Centre National de Référence (CNR)).

Figure 6. Cas de leptospirose en France métropolitaine ; noter la saisonnalité (source : invs.santepubliquefrance.fr)

Ces dernières années l'incidence de la leptospirose a augmentée dans certaines régions tropicales comme en Malaisie (83). De fréquentes épidémies sont observées en régions tropicales notamment en Inde (84) et au Brésil (85). Elle avait baissé durant la seconde partie du vingtième siècle en Europe mais a réémergé dans certaines régions urbaines du monde (86–88). L'incidence varie entre 0,1 et 1 pour 100 000 habitants dans les pays au climat tempéré et atteint plus de 10 pour 100 000 habitants dans les régions tropicales (25). La figure 7 montre qu'au niveau de l'équateur l'incidence de la leptospirose humaine est forte. En France métropolitaine l'incidence varie selon le département comme nous pouvons le voir sur la figure 8 et elle est forte dans les Ardennes, dans la partie sud de la Corse, dans les Deux-Sèvres, dans la Manche, dans les Pyrénées atlantiques, dans le sud de la Région Parisienne, en Vendée et dans la région de Franche Comté. L'augmentation de l'incidence a été signalé à Marseille (89).

Figure 7. Incidence de la leptospirose selon les espèces (90)

Figure 8. Incidence de la leptospirose en France métropolitaine (source : invs.santepubliquefrance.fr)

b) Cycle de transmission

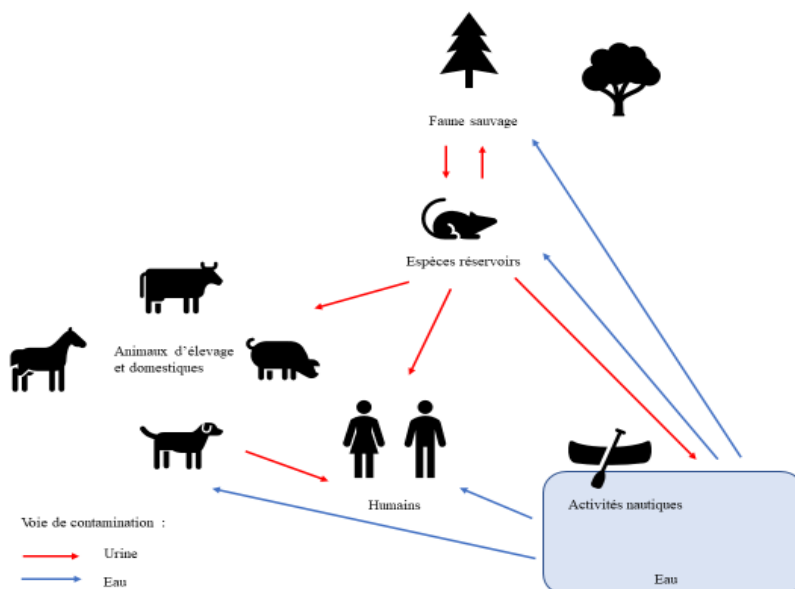


Figure 9. Cycle de transmission des leptospires pathogènes

Il y a beaucoup de zones d'incertitude dans le cycle de transmission de la leptospirose et celui-ci est très complexe car beaucoup d'espèces peuvent être impliquées comme le montre la figure 9. De plus les connaissances actuelles ne permettent pas de déterminer avec certitude quel organisme a contaminé un autre.

Hôtes sensibles/réceptifs

Les réservoirs accumulent les leptospires dans leurs tubules rénaux pour ensuite les excréter par les urines. Les principaux réservoirs de la faune sauvage seraient les rongeurs. Mais il semblerait que de nombreux autres mammifères de la faune sauvage comme les érinacéidés et les mustélidés (91,92) jouent un rôle important dans la maintenance de certaines souches dans l'environnement. Selon une étude la prévalence du portage de leptospires chez le hérisson était de 37,5% et de 20,6% chez la belette (91). Des espèces domestiques peuvent également être des réservoirs comme les bovins pour le sérovar Hardjo (37,40). Les porteurs chroniques comme les rats et les ragondins sont peu affectés voire présentent une infection asymptomatique chronique avec la colonisation des tubules rénaux (25), et secrètent les leptospires en grande quantité dans l'environnement par l'urine, participant ainsi à leur dissémination. Les hôtes dits accidentels présentent des infections violentes suite à l'exposition à une ou plusieurs souches et ils excrètent peu de leptospires (27,28,93). Cependant il est possible qu'un individu porteur chronique asymptomatique pour un sérovar, soit l'hôte accidentel d'un autre. Le statut de cet individu, porteur chronique ou hôte accidentel, varie alors selon le sérovar étudié. Cela semble être le cas pour des bovins d'un élevage que nous allons présenter dans cette thèse. Il est également très difficile à l'heure actuelle d'établir un lien sûr et direct entre le portage des leptospires par un individu et la leptospirose clinique d'un autre.

Maintenance dans l'environnement

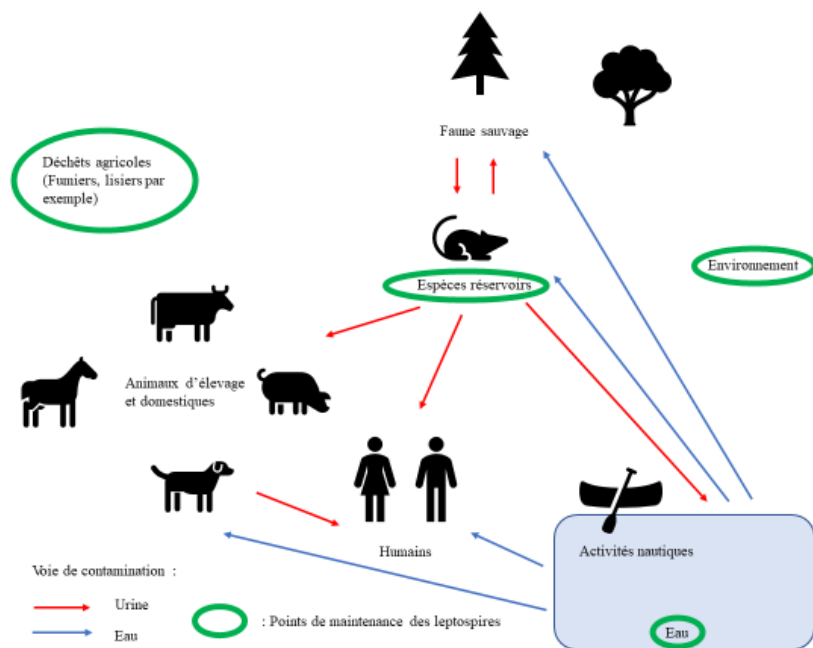


Figure 10. Schéma des points de maintenance des leptospires

Les leptospires sont maintenues par les espèces réservoirs. Une fois excrétées elles se retrouvent dans l'environnement (Figure 10). La contamination se fait, par l'intermédiaire des urines contaminées, dans l'eau ou l'environnement (1) où les leptospires peuvent survivre plusieurs semaines. La contamination à l'humain peut se faire via l'environnement mais aussi par contact avec des espèces infectées. Les eaux stagnantes et les lisiers sont des lieux de maintenance des leptospires dans l'environnement et des sources de contamination. Il y a peu de données sur les leptospires présentes dans l'environnement. En effet cela peut être dû à la difficulté d'isolement des souches (contaminations et faible croissance des cultures par exemple). Pour une étude réalisée aux Philippines et au Japon, des échantillons d'eau et de sol ont été analysés pour la présence de leptospires avec une combinaison de 5 agents antimicrobiens (STAFF) pour limiter les contaminations. La positivité pour la présence de leptospires dans les échantillons a été de 40% et 46% respectivement (94). Cette étude a également montré sur un suivi de 5 mois que les leptospires survivent dans l'eau pendant les jours secs et sont à la surface de l'eau durant les jours de pluie (94). Une autre étude en France a montré que 96% d'échantillons d'eau étaient positifs pour la présence de leptospires saprophytes et 4% pour la présence de leptospires pathogènes (95). Il a été également montré expérimentalement qu'une eau minérale contaminée par des leptospires pathogènes était encore contaminée 18 mois plus tard (95). Les leptospires peuvent survivre jusqu'à 8 jours dans les lisiers et cette durée varie selon les conditions climatiques (96).

4. Facteurs de risques

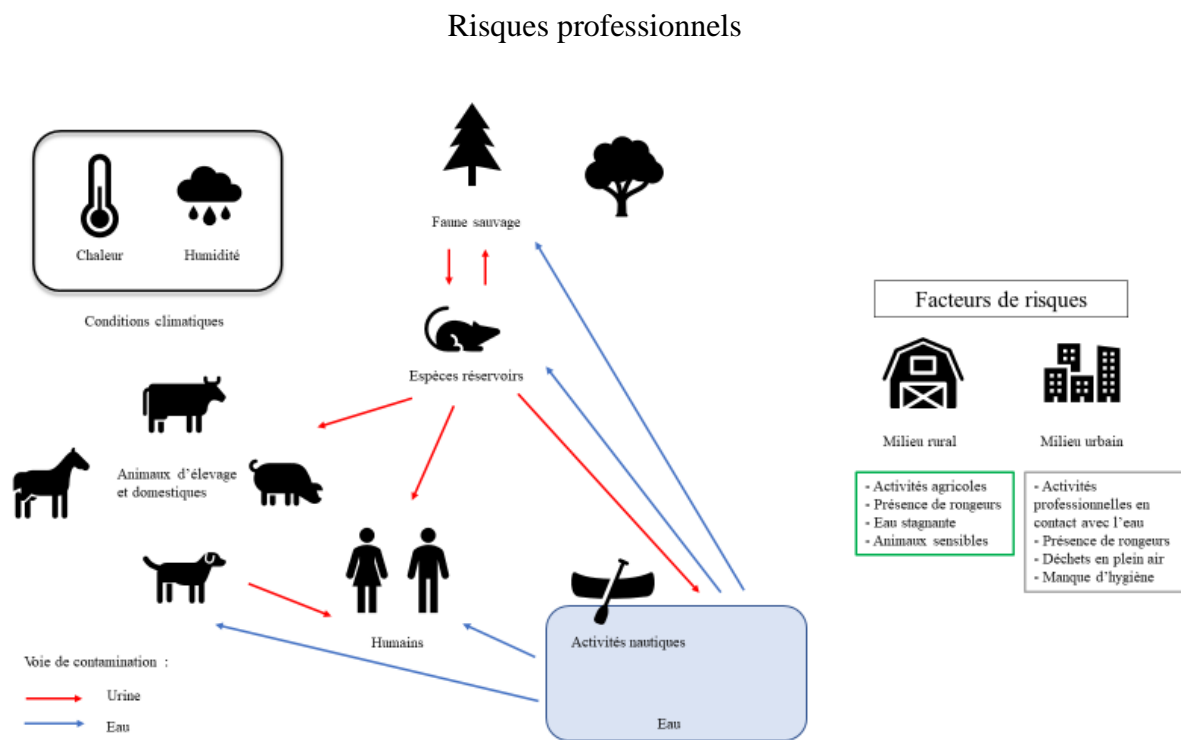


Figure 11. Facteurs de risques associés à la leptospirose

Des populations de rongeurs peuvent transmettre des leptospires pathogènes via de l'eau ou des déchets contaminés à des professionnels comme des égoutiers et employés de l'urbanisme qui font partie des personnes dites à risques (Figure 11). Les agriculteurs et les vétérinaires qui travaillent avec des animaux potentiellement porteurs de leptospires pathogènes constituent également une cible potentielle.

Facteurs environnementaux

La présence d'eaux stagnantes qui sont des zones de maintenance de leptospires pathogènes augmente le risque de leptospirose. En effet par exemple les personnes pratiquant des activités nautiques sont exposées aux leptospires pathogènes. L'incidence de la leptospirose a augmenté ces dernières années pour ces personnes. En Martinique en 2011, 7 participants à des activités de canyoning ont eu la leptospirose.

Facteurs climatiques

Un climat chaud et humide est optimal pour le cycle de transmission de leptospires pathogènes. Les pays tropicaux ont une incidence pour la leptospirose forte et leurs populations sont dites

à risque. Le réchauffement climatique influencerait sur l'incidence de la leptospirose en France continentale (97). L'incidence de la leptospirose pourrait évoluer selon les pays avec le réchauffement climatique et les facteurs climatiques associés à savoir par exemple l'augmentation des inondations dans certains pays et la désertification dans d'autres.

Facteurs sociétaux

Une étude a montré que plusieurs facteurs impactaient l'incidence de la leptospirose humaine (Figure 12) comme l'augmentation de l'imperméabilisation des sols, l'extension des bidonvilles aux abords des grandes mégapoles des pays en développement, avec des conditions sanitaires précaires, l'augmentation des inondations pouvant entraîner l'augmentation de populations de rats et une fréquence élevée des contacts avec l'homme, notamment lors de dégâts dans les habitats humains.

Figure 12. Facteurs influençant l'augmentation de l'incidence de la leptospirose humaine (98)

Facteurs populations de réservoirs

Il y a plusieurs facteurs de risque qui dépendent du site d'étude (Figure 11). En milieu rural, les activités agricoles comme l'élevage de bovins avec la présence de réservoirs de la faune sauvage tels que des rats ou des campagnols dans l'environnement et à proximité d'eau ou de nourriture peuvent intervenir dans le cycle de transmission de leptospires pathogènes. En milieu urbain, ce sont les employés travaillant dans les égouts ou en contact avec l'eau par exemple qui peuvent être contaminés par les leptospires, les facteurs propices au développement de populations de rats peuvent être les poubelles dans les rues qui leur fournissent de la nourriture et le manque d'hygiène dans certaines zones. La combinaison de nombreux facteurs peut augmenter le risque d'exposition à la leptospirose. La présence de rongeurs et celle de points d'eau pouvant être des réservoirs sont associés au risque leptospirosique quelle que soit la zone étudiée.

Prévention

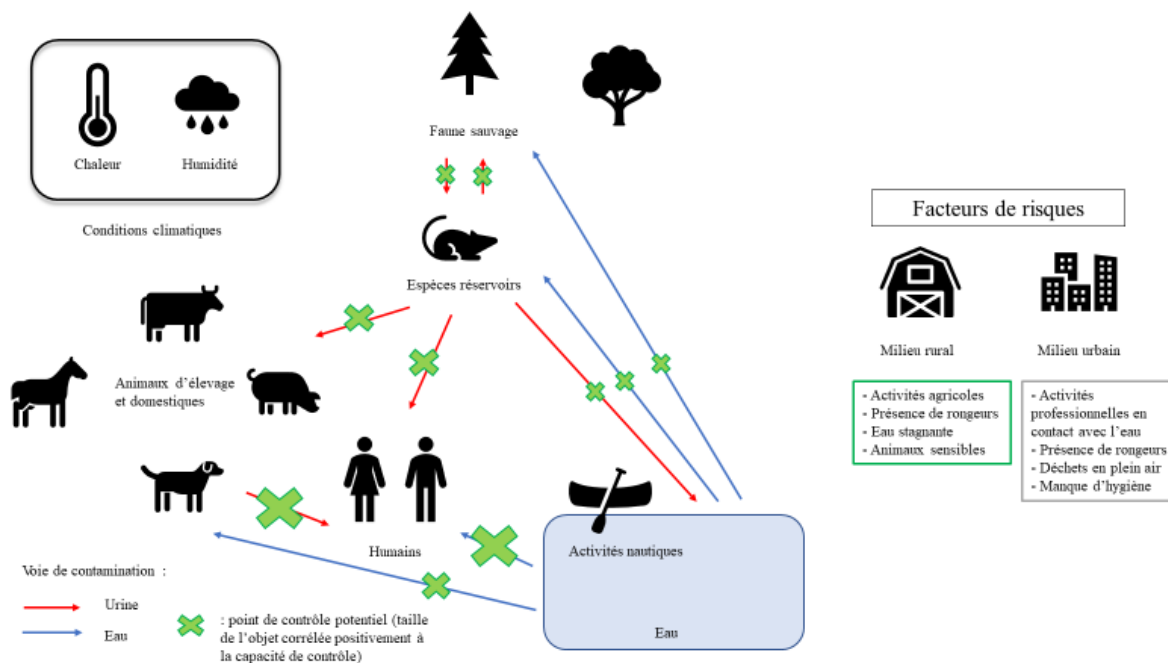


Figure 13. Points de contrôles potentiels dans le cycle de transmission des leptospires pathogènes

Il est compliqué de mettre en place des règles générales de prévention et de contrôle de la leptospirose humaine à cause de la complexité du cycle de transmission comme le montre la figure 13. Le fait que des organismes sauvages tels que les insectivores (hérissons et musaraignes par exemple) soient des majeurs réservoirs naturels rend le cycle de transmission difficile à contrôler. Hardjo semble être une exception puisqu'il est maintenu par les bovins et les ovins donc des espèces domestiques (99). Diminuer les contacts avec les sources d'infection potentielle et éviter que les bactéries ne rentrent dans les organismes peuvent être des mesures mises en place (99). Porter des équipements et éviter de laisser des plaies sans protection peuvent être des mesures hygiéniques de prévention lors de contacts avec des animaux ou des environnements potentiellement contaminés. Limiter les déchets en plein air peut éviter la maintenance des réservoirs à proximité des habitations. Des campagnes de prévention visant à prévenir les populations à risques comme les personnes pratiquant des activités nautiques, ou les personnes en contact avec des animaux ou de l'eau (agriculteurs et employés de l'urbanisme par exemple) peuvent être proposées (100). Il s'agit d'éviter d'ingérer de l'eau de rivières par exemple ou de consulter un médecin s'il y a observation de symptômes grippaux dans les 48 heures suivant des activités nautiques. Un vaccin est également disponible en France protégeant contre le sérotype Icterohaemorrhagiae qui est responsable des formes les plus

graves de leptospirose humaine (25) mais un autre sérotype, Grippotyphosa, voit son impact augmenter. Un vaccin cubain protégeant contre les sérovars Canicola, Icterohaemorrhagiae et Mozdok est actuellement disponible uniquement dans ce pays. Les vaccins peuvent être peu efficaces étant donné la diversité de souches c'est pourquoi les autres mesures préventives et en particulier la lutte contre les rongeurs sont importantes.

III - Les rongeurs : réservoirs de leptospires pathogènes

1. Rôle des rongeurs dans la transmission de leptospires pathogènes

Le rôle des rongeurs est central dans le cycle de transmission de la leptospirose. Les souches portées peuvent être différentes d'une espèce à une autre comme le montre le tableau 5. Le rat brun est le réservoir de nombreux sérovars du sérogroupe *Icterohaemorrhagiae* (79). Or ce sérogroupe est responsable de nombreuses infections chez l'humain et surtout dans les cas les plus graves (25). Dans la littérature il existe des cas de transmission directe d'un rat à l'humain que ce soit par de l'urine contaminée ou par morsure d'un rat domestique ou sauvage (101,102). D'autres rongeurs peuvent également être réservoirs de leptospires pathogènes bien que des corrélations avec des cas de leptospirose soient difficiles à établir. Certaines espèces de rongeurs sauvages ou domestiques sont sensibles à la leptospirose (castors, hamsters, gerbilles, cobayes...). Le rôle des rongeurs dans le cycle de la leptospirose est donc dépendant de l'espèce étudiée, celui des rats bruns et noirs est largement démontré, celui du ragondin est de plus en plus étudié mais le rôle de certaines espèces comme les campagnols reste à définir.

Tableau 5. Liste de rongeurs non exhaustive et leur implication dans le cycle de la leptospirose

| | Espèces | Mode de vie | Habitats | Statut | Sérogroupe |
|------------------|----------------------|----------------------------|---|-----------------|---|
| Faune sauvage | Castor | semi-aquatique | forêts et rivières | sensible | Icterohaemorrhagiae (93) |
| | Ragondins | semi-aquatique | berges et rivières | réservoir | Australis et Icterohaemorrhagiae (95,103) |
| | Rat musqué | semi-aquatique | berges et rivières | réservoir (104) | Grippytyphosa et Icterohaemorrhagiae (95,105) |
| | Rat noir | terrestre | lieux en hauteurs (greniers et silo à grains) | réservoir (106) | |
| | Rat brun | terrestre | ubiquiste | réservoir | Icterohaemorrhagiae (93) |
| | Souris domestique | terrestre | intérieurs (maisons et fermes) | réservoir | Sejroe (107) |
| | Campagnol terrestre | terrestre / semi-aquatique | champs et forêts | ? | |
| | Campagnol des champs | terrestre | champs et forêts | réservoir | Grippytyphosa (108) |
| | Mulot | terrestre | forêts et prairies | | Australis et Pomona (107) |
| | Musaraigne | terrestre | forêts et prairies | | Mozdok et Poi (93) |
| Faune domestique | Hamster | terrestre | Habitations humaines | sensible | |
| | Gerbille | terrestre | | sensible | |
| | Chinchillas | terrestre | | sensible | |
| | Cochon d'Inde | terrestre | | sensible | |

2. Les rongeurs faisant l'objet d'une régulation chimique

Les rongeurs ou membres de l'ordre *Rodentia* font partie des Mammifères et regroupent plusieurs sous-ordres incluant des espèces variées allant des hamsters aux ragondins. Ces animaux ont pour caractéristique particulière d'avoir une paire d'incisives à croissance continue sur les deux mâchoires avec lesquelles ils rongent que ce soit pour se nourrir, creuser mais pour combattre. Ils peuvent avoir des régimes alimentaires différents selon l'espèce. Ils sont présents sur tous les continents sauf l'Antarctique. Ils sont capables de coloniser divers milieux et de s'adapter à la présence des humains.

De nombreuses espèces de rongeurs sont présentes en France et peuvent avoir un rôle dans la transmission de leptospires. Dans cette partie nous ne traiterons que des espèces de rongeurs ayant fait l'objet d'études lors de ce travail de thèse et dont les populations peuvent être régulées par des méthodes chimiques, c'est-à-dire les rats bruns (*Rattus norvegicus*) et rats noirs (*Rattus rattus*), la souris domestique (*Mus musculus domesticus*), les campagnols terrestres (*Arvicola terrestris*) et campagnols des champs (*Microtus arvalis*). D'autres rongeurs tels que les ragondins jouent un rôle certain dans la transmission des leptospires en France mais leurs populations ne sont pas régulées par des méthodes chimiques, ce sont des espèces qui peuvent être chassées car elles sont considérées comme nuisibles.

a) *Campagnol des champs (Microtus arvalis)*

Figure 14. Photo d'un Campagnol des champs (Source Inventaire national du patrimoine naturel : inpn.mnhn.fr)

Ce sont des petits rongeurs sauvages de la famille des Cricétidés. Ils sont présents dans divers pays d'Europe de l'Ouest dont la France. Ils peuvent se trouver jusqu'à 2000 mètres d'altitude. Ils ont le dos brun et le ventre blanc. Leur corps a une longueur moyenne à l'âge adulte de 100 mm et leur queue, de 28 mm. Ils ont une longévité d'environ un an. Ils vivent en nids familiaux et sont territoriaux. Ce sont des herbivores, consommant des pousses et des racines. Ils creusent des galeries dans les champs ou les forêts peu denses au niveau de la couche superficielle du sol. Ils sont capables de faire des dégâts dans des champs pâturés ou des cultures durant leurs phases de pullulation où les populations peuvent atteindre 1000 individus par hectare (source : www.campagnols.fr). Ils sont sexuellement matures à un mois et peuvent faire une à cinq portées par an d'un à dix petits. La gestation est de trois semaines. Leur reproduction est saisonnière. Ils sont actifs au printemps et inactifs l'hiver. Cette saisonnalité de la reproduction dépend de nombreux facteurs (par exemple pression de prédation plus ou moins forte, températures). Une étude a montré qu'ils étaient porteurs du sérovar *Grippotyphosa* avec des néphrites interstitielles lymphoplasmacellulaires (108). Ils peuvent également être porteurs de parasites comme les échinocoques. Leurs principaux prédateurs sont les Rapaces et les Mustélidés.

b) *Campagnol terrestre (Arvicola terrestris)*

Figure 15. Photo d'un Campagnol terrestre (Source Inventaire national du patrimoine naturel : inpn.mnhn.fr)

Ce sont des petits rongeurs de la famille des Cricétidés pouvant être présents jusqu'à 2500 mètres d'altitude présents dans plusieurs pays de l'Europe dont la France. Ils ont le dos brun qui devient jaune sur le ventre. Leur corps à l'âge adulte est en moyenne de 15 centimètres et leur queue de 9 centimètres. Ils vivent jusqu'à huit mois. Ils sont herbivores, mangeant chaque jour l'équivalent de leur poids en racines de type Légumineuse par exemple. Ils vivent dans les sols frais et humides où ils colonisent des galeries de taupes puis creusent jusqu'à 20 cm de profondeur des tunnels pouvant atteindre 60 m de longueur, la terre projetée hors du sol formant des tumuli. Ils vivent en couple et principalement dans des galeries. Ils sont matures à 2 mois, il peut y avoir cinq à six portées par an de deux à huit petits. La durée de gestation est de 21 jours. Leur grande capacité de reproduction fait que les effectifs de populations peuvent être considérables. Ils peuvent causer de gros dégâts dans les champs cultivés et pâturés faisant diminuer les rendements aux alentours de 80 % en mangeant les racines. Ils ont des cycles de pullulations peu connus qui peuvent durer de 4 à 6 ans (figure 16), semblant dépendre de nombreux facteurs (présence de prédateurs ou maladies par exemple).

Figure 16. Cycle de pullulation des Campagnols terrestres (Source : www.fredon-auvergne.fr)

Il y a tout d'abord une phase de basse densité qui dure environ deux ans durant laquelle les populations sont stables et ne dépassent pas les 200 individus par hectare. Suit une période de densité moyenne qui dure environ 1,5 an durant laquelle la population croit pour atteindre environ 1000 individus par hectare. Il y a ensuite une phase de forte densité de population qui varie peu d'environ 1000 individus avec un pic de pullulation et qui dure environ un an. Cette phase est suivie d'une période de déclin qui dure environ 1 an et durant laquelle la population décroît jusqu'à une densité d'environ 100 individus par hectare. Une particularité est qu'ils ne boivent pas. Ils peuvent être porteurs d'échinocoques comme les Campagnols des champs. Leur statut concernant le portage de leptospires n'est pas vraiment établi. Leurs prédateurs sont des rapaces et des mammifères carnivores. Il s'avère que des changements dans les pratiques agricoles dans la deuxième partie du vingtième siècle ont participé à l'augmentation des

variations de densités de populations de campagnols terrestres (109). Différentes mesures de lutte contre les campagnols terrestres ont été mises en place en milieu agricole dont des changements de méthodes de travail des sols (labourage raisonné par exemple) et l'utilisation raisonnée de bromadiolone, une molécule chimique de type anticoagulant anti-vitamine K (AVKs).

c) *Rat brun (Rattus norvegicus)*

Figure 17. Photo d'un Rat brun (Source Inventaire national du patrimoine naturel : inpn.mnhn.fr)

C'est un rongeur de la famille des *Muridae* ayant colonisé l'ensemble des continents sauf l'Antarctique (Figure 18). Originnaire d'Asie, du Nord la Mer Caspienne il a migré pour des raisons inconnues peut-être des grandes densités de populations ayant entraîné des pressions nécessitant des migrations dans d'autres régions (110).

Figure 18. Répartition mondiale du rat brun (110)

Il s'est répandu en voyageant dans les bateaux et vit aujourd'hui en commensalisme avec les humains dans les milieux urbanisés (28) comme dans les milieux agricoles. Ils ont une couleur brune, leur corps fait de 16 à 25 cm et leur queue 16-20 cm (110). Ils peuvent vivre de deux à trois ans. Ils sont omnivores, adaptant leur régime alimentaire en fonction de la nourriture disponible dans leur environnement que ce soient des déchets ou des graines. Ils sont matures à 6 semaines, la durée de gestation est de 21 à 23 jours. Ils peuvent faire entre un et vingt-cinq petits par portée. Ils vivent en petits groupes d'un mâle et d'une à plusieurs femelles avec leurs petits dans des territoires de 10 à 30 m de diamètre environ. Ils peuvent faire 1 kilomètre par nuit ou plus pour trouver de la nourriture qui se trouve en dehors du territoire sur des terrains neutres. Les individus de cette espèce ont de grandes capacités d'adaptation à leur environnement. La colonisation des rats bruns s'est faite parallèlement à la décolonisation des rats noirs (110). La compétition entre les deux espèces s'étant faite à l'avantage des rats bruns, plus agressifs et forts. Les rats bruns sont moins agiles que les rats noirs, ils vivent plutôt au niveau du sol ou dans des galeries souterraines. Pouvant vivre très proches des humains ils peuvent être porteurs de pathogènes comme les leptospires, ils sont connus pour être le principal réservoir du sérotype *Icterohaemorrhagiae* (1). En France ce sérotype est le plus incriminé

dans les infections humaines graves. Ils sont également porteurs des puces vectrices de la peste provoquée par la bactérie *Yersinia pestis*. Ses prédateurs sont les rapaces et les mustélidés. Les dégâts occasionnés par les rats bruns ainsi que leur portage de pathogènes a amené au développement de moyens de luttés, que ce soit par des piégeages en lutte mécanique ou en utilisant des molécules à effet différé pour éviter l'aversion alimentaire.

d) Rat noir (Rattus rattus)

Figure 19. Photo d'un Rat noir (Source Inventaire national du patrimoine naturel : inpn.mnhn.fr)

Ce sont des rongeurs de la famille des *Muridae* originaire d'Asie présent sur tous les continents sauf l'Antarctique (Figure 20). Ils semblent avoir une origine arboricole dans des forêts équatoriales.

Figure 20. Répartition mondiale du rat noir (Buckle et Smith, 2015)

Jusqu'au début du 18ème siècle ils étaient les seuls rats connus. La compétition avec les rats bruns les a amenés à vivre en hauteur et a en partie diminué leur aire de répartition. Ils ont une couleur pouvant varier de noir à noisette avec le dessous du corps plus clair. Leur corps à l'âge adulte atteint une longueur de 17-20 cm et leur queue atteint une longueur de 20-25 cm (110). Ils vivent en nids dans des groupes sociaux en hauteur. Ils peuvent vivre entre 2 et 3 ans. Ils sont omnivores à tendance granivores et frugivores. Ils vivent plutôt dans les milieux ruraux comme des champs cultivés et des lieux de stockage. Ils sont agiles ce qui les aide pour leurs déplacements. Ils sont matures à l'âge de 2 à 3 mois. La durée de gestation est de 21 jours. Ils peuvent faire entre 3 et 6 portées par an de 10 petits au maximum chacune. Leurs prédateurs sont les chats domestiques et les rapaces nocturnes. Ils peuvent faire des dégâts dans des lieux de stockage de nourriture. Ils peuvent être porteurs de pathogènes comme des leptospires ou des toxoplasmes.

e) Souris domestique (Mus musculus domesticus)

Ce sont des petits rongeurs de la famille des *Muridae*, originaires d'Asie et s'étant répandu dans le monde. Les souris domestiques ont le dos gris avec le ventre plus clair. Leur corps à l'âge adulte fait en moyenne 9 cm, leur queue, 8 cm. Elles sont omnivores. Elles vivent jusqu'à 3 ans. Matures entre 5 et 6 semaines elles peuvent faire environ 10 portées par an. La gestation dure 21 jours, il y a entre 6 et 12 petits par portée. Elles peuvent vivre dans des granges, des maisons, proches des humains. En l'absence de compétition avec d'autres espèces elles peuvent vivre dans des champs (110). Elles peuvent grimper et nager. Elles sont plutôt actives la nuit. Elles vivent proches de sources de nourriture. Elles sont territoriales et vivent en petits groupes avec un mâle, plusieurs femelles et leurs petits. Elles peuvent être porteuses de leptospires pathogènes comme l'ont montrées diverses études (111,112). Le sérotype Sejroe et Ballum ou Pyrogenes ont été détectés chez des souris dans une étude s'intéressant à la possible transmission de leptospires pathogènes d'animaux de compagnie à leurs propriétaires (113). Leurs prédateurs sont des chats domestiques et des rapaces.

3. Autres problèmes liés aux rongeurs

Quelques premiers titres d'articles de journaux sont montrés ci-dessous pour illustrer la diversité des problèmes associés à la pullulation de rongeurs.

Figure 21. Exemples de titres d'articles liés aux problèmes causés par des rongeurs

a) Autres problèmes sanitaires

Les rongeurs peuvent être vecteurs d'autres pathogènes que les leptospires que ce soit directement dans leurs organismes ou indirectement via des parasites externes (Tableau 6). Ils sont capables de résister à des pathogènes colonisant leurs organismes faisant d'eux des remarquables modèles d'adaptation. Les environnements propices à la prolifération de pathogènes comme les décharges et les égouts constituent des lieux de vie pour ces rongeurs, permettant leur contamination et leur dispersion. La faune sauvage peut être une source de

contamination pour les rongeurs vivant en zone agricole et ils sont capables de les transmettre aux animaux d'élevage et de compagnie.

Tableau 6. Liste de pathogènes pouvant être transmis par les rongeurs (110)

Le tableau 6 montre certains pathogènes pouvant être transmis par des rongeurs. Concernant les rongeurs étudiés pendant la thèse, les souris peuvent être porteuses de divers parasites externes comme les tiques qui transmettent l'agent pathogène de la Borréliose.

Une bactérie transmise par des puces portées par *Rattus rattus* est *Yersinia pestis* responsable de la peste. Il existe deux formes de cette maladie : bubonique (transmise par piqûre de puce) et pulmonaire (voie aérienne). Dans 20 à 40% des cas le bubon guérit mais sinon il peut évoluer vers une septicémie rapidement mortelle. La peste pulmonaire est mortelle en 3 jours en l'absence de traitement. Les traitements antibiotiques permettent de réduire la morbidité et la mortalité de cette maladie. Il faut éviter le contact avec les rongeurs et des répulsifs peuvent éviter de se faire contaminer par des piqûres de puce (Source : www.pasteur.fr). Le fait que ces rongeurs soient capables d'être réservoirs de cette maladie pose problème dans le sens où des puces porteuses peuvent passer à des humains vivant à proximité de terriers de rats. Il y a encore des cas de pestes dans certains pays, notamment à Madagascar.

Les Campagnols des champs et les Campagnols terrestres peuvent être porteurs de petits vers plats appelés échinocoques (*Echinococcus multilocularis*) parasitant les intestins de renards, de chiens ou de chats sans entraîner de troubles particuliers (Source : www.fredon-auvergne.fr). Ils peuvent être transmis aux humains. La maladie développée peut être grave et les symptômes peuvent être des douleurs abdominales, jaunisse, fièvre et un gros foie. Il y a eu 31 cas répertoriés en Auvergne entre 1982 et 2000 (Source FranceEchino).

Les Hantavirus sont dans la famille des *Bunyaviridae* (114). Ils sont présents sur tous les continents. Il y a deux syndromes qui peuvent se développer, une fièvre hémorragique accompagnée d'un syndrome rénal avec 0,1% à 10% de taux de létalité associée aux hantavirus asiatiques et européens, un syndrome pulmonaire avec 30% à 60% de létalité associé aux hantavirus américains. La prévention vise à limiter le contact avec les rongeurs. Les hôtes du virus Seoul sont *Rattus rattus* et *Rattus norvegicus*.

b) Problèmes économiques

Dégâts aux infrastructures

Certains rongeurs sont responsables directement et indirectement de divers problèmes économiques liés à des dégâts faits aux infrastructures. En effet certaines espèces se sont adaptées aux aires anthropiques et y vivent de manière opportuniste. Ce sont surtout les rats et les souris, rongeurs commensaux qui causent ce type de dégâts. Les rats bruns par exemple sont capables de coloniser les caves et les égouts leur permettant d'avoir des accès rapides aux poubelles laissées dans les rues leur fournissant des sources de nourriture et également aux réseaux de transports comme le réseau ferroviaire sur lesquels ils sont capables de faire de nombreux dégâts. Leur capacité de ronger fait qu'ils sont capables d'endommager des câbles électriques pouvant causer divers problèmes comme des coupures d'électricité et des incendies. Un faux contact a eu pour effet de modifier des feux sur un réseau ferroviaire (Figure 21). Cela a abouti à la collision d'un TER et d'un TGV le 17 juillet 2014 à Denguin. Ce faux contact a été provoqué par des rats ayant rongé des câbles.

Environ 25% des incendies non criminels aux États-Unis seraient dus à des rongeurs qui provoqueraient des ruptures de câbles électriques. Dans la centrale de Fukushima le deuxième arrêt des systèmes de refroidissement est dû à un rat brun qui a causé un court-circuit (Figure 21).

Les rats et les souris peuvent causer des dégâts dans les voitures en rongant des câbles faits avec de l'huile de poisson au niveau de joints. Dans des habitations des rongeurs peuvent abîmer des canalisations et des isolations. Une étude faite aux États-Unis a estimé le coût de destruction de matériel à 15 dollars par rat (115). Si cette donnée était rapportée au nombre de rats dans le pays les sommes pourraient être gigantesques.

Dégâts et compétitions alimentaires avec l'homme ou les animaux de rente

Les rongeurs que nous étudions durant cette thèse peuvent causer des dégâts sur la nourriture au niveau des cultures. Les campagnols des champs et terrestres sont capables de détruire, en mangeant les racines des plantes, plus de 80 % des cultures ou pâtures sur le lieu où ils vivent. Cela cause des pertes importantes pour les agriculteurs et les éleveurs. Par exemple pour une exploitation de 60 hectares ayant un droit à produire du lait à Comté il peut y avoir une perte de 6000 euros à 15000 euros selon l'importance de la pullulation de Campagnols terrestres

(Source : FREDON Franche-Comté). En 2015 en Auvergne il y a eu des pertes de fourrages énormes et de nombreux articles de presse en ont parlé comme sur la figure 21. Il y en a eu aussi en Franche Comté. Suite à ces problèmes des collectifs d'agriculteurs ont été mis en place pour protester contre les moyens de gestion mis en place car les pullulations ont duré plusieurs mois et ravagé plusieurs zones. La gestion des populations de Campagnols terrestres se fait à basse densité de population par des méthodes combinées appelées boîtes à outils.

La France n'est pas le seul pays concerné par des dégâts liés aux populations de Campagnols. En Espagne, le fait de passer de production céréalière à des légumineuses fourragères que les Campagnols des champs préfèrent manger a amené des pullulations (116,117). En Allemagne les pullulations de Campagnols des champs sur les grandes cultures entraînent des pertes financières estimées à plusieurs dizaines de milliers d'euros (118). Au niveau du stockage de nourriture ce sont surtout les rats et les souris qui font des dégâts. Les rongeurs par leurs urines et leurs excréments peuvent souiller la nourriture la rendant inutilisable. Il a été estimé qu'environ 20% de la production mondiale de graines est rendu inutilisable après son stockage en particulier du fait des dégâts liés aux rongeurs (Source : www.statistica.com). Les souris peuvent coloniser les maisons où elles se nourrissent dans les placards ou les caves. Les rats noirs s'établissent près des silos où ils peuvent se nourrir de graines. Au niveau économique les rongeurs peuvent faire de nombreux dégâts et en plus des dangers sanitaires qu'ils peuvent représenter. Les moyens de gestion de leurs populations doivent être adaptés et efficaces.

