



HAL
open science

Leptospires et vitamine K : identification et caractérisation de nouveaux mécanismes de virulence

Sionfoungo Daouda Soro

► **To cite this version:**

Sionfoungo Daouda Soro. Leptospires et vitamine K : identification et caractérisation de nouveaux mécanismes de virulence. Santé. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10284 . tel-04777579

HAL Id: tel-04777579

<https://theses.hal.science/tel-04777579v1>

Submitted on 12 Nov 2024

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

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

**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé**

Discipline : Biologie, Médecine et Santé

Soutenue publiquement le 14/12/2023, par :

Sionfoungo Daouda SORO

**Leptospires et vitamine K :
Identification et caractérisation de
nouveaux mécanismes de virulence**

Devant le jury composé de :

MAGNE, David	<i>Professeur / Université de Lyon 1</i>	Président
BOURATBINE, Aïda	<i>Professeure / Université de Tunis</i>	Rapporteuse
PICARDEAU, Mathieu	<i>Directeur de recherche / Institut Pasteur</i>	Rapporteur
RUVOEN, Nathalie	<i>Professeure / Oniris VetAgroBio</i>	Rapporteuse
BONI, Mickaël	<i>Responsable d'unité / IRBA</i>	Examinateur
MONCHATRE-LEROY, Elodie	<i>Directrice de recherche / ANSES</i>	Examinatrice
BENOIT, Etienne	<i>Professeur / VetAgro Sup</i>	Directeur de thèse
KODJO, Angeli	<i>Professeur / VetAgro Sup</i>	Encadrant
CHATRON, Nolan	<i>Ingénieur de recherche / VetAgro Sup</i>	Encadrant

Remerciements

Je ne saurais entamer cette série de remerciements sans auparavant rendre Grâce au **Tout Puissant**, pour la vie, mais également la santé et le courage d'avoir entamé et poursuivi cette formation jusqu'à son terme.

La réalisation d'une thèse est une expérience professionnelle mais également une aventure humaine assez incroyable. S'il est vrai que j'en ai tiré beaucoup d'enseignements, la réalisation de mes travaux et la rédaction de mon manuscrit n'auraient pas pu se faire sans la participation directe ou indirecte de plusieurs personnes à qui je tiens à rendre hommages à travers ces quelques lignes. Difficile de savoir par qui commencer et quel ordre suivre.

Je commencerai par adresser toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude à chacun des membres de mon jury de thèse ainsi que mon jury de CSI. Vos expertises respectives associées pour l'évaluation et l'amélioration de ce travail sont pour moi un honneur et une fierté.

A Mesdames **Nathalie RUVOEN** et **Aïda BOURATBINE** et Monsieur **Mathieu PICARDEAU**, qui m'ont fait le plaisir et l'honneur de s'intéresser à mon travail et qui ont accepté d'être rapporteurs, Hommages respectueux pour le temps consacré à la lecture de mon manuscrit ainsi qu'à l'élaboration de vos rapports.

A Madame **Elodie MONCHATRE-LEROY** et Messieurs **David MAGNE** et **Mickaël BONI**, pour votre disponibilité à participer à ce jury de thèse et examiner ce travail, sincères remerciements.

A Mesdames **Delphine SERGENTET** et **Emmanuelle GILOT-FROMONT**, pour avoir accepté d'être membres de mon comité de suivi de thèse (CSI) et pour vos conseils avisés, profonde gratitude.

Je souhaite ensuite remercier tout particulièrement mes encadrants :

Cher *Prof* **Etienne BENOIT**, je sais que vous n'approuvez pas cette marque d'appellation encore moins que je vous vouvoie, mais permettez-moi en cette occasion que je puisse le faire. Toujours disponible et à l'écoute, vous êtes un modèle pour moi. Vous m'avez accompagné tout au long de ce parcours de thèse. Votre enthousiasme, votre patience, votre compréhension mais surtout votre encadrement m'ont permis de m'enrichir d'un point de vue aussi bien professionnel que personnel. Profonde gratitude aussi pour tout ce que vous m'avez apporté au-delà de cette thèse et pour votre bienveillance pour mon parcours présent et à venir.