IV – Méthodes de gestion

1. Présentation de la boîte à outils

Des déséquilibres trophiques liés à la disparition de certaines espèces ayant les mêmes niches écologiques ou l'absence de prédateurs peuvent favoriser l'installation et le développement de certaines populations de rongeurs et entraîner des problèmes liés à la surconsommation de nourriture ou la destruction d'habitats. Lors de pullulations de rongeurs, différents moyens de gestion des populations peuvent être mis en place (Tableau 7). La gestion des rongeurs ne relève pas d'une solution miracle mais elle repose sur un ensemble de solutions à mettre en œuvre et dont la mise en œuvre dépend des sites et des rongeurs présents. La boîte à outil regroupe des mesures d'hygiène, des pratiques agricoles et architecturales adaptées, et des mesures de lutte physique, biologique et/ou chimique. La mise en œuvre des mesures d'hygiène (gestion des déchets, gestion des poubelles, arrêt du nourrissage, stockage fermé des sources alimentaires...) doit être la première chose à mettre en place. De mauvaises pratiques hygiéniques pouvant être à l'origine d'un échec de toutes les autres mesures.

Tableau 7. Moyens de gestions de populations de rongeurs non chimiques et non létaux (110)

Pour gérer les populations de campagnols terrestres par exemple la boîte à outil consiste en plusieurs méthodes. Il s'agit de piéger pour surveiller la densité de population et traiter chimiquement à basse densité pour éviter des pullulations. Il faut également alterner fauche et pâturage pour détruire les habitats et limiter la nourriture. La rotation des cultures et le travail du sol détruit des galeries. Favoriser la prédation peut se faire en installant des nichoirs et en mettant des haies.

2. Mesures préventives

a) Pratiques agricoles

Différentes mesures de lutte ont été mises en place dans le milieu agricole pour gérer des populations de Campagnols. Pour remettre en état les prairies dégradées par des Campagnols terrestres il y a plusieurs recommandations selon la FREDON Auvergne. Le labour doit être suivi par du semis classique si possible. Si le labour n'est pas possible il y a des techniques de sursemis ou de semis direct en fonction de l'état de la flore et cela ayant un coût il faut privilégier celles fortement dégradées et grandes. Il faut supprimer les taupinières 10 à 15 jours après le traitement des campagnols et éviter de gratter avant une période de gel pour que la prairie se refasse après l'étaupinage. Il y a plusieurs outillages qui peuvent être utilisés mais la herse étrille est la mieux adaptée pour écarter et limiter les bourrages. Pour la lutte contre les populations de Campagnols des champs la Fnams (Fédération nationale des agriculteurs multiplicateurs de semence) a développé un réseau de biosurveillance permettant de suivre les évolutions de populations et de combiner des mesures préventives comme favoriser la prédation et des mesures de lutte chimique avec l'utilisation de bromadiolone réduite (119). Le travail du sol permet de lutter contre les campagnols des champs mais est limité en agriculture de conservation des sols. Une étude s'est intéressée au travail du sol superficiel qui peut être une alternative et l'impact sur les populations de campagnols des champs. Ce qui a été montré c'est que l'utilisation d'un déchaumeur à travail vertical a permis de diminuer les populations quelques temps après mais sans données sur le long terme (119). Pour lutter contre les

populations de Campagnols terrestres un prototype utilisant des données collectées sur téléphone et des programmes pour réaliser des cartes permet une surveillance (119). La lutte contre les campagnols repose sur des principes et des méthodes utilisées à basse densité car à haute densité elles sont inefficaces.

b) Mesures architecturales

Il est difficile de mettre en place des mesures pour empêcher l'installation de rongeurs et en particulier des rats et des souris dans des bâtiments. En ce qui concerne les sources de nourriture comme les graines dans les structures agricoles il faut les isoler dans des conteneurs par exemple. Dans les habitations il y a diverses voies d'entrées possibles comme le montre la figure 22. Agir au niveau de ces points peut être une solution comme boucher les potentiels trous dans les fenêtres et les murs mais au niveau des gouttières et des câbles il est difficile de les empêcher de passer. De plus les rongeurs peuvent s'installer dans les isolations de bâtiments par exemple. Faire des travaux de rénovation peut limiter leur accès.

Figure 22. Voies de passage de rongeurs (110)

3. Méthodes de lutte

Tableau 8. Présentation des différents types de lutte contre les rongeurs

| Systèmes | Exemples | Avantages | Inconvénients |
|------------------|---|-----------------------------------|---|
| Lutte biologique | chats, chiens, buses... | Pas de pollution environnementale | Moyen de lutte anecdotique Faible efficacité |
| Lutte physique | piégeage (tapettes, pièges divers, colles, ...) | Pas de pollution environnementale | Capacité de contrôle de la prolifération Manipulation des animaux (risque de contamination homme-animal) |
| Lutte chimique | Molécules à effet immédiat | Toxicité | Aversion alimentaire -> mort immédiate de l'animal induisant un évitement de l'appât par le groupe |

| | | | |
|--|---|--|---|
| | Phosphure de zinc (appât et fumigation) | Libération (en milieu acide ou aqueux) d'un gaz toxique : le phosphane | Usage limité (risque d'inhalation par l'homme) |
| | | | Stockage contraignant |
| | Approche hormonale (contraception) | Efficacité réelle en milieu contrôlé (laboratoire) | Libération d'hormones stéroïdes dans l'environnement / reprotoxicité pour l'homme |

a) Lutte biologique

Une lutte biologique peut se faire par l'introduction de prédateurs naturels des rongeurs comme les rapaces en milieu agricole. Cette méthode de lutte est difficile à mettre en place en milieu urbain (Tableau 8). La cohabitation avec les prédateurs peut être compliquée pour les humains. Pour lutter contre les Campagnols terrestres par exemple, il existe différentes catégories de prédateurs à savoir les généralistes comme les renards qui ont un régime alimentaire varié et les spécialistes comme les hermines qui mangent principalement le campagnol terrestre. Pour que les prédateurs s'installent il faut favoriser les habitats naturels comme les bosquets et les haies ainsi que les perchoirs que ce soient naturels comme les arbres mais aussi artificiels comme les nichoirs (Source : FREDON Auvergne). Des espèces domestiques comme les chats et les chiens peuvent également être des prédateurs des rongeurs au niveau des habitations humaines ou du moins peuvent les éloigner.

b) Mesures physiques

Si les populations sont de petite taille des pièges peuvent être utilisés en lutte mécanique mais peuvent poser des problèmes concernant la souffrance animale (Tableau 8). Dans le cas de pullulations de Campagnols terrestres elle peut être efficace en début d'infestation. Pour poser les pièges il faut néanmoins le faire de manière efficace. Pour cela il y a plusieurs choses à faire comme repérer les foyers, les indices de présences, les traces récentes de passage et adapter les méthodes selon l'espèce que ce soit le type de pièges ou les appâts. Le piégeage prend du temps ce qui est un élément à prendre également en considération.

c) Lutte chimique

La lutte chimique peut se faire avec des molécules à effet immédiat (strychnine, crimidine par exemple) (Tableau 8). Mais comme l'effet est immédiat elles n'évitent pas l'aversion alimentaire. De ce fait des molécules à effet légèrement différé ou différé ont été développées (Tableau 8) telles que l'alphachloralose, la norbromide, le cholécalciférol ou les anticoagulants antivitaminé K :

- L'alphachloralose est un composé organique artificiel venant de la condensation d'une molécule de glucose avec une molécule de chloral anhydre en présence d'acide sulfurique (120). Elle possède deux effets, un effet sédatif et un effet sur l'excitation motrice. Son effet est dépendant de la température extérieure et est utilisé contre les souris. L'utilisation de l'alphachloralose a été largement associée à des intoxications chez le chat, les oiseaux (121) car cette molécule était utilisée en tant que corvicide à des concentrations de 96%. Aujourd'hui elle n'est plus homologuée pour la lutte contre les corbeaux et n'est homologuée que en tant que souricide à des concentrations à 4% ce qui permet de limiter les accidents chez les espèces non-cibles. Cette molécule ne marche que pour la lutte contre la souris.

- La norbormide est utilisée contre les rats (122). Elle provoque une vasoconstriction irréversible des petites artères périphériques et une vasodilatation des artères systémiques de gros calibre. Elle n'est pas autorisée en Europe.

- Le cholécalciférol ou vitamine D3 provoque une hypercalcémie. Cela provoque des troubles fonctionnels et organiques chez l'animal dans les jours qui suivent l'ingestion et n'est plus autorisé pour le moment en Europe en raison des nombreux accidents chez les espèces non-cibles en particulier le chien (123,124). Une utilisation combinée de coumatétralyl (anticoagulant antivitaminé K) et de cholécalciferol a été testée sur des rats bruns résistants aux anticoagulants et cela semble fonctionner tout en limitant les risques écotoxicologiques (125). Une tentative de ré-homologation est en cours en Europe, mais la vitamine D sera probablement classée comme perturbateur endocrinien.

- Le phosphore de zinc utilisé contre les campagnols, vient d'être autorisé en France, était déjà autorisé dans d'autres pays de l'Europe tel que l'Allemagne. Il est utilisé en appâts à des concentrations de 1 à 5 % (110). Il agit en provoquant des insuffisances cardiaques et des

dommages aux organes internes. Il tue le campagnol intoxiqué en 1 à 3 heures. Il y a peu de risques d'empoisonnement secondaire.

- Les anticoagulants anti vitamines K (AVKs) sont utilisés comme rodenticides contre plusieurs espèces de rongeurs. Différentes formulations sont disponibles, sous forme de céréales (blé ou avoine), sous forme de pâtes, sous forme de blocs ou sous forme de mousse se collant aux rongeurs (pour le coumatétralyl uniquement). Ces molécules agissent en inhibant l'enzyme vitamine K epoxyde reductase subunit 1 (VKORC1) qui est impliquée dans la coagulation et leur action provoque des hémorragies dans les 3 ou 4 jours suivant l'ingestion. Ils sont utilisés

1/ comme biocides dans et autour des bâtiments contre les souris et les rats avec une obligation de les utiliser dans des boites d'appâtage depuis 2013. Pour cet usage, sont autorisées 8 molécules en France, la warfarine, le coumatétralyl, la chlorophacinone, la bromadiolone, le difénacoum, la diféthialone, le brodifacoum et le flocoumafène.

2/ pour la protection des plantes en plein champs contre les campagnols avec des mesures restrictives : nécessité d'une autorisation de traitement par la mairie, quantité épanchée par hectare limitée et enfouissement obligatoire dans les galeries. Seule la bromadiolone est autorisée dans la lutte contre les Campagnols de manière réglementée en basse densité de population. Les quantités sont également réglementées à savoir en traitement mécanique à 20 kilogrammes par hectare et en traitement manuel de 20 à 25 grammes par poste de traitement (Source FREDON Auvergne). Les conditions d'utilisation de la bromadiolone pour la gestion de populations de rongeurs sont régies par l'arrêté du 14 mai 2014.

V – Les anticoagulants anti-vitamines K

1. Historique

Dans les années 1920 aux États-Unis et au Canada des bétails ayant consommé du mélilot doux avarié souffrèrent d'hémorragies spontanées. Le vétérinaire pathologiste Franck Shofield remarqua un temps de coagulation allongé chez ces animaux. Après le retrait du trèfle doux de leur alimentation, leur état clinique s'améliora (126). En 1937 Quick vit une diminution du taux de prothrombine chez ces animaux. En 1939 Karl Paul Link et son équipe isolèrent l'agent responsable de ces hémorragies, le 3,3'-diméthylène-4-hydroxycoumarine, le synthétisèrent et l'appelèrent dicoumarol. Ils montrèrent qu'un traitement à la vitamine K1 contrait les effets du dicoumarol ce qui en fait un anticoagulant anti-vitamine K (127). Ils développèrent 106 analogues. L'un d'eux fut utilisé en tant que raticide, la warfarine. Son activité anticoagulante en fit un rodenticide à partir de 1948. Aujourd'hui les AVKs sont utilisés en médecine humaine en prévention des maladies thrombo-emboliques. Ils sont utilisés aussi en tant que rodenticides dans la gestion des populations de rongeurs. Ils agissent en inhibant l'activation de certains facteurs de coagulation, les facteurs II, VII, IX et X par gamma-carboxylation. Les molécules utilisées en médecine humaine sont différentes de celles utilisées dans la gestion des populations de rongeurs excepté la warfarine.

2. Les molécules

Il y a trois grandes familles de molécules antivitamine K utilisées en tant que rodenticides (Figure 23) :

- Des dérivés de la 4-hydroxycoumarine (warfarine, coumatétralyl, bromadiolone, difénacoum, brodifacoum et flocoumafène)
- Des dérivés de la 4-hydroxythiocoumarine (diféthialone)
- Des dérivés de l'indane-1,3-dione (chlorophacinone)

On peut classer les AVKs en deux générations avec des caractéristiques différentes :

- Une première génération aux molécules moyennement actives (warfarine, coumatétralyl et chlorophacinone), efficaces en plusieurs ingestions à faible rémanence (environ 15 jours)
- Une deuxième génération aux molécules très efficaces (bromadiolone, difénacoum, brodifacoum, diféthialone et flocoumafène) en une seule ingestion, à longue rémanence (jusqu'à 300 jours).

Les AVKs ont une analogie structurale avec la vitamine K et leurs propriétés physico-chimiques varient selon leur type.

Figure 23. Structures de différentes molécules d'AVKs (source : www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

3. Mécanisme d'action

a) Historique

En 1929 deux scientifiques danois Carl Peter Henrik Dam et Shônheyder qui menaient des recherches sur le métabolisme du cholestérol remarquèrent que des poulets nourris sans lipides mourraient d'un syndrome hémorragique même après ajout de cholestérol à leur nourriture. En 1935 Carl Peter Henrick Dam identifia un composé liposoluble différent du cholestérol qu'il appela vitamine K pour koagulation en danois ou vitamine de la coagulation (128). Durant l'année 1936 il extrait la vitamine K1 (phylloquinone) à partir de la luzerne et en 1939 un chercheur américain Edward Adelbert Doisy réalise la synthèse chimique de la vitamine K. La même année la vitamine K2 (ménaquinone, MK) est extraite de chair de poisson avariée. Durant l'année 1943 Karl Henrick Dam et Edward Adelbert Doisy obtinrent le prix Nobel pour leurs travaux respectifs sur la découverte de la vitamine K d'une part et la découverte de sa structure chimique d'autre part. Les structures des différentes vitamines K sont présentées sur la figure 24.

Figure 24. Structures des différentes vitamines K (source : themedicalbiochemistrypage.org)

La vitamine K est le co-substrat de la réaction de gamma-carboxylation consistant en la carboxylation en gamma de résidus glutamiques (Glu) en acide gamma carboxy-glutamique (Gla) qui se fait dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes mais aussi dans d'autres cellules comme les ostéoblastes avec l'action de l'enzyme appelée gamma-glutamyl-carboxylase. La vitamine K permet une modification post traductionnelle de protéines vitamines K dépendantes (PVKDs) et il y en a actuellement 16 (Tableau 9).

Tableau 9. Les différentes PVKD connues à ce jour

| PVKD hépatiques | PVKD extra hépatiques |
|--|---|
| facteurs de coagulation (II, VII, IX et X), la protéine C, la protéine S et la protéine Z | Protéines Gla transmembranaires (PRG1, PRG2 (129), TMG3 et TMG4 (130)), protéines riches en Glu gamma carboxylables (Gla-Rich-Protein et périostine 1), Growth Arrest Specific gene 6, Matrix Gla Protein et Ostéocalcine |

Légende :

Gla : Acide amine gamma-carboxyglutamate, PRG : Prolin-rich Gla protein et TMG : Protéine Gla transmembranaire.

b) Rôle de la vitamine K dans la coagulation

La vitamine K sert notamment de co-substrat à l'enzyme GGCX qui sert à l'activation de certains facteurs de coagulation (II, VII, IX et X) eux-mêmes impliqués dans l'hémostase. L'hémostase est un ensemble de mécanismes permettant d'arrêter les hémorragies et d'empêcher les thromboses. Elle est constituée de trois phases.

L'hémostase primaire sert à combler une brèche vasculaire en faisant un thrombus plaquettaire en quelques minutes. Elle se fait en deux phases. La première phase vasculaire va ralentir l'écoulement du sang et regrouper plaquettes et protéines coagulantes au niveau de la plaie. La deuxième phase plaquettaire va consister en l'adhésion des plaquettes, leur activation et leur

agrégation. Les cellules endothéliales vont permettre de synthétiser le facteur de Von Willebrand qui sert de transporteur au facteur VIII (cofacteur de la coagulation) et médiateur de l'adhésion et agrégation plaquettaire quand il y a une lésion vasculaire et la prostacycline par exemple. Les plaquettes possèdent une membrane riche en cholestérol, en calcium, ayant des récepteurs pour facteur de Von Willebrand et fibrinogène. Le fibrinogène est un dimère composé de trois chaînes (alpha, bêta et gamma) avec un domaine central E et deux domaines latéraux D, jouant un rôle dans l'hémostase primaire et l'hémostase secondaire.

- L'hémostase secondaire sert à renforcer le thrombus blanc par le fibrinogène se convertissant en fibrine. Il s'agit d'une cascade de réactions enzymatiques permettant d'activer des facteurs de coagulation (Tableau 10) pour produire la fibrine. Les régulateurs de la coagulation sont des systèmes anticoagulants physiologiques situés dans le plasma permettant d'inactiver les facteurs activés. Le système de l'antithrombine inhibe la thrombine et le facteur Xa, l'héparine augmente son action anticoagulante. Le système protéine C-protéine S permet l'inactivation des facteurs Va et VIIIa et ces deux protéines sont des PVKDs. Le système tissu factor pathway inhibitor (TFPI) peut inhiber le complexe facteur VIIa- facteur tissulaire.

- L'hémostase tertiaire a pour objectif de dissoudre la fibrine. Il s'agit d'une destruction des polymères de fibrine ce qui a pour objectif d'empêcher l'installation et l'extension du caillot.

Tableau 10. Description des facteurs de coagulation

| Forme inactive | Forme active | Nom | PVKD |
|----------------|--------------|----------------------------|------|
| I | Ia | Fibrinogène | non |
| II | IIa | Prothrombine | oui |
| III | IIIa | Facteur tissulaire | non |
| IV | IVa | Calcium ionisé | non |
| V | Va | Proaccélérine | non |
| VII | VIIa | Proconvertine | oui |
| VIII | VIIIa | Facteur antihémophilique A | non |
| IX | IXa | Facteur antihémophilique B | oui |
| X | Xa | Facteur de Stuart Prower | oui |

| | | | |
|------|-------|---------------------|-----|
| XI | XIa | Facteur Rosenthal | non |
| XII | XIIa | Facteur Hageman | non |
| XIII | XIIIa | Facteur Laki-Lorand | non |

c) Cycle de la vitamine K

La vitamine K est nécessaire à la gamma carboxylation d'acides aminés glutamiques en acides aminés gamma-carboxyglutamates de protéines dites protéines vitamine K dépendantes. Cette gamma carboxylation permet l'activation de facteurs de coagulations et autres PVKDs. Lors de cette gamma-carboxylation, la vitamine K est transformée en vitamine K époxyde. Une partie de la vitamine K est apportée par la nourriture (131) mais cet apport est insuffisant pour assurer les besoins en vitamine K (132). L'organisme a un cycle de recyclage de la vitamine K époxyde en vitamine K hydroquinone qui se fait en deux étapes.

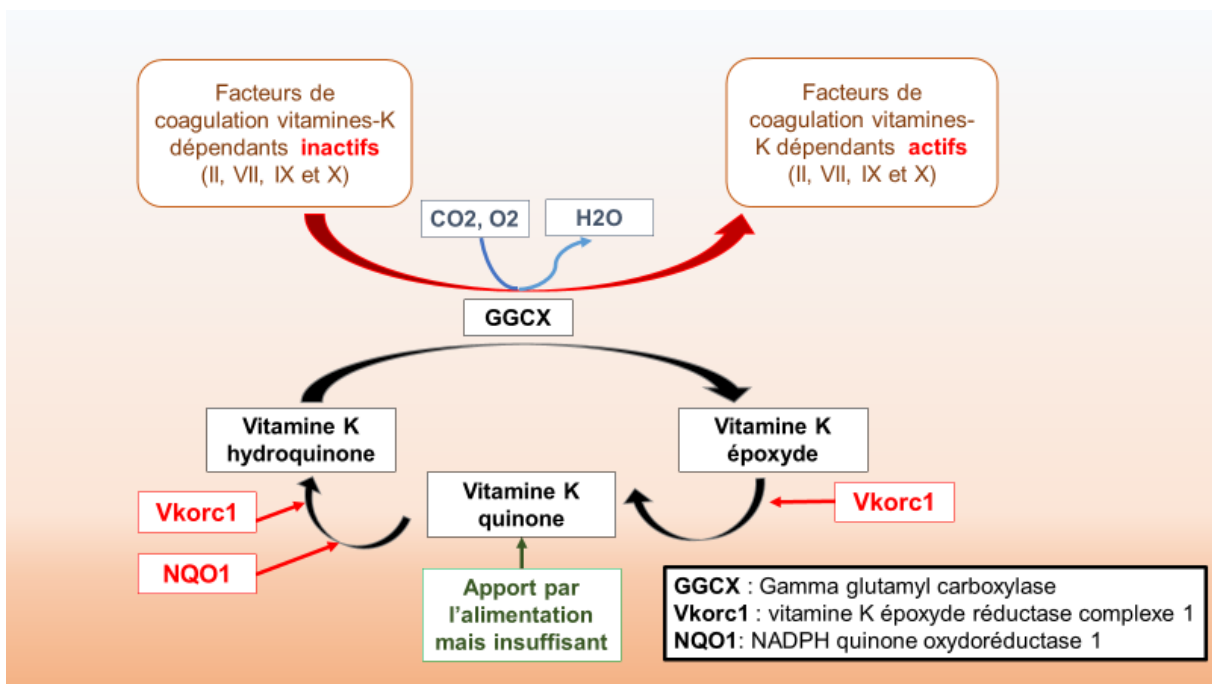


Figure 25. Cycle de recyclage de la vitamine K

La première étape du cycle est la réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone (Figure 25). L'enzyme qui catalyse cette transformation est la VKORC1 (Vitamine K époxyde réductase). L'activité de la vitamine K époxyde réductase (VKOR) décrite pour la première fois

en 1970 (133) est inhibable dans le foie par le coumafène. Le gène vitamine K epoxyde reductase complex subunit 1 ou *vkorc1* qui fait 5126 paires de bases, code pour une protéine VKORC1 de 163 acides aminés et est situé sur le chromosome 16 de l'humain. Ce gène a été découvert en 2004 (134,135) et est conservé parmi les vertébrés, les plantes et les bactéries (136). La deuxième étape du cycle permet la réduction de la vitamine K quinone en hydroquinone. L'activité VKR est catalysée par une NADPH quinone oxydoréductase ou DT-daphorase ainsi que par la VKORC1.

d) Inhibition du cycle de la vitamine K par les AVKs

Les AVKs agissent en inhibant l'activité VKOR du cycle de recyclage de la vitamine K (Figure 26). Il s'agit d'une inhibition de type non compétitif. Les AVKs ont une homologie structurale avec la vitamine K époxyde. Le site de fixation sur VKORC1 n'est pas défini. Ils bloquent le cycle de recyclage de la vitamine K en entraînant une diminution de la vitamine K disponible. Ils entraînent ainsi une augmentation du temps de coagulation et un retard de formation de la fibrine. Les réserves en facteurs de coagulation II, VII, IX et X activés étant très importantes, l'effet clinique des AVKs est différé dans le temps, les premiers symptômes apparaissant au moins 48 heures après l'administration. Cet effet différé permet de contourner l'aversion alimentaire des rongeurs.

Figure 26. Mécanisme d'action des AVKs sur le cycle de la vitamine K (110)

4. Métabolisme des AVKs

Après leur ingestion les AVKs sont métabolisés dans le foie par les mono-oxygénases et les enzymes de phase II du réticulum endoplasmique hépatique, ce sont les cytochromes P450 (CYP-450) qui assurent le métabolisme hépatique chez le rat et le type de CYP-450 agissant varie selon l'espèce et la molécule (137). La demi-vie est plus longue pour les molécules AVKs de seconde génération (plusieurs mois) que pour celles de première génération (environ 15 jours) (Tableau 11). Les molécules de seconde génération sont donc des molécules très

persistantes dans le foie des animaux intoxiqués (138). Les rongeurs intoxiqués par les AVKs, moribonds ou morts, peuvent se faire manger par un prédateur et entraîner une exposition secondaire de ce prédateur. Les AVKs ont été largement rapportés être associés à des mortalités de la faune sauvage (rapaces, renards, sangliers...) (139,140). Cela explique la complexité d'utilisation de ces molécules.

Tableau 11. Caractéristiques de molécules AVKs chez le rat (141)

Une étude réalisée dans le département du Doubs a analysé des populations de renards et des quantités de bromadiolone utilisées en lutte chimique pour gérer des populations de Campagnols terrestres (142). Cette étude a montré que l'utilisation de la bromadiolone comme rodenticide avait un impact négatif sur les populations de renards. Une étude menée en Allemagne sur des échantillons biologiques provenant de différentes espèces de la faune sauvage a rapporté une exposition à au moins une molécule anticoagulante voisine de 60%, dans 20% des cas les concentrations mesurées pouvaient avoir des effets biologiques (143). Des anticoagulants de seconde génération ont été détectés plus fréquemment que ceux de première génération.

VI - Résistance aux AVKs

1. Historique

Chez certaines espèces il existe des phénotypes naturellement résistants aux AVKs rendant leur action peu, voire pas efficace. Des résistances à la warfarine dès le début de son utilisation ont été trouvées chez *Rattus norvegicus* en 1958 (144) et chez *Mus musculus domesticus* en 1960 (145). Des résistances ont ensuite émergé un peu partout dans le monde chez différentes espèces de rongeurs rendant les gestions de leurs populations par les AVKs difficiles. Une deuxième génération d'AVKs a été développée. Des résistances existent également à certaines molécules de deuxième génération. Il existe deux types de résistance, à savoir la résistance de cible et la résistance métabolique. Ces deux types de résistance entraînent une perte d'efficacité des AVKs utilisés. Les individus résistants peuvent manger plus d'appâts contenant des AVKs que les individus dits sensibles. Il y a une sélection de phénotypes résistants aux AVKs car ceux-ci survivent quand il y a une pression exercée par l'utilisation des AVKs pour gérer une population.

2. La résistance de cible

La résistance de cible est basée sur des single-nucleotide-polymorphim ou SNP du gène *vkorc1* qui entraînent une modification de la protéine VKORC1 (134,135). Il existe de nombreux polymorphismes de ce gène (146,147) (Tableau 12).

Tableau 12. Mutations du gène *vkorc1* et niveaux de résistances à des molécules d'AVKs associées

| Espèce | mutation | Niveau résistance | | | | | | source |
|--------------------------------|----------|-------------------|-----------------|--------------|------------|-------------|--------------|--------|
| | | Warfarine | Chlorophacinone | Bromadiolone | Difenacoum | Brodifacoum | Difethialone | |
| <i>Rattus norvegicus</i> | L120Q | +++ | ++ | + | ++ | + | + | (148) |
| | L128Q | + | + | + | + | + | + | |
| | Y139C | +++ | +++ | + | + | + | + | |
| | Y139F | +++ | ++ | + | + | + | + | |
| | Y139S | +++ | ++ | + | + | + | + | |
| <i>Mus musculus domesticus</i> | R12W | + | + | + | + | + | + | (149) |
| | A26S | + | + | + | + | + | + | |
| | A26T | + | + | + | + | + | + | |

| | | | | | | | |
|------------|-----|-----|----|----|----|----|----|
| E37G | + | + | + | + | + | + | + |
| A48T | + | + | + | + | + | + | + |
| R58G | + | + | + | + | + | + | + |
| R61L | + | + | + | + | + | + | + |
| L124Q | + | + | + | + | + | + | + |
| L124M | + | + | + | + | + | + | + |
| L128S | +++ | ++ | ++ | + | + | + | + |
| Y139C | ++ | +++ | ++ | + | + | + | + |
| A26T/L128S | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| A26S/L128S | ++ | ++ | + | + | ++ | + | + |
| Vkorc1spr | ++ | ++ | + | + | + | + | + |

a) *Le rat brun*

Concernant le rat brun, plusieurs études ont été faites et 5 mutations ont été trouvées en Europe (146) (Figure 27). Ces mutations confèrent toutes une résistance sévère aux molécules de première génération et à certaines molécules de seconde génération telle que la bromadiolone. En France Y139F est la plus présente (150) (Figure 28). Une équipe de chercheurs a étudié la résistance. Ils ont caractérisé l'implication de SNP trouvés chez des rats et des souris en exprimant les VKORC1 mutées dans des cellules HEK et l'activité VKOR a été analysée sans et avec warfarine. Il a été mis en évidence qu'une mutation en position 139 avait tendance à apporter de la résistance à la molécule (147). Une étude *in vivo* a ensuite été réalisée pour analyser les conséquences des mutations par l'introgression de la mutation 139F dans le génome d'une souche de rat de laboratoire (150). Après 6 générations successives il y avait une proportion de 1,56% du génome du rat muté 139F avec un segment moyen inséré centré autour de *vkorc1*. Il a été montré que la présence de la mutation était responsable de la résistance aux AVKs de première génération observée chez le rat sauvage. À l'état hétérozygote il y a un phénotype intermédiaire qui démontre une codominance entre les allèles sauvages et mutés. Une étude a caractérisé l'implication des mutations dans la résistance dans la levure *Pichia pastoris* (148). Cela a établi que la VKORC1 mutée est seule impliquée dans la résistance aux anticoagulants anti-vitamines K.

Figure 27. Mutations VKORC1 chez le rat brun en Europe (146)

Figure 28. Mutations VKORC1 chez le rat brun en France (151)

b) *La souris domestique*

Chez les souris domestique *Mus musculus domesticus* plusieurs mutations ont été trouvées. Certaines sont spontanées, d'autres issues d'une introgression naturelle. En effet, la cohabitation des souris *Mus spretus* et *Mus musculus domesticus* en Espagne a entraîné l'introgression naturelle du gène *Vkorc1* de la souris *Mus spretus* vers la souris *Mus musculus domesticus* (152). Les souris *Mus spretus* étant naturellement résistantes aux AVKs ont transmis leur résistance aux souris domestiques.

Une étude menée en France a montré que 70% des souris analysées présentaient des mutations du gène *vkorc1* et parmi elles 80% étaient homozygotes (149). Les mutations détectées en France sont présentées sur la figure 29. Contrairement au rat où il y a un génotype prédominant de *vkorc1* en France, chez les souris plusieurs génotypes sont présents avec des fortes fréquences alléliques (les mutations Y139C, L128S et l'introgression *spretus* *Vkorc1*^{SPF}). Ces mutations entraînent une résistance sévère aux molécules de première génération et à la bromadiolone, les autres molécules restant efficaces. Néanmoins, la coexistence de différents mutants sur le même site a entraîné l'émergence de doubles mutants. Ces doubles mutations confèrent une résistance sévère également aux molécules de seconde génération (149).

Figure 29. Mutations VKORC1 chez la souris domestique en France (149)

3. La résistance métabolique

La résistance métabolique chez les rongeurs serait essentiellement due à des surexpressions des cytochromes P-450. Les AVKs sont ainsi éliminés plus rapidement chez les individus résistants. En 2001 une étude a montré de la résistance à la warfarine chez des rats noirs (153). Une surexpression de CYP-3A a été découverte chez les individus résistants par rapport aux individus sensibles (154) et CYP-3A provoque une diminution des effets de AVKs et augmente la tolérance à de fortes doses de warfarine chez l'humain (155). La Caluménine a été envisagée comme mécanisme de résistance métabolique (156) mais cela n'a pas été observé ailleurs. Une étude faite sur des campagnols de Californie (*Microtus californicus*) a montré que des foies d'animaux ayant été exposés métabolisaient plus de diphacinone et de chlorophacinone par rapport à des animaux n'ayant pas été exposés (157). Les mâles exposés avaient un foie plus

gros que ceux n'ayant pas été exposés alors qu'il n'y avait pas de différences significatives pour les poids des foies des femelles. La résistance métabolique est souvent associée avec des changements de poids des foies. Chez des rats bruns il a été montré que les mâles sont plus sensibles que les femelles à ces deux molécules (158). La susceptibilité des genres par rapport à la diphacinone a également été rapportée chez la souris (159). Les changements métaboliques pourraient être des mécanismes pour expliquer la résistance des populations de campagnols aux molécules utilisées (157) mais cela pourrait être également dû à la capacité de ces molécules à inhiber l'enzyme VKORC1 (160).

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Notre travail s'inscrit dans un projet dont l'objectif général est la gestion du risque sanitaire associé aux rongeurs évoluant dans divers écosystèmes. Pour cela, nous nous sommes intéressés à 3 problématiques illustratives des préoccupations associées à divers rongeurs.

Problématique 1. Risques leptospirosiques associés à une pullulation non maîtrisée de campagnols terrestres.

L'objectif ici a été d'évaluer le risque sanitaire lié au portage de leptospires par le campagnol terrestre et la résistance aux anticoagulants des campagnols terrestres. Ce risque peut être exacerbé par la difficulté de contrôler localement les populations de campagnols en raison de phénomènes de résistance à certains anticoagulants rodenticides. Nous nous sommes intéressés pour cette étude à deux régions qui ont été particulièrement touchées par les problèmes liés aux campagnols, l'Auvergne et la Franche Comté. Les buts ont été d'analyser la répartition des souches de leptospires et les mutations codantes du gène *vkorc1* de campagnols dans différentes zones.

Problématique 2. La souris domestique, véritable menace sanitaire dans le cadre de la leptospirose humaine et animale.

Pour illustrer cette 2^{ème} problématique, nous nous sommes intéressés à un élevage bovin dans lequel des cas de leptospirose bovine concomitants à un cas de leptospirose humaine se sont déclarés. Nous y avons étudié le portage de leptospires chez des souris capturées dans la ferme ainsi que leur résistance de cible aux anticoagulants rodenticides utilisés localement. Une des retombées de ce travail était de pouvoir identifier les points de maintenance des leptospires pour pouvoir ensuite proposer un plan de gestion à l'éleveur et limiter la prolifération des souches sur le site.

Problématique 3. Étude de la résistance aux AVKs chez des rongeurs dans un contexte leptospirosique en Martinique.

Nous avons étudié la résistance de cible aux AVKs chez des populations de rongeurs commensaux (rat brun, rat noir et souris domestique) dans un contexte leptospirose endémique en Martinique. Dans ce cadre nous nous sommes intéressés à ces 3 espèces commensales pour lesquelles la résistance de cible a déjà été bien étudiée. L'exposition aux AVKs a aussi été

analysée. Le but était d'analyser la sensibilité des 3 espèces de rongeurs commensaux aux AVKs pour mettre en place des moyens de gestions de leurs populations efficaces afin de limiter le risque de transmission de leptospirose.

PROJETS DE LA THÈSE

1) Étude du portage leptospirosique et de la résistance aux AVKs chez le Campagnol terrestre

1. Contexte et objectifs de l'étude

Notre étude s'est intéressée à deux régions dans lesquelles les Campagnols des champs et Campagnols terrestres causent de nombreux dégâts, recensés depuis le 18^{ème} siècle. Les périodes de pullulations sont notées depuis 1949 pour la Franche Comté et 1973 en Auvergne. Les moyens de lutte ont été mis en place différemment dans les deux régions. En Franche Comté il y a eu de nombreuses réflexions sur les méthodes utilisées afin de passer du traitement curatif au traitement préventif pour limiter les risques d'écotoxicité. En effet, les traitements curatifs à base de bromadiolone ont occasionné des intoxications de la faune sauvage. Le traitement préventif vise à limiter les phases de pullulations en agissant à basse densité de population, avec une combinaison de méthodes chimiques (bromadiolone utilisée mais limitée voire interdite quand il y a des problèmes liés à la biodiversité), biologiques (par la favorisation de la prédation) et mécaniques (piégeages). Une modification des pratiques agricoles associée à des recommandations faites dans le journal officiel 2014 sont utilisées en Franche Comté visant à améliorer la situation. En Auvergne il y a une appréhension différente du problème. En effet, des périodes de fortes pullulations plus récentes qu'en Franche Comté, comme en 2011 et en 2015, ont conduit à une utilisation forte de la bromadiolone malgré les recommandations.

Ce projet vise à comparer le danger sanitaire lié au portage de leptospires pathogènes et la potentielle résistance de cible aux AVKs des campagnols entre les deux régions. Les cartes de la figure 30 présentent les différents sites de piégeage.

Figure 30. Cartes de répartition des différents sites de piégeage des campagnols (sources des cartes : fr.actualitix.com et d'après les données de la base GEOFLA de l'IGN)

Légende : 1 : Franche Comté et 2 : Auvergne. En violet sont indiquées les zones échantillonnées

2. Principaux résultats de l'étude et discussion

a) Méthodologie

En Auvergne, deux départements ont été étudiés : le Cantal avec 153 individus issus de 15 parcelles et le Puy De Dôme avec 153 individus issus de 10 parcelles, tous de l'espèce campagnol terrestre (Tableau 13). En Franche Comté, le département du Doubs a été étudié avec 107 individus de l'espèce campagnol terrestre et 36 individus de l'espèce campagnol des champs sur 10 parcelles (voir article en cours de préparation).

Tableau 13. Nombre de campagnols terrestres capturés par zone de piégeage en Auvergne

| ZONE | NOMBRE D'INDIVIDUS |
|--------------------|---------------------------|
| CANTAL | |
| PARCELLE 1 | 10 |
| PARCELLE 2 | 10 |
| PARCELLE 3 | 10 |
| PARCELLE 4 | 10 |
| PARCELLE 5 | 10 |
| PARCELLE 6 | 10 |
| PARCELLE 7 | 10 |
| PARCELLE 8 | 10 |
| PARCELLE 9 | 10 |
| PARCELLE 10 | 10 |
| PARCELLE 11 | 14 |
| PARCELLE 12 | 10 |
| PARCELLE 13 | 12 |
| PARCELLE 14 | 10 |
| PARCELLE 15 | 7 |
| PUY DE DOME | |
| PARCELLE 1 | 54 |

| | |
|----------------------------------|----|
| PARCELLE 2 | 10 |
| PARCELLE 3 | 17 |
| PARCELLE 4 | 7 |
| PARCELLE 5 | 23 |
| PARCELLE 6 ET PARCELLE 10 | 3 |
| PARCELLE 7 | 26 |
| PARCELLE 8 | 9 |
| PARCELLES INCONNUES | 4 |

Tableau 14. Nombre de campagnols des champs capturés par parcelle en Franche Comté

La parcelle n'est pas indiquée lorsqu'aucun campagnol des champs n'a pu être capturé.

| Zone | Nombre d'individus | Prévalence du portage de leptospires |
|-------------|---------------------------|---|
| 4 | 12 | 75% |
| 6 | 2 | 50% |
| 8 | 3 | 67% |
| 10 | 19 | 37% |

L'échantillonnage des campagnols terrestres en Franche comté est indiqué dans l'article ci-après.

La méthodologie utilisée en Auvergne est la même que celle utilisée en Franche Comté et présentée dans l'article en cours de préparation. Cette étude a permis de mettre en avant plusieurs éléments concernant les campagnols.

b) Résultats

En Franche Comté, environ 52% des campagnols terrestres étaient porteurs de leptospires pathogènes de l'espèce *Leptospira kirschneri*, avec des prévalences allant de 21% à 75% selon la parcelle. Environ 53% des campagnols des champs étaient porteurs de leptospires pathogènes des espèces *L. interrogans* et *L. kirschneri*, avec des prévalences allant de 37% à 75%. Etant donné que l'échantillonnage en campagnols des champs était faible avec des animaux capturés

seulement sur 4 communes (Tableau 14), la prévalence moyenne obtenue n'est qu'indicative (Tableau 15). Des études plus larges seraient nécessaires pour obtenir une prévalence significative.

Deux profils moléculaires ont néanmoins été identifiés. Un profil spécifique (VNTR4 1 et VNTR7 2) a été retrouvé sur la parcelle 7 pour les Campagnols terrestres et sur la parcelle 6 pour les Campagnols des champs. Un second profil (VNTR4 2 et VNTR7 2) a été retrouvé sur les autres parcelles pour les deux espèces (voir article en cours de préparation).

Tableau 15. Données sur le portage des leptospires par les Campagnols

| Espèce rongeur | Région | Département | Prévalence | Espèces leptospires |
|-----------------------|---------------|--------------------|-------------------|--|
| Campagnol terrestre | Auvergne | Cantal | 3% | <i>L. borgpetersenii</i> et <i>L. kirschneri</i> |
| | | Puy De Dôme | 10% | <i>L. borgpetersenii</i> , <i>L. interrogans</i> et <i>L. kirschneri</i> |
| | Franche Comté | Doubs | 52% | <i>L. kirschneri</i> |
| Campagnol des champs | | Doubs | 53% | <i>L. interrogans</i> et <i>L. kirschneri</i> |

L'étude en Auvergne est encore en cours. La prévalence globale du portage de leptospires pathogènes par les campagnols terrestres analysés était de 6,5%. Dans le Cantal elle était de 3% avec des variations allant selon les zones de 0% à 20%. Dans le Puy de Dôme elle était de 10% avec des variations allant selon les zones de 0% à 18%. Néanmoins, 3 espèces de leptospires ont été trouvées sur les deux départements d'Auvergne : *L. borgpetersenii*, *L. interrogans* et *L. kirschneri*, alors que seule *L. kirschneri* a été identifiée en Franche Comté chez les campagnols terrestres. Les profils VNTR n'ont pas pu être identifiés par rapport aux profils VNTR répertoriés, ce qui peut suggérer l'existence de souches encore non caractérisées et spécifiques des campagnols terrestres.

Figure 31. Cartes du portage de leptospires et de mutations *vkorc1* chez les Campagnols terrestres (sources des cartes : fr.actualitix.com et d’après les données de la base GEOFLA de l’IGN)

Nous pouvons noter une grande différence de prévalence globale du portage de leptospires entre l’Auvergne et la Franche Comté (Tableau 15). Les conditions environnementales ne sont pas les mêmes entre les deux régions, ce qui pourrait avoir un impact sur le cycle de transmissions des leptospires et leur maintenance. Les résultats sont cohérents avec le faible nombre de cas de leptospirose humaine en Auvergne, comme présenté en introduction. Le danger sanitaire du aux Campagnols terrestres en Auvergne semble donc moins important qu’en Franche Comté, aux vues de la prévalence du portage de leptospires. Les stratégies de gestion des populations pourraient être différentes si le risque sanitaire lié à la leptospirose était pris en compte lors de la prise de décision en Franche Comté. Néanmoins, dans les 2 régions, la gestion des populations de campagnols terrestres est basée sur l’utilisation de la bromadiolone (seule molécule AVKs autorisée en France), d’où l’étude de la résistance des campagnols terrestres à cette molécule.

Tableau 16. Caractéristiques des mutations *vkorc1* des Campagnols terrestres

| Mutations VKORC1 | | Franche Comté | Auvergne |
|------------------|---|---------------|----------|
| G71R | Nombre d'individus mutés / Nombre d'individus globaux | 2/107 | 6/153 |
| | Nombre d'homozygotes | 0 | 0 |
| | Nombre d'hétérozygotes | 2 | 6 |
| S149I | Nombre d'individus mutés / Nombre d'individus globaux | 3/107 | |
| | Nombre d'homozygotes | 0 | |
| | Nombre d'hétérozygotes | 3 | |
| E67D/G71R | Nombre d'individus mutés / Nombre d'individus globaux | | 1/153 |
| | Nombre d'homozygotes | | 0 |
| | Nombre d'hétérozygotes | | 1 |

Tableau 17. Fréquences alléliques des mutations *vkorc1* des campagnols terrestres

| Mutations VKORC1 | Fréquence allélique par parcelle (Franche Comté) | | Fréquence allélique globale | Fréquence allélique par parcelle (Auvergne) | | Fréquence allélique globale |
|------------------|--|------------|-----------------------------|---|------------|-----------------------------|
| | Parcelle 3 | Parcelle 9 | | Parcelle 1 | Parcelle 3 | |
| G71R | | | 0,9 | | | 2 |

| | | | | | | |
|-----------|------------|------------|-----|------------|-----|--|
| | 3,6 | 3,3 | | 4,6 | 2,9 | |
| S149I | Parcelle 7 | Parcelle 8 | 1,4 | | | |
| | 3,1 | 16,6 | | | | |
| E67D/G71R | | | | Parcelle 3 | 0,3 | |
| | | | | 2,9 | | |

En Franche Comté, deux mutations codantes de *vkorc1* ont été trouvées chez les campagnols terrestres : G71R et S149I (Figure 31). Dans le tableau 16 nous observons que peu d'individus portent des mutations codantes de *vkorc1* ; de plus, tous les individus porteurs de ces mutations sont hétérozygotes, ce qui explique les fréquences alléliques basses, respectivement 0,9 et 1,4 pour G71R et S149I (Tableau 17).

Deux mutations codantes de *vkorc1* ont été trouvées en Auvergne : le double mutant E67D/G71R (en cours de caractérisation) et le mutant simple G71R, également identifié en Franche Comté (Figure 2). Dans le tableau 16 nous pouvons voir que peu d'individus sont porteurs de mutations codantes et qu'elles sont toutes à l'état hétérozygote (comme en Franche Comté), ce qui explique les fréquences alléliques basses : respectivement 2 et 0,3 pour G71R et E67D/G71R (Tableau 17).

Les méthodes de caractérisation des facteurs de résistance sont présentées dans l'article en cours de préparation. Les protéines mutées et non-mutées sont exprimées dans les membranes des levures *Pichia pastoris*. Puis, une caractérisation enzymologique est faite avec détermination pour chaque mutant des constantes cinétiques K_m , V_{max} et des constantes d'inhibition (K_i) vis-à-vis de la bromadiolone. Les facteurs de résistance induits par les mutations étudiées sont calculés par le rapport K_i de la protéine mutée sur K_i de la protéine non-mutée. Les mutations G71R et S149I induisent des facteurs de résistance (c'est-à-dire le rapport entre le K_i de la protéine mutée sur le K_i de la protéine non-mutée) à la bromadiolone limités, compris entre 3 et 5.

Il faut néanmoins faire attention à l'utilisation de la bromadiolone sur les parcelles concernées pour éviter la sélection et la prolifération de ces allèles. Chez les campagnols des champs la résistance de cible est encore en cours d'analyses.

Les données obtenues lors de ce travail montrent que les Campagnols terrestres présentent une prévalence élevée de portage de leptospires pathogènes. Il faudrait maintenant faire le lien entre les souches détectées et celles responsables de cas de leptospirose humaine ou animale avérés.

En plus de la résistance de cible à la bromadiolone, il serait également intéressant d'étudier la résistance métabolique (décrite chez des populations de Campagnols californiens). La gestion actuelle des populations de Campagnols terrestres est essentiellement basée sur les risques écotoxiques associés à l'utilisation de la bromadiolone. Le danger sanitaire avéré dans cette étude devrait également être pris en compte, ce qui impliquerait certainement une gestion des populations de Campagnols spécifique pour les régions Auvergne et Franche Comté.

Ces travaux font l'objet d'un article en cours de rédaction présenté ci-dessous.

ARTICLE 2

Leptospires carriage and resistance to bromadiolone rodenticide in ground voles populations in a region with high prevalence of human leptospirosis

Aurélié MARQUEZ (USC 1233 INRA/VAS, Établissement Vetagro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Étoile, France)

Rami ABI KHALIL (USC 1233 INRA/VAS, Établissement Vetagro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Étoile, France)

Isabelle FOUREL (USC 1233 INRA/VAS, Établissement Vetagro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Étoile, France)

Etienne BENOIT (USC 1233 INRA/VAS, Établissement Vetagro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Étoile, France)

Angéli KODJO (USC 1233 INRA/VAS, Équipe Leptospires, Campus de Lyon, Marcy L'Étoile, France)

Virginie LATTARD (USC 1233 INRA/VAS, Équipe Anticoagulants, Campus de Lyon, Marcy L'Étoile)

En collaboration avec

Le laboratoire CHRONO-ENVIRONNEMENT, UMR 6249, Université de Franche Comté

Abstract

Management of ground voles, *Arvicola terrestris*, populations is an important issue in France because they cause numerous economic problems for farmers by causing damages in field by eating plant roots. They can damage up to 80% of a meadow. Density of populations varies from low to high pullulation peaks in 5 or 6 years cycle. The chemical way to control their populations is the use of bromadiolone only at low density of vole population in order to limit ecotoxicological side effects. Bromadiolone is an anticoagulant antivitamine K rodenticide. If economic losses for farmers is the primary adverse effect, sanitary risks by the carriage of pathogenic leptospires have not been extensively studied. Pathogenic leptospires cause leptospirosis, a worldwide zoonosis affecting each year approximately 1 million people over the world and considered as re-emerging.

In the present study we were interested in analysing carriage of pathogenic leptospires by ground voles together with the resistance of these rodents to bromadiolone, the only molecule authorised to control populations in France. Up to 52% of ground voles analysed carried pathogenic leptospires of the species *Leptospira kirschneri*. For target resistance we found that 5% of ground voles analysed had missense heterozygous VKORC1 mutations. The two missense mutations were G71R and S149I. In France, decision of ground voles management are based on ecotoxic risks of the use of bromadiolone but there is a potentiel sanitary risk associated with relatively high carriage of pathogenic leptospires and these sanitary data should be considered to implement management methods.

Introduction

Ground voles, *Arvicola terrestris*, are small mammals belonging to the order Rodentia. They live in grassland and up to 2500 meters altitude. They cause numerous problems in agricultural areas by eating roots especially when populations are in pullulation phases and can damage until 80% of a meadow leading to high economic losses for farmers. Rodents can be carriers of numerous pathogens and potentially pathogenic leptospires which cause leptospirosis which is a zoonosis. Leptospirosis has a worldwide distribution (1) with high incidence in tropical regions affecting each year approximately one million persons (2,3). In both humans and highly sensitive animals, mainly dogs, there is a large variety of symptoms (4) from flu syndrome to renal failure rendering difficult the clinical diagnostic of the disease. In ruminants and pigs, the disease is associated to reproductive disorders which may lead to abortions and/or milk drop syndrome. Leptospires are excreted in urine by animal carriers in environment (5) where they can persist in water for a long period (6). The status of ground voles remains little known for this disease. Only a few publications have studied leptospiral carriage by the semi-aquatic water vole *Arvicola amphibius* (7,8) or by the common vole *Microtus arvalis* (9). It could be important to know if ground voles can excrete leptospires in environment and participate in the transmission of the disease and in the maintenance cycle of that pathogen. If they are carrier of pathogenic leptospires in case of high population density in an agricultural or pasture field they can, in addition to direct damage to crops, represent also a potential sanitary danger. Chemical management of ground vole populations is made with bromadiolone, an anti vitamin K (AVK) molecule. AVKs inhibit vitamin K cycle and prevent formation of blood-clotting factors (10) provoking haemorrhages. They are the main chemical molecules used in France and they have the advantage of having an antidote which is the vitamin K. It exists two kinds of resistance to this class of molecules: one target is based on *vkorc1* gene mutations which lead to mutation in vitamin K epoxide reductase complex (VKORC) subunit, which is an enzyme responsible for reducing vitamin K 2,3-epoxide to its active form, which is important for effective clotting. The second mechanism involved metabolic pathways in individuals who eliminate AVKs molecule more efficiently than sensitive individuals. To manage ground vole populations in France, bromadiolone is the sole authorized chemical molecule and it has been utilized over long periods in many French regions leading to existence of possible ground vole populations presenting resistance to bromadiolone.

This study aimed at studying ground vole populations in Doubs department in Franche Comté with the objectives of determining their leptospire carriage together with their resistance to AVKs.

Materiel and methods

Study area

This work took place in Franche Comté region of France, in Doubs department. It is valleys with mountain trays. There are numerous cattle and rural areas represent more than 80% of the department area. Management with AVKs of ground vole is made with bromadiolone molecule. Nine plots have been studied in nine areas.

Figure 1. Repartition of studied areas in Doubs department in France (maps sources: fr.actualitix.com and from database GEOFLA of IGN) In purple : numbers : studied areas.

Rodent trapping method

Because kidney samples were needed for leptospirosis detection, removed trapping and euthanasia were used. Traps as topcats were set up where footprints and others traces of rodents have been spotted. Trapping was conducted during 9 days (19/08/2016, 01/09/2016, 05/09/2016, 06/09/2016, 08/09/2016, 09/09/2016, 12/09/2016, 13/09/2016 and 14/09/2016) and trapped animals were weighted and sexed. Kidneys were taken and a part (*i.e.*, cortico-medullary junction, 5 mg) was frozen at -20 ° C for the molecular detection and characterization of leptospire and for *vkorc1* gene genotyping and further analyses.

***Leptospira* detection and identification**

DNA extractions of mice kidneys were performed with QIAamp® DNA Mini kit Qiagen kit according to manufacturer's guideline. Amplification of a part of 16S rDNA was performed to detect *Leptospira* DNA and subsequently determine *Leptospira* species by sequencing amplified 16SrDNA. The mix for PCR was prepared using 1x PCR buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl [pH8.3], 3 mM MgCl₂), 0.2mM dNTP, 0.2 mM each primer (LeptA primer: 5'-

GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3' and LeptB primer: 5'-TTCCCCCATTGAGCAAGATT-3'), 5 units of HotStarTaq® DNA Polymerase and 5 µl of extracted DNA template, and sterile water to have a final volume of 50 µl. The following thermocycling program was used: a 15 minutes enzyme activation step at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 57°C for 30 s and 72°C for 1 min with a final elongation step at 72°C for 10 min. PCR mix without the target DNA was included as a negative control, and PCR mix with a *Leptospira* strain was included as a positive control. PCR products were then sequenced by Genoscreen enterprise by a Sanger procedure. A laboratory database containing reference partial 16S sequences for all known *Leptospira* species was used to compare and assign a *Leptospira* species to the obtained sequences. Analyses of sequences were made with Chromaspro software (copyright © 2003-2016 Technelysium Pty Ltd.) and alignments were performed with the Multi Align software, an online software of the PRABI (Pôle Rhône-Alpes de Bioinformatique) platform (11).

Characterization of *Leptospira* serovar

Leptospira serovar determination was attempted by Variable Number Tandem Repeat (VNTR) analyses as described by Salaün et al. (12). Positive sample in detection step with 16S rDNA PCR and identified as pathogenic *Leptospira* genospecies were subjected to VNTR analyses according to Salaün et al.(12). The following 3 regions were amplified VNTR4, VNTR7 and VNTR10. DNAs from reference *Leptospira* strains were used as control and to determine VNTR loci profiles. The mix for PCR was prepared using 1x PCR buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl [pH8.3], 3 mM MgCl₂), 0.2mM dNTP, 0.2 mM each primer (VNTR4F: 5'-AAGTAAAAGCGCTCCCAAGA-3', VNTR4R: 5'-ATAAAGGAAGCTCGGCGTTT-3', VNTR7F: 5'-GATGATCCCAGAGAGTACCG-3', VNTR7R: 5'-TCCCTCCACAGGTTGTCTTG-3', VNTR10F: 5'-GAGTTCAGAAGAGACAAAAGC-3' and VNTR10R: 5'-ACGTATCTTCATATTCTTTGCG-3'), 5 units of HotStarTaq® DNA Polymerase and 5 µl of extracted DNA template, and sterile water to have a final volume of 50 µl. The following thermocycling program was used: a 15 minutes enzyme activation step at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 54°C for 30 s (VNTR4 and VNTR7) / 52°C for 30s (VNTR10) and 72°C for 1 min with a final elongation step at 72°C for 10 min. PCR mix without the target DNA was included as a negative control, and PCR mix with a *Leptospira* strain was included as a positive control and band size determination after gel electrophoresis.

Vkorc1 genotyping

Genomic DNA extraction from mice tails were performed with QIAamp® DNA Mini kit Qiagen kit according to manufacturer's guideline. Genomic DNA was amplified using specific primers of *Vkorc1* gene. In order to sequence the totality of the *vkorc1* gene, two sets of primers were used. The sequences of the first primer set ArvVKas and ArvVKAas were (5'-TCCTGGTGGTCTGGACTGTC-3') and (5'-TAATCCCAGCACTTGGGAAGG-3'), respectively, they were used to amplify ground vole *Vkorc1* gene from nucleotide 5 to nucleotide 1416. The sequences of the second primers set ArvVKbs and ArvVKbas were (5'-GCCCCGGCTTCAGTTTTTAAT-3') and (5'-AGGGGGATTGGAATGTAAGG-3') respectively, they were used to amplify the mouse *vkorc1* gene from nucleotide 1767 to nucleotide 2608. Ground vole *vkorc1* gene amplifications were performed using 10 pmol of each primer of one primers set, Accuprime polymerase (1 unit, Invitrogen) in a 25 µl reaction volume containing 2 µl DNA, 2.5 µl 10X Accuprime buffer and 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate. The amplification was performed at 94°C for 3 min followed by 40 cycles at 94°C for 20 s, 61°C for 20 s, 68°C for 50 s, and a final extension step at 68°C for 10 min. The amplified products were sequenced on both strands. Obtained sequences were subsequently compared with the published *vkorc1* gene sequences for *Arvicola terrestris* (Genbank n° FJ986204.1).

vkorc1 new mutations expression

Coding sequences corresponding to *Mus musculus domesticus* and *Rattus rattus* VKORC1 fused with a c-myc tag via a flexible (GGG)₃ in its 3'-extremity were optimized for heterologous expression in yeast and synthesized by GenScript (Piscataway, NJ, USA). Synthesized nucleotide sequences included *Eco*RI and *Xba*I restriction sites at its 5'- and 3'-extremities, respectively. These nucleotides sequences were subcloned into pPICZ-B (Invitrogen) and sequenced on both strands. Constructions of mVKORC1 and rVKORC1 mutants were carried out using pPICZ-mVKORC1 and pPICZ-rVKORC1 as templates with the Quick change site-directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's recommendations. Each mutant was verified by sequencing and expressed in *Pichia pastoris* (13,14).

Microsomes were prepared from yeast cells by differential centrifugation. Yeast cells were resuspended in 50 mmol/L Phosphate Buffer (pH 7.4) containing 1.15% (w/v) of KCl. They were broken with Zircon beads using Dispermat® LC30 (VMA-GETZMANN, Germany; 30 min-3,500 rpm) continuously at 4° C and further submitted to differential centrifugation

continuously at 4° C. The 100,000 g pellet corresponding to the membrane fraction was suspended by Potter homogenization in HEPES-glycerol buffer (50 mmol/L Hepes, 20% glycerol, pH 7.4). Protein concentrations were evaluated by the method of Bradford (15) using bovine serum albumin as a standard. Microsomal fractions were frozen at -80° C and used for kinetic analysis.

Microsomal VKOR activity was assayed as described previously (16,17). Standard reactions were performed in 200 mmol/L Hepes buffer (pH 7.4) containing 150 mmol/L KCl, 1 mmol/L dithiothreitol, and 1g/L of total proteins. The reaction was started by the addition of vit K₁>0 solution in 1% Triton X-100 and incubated at 37° C for 30 min. In these conditions, the reaction was linear according to the time of incubation and the quantity of incubated proteins. After incubation at 37° C for 30 min, the reaction was stopped by adding of 2 ml of isopropanol. After centrifugation at 3,000 g for 10 min in order to precipitate proteins, 2 ml of hexane was added. After centrifugation at 3,000 g for 10 min, the hexane layer was removed and dried under nitrogen. The dry residue was immediately dissolved in 0.2 ml of methanol, and reaction product was analysed by liquid chromatography-mass spectrometry.

The LC-APCI/MS/MS used was a 6120 Quadrupole LC/MS with an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) interface and a LCMS Chemstation software from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Chromatographic separation was performed using a XTerra MS C18 column (2.1mm * 50 mm, 2.5µm; Waters, Milford, MA, USA) with a mobile phase of methanol, 0.1% acetic acid (96:4) in isocratic condition. The column temperature was 48° C. The flow rate in the LC column was 0.4ml/min. The injection volume was 20µl. The temperature of the auto sampler tray was set to 5° C, and the samples were protected from the daylight. Detection was by MS with APCI source in positive mode. Nebulizer pressure was set to 60 psi, dry gas temperature to 350° C, dry gas flow to 5L/min, and vaporizer temperature to 400° C. Capillary voltage was set to 4,000 V, corona needle to 10 µA. Identification criteria for vit K₁ are the retention time (tr = 234s) and the selected ion 451.4. Identification criteria for K₁>0 are the retention time (tr = 174 s) and the selected ion 467.0. Linearity and accuracy were tested from 25 to 2,000 ng/ml (n = 20). The response was linear throughout the concentration range tested with a coefficient of correlation (r^2) above .99. Accuracy was between 80% and 120% of the theoretical concentrations.

K_m , V_{max} and K_i values were obtained from at least three separate experiments performed on two different batches of protein. The estimation of K_m and V_{max} values was achieved by the incubation of at least nine different concentrations of vit K>0 (from 0.003 to 0.2 mmol/L) to

the standard reaction. Incubations were performed in duplicate. Data were fitted by nonlinear regression to the Michaelis-Menten model using the R-fit program. In order to evaluate the inhibiting effect of AVKs on VKOR activity, K_i were determined after addition of various concentrations of anticoagulant to the standard reaction in the presence of increasing amounts of vit K>0 (from 0.003 to 0.2 mmol/L) using anticoagulant concentrations from about 0.05 to $20 * K_i$. Data were fitted by nonlinear regression to the noncompetitive inhibition model $v = (V_{max}/(1+(I/K_i))) * (S/(K_m + S))$ using the R-fit program.

Results

Rodent populations

The sampling of trapped ground voles was composed of 65 females and 42 males.

Leptospiral carriage in trapped ground voles

Based on 16S amplification, 56 ground voles presented positive results for *Leptospira* presence. *L. kirschneri* was the unique pathogenic *Leptospira* genospecies identified during the study throughout. The prevalence of pathogenic leptospiral carriage in trapped ground voles was 52% taking into account all areas with no statistical difference between females (51%) and males (55%). As shown in figure 1, the percentage of carriage varies according to studied area.

Characterization of detected pathogenic *Leptospira* DNA

Three loci designed VNTR4, VNTR7 and VNTR10 respectively were targeted in order to assign a *Leptospira* serovar to the analysed samples after comparison with published or laboratory databases. For each sample, the amplified product led to a number of tandem repeat copies within the locus or absence of targeted loci. The profiles obtained were recorded considering the presence or absence of locus and number of tandem repeats within each detected locus VNTR4; VNTR7 and VNTR10. In this way, according the data bases taken as reference, two new profiles referred to as profile 1-2-N (VNTR4 = 1 copie of tandem repeat in locus; VNTR7= 2 copies in locus; and No amplification for VNTR10) and profile 2-2-N were assigned to the VNTR patterns obtained for the extracted DNA. Within these patterns, the pattern 1-2-N was more frequently observed and distributed (Table 1 and Figure 2). Twenty-eight samples on fifty-six positives with leptospires PCR positive in kidneys could be characterised by VNTR.

Table 1. Trapping ground voles repartition

| <i>Areas</i> | Number of individuals trapped | Number of individuals with leptospira PCR+ in kidney | VNTR Profile 1-2-N* | VNTR Profile 2-2-N* |
|---------------|--------------------------------------|---|----------------------------|----------------------------|
| <i>Area 1</i> | 14 | 3 | 0 | 0 |
| <i>Area 2</i> | 15 | 9 | 3 | 0 |
| <i>Area 3</i> | 14 | 8 | 0 | 0 |
| <i>Area 4</i> | 5 | 5 | 1 | 0 |
| <i>Area 5</i> | 18 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Area 6</i> | 4 | 13 | 7 | 0 |
| <i>Area 7</i> | 16 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Area 8</i> | 6 | 12 | 0 | 12 |
| <i>Area 9</i> | 15 | 4 | 4 | 0 |
| <i>Total</i> | 107 | 56 | 16 | 12 |

*VNTR 1-2-N stands for samples with 1 copie of tandem repeat in locus VNTR4 ; 2 copies of tandem repeat in VNTR 7 ; and no amplification for VNTR10 (absence of locus VNTR10)

Figure 2. Leptospiral carriage and *vkorc1* mutations distribution of ground voles in studied areas in Doubs department in France (maps sources: fr.actualitix. and from database GEOFLA of IGN)

Vkorc1 genotyping results

In the trapped ground voles, 5 different mutations (D44D, G71R, A72A, S149I and H156H) were found either alone or in combination in 107 individuals (Table 2). Three mutations were silent (D44D, A72A and H156H) and two mutations were missense (G71R and S149I). The missense mutations are in characterisation. Seven different VKORC1 genotypes were observed in trapped ground voles (Table 5). The figures 3 and 4 show chromatograms of double peaks leading to heterozygous missense mutations found.

Table 2. Characteristics of VKORC1 mutations of analysed ground voles individuals

| Exon | Nucleotide mutation | Proteic mutation | Status |
|--------|---------------------|------------------|----------|
| Exon 1 | C162T | D44D | silent |
| Exon 2 | G1001A | G71R | missense |
| Exon 2 | T1006C | A72A | silent |
| Exon 3 | G12457T | S149I | missense |
| Exon 3 | C2479T | H156H | silent |

Table 3. Characteristics of VKORC1 genotypes of analysed ground voles individuals

| Genotype | Number of individuals |
|-------------------|-----------------------|
| Wild type | 19 |
| <i>D44D/A72A</i> | 1 |
| <i>G71R/A72A</i> | 1 |
| <i>G71R/A72A</i> | 1 |
| <i>A72A</i> | 25 |
| A72A | 55 |
| <i>A72A/S149I</i> | 3 |
| <i>A72A/H156H</i> | 1 |

The *vkorc1* mutations G71R and S149I lead to resistance factors (i.e. the ratio between the K_i of mutated protein on the K_i of non-mutated protein) to bromadiolone limited, contained between 3 and 5.

Discussion

Important *Leptospira* carriage in ground voles

The first thing noticed in this study is the relatively high prevalence of leptospiral carriage in analysed individuals. Indeed, with an average higher than 50% all sites taken into account it is a higher rate carriage compared to what is usually observed in rat populations in which carriage

rate of 35% has been observed in close environmental conditions (18). A study has shown hedgehogs to have a prevalence rate of 37,5% (19) and they can live around fields where ground voles are which can suggest possible cross transmission between these 2 animal hosts. In the present study, there was almost no difference between females (51%) and males (55%) prevalence contrarily to the study of Gelling and coll. (8) who showed a only male carriage in water voles (8). With such a high rate of carriage the results presented here clearly indicate that the ground vole represents a reservoir for *Leptospira*, and specifically for *L. kirschneri* which was the unique pathogenic genospecies detected. In the study of leptospiral carriage by water voles *Arvicola amphibius*, serovars Australis, Autumnalis and Icterohaemorrhagiae were found without precision on their *Leptospira* species (8) and these serovars can also belong to the *L. kirschneri* species as found here.

The second thing to underline is the finding of a common unique serologic profile which was distributed in all trapped sites except in one site where a second VNTR pattern has been detected. In each case, only one pattern was associated to the studied population. Thus, the ground vole behave structurally as rat in which usually one *Leptospira* strain is associated with a rat colony (20). These animals are territorials and there are few individuals movements except for gene melting in order to provide genetic enrichment. Population is for this case a family living in the same terrier with maintenance of the infecting *Leptospira* strain(s) within the population. Other studies have isolated in the common vole *Microtus arvalis*, the pathogenic *L. interrogans*, serovar Grippotyphosa (9). Considering that Grippotyphosa is the main serogroupe member of *L. kirschneri*, it may be plausible that the new VNTR profiles identified in this study represent members of the Grippotyphosa serogroup. In this respect, the fact that only serovars of Grippotyphosa are associated to a vole colony points out that ground vole may represent selective reservoir for this group of *Leptospira* in whether or not the belong to the *L. kischneri* or in *L. interrogans* species as rats are for serovars of the Icterohaemorrhagiae serogroup (18). This observation opens perspectives of studying susceptibility of these animals by their simultaneous infection with to 2 different serovars to confirm the hypothetical selective adaptation of the identified serovar compare to other *Leptospira* serovars. To achieve this goal, it will be necessary to succeed isolation of this particular ground vole *Leptospira* strain. In addition, the isolation of such strain will help in conducting studies on its pathogenicity in sensitive laboratory animal models. These experiments may help in assessing the role of ground vole in the transmission cycle of the disease for human and domestic animals.

AVKs target resistance of ground voles

There is a rate of 5% for carriage of heterozygous encoding mutations in exons of *vkorc1* gene. The heterozygous state implies that prevalence of mutated alleles is less important than in homozygous state. It is different that what was observed for mice populations in a study made in 65 locations in France (21). In this study 80% of mutations were homozygous and 20% were heterozygous. This difference of mutation rates and status of mutations could be explained by less monitoring of used AVKs for house mice population control than for ground voles populations leading to more selection of AVKs target resistance in mice populations. It could be due to differences in ecotoxic risks of AVKs use for these two species. House mice live in building and ground voles lives in field with high exposure of molecules to predators for example.

In the sites where *vkorc1* mutations were detected in ground voles populations, particular attention on monitoring of bromadiolone use has to be done to provide selection of mutated alleles leading to bromadiolone target resistance and augmentation of resistant individuals in populations. On the four sites where mutated individuals have been detected three have been treated with bromadiolone which could have been involved the in selection of mutations. Metabolic resistance could be analysed in these sites because it has been observed in others voles species and could bring information about populations states. A study of *Microtus californicus* suggests that alterations in metabolic functions could play a role in AVKs resistance (22).

Voles populations management

Despite of management methods put in place, voles cause numerous problems for farmers and their cattle. A combination of several ways of populations control called toolbox for ground voles management has been established. The toolbox allows to avoid installation and pullulations of voles by making a place, for example a field, inhabitable for voles. The toolbox consists in limiting presence of food as some kinds of roots and nesting sites by breaking galleries. It allies hygiene measure, agricultural practises like farming management in period of low density of ground voles populations and pasture in a large proportion of surfaces, building architectural, chemical control, biological control like promote predation by installation of hedges and artificial nest boxes and physical control. It seems to be efficient in Franche Comté because last years, pullulations of voles have fallen limiting maximum of individuals by site during pullulation peak.

In official regulation of government, only bromadiolone is authorised as chemical control in low density of vole populations. The baits of bromadiolone are used in full-field so there is risks of primary poisoning of non target fauna and secondary poisoning of ground voles predators. Intoxications of foxes and buzzards by bromadiolone has been studied in France (23). It was suggested that foxes and buzzards were potentially exposed to anticoagulant compounds sometimes by contaminated preys (23). Use of bromadiolone in full-field causes problems if endangered species as European mink are exposed (24). These ecotoxic problems participate in important regulation of bromadiolone use for ground voles populations control.

Data from this work show high rate carriage of pathogenic leptospire in some areas. Franche Comté is one of the most affected region in metropolitan France (25,26). Even if pullulations phases have decreased last years, the danger represented by carriage of pathogenic leptospire is present when there are direct or indirect contact with humans and animals with ground voles contaminated. Potentiel sanitary risk represented by voles should be taken in account in management decision. The work on control of ground voles is important to manage potential sanitary risk. Others trapping in the same areas could be interesting to study evolution of leptospiral carriage and if same strains are identified. If leptospire could be isolated from urine for example, serotyping methods could be used to characterise serovars and so define the role of ground voles in leptospirosis. Reflexions about the use of bromadiolone could be done taking account sanitary risks. In effect if ground voles could represent health risks the consideration of only ecotoxicity in management decision is possibly non adapted to the situation.

Conclusion

This work is an overview of leptospiral carriage and target resistance to bromadiolone of ground vole populations in a department where they can cause economic losses in agricultural areas and sanitary threats. A high prevalence rate of pathogenic leptospiral carriage has been demonstrated and this may represent a sanitary threat for both human and animal, particularly for bovine in contact with them. As new serologic profiles have been identified, it is not possible to conclude if strains found in the ground voles populations are pathogenic for domestic animals or humans but it is clear that ground voles participate in the maintenance cycle of pathogenic leptospire. Further studies on the pathogenicity of isolates may help in assessing the real risk for sensitive hosts including Human.

Management of ground voles populations in France integrates ecotoxicological considerations. In fact, only bromadiolone can be used where ground voles populations have low densities. Quantities are limited to provide intoxication of predators as raptor. But the potential danger represented by high leptospiral prevalence in populations analysed should be considered to integrate other ways to manage the ground vole populations.

References

1. 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 Dec;3(12):757–71.
2. Cosson J-F, Picardeau M, Mielcarek M, Tatard C, Chaval Y, Suputtamongkol Y, et al. Epidemiology of leptospira transmitted by rodents in southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jun;8(6):e2902.
3. Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho ALF, Aires TSF, Villasboas-Bisneto JC, Queiroz A, et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008 Mar;14(3):505–8.
4. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr 1;14(2):296–326.
5. Marquez A, Djelouadji Z, Lattard V, Kodjo A. Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospires. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol*. 2017 Dec;20(4):184–93.
6. Andre-Fontaine G, Aviat F, Thorin C. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic *Leptospira* spp. in Fresh Water. *Curr Microbiol*. 2015 Jul 1;71(1):136–42.
7. Slavin G, Salt GF, Wolff JW. *Leptospira erinacei auriti* in a water vole, *arvicola amphibius*. *Nature*. 1964 Aug 22;203:893.
8. Gelling M, Zochowski W, Macdonald D, Johnson A, Palmer M, Mathews F. Leptospirosis acquisition following the reintroduction of wildlife. *Vet Rec*. 2015 Oct 20;177.
9. Kuiken T, van Dijk JE, Terpstra WJ, Bokhout BA. The role of the common vole (*Microtus arvalis*) in the epidemiology of bovine infection with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Vet Microbiol*. 1991 Aug 1;28(4):353–61.

10. Brakes CR, Smith RH. Exposure of non-target small mammals to rodenticides: short-term effects, recovery and implications for secondary poisoning. *J Appl Ecol.* 2005 Feb 1;42(1):118–28.
11. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 1988 Nov 25;16(22):10881–90.
12. Salaün L, Mérien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2006 Nov;44(11):3954–62.
13. Hodroge A, Longin-Sauvageon C, Fourel I, Benoit E, Lattard V. Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch Biochem Biophys.* 2011 Nov;515(1–2):14–20.
14. Hodroge A, Matagrín B, Moreau C, Fourel I, Hamed A, Benoit E, et al. VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity. *J Thromb Haemost JTH.* 2012 Dec;10(12):2535–43.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248–54.
16. Bodin L, Horellou MH, Flaujac C, Lorient MA, Samama MM. A vitamin K epoxide reductase complex subunit-1 (VKORC1) mutation in a patient with vitamin K antagonist resistance. *J Thromb Haemost JTH.* 2005 Jul;3(7):1533–5.
17. Haniza MZH, Adams S, Jones EP, MacNicoll A, Mallon EB, Smith RH, et al. Large-scale structure of brown rat (*Rattus norvegicus*) populations in England: effects on rodenticide resistance. *PeerJ.* 2015 Dec 7;3:e1458.
18. Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J, et al. *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2009 Dec 1;32(6):463–76.

19. Ayrat F, Djelouadji Z, Raton V, Zilber A-L, Gasqui P, Faure E, et al. Hedgehogs and Mustelid Species: Major Carriers of Pathogenic *Leptospira*, a Survey in 28 Animal Species in France (2012-2015). *PloS One*. 2016;11(9):e0162549.
20. Ayrat F, Zilber A-L, Bicout DJ, Kodjo A, Artois M, Djelouadji Z. Distribution of *Leptospira interrogans* by Multispacer Sequence Typing in Urban Norway Rats (*Rattus norvegicus*): A Survey in France in 2011-2013. *PLoS ONE* [Internet]. 2015 Oct 8;10(10).
21. Goulois J, Lambert V, Legros L, Benoit E, Lattard V. Adaptive evolution of the *Vkorc1* gene in *Mus musculus domesticus* is influenced by the selective pressure of anticoagulant rodenticides. *Ecol Evol*. 2017;
22. Horak KE, Volker SF, Campton CM. Increased diphacinone and chlorophacinone metabolism in previously exposed wild caught voles, *Microtus californicus*. *Crop Prot*. 2015 Dec;78:35–9.
23. Berny PJ, Buronfosse T, Buronfosse F, Lamarque F, Lorgue G. Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere*. 1997 Oct;35(8):1817–29.
24. Fournier-Chambrillon C, Berny PJ, Coiffier O, Barbedienne P, Dassé B, Delas G, et al. Evidence of secondary poisoning of free-ranging riparian mustelids by anticoagulant rodenticides in France: implications for conservation of European mink (*Mustela lutreola*). *J Wildl Dis*. 2004 Oct;40(4):688–95.
25. Rapports d'activité du CNR de la Leptospirose [Internet]. Institut Pasteur. 2016 [cited 2018 Sep 27].
26. Estavoyer JM, Chirouze C, Faucher JF, Floret N, Couetdic G, Leroy J, et al. Leptospirosis in Franche-Comté (FRANCE): Clinical, biological, and therapeutic data. *Médecine Mal Infect*. 2013 Sep;43(9):379–85.

II. La souris comme menace sanitaire dans un élevage bovin

1. Contexte et objectifs de l'étude

Dans un élevage bovin situé dans la Loire, des cas d'avortements liés à des infections de leptospirose bovine nous ont été rapportés, concomitants à une infection leptospirosique de l'éleveur. Un cycle de transmission de leptospires était donc présent sur cet élevage. Le but de notre travail a été de caractériser ce cycle de transmission et les principaux acteurs impliqués, en focalisant notre attention sur le rôle des rongeurs présents sur l'élevage. Ce travail avait pour but de proposer des mesures adaptées pour stopper et prévenir la transmission leptospirosique au sein de cet élevage.

L'hypothèse que nous avons faite était qu'un même vecteur pouvait à la fois contaminer les bovins et l'éleveur. Nous avons donc cherché à caractériser les souches de leptospires portées par les rongeurs présents sur le site, ainsi que celles portées par les bovins. Afin de préconiser des mesures de gestion et de prévention adaptées dans le cas où des rongeurs seraient impliqués dans ce cycle de transmission, nous avons également analysé la sensibilité des rongeurs aux AVKs.

2. Principaux résultats de l'étude

- L'éleveur traitant régulièrement les bâtiments de son élevage avec des AVKs de première génération, aucun rat n'a pu être détecté dans l'élevage. Par contre des traces de souris récentes ont été repérées dans 2 bâtiments, un d'élevage, l'autre de stockage.
- Malgré la concurrence alimentaire, 12 souris ont pu être capturées dans le bâtiment d'élevage.
- 41% des souris analysées étaient porteuses de leptospires pathogènes des espèces *Leptospira interrogans* et *Leptospira kirschneri*. Par PCR VNTR le sérovar *Icterohaemorrhagiae* a été identifié et le sérovar *Grippotyphosa* a été partiellement identifié chez ces souris.
- Chez les bovins, les sérovats *Grippotyphosa* et *Sejroe* ont été identifiés.