Monsieur **Angeli KODJO**, pour votre contribution financière en tant que responsable du LAV qui a permis à cette thèse de voir le jour, pour m'avoir permis l'accès au LAV et surtout pour vos conseils avisés et constructifs, veuillez trouver ici l'expression de ma profonde considération.

Monsieur **Nolan CHATRON** affectueusement « Nono », mille merci tout d'abord pour l'accueil lors de mon retour en France pour la réalisation de cette thèse. Tes qualités humaines et scientifiques m'ont permis de me sentir en famille. Un grand merci pour m'avoir fait découvrir et former à la modélisation moléculaire. De par ta disponibilité et ton enthousiasme, tu as su rendre cet enseignement très agréable. Mille merci à nouveau pour ta contribution à ce travail.

Madame **Virginie LATTARD**, vous êtes celle par qui tout a commencé. Vous m'avez donné l'opportunité de réaliser mon stage de M2 au sein du labo en 2018, puis par la suite accueilli pour la réalisation de ce travail. Ce fut un grand bonheur tant scientifique qu'humain de travailler à vos côtés. Par les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues et vos conseils continus, vous m'avez guidé et aidé jusque dans la rédaction de cette thèse. Sincères remerciements pour votre formation, votre rigueur, votre culture scientifique et vos conseils avisés transmis au cours de ma thèse.

Nos sincères remerciements vont également à l'endroit des membres de l'USC 1233 et du LAV (aujourd'hui PAV) qui ont fait et continuent de faire de mon aventure française une période inoubliable.

➤ Aux membres de l'USC1233

Sébastien LEFEBVRE, je tiens à te remercier pour l'aide apportée pendant ce fameux moment de stress au soir du 18 octobre 2023 mais aussi pour tous nos échanges fructueux durant toutes ces années.

Karine GROUD, mille merci pour ton investissement et le temps consacré à mon égard. Je n'oublierai jamais tous nos moments d'échanges sur la complexité des leptospires.

Ambre FAFOURNOUX, *la mère poule des rongeurs*, merci pour ta convivialité et pour tous ses moments de captures et d'autopsie.

Merci à mes collaborateurs Françoise, Natacha, au duo Amandine, Victor, Gilbert. Votre générosité et surtout votre bonne humeur ont été d'un soutien inestimable. Profonde gratitude.

A mes anciens collaborateurs partis vers d'autres horizons : Xavier, Brigitte, Denis, Abdé, Claire, Ludivine, Dellilah, mille merci pour tous nos moments d'échange et de partage.

Un grand merci à mes prédécesseurs, Arnaud, Jean Valérie, Rami, Thomas, Antoine *mon emmerdeur de professeur et complice*, Ali Barka *mon compagnon*, Youssef, Tarek, Rym et Elena pour tous nos discussions et conseils partagés.

Bon courage aux autres thésards Martha, Kevyn, Marion.

Une petite pensée à tous les stagiaires (Julie, Marie, Margot, Vianney, Prune, Florence, Charline, Victor, Valentina, Miguel...) que j'ai rencontré et qui ont contribué à la bonne ambiance du labo.

➤ Aux membres du LAV

Un immense remerciement à Marine LE GUYADER, *mon repère*, qui a toujours mis à ma disposition les souches de leptospires dont j'avais besoin et toujours facilité mes manips au labo.

Merci à Sophie ANGELLOZ-PESSEY, *mon ange protecteur même si tu prenais toujours le parti d'Elisa* et Vitor GERIANTE GILBERTO, *mon fidèle soutien parmi les filles*, pour votre disponibilité et votre promptitude à me dépanner quand j'en avais besoin. Votre générosité et votre bonne humeur ont été d'une aide précieuse durant toutes mes manips au labo. Profonde gratitude.

Merci à Elisa BOISSY (affectueusement *Elisa Top model*) pour sa sympathie et sa disponibilité. Malgré tous les emmerdements que je te causais pendant mes passages au labo, tu as toujours su garder ta bonne humeur. Finalement, t'a pas réussi à me faire déprimer.

Merci à Floriane DUMAS *toujours joyeuse*, je n'ai pas oublié notre séance de formation à venir, Lucie MARTINEZ, Julianne BERTHET et Brigitte HUMBERT pour votre accueil et votre gentillesse.

Vous tous si nombreux que je n'ai pas pu citer et qui avez contribué énormément à ce succès, sachez que ce travail est aussi le vôtre et je vous serai toujours reconnaissant. Merci.

Enfin, ce modeste travail est dédié :

- ✓ ***A ma Maman chérie*** qui es un soutien spirituel sans faille pour moi. La douceur de ton langage et la justesse de tes propos m'ont toujours rassuré depuis ma tendre enfance. Retrouve ici le fruit de tes efforts et que le TOUT PUISSANT te garde en santé, t'accorde longue vie et me permette de prendre soin de toi comme tu l'as fait pour nous. Mille mercis Maman.
- ✓ ***A feu mon Papa*** pour l'éducation qu'il m'a inculqué et pour tous les sacrifices consentis me permettant d'être là aujourd'hui. Puisse le Tout-Puissant t'accueillir dans ses Paradis célestes. Reconnaissance éternelle Papa.
- ✓ ***A ma bien-aimée***, présente tant dans les bons moments que dans les moments difficiles. Merci pour tes conseils et tes prières. Je ne te le dis pas souvent, mais je n'aurai pas pu et ne pourrai pas bien aller loin sans toi et toutes tes petites attentions. Ce travail est le tien. Trouve ici le témoignage de ma pleine reconnaissance.
- ✓ ***A mes petits anges***, pour avoir apporté une touche spéciale à ce parcours de thèse. Je vous aime plus que tout !
- ✓ ***A mes frères et sœurs***, « *Seul le travail fait l'homme* » que ceci vous serve d'exemple et vous brise toute barrière. Je vous aime et que l'esprit d'entente et d'amour continu de nous unir.
- ✓ ***A ma grande famille Maternelle et Paternelle***
- ✓ ***A ma très chère patrie, la CÔTE D'IVOIRE***
- ✓ ***A mon pays d'accueil, la FRANCE***

Table des matières

LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES ABREVIATIONS	8
Liste des publications	10
Résumé	12
I. INTRODUCTION	16
II. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	19
A. Généralités sur la leptospirose	20
1. Historique	20
2. Importance sanitaire de la leptospirose	21
3. Réservoirs et Cycle de transmission	24
4. Manifestations cliniques de la leptospirose	26
a. La leptospirose humaine	26
b. La leptospirose animale	28
5. Facteurs de risques.....	30
a. Facteurs de risque liés aux conditions climatiques	30
b. Facteurs de risque socio-économiques.....	31
c. Facteurs de risque liés aux loisirs	31
6. Diagnostic.....	32
a. Observation directe et culture	32
b. Sérologie	33
c. Méthodes PCR	34
7. Traitement et mesures préventives	35
a. Traitement	35
b. Mesures préventives.....	36
B. Leptospires : agents de la leptospirose	39
1. Systématique.....	39
2. Classifications.....	41
a. Classification phénotypique.....	41
b. Classification sérologique	42
c. Classification génomique.....	44
3. Caractéristiques microbiologiques	47
a. Caractéristiques morphologiques	47
b. Caractéristiques génomiques.....	50

c.	Caractéristiques métaboliques.....	51
d.	Caractéristiques culturelles	51
4.	Virulence et pouvoir pathogène	52
a.	Protéines impliquées dans la pathogénie	52
i.	Protéines de surface.....	52
ii.	Protéines aux propriétés d'échappement du système immunitaire	54
iii.	Protéines à activité hémolytique.....	54
b.	Chimiotactisme et motilité.....	56
i.	Structure du flagelle	58
ii.	Fonctionnement du flagelle.....	59
iii.	Implication de la motilité dans la virulence.....	61
C.	Le mécanisme de formation des ponts disulfures.....	63
1.	Généralités sur les ponts disulfures et les protéines les contenant	63
2.	Le système de formation des ponts disulfures.....	63
a.	La formation d'un pont disulfure	63
b.	La formation des ponts disulfures dans le périplasme bactérien	64
c.	Implication du système Dsb dans la virulence bactérienne	66
d.	Diversité du système de formation des ponts disulfures.....	67
D.	Les inhibiteurs anticoagulants antivitamines K de l'activité VKOR.....	71
1.	Historique	71
2.	Structure et classification.....	72
3.	Mécanisme d'action.....	74
III.	OBJECTIFS DE LA THESE.....	77
IV.	MATERIELS & METHODES	82
A.	Approche par modélisation moléculaire	83
1.	Exploitation des banques de données	83
2.	Alignement de séquences obtenues	84
3.	Construction d'un modèle 3D.....	84
4.	Docking moléculaire ligand/protéine	86
5.	Dynamique moléculaire.....	89
a.	Recours au logiciel <i>Gromacs</i> et utilisation du champ de force CHARMM36	90
b.	Construction d'un modèle de bicouche lipidique	91
c.	Solvatation et Ionisation du système.....	91
d.	Minimisation de l'énergie potentielle	93
e.	Equilibration de la température à volume constant.....	93