Face à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que les souches appartenant aux sérovars *Grippotyphosa* (Figure 32) ont pu être transmises aux bovins par les souris, directement ou indirectement par de l'alimentation souillée par les urines de ces souris. L'éleveur aurait été infecté par contact direct avec les urines d'animaux infectés, ou indirectement par l'environnement contaminé comme le fumier. Nous avons émis l'hypothèse que le sérovar *Hardjo* est porté depuis longtemps par les bovins, ce qui expliquerait la grande prévalence trouvée via les analyses sérologiques et exclurait ce sérovar comme responsable des infections humaine et bovine.

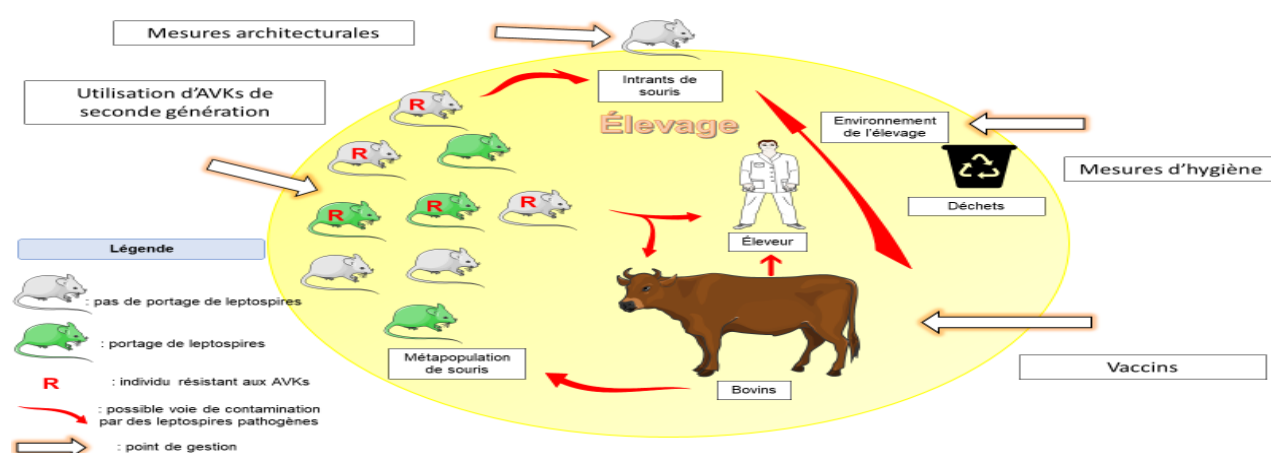


Figure 32. Schéma présentant les points de gestion du cycle de transmission de la leptospirose sur le site de l'élevage

En ce qui concerne la résistance aux AVKs, la présence de 4 génotypes différents de VKORC1 (Tableau 18) a été notée sur 50% des souris analysées. Ces génotypes sont présentés dans le tableau ci-dessous, et sont à l'origine de résistances aux AVKs de première génération. La grande diversité de génotypes de résistance trouvés sur une petite population pourrait venir de flux d'intrants importants.

Tableau 18. Caractéristiques des mutations *vkorc1* trouvées chez les souris du site analysées. En italique : mutation hétérozygote et gras : mutation homozygote.

| Génotype VKORC1 | Résistance aux AVKs | Fréquence allélique |
|---|---------------------|---------------------|
| <i>R12W/A26S/E37E</i> | + | 4,1 |
| <i>R12W/A26S/A48T</i> et <i>R61L</i> | + | 8 |
| R12W/A26S/E37E/A48T et R61L | +++ | 8 |
| Y139C | +++ | 25 |

Des mesures de gestion ont été proposées à la suite de cette étude afin de limiter la maintenance et la transmission de la leptospirose sur le site de l'élevage :

- limitation de la compétition alimentaire, en plaçant la nourriture en conteneurs par exemple, pour optimiser la lutte chimique par les AVKs
- mise en place d'une vaccination des personnes travaillant sur le site et des bovins
- traitement des déchets agricoles comme les fumiers et les lisiers, car ils peuvent être des zones de maintenance des leptospires pathogènes
- limiter les intrants de souris pour éviter qu'il n'y ait de nouvelles souches de leptospires pathogènes et de nouveaux génotypes de VKORC1.
- La prolifération des souris porteuses de leptospires pathogènes doit être stoppée. Ces souris étant fortement résistantes aux anticoagulants de première génération et à la bromadiolone, leurs populations doivent être contrôlées via des molécules plus toxiques telles que le difénacoum, la diféthialone ou le brodifacoum. Ces molécules étant très toxiques et très rémanentes dans l'organisme des rongeurs, elles doivent être utilisées dans des boîtes d'appâtage à l'intérieur de bâtiments, afin d'éviter tout risque de toxicité primaire ou secondaire.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article présenté ci-dessous qui a été soumis le samedi 1^{er} décembre 2018 au journal BioMed Research International.

ARTICLE 3

House mice as a real sanitary threat for human and animal leptospirosis: proposal for integrated management

Short title: Leptospire carriage in House mice resistant to anticoagulant rodenticides

Aurélie MARQUEZ (USC 1233 INRA/VAS, Établissement Vetagro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Étoile, France)

Tristan ULIVIERI (USC 1233 INRA/VAS, Établissement Vetagro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Étoile, France)

Etienne BENOIT (USC 1233 INRA/VAS, Établissement Vetagro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Étoile, France)

Angéli KODJO (USC 1233 INRA/VAS, Équipe Leptospire, Campus de Lyon, Marcy L'Étoile, France)

Virginie LATTARD (USC 1233 INRA/VAS, Équipe Anticoagulants, Campus de Lyon, Marcy L'Étoile)

ABSTRACT

Leptospirosis is a re-emerging zoonosis and ranges in severity from benign to sometimes fatal. In cattle, infection is responsible for abortion and infertility that lead to product losses. Humans may be contaminated through direct contact with urine of infected animals or indirectly through interaction with urine-contaminated environment. Many wildlife species that live in cattle habitats, especially commensal rodents may be suspected to have a role in the *Leptospira* transmission cycle. Nevertheless, little is known on the epidemiology of non-maintenance *Leptospira* serovars that limits appropriate management.

In a French farm where human and cattle leptospirosis were detected, the transmission cycle was explored to propose appropriate mitigation measures. For that, commensal rodents were trapped and leptospire carriage was studied by molecular methods. Our study highlights the presence of mice carrying two pathogenic *Leptospira* species (*L. interrogans* and *L. kirschneri*). Since these 2 serogroups were simultaneously detected in mice and cows, we could suspect an initial *Leptospira* transmission from mice to cows. In this farm, effective management of mice populations must be done. Because resistance to anticoagulant rodenticides due to VKORC1 mutations has been largely described in rodent populations, susceptibility of these mice was characterized by sequencing. 50% of the trapped mice carried mutations in the *vkorc1* gene leading to severe resistance to anticoagulant. The management of such mice that are a real sanitary threat can be achieved only by using the most toxic second-generation anticoagulants

INTRODUCTION

Leptospirosis is a worldwide zoonosis caused by pathogenic leptospire, bacteria from the Spirochete order (1,2). This disease is re-emerging (3) affecting approximately 1 million people all over the world each year (4,5). Over the last few years, the number of cases has increased in tropical regions (6). Leptospirosis ranges in severity from benign in most cases to sometimes fatal with a mortality rate around 10 percent and raises a real public health issue (7). This disease can provoke a large variety of symptoms. Renal and hepatic failures are observed in human cases (8). For treatment of human infections, antibiotics as penicillin and doxycycline can be used. In cattle, abortions and other reproductive problems are observed (9) causing economic losses for farmers. The World Organisation for Animal Health (OIE) recommends streptomycin for farm animals (10) and vaccines against some serovars are available depending on the country. The main way of contamination is indirect contact with infected urine of carriers. Main carriers are rodents like rats and coypus but small mammals as *Mustelidae* can participate in transmission (11,12). They accumulate bacteria in kidneys and excrete them in their urine in environment. Leptospire have a survival of several weeks in water and manure (1,3), which may provide recontamination pathways and allow the maintenance of leptospire in environment There are still numerous unknown steps in leptospire transmission process, but as rodent are main carriers of leptospire, efficient rodent management could prevent against leptospire infections.

Efficient rodent management must associate sanitary and architectural approaches as well as adapted farming practices. If insufficient, these approaches may be completed by the use of chemical rodenticides. Different classes of molecules are used in Europe (i.e., antivitamin K anticoagulants (AVKs), zinc phosphide, alphachloralose...) with different usage restrictions depending on the molecules. The sophisticated social organization of rodent populations and the neophobic behaviour of these animals makes often fast-acting rodenticides (lethal in less than 2 days) totally ineffective. In France, AVKs are the main chemical molecules used as rodenticides because of their delayed action avoiding food aversion. AVKs provoke haemorrhage by blocking vitamin K epoxide reductase (VKORC1)-dependent vitamin K recycling limiting the activation of vitamin K-dependent clotting factors II, VII, IX and X. Nevertheless, because of the intensive use of these AVKs, resistance to AVKs have been reported since 1960 (13,14) associated with *vkorc1* mutations (15-18). Since the first description, numerous mutations of *Vkorc1* have been reported in brown rats (i.e., *Rattus*

norvegicus) with 1 major mutation in France and in house mice (*i.e.*, *Mus musculus*) with 15 described *vkorc1* gene mutations. To overcome resistance problems, a second generation of AVKs molecules including bromadiolone, difenacoum, brodifacoum, flocoumafen and difethiaone has been developed. This second generation of AVKs is more toxic and more tissue-persistent and are thus more often associated with primary or secondary poisonings than the first generation of AVK. Because of the limited number of solutions available and because of resistance, effective management of rodents can sometimes be difficult. After the demonstration of animal and human leptospirosis cases in a cattle farm located in the Auvergne-Rhône-Alpes region of France, our study aims to identify the most likely transmission scheme(s) in this farm and the methods to be used to prevent any new cases.

MATERIALS AND METHODS

Study area

This study was conducted in a farm in the Auvergne-Rhône-Alpes region of France, in the Loire department. This farm was located in lowland surrounded by hills.

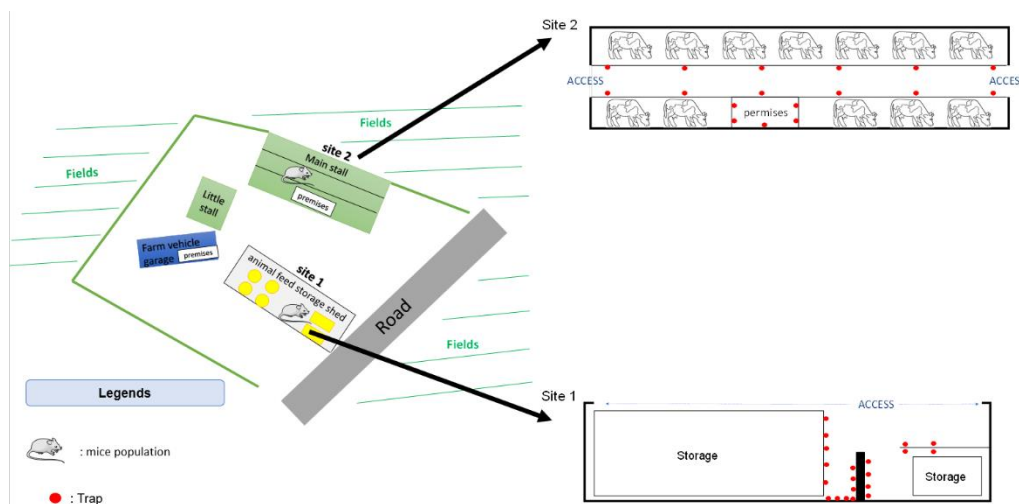


Figure 1. Farm scheme and trapping map.

It included different agricultural buildings (two stalls, one animal feed storage shed and one vehicle shed) and was served by a single road (Fig 1). Two farmers were working in this farm to raise cattle for meat production. The herd was composed of 300 charolais cattle with 130 adult cows. Animals are in the meadow and exclusively fed with grass in summer and are in

stabling and fed with hay and silage in winter. Rodent management has been implemented in agricultural buildings by the farmer by using first generation anticoagulant rodenticides.

Rodent trapping method

Because kidney samples were needed for leptospires research, trapping methods were used. Forty mouse traps (Liphatech, France) killing instantly mice were set up where traces of rodents had been observed (Fig 1). Baiting was done using peanut butter which was renewed daily during the capture period. Trapping was conducted during 24 consecutive days from November 17th, 2015 until December 10th, 2015. During this period, cows were mainly housed in the barn. Trapped animals were weighted, sexed, and assigned to one of two age categories: immature house mice (< 12g), mature house mice (> 12g). Kidneys were taken under sterile conditions under biosafety hood. One part of the kidneys was used immediately for culture, the other part (*i.e.*, cortico-medullary junction, 5 mg) was frozen at -20 ° C for the molecular detection and characterization of leptospires. A piece of tail of each trapped house mouse was stored in 70% ethanol as material for DNA extraction for *vkorc1* gene genotyping.

Rodent species identification

Trapped animals were molecularly confirmed to be *M. musculus domesticus* (as opposed to a morphologically similar species) by sequencing a portion of the mtDNA cytochrome b gene. Briefly, genomic DNA was extracted from liver using silica columns (Macherey Nagel) according to the manufacturer's recommendations. Two microliters of genomic DNA were amplified by PCR using specific primers of *cytochrome b* (19). The sequence of the sense primer cytb-S and the antisense primer cytb-AS were (5'-TCTCCATTTCTGGTTTACAAGAC-3') and (5'-AACAATGACATGAAAATCATCGTT-3'), respectively. *Cytochrome b* amplification was performed using cytb-S and cytb-AS (10 pmol), GoTaq polymerase (1 unit, Promega) in a 25 µl reaction volume containing 2 µl DNA, 5 µl 5X GoTaq buffer and 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate. The amplification was performed at 94°C for 3 min followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, 72°C for 90 s, and a final extension step at 72°C for 10 min. The amplified product was sequenced on both strands; the resulting sequence was submitted to blast analysis.

Serological tests using the microscopic agglutination test (MAT)

MAT analyses were performed in the Laboratoire des Leptospires (VetAgro Sup, Marcy-l'Etoile, France). Blood samples were collected from seventy-six cows presenting reproductive

disorders, centrifuged, and the serum obtained was stored at -20°C until MAT analyses. A total of 23 *Leptospira* strains belonging to 14 serogroups were used for the MAT: Australis (using the Australis, Bratislava, and Munich serovars as antigens), Autumnalis (using the Autumnalis and Bim serovars), Ballum, Bataviae, Canicola, Grippotyphosa (using the Grippotyphosa and Vanderhoedoni serovars as antigens), Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae (using the M20 Copenhageni and Verdun Icterohaemorrhagiae serovars), Panama (using the Panama and Mangus serovars as antigens), Pomona (using the Pomona and Mozdok serovars), Pyrogenes, Sejroe (using the Sejroe, Saxkoebing, Hardjo, and Wolffi serovars), Tarassovi, and Cynopteri. The screening was performed starting with a serum dilution of 1: 10 up to a dilution of 1: 800. The endpoint was the highest serum dilution showing 50% agglutination in free-moving leptospire. Positivity to a serovar was concluded when a MAT reaction was observed towards this unique serovar or when this serovar displayed a titre three times higher than the other serovars when cross reactions was observed. When cross-reactivities were observed between several serovars with similar titers, positivity was established towards cross-reacting serovars.

***Leptospira* isolation**

Kidney from each mouse and 3 placental cotyledons from aborted cows were crushed and aseptically transferred to tubes containing Ellinghausen McCullough Johnson and Harris (EMJH) medium (Indicia, St G enis, France) (20). Three serial dilutions tubes were incubated at 30°C according to the protocol for pathogenic *Leptospira* isolation (20). For a period of three months, the tubes were examined weekly using a dark-field microscope

16S amplification for *Leptospira* detection and species identification

DNA extractions of mice kidneys were performed with QIAamp® DNA Mini kit Qiagen kit according to manufacturer's guidelines. Amplification of a part of 16S rDNA was performed to detect *Leptospira* and identify species. The mix for PCR was prepared using 1x PCR buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl [pH8.3], 3 mM MgCl₂), 0.2mM dNTP, 0.2 mM each primer (LeptA primer: 5'-GGCGGCGCGTCTTAAACATG-3' and LeptB primer: 5'-TTCCCCATTGAGCAAGATT-3'), 5 units of HotStarTaq® DNA Polymerase and 5 µl of extracted DNA template, and sterile water to have a final volume of 50 µl. The following thermocycling program was used: a 15 minutes enzyme activation step at 95°C , followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 57°C for 30 s and 72°C for 1 min with a final elongation step at 72°C for 10 min. PCR mix without the target DNA was included as a negative control, and PCR mix with a *Leptospira* strain was included as a positive control. PCR products were then sequenced

by Genoscreen enterprise by a Sanger procedure. A database containing reference partial 16S sequences for *Leptospira* species was used to compare the obtained sequences with the published sequences. Analyses of sequences were made with Chromaspro software (copyright © 2003-2016 Technelysium Pty Ltd.) and online software Multi Alin of PRABI platform (21) was used to align sequences of database and samples.

Multi Sequence Typing (MST) analyses

Positive samples for *L. interrogans* species were subjected to MST analyses allowing the sequencing of 3 intergenic regions, the MST1, MST3 and MST9 regions (22). DNAs from reference *Leptospira* strains were used as control. The mix for PCR was prepared using 1x PCR buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl [pH8.3], 3 mM MgCl₂), 0.2mM dNTP, 0.2 mM each primer (MST1F: 5'-ACGGGAGAATCTGTCAAAGG-3', MST1R: 5'-AAATTCAGTACTGATTACCTCCACCA-3', MST3F: 5'-ACGATCGTGCCAATGTTTTT-3', MST3R: 5'-AAAATTCAAACCGGCAAATG-3', MST9F: 5'-TTTGAAAAACGACTGAGGTCAA-3' and MST9R: 5'-TCGATATCGGCACAAAATCA-3'), 5 units of HotStarTaq® DNA Polymerase and 5 µl of extracted DNA template, and sterile water to have a final volume of 50 µl. The following thermocycling program was used: a 15 minutes enzyme activation step at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 52°C for 30 s (MST1) / 50°C for 30s (MST3 and MST9) and 72°C for 1 min with a final elongation step at 72°C for 10 min. PCR mix without the target DNA was included as a negative control, and PCR mix with a *Leptospira* strain was included as a positive control. PCR were negative for samples tested, therefore sequencing was not necessary.

Variable Number Tandem Repeat (VNTR) analyses

Positive sample for *Leptospira sp.* by 16S amplification were subjected to VNTR analyses allowing to determine the number of the repetition of short sequences located in three *Leptospira* genomic regions (23). The following 3 regions were amplified VNTR4, VNTR7 and VNTR10. DNAs from reference *Leptospira* strains were used as control and to determine VNTR loci profiles. The mix for PCR was prepared using 1x PCR buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl [pH8.3], 3 mM MgCl₂), 0.2mM dNTP, 0.2 mM each primer (VNTR4F: 5'-AAGTAAAAGCGCTCCCAAGA-3', VNTR4R: 5'-ATAAAGGAAGCTCGGCGTTT-3', VNTR7F: 5'-GATGATCCCAGAGAGTACCG-3', VNTR7R: 5'-TCCCTCCACAGGTTGTCTTG-3', VNTR10F: 5'-GAGTTCAGAAGAGACAAAAGC-3' and VNTR10R: 5'-ACGTATCTTCATATTCTTTGCG-3'), 5 units of HotStarTaq® DNA

Polymerase and 5 µl of extracted DNA template, and sterile water to have a final volume of 50 µl. The following thermocycling program was used: a 15 minutes enzyme activation step at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 54°C for 30 s (VNTR4 and VNTR7) / 52°C for 30s (VNTR10) and 72°C for 1 min with a final elongation step at 72°C for 10 min. PCR mix without the target DNA was included as a negative control, and PCR mix with a *Leptospira* strain was included as a positive control and band size control for electrophoresis gel migration.

***Vkorc1* genotyping**

Genomic DNA extractions from mice tails were performed with QIAamp® DNA Mini kit Qiagen kit according to manufacturer's guideline. Genomic DNA was amplified using specific primers of *Vkorc1* gene. In order to sequence the totality of the *vkorc1* gene, two sets of primers were used. The sequences of the first primer set sVKOR-S1 and sVKOR-AS1 were (5'-GATTCTTCCCTCCTGTCC-3') and (5'-AGACCCTGTCTCAAAACCTA-3'), respectively, they were used to amplify mouse *Vkorc1* gene from nucleotide -36 to nucleotide +1727. The sequences of the second primer set sVKORC1-S2 and sVKORC1-AS2 were (5'-GAAAGCAGAACAACCTTAGCAGG-3') and (5'-AACCAACAGCAGAATGCAGCC-3') respectively, they were used to amplify the mouse *vkorc1* gene from nucleotide (+)1252 to nucleotide (+)2512. Mouse *vkorc1* gene amplifications were performed using sVKOR-S1 and sVKOR-AS1 or sVKOR-S2 and sVKOR-AS2 (10 pmol), Accuprime polymerase (1 unit, Invitrogen) in a 25 µl reaction volume containing 2 µl DNA, 2.5 µl 10X Accuprime buffer and 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate. The amplification was performed at 94°C for 3 min followed by 40 cycles at 94°C for 20 s, 64°C for 20 s, 68°C for 50 s, and a final extension step at 68°C for 10 min. The amplified products were sequenced on both strands. Obtained sequences were subsequently compared with the published *vkorc1* gene sequences for *Mus Musculus domesticus* (Genbank n°GQ905710.1).

Ethics statement

This project was run in the framework of a rodent control program decided and organized by the farmer. Trapping was conducted by a private pest control firm during an eradication program conducted in the farm. Commercial mouse traps killing instantly mice were used. Traps were placed by the pest control operator where rodent tracks were detected. Daily control of the traps was done by the farmer. When the presence of rodent in the trap was noted by the farmer, the latter placed it at 4 ° C until its dissection the next day. This study was not considered to be an "experimental procedure" as defined by the French legislation (Rural Code, Article

R214–89) and was therefore not subject to an ethical committee approval in France. This study complied with the ethical standards of European regulations governing the care and use of animals in research and it did not involve any endangered or protected species, or protected areas.

RESULTS

Rodent populations in farm

Mice, traces of passage of mice, urine or feces of mice were observed in 2 buildings of the farm, in the animal feed storage shed (referred as site 1) and in the main stall (referred as site 2) (Fig 1). In other buildings, no trace of mice was observed. No rats and no trace of rats were observed in the different farm buildings. First-generation anticoagulants had been applied 2 months earlier.

Traps were put in both buildings (20 per building) where traces of passage and mice had been seen (Fig 1). A total of 12 house mice (*Mus musculus domesticus*) were caught in site 2 (about 2 every 2 days) and referred to as S1 to S12, including 100% of mature animals and 50% of males as showed in Table 1.

Table 1. Mice leptospire carriage and *vkorc1* gene mutations.

| Mice | Sex | Leptospire carriage | | VKORC1 mutations | | | Resistance to AVK |
|------|--------|--|---------------------|------------------------|---------|----------|-------------------|
| | | Species | Serogroup | Exon 1 | Exon 2 | Exon 3 | |
| S1 | Male | <i>L. Interrogans</i> & <i>Kirschneri</i> | Grippotyphosa* | WT | WT | Y139C*** | +++ |
| S2 | Male | <i>L. kirschneri</i> | Icterohaemorrhagiae | WT | WT | Y139C*** | +++ |
| S3 | Male | X | X | WT | WT | WT | - |
| S4 | Female | X | X | R12W/A26S/E37E** | WT | WT | + |
| S5 | Female | <i>L. kirschneri</i> | Grippotyphosa* | R12W/A26S/E37E/A48T*** | R61L*** | WT | +++ |
| S6 | Male | X | X | WT | WT | WT | - |
| S7 | Female | X | X | WT | WT | WT | - |
| S8 | Female | X | X | WT | WT | WT | - |
| S9 | Female | <i>L. interrogans</i> | Failed analyses | WT | WT | Y139C*** | +++ |
| S10 | Male | <i>L. biflexa</i> | ND | WT | WT | WT | - |
| S11 | Male | <i>L. kirschneri</i> | Icterohaemorrhagiae | WT | WT | WT | - |
| S12 | Female | <i>L. biflexa</i> | ND | R12W/A26S/A48T** | R61L** | WT | + |

*presumptive serogroup; **heterozygous mutation; ***homozygous mutation; WT: wild type; in grey: mice carrying leptospire and resistant to first generation AVKs; X: No leptospire carriage found; ND: Not done, -: no AVKs resistance, +: limited AVKs resistance and +++: severe AVKs resistance.

In site 1, no rodent could be captured due to food competition and the presence of seeds stocks directly on the ground. The trap effort (*i.e.*, number of traps per site × number of days of trapping) was 480 trap-days in site 1 and 2, respectively. The trap success (*i.e.*, number of trapped mice/trap effort × 100) was 0 in site 1 and 2.5 in site 2, respectively.

Trapped individuals were confirmed to be *Mus musculus domesticus* based on matching of mtDNA cytochrome b sequences. Amplified sequences presented more than 98% of homology with sequences of *cytochrome b* published for *Mus musculus domesticus*.

Leptospiral carriage in cows

Seventy-six cows presenting reproductive disorders and three aborted cows were subjected to serological analysis by MAT test. Reactivity towards the different tested serogroups with titers between 10 and 640 are presented in table 2.

Table 2. MAT results of the samples taken from pregnant and aborted cows

| Tested serogroups | Number of positive serums among the 76 pregnant cows* | MAT titres (min to max)** | Number of positive serums in aborted cows (3 individuals) | MAT titres (min to max) |
|---------------------|---|---------------------------|---|-------------------------|
| Icterohaemorrhagiae | 21 | 10 -> 80 | 0 | / |
| Australis | 27 | 10 -> 80 | 0 | / |
| Autumnalis | 0 | / | 0 | / |
| Ballum | 0 | / | 0 | / |
| Bataviae | 0 | / | 0 | / |
| Canicola | 0 | / | 0 | / |
| Grippotyphosa | 10 | 20 -> 80 | 1 | 80 |
| Hebdomadis | 0 | / | 0 | / |
| Panama | 0 | / | 0 | / |
| Pomona | 0 | / | 0 | / |
| Pyrogenes | 0 | / | 0 | / |
| Sejroe | 61 | 10 -> 640 | 2 | 10 -> 160 |
| Tarassovi | 0 | / | 0 | / |
| Cynopteri | 0 | / | 0 | / |

*See next for detailed results; ** Positivity is recorded on the panel of serovars within the serogroup (i.e, within the *Grippotyphosa* serogroup, serovars *Grippotyphosa* and *Vanderhoedoni* were tested... see text)

Among cows with reproductive disorders, forty-three were seropositive to a single serotype, either *L. Sejroe* (serovar Hardjo) or *L. Grippotyphosa* (Table 3) and twenty-three presented cross-reactivity against *Leptospira*. *L. Sejroe* (serovar Hardjo), *L. Grippotyphosa* and to a lesser extent *L. Icterohaemorrhagiae*.

Table 3. Detailed results obtained for the MAT analysis of the 76 serums sampled from the pregnant cows

| Number of analyzed serum samples | Number of serum samples with positivity to one or more serogroups | |
|----------------------------------|---|--|
| | 66 (87%) | |
| | Detailed results of positivity | |
| | Serogroup | Positivity ascertained to a single serotype* |
| 76 cattles | AUS | 0 |
| | GRIPP | 1 |
| | IH | 0 |
| | SJ | 42 |
| | Total | 43 |
| | 23 | |
| | 66 | |

* Positivity is ascertained when a MAT reaction is observed solely to this serovar or when this serovar displays a titer three times higher than the other serovars when cross reactions is observed; ** Cross reactions in which the previous parameters are not observed (in all these reactions, MAT titer against a member of the *Sejroe* serogroup was common). AUS: Australis, GRIPP: *Grippotyphosa*, IH, *Icterohaemorrhagiae*, SJ: *Sejroe*

Out of the 3 aborted cows, 2 and 1 were demonstrated by MAT analysis to be infected by *L. Sejroe* and *L. Grippotyphosa*, respectively (Table 2). Unfortunately, all the attempts of cultures and PCR detection on aborted materials were unsuccessful.

Leptospiral carriages in trapped mice

Based on 16S amplification, 7 mice presented positive results for *Leptospira* presence. Three *Leptospira* genospecies were identified, including a saprophytic leptospire. *L. biflexa* was found

in 2 mice, *L. kirschneri* in 3 mice, *L. interrogans* in 1 mouse and one mouse was found carrying the two leptospire species *L. interrogans* and *L. kirschneri* (Table 1). The prevalence of pathogen Leptospiral renal carriage in trapped mice was 42%.

From the *L. interrogans* DNA sample extracted, MST and VNTR profiles could not be obtained because of unspecific amplifications. From the 4 *L. kirschneri* DNA samples extracted, complete VNTR profiles were obtained in 2 samples and corresponded to *Leptospira* belonging to serogroup *Icterohaemorrhagiae* as we can see in Table 1 according to VNTR published database (23). For the two other samples, VNTR profiles were incomplete because VNTR10 analyses could not be interpreted because of unspecific band.

***VkorC1* genotyping results**

In the trapped mice, 6 different mutations were found either alone or in combination. Mutations found in the trapped mice are summarized in Table 1. In exon 1, 4 mutations were detected. These mutations were located at nucleotide 34 (g.34C>T), 76 (g.76G>T), 111 (g.111A>G) and 142 (g.142G>C). Except for the g.111A>G mutation, these mutations were missense mutations leading to mutations R12W, A26S and A48T, respectively. In exon 2, one missense mutation was detected at nucleotide 976 (g.976G>T) leading to mutation R61L. In exon 3, one missense mutation was detected at nucleotide 2223 (g.2223A>G) leading to mutation Y139C.

Four different VKORC1 genotype were observed in the trapped mice. One genotype with no *vkorc1* gene mutation was detected in 6 mice. One genotype with only 1 *vkorc1* gene mutation, the Y139C mutation was detected in 3 mice. One genotype combining 2 missense mutations (R12W and A26S) and one silent mutation (E37E) was found in only one mouse at the heterozygous state. The last genotype combined 4 missense mutations (R12W, A26S, A48T and R61L) and 1 silent mutation (E37E) and was found in two mice, one at the homozygous state and one at the heterozygous state.

DISCUSSION

Epidemiology of non-maintenance *Leptospira* serovars in the farm

The high rate of abortion observed in the herd whereas in previous years nothing abnormal had been reported, the detection of antibodies against Leptospire in 66 cows out of 76 tested, as well as the fact that the farmer contracted Leptospirosis in the same time, allowed us to suspect the recent establishment of a Leptospire transmission cycle within the farm.

Since in previous years, no abnormal abortion had been reported, this suggests recent contamination of the farm. Three serogroups, *L. Sejroe* (serovar Hardjo), *L. Grippityphosa* and to a lesser extent *L. Icterohaemorrhagiae* were found in cows by MAT analyses. The three aborted cows were found to be infected either by *L. Sejroe* for two cows or by *L. Grippityphosa* for the other one. These results suggest that both serogroups are responsible for abortions observed in this herd. Since cows are known to be natural hosts for serovar Hardjo (9,24) and the spirochete can survive in cow for years, it seems unlikely that the high rate of abortion and reproductive disorders observed at the time of the study was caused by the serovar Hardjo. Indeed, we can assume that in the absence of new animals entering the farm, the cows of this farm were already carriers *L. Sejroe* (serovar *Hardjo*) the previous years, while the reproductions proceeded normally. It is more likely that the high rate of abortions and the reproductive disorders suddenly observed was due to recent infection by the other serogroups *L. Grippityphosa* and *L. Icterohaemorrhagiae* that are non-maintenance *Leptospira* serovars in cows.

Many wildlife species living in the cattle habitats may be suspected to have a role in the initiation of *Leptospira* transmission cycle. Nevertheless, since rodents are the natural carriers of these serogroups (25,26), it was normal to immediately consider the role of commensal rodents in this initiation even if rodent control operations have been regularly conducted by the farmer. The presence of rats has not been highlighted in the farm buildings despite a careful inspection, which seems to show the success of the solutions applied by the farmer to control rat populations. On the contrary, trace of mice and mice themselves have been seen in two buildings of the farm, suggesting a failure of the solutions applied to control mice. Only 12 mice could be captured in site 2, while numerous mice and numerous traces of mice could be observed in sites 1 and 2. The strong food competition in the buildings has undoubtedly limited the success of trapping, preventing any conclusion on the size of the mice populations present in this farm. Nevertheless, our study highlights the presence of mice carrying two pathogenic *Leptospira* species (*L. interrogans* and *L. kirschneri*) (5/12 trapped mice) in the main stall of the farm. Within these 2 *Leptospira* species, 3 serovars were identified, one completely identified (*i.e.*, *Icterohaemorrhagiae*) and the two others partially identified. We assume that the DNA of the *L. kirschneri*, partially typed by VNTR method, belongs to *Grippityphosa* serogroup the major representative of the *L. kirschneri* species in France and for which VNTR analysis has shown a weak ability to achieve its typing (27).

Since these 2 serogroups (*Grippityphosa* and *Icterohaemorrhagiae*) were simultaneously detected in mice and cows, we could suspect an initial *Leptospira* transmission from mice to

cows and then, hypothetically from cows to the farmer who developed the disease at the period of cow abortions (Fig 2). Because mice share the same habitat than cows in this farm, initial transmission from mice to cows was most likely indirect through interaction with a urine-contaminated environment such as hay, grains.... Indeed, contact between rodents and food in dairy cattle has been often described as a factor risk in a prevalence of *Leptospira* infection study (9,28). After the initial transmission from mice to cows, we can hypothesize that the farmer acquired leptospirosis from cow through direct contact with the urine of infected animals or indirectly with a urine-contaminated environment such as manure. Even if the serogroup of *Leptospira* responsible for leptospirosis of the farmer is unknown, we can easily assume that the serogroup *Grippityphosa* was also responsible for the leptospirosis of the farmer. In fact, in a recent epidemiologic study on human leptospirosis performed in the Franche Comté department located approximately 300 km at the North East of the farm, this serogroup was found to be the most often involved in human disease (8).

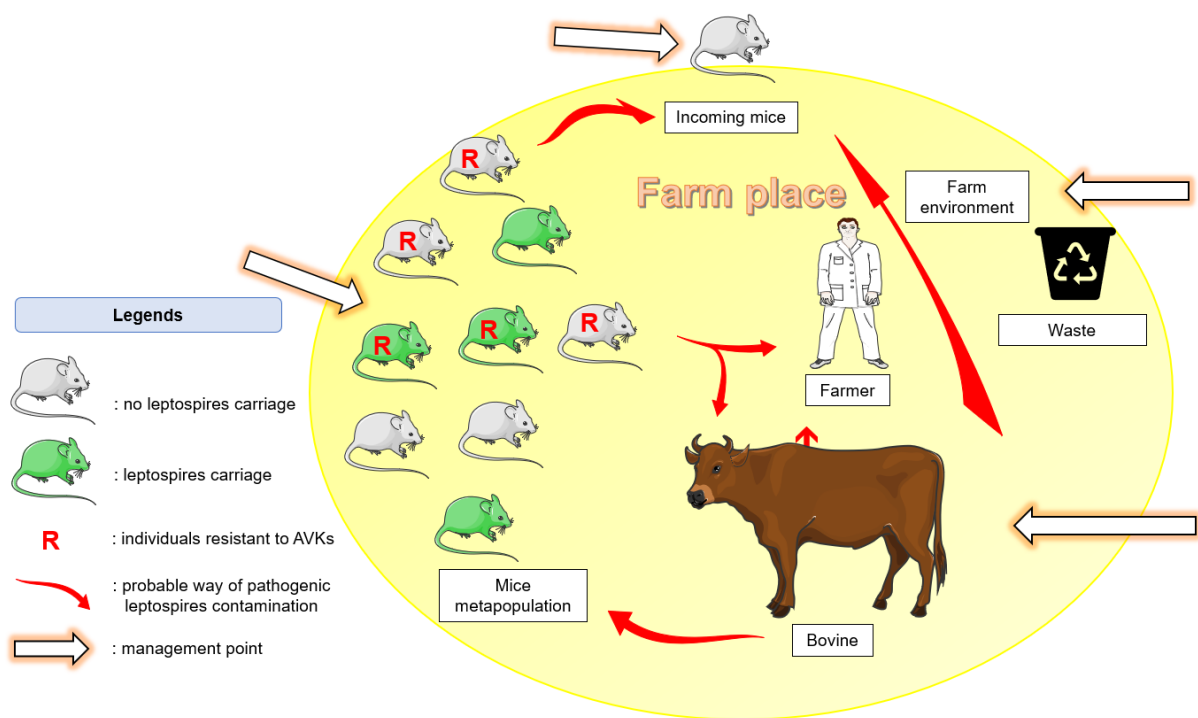


Figure 2. Leptospira transmission cycle (represented by the red arrows) and points of management (presented by the white arrows).

This farm in which animal leptospirosis is concomitant to human leptospirosis is clearly a public health concern. Indeed, leptospirosis is reported as fatal in about 10% of infected humans, with a possible fatality range of 5–40%. The context of this farm clearly shows that the importance of these 2 non-maintenance serovars in bovine leptospirosis should not be underestimated in

epidemiological survey studies. Radical measures must be implemented within the farm to stop the cycle. Different possible management points will be discussed above to limit and prevent *Leptospira* transmission.

Management crisis

Management of mice in buildings - Until now, scientific studies have mainly shown that *Leptospira* are frequently carried in rats and studies reporting carriage of *Leptospira* in mice are few (29). This could explain why the farmer was not worried about the presence of mice in these buildings. Because leptospiral-infected mice share the same habitat than cows in this farm, they represent a real threat even if the size of the population could be small. The first action to be implemented is to effectively manage rodent populations in livestock buildings, but also in food and materials storages. The farmer had applied first-generation anticoagulants. Clearly this method has been effective in controlling rat populations, but not those of mice. The genetic analyzes carried out on the trapped mice enabled to understand the failure of this treatment. In fact, 50% of the trapped mice carried mutations in the *vkorc1* gene. Mutations of this gene have been widely studied in Europe and France because a number of them have been shown to be responsible for resistance to AVKs which are the most frequently used molecules in Europe to manage rodents. The mutations found in this farm have already been described in Europe and France. The Y139C mutation has been described for the first time in Germany (30) and its presence has subsequently been described in France (31) with variable frequencies depending on the regions. In the South East of France, its frequency has been reported close to 20% (31) in mice trapped from 21 different sites. It is therefore not surprising to find this mutation in this site. The set of mutations (R12W, A26S, A48T, R61L) detected in this farm has also been previously described in Germany (30,32), then in France (31,33). This set of 3 or 4 mutations has been reported to be the consequence of the introgression of *vkorc1* gene from the Algerian mouse (*Mus spretus*) in the genome of *Mus musculus domesticus*. The Y139C mutation and the set of 3 or 4 mutations have been shown to be responsible for severe resistance to anti-vitamin K anticoagulants, particularly to first generation molecules. The failure of the treatments carried out by the farmer is therefore understandable, especially since this resistance is compounded by the presence in the buildings of easily accessible food stocks and certainly responsible for a low consumption of baits by mice. The management of such mice can be achieved only by using second-generation anticoagulants such as difenacoum, difethialone, brodifacoum or flocoumafene. These anticoagulants are more effective on such strains, but they are more persistent and more often associated with secondary poisoning of wildlife due to the ingestion

of intoxicated rodents. Their use must therefore be limited in an around building and it is better to use them in baiting boxes. The use of a molecule such as alpha chloralose, a central nervous depressant system, may also be preferred to limit these risks of secondary poisoning. Nevertheless, the effectiveness of these molecules can be limited when the ambient temperatures are too high. Systematic trapping, limit access to food stocks must be additional and essential measures to improve mice control.

Limiting access to incoming mice - The presence of several leptospiral strains and several mutations of the *vkorc1* gene within the same farm is quite surprising. Indeed, generally within the same site and the same population of rodents, a single leptospiral strain or a unique *vkorc1* gene mutation is found. For example, a recent study conducted in the city of Lyon (France) showed the presence of a unique strain of leptospire in rats caught in different sites of the same city (27). Similarly, a study conducted in a Paris park of approximately 80 ha reported the presence of a unique *vkorc1* gene mutation in a sample of more than 80 rats trapped at different park locations (34). In this farm, 2 species and at least 3 Leptospire serovars were detected with individuals potentially carrying 2 species of Leptospire, as well as 4 different VKORC1 genotypes. Two hypotheses are possible : 1 / within the farm several micropopulations of mice forming a metapopulation could be present, nesting in different places of the farm/building and crossing very rarely, possibly in places where they eat, leading potentially to a transfer of pathogens or even resistance alleles - a suitable management as explained previously must be done by considering all the potential sites of breeding and feeding, 2 / within the farm a single micropopulation is present, and the diversity in pathogens and VKORC1 genotypes is due to new entrants introduced by transport or from the surrounding area, exchanging genes and pathogens with local individuals when animals meet - population control measures should be combined with architectural and sanitary measures to prevent the introduction of new entrants. Nevertheless, on a farm, these measures are extremely difficult or impossible to implement.

The plurality of *vkorc1* gene mutations found in a homozygous state on the same site could have disastrous consequences in terms of rodent management. Indeed, recently, double mutations on the *vkorc1* gene have been discovered, certainly due to genetic recombination between mutated alleles (31). The coexistence of individuals homozygous for the Y139C mutation and individuals homozygous for the set of the 4 mutations (R12W, A26S, A48T and R61L) could favor recombination between genotypes that could generate resistances to the first generation AVKs, but also to the second generation AVKs. Effective methods of managing the different genotypes must be put in place quickly to avoid this emergence.

Prophylaxis measures - In this farm, to reduce the risk of pathogenic leptospires contamination, prophylaxis measures are also important in order to reduce farm and domestic animals and human contamination, but also contamination of new entrant mice. Containment of seeds to prevent them to be contaminated by infected mice urine must be done as far as possible. Disinfection or even renewal of equipment which could have been in contact with the pathogen must be done and building soils must be washed with detergent. If possible calving boxes and quarantine zones must be set up for cattle. Infected cows must be isolated and treated with antibiotics. Farm waste such as manure are to consider for limiting leptospires proliferation. Indeed contaminated urine can be a source of infection of manure. Leptospires survival in manure has been studied up to 8 days and this period varies according to climate conditions (35). So, before spreading manure in pasture, a storage period higher than 8 days should limit risk of contamination because of the short survival period.

Human vaccine could be preconised against serovar *Icterohaemorrhagiae*. The infecting strain of the farmer could not be characterised, but symptoms were febrile illness associated to mild hepatitis and this form is usually known to be caused by *Grippityphosa*, a serovar considered to be less severe than clinical forms caused by *Icterohaemorrhagiae*. In France, only vaccine against serovar *Hardjo* is available for bovine. In this case, using this vaccine solely would not be efficient unless it is associated to *Grippityphosa* antigen as the vaccines available in the US. Our study points out that *Hardjo* is not the only serovar responsible for bovine abortion and the vaccine to be used should therefore associate other antigens than the only *Hardjo* antigen which is currently available for controlling bovine leptospirosis in France.

CONCLUSIONS

Reproductive disorders and abortions suddenly observed in this farm could be associated to Leptospirosis. Since *L. Sejroe* (serovar *Hardjo*), *L. Grippityphosa* and *L. Icterohaemorrhagiae* have been detected in cows, clinical symptoms may be due to one or more of these serogroups and appropriate measures should be taken. The presence of *L. Sejroe* (serovar *Hardjo*) would justify the vaccination of the herd against this serovar. However, this vaccination will not prevent contaminations of cows by *L. Grippityphosa* or *L. Icterohaemorrhagiae* carried by mice that could also contribute to clinical signs observed in this farm.

The fact that several mice present in this farm carries *L. Gryppotyphosa* or *L. Icterohaemorrhagiae* demonstrates the relevance of mice control in this farm to mitigate the risk of *Leptospira* transmission from wildlife to livestock and/or humans even if the number of mice captured was limited, preventing an accurate assessment of the percentage of individuals carrying leptospires. Nevertheless, management of such mice carrying zoonotic agent is challenging because of their severe resistances to AVK rodenticides. The low sampling of captured mice did not allow to compare the prevalence of leptospiral carriage between resistant mice and non-resistant mice. A more complete study should be conducted to evaluate a potential link between resistance and carriage of leptospires. A biological cost of resistance could possibly lead to a more frequent contamination of resistant mice. Once the transmission cycle is established in livestock, rodent control must be combined with appropriate environmental and medical prophylactic measures. It would have been interesting to be able to repeat MAT analyzes after the implementation of all the recommended measures to know the evolution of the situation, but alas this was not possible.

Such surveillance studies are essential to identify circulating serovars that are essential for the development of appropriate vaccines. Because of the small number of trapped and analyzed mice, this study may be considered as a preliminary report on *Leptospira* carriage by house mice. More studies will be needed to assess *Leptospira* prevalence in mice.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the “Laboratoire des leptospires” for their analyses, F. Peigneaux for his advice for trapping and Z. Djelouadji for her advice for molecular identification of *Leptospira*. This work was supported by grants ISI n°I1301001W “NEORAMUS” from Bpi France. This funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010;140:287–296.
2. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:296–326.

3. 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.
4. Cosson J-F, Picardeau M, Mielcarek M, Tatard C, Chaval Y, Suputtamongkol Y, et al. Epidemiology of leptospira transmitted by rodents in southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e2902.
5. Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho ALF, Aires TSF, Villasboas-Bisneto JC, Queirroz A, et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:505–508.
6. Benacer D, Thong KL, Min NC, Verasahib KB, Galloway RL, Hartskeerl RA, et al. Epidemiology of human leptospirosis in Malaysia, 2004–2012. *Acta Trop.* 2016;157:162–168.
7. C Gravekamp HV de K. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *Journal of General Microbiology*, 139, 1691-1700. *J Gen Microbiol.* 1993;139:1691–1700.
8. Estavoyer JM, Chirouze C, Faucher JF, Floret N, Couetdic G, Leroy J, et al. Leptospirosis in Franche-Comté (FRANCE): Clinical, biological, and therapeutic data. *Médecine Mal Infect.* 2013;43:379–385.
9. Fávero JF, de Araújo HL, Lilenbaum W, Machado G, Tonin AA, Baldissera MD, et al. Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microb Pathog.* 2017;107:149–154.
10. Marquez A, et al. Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and identify and type leptospire. IN PRESS.
11. Stritof Majetic Z, Galloway R, Ruzic Sabljic E, Milas Z, Mojcec Perko V, Habus J, et al. Epizootiological survey of small mammals as *Leptospira* spp. reservoirs in Eastern Croatia. *Acta Trop.* 2014;131:111–116.
12. Turk N, Milas Z, Margaletic J, Staresina V, Slavica A, Riquelme-Sertour N, et al. Molecular characterization of *Leptospira* spp. strains isolated from small rodents in Croatia. *Epidemiol Infect.* 2003;130:159–166.
13. Boyle CM. Case of Apparent Resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to Anticoagulant Poisons. *Nature.* 1960;188:517.

14. Dodsworth E. Mice are spreading despite such poisons as warfarin. *Minic Engin Lond.* 1961;3746:1668.
15. Grandemange A, Kohn MH, Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Berny P, Benoit E. Consequences of the Y139F *Vkorc1* mutation on resistance to AVKs: in-vivo investigation in a 7th generation of congenic Y139F strain of rats. *Pharmacogenet Genomics.* 2009;19:742–750.
16. Hodroge A, Longin-Sauvageon C, Fourel I, Benoit E, Lattard V. Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat *VKORC1* involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch Biochem Biophys.* 2011;515:14–20.
17. Pelz H-J, Rost S, Hünnerberg M, Fregin A, Heiberg A-C, Baert K, et al. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics.* 2005;170:1839–1847.
18. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz H-J, et al. Mutations in *VKORC1* cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature.* 2004;427:537–541.
19. Pagès M, Chaval Y, Herbreteau V, Waengsothorn S, Cosson J-F, Hugot J-P, et al. Revisiting the taxonomy of the Rattini tribe: a phylogeny-based delimitation of species boundaries. *BMC Evol Biol.* 2010;10:184.
20. Zuerner RL. Laboratory Maintenance of Pathogenic *Leptospira*. In: *Current Protocols in Microbiology* [Internet]. John Wiley & Sons, Inc.; 2005. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780471729259.mc12e01s00/abstract>
21. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:10881–10890.
22. Zilber AL, Picardeau M, Ayrat F, Artois M, Demont P, Kodjo A, Djelouadji Z. High-resolution typing of *Leptospira interrogans* strains by multispacer sequence typing. *J Clin Microbiol.* 2014;52:564-71.
23. Salaün L, Mérien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3954–3962.

24. Lilenbaum W, Martins G. Leptospirosis in Cattle: A Challenging Scenario for the Understanding of the Epidemiology. *Transbound Emerg Dis.* 2014;61 Suppl 1:63–68.
25. *Veterinary Medicine - 10th Edition* [Internet]. [cited 2018 Jan 10]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/veterinary-medicine/radostits/978-0-7020-2777-2>
26. Ellis WA. Animal Leptospirosis. In: *Leptospira and Leptospirosis* [Internet]. Springer, Berlin, Heidelberg; 2015 [cited 2017 Oct 18]. p. 99–137. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-45059-8_6
27. Ayrat F, Djelouadji Z, Raton V, Zilber A-L, Gasqui P, Faure E, et al. Hedgehogs and Mustelid Species: Major Carriers of Pathogenic *Leptospira*, a Survey in 28 Animal Species in France (20122015). *PloS One.* 2016;11:e0162549.
28. Talebkhan Garoussi M, Vand-E-Useefee J, Mehrzad J. Seroprevalence of Leptospiral Infection in Rodents of Dairy Cattle Herds Complexes in Suburb of Mashhad -Iran. *J Appl Anim Res.* 2006;30:109–111.
29. Mayer-Scholl A, Hammerl JA, Schmidt S, Ulrich RG, Pfeffer M, Woll D, et al. *Leptospira* spp. in Rodents and Shrews in Germany. *Int J Environ Res Public Health.* 2014;11:7562–7574.
30. Pelz H-J, Rost S, Müller E, Esther A, Ulrich RG, Müller CR. Distribution and frequency of VKORC1 sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. *Pest Manag Sci.* 2012;68:254–259.
31. Goulois J, Hascoët C, Dorani K, Besse S, Legros L, Benoit E, et al. Study of the efficiency of anticoagulant rodenticides to control *Mus musculus domesticus* introgressed with *Mus spretus* Vkorc1. *Pest Manag Sci.* 2017;73:325–331.
32. Song Y, Endepols S, Klemann N, Richter D, Matuschka FR, Shih CH, et al. Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between old world mice., Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between Old World mice. *Curr Biol CB.* 2011;21:1296–1301.
33. Goulois J, Lambert V, Legros L, Benoit E, Lattard V. Adaptive evolution of the Vkorc1 gene in *Mus musculus domesticus* is influenced by the selective pressure of anticoagulant rodenticides. *Ecol Evol.* 2017;7:2767-2776.

34. Desvars-Larrive A, Pascal M, Gasqui P, Cosson J-F, Benoît E, Lattard V, et al. Population genetics, community of parasites, and resistance to rodenticides in an urban brown rat (*Rattus norvegicus*) population. *PloS One*. 2017;12:e0184015.
35. Diesch SL. Survival of leptospire in cattle manure. *J Am Vet Med Assoc*. 1971;159:1513–1517.

III. Étude de la résistance aux AVKs chez des rongeurs dans un contexte leptospirosique en Martinique

1. Contexte et objectifs de l'étude

La leptospirose touche principalement les zones tropicales. Récemment plusieurs épidémies de cas humains en Martinique ont été rapportées. Afin de prévenir de futures infections, un plan visant à analyser l'efficacité des moyens de gestion des populations de rongeurs a été mis en place, ceux-ci étant les principaux réservoirs de leptospires. Le programme a débuté en Guadeloupe puis a été mis en place en Martinique. Trois espèces commensales, dont le rôle dans la transmission de la leptospirose a déjà été bien étudié, ont été analysées : *Mus musculus domesticus*, *Rattus norvegicus* et *Rattus rattus*.

Les objectifs de l'étude étaient d'analyser la sensibilité et l'exposition des 3 espèces commensales aux AVKs dans différentes zones de Martinique. Plusieurs zones de l'île ont été étudiées avec des caractéristiques différentes : agricoles, réserves naturelles, touristiques et urbanisées, avec des zones traitées et des zones témoins non-traitées.

2. Principaux résultats de l'étude

- Chez les *Rattus norvegicus* (rats bruns) aucune mutation codante n'a été trouvée mais peu d'individus ont été capturés (18), les données sont donc peu représentatives.
- 129 *Rattus rattus* ont été capturés dans tous les écosystèmes, même si ces derniers semblent plus abondants en milieux forestier et agricole. Trois mutations codantes ont été retrouvées (H68N, A115T et Y129N) (Figure 33). Les mutations A115T et Y129N n'avaient pour le moment jamais été détectées. Ces mutations semblent conférer peu voire pas de résistance aux AVKs.
- 59 *Mus musculus* ont été capturées majoritairement dans des écosystèmes agricoles mais également industriels et commerciaux. Cinq génotypes composés de cinq mutations codantes ont été identifiés (Tableau 19). La mutation S149N n'avait pour le moment jamais été détectée.

Cette mutation semble induire peu de résistance aux AVKs. La mutation Y139C, déjà largement décrite en Europe, a été détectée avec une fréquence allélique de plus de 39%. Cette mutation confère une résistance sévère aux AVKs de 1^{ère} génération et à la bromadiolone. Ceci implique donc la nécessité d'utiliser des molécules de 2nd génération plus toxiques, mais plus rémanentes, pour gérer les populations de souris. Leur utilisation doit donc être faite par des professionnels connaissant les problèmes d'écotoxicité associés à ces molécules afin d'en maîtriser les risques.

La répartition des différentes mutations codantes est montrée sur la figure 33. En ce qui concerne l'exposition aux AVKs, 54% des rongeurs ont été exposés à au moins une molécule. Cela suggère l'utilisation de divers types d'appâts sur le même site. Pour résumer, il semble que sur l'île des AVKs soient utilisés en quantités variables selon les zones, pouvant avoir sélectionné des individus résistants chez les rongeurs commensaux étudiés. Il faut qu'il y ait une vigilance quant à l'utilisation des AVKs pour éviter la prolifération de phénotypes résistants et prévenir les risques d'intoxication de la faune non-cible. La gestion des populations de souris doit être contrôlée attentivement pour éviter la diffusion de la résistance aux AVKs et l'émergence de nouvelles mutations du gène *vkorc1*. Concernant le rat noir, il ne semble pas y avoir de problème de résistance de cible particulier aux vues des données de l'étude. Il faudrait étudier la résistance métabolique aux AVKs, qui peut être une autre voie expliquant le peu d'efficacité des moyens de gestion mis en place.

Figure 33. Carte de répartition des génotypes VKORC1 codants chez les 3 espèces commensales étudiées

MM : *Mus musculus domesticus*, RR : *Rattus rattus* et gras : nouvelles mutations *vkorc1*.

Tableau 19. Caractéristiques des mutations codantes de *vkorc1*

| Espèce | Mutation | Fréquence allélique |
|--------------------------------|------------|---------------------|
| <i>Mus musculus domesticus</i> | A26T | 0,9 |
| | A48T/R61L | 1,9 |
| | Y139C | 39,6 |
| | A26T/Y139C | 0,9 |
| | S149N | 0,9 |
| <i>Rattus rattus</i> | H68N | 2,6 |
| | A115T | 0,9 |

| | | |
|--|-------|-----|
| | Y129N | 0,9 |
|--|-------|-----|

Ces travaux ont fait l'objet d'un article présenté ci-dessous qui a été soumis au journal Plos Neglected Tropical Disease le 21 novembre 2018.

ARTICLE 4

Resistance to anticoagulant rodenticides in Martinique could lead to inefficient rodent control to prevent leptospirosis transmission

Aurélie MARQUEZ (USC 1233 INRA/VAS, Établissement Vetagro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Étoile, France)

Rami ABI KHALIL (USC 1233 INRA/VAS, Établissement Vetagro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Étoile, France)

Isabelle FOUREL (USC 1233 INRA/VAS, Établissement Vetagro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Étoile, France)

Teddy OVARBURY (FREDON Martinique, Ducos, Martinique)

Rosine Armand (FREDON Martinique, Ducos, Martinique)

Gérard THALMENSI (ARS Martinique, Fort de France Cedex, Martinique)

Georges JAFFORY (ARS Martinique, Fort de France Cedex, Martinique)

Etienne BENOIT (USC 1233 INRA/VAS, Établissement Vetagro Sup, Campus de Lyon, Marcy l'Étoile, France)

Angéli KODJO (USC 1233 INRA/VAS, Équipe Leptospores, Campus de Lyon, Marcy L'Étoile, France)

Virginie LATTARD (USC 1233 INRA/VAS, Équipe Anticoagulants, Campus de Lyon, Marcy L'Étoile)

Keywords: Vitamin K epoxide reductase, Anticoagulant rodenticide, resistance, mutation, leptospirosis transmission

ABSTRACT

Leptospirosis is a re-emergent worldwide zoonosis. It is endemic in Martinique where transmission conditions are favourable. Humans are usually infected through contact with water contaminated with urine of rodents. Recent human leptospirosis outbreaks in Martinique require today effective rodent management to prevent leptospirosis transmission. Nowadays, use of anticoagulant rodenticides (AR) is the main method implemented to control rodent populations. Nevertheless, intensive use of these AR has selected worldwide many VKORC1-based resistant rodent strains to AR. Our aim was to characterize the sensitivity of Martinique commensal rodents to AR to better prevent leptospirosis transmission. Resistance of house mice to first-generation and in rare cases even to second-generation ARs were clearly demonstrated in Martinique with the detection of the Y139C mutation with a very high allelic frequency of 40% and the A26T/Y139C double-mutation with an allelic frequency of 0.9%. In black rat, the most prevalent rodent in Martinique, 3 new *Vkorc1* coding mutations were detected, the H68N, A115T and S149N mutations associated with moderate resistance to first generation AR. Therefore, rodent management in Martinique must be carried carefully to avoid resistance diffusion and maintain long-term effective rodent management, to be able to efficiently prevent leptospirosis transmission.

INTRODUCTION

Leptospirosis, a bacterial disease, is one of the most widespread zoonoses in the world (1,2). This disease has been reported to affect approximately 1 million persons all over the world each year (3) while its diagnosis is certainly still underestimated. Indeed, this disease may be accompanied by different clinical symptoms ranging from a flu-like syndrome with a moderate fever to a multi-organ failure (4–6). Even if this disease may be usually treated within a few weeks by appropriate antibiotic therapy based on the use of penicillin or doxycycline, death occurs in approximately 10% of cases (7).

Incidence of this disease is much higher in the tropics than in the temperate zones, the transmission conditions being more favorable (1). In Martinique, an Island of the French West Indies, leptospirosis is an endemic disease. Incidence was reported at 13.9 cases per 100 000 inhabitants per year in a study conducted between 2002 and 2008 (8) (Centre national de référence de la leptospirose, 2012); according to a more recent study it would reach 60.6 cases per 100000 inhabitants (9), 100 times higher than that reported in metropolitan France. Recent outbreaks in humans have been reported after a race in the tropical forest including crossing shallow rivers in 2009 (10) and after canyoning activities in 2011 (11). All preventive measures must be implemented to limit leptospirosis transmission in Martinique. Even if numerous wild and domestic animal species have been identified as hosts of pathogen *Leptospira* excreting them in their urine, the main reservoirs identified are rodents, hence the importance of managing their populations (12,13) (Marquez et al, in reviewing).

Nowadays, use of anticoagulant rodenticides ARs is the main method implemented to control rodent populations. They provoke haemorrhage by inhibiting the vitamin K epoxide reductase (VKORC1) enzyme involved in the vitamin K cycle, vitamin K being required for vitamin K-dependent clotting factors II, VII, IX and X activation(14,15). Intensive use of ARs has selected target resistance to ARs since 1960 (16,17) due to *vkorc1* mutations (18–21) in *Rattus norvegicus* and *Mus musculus domesticus* populations. Such resistance has been first described in Europe, and then worldwide in the United States (22), in Canada (23), in Japan (24) and in Australia (25).... Second generation ARs have been developed to overcome resistance issues in rodents but these molecules are more tissue-persistent and thus more often associated with secondary exposure or intoxication of non-target wildlife. Their use should be cautious. In some countries, it is limited to professionals and is only possible after failure of a first-generation AR treatment or if resistance is demonstrated by any other method.

In Martinique where leptospirosis is so prevalent, rodent management must be optimal to prevent or limit *Leptospira* transmission from rodents, the main known reservoirs of pathogenic *Leptospira*, to humans or domestic animals. This study was therefore intended to characterize the sensitivity of Martinique rodents to ARs used in Martinique.

RESULTS

Trapping success

A total of 512 traps were set in Martinique. The trap effort on the Martinique Island all along the study was 2048 trap-nights. The trap effort was different according to the site: 88 trap-nights for site 8, 100 for sites 1 to 6, 108 for site 7, 192 for site 9, 200 for sites 10 to 13, and 260 for site 14. A total of 206 rodents were captured (129 *Rattus rattus*, 59 *Mus musculus domesticus* and 18 *Rattus norvegicus*). Trapped individuals were confirmed to be *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* or *Mus musculus domesticus* based on matching of mtDNA cytochrome b sequences. Amplified sequences presented more than 98% of homology with sequences of *cytochrome b* published for *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* or *Mus musculus domesticus*. Trapping results per site are summarized in Table 1. The trap success was 10.06 rodents per 100 trap-nights in Martinique Island including 6.30 *Rattus rattus*, 2.88 *Mus musculus domesticus* and 0.88 *Rattus norvegicus*. Results per site are summarized in Table 2 with trap-success ranging from 0 rodent for site 4 to 23.5 rodents for the control site 14. The trap-success for *Rattus rattus* was comprised between 0 to 23.5 for site 14; for *Mus musculus*, between 0 to 12 (for site 5); for *Rattus norvegicus*, between 0 to 10 (for site 2).

Table 1. Trapping details of rodents in Martinique Island. Between brackets, is indicated the number of samples analyzed

| Dates of trapping | Site | Activity | Number of traps | Trapped rodents | | |
|------------------------------|---------|--|-----------------|-----------------|-----------|-----------|
| | | | | Rr | Mm | Rn |
| From 04/13/15 to 04/17/15 | Site 1 | Agricultural (sugar cane) | 25 | 5 | 0 | 0 |
| | Site 2 | Agricultural (sweet potato, cassava) | 25 | 1 | 0 | 10 (8) |
| From 06/15/15 to 06/19/15 | Site 3 | Intensive farming (poultry) | 25 | 1 | 0 | 1 |
| | Site 4 | Intensive farming (poultry and pig) | 25 | 0 | 0 | 0 |
| From 07/20/15 to 07/24/15 | Site 5 | Agricultural (cassava) | 25 | 4 | 12 | 0 |
| | Site 6 | Agricultural (cassava) | 25 | 1 | 9 (8) | 0 |
| From 08/31/15 to 09/04/15 | Site 7 | Agricultural (banana tree) | 27 | 5 | 4 | 0 |
| | Site 8 | Agricultural (banana tree) | 22 | 12 | 1 | 1 |
| From 09/14/15 to 09/18/15 | Site 9 | Control forest area (as control site) | 48 | 23 | 0 | 1 |
| From 09/21/15 to 09/25/15 | Site 10 | Agricultural (chayote) | 50 | 5 (4) | 2 (1) | 2 |
| From 10/12/15 to 10/16/15 | Site 11 | Industrial and commercial area | 50 | 5 | 8 (6) | 1 |
| From 10/19/15 to 10/23/15 | Site 12 | Industrial and commercial area | 50 | 0 | 14 | 0 |
| From 11/16/15 to 11/20/15 | Site 13 | Agricultural (sugar cane) | 50 | 6 | 9 | 2 |
| From 11/23/15 to 11/27/15 | Site 14 | Control natural area (as control site) | 65 | 61 (14) | 0 | 0 |
| Total | | | 512 | 129 | 59 | 18 |

Table 2. Trap-success per site and per species

| | Total rodents Rr+Mm+Rn | <i>Rattus rattus</i> (Rr) | <i>Mus musculus</i> (Mm) | <i>Rattus norvegicus</i> (Rn) |
|------------------------|---|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Site 1 (ARs site) | 5,00 | 5,00 | 0,00 | 0,00 |
| Site 2 (ARs site) | 11,00 | 1,00 | 0,00 | 10,00 |
| Site 3 (ARs site) | 2,00 | 1,00 | 0,00 | 1,00 |
| Site 4 (ARs site) | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| Site 5 (ARs site) | 16,00 | 4,00 | 12,00 | 0,00 |
| Site 6 (ARs site) | 10,00 | 1,00 | 9,00 | 0,00 |
| Site 7 (ARs site) | 8,33 | 4,63 | 3,70 | 0,00 |
| Site 8 (ARs site) | 15,91 | 13,64 | 1,14 | 1,14 |
| Site 9 (control site) | 12,50 | 11,98 | 0,00 | 0,52 |
| Site 10 (ARs site) | 4,50 | 2,50 | 1,00 | 1,00 |
| Site 11 (ARs site) | 7,00 | 2,50 | 4,00 | 0,50 |
| Site 12 (ARs site) | 7,00 | 0,00 | 7,00 | 0,00 |
| Site 13 (ARs site) | 8,50 | 3,00 | 4,50 | 1,00 |
| Site 14 (control site) | 23,46 | 23,46 | 0,00 | 0,00 |

Exposition of trapped rodent populations to ARs

Rodent exposure to ARs was assessed by analyzing residues of ARs in liver. The rodents trapped in control sites 9 and 14 did not have hepatic residues of ARs. In the other sites, 61 rodents presented liver ARs residues of less than 10 ng/g (54% of rodents trapped in ARs sites); 26 rodents, concentrations between 10 and 100 ng/g (or 23% of rodents trapped in ARs sites); 23, concentrations between 100 and 1000 ng/g (or 20% of rodents trapped in ARs sites); and 3, concentrations greater than 1000 ng/g (*i.e.*, 2.6% of rodents trapped in ARs sites). The majority of ARs residues were molecules belonging to second-generation ARs with difenacoum residues significantly higher than other second-generation molecules (Figures 1 and 2B).

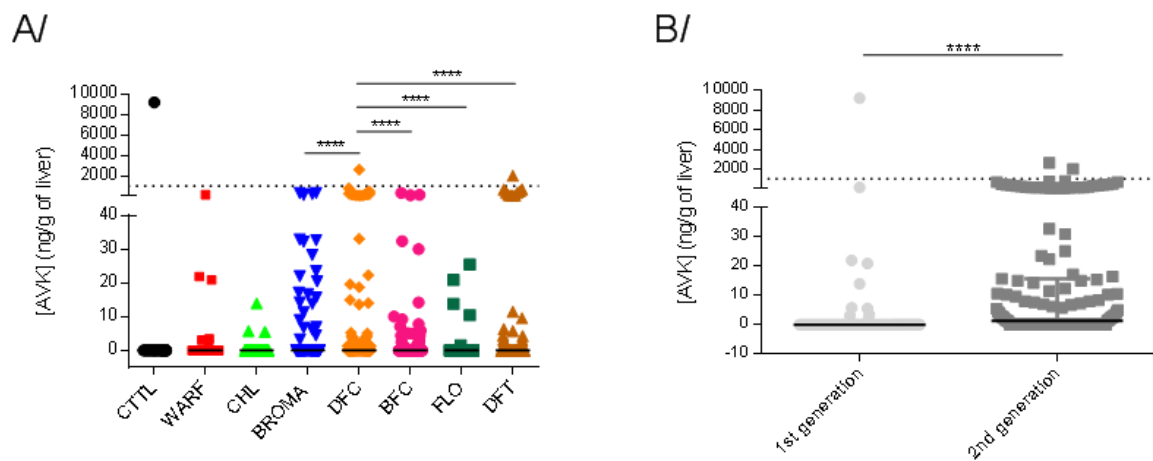


Figure 1. AR concentration in liver of trapped rodents in Martinique Island. Concentrations of individual (A) or grouped in first or second generation (B) AR molecules are presented.

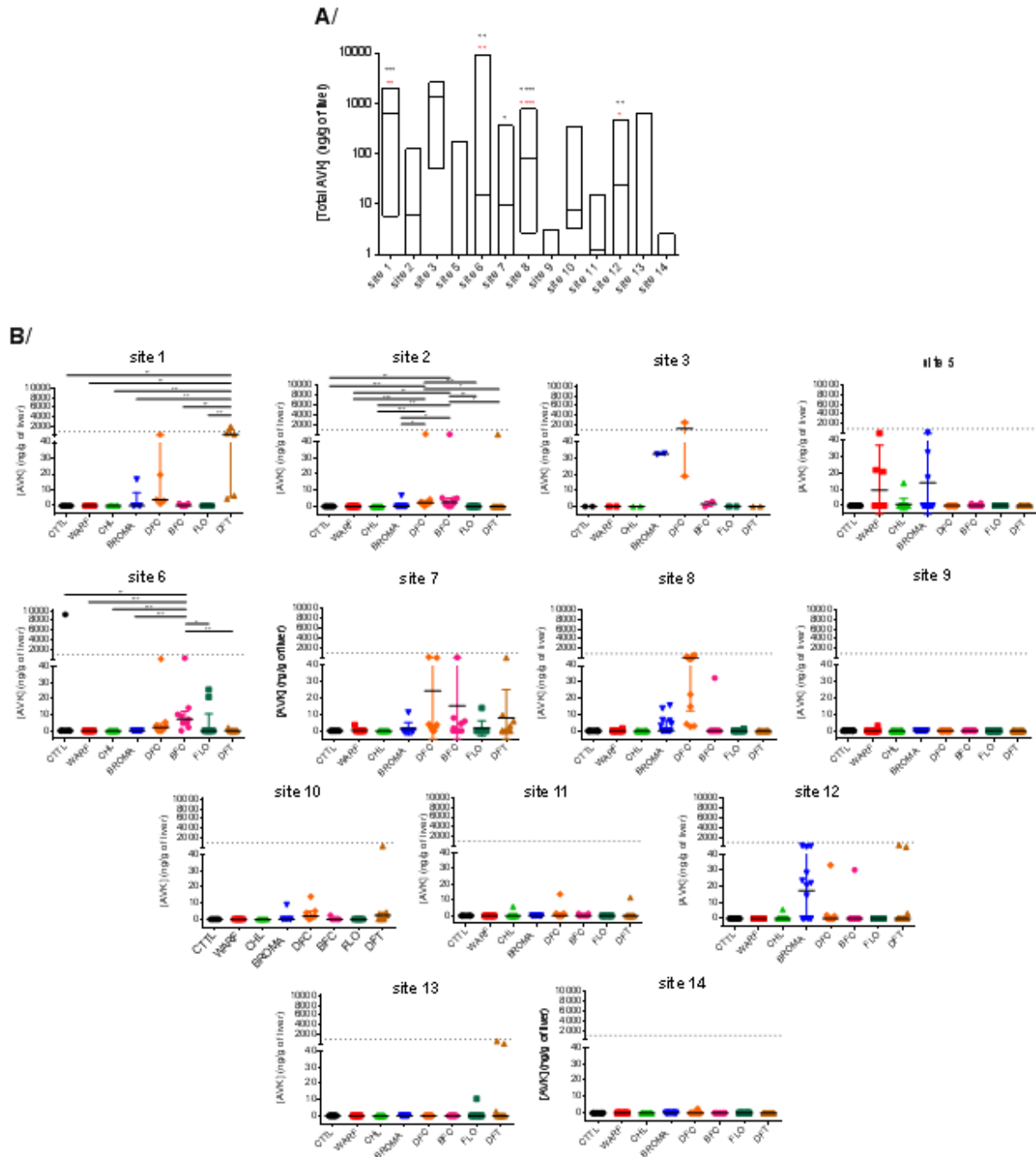


Figure 2. AR concentrations in liver of rodents trapped in the different trapping sites. Concentrations of total (A) or individual (B) ARs are presented. Sites 9 and 14 corresponded to control sites.

Rodents trapped in sites located in northern and central Martinique (excluding rodents trapped in control zones) had liver residues of second-generation ARs that were significantly higher than those sites located in the South (Figure 3), while first generation ARs could be dosed only in 4 rodents trapped in sites in southern Martinique.

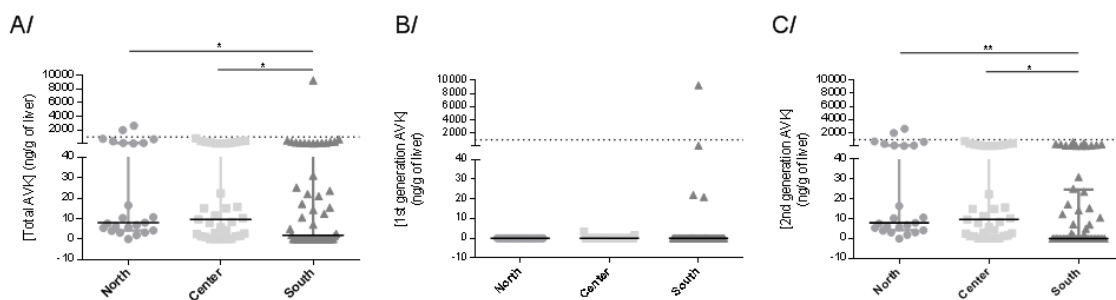


Figure 3. AR concentrations in liver of rodents trapped in the North, Center or South of Martinique Island. Concentrations of total (A), first generation (B), and second generation (C) ARs are presented.

Whether it was agricultural site or industrial site, residues of ARs were similar (result not shown), even if there were noticeable differences between agricultural sites, with highly treated sites such as sites 1 and 8 (significantly different from the control sites) and weakly treated sites such as site 13 (not significantly different from the control sites) (Figure 2A).

ARs residues were detected in *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* and *Mus musculus* (Figure 4). First generation ARs were detected in concentration higher than 5 ng/g only in liver of *Mus musculus*. Second generation AR were detected in all species but were significantly higher in liver of *Rattus rattus* than *Mus musculus*.

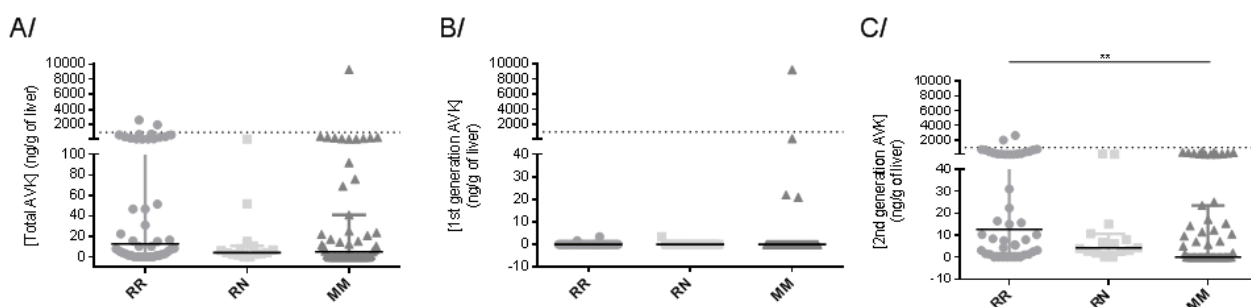


Figure 4. AR concentrations in liver of trapped *Rattus rattus* (RR), *Rattus norvegicus* (RN) and *Mus musculus* (MM). Concentrations of total (A), first generation (B), and second generation (C) ARs are presented.

Vkorc1 genotyping of trapped rodent populations

From the sampling, *Vkorc1* of 81 *Rattus rattus*, 55 *Mus musculus* and 16 *Rattus norvegicus* have been sequenced. From *Mus musculus*, all the sequences were exploitable. From *Rattus sp.*, only *Vkorc1* sequences of 61 *Rattus rattus* and 15 *Rattus norvegicus* were exploitable. 34 *Rattus rattus* presented no silent or missense mutation in the coding sequences of *Vkorc1* gene (*i.e.*, 55.7% of the sequenced samples from *Rattus rattus* species) and 4 presented missense mutations in the coding sequence (*i.e.*, 6.6% of the sequenced samples from *Rattus rattus* species). One *Rattus norvegicus* presented no silent or missense mutation in the coding sequences of *Vkorc1* gene, the others presented silent mutations. Only 21 *Mus musculus* presented no silent or missense mutation in the coding sequences of *Vkorc1* gene (*i.e.*, 38.2% of the sequenced samples from *Mus musculus* species) and 34 presented missense mutations (*i.e.*, 61.8% of the sequenced samples from *Mus musculus* species).

Among sequenced *Rattus rattus*, 6 different SNPs or mutations found either alone or in combination were detected including 3 silent mutations L94L (g.1087C>T), S120S (g.2005A>T), A143A (g.2083A>G) and 3 missense mutations H68N (g.1009C>A), A115T (g.1997G>A), Y129N (g.2039T>A). Allelic frequencies of the different genotypes are presented in Table 3 and locations of genotypes leading to protein mutations are presented in Figure 5.

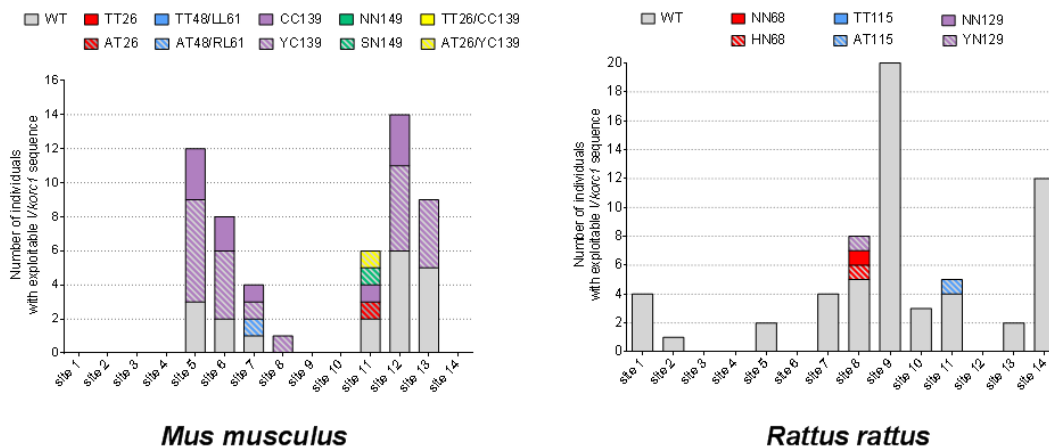


Figure 5. Distribution of Vkorc1 SNPs or mutations per site in trapped *Rattus rattus* and *Mus musculus*

Among sequenced *Rattus norvegicus*, only 1 silent mutation H68H (g.1140C>T) was detected with an allelic frequency of 93.3%. This silent mutation was found in sites 2, 3, 8, 9, 10, 11 and 13.

Among sequenced *Mus musculus*, 5 different SNPs or mutations found either alone or in combination were detected. All these mutations were missense mutations A26T (g.76G>A), A48T (g.142G>A), R61L(g.976G>T), Y139C(g.2223A>G) and S149N(g.2253G>A). Allelic frequencies of the different genotypes are presented in Table 3 and locations of genotypes leading to protein mutations are presented in Figure 5.