f.	Equilibration de la pression à température constante.....	94
g.	Lancement de la dynamique moléculaire.....	94
6.	Analyse des données obtenues	96
a.	Après Docking moléculaire	96
b.	Après dynamique moléculaire	96
c.	Outils de visualisation.....	98
B.	Approche expérimentale	99
1.	Culture bactérienne.....	99
2.	Caractérisation de l'activité de VKOR.....	100
a.	Optimisation des séquences nucléotidiques.....	100
b.	Transformation des bactéries compétentes	100
c.	Transformations des levures compétentes	101
d.	Expression des protéines recombinantes.....	102
e.	Préparation des fractions microsomales.....	102
f.	Dosage des fractions microsomales	103
g.	Analyse de l'expression des protéines d'intérêt.....	103
h.	Mise au point de l'activité enzymatique	104
i.	Analyse statistique	105
V.	RESULTATS	106
A.	Analyse structurale de la VKOR de <i>Leptospira sp.</i>	107
1.	Objectifs.....	107
2.	Méthodes	107
3.	Résultats principaux	107
B.	Développement d'une approche enzymatique de caractérisation de l'activité VKOR par le système NADPH/Trx/TrxR dépendant : Application sur la VKORC1 de mammifère ..	110
1.	Objectifs.....	110
2.	Méthodes	110
3.	Résultats principaux	111
C.	Etudes de portage leptospirosique chez des campagnols terrestres et des rats urbains ayant conduit à l'obtention de nouvelles souches de terrain	113
1.	Objectifs.....	113
2.	Méthodes	113
3.	Résultats principaux	113
D.	Développement d'une méthode de vidéomicroscopie couplée à un script Python pour l'évaluation du comportement motile des leptospires en présence d'inhibiteurs de la VKOR	116

1. Objectifs.....	116
2. Méthodes	116
3. Résultats principaux	116
VI. DISCUSSION GENERALE	119
VII. CONCLUSION.....	131
VIII. PERSPECTIVES.....	134
IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	143
X. ANNEXES.....	172
ANNEXE 1	174
ANNEXE 2	175
ANNEXE 3	176
ANNEXE 4	177
ANNEXE 5	178

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Distribution mondiale des foyers de leptospirose humaine rapportés dans la littérature par écorégion, obtenue à partir d'une revue systématique de la littérature de 1970 à 2012	21
Figure 2 : Morbidité annuelle estimée de la leptospirose par pays ou territoire	22
Figure 3 : Cycle d'infection de la leptospirose	26
Figure 4 : Arbre phylogénétique des Spirochètes séquencés basé sur l'alignement de séquences en acides aminés de 22 protéines conservées	40
Figure 5 : Arbre phylogénétique des leptospires basé sur les séquences nucléotidiques de 1371 gènes orthologues	46
Figure 6 : Leptospires en microscopie à fond noir (A) et en microscopie électronique (B et C)	48
Figure 7 : Morphologie cellulaire et structure de l'enveloppe de <i>L.interrogans</i>	49
Figure 8 : Diagramme de Venn indiquant le nombre de gènes uniques et partagés entre <i>L. interrogans</i> , <i>L. borgpetersenii</i> et <i>L. biflexa</i>	50
Figure 9 : Classification des protéines de surface des leptospires pathogènes : implication dans la pathogénèse, le diagnostic et l'efficacité des vaccins	53
Figure 10 : Différents types de motilité observés chez les bactéries.....	57
Figure 11 : Structure du flagelle basée sur la distribution des protéines flagellaires d'espèces bactériennes flagellées.....	58
Figure 12 : Structure du moteur flagellaire de 6 bactéries modèles	59
Figure 13 : Représentation des 4 types de motilité	61
Figure 14 : Réaction de formation d'un pont disulfure.....	63
Figure 15 : Voies de formation des ponts disulfures dans le périplasme bactérien	65
Figure 16 : Schéma des différents types d'oxydations mis en évidence chez les bactéries	69
Figure 17 : Formation du dicoumarol.	71