Table 3. *Vkorc1* genotypes found in rodents in Martinique Island

| Species | Nucleotide mutation | Protein mutation | Exon | Allelic frequency in rodents sampling |
|--------------------------|---------------------|------------------|------|---------------------------------------|
| <i>Mus musculus</i> | G76A | A26T | 1 | 0.9 |
| | G142A/G976T | A48T/R61L | 1/2 | 1.9 |
| | A2223G | Y139C | 3 | 39.6 |
| | G76A/A2223G | A26T/Y139C | 1/3 | 0.9 |
| | G2253A | S149N | 3 | 0.9 |
| <i>Rattus rattus</i> | C1009A | H68N | 2 | 2.6 |
| | C1087T | L94L | 2 | 18.1 |
| | G1997A | A115T | 3 | 0.9 |
| | A2005T | S120S | 3 | 1.7 |
| | T2039A | Y129N | 3 | 0.9 |
| | C1087T/A2083G | L94L/A143A | 2/3 | 6.0 |
| <i>Rattus norvegicus</i> | C1140T | H68H | 2 | 93.3 |

Functional consequences of VKORC1 mutations

To assess the consequences of VKORC1 mutations on the functional properties of VKORC1, unknown VKORC1 mutants were overexpressed as c-myc-fused proteins in *P. pastoris*; wild type VKORC1 of *Rattus sp.* or *Mus musculus* and some mutants (i.e., *MmVKORC1*-A26T and *MmVKORC1*-Y139C) having been previously characterized (Goulois et al, 2016, 2017, Hodroge et al, 2011). All proteins were efficiently expressed in *P. pastoris* with the same expected molecular mass of approximately 20-kDa. In order to compare the susceptibilities to ARs of VKORC1 mutants, their respective inhibition constants K_i towards various first

generation (i.e., warfarin, chlorophacinone) or second generation (i.e., bromadiolone, difenacoum, difethialone or brodifacoum) ARs were determined. AR concentrations necessary to inhibit the VKOR activity was different between mutants and between inhibitors. Results are presented in Figure 6 as a ratio between the K_i obtained for the mutated protein and the K_i obtained for the wild type protein, this ratio representing the resistance factor of the mutated protein. Previous results obtained for *MmVKORC1*-A26T and *MmVKORC1*-Y139C in previous studies have been added to allow the comparison.

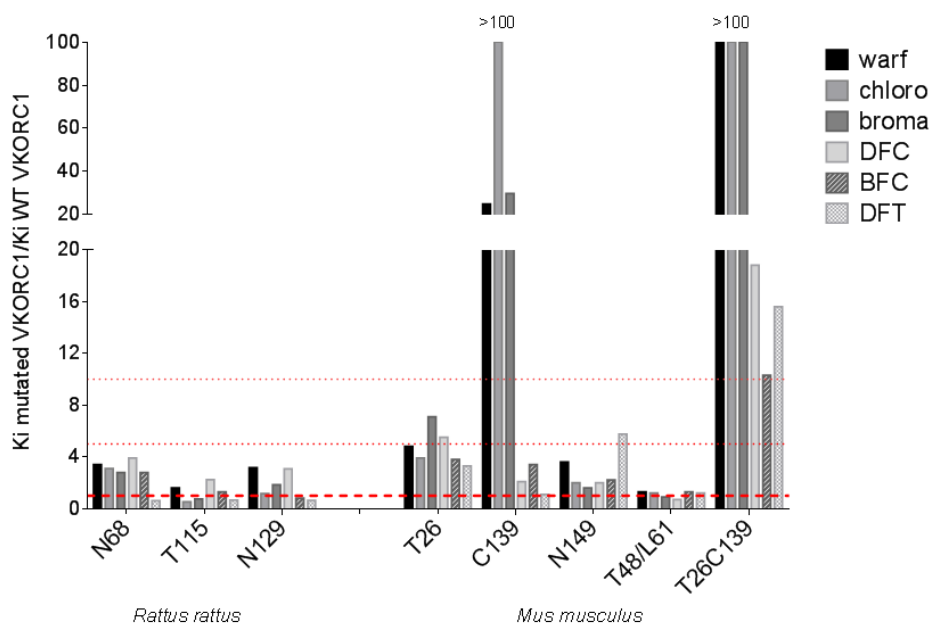


Figure 6. Resistance factors towards various ARs molecules of mutated VKORC1 detected in trapped rodents on Martinique Island.

DISCUSSION

This study is the first study reporting rodent resistance to ARs in Martinique. This finding is crucial to improve their management in this island where leptospirosis is an endemic disease so common with a very high number of human cases ranging from 13.9 cases per 100 000 inhabitants according to a study conducted between 2002 and 2008 (8) at 60.6 according to another study carried out in 2011 (9). Rodents play a central role in the transmission of leptospirosis because of their abundance, their promiscuity with humans and domestic animals, and their healthy carriage of pathogenic leptospire. This portage has been widely described in brown rats in the French West Indies, but it has been also reported in black rats and domestic

mice. Indeed, in Trinidad, 43% of brown rats, 16% of black rats and 29% of house mice have been reported to be seropositive; in Guadeloupe, 16.6% of brown rats, 36.8% of black rats and 57.1% of house mice have been reported to be seropositive (26,27). The management of these 3 species of rodents is therefore vital to limit leptospirosis in the French West Indies. This study aimed therefore to explore practices and effectiveness of rodent chemical treatments in Martinique.

The study aimed to be as representative as possible of the island with an important number of study sites (*i.e.*, 14 sites) distributed homogeneously on the island (*i.e.*, 5 sites in the North, 4 sites in the Center and 5 sites in the South), representing all the sectors of activity (*i.e.*, 2 industrial / commercial sites, 2 intensive breeding sites, 2 forest / natural areas, 8 agricultural areas of sugar cane, cassava, banana, sweet potatoes or chayotes), since rodents present and practices may be different depending on the sector. 206 rodents were captured in this study, this must be analyzed considering to the trapping effort. For this, the trap-success index, which reflects the population levels, has been calculated. This success trap, including all the sites and the 3 species of rodents is 10.06 rodents/100 trap nights. A recent study conducted in a Parisian park in which rats were known to be abundant as many visitors were reporting rat sightings at day time, pointed out a trap success between 0.32 and 1.58 (28). The population of rodents in Martinique would therefore be quite abundant, especially since all the sites except the control ones are sites on which rodent management is organized. Nevertheless, this seems variable from one site to another since the trapping effort was similar between sites, with surface differences being offset by the number of traps. Trap success was less than 2 rodents/100 trap nights in only 2 sites, the 2 sites with intensive livestock production. This low trap success may be due to food competition, it is thus difficult to conclude on the management methods implemented on these sites. Trap success was greater than 10 rodents/100 trap nights in 6 sites (*i.e.*, sites 2, 5, 6, 8, 9, 14), 2 corresponded to control forest areas for which no management was required and for which it was therefore not surprising to meet high populations, the other 4 corresponded to agricultural areas in which management measures are regularly organized. Poor practices, palatability problems, inefficiency of the baits could be thus suspected on these 4 agricultural sites.

In our study, brown rats, black rats, and house mice were trapped. These 3 species are therefore present in Martinique, nevertheless the black rat seems most abundant (*i.e.*, trap success of 6.3), then the domestic mouse (*i.e.*, trap success of 2.9), the brown rat population (*i.e.*, trap success of 0.9), being rather limited. Nevertheless, this distribution varies according to the site. Thus, in forest site, the black rat seems largely predominant. In industrial/commercial sites, the

domestic mouse seems to be the most common, but the number of sites remaining limited, larger studies would be required. In agricultural sites, this distribution seems more variable with sites where the black rat is predominant, sites where the domestic mouse is predominant and sites where the populations are mixed. Surprisingly, very few mice were trapped in the north of the island.

The management of brown rats, black rats and house mice in Martinique, as in the rest of the French West Indies, is largely based on the use of rodenticide anticoagulants. In our study, 54% of rodents were exposed to at least one AR molecule, 29% of which were exposed to more than 2 molecules, confirming this preferential use of ARs in rodent management and suggesting the use of several types of active ingredients on the same site. First- and second-generation AR were detected in rodents trapped in urban as well as agricultural sites. Second-generation molecules were most frequently detected (in the liver of 50% of rodents) while first-generation molecules were very rarely detected (in the liver of only 6% of rodents). Difenacoum was the most frequently detected molecule in 38% of rodents; nevertheless, hepatic concentrations were higher than 100 ng/g, threshold compatible with the death of the animal in only 7% of the cases. Bromadiolone, brodifacoum and difethialone were detected with similar respective frequencies of 15.5, 20 and 14.5%. This intense use of second-generation molecules in agricultural areas is surprising because French regulations provide for restricted use of ARs. According to the French regulation, ARs can be used as biocides - in and around the buildings for the control of the populations of commensal rodents - or as plant protection products - in field for the control of voles. Currently, 8 active ingredients are authorized as biocides (i.e., warfarin, coumatetralyl, chlorophacinone, bromadiolone, difenacoum, brodifacoum, difethialone, flocoumafen), whereas only bromadiolone is authorized for the control of voles. Nevertheless, because of the high leptospirosis risk, a collective management of brown rats, black rats and mice, subjected to a preliminary prefectural authorization, is organized every year by the FREDON in Martinique and foresees a wider use of the ARs in the cultures and Border Fields (www.martinique.pref.gouv.fr). This may explain this important detection of ARs in agricultural areas. Until now, ecotoxicity issues associated to the use of ARs have not been reported in Martinique.

Among the 14 trapping sites, some sites seem to use few or no rodenticide treatment (i.e., sites 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14) with a median for total ARs contents less than 10ng/g in liver of trapped rodents. Two of these are the control sites (i.e., sites 9 and 14) confirming the non-use of ARs in forest/natural areas; six are agricultural sites (i.e., sites 2, 5, 6, 7, 10 and 13) and correspond to sites in which rodent populations appear, not surprisingly, to be rather abundant

with a trap success greater than 8 rodents per 100 trap-nights, except for site 10; the last is an industrial/commercial site. Sites 1 and 3 seem to use frequently ARs treatment with a median hepatic concentration for total ARs greater than 600 ng/g. However, the rodent population on site 1 still seems abundant with a trap-success of 5 rodents for 100 trap-nights.

The intense use of ARs in Martinique is a factor that may favor the selection of resistant strains due to mutations of the *Vkorc1* gene. This resistance has been widely reported in Europe (29-33) but also worldwide, in brown rats and house mice and also more recently in black rats (24,34-36). This study demonstrates that resistance of rodents to ARs is present in Martinique. This resistance is evident for the house mouse with the detection of the Y139C mutation in Martinique. This mutation has been reported to induce a very strong resistance to first generation molecules and some second generation molecules such as bromadiolone (29). The allelic frequency of this mutation is 40% in our sampling with 10 homozygous and 21 heterozygous mice. This allelic frequency is much greater than that reported during the resistance study conducted recently in France (29). As this mutation is present on all mice trapping sites, the use of second-generation molecules is required to control mouse populations in Martinique. Nevertheless, these molecules must be used in a carefully way and by professionals informed of the risks related to their use. Moreover, their use could be conditioned by a preliminary genotyping to minimize any ecotoxicity problem.

Other mutations were detected in mice during this study. Some have already been described previously in Europe such as the mutation A26T (29), which confers moderate or no resistance to ARs. Others are detected for the first time such as the S149N mutation, which also confers very little resistance to the mice. These mutations were found with low allelic frequencies. Nevertheless, their presence on sites where the Y139C mutation is very frequently present is responsible for the emergence of a double mutant A26T/Y139C, which is certainly due to genetic recombination between mutated alleles. The emergence of double mutants has been described in France (29), but this specific double mutant is described for the first time. The emergence of double mutation confers an evident benefit for mice carrier of these double mutations compared to mice carrier of the corresponding single mutations (Fig. 7). While the single A26T or Y139C mutations lead to moderate or severe resistance to first generation ARs, the double mutations lead to resistance to all ARs currently available with resistance factors reaching levels higher than 10 towards difenacoum, brodifacoum and difethialone. Such levels of resistance to such molecules will certainly complicate mice management if double-mutants frequency becomes greater in a species largely associated with leptospirosis transmission (*L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*) to humans and domestic animals (37,38).

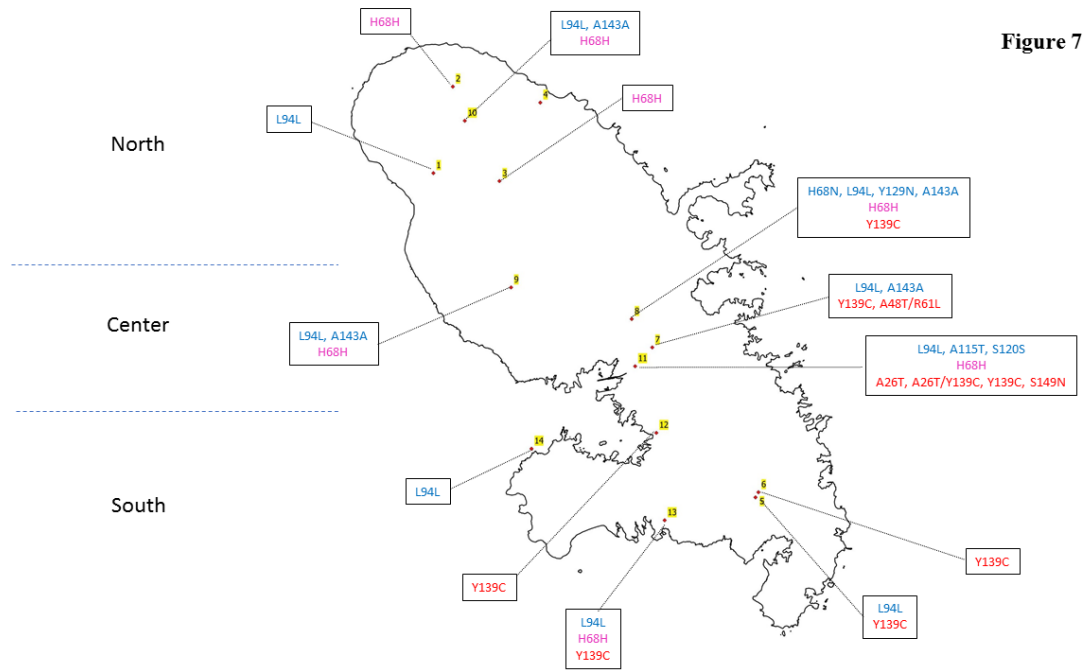


Figure 7. Sites of trapping in Martinique Island

Interestingly, another group of A48T/R61L mutations was also detected in an individual in the heterozygous state. These mutations have been described in the introgression of the *Spretus* mouse *Vkorc1* gene into the domestic mouse genome that has occurred in Europe (39). This introgression led to the introduction into the genome of the domestic mouse of a group of 4 R12W/A26S/A48T/R61L coding mutations resulting in a very strong resistance to first generation AR. In Europe, mice with this group of 4 mutations are very frequently detected, but also, mice with either one, two, or three of these mutations (29,39). Surprisingly only 2 of these 4 mutations were detected on the island of Martinique. The presence of these mutations in Martinique may be due either to point mutations of the *Vkorc1* gene or to the importation of introgressed domestic mice from Europe. This last hypothesis should be accompanied by the presence in Martinique of domestic mice with the group of 4 characteristic mutations of the *Spretus* mouse genome associated with a strong resistance to first generation AR.

For brown rats, no mutation of *Vkorc1* was found in our sample. As the brown rat population appeared to be limited in Martinique, our sampling included only 16 brown rats for which *Vkorc1* was sequenced and might not be sufficiently representative. Nevertheless, if mutations of *Vkorc1* are present in the brown rat, their frequency might be rather limited contrary to what has been described in Europe (30,31). The use of second-generation molecules that are certainly consumed in sufficient quantities by brown rats, in urban as in agricultural, has certainly allowed to avoid the selection of resistant alleles.

For black rats, only 3 coding mutations were detected in the *Vkorc1* gene in our sample, the H68N, A115T and S149N mutations. They had never been described in previous studies (24,34-36). These new mutations seem to induce moderate (resistance factor less than 4) or no resistance to neither the first-generation nor the second-generation molecules. Moreover, these mutations have been found only in the heterozygous state with very low allelic frequencies and never together on a single site. The black rats of Martinique therefore do not seem to present target resistance such as that described in the brown rat or the house mouse. Nevertheless, the black rat being frugivorous, they consume certainly baits in a very limited way. The low degree of resistance induced by the H68N, A115T and Y129N mutations could thus induce an inefficiency or limited efficiency of baits if present in the homozygous state. It is therefore essential to have correct treatment practices to avoid selecting these mutations and thus increasing their allelic frequency.

In conclusion, this study enables the first-time description of rodent resistance to ARs in French West Indies where leptospirosis is an endemic disease so prevalent. This resistance is clearly present with high frequency in house mouse, species which are more and more associated with leptospirosis transmission (*L. interrogans*, *L. kirshneri*, *L. borgpeterseni*) to humans and domestic animals (37,38). Mice management in Martinique should be carried out carefully to prevent diffusion of resistance to first and second generation ARs and to avoid selection/emergence of new *Vkorc1* mutants or double-mutants. In black rats, even if two new *Vkorc1* mutations have been reported in this study, target resistance to ARs does not currently seem an important issue for the management of this species in Martinique. Nevertheless, other resistance mechanisms to ARs due to metabolism modification (40-42) could exist and this study did not explore the presence and frequency of such mechanisms in rodents of Martinique.

METHODS

Ethics statement

This study is part of the integrated program of surveillance, prevention and control of leptospirosis developed by the Regional Health Agencies of Guadeloupe, Martinique and Guyana and the Interregional Epidemiology Unit Antilles-Guyana. Trappings were performed by FREDON Martinique. This study was not considered to be an “experimental procedure” as defined by the French legislation (Rural Code, Article R214–89) and was therefore not subject to an ethical committee approval in France. This study complied with the ethical standards of

European regulations governing the care and use of animals in research (Directive 2010/63/EU) and it did not involve any endangered or protected species, or protected areas.

Study area

This study took place in Martinique, a French island located in the Caribbean. Thirty percent of this island is cultivated. The north is composed of hills and a volcano and different types of crops (bananas, sugar cane, cassava, pineapple ...) are present. The center of the island is more urbanized. The south is tourist and composed of hills, savannas and different types of crops (Figure 7). Field investigations conducted by FREDON Martinique have identified areas where ARs have been intensively used (ARs sites) to control rodents and in which decreases or losses of efficiency have been reported. Eight agricultural areas (sugar cane, sweet potato, cassava, banana, christophine), 2 intensive breeding sites and 2 industrial and commercial zones were selected based on these investigations for this study. Furthermore, 2 control areas without any AR use (control sites) have been also selected (Table 1 and Figure 7). All of these sites were homogeneously distributed on Martinique Island (Central, South and North of Martinique).

Trapping methods

Trapping in Martinique began on April 13, 2015 and ended on November 27, 2015 (Table 1). For each site, the trapping time was systematically 5 consecutive days. Depending on the size of the sites, 22 to 65 trapping stations have been set up (Table 1). These stations were homogeneously and consistently distributed on each site. The trapping stations were 10 meters apart and located in places likely to be frequented by rodents (border plots, ecotones, rivers, around livestock buildings, forest trails ...). Each station included a Manufrance rat trap and an INRA trap for mice. Manufrance rat trap were baited with peanut butter, oat flakes and sardine oil, checked daily and re-baited, if necessary.

The captured rodents were killed at the trapping site, morphologically identified (*i.e.*, *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* or *Mus musculus*), housed in an individual referenced bag and placed in a cooler with ice buns for the transport. Rodents were then kept at -20°C until the day before their autopsy. For each rodent, a piece of tail for sequencing (1 cm maximum) and the liver to quantify ARs residues were taken and stored respectively in 70% ethanol at 4°C and at -20°C until sent to the laboratory.

Rodent species identification

Species of trapped rodents were identified by morphologic aspects during autopsy. Trapped animals were molecularly confirmed to be *Mus musculus domesticus*, *Rattus rattus* or *Rattus norvegicus* by sequencing a portion of the mtDNA *cytochrome b* gene. Briefly, genomic DNA was extracted from liver using silica columns (Macherey Nagel) according to the manufacturer's recommendations. Two microliters of genomic DNA were amplified by PCR using specific primers of *cytochrome b* (43). The sequence of the sense primer cytb-S and the antisense primer cytb-AS were respectively (5'-TCTCCATTTCTGGTTTACAAGAC-3') and (5'-AACAATGACATGAAAAATCATCG TT-3'). *Cytochrome b* amplification was performed using cytb-S and cytb-AS (10 pmol), GoTaq polymerase (1 unit, Promega) in a 25 µl reaction volume containing 2 µl DNA, 5 µl 5X GoTaq buffer and 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate. The amplification was performed at 94°C for 3 min followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, 72°C for 90 s, and a final extension step at 72°C for 10 min. The amplified product was sequenced on both strands; the resulting sequence was submitted to blast analysis.

Vkorc1 genotyping

Genomic DNA was amplified using specific primers of *vkorc1* gene. In order to sequence the totality of the *vkorc1* gene, two sets of primers were systematically used for rats (*Rattus rattus* and *Rattus norvegicus*) and for mice (*Mus musculus domesticus*). The sequences of the first primer set VKOR-F1 and VKOR-R1 were (5'-GATTCTTCCCTCCTGTCC-3') and (5'-AGACCCTGTCTCAAAACCTA-3') for mice (29) and (5'-GGTTCTTCCCTCTTGTGTCTG-3') and (5'-GGGTCACCAAGACATGAGGTG-3') for rats (34). They were used to amplify exon 1 and exon 2 of *vkorc1* gene. The sequences of the second primer set VKORC1-F2 and VKORC1-R2 were (5'-GAAAGCAGAACACTTAGCAGG-3') and (5'-AACCAACAGCAGAATGCAGCC-3') for mice (Goulois et al, 2017, Ecol Evol) and (5'-ACTTGGGCAAGGCTCATGTG-3') and (5'-AAGAGTAGGGGACAAGGTGGC-3') for rats (34). They were used to amplify exon 2 and exon 3 of *vkorc1* gene. PCR were performed using set1 or set2 of primers according to species (10 pmol), Accuprime polymerase (1 unit, Invitrogen) in a 25 µl reaction volume containing 2 µl DNA, 2.5 µl 10X Accuprime buffer and 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate. The amplification was performed at 94°C for 3 min followed by 40 cycles at 94°C for 20 s, 64°C (for mouse) or 62°C (for rat) for 20 s, 68°C for 50 s, and a final extension step at 68°C for 10 min. The amplified products were sequenced on both strands. Obtained sequences were subsequently compared with the published *vkorc1* gene sequences for *Mus Musculus*

domesticus (Genbank n°GQ905710.1), *Rattus norvegicus* (Genbank n°CM000231.2) and *Rattus rattus* (Genbank n°AB702679.1).

Heterologous expression of new VKORC1 mutants

Construction of Mm VKorc1 or RrVKORC1 mutants was carried out using pPICZ-RrVKORC1 (34) or pPICZ-MmVKORC1 (29) as template with the Quickchange site directed mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's recommendations. Mutants were checked by sequencing and was thus expressed in *P. pastoris*. Recombinant wild type and mutant VKORC1 proteins were expressed in *Pichia pastoris* as described previously by Hodroge et al (19,44). Yeast microsomes were prepared from thawed yeast cells by differential centrifugation, as described previously (19,44). Protein concentrations were evaluated by the method of Bradford (45) using bovine serum albumin as a standard. Microsomes were frozen at -80 °C and used for kinetic analysis and immunoblot analysis.

Assays of VKORC1 mutant activities and kinetics

Microsomal VKOR activity was assayed as described previously (19,29,34,44). Standard reactions were performed in 200 mmol/L Hepes buffer (pH 7.4) containing 150 mmol/L KCl, 1 mmol/L dithiothreitol, and 1g/L of total proteins. The reaction was started by the addition of vit K₁>0 solution in 1% Triton X-100 and incubated at 37° C for 30 min. In these conditions, the reaction was linear according to the time of incubation and the quantity of incubated proteins. After incubation at 37° C for 30 min, the reaction was stopped by adding of 2 ml of isopropanol. After centrifugation at 3,000 g for 10 min, 2 ml of hexane were added. After centrifugation at 3,000 g for 10 min, the hexane layer was removed and dried under nitrogen. The dry residue was immediately dissolved in 0.2 ml of methanol, and reaction product was analysed by liquid chromatography-mass spectrometry.

Determination of AR concentrations in liver

Solid-Liquid Extraction (SLE) was used to extract ARs from liver of rats. 0.50(±0.01) g of liver was weighed and homogenized with 10mL of acetone using an UltraTurax. The mixture was centrifuged at 3000rpm for 5min. The liquid part was evaporated to dryness at 40°C under a gentle stream of nitrogen. The residues were reconstituted in 1mL of acetonitrile and washed twice with 1mL of hexane to discard the lipids. The remaining acetonitrile phase was evaporated to dryness in the same way as above. The residues were reconstituted with 200µL of acetonitrile, and filtered through a 0.2µm filter (Phenomenex, Torrance, CA, USA). AR

residues analysis was carried out by using the LC-MS/MS method previously described (46). The ARs analysed with this method were three first generation ARs: warfarin, coumatetralyl, chlorophacinone and five second generation ARs potentially used in European countries: bromadiolone, difenacoum, brodifacoum, flocoumafen and difethialone. The chromatographic separation was achieved with a semi-porous Poroshell 120 StableBond C18 column (2.1*100mm, 2.7 μ m) and MS/MS detection was carried out by a 6410B Triple Quadrupole from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipped with ElectroSpray Ionization source in negative mode. Two fragment ions were recorded in dynamic Multiple Reaction Monitoring mode for each analyte. Limit of quantification was between 1 and 2 ng/g wet weight.

Data analysis

A night trap effort (*i.e.*, number of traps used \times number of nights of trapping) was calculated for each site. Trap success (number of trapped rodents/trap effort \times 100) was calculated to evaluate relative rodent abundance on each site using the index described by Theuerkauf et al (2011) (47).

K_m and K_i values were obtained from at least three separate experiments performed on two different batches of protein. Estimation of K_m values was achieved by the incubation of at least nine different concentrations of vit K $>$ 0 (from 0.003 to 0.2 mmol/L) to the standard reaction. Incubations were performed in duplicate. Data were fitted by nonlinear regression to the Michaelis-Menten model using the R-fit program. In order to evaluate the inhibiting effect of ARs on VKOR activity, K_i were determined after addition of various concentrations of AR to the standard reaction in the presence of increasing amounts of vit K $>$ 0 (from 0.003 to 0.2 mmol/L) using anticoagulant concentrations from about 0.05 to 20 \times K_i . Data were fitted by nonlinear regression to the noncompetitive inhibition model $v = (V_{max}/(1+(I/K_i))) * (S/(K_m + S))$ using the R-fit program.

Statistical analyses were performed using R v.3.2.2. Owing to the distribution of our data, which did not follow a normal distribution, non-parametrical tests were performed. To compare two or more than two different groups, a Mann-Whitney or a Kruskal-Wallis test was performed and the level of significance was set to 0.05.

REFERENCES

1. Levett, P.N. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. **14**, 296–326 (2001).

2. Adler, B. & de la Peña Moctezuma, A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.* **140**, 287–296 (2010).
3. Costa, F., et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**: e0003898 (2015).
4. Hochedez, P., et al. Factors Associated with Severe Leptospirosis, Martinique, 2010–2013. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 2221–2224 (2015).
5. Herrmann-Storck, C., et al. Severe Leptospirosis in Hospitalized Patients, Guadeloupe. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 331–334 (2010).
6. Haake, D.A. & Levett, P.N. Leptospirosis in Humans. In: Adler B, editor. *Leptospira and Leptospirosis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; p. 65–97. (Current Topics in Microbiology and Immunology). Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5 (2015).
7. Gravekamp, C., et al. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1691–1700 (1993).
8. Rapports d'activité du CNR de la Leptospirose [Internet]. Institut Pasteur. Available from: <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/leptospirose/rapports-d-activite> (2016)
9. Cassadou, S., et al. Underestimation of Leptospirosis Incidence in the French West Indies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004668 (2016).
10. Hochedez, P., et al. Outbreak of Leptospirosis after a Race in the Tropical Forest of Martinique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **84**, 621–626 (2011).
11. Hochedez, P., et al. Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011. *Eurosurveillance.* **18**, 20472 (2013).
12. Stritof Majetic, Z., et al. Epizootiological survey of small mammals as *Leptospira* spp. reservoirs in Eastern Croatia. *Acta. Trop.* **131**, 111–116 (2014).
13. Ayral, F. Vers une surveillance des zoonoses associées aux rats (*Rattus norvegicus*) [Internet] [thesis]. Grenoble Alpes; Available from: <http://www.theses.fr/2015GREAS004> (2015)

14. Suttie, J.W. Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 459–477 (1985).
15. Furie, B. & Furie, B.C. The molecular basis of blood coagulation. *Cell.* **53**, 505–518 (1988).
16. Boyle, C.M. Case of Apparent Resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to Anticoagulant Poisons. *Nature.* **188**, 517 (1960).
17. Dodsworth, E. Mice are spreading despite such poisons as warfarin. *Minic. Engin. Lond.* **3746**, 1668 (1961).
18. Grandemange, A., Kohn, M.H., Lasseur, R., Longin-Sauvageon, C., Berny, P. & Benoit, E. Consequences of the Y139F *Vkorc1* mutation on resistance to AVKs: in-vivo investigation in a 7th generation of congenic Y139F strain of rats. *Pharmacogenet. Genomics.* **19**, 742–750 (2009).
19. Hodroge, A., Longin-Sauvageon, C., Fourel, I., Benoit, E. & Lattard, V. Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat *VKORC1* involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch. Biochem. Biophys.* **515**, 14–20 (2011).
20. Pelz, H-J. The Genetic Basis of Resistance to Anticoagulants in Rodents. *Genetics.* **170**, 1839–1847 (2005).
21. Rost, S., et al. Mutations in *VKORC1* cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature.* **427**, 537–541 (2004).
22. Jackson, W.B. & Kaukeinen, D. Resistance of wild Norway rats in North Carolina to warfarin rodenticide. *Science.* **176**, 1343–1344 (1972).
23. Siddiq, Z. & Blaine, W.D. Anticoagulant resistance in house mice in Toronto, Canada. *Environ. Health. Rev.* **2**, 49–51 (1982).
24. Tanaka, K.D., et al. The genetic mechanisms of warfarin resistance in *Rattus rattus* found in the wild in Japan. *Pestic. Biochem. Physiol.* **103**, 144–151 (2012).
25. Saunders, G.R. Resistance to warfarin in the roof rat in Sydney, NSW. *Search.* **9**, 39–40 (1978).
26. Desvars, A., Cardinale, E. & Michault, A. Animal leptospirosis in small tropical areas. **139**, 167 (2011).

27. Bourhy, P., et al. Serovar Diversity of Pathogenic *Leptospira* Circulating in the French West Indies. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* **14**, 7 (2013).
28. Desvars-Larrive, A., et al. Population genetics, community of parasites, and resistance to rodenticides in an urban brown rat (*Rattus norvegicus*) population. *PloS One.* **12**, e0184015 (2017).
29. Goulois, J., Lambert, V., Legros, L., Benoit, E. & Lattard, V. Adaptative evolution of the *Vkorc1* gene in *Mus musculus domesticus* is influenced by the selective pressure of anticoagulant rodenticides. *Ecol. Evol.* **7**, 2767-2776 (2017).
30. Pelz, H-J., et al. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics.* **170**, 1839–1847 (2005).
31. Grandemange, A., Lasseur, R., Longin-Sauvageon, C., Benoit, E. & Berny P. Distribution of VKORC1 single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. *Pest. Manag. Sci.* **66**, 270–276 (2010).
32. Buckle, A.P., Klemann, N. & Prescott, C.V. Brodifacoum is effective against Norway rats (*Rattus norvegicus*) in a tyrosine139cysteine focus of anticoagulant resistance in Westphalia, Germany. *Pest. Manag. Sci.* **68**, 1579–1585 (2012).
33. Meerburg, B.G, van Gent-Pelzer, M.P., Schoelitsz, B. & Van der Lee, T.A. Distribution of anticoagulant rodenticide resistance in *Rattus norvegicus* in the Netherlands according to *Vkorc1* mutations. *Pest. Manag. Sci.* **70**, 1761–1766 (2014).
34. Goulois, J., et al. Study of the efficiency of anticoagulant rodenticides to control *Mus musculus domesticus* introgressed with *Mus spretus* *Vkorc1*. *Pest. Manag. Sci.* **73**, 325-331 (2017).
35. Díaz, J.C., Song, Y., Moore, A., Borchert, J.N. & Kohn, M.H. Analysis of *vkorc1* polymorphisms in Norway rats using the roof rat as outgroup. *BMC Genet.* **11**, 43 (2010).
36. Cowan, P.E., Gleeson, D.M., Howitt, R.L., Ramón-Laca, A., Esther, A. & Pelz, H-J. *Vkorc1* sequencing suggests anticoagulant resistance in rats in New Zealand. *Pest. Manag. Sci.* **73**, 262–266 (2017).
37. Moseley, M., Rahelinirina, S., Rajerison, M., Garin, B., Piertney, S. & Telfer, S. Mixed leptospira infections in a diverse reservoir host community, Madagascar, 2013–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 1138–1140 (2018).

38. Marquez, A., Olivieri, T., Benoit, E., Kodjo, A. & Lattard, V. House mice as a real sanitary threat for human and animal leptospirosis: proposal for integrated management. *Biomed. Res. Intern.* (In Press).
39. Song, Y., et al. Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between old world mice., Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between old world mice. *Curr. Biol.* **21**, R581-583 (2011).
40. Sugano, S., et al. Suppression of CYP3A2 mRNA expression in the warfarin-resistant roof rat, *Rattus rattus*: possible involvement of cytochrome P450 in the warfarin resistance mechanism. *Xenobiotica.* **31**, 399–407 (2001).
41. Ishizuka, M., et al. Elevated Warfarin Metabolism in Warfarin-Resistant Roof Rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. *Drug. Metab. Dispos.***35**, 62–66 (2007).
42. Boitet, M., Hamed, A., Chatron, N., Debaux, J.V., Benoit, E. & Lattard, V. Elevated difenacoum metabolism involved in the difenacoum-resistant phenotype observed in Berkshire rats homozygous for the L120Q mutation in *Vkorc1* gene. *Pest. Manag. Sci.* **74**, 1328-1334 (2017).
43. Pagès, M., et al. Revisiting the taxonomy of the Rattini tribe: a phylogeny-based delimitation of species boundaries. *BMC Evol. Biol.* **10** :184 (2010).
44. Hodroge, A., et al. VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 2535–2543 (2012).
45. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
46. Fourel,, I., Damin-Pernik, M., Benoit, E. & Lattard, V. Core-shell LC-MS/MS method for quantification of second generation anticoagulant rodenticides diastereoisomers in rat liver in relationship with exposure of wild rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **1041-1042**:120-132 (2017).
47. Theuerkauf, J., Rouys, S., Jourdan, H. & Gula, R. Efficiency of a New Reverse-Bait Trigger Snap Trap for Invasive Rats and a New Standardised Abundance Index. *Ann. Zool. Fenn.* **48**, 308–318 (2011).

DISCUSSION GENERALE DE LA THESE

I. Les dangers liés aux rongeurs

1. Dangers sanitaires

Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes intéressés au portage leptospirosique chez les rongeurs, même si ces derniers peuvent être porteurs de nombreux autres pathogènes. Ils sont notamment porteurs de plus de 40 pathogènes zoonotiques (110), soit directement dans leurs organismes comme pour les Hantavirus (114) ou les leptospires (28) soit par l'intermédiaire de parasites comme pour la bactérie *Yersinia pestis* responsable de la peste, transmise par les puces *Xenopsylla cheopsis* (110). Néanmoins, la leptospirose est certainement le problème sanitaire principal lié aux rongeurs en France métropolitaine et dans les territoires d'Outre-mer dans lesquels le nombre de cas annuel peut aller jusqu'à 50 cas pour 100000 habitants. En Europe, la leptospirose constitue également un problème sanitaire majeur. Une étude par screening moléculaire et sérologique réalisée en Autriche a ainsi montré que les leptospires pathogènes étaient les bactéries les plus retrouvées chez les rongeurs (161). Dans le monde, environ 1 million de nouveaux cas sont déclarés par an selon l'OMS et le nombre de cas est en augmentation chaque année alors que l'incidence réelle de la maladie est certainement sous-estimée en raison notamment de la grande diversité de symptômes possibles. Le taux de mortalité peut être élevé allant de 10% à 50% dans certains cas avec des complications pulmonaires. Le portage leptospirosique a donc été choisi dans ce travail comme indicateur du danger sanitaire lié aux rongeurs.

De nombreuses espèces de rongeurs, en particulier les rats, sont impliqués dans le cycle de transmission de la leptospirose (28). Ils peuvent être porteurs chroniques ou accidentels de leptospires pathogènes. Parmi les espèces étudiées dans cette thèse, le portage de leptospires chez le rat brun avait déjà été largement décrit dans de nombreuses études à travers le monde (28,79). Chez le campagnol des champs (108) et la souris domestique (162), peu de données à travers le monde étaient publiées. Chez le campagnol terrestre aucune étude n'avait été publiée au début de nos travaux. Les espèces de rongeurs que nous avons étudiées dans ce travail sont à priori toutes réservoirs excepté le campagnol terrestre pour lequel aucune donnée n'est disponible. Les niveaux de contamination de ces rongeurs pouvant dépendre de la région

analysée, ils pourraient être considérés comme sentinelle de la prévalence de la leptospirose dans une région donnée.

Deux classifications des leptospires sont actuellement disponibles, l'une sérologique, l'autre génétique. La première, la plus ancienne, basée sur la structure des lipopolysaccharides de surface et les anticorps anti-leptospires, est complexe voire impossible à mettre en œuvre chez le rongeur réservoir (celui-ci, tolérant à l'infection, présente une réaction immunitaire de bas niveau voire nulle) et imprécise du fait de l'existence de nombreuses réactions sérologiques croisées. Pour évaluer le danger leptospirosique lié aux rongeurs en France, nous avons donc privilégié l'utilisation des outils moléculaires, permettant de détecter, d'identifier les espèces et même les géovars portés par les rongeurs en France. Différents outils moléculaires ont été développés par les différentes équipes à travers le monde (163). Dans cette étude, la détection et l'identification des espèces de leptospires ont été réalisées par amplification d'un fragment de l'ARN ribosomal 16S par PCR. Cette technique nous a ainsi permis d'identifier chez les rongeurs, les individus porteurs de leptospires pathogènes. En effet, le genre *Leptospira* regroupe 22 espèces génomiques distinctes réparties en 3 groupes d'espèces (pathogènes, saprophytes, intermédiaires) (28). Chez le campagnol terrestre, les 3 espèces de leptospires pathogènes les plus fréquemment rencontrées en France, *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri* et *L. interrogans* ont été détectées durant cette étude. Chez le campagnol des champs et la souris domestique, seules les espèces *L. interrogans* et *L. kirschneri* ont été mises en évidence. Néanmoins nos échantillonnages de campagnols des champs et de souris étaient limités en nombre et en sites et n'ont peut-être pas permis la mise en évidence de toutes les espèces portées par ces rongeurs. Afin d'identifier le géovar de ces espèces, plusieurs techniques sont possibles. Lors de cette étude, 2 techniques ont été utilisées, la technique MST basée sur le séquençage de 3 régions intergéniques dont des mutations ponctuelles permettent de différencier les géovars de l'espèce *interrogans* (164). La MST a permis de mettre en évidence la présence du sérovar *Icterohaemorrhagiae* chez la souris domestique dans un élevage localisé dans le département de la Loire. Le sérovar *Icterohaemorrhagiae* est le sérovar le plus fréquemment impliqué dans la leptospirose humaine (28), suggérant éventuellement un rôle de la souris domestique dans la transmission à l'homme, bien que le portage chez le rat brun soit également largement impliqué (88). La technique MST n'ayant hélas pas encore été validée pour les autres espèces de leptospires, la technique VNTR basée sur la détermination du nombre de répétitions de courtes séquences au sein de 3 différentes régions géniques a également été utilisée (165) pour identifier les géovars chez la souris, le campagnol terrestre et le campagnol

des champs. Cette technique a permis de caractériser partiellement chez la souris le sérovar *Grippytyphosa*, également largement décrit dans la leptospirose humaine. La technique VNTR a permis d'identifier chez les campagnols terrestres et des champs 2 nouveaux profils qui n'ont jusqu'à présent jamais été décrits. Les profils VNTR actuellement disponibles et publiés sont des profils de souches retrouvées essentiellement chez l'homme ou chez le rat. L'identification de nouveaux profils chez les campagnols n'est donc pas réellement surprenante. Une des souches était relativement ubiquiste et retrouvée sur un très grand nombre de parcelles et donc de colonies de campagnols. L'autre souche n'a été retrouvée que sur une parcelle dans laquelle l'autre souche n'était curieusement pas présente, suggérant une absence d'échange entre les colonies.

Nos travaux ont permis de confirmer chez certaines espèces et démontrer pour d'autres, le danger leptospirosique associé à la pullulation de populations de campagnols terrestres, de campagnols des champs et de souris en France. Puisque la présence des espèces *L. borgpetersenii*, *L. kirschneri* et *L. interrogans* a été montré chez ces 3 espèces de rongeurs, ces derniers pourraient jouer un rôle dans la transmission de leptospires à l'homme et à l'animal domestique. Chez l'homme, les sérogroupes les plus fréquemment retrouvés sont par ordre décroissant, *Icterohaemorrhagiae*, *Grippytyphosa*, *Canicola*, *Australis* et *Sejroe*, les 2 premiers ayant été détectés chez la souris et les campagnols. Chez les animaux domestiques, les sérogroupes les plus fréquents sont par ordre décroissant, *Australis*, *Sejroe*, *Icterohaemorrhagiae* et *Grippytyphosa*.

Il est par ailleurs important d'observer qu'aucune des souris capturées dans l'exploitation étudiée dans la Loire n'hébergeait le sérovar Hardjo, confirmant l'hypothèse selon laquelle le bovin serait l'hôte préférentiel de ce sérovar. Cette observation conduit légitimement à s'interroger sur l'incapacité réelle de ces rongeurs à se comporter comme réservoir de sérovares autres que ceux mentionnés dans la littérature ou identifiés au cours de ce travail et ouvre des perspectives intéressantes d'études expérimentales au cours desquelles des co-infections pourraient être réalisées sur un type ou un autre de rongeur. Ce type de données pourrait être utile dans la gestion du risque sanitaire associé à tel type de petit rongeur.

2. Dangers économiques

Les dangers sanitaires ne sont pas les seuls dangers associés à une pullulation de rongeurs. Ces derniers posent également de nombreux problèmes économiques. En effet, leur comportement

invasif fait qu'ils peuvent se développer de manière opportuniste dans de nombreux écosystèmes. Les effectifs des populations peuvent grandir rapidement entraînant des dégâts importants. Au niveau de cultures diverses (bananes et riz par exemple) par exemple dans les îles tropicales, les rongeurs commensaux comme les rats et les souris entraînent des pertes économiques importantes (110). En France métropolitaine, les dégâts occasionnés par les campagnols des champs et campagnols terrestres dans les champs cultivés et pâturés en Auvergne et en Franche Comté entraînent des pertes financières importantes pour les agriculteurs. Ces pertes économiques, comme celles observées en 2015 dans le Massif Central sont telles que des exploitations agricoles ont été arrêtées et que des manifestations d'agriculteurs ont été observées dans le Cantal. Ces manifestations revendiquaient des aides mais reflétaient aussi un désespoir dramatique des agriculteurs. L'incidence des dégâts est fortement cyclique (110), ce qui est la conséquence de nombreux facteurs environnementaux mais également des cycles de vie des campagnols avec des cycles de pullulations de l'ordre de 5 ans.

Ce sont ces pertes économiques qui ont initialement motivées l'initiation de ce travail qui avait pour but de réfléchir sur une amélioration de la gestion des rongeurs, en particulier des campagnols terrestres. Néanmoins la décision de gérer les populations de rongeurs doit être prise en considérant l'ensemble des paramètres au sein d'un écosystème, les dangers sanitaires, les dangers économiques et les dangers environnementaux.

3. Dangers environnementaux

Les rongeurs ont des impacts environnementaux, quand ils sont dans des écosystèmes où ils sont en compétition avec des espèces endémiques. Trois espèces commensales de l'Homme ont pu se disperser dans le monde et cela particulièrement en voyageant dans les bateaux durant la période des Grandes découvertes, provoquant ainsi des dommages aux espèces locales (166). Il s'agit de l'espèce du rat brun, du rat noir et de la souris domestique auxquelles nous pouvons ajouter le rat polynésien (*Rattus exulans*) dans le Pacifique. Après l'arrivée de rats noirs sur l'île Lord Howe en 1918, dans les dix années qui suivirent plus de 40% des espèces d'oiseaux terrestres de l'île dont le rhipidure à collier (*Rhipidura fuliginosa*) endémique de l'île ont disparu (167). Il y a eu des observations similaires sur les Îles Midway (1943) et la Grande île du cap Sud (1962). Les rats bruns et noirs ont un fort impact négatif sur des espèces d'oiseaux car ils mangent leurs œufs sur les îles Galapagos (galapagos.org et

galapagosconservation.org.uk) et les îles Lavezzi (oncfs.gouv.fr et cen-corse.org). Les programmes de sauvegarde d'espèces insulaires passent par l'éradication de ces rongeurs nuisibles, par exemple par utilisation de rodenticides anticoagulants comme le brodifacoum qui est le seul à avoir une homologation par pulvérisation par avion (166). Cela a fonctionné sur l'île de Lundy au Royaume Uni où l'éradication de rats bruns a pu faire augmenter des populations de Puffin des Anglais et de Macareux moine (BBC Devon et RSPB). Mais les espèces endémiques ne sont pas les seules concernées. En effet il y a de la compétition entre les rats bruns et les rats noirs. Les rats noirs, qui étaient présents dans de nombreuses zones dans le monde, ont eu leur aire de répartition qui a diminué par effet de compétition avec les rats bruns. Ainsi, en France jusqu'au début du 18^{ème} siècle, on ne trouvait que des rats noirs. Maintenant ceux-ci sont retrouvés essentiellement dans le sud de la France et en Bretagne et les zones portuaires. Dans tout le reste du territoire, l'essentiel des rats appartient à la famille des rats bruns.

II) Problématique de l'exposition aux rongeurs, les risques liés aux rongeurs

1. La notion de risque

Les dangers cités précédemment n'existent dans un endroit particulier seulement si la présence de populations de rongeurs est avérée. Deux solutions sont possibles pour limiter cette exposition, soit en les éloignant de la zone où ils sont installés, soit en éliminant les populations présentes. La notion de risque étant le danger multiplié par l'exposition, un danger auquel on n'est pas exposé n'est pas un risque. Gérer les populations de rongeurs correspond donc à gérer les risques liés aux rongeurs.

Dans la notion d'exposition au danger, il y a un paramètre important à prendre en compte, il s'agit de la perception du risque qui passe par un aspect sociétal. Pour des raisons de représentations mentales, la souris (Jerry la souris du dessin animé « Tom et Jerry » est particulièrement sympathique) est ressentie comme moins dangereuse que le rat. Le risque lié à la présence d'une population abondante de souris peut alors être sous-estimé. En effet, les souris vivent souvent bien plus à proximité des humains que les rats, les risques de transmission de maladies par les souris sont de ce fait plus importants. Il est probable que pour des raisons

symétriques, les risques liés aux rats à Paris soient perçus particulièrement négativement. Il est donc essentiel d'évaluer le risque de façon objective.

La gestion des rongeurs est confrontée à différents courants de pensées comme les antispécistes et les végans qui ont une vision de la place de l'animal dans la société différente. Les tenants de ces courants de pensées considèrent que les rongeurs sont des habitants comme les autres de nos villes et qu'il n'est pas envisageable de chercher à gérer leurs populations, la dératisation étant considérée par ces groupes comme un « génocide » (voir Pétition contre la mairie de Paris « Stoppez le génocide des rats à Paris » l'Express décembre 2016). La perception du risque, par les tenants de ces groupes de pensée ne peut être objective.

La société est peu favorable à la chimie et nous pouvons le voir avec le développement du « Bio ». Dans cette mesure l'usage des raticides est redouté et est perçu comme particulièrement dangereux.

Évaluer le risque lié aux populations de rongeurs est une notion scientifique, mais la perception sociale subjective de ce risque peut être un déterminant de la gestion. En effet, il est difficile pour les personnes devant décider de la mise en place de la gestion de s'affranchir de leurs perceptions du risque mais surtout de la perception sociale du risque et de n'utiliser que des bases scientifiques pour mettre en place un plan de gestion.

L'évaluation du risque passe donc par l'évaluation des populations de rongeurs. L'observation des dégâts, des déjections, des signes de vie de ces espèces est souvent difficile. L'évaluation des populations passe essentiellement par le nombre d'individus observés par le public et les plaintes déposées auprès des services municipaux. Peu d'études basées sur un comptage des rongeurs sont disponibles et en particulier sur les rongeurs en milieu urbain.

III) Gestion de population de rongeurs

1. Une boîte à outils complexe

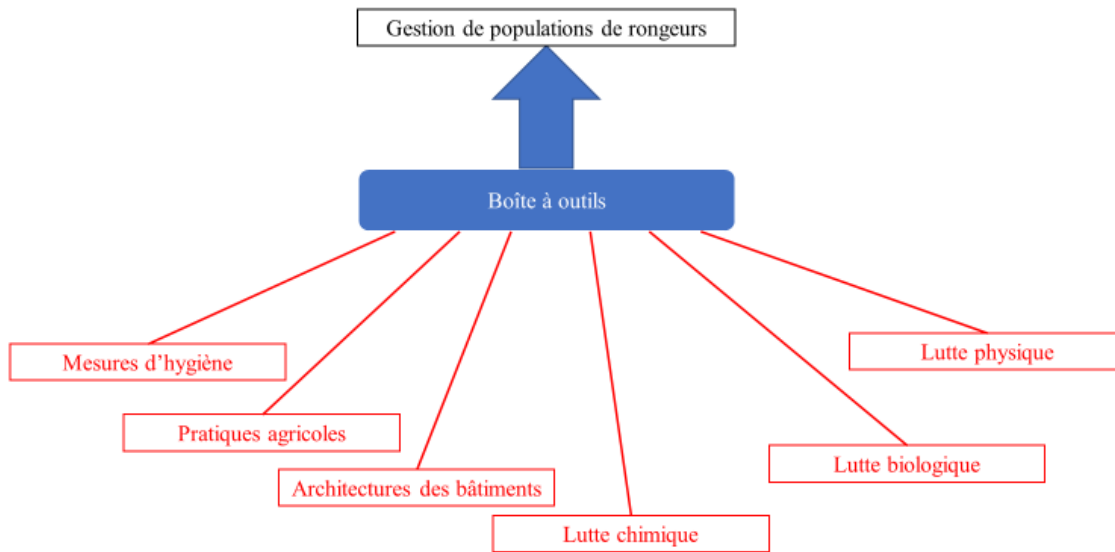


Figure 34. Présentation des moyens de gestion de populations de rongeurs

La gestion de populations de rongeurs regroupe plusieurs moyens (Figure 1). Il peut y avoir des mesures de prévention permettant de limiter l'installation de rongeurs. Cela passe par des mesures d'hygiène strictes comme mettre la nourriture dans des conteneurs hermétiques et ne pas laisser de déchets à l'air libre. Des mesures en agriculture existent concernant le travail du sol visant à limiter l'installation et la prolifération de rongeurs comme les campagnols des champs et les campagnols terrestres par exemple. L'architecture des bâtiments peut être faite de façon à limiter les passages de rongeurs comme en bouchant les trous dans les murs. Il faut rendre la zone peu favorable à l'installation des rongeurs ou à leur prolifération en ne leur apportant pas de nourriture ni de lieux pour nicher. Il y a également des moyens de lutte quand des populations de rongeurs sont installées. La lutte chimique se base sur l'utilisation de diverses sortes de molécules soit à action immédiate soit à action différée. La lutte biologique passe par la favorisation de la prédation des rongeurs en installant des haies ou des nichoirs à rapaces. La lutte physique se fait avec différents types de pièges. Pour optimiser l'efficacité des moyens de gestion plusieurs méthodes peuvent être utilisées en simultanément.

2. La gestion chimique des rongeurs : des dangers supplémentaires ?

La gestion des populations de rongeurs par la lutte chimique implique des dangers d'écotoxicité, de toxicité primaire et secondaire ainsi que de résistance aux molécules utilisées. L'écotoxicité

est liée aux résidus de molécules présents dans les foies des cadavres de rongeurs. La toxicité primaire concerne la faune non-cible domestique comme les chiens qui mangent « tout » et sauvage comme les lapins, les sangliers qui mangent les appâts contenant des AVKs (140). La toxicité secondaire concerne les prédateurs des rongeurs comme les buses et les renards qui mangent les rongeurs traités (139).

La sélection de résistance aux molécules utilisées modifie la stratégie de gestion. En effet, depuis les années 1960 il y a eu des mutations sur le gène *vkorc1* chez les rats (146) et les souris (149) les rendant résistants aux AVKs de première génération. Cela a amené au développement de molécules de seconde génération plus écotoxiques que celles de première génération. Il y a un fort risque d'intoxication car les molécules utilisées pour remplacer celles auxquelles les animaux sont résistants sont plus toxiques. Gérer l'exposition aux rongeurs peut donc créer de nouveaux risques liés à de nouvelles expositions à des produits toxiques.

Il est donc nécessaire de tenir compte des nombreux risques liés aux rongeurs mais aussi des risques liés à la gestion des rongeurs avant de décider d'une action de gestion de population.

Les différents travaux présentés dans ce mémoire de thèse montrent la diversité des problèmes auxquels le gestionnaire du risque est confronté. Pour chaque cas, l'analyse des dangers liés aux rongeurs et l'analyse des dangers liés à la gestion des populations de rongeurs sera présentée.

Selon l'évaluation du risque lié à la gestion des populations de rongeurs, la décision doit tenir compte de tous ces aspects (écotoxicité, économie et sanitaire), des dangers liés à l'exposition aux rongeurs eux-mêmes, à l'exposition aux produits utilisés, aux problèmes liés à la gestion elle-même (résistance) et voir de quel côté penche la balance à multi plateaux. Les analyses présentées dans cette thèse sont des illustrations de cette façon de penser reposant sur des cas concrets.

IV) Évaluation des risques liés aux rongeurs et à la maîtrise de leurs populations. Trois cas concrets.

1. Une ferme à haut risque infectieux

Nous avons eu l'occasion d'intervenir dans le cadre d'une double préoccupation sanitaire intervenue à la fois chez l'homme et son troupeau de bovins. Cette étude reste originale car elle s'appuie sur une observation de terrain assez souvent évoquée mais rarement transcrite en publication. L'étude révèle un désordre sanitaire lié à des souris présentes sur le site de l'élevage et tente d'identifier les points de maintien de leptospires pathogènes au sein de l'élevage.

Certaines souris du site étaient réservoirs de plusieurs souches de leptospires dont *Icterohaemorrhagiae* et potentiellement *Grippotyphosa* bien que le typage ait été incomplet. Il s'avère que le sérovar *Grippotyphosa* a également été identifié chez des bovins de cet élevage présentant des troubles de la reproduction. Nous pouvons donc supposer que c'est le sérovar responsable des infections humaines et bovines déclarées sur le site. Nous avons émis l'hypothèse que les souris étaient responsables de la contamination initiale des bovins, la contamination de l'éleveur ayant pu être consécutive à une exposition aux urines des bovins contaminés.

Bien entendu, d'autres espèces sauvages peuvent être réservoirs de leptospires que ce soient des espèces de rongeurs comme les rats (28), les campagnols ou autres comme les hérissons (91), les ragondins (103). Mais nous supposons que seule une grande proximité entre les réservoirs et l'éleveur/l'élevage peut expliquer la contamination. Or, aucun rat n'a pu être détecté sur le site de l'élevage au moment de l'étude, l'éleveur organisant régulièrement une lutte contre les rongeurs à base d'anticoagulants de première génération qui semble être efficace pour éviter la présence de rats. Nous avons donc exclu le rôle des rats dans la transmission de leptospires pathogènes dans ce cas précis.

La perception sociétale de l'éleveur était responsable d'une sous-estimation majeure du risque lié à la souris par rapport à celui du rat. En effet il luttait contre les rats mais ne se préoccupait pas de la présence de souris dans l'élevage. Pourtant la souris est le rongeur le plus commensal de l'homme allant dans les habitations alors que le rat ne rentre que dans les sous-sols. Une gestion efficace de tous les rongeurs, souris comprises, est indispensable dans cet élevage afin de limiter les risques sanitaires.

L'éleveur utilisait des AVKs de première génération. Ces molécules étaient efficaces pour gérer les rats, mais ne l'étaient pas pour gérer les souris. Une non-consommation des appâts et/ou des phénomènes de résistance pouvaient être responsables de cet échec. 50% des souris de l'échantillonnage analysé (même si l'échantillonnage était faible) présentaient une ou plusieurs mutations du gène *vkorc1* associées à de la résistance aux AVKs de première génération. La

prévalence des souris résistantes sur l'élevage était donc très forte expliquant certainement les problèmes de gestion. L'utilisation exclusive des AVKs de première génération est certainement à l'origine de cette sélection des allèles de résistance. L'utilisation d'AVKs de seconde génération devrait être envisagée. Néanmoins, leur utilisation sera associée à une augmentation des risques écotoxiques. Leur utilisation devra être faite exclusivement en boîtes d'appâtage à l'intérieur des bâtiments ou autour des bâtiments et les appâts non utilisés devront être entreposés dans des lieux clos à l'abri des animaux domestiques et sauvages afin de minimiser les risques écotoxiques. Néanmoins, la présence de stocks d'aliments facilement accessibles dans les bâtiments contribue certainement à une réduction de la consommation des appâts par les souris. La compétition alimentaire peut être un frein à une gestion efficace des populations de rongeurs car ces derniers habitués à vivre dans un écosystème où de la nourriture est présente en quantité suffisante vont hésiter voire ne pas consommer une nouvelle source potentiellement dangereuse en raison de leur forte aversion alimentaire. Les mesures d'hygiène sont toujours les premières mesures à mettre en œuvre lors de la mise en place d'un programme de gestion des rongeurs. En effet, l'invasion d'un biotope par des rongeurs est en général dépendante des ressources alimentaires, si ces dernières sont présentes ils s'installeront sur le site. L'utilisation d'AVKs de deuxième génération, si ces derniers ne sont pas consommés, ne permettra pas de gérer les risques sanitaires liés aux souris dans cet élevage.

Au sein de cet élevage il est donc nécessaire :

- De limiter le maintien des leptospires dans l'environnement, eau, fumier... Les leptospires peuvent survivre jusqu'à 8 jours dans le fumier. Cette durée peut varier selon les conditions climatiques (96). Attendre au moins 8 jours avant de l'épandre est nécessaire afin de limiter la transmission.
- La vaccination humaine protégeant contre le sérovar *Icterohaemorrhagiae* peut être envisagée pour les personnes travaillant sur le site pour éviter d'autres cas de leptospirose et la vaccination des bovins pourrait limiter la maintenance du sérovar *Hardjo*. Mais le sérovar supposé responsable des infections sur le site de l'élevage étant *Grippotyphosa*, les mesures de vaccinations seront certainement insuffisantes.
- De mettre en place un contrôle de la prolifération des souris par utilisation des AVKs de seconde génération tout en limitant l'accès à la nourriture et en piégeant au maximum les souris.

2. Une région tropicale à fort risque leptospirosique : la Martinique

En Martinique un très grand nombre de cas de leptospirose humaine sont déclarés comparativement à la France métropolitaine avec respectivement 30 à 70 cas humains /100000 habitants et 0,5 cas humains 100000 habitants par an (168). L'environnement tropical est propice au développement des leptospires pathogènes. Différentes études ont tenté d'identifier les facteurs de risque de la maladie. Des lésions cutanées, la pratique du canoë-kayak, le contact avec des rongeurs sauvages, un lieu de résidence à la campagne (169) ont été suggérés... Les loisirs aquatiques exposent les participants au risque de leptospirose et des cas groupés ont été rapportés après la pratique d'activités comme la nage en rivière ou le rafting (170,171). Une étude réalisée à Salvador au Brésil, a estimé le risque leptospirosique supérieur à 3% par an dans une favela avec un risque maximum pour les hommes et les personnes à faible revenu. La réinfection était fréquente pour les personnes vivant à proximité d'égouts à ciels ouverts (172). Le développement de compétitions sportives en milieu tropical, qui s'accompagnent de regroupements importants de participants, créent des conditions potentielles pour des expositions de masse (173). Lors d'événements sportifs avec des passages dans de l'eau, la situation est particulière avec une exposition des coureurs plus grande qu'à la normale et des périodes avec des épidémies associées (174,175). Trois espèces de rongeurs commensaux sont reconnues être porteuses de leptospires pathogènes à savoir le rat brun, le rat noir et la souris domestique en Martinique. Pour la gestion du risque leptospirosique il est donc indispensable de gérer les populations de ces 3 espèces sur l'ensemble de l'île de la Martinique. Il ne s'agit plus d'un problème local nécessitant la mise en place d'une solution locale, mais d'un problème plus vaste à l'échelle de l'île de la Martinique nécessitant la mise en place de solutions globales des 3 espèces de rongeurs commensaux porteurs de leptospires pathogènes, sur une île dans laquelle des espèces endémiques sont présentes et pour lesquelles il est nécessaire de minimiser le risque écotoxique. Cette étude s'est donc concentrée sur l'optimisation des méthodes de gestion chimique qui se doivent d'être réfléchies à l'échelle de l'île afin de choisir les molécules appropriées pour contourner les phénomènes de résistance et éviter/minimiser les problèmes écotoxiques. La résistance de cibles chez les rats bruns et souris a été si souvent décrite (135,146) à travers le monde, qu'il était légitime de la suspecter sur l'île de la Martinique. Pourtant, aucune étude n'avait été menée dans cette île ni dans aucune autre île de cet archipel.

Dans ce projet nous avons étudié l'exposition des rongeurs aux AVKs afin d'identifier les molécules déjà utilisées dans les différents secteurs d'activité. Huit AVKs sont actuellement disponibles (voir introduction). Elles ont toutes été détectées en Martinique témoignant de

l'utilisation de tous les AVKs sur l'île de la Martinique. La diversité des molécules retrouvées en milieu agricole était aussi grande que celles retrouvées en ville, ce qui démontre une utilisation différente des AVKs entre la Martinique et la France métropolitaine. La réglementation française prévoit un usage limité des AVKs en plein champ en raison des problèmes écotoxiques. Ainsi, seule la bromadiolone est homologuée pour l'usage en plein champ. Néanmoins en raison du problème leptospirosique, des autorisations préfectorales sont prises chaque année afin de permettre l'utilisation en plein champ des autres molécules homologuées seulement pour un usage biocide. Ces extensions d'autorisation étaient au début de ce projet surprenantes. Pourquoi permettre l'utilisation des autres molécules, en particulier les molécules de seconde génération les plus toxiques, telles que la diféthialone, le flocoumafène, le brodifacoum, en plein champ en Martinique ?

L'étude de la résistance des rongeurs martiniquais nous a permis d'apporter un début de réponse à cette question. Seule la résistance de cible due à des mutations du gène *Vkorc1* a été analysée au cours de ce projet, alors qu'une résistance métabolique pourrait être également envisagée. En effet des surexpressions d'enzymes du métabolisme des AVKs ont été évoquées comme étant à l'origine de phénomènes de résistance en accélérant l'élimination de l'AVK par le rongeur (154). Néanmoins, pour le moment ces mécanismes semblent peu répandus alors que la résistance de cible a été décrite largement chez le rat brun (147,148), chez la souris domestique (149,176) et chez le rat noir (177), principalement en Europe, mais également dans le monde entier. C'est pourquoi seule la résistance de cible a été envisagée dans ce projet.

Chez la souris, la résistance de cible est évidente en Martinique avec une prévalence proche de 40% de la mutation Y139C, mutation déjà largement décrite en Europe (176). Cette mutation entraîne une résistance sévère à tous les AVKs de première génération et à la bromadiolone (149). Cette très forte prévalence de la résistance chez la souris est certainement à l'origine de l'utilisation des AVKs de seconde génération les plus toxiques, brodifacoum et diféthialone, en plein champ pour permettre une lutte efficace. Le portage leptospirosique des souris justifie-t-il cette utilisation ? Le grand nombre de cas de leptospirose humaine en Martinique nécessite que la gestion des rongeurs soit optimale. Utiliser seulement des AVKs de première génération ou de la bromadiolone pour gérer des populations de souris porteuses de la mutation Y139C et certainement porteuses de leptospires pathogènes équivaldrait à ne rien faire. Clairement, la gestion du risque leptospirosique a pris le pas par rapport au risque écotoxique induit par l'utilisation des AVKs de deuxième génération. Néanmoins, parallèlement à cette étude de résistance a été entreprise par le CHU de Fort de France, une étude du portage de leptospires

pathogènes par les rongeurs en Martinique. Les analyses sont en cours. S'il s'avérait que le portage de leptospires pathogènes par les souris soit finalement faible ou que les souches portées soient différentes de celles impliquées dans la leptospirose humaine, le recours aux molécules de seconde génération pourrait être questionné. Néanmoins, l'usage seul des molécules de première génération augmenterait la fréquence des allèles de résistance et rendrait la gestion des souris impossible. Quel est l'impact des souris sur les cultures ?

Chez le rat brun, aucune mutation n'a été détectée. Pourtant un grand nombre de mutation du gène *vkorc1* induisant de la résistance chez le rat brun ont été décrites dans le monde par différentes équipes (146,147). En Europe, cinq mutations principales ont été identifiées, les mutations L120Q, L128Q, Y139F, Y139C et Y139S (146). Aucune d'entre elles n'a été mise en évidence chez les rats bruns martiniquais. Néanmoins, l'échantillonnage de rats bruns était très limité en raison de la faible abondance de ce rat en Martinique et ne permet pas de tirer des conclusions définitives. L'absence ou la faible prévalence des mutations chez le rat brun est certainement due à l'utilisation des molécules de deuxième génération. En effet, les mutations du gène *vkorc1* conduisent en général à une résistance aux molécules de première génération et à la bromadiolone seulement. Utiliser des molécules de seconde génération dans les différents secteurs d'activité permet sans aucun doute une non-sélection des allèles de résistance. En France métropolitaine et en Europe, l'utilisation exclusive de la bromadiolone en secteur agricole a conduit à une sélection massive des allèles de résistance. En contrepartie, il est fort probable que la faune sauvage soit davantage exposée aux AVKs de seconde génération en Martinique comparativement à la France. Ce point n'a pour l'instant jamais fait l'objet d'études.

Chez le rat noir, 2 nouvelles mutations ont été détectées. Ces mutations induisent peu, voire pas de résistance aux AVKs et ont été retrouvées avec une fréquence très faible. L'utilisation des AVKs de première génération devrait suffire pour gérer les populations de rats noirs. Néanmoins, les appâts actuellement développés le sont essentiellement, pour gérer les populations de rats bruns qui sont les rats principalement rencontrés dans les pays occidentaux. Les formulations de ces appâts ne sont peut-être pas adaptées au rat noir qui est lui frugivore et qui les consomme très peu. L'utilisation des molécules de seconde génération plus rémanentes et plus toxiques permet donc certainement d'atteindre une efficacité meilleure même si elles sont consommées en faible quantité, par rapport aux molécules de première génération, moins rémanentes et moins toxiques.

En Martinique, la lutte contre les rongeurs est réalisée pour gérer le risque leptospirosique et le risque économique. Puisque sur les différents sites d'étude ont été piégés des rats bruns, des

rats noirs et des souris qui sont tous décrits porteurs de leptospires pathogènes, la gestion doit être efficace pour gérer les 3 espèces. Seule l'utilisation des molécules de seconde génération, à l'exception de la bromadiolone, peut aboutir à cet objectif. Une identification moléculaire plus précise des souches portées par les rongeurs, ainsi que celles impliquées dans la leptospirose humaine est nécessaire pour remettre en question l'utilisation des molécules de seconde génération en plein champ et considérer le risque écotoxique lié à leurs utilisations.

3. Campagnols, une gestion de populations à adapter aux situations

Cette troisième étude avait pour but de réfléchir sur la gestion des populations de campagnols terrestre et campagnols des champs dans des zones de moyenne montagne : l'Auvergne et la Franche Comté. La Franche Comté est une région dans laquelle les agriculteurs produisent le comté, produit à très forte valeur ajoutée permettant d'assurer aux agriculteurs un revenu raisonnable. Néanmoins, la présence de campagnols terrestres est une problématique majeure entraînant très régulièrement des pertes économiques très importantes. En effet, les effectifs de ces populations durant les phases de pullulation peuvent être importants et entraîner des pertes de plus de 80% de rendement sur une parcelle. La région Franche Comté s'est saisie du problème depuis plus de 10 ans et a travaillé à l'identification de pratiques agricoles et de méthodes de lutte adaptées. Les mesures mises en place pour gérer les populations de campagnols semblent être efficaces dans cette région. La gestion de campagnols est décidée par arrêté préfectoral autorisant l'utilisation de la bromadiolone seulement si les populations sont encore à basse densité. Cette décision de ne traiter qu'à basse densité a été prise afin d'éviter les risques d'intoxication secondaire de la faune sauvage lors de traitements à forte densité. En effet, les traitements à la bromadiolone ont été largement impliqués dans la mortalité des prédateurs des rongeurs, tels que le milan et le renard (139). Une étude récente a même suggéré que le traitement à la bromadiolone utilisée pour gérer des populations de campagnols terrestres pouvait expliquer le déclin saisonnier de petits mustélidés prédateurs de cette espèce (178).

La prise de conscience en Auvergne des problèmes dus aux campagnols terrestres est plus récente et est consécutive aux fortes pullulations qu'il y a eu en 2011 et 2015. La gestion est aujourd'hui réalisée selon les méthodes qui ont été mises en place en Auvergne à savoir traitement à base de bromadiolone à faible densité uniquement. Les régions étant différentes, les méthodes de gestion doivent-elles être identiques ? Seuls les problèmes économiques liés

aux rongeurs et les risques écotoxiques liés à la gestion des rongeurs ont été mis dans la balance pour orienter les prises de décisions. Les risques sanitaires et la possibilité de résistance à la bromadiolone n'ont jamais été considérés. Cette étude visait à apporter des réponses à propos de ces 2 aspects.

Nous nous sommes donc intéressés dans un premier temps au portage de leptospires pathogènes par les campagnols des champs et les campagnols terrestres. Des différences importantes de prévalence du portage de leptospires pathogènes par les campagnols terrestres ont été mises en évidence entre les zones étudiées, ce portage allant de 3-10% en Auvergne à 52% en Franche Comté. Si nous confrontons ces prévalences, aux prévalences de leptospirose humaine, ces résultats sont cohérents. En métropole le nombre de cas annuel est d'environ 300 (179). En 2013, il y a eu 385 cas en France avec une incidence moyenne de 0,6 cas pour 100000 habitants et comme les années précédentes l'incidence la plus élevée était en Franche Comté de 3,73 cas pour 100000 habitants avec 44 cas au total (168). Aux vues des résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que les campagnols des champs et les campagnols terrestres pourraient jouer un rôle majeur dans la transmission de leptospires pathogènes à l'homme et aux animaux domestiques en Franche Comté. En effet, les effectifs de ces rongeurs peuvent atteindre des niveaux très importants. De plus, les fréquences de portage de leptospires pathogènes par les campagnols en Franche Comté sont du même ordre de grandeur que ceux publiés lors d'une étude menée chez le campagnol des champs dans un contexte de leptospirose bovine dans lequel ce dernier avait été supposé joué un rôle majeur (108).

Dans un second temps, nous avons étudié la possible existence d'une résistance de cible à la bromadiolone chez les campagnols terrestres. En effet, une inefficacité de la bromadiolone est parfois décrite par les agriculteurs sur certaines parcelles. Trois mutations codantes ont été retrouvées, les mutations E67D, R71G et I149S. La caractérisation de la résistance induite par ces mutations a révélé qu'elles induisent une légère résistance à la bromadiolone avec des facteurs de résistance entre 2 et 5. Ces facteurs de résistance n'ont rien à voir avec ceux décrits pour certaines mutations chez le rat et la souris (148,149). En effet, chez ces derniers, les facteurs de résistance peuvent être supérieurs à 100. Néanmoins, les facteurs de résistance induits par les mutations R71G et S149I pourraient chez le campagnol induire une inefficacité si les appâts étaient peu consommés sur le terrain, comme cela peut être le cas lorsque la végétation est abondante. Ceci implique de traiter au bon moment lorsque la végétation est plus limitée. Pour le moment, les fréquences alléliques de ces mutations semblent très faibles et ces dernières

n'ont été retrouvées qu'à l'état hétérozygote. Les mutations du gène *vkorc1* ayant été décrites codominantes, la résistance d'un individu hétérozygote est plus faible que celle d'un individu homozygote. L'inefficacité rapportée par certains agriculteurs n'est donc probablement pas explicable par cette résistance de cible, bien que sur certaines parcelles spécifiques, certaines mutations puissent atteindre des fréquences alléliques supérieures à 10%.

Dans cette étude seule la résistance de cible a été analysée. D'autres mécanismes pourraient être à l'origine d'une résistance. Ainsi des surexpressions d'enzymes du métabolisme, tel que décrit chez le rat (154) pourraient entraîner une élimination accélérée de la bromadiolone par le campagnol. Cette hypothèse devra être évaluée.

Dans cette étude le risque leptospirosique associé à la pullulation de campagnols est très différent selon la région considérée. La gestion des campagnols doit-elle répondre aux mêmes règles selon les régions ? Le traitement basé sur un arrêté limitant l'utilisation de la bromadiolone à basse densité de population est certainement adapté en Auvergne. La prévalence de portage de leptospires pathogènes chez les campagnols et la forte incidence de la leptospirose humaine en Franche Comté devraient être prises en compte dans la prise de décision concernant la gestion. Des études complémentaires seront nécessaires à plus grande échelle afin de confirmer ces résultats.

PERSPECTIVES DE LA THESE

Cette thèse a permis d'illustrer la complexité que représente la gestion des populations de rongeurs. En effet, la gestion des rongeurs se doit de prendre en considération de nombreux paramètres que ce soient les risques économiques, écologiques ou sanitaires posés par la présence de rongeurs mais également ceux créés par leur gestion, en particulier ceux associés à la lutte chimique, c'est-à-dire les risques écotoxiques et les risques de diffusion d'allèles de résistance au sein des populations. L'ensemble des risques doit être mis dans la balance afin d'aider à la décision de gérer ou ne de ne pas gérer la ou les population(s) et d'orienter de choix des méthodes à utiliser afin de minimiser les risques associés à cette gestion. Les travaux réalisés au sein de cette thèse ont tenté d'aborder conjointement les risques sanitaires et les risques de diffusion de résistance aux rodenticides. Si ces aspects avaient été déjà bien décrits chez le rat et la souris, ces derniers étaient non décrits chez le campagnol terrestre. Néanmoins, de nombreuses questions restent sans réponse à l'issue de ce projet concernant ces aspects chez le campagnol.

Au cours de ce projet :

Nous avons montré que les campagnols des champs et les campagnols terrestres sont porteurs de leptospires pathogènes, le taux de portage pouvant être localement très élevé. Les souches retrouvées semblent varier en fonction de la région et en fonction des parcelles/colonies. Hélas les techniques utilisées au cours de cette thèse n'ont permis qu'une identification partielle de ces souches. L'utilisation d'autres techniques moléculaires, telle que la MLST devra être considéré pour caractériser les souches portées par les campagnols. Les souches étant potentiellement non décrites, un séquençage complet du génôme de ces souches par séquençage massif sera éventuellement nécessaire.

L'isolement des souches portées par ces rongeurs pourraient, de plus, permettre d'envisager d'autres perspectives intéressantes à ce travail. En effet, l'obtention de ces isolats devrait permettre de :

- déterminer le pouvoir pathogène de ces nouvelles souches sur modèle animal expérimental. Ce point nous paraît essentiel afin de préciser le rôle réel de ce rongeur dans le cycle de transmission et de maintenance des leptospires pathogènes.

- déterminer le rôle réservoir sélectif d'un sérotype particulier de leptospire. En effet le fait d'avoir identifié des sérovars proches du sérotype Grippotyphosa (qu'il s'agisse de membres de l'espèce *L. interrogans* ou de *L. kirschneri*) laisse supposer qu'il pourrait exister une interaction entre les structures de surface de ce sérotype et les cellules de cet hôte animal, avec notamment une forme de tolérance immunitaire qui en ferait un hôte réservoir. Une approche par stratégie expérimentale avec co-infection d'individus maintenus en captivité constituerait l'ossature de ce travail. Cette donnée associée à la perspective énoncée précédemment permettrait de mieux cibler la place du campagnol au sein du cycle de l'infection.

Les souches de leptospires semblent être différentes en fonction de la région, de la parcelle voire de la colonie de campagnol considérée, il serait intéressant d'identifier les raisons de cette sélectivité. Le campagnol étant un rongeur territorial, il est possible que cette sélectivité soit expliquée par son comportement. Les outils de génétique des populations pourraient permettre d'évaluer la diversité génétique des colonies de campagnols d'une parcelle à une autre.

Nous avons montré que la résistance de cible aux anticoagulants raticides est un mécanisme peu voire pas fréquent chez le campagnol terrestre, contrairement à ce qui est décrit chez les rats et souris. Pourtant, nombreux sont les agriculteurs rapportant une absence d'efficacité de la bromadiolone.

- L'existence d'autres mécanismes de résistance à la bromadiolone devra être considérée chez le campagnol. Une résistance métabolique aux anticoagulants raticides a été évoquée chez le rat *via* la surexpression d'enzymes du métabolisme à l'origine d'une élimination accélérée de l'anticoagulant. Les enzymes du métabolisme étant multiples, cette caractérisation sera complexe chez le campagnol. Il sera tout d'abord nécessaire de mesurer les demi-vies d'élimination de la bromadiolone chez des campagnols provenant de parcelles sur lesquelles la bromadiolone est considérée inefficace versus des campagnols provenant de parcelles sur lesquelles la bromadiolone est efficace. Des demi-vies d'élimination différentes seront en faveur de l'existence d'une résistance métabolique. L'utilisation de puces à ADN ciblant les enzymes du métabolisme pourraient permettre l'identification de la cible. Néanmoins, ces puces sont développées chez le rat et la souris et pourraient ne pas être applicables chez le campagnol.

- D'autres mécanismes pourraient être à l'origine de résistance : la microflore intestinale pourrait être responsable de synthèse de vitamine K, antidote de la bromadiolone. Le

comportement alimentaire du campagnol pourrait être également à l'origine d'une absence d'efficacité de la bromadiolone. Toutes ces questions devront être résolues afin d'optimiser la gestion des campagnols terrestres.

- L'utilisation et le développement d'autres matières actives plus appropriées voire l'alternance de ces matières actives devraient être considérés pour gérer les populations de campagnols de façon optimale.

Seuls les risques sanitaires et les risques de diffusion de résistance ont été abordés dans ce travail. Les risques écologiques et économiques associés à la présence de rongeurs et les risques écotoxiques associés à la gestion de ces rongeurs n'ont hélas pas pu être abordés au cours de ce projet. Pourtant la gestion des rongeurs en Martinique doit absolument prendre en compte par exemple les risques écotoxiques, sachant que l'usage des anticoagulants de seconde génération est indiqué en Martinique. La prise en compte de l'ensemble des risques nécessitera la collaboration d'équipes pluridisciplinaires allant de l'économie, aux sciences humaines et sociales...

CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié la gestion de populations de rongeurs dans un contexte leptospirosique. Nos objectifs étaient d'analyser le risque sanitaire leptospirosique associé à des rongeurs présents dans différents écosystèmes par deux axes à savoir l'étude du portage de leptospires pathogènes et la résistance aux AVKs utilisés pour gérer les populations. En effet si le risque leptospirosique du rat est bien connu en raison notamment du fait qu'il est réservoir d'un sérovar responsable de cas de leptospirose humaine, les données concernant d'autres espèces comme les campagnols sont peu disponibles dans la littérature et leur rôle est méconnu dans le cycle de transmission de la leptospirose. De plus un des principaux moyens de lutte chimique contre les rongeurs est l'utilisation d'AVKs. Les mécanismes de résistance sont peu connus chez les campagnols et ce manque de connaissance pourrait impacter l'efficacité des méthodes de gestion mises en place.

Nos travaux nous ont amené à considérer trois paramètres entrant dans le processus de décision des moyens à mettre en place pour la gestion de populations de rongeurs. Nous avons étudié l'impact de la perception sociétale sur la gestion de populations de souris dans un cas de santé publique à savoir la leptospirose humaine et la leptospirose bovine. Il en ressort que le risque sanitaire leptospirosique lié à la souris est sous-estimé, que certaines sont résistantes aux AVKs de première génération et que la compétition alimentaire limite l'efficacité de la gestion. Dans le cas de l'étude en Martinique concernant l'efficacité des moyens de gestion de populations de rongeurs commensaux, nous avons remarqué l'importance du contrôle des AVKs utilisés pour limiter la résistance et l'écotoxicité dans un écosystème tropical avec des espèces protégées sensibles aux intoxications par des AVKs. Avoir des méthodes de lutte efficaces est important, en particulier dans un écosystème où l'incidence de cas de leptospirose humaine est si grande comme en Martinique. Nos travaux concernant les campagnols ont montré que selon la zone étudiée la prévalence du portage de leptospires pathogènes varie beaucoup suggérant une variation importante du risque sanitaire leptospirosique. La gestion des populations doit être adaptée à la situation.

La gestion de populations de rongeurs est un problème complexe multifactoriel qui doit prendre en compte les risques sanitaires liés aux rongeurs, les risques d'exposition aux rongeurs et les

risques de gestion des rongeurs. De ce fait, il est difficile de proposer en pratique un plan de gestion général. Cette gestion doit être adaptée à chaque situation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES DE LA THESE

1. 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 Dec;3(12):757–71.
2. Paster BJ, Dewhirst FE, Weisburg WG, Tordoff LA, Fraser GJ, Hespell RB, et al. Phylogenetic analysis of the spirochetes., Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J Bacteriol*. 1991 Oct;173, 173(19, 19):6101, 6101–9.
3. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr 1;14(2):296–326.
4. Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang T-H, Kravchenko V, Girons IS, et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*. 2001 Apr;2(4):346–52.
5. Adler B. Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects. *Vet Microbiol*. 2014 Aug;172(3–4):353–8.
6. Murray GL, Ellis KM, Lo M, Adler B. *Leptospira interrogans* requires a functional heme oxygenase to scavenge iron from hemoglobin. *Microbes Infect*. 2008 Jun 1;10(7):791–7.
7. Murray GL, Srikram A, Henry R, Puapairoj A, Sermswan RW, Adler B. *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. *Microbes Infect*. 2009 Feb 1;11(2):311–4.
8. Eshghi A, Lourdault K, Murray GL, Bartpho T, Sermswan RW, Picardeau M, et al. *Leptospira interrogans* Catalase Is Required for Resistance to H₂O₂ and for Virulence. *Infect Immun*. 2012 Nov 1;80(11):3892–9.
9. Lourdault K, Cerqueira GM, Wunder EA, Picardeau M. Inactivation of *clpB* in the Pathogen *Leptospira interrogans* Reduces Virulence and Resistance to Stress Conditions. *Infect Immun*. 2011 Sep 1;79(9):3711–7.
10. McBride AJ, Athanzio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2005 Oct;18(5):376.
11. Dellagostin OA, Grassmann AA, Hartwig DD, Félix SR, Silva ÉF da, McBride AJA. Recombinant vaccines against Leptospirosis. *Hum Vaccin*. 2011 Nov 1;7(11):1215–24.

12. Forster KM, Hartwig DD, Seixas FK, Bacelo KL, Amaral M, Hartleben CP, et al. A Conserved Region of Leptospiral Immunoglobulin-Like A and B Proteins as a DNA Vaccine Elicits a Prophylactic Immune Response against Leptospirosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2013 May 1;20(5):725–31.
13. Choy HA, Kelley MM, Chen TL, Møller AK, Matsunaga J, Haake DA. Physiological Osmotic Induction of *Leptospira interrogans* Adhesion: LigA and LigB Bind Extracellular Matrix Proteins and Fibrinogen. *Infect Immun*. 2007 May 1;75(5):2441–50.
14. Robbins GT, Hahn BL, Evangelista KV, Padmore L, Aranda PS, Coburn J. Evaluation of Cell Binding Activities of *Leptospira* ECM Adhesins. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 avr;9(4):e0003712.
15. Fernandes LGV, Vieira ML, Kirchgatter K, Alves IJ, Morais ZM de, Vasconcellos SA, et al. OmpL1 Is an Extracellular Matrix- and Plasminogen-Interacting Protein of *Leptospira* spp. *Infect Immun*. 2012 Oct 1;80(10):3679–92.
16. Lin M-H, Chang Y-C, Hsiao C-D, Huang S-H, Wang M-S, Ko Y-C, et al. LipL41, a Hemin Binding Protein from *Leptospira santarosai* serovar Shermani. *PLOS ONE*. 2013 déc;8(12):e83246.
17. Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, et al. Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun*. 2005 Aug 1;73(8):4853–63.
18. King AM, Bartpho T, Sermswan RW, Bulach DM, Eshghi A, Picardeau M, et al. Leptospiral Outer Membrane Protein LipL41 Is Not Essential for Acute Leptospirosis but Requires a Small Chaperone Protein, Lep, for Stable Expression. *Infect Immun*. 2013 Aug 1;81(8):2768–76.
19. Lin X 'ai, Zhao J, Qian J, Mao Y, Pan J, Li L, et al. Identification of Immunodominant B- and T-Cell Combined Epitopes in Outer Membrane Lipoproteins LipL32 and LipL21 of *Leptospira interrogans*. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 May 1;17(5):778–83.
20. Matsunaga J, Young TA, Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Haake DA. Novel 45-Kilodalton Leptospiral Protein That Is Processed to a 31-Kilodalton Growth-Phase-Regulated Peripheral Membrane Protein. *Infect Immun*. 2002 Jan 1;70(1):323–34.

21. Vijayachari P, Vedhagiri K, Mallilankaraman K, Mathur PP, Sardesai NY, Weiner DB, et al. Immunogenicity of a novel enhanced consensus DNA vaccine encoding the leptospiral protein LipL45. *Hum Vaccines Immunother.* 2015 Aug 3;11(8):1945–53.
22. Zeng L-B, Zhuang X-R, Huang L-L, Zhang Y-Y, Chen C-Y, Dong K, et al. Comparative subproteome analysis of three representative *Leptospira interrogans* vaccine strains reveals cross-reactive antigens and novel virulence determinants. *J Proteomics.* 2015 Jan 1;112:27–37.
23. Levy C, Khaled M, Iliopoulos D, Janas MM, Schubert S, Pinner S, et al. Intronic miR-211 Assumes the Tumor Suppressive Function of Its Host Gene in Melanoma. *Mol Cell.* 2010 Dec 10;40(5):841–9.
24. Matsui M, Soupé M-E, Becam J, Goarant C. Differential In Vivo Gene Expression of Major *Leptospira* Proteins in Resistant or Susceptible Animal Models. *Appl Environ Microbiol.* 2012 Sep 1;78(17):6372–6.
25. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine Mal Infect.* 2013 Jan;43(1):1–9.
26. Cerqueira GM, Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol.* 2009 Sep;9(5):760–8.
27. Guerra MA. Leptospirosis. *J Am Vet Med Assoc.* 2009 Feb 15;234(4):472–8.
28. Zilber A-L. Rôle du rat brun (*Rattus norvegicus*) dans la persistance des leptospires en conditions naturelles. *Lyon* 1; 2015.
29. Bourhy P, Collet L, Brisse S, Picardeau M. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014 Dec;64(Pt 12):4061–7.
30. Levett PN. Systematics of *Leptospiraceae*. In: *Leptospira and Leptospirosis*. Springer, Berlin, Heidelberg; 2015. p. 11–20. (Current Topics in Microbiology and Immunology).
31. Arean VM. The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *Am J Pathol.* 1962;40(4):393.
32. Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect.* 2000 Aug;2(10):1265–76.

33. Kobayashi Y. Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. *J Infect Chemother.* 2001;7(1):10–5.
34. Ido Y, Hoki R, Ito H, Wani H. The rat as carrier of *Spirochaeta Icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Weil's disease (*Spirochaetosis Icterohaemorrhagica*). *J Exp Med J Exp Med.* 1917 Sep 1;26, 26(3, 3):341, 341–53.
35. Lilenbaum W, Santos MRC dos. Leptospirose em reprodução animal: III. Papel do serovar hardjo nas leptospiroses bovinas no Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Latinoam Microbiol.* 1995;37(2):87–92.
36. Faine S. *Leptospira and leptospirosis.* Melbourne, Australia: MediSci; 1999.
37. Lilenbaum W, Martins G. Leptospirosis in Cattle: A Challenging Scenario for the Understanding of the Epidemiology. *Transbound Emerg Dis.* 2014 Aug 1;61 Suppl 1:63–8.
38. Sanhueza JM, Heuer C, West D. Contribution of *Leptospira*, *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. *Prev Vet Med.* 2013 Oct 1;112(1–2):90–8.
39. Chiebao D, Valadas S, Minervino A, Castro V, H. C. N. Romaldini A, S. Calhau A, et al. Variables Associated with Infections of Cattle by *Brucella abortus*., *Leptospira* spp. and *Neospora* spp. in Amazon Region in Brazil. *Transbound Emerg Dis.* 2013 Dec 1;62.
40. Fávero JF, de Araújo HL, Lilenbaum W, Machado G, Tonin AA, Baldissera MD, et al. Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microb Pathog.* 2017 Jun 1;107:149–54.
41. Talebkhan Garoussi M, Vand-E-Useefee J, Mehrzad J. Seroprevalence of Leptospiral Infection in Rodents of Dairy Cattle Herds Complexes in Suburb of Mashhad -Iran. *J Appl Anim Res.* 2006 Dec 1;30:109–11.
42. Verma A, Stevenson B, Adler B. Leptospirosis in horses. *Vet Microbiol.* 2013 Nov 29;167(1):61–6.
43. Timoney JF, Kalimthusamy N, Velineni S, Donahue JM, Artiushin SC, Fetting M. A unique genotype of *Leptospira interrogans* serovar Pomona type kennewicki is associated with equine abortion. *Vet Microbiol.* 2011 Jun 2;150(3):349–53.

44. Ellis WA. Animal Leptospirosis. In: *Leptospira and Leptospirosis*. Springer, Berlin, Heidelberg; 2015. p. 99–137. (Current Topics in Microbiology and Immunology).
45. Verma A, Kumar P, Babb K, Timoney JF, Stevenson B. Cross-Reactivity of Antibodies against Leptospiral Recurrent Uveitis-Associated Proteins A and B (LruA and LruB) with Eye Proteins. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(8):e778.
46. Lee HS, Levine M, Guptill-Yoran C, Johnson AJ, von Kamecke P, Moore GE. Regional and temporal variations of *Leptospira* seropositivity in dogs in the United States, 2000-2010. *J Vet Intern Med*. 2014 Jun;28(3):779–88.
47. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats - Schuller - 2015 - *Journal of Small Animal Practice* - Wiley Online Library.
48. S Ghneim G, H Viers J, Chomel B, Kass P, A Descollonges D, L Johnson M. Use of a case-control study and geographic information system to determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis. *Vet Res*. 2007 Jan 1;38:37–50.
49. Huhn RG. Current status of leptospiral immunizing agents for use in swine. *J Am Vet Med Assoc*. 1972 Feb 15;160(4):634–7.
50. Beaudu-Lange C, Lange E. Unusual clinical presentation of leptospirosis in a cat. *Rev Vét Clin*. 2014 Jul 1;49(3):115–22.
51. Lau SF, Wong JY, Khor KH, Roslan MA, Abdul Rahman MS, Bejo SK, et al. Seroprevalence of Leptospirosis in Working Dogs. *Top Companion Anim Med*. 2017 Dec 26;
52. Jacobs A a. C, Harks F, Hoeijmakers M, Collell M, Segers RP a. M. Safety and efficacy of a new octavalent combined Erysipelas, Parvo and *Leptospira* vaccine in gilts against *Leptospira interrogans* serovar Pomona associated disease and foetal death. *Vaccine*. 2015 Jul 31;33(32):3963–9.
53. Ebani V, Bertelloni F, Pinzauti P, Cerri D. Seroprevalence of *Leptospira* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu Lato in Italian horses. *Ann Agric Environ Med AAEM*. 2012 Jun 27;19:237–40.
54. Hamond C, Martins G, Lilenbaum W. Subclinical leptospirosis may impair athletic performance in racing horses. *Trop Anim Health Prod*. 2012 Dec;44(8):1927–30.

55. Jung BY, Lee KW, Ha TY. Seroprevalence of *Leptospira* spp. in clinically healthy racing horses in Korea. *J Vet Med Sci.* 2010 Feb;72(2):197–201.
56. Båverud V, Gunnarsson A, Engvall EO, Franzén P, Egenvall A. *Leptospira* seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses. *Acta Vet Scand.* 2009 Mar 30;51:15.
57. Ellis WA, O'Brien JJ, Cassells JA, Montgomery J. Leptospiral infection in horses in Northern Ireland: serological and microbiological findings. *Equine Vet J.* 1983 Oct;15(4):317–20.
58. Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: The Dawn of the Molecular Genetics Era for an Emerging Zoonotic Pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Oct;7(10):736–47.
59. Zilber A-L, Belli P, Grezel D, Artois M, Kodjo A, Djelouadji Z. Comparison of Mucosal, Subcutaneous and Intraperitoneal Routes of Rat *Leptospira* Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Mar 31;10(3):e0004569.
60. Athanazio DA, Silva EF, Santos CS, Rocha GM, Vannier-Santos MA, McBride AJA, et al. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Trop.* 2008 Feb;105(2):176–80.
61. Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE. Review Paper: Host-Pathogen Interactions in the Kidney during Chronic Leptospirosis. *Vet Pathol Online.* 2009 Sep 1;46(5):792–9.
62. Monahan AM, Callanan JJ, Nally JE. Proteomic Analysis of *Leptospira interrogans* Shed in Urine of Chronically Infected Hosts. *Infect Immun.* 2008 Nov;76(11):4952–8.
63. Muslich LT, Villanueva SYAM, Amran MY, Segawa T, Saito M, Yoshida S. Characterization of *Leptospira* infection in suckling and weaning rat pups. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2015 Feb 1;38:47–55.
64. Werts C. Leptospirosis: a Toll road from B lymphocytes. *Chang Gung Med J.* 2010 Dec;33(6):591–601.
65. Matsui M, Rouleau V, Bruyère-Ostells L, Goarant C. Gene Expression Profiles of Immune Mediators and Histopathological Findings in Animal Models of Leptospirosis: Comparison between Susceptible Hamsters and Resistant Mice ▽. *Infect Immun.* 2011 Nov;79(11):4480–92.

66. Raffray L. Immunopathologie de la leptospirose humaine : exploration de la réponse immunitaire innée. 2017.
67. Viriyakosol S, Matthias MA, Swancutt MA, Kirkland TN, Vinetz JM. Toll-Like Receptor 4 Protects against Lethal *Leptospira interrogans* Serovar Icterohaemorrhagiae Infection and Contributes to In Vivo Control of Leptospiral Burden. *Infect Immun*. 2006 Feb 1;74(2):887–95.
68. Viriyakosol S, Tobias PS, Kitchens RL, Kirkland TN. MD-2 Binds to Bacterial Lipopolysaccharide. *J Biol Chem*. 2001 Oct 12;276(41):38044–51.
69. 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 Nov 1;175(9):6022–31.
70. Revue PratiqueVet N° 146 - Mars 2017.
71. L Murray G. The Molecular Basis of Leptospiral Pathogenesis. Vol. 387. 2015. 139 p.
72. Fraga TR, Courrol D dos S, 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 Mar 15;209(6):876–86.
73. Fraga T, S Barbosa A, Isaac L. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement System. Vol. 73. 2011. 408 p.
74. Toma C, Okura N, Takayama C, Suzuki T. Characteristic features of intracellular pathogenic *Leptospira* in infected murine macrophages. *Cell Microbiol*. 2011 Aug 5;13:1783–92.
75. Barocchi MA, Ko AI, Reis MG, McDonald KL, Riley LW. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by *Leptospira interrogans*, an invasive but nonintracellular pathogen. *Infect Immun*. 2002 Dec;70(12):6926–32.
76. Silveira MM, Oliveira TL, Schuch RA, McBride AJA, Dellagostin OA, Hartwig DD. DNA vaccines against leptospirosis: A literature review. *Vaccine*. 2017 Oct 9;35(42):5559–67.

77. Zuerner RL. Host Response to *Leptospira* infection. In: *Leptospira and Leptospirosis* [Internet]. Springer, Berlin, Heidelberg; 2015. p. 223–50. (Current Topics in Microbiology and Immunology).
78. Perez J, Brescia F, Becam J, Mauron C, Goarant C. Rodent Abundance Dynamics and Leptospirosis Carriage in an Area of Hyper-Endemicity in New Caledonia. Vinetz JM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Oct 25;5(10):e1361.
79. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*. 2010 Jan 27;140(3–4):287–96.
80. Cosson J-F, Picardeau M, Mielcarek M, Tatard C, Chaval Y, Suputtamongkol Y, et al. Epidemiology of leptospira transmitted by rodents in southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jun;8(6):e2902.
81. Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho ALF, Aires TSF, Villasboas-Bisneto JC, Queirroz A, et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2008 Mar;14(3):505–8.
82. 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 Sep 17;9(9):e0003898.
83. Benacer D, Thong KL, Min NC, Verasahib KB, Galloway RL, Hartskeerl RA, et al. Epidemiology of human leptospirosis in Malaysia, 2004–2012. *Acta Trop*. 2016 May;157:162–8.
84. Kanagavel M, Princy Margreat AA, Arunkumar M, Prabhakaran SG, Shanmughapriya S, Natarajaseenivasan K. Multilocus sequence typing (MLST) of leptospiral strains isolated from two geographic locations of Tamil Nadu, India. *Infect Genet Evol*. 2016 Jan;37:123–8.
85. Miraglia F, Matsuo M, Morais ZM, Dellagostin OA, Seixas FK, Freitas JC, et al. Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Nov;77(3):195–9.
86. Jansen A, et al. Leptospirosis in Germany, 1962–2003 - Volume 11, Number 7—July 2005 - *Emerging Infectious Disease journal* - CDC.

87. Meites E, et al. Reemerging Leptospirosis, California - Volume 10, Number 3—March 2004 - Emerging Infectious Disease journal - CDC.
88. Koizumi N, Muto M, Tanikawa T, Mizutani H, Sohmura Y, Hayashi E, et al. Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring *Leptospira interrogans* in urban areas of Tokyo, Japan. *J Med Microbiol.* 2009;58(9):1227–30.
89. Dupouey J, Faucher B, Edouard S, Richet H, Kodjo A, Drancourt M, et al. Human leptospirosis: An emerging risk in Europe? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2014 Mar;37(2):77–83.
90. Grace D, Mutua F, Ochungo P, Kruska RL, Jones K, Brierley L, et al. Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots. ILRI; 2012 Jul.
91. Ayrat F, Djelouadji Z, Raton V, Zilber A-L, Gasqui P, Faure E, et al. Hedgehogs and Mustelid Species: Major Carriers of Pathogenic *Leptospira*, a Survey in 28 Animal Species in France (20122015). *PloS One.* 2016;11(9):e0162549.
92. Wong M, Katz AR, Li D, Wilcox BA. *Leptospira* Infection Prevalence in Small Mammal Host Populations on Three Hawaiian Islands. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Aug 1;87(2):337–41.
93. Hartskeerl RA, Terpstra WJ. Leptospirosis in wild animals. *Vet Q.* 1996;18 Suppl 3:S149-150.
94. Saito M, Villanueva SYAM, Chakraborty A, Miyahara S, Segawa T, Asoh T, et al. Comparative Analysis of *Leptospira* Strains Isolated from Environmental Soil and Water in the Philippines and Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2013 Jan 15;79(2):601–9.
95. Aviat F, Blanchard B, Michel V, Blanchet B, Branger C, Hars J, et al. *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2009 Dec 1;32(6):463–76.
96. Diesch SL. Survival of leptospirae in cattle manure. *J Am Vet Med Assoc.* 1971 Dec 1;159(11):1513–7.
97. Dufour B, Moutou F, Hattenberger A, Rodhain F. Global change: Impact, management risk approach and health measures - The case of Europe. Vol. 27. 2008. 529 p.

98. Tulsiani SM, Lau CL, Graham GC, Hurk AFVD, Jansen CC, Smythe LD, et al. Emerging tropical diseases in Australia. Part 1. Leptospirosis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2010 Oct 1;104(7):543–56.
99. Hartskeerl RA, Collares-Pereira M, Ellis WA. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Apr 1;17(4):494–501.
100. Estavoyer JM, Chirouze C, Faucher JF, Floret N, Couetdic G, Leroy J, et al. Leptospirosis in Franche-Comté (FRANCE): Clinical, biological, and therapeutic data. *Médecine Mal Infect*. 2013 Sep;43(9):379–85.
101. Roczek A, Forster C, Raschel H, Hörmansdorfer S, Bogner K-H, Hafner-Marx A, et al. Severe course of rat bite-associated Weil's disease in a patient diagnosed with a new *Leptospira*-specific real-time quantitative LUX-PCR. *J Med Microbiol*. 2008;57(5):658–63.
102. Gollop JH, Katz AR, Rudoy RC, Sasaki DM. Rat-bite leptospirosis. *West J Med*. 1993 Jul;159(1):76–7.
103. Vein J, Leblond A, Belli P, Kodjo A, Berny PJ. The role of the coypu (*Myocastor coypus*), an invasive aquatic rodent species, in the epidemiological cycle of leptospirosis: a study in two wetlands in the East of France. *Eur J Wildl Res*. 2014 Feb 1;60(1):125–33.
104. Hurd J, Berke O, Poljak Z, Runge M. Spatial analysis of *Leptospira* infection in muskrats in Lower Saxony, Germany, and the association with human leptospirosis. *Res Vet Sci*. 2017 Oct 1;114:351–4.
105. Steinen ACM, Schuurman JL, Gravekamp C, Korver H, Terpstra WJ. Muskrats as carriers of pathogenic leptospire in The Netherlands. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1992 Jan 1;61(1):43–50.
106. Seguel M, Muñoz F, Paredes E, Navarrete MJ, Gottdenker NL. Pathological Findings in Wild Rats (*Rattus rattus*) Captured at Guafo Island, Northern Chilean Patagonia. *J Comp Pathol*. 2017 Aug 1;157(2):163–73.
107. Turk N, Milas Z, Margaletic J, Staresina V, Slavica A, Riquelme-Sertour N, et al. Molecular characterization of *Leptospira* spp. strains isolated from small rodents in Croatia. *Epidemiol Infect*. 2003 Feb;130(1):159–66.

108. Kuiken T, van Dijk JE, Terpstra WJ, Bokhout BA. The role of the common vole (*Microtus arvalis*) in the epidemiology of bovine infection with *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Vet Microbiol.* 1991 Aug 1;28(4):353–61.
109. Giraudoux P, Delattre P, Habert M, Quéré JP, Deblay S, Defaut R, et al. Population dynamics of fossorial water vole (*Arvicola terrestris scherman*): a land use and landscape perspective. *Agric Ecosyst Environ.* 1997 Nov 17;66(1):47–60.
110. Buckle AP, Smith RH, editors. *Rodent pests and their control*. 2nd edition. Wallingford, Oxfordshire ; Boston, MA: CAB; 2015. 422 p.
111. Mayer-Scholl A, Hammerl JA, Schmidt S, Ulrich RG, Pfeffer M, Woll D, et al. *Leptospira* spp. in Rodents and Shrews in Germany. *Int J Environ Res Public Health.* 2014 Jul 24;11(8):7562–74.
112. Vitale M, Agnello S, Chetta M, Amato B, Vitale G, Bella CD, et al. Human leptospirosis cases in Palermo Italy. The role of rodents and climate. *J Infect Public Health.* 2018 Mar 1;11(2):209–14.
113. Mori M, Bourhy P, Guyader ML, Esbroeck MV, Djelouadji Z, Septfons A, et al. Pet rodents as possible risk for leptospirosis, Belgium and France, 2009 to 2016. *Eurosurveillance.* 2017 Oct 26;22(43):16-00792.
114. Heyman P, Plyusnina A, Berny P, Cochez C, Artois M, Zizi M, et al. Seoul hantavirus in Europe: first demonstration of the virus genome in wild *Rattus norvegicus* captured in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2004 Sep;23(9):711–7.
115. Battersby S, Public health policy—can there be an economic imperative ? An examination of one such issue. *Journal of Environmental Health Research.* 2004, Volume 3, Issue 1.
116. Luque-Larena JJ, Mougeot F, Viñuela J, Jareño D, Arroyo L, Lambin X, et al. Recent large-scale range expansion and outbreaks of the common vole (*Microtus arvalis*) in NW Spain. *Basic Appl Ecol.* 2013 Aug 1;14(5):432–41.
117. Jareño D, Viñuela J, Luque-Larena JJ, Arroyo L, Arroyo B, Mougeot F. Factors associated with the colonization of agricultural areas by common voles *Microtus arvalis* in NW Spain. *Biol Invasions.* 2015 Aug 1;17(8):2315–27.

118. Jacob B, Tkadlec E. Rodent outbreaks in Europe: dynamics and damage. International Rice Research Institute. 2010 January, pp 207-223.
119. Phytoma La santé des végétaux. Mai 2017 N°704.
120. Balis GU, Monroe RR. The pharmacology of chloralose. *Psychopharmacologia*. 1964 Jan 1;6(1):1–30.
121. Segev G, Yas-Natan E, Shlosberg A, Aroch I. Alpha-chloralose poisoning in dogs and cats: A retrospective study of 33 canine and 13 feline confirmed cases. *Vet J*. 2006 Jul 1;172(1):109–13.
122. Ravindran S, Hopkins B, Bova S, Tingle M. In vivo metabolism of norbormide in rats and mice. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2009 Jul 1;28(1):147–51.
123. DeClementi C, Sobczak BR. Common rodenticide toxicoses in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2012 Mar;42(2):349–360, viii.
124. Peterson ME, Fluegeman K. Cholecalciferol. *Top Companion Anim Med*. 2013 Feb;28(1):24–7.
125. Endepols S, Klemann N, Richter D, Matuschka F-R. The potential of coumatetralyl enhanced by cholecalciferol in the control of anticoagulant resistant Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Pest Manag Sci*. 2016 Jan 22;
126. Schofield FW. A Brief Account of a Disease in Cattle Simulating Hemorrhagic Septicaemia due to Feeding Sweet Clover., A Brief Account of a Disease in Cattle Simulating Hemorrhagic Septicaemia due to Feeding Sweet Clover. *Can Vet J Can Vet J*. 1984 Dec;25, 25(12, 12):453, 453–5.
127. Link KP. The Discovery of Dicumarol and Its Sequels. *Circulation*. 1959 Jan 1;19(1):97–107.
128. Dam H. The antihemorrhagic vitamin of the chick. *Biochem J*. 1935 Jun 1;29(6):1273–85.
129. Kulman JD, Harris JE, Haldeman BA, Davie EW. Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich gamma-carboxyglutamic acid proteins., Primary structure and tissue distribution of two novel proline-rich γ -carboxyglutamic acid proteins. *Proc Natl Acad Sci U S Am Proc Natl Acad Sci U S Am*. 1997 Aug 19;94, 94(17, 17):9058, 9058–62.

130. Kulman JD, Harris JE, Xie L, Davie EW. Identification of two novel transmembrane gamma-carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 13;98(4):1370–5.
131. Bal dit Sollier C and Drouet L. Vitamine K, antivitamine K et alimentation. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 2009 December, Volume 44, Issue 6.
132. Beulens JWJ, Bots ML, Atsma F, Bartelink M-LEL, Prokop M, Geleijnse JM, et al. High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification. *Atherosclerosis*. 2009 Apr;203(2):489–93.
133. Bell RG, Matschiner JT. Vitamin K activity of phylloquinone oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1970 Dec;141(2):473–6.
134. Li T, Chang C-Y, Jin D-Y, Lin P-J, Khvorova A, Stafford DW. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature*. 2004 Feb 5;427(6974):541–4.
135. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hoertnagel K, Pelz H-J, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*. 2004 Mar 1;427:537–41.
136. Robertson HM. Genes Encoding Vitamin-K Epoxide Reductase Are Present in *Drosophila* and Trypanosomatid Protists. *Genetics*. 2004 Oct 1;168(2):1077–80.
137. Ageno W, Gallus AS, Wittkowsky A, Crowther M, Hylek EM, Palareti G. Oral Anticoagulant Therapy. *Chest*. 2012 Feb;141(2 Suppl):e44S–e88S.
138. Atterby H, Kerins GM, MacNicol AD. Whole-carcass residues of the rodenticide difenacoum in anticoagulant-resistant and -susceptible rat strains (*Rattus norvegicus*). *Env Toxicol Chem*. 2005 Feb;24(2):318–23.
139. Berny PJ, Buronfosse T, Buronfosse F, Lamarque F, Lorgue G. Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpes vulpes*) and buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere*. 1997 Oct;35(8):1817–29.
140. Berny P, Velardo J, Pulce C, D'amico A, Kammerer M, Lasseur R. Prevalence of anticoagulant rodenticide poisoning in humans and animals in France and substances involved. *Clin Toxicol*. 2010 Nov 1;48(9):935–41.
141. Gamelin L, Harry P. Rodenticides. *EMC - Toxicol-Pathol*. 2005 Sep 1;2(3):89–97.

142. Jacquot M, Coeurdassier M, Couval G, Renaude R, Pleydell D, Truchetet D, et al. Using long-term monitoring of red fox populations to assess changes in rodent control practices. *J Appl Ecol*. 2013 Dec 1;50(6):1406–14.
143. Geduhn A, Jacob J, Schenke D, Keller B, Kleinschmidt S, Esther A. Relation between intensity of biocide practice and residues of anticoagulant rodenticides in Red Foxes (*Vulpes vulpes*). Spanoghe P, editor. *PLOS ONE*. 2015 Sep 29;10(9):e0139191.
144. Boyle CM. Case of Apparent Resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to Anticoagulant Poisons. *Nature*. 1960 Nov 5;188(4749):517.
145. Dodsworth E. Mice are spreading despite such poisons as warfarin. *Minic Engin Lond*. 1961;3746:1668.
146. Pelz H-J, Rost S, Hünerberg M, Fregin A, Heiberg A-C, Baert K, et al. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics*. 2005 Aug;170(4):1839–47.
147. Rost S, Pelz H-J, Menzel S, MacNicoll AD, León V, Song K-J, et al. Novel mutations in the *VKORC1* gene of wild rats and mice – a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC Genet*. 2009 Feb 6;10:4.
148. Hodroge A, Longin-Sauvageon C, Fourel I, Benoit E, Lattard V. Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat *VKORC1* involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants. *Arch Biochem Biophys*. 2011 Nov;515(1–2):14–20.
149. Goulois J, Lambert V, Legros L, Benoit E, Lattard V. Adaptive evolution of the *Vkorc1* gene in *Mus musculus domesticus* is influenced by the selective pressure of anticoagulant rodenticides. *Ecol Evol*. 2017 Mar 1;7.
150. Grandemange A, Kohn MH, Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Berny P, Benoit E. Consequences of the Y139F *Vkorc1* mutation on resistance to AVKs: in-vivo investigation in a 7th generation of congenic Y139F strain of rats. *Pharmacogenet Genomics*. 2009 Oct;19(10):742–50.
151. Grandemange A, Lasseur R, Longin-Sauvageon C, Benoit E, Berny P. Distribution of *VKORC1* single nucleotide polymorphism in wild *Rattus norvegicus* in France. *Pest Manag Sci*. 2010 Mar;66(3):270–6.
152. Song Y, Endepols S, Klemann N, Richter D, Matuschka FR, Shih CH, et al. Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between old world

- mice., Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between Old World mice. *Curr Biol* CB *Curr Biol* CB. 2011 Aug 9;21, 21(15, 15):1296, 1296–301.
153. Sugano S, Kobayashi T, Tanikawa T, Kawakami Y, Kojima H, Nakamura K, et al. Suppression of CYP3A2 mRNA expression in the warfarin-resistant roof rat, *Rattus Rattus*: possible involvement of cytochrome P450 in the warfarin-resistance mechanism. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst*. 2001 Aug 1;31:399–407.
154. Ishizuka M, Okajima F, Tanikawa T, Min H, Tanaka KD, Sakamoto KQ, et al. Elevated Warfarin Metabolism in Warfarin-Resistant Roof Rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. *Drug Metab Dispos*. 2007 Jan 1;35(1):62–6.
155. Izzo AA. Herb–drug interactions: an overview of the clinical evidence. *Fundam Clin Pharmacol*. 2005 Feb 1;19(1):1–16.
156. Wallin R, M Hutson S, Cain D, A. J. S, C Sane D. A molecular mechanism for genetic warfarin in the rat. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2001 Dec 1;15:2542–4.
157. Horak KE, Volker SF, Campton CM. Increased diphacinone and chlorophacinone metabolism in previously exposed wild caught voles, *Microtus californicus*. *Crop Prot*. 2015 Dec;78:35–9.
158. Prescott C, Buckle A. Blood-clotting response tests for resistance to diphacinone and chlorophacinone in the Norway Rat (*Rattus norvegicus* Berk.). *Crop Prot*. 2000 Jun 1;19:291–6.
159. Fisher P. Review of house mouse (*Mus musculus*) susceptibility to anticoagulant poisons. 2005.
160. Lasseur R, Grandemange A, Longin-Sauvageon C, Berny P, Benoit E. Comparison of the inhibition effect of different anticoagulants on vitamin K epoxide reductase activity from warfarin-susceptible and resistant rat. *Pestic Biochem Physiol*. 2007 Jun 1;88(2):203–8.
161. Schmidt S, Essbauer SS, Mayer-Scholl A, Poppert S, Schmidt-Chanasit J, Klempa B, et al. Multiple Infections of Rodents with Zoonotic Pathogens in Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2014 Jul 1;14(7):467–75.

162. Marquez A, Ulivieri T, Benoit E, Kodjo A, Lattard V. House mice as a real sanitary threat for human and animal leptospirosis: proposal for integrated management. (soumis au journal BioMed Research International).
163. Marquez A, Djelouadji Z, Lattard V, Kodjo A. Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospire. *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol*. 2017 Dec;20(4):184–93.
164. Zilber A-L, Picardeau M, Ayrat F, Artois M, Demont P, Kodjo A, et al. High-Resolution Typing of *Leptospira interrogans* Strains by Multispacer Sequence Typing. *J Clin Microbiol*. 2014 Feb;52(2):564–71.
165. Salaün L, Mérien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 2006 Nov;44(11):3954–62.
166. Buckle AP, Fenn MGP. Rodent control in the conservation of endangered species. *Proc Fifteenth Vertebr Pest Conf 1992*. 1992 March.
167. Hindwood KA. The Birds of Lord Howe Island. *Emu - Austral Ornithol*. 1940 Jul 1;40(1):1–86.
168. Hochedez P. Epidémiologie de la leptospirose aux Antilles françaises : apports du diagnostic par biologie moléculaire dans l'étude des facteurs de risques, des facteurs pronostiques et de l'incidence. *Santé publique et épidémiologie*. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI; 2015. Français. <NNT : 2015PA066010>. <tel-01176154>.
169. Nardone A, Capek I, Baranton G, Campèse C, Postic D, Vaillant V, et al. Risk Factors for Leptospirosis in Metropolitan France: Results of a National Case-Control Study, 1999–2000. *Clin Infect Dis*. 2004 Sep 1;39(5):751–3.
170. Diseases directly transmitted by rodents | Rodents | CDC.
171. Katz AR, Sasaki DM, Mumm AH, Escamilla J, Middleton CR, Romero SE. Leptospirosis on Oahu: an outbreak among military personnel associated with recreational exposure. *Mil Med*. 1997 Feb;162(2):101–4.
172. Felzemburgh RDM, Ribeiro GS, Costa F, Reis RB, Hagan JE, Melendez AXTO, et al. Prospective Study of Leptospirosis Transmission in an Urban Slum Community: Role of Poor

Environment in Repeated Exposures to the *Leptospira* Agent. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 mai;8(5):e2927.

173. Al JS et. Leptospirosis in “Eco-Challenge” Athletes, Malaysian Borneo, 2000 - Volume 9, Number 6—June 2003 - *Emerging Infectious Diseases* journal - CDC.

174. Hochedez P, Rosine J, Théodose R, Abel S, Bourhy P, Picardeau M, et al. Outbreak of Leptospirosis after a Race in the Tropical Forest of Martinique. *Am J Trop Med Hyg*. 2011 Apr 5;84(4):621–6.

175. Hochedez P, Escher M, Decoussy H, Pasgrimaud L, Martinez R, Rosine J, et al. Outbreak of leptospirosis among canyoning participants, Martinique, 2011. *Eurosurveillance*. 2013 May 2;18(18):20472.

176. Pelz H-J, Rost S, Müller E, Esther A, Ulrich RG, Müller CR. Distribution and frequency of VKORC1 sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. *Pest Manag Sci*. 2012 Feb 1;68(2):254–9.

177. Goulois J, Chapuzet A, Lambert V, Chatron N, Tchertanov L, Legros L, et al. Evidence of a target resistance to antivitamin K rodenticides in the roof rat *Rattus rattus* : identification and characterisation of a novel Y25F mutation in the *Vkorc1* gene. *Pest Manag Sci*. 2015 Jul 4;n/a-n/a.

178. Fernandez-de-Simon J, Coeurdassier M, Couval G, Fourel I, Giraudoux P. Do bromadiolone treatments to control grassland water voles (*Arvicola scherman*) affect small mustelid abundance? *Pest Manag Sci*. 2018 Sep 2;

179. Baranton G, Postic D. Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. *Int J Infect Dis*. 2006 Mar 1;10(2):162–70.