Figure 18 : Structure chimique du noyau 2-methyl 1,4 naphtoquinone commune à tous les AVKs et celle des trois classes d'AVKs et de leurs dérivés.	73
Figure 19 : Cycle de la vitamine K et mode d'action des antivitamines K	74
Figure 20 : Mécanisme d'inhibition de VKORC1 par les AVK selon Silverman	75
Figure 21 : Schéma d'une grille de potentiel englobant le site actif de la protéine d'intérêt ...	88
Figure 22 : Exemple de neutralisation du système par ajout de 5 ions Cl ⁻	92
Figure 23 : Représentation du principe de conditions périodiques aux limites.	92
Figure 24 : Etape de minimisation d'énergie pour s'affranchir des aberrations d'interactions entre molécules.	93
Figure 25 : Etape de thermalisation du système (protéine en orange considérée comme fixe, molécules vertes libres).	94
Figure 26 : Subdivision du système pour l'équilibration de la pression et pour la dynamique moléculaire.	95
Figure 27 : Principe d'intégration d'un gène d'intérêt dans le génome de la levure <i>Pichia pastoris</i>	101
Figure 28 : Cycle de la vitamine K	123
Figure 29 : Application du script Python pour le traitement d'images.	126
Figure 30 : Effet de différentes concentrations de warfarine sur la motilité des leptospires.	129

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Estimation annuelle de la morbidité et de la mortalité selon les régions définies par le GBD (Global Burden of Disease) (Costa <i>et al.</i> , 2015).....	23
Tableau II : Hôtes réservoirs typiques des sérovars communs de <i>Leptospira</i> (Bharti <i>et al.</i> , 2003).....	25
Tableau III : Caractéristiques distinctives des deux catégories de leptospires.....	41
Tableau IV : Sérovars retrouvés chez diverses espèces de leptospires. (Caimi <i>et al.</i> , 2020)...	43
Tableau V : Classification génomique des espèces de <i>Leptospira</i> (Adapté de Bourhy <i>et al.</i> , 2014 ; Levett, 2015).	45
Tableau VI : Quelques exemples de bactéries chez lesquelles le processus de motilité impliqué dans la pathogénicité serait dépendant de l'activité DsbA/DsbB.....	67

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADN :	ADN génomique
AVK :	Anticoagulant antivitamine K
CAAT :	Cross Agglutination Adsorption Test
CASP :	Critical Assessment for Structure Prediction
Dsb :	Disulfide bond protéine
DTT :	Dithiolthreitol
E. coli :	<i>Escherichia coli</i>
ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ELL :	Energie libre de liaison
Erp18 :	Endoplasmic reticulum protein 18
G6P :	Glucose-6-phosphate
G6PDH :	Glucose-6-déshydrogénase
GGCX :	Gamma glutamyl carboxylase
GSH :	Glutathion
GSSG :	Glutathion oxydé
HPLC :	Chomatographie Haute Performance en Phase Liquide
Km :	Constante de Michaelis-Menten
KO :	Knock out
LAV :	Laboratoire d'Analyses Vétérinaires
LC-MS :	Liquid chromatographiy mass spectrometry
LPS :	Lipopolysaccharide
MAT :	Test d'agglutination microscopique
NAPDH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NQO1 :	NAD(P)H déshydrogénase quinone 1
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PCR :	Polymerase chain reaction
PDI :	Protein Disulfide Isomerase

PVKD :	Protéines vitamine K-dépendantes
qPCR :	PCR temps réel
RMSD :	Root Mean Square Deviation
TCK :	Temps de Céphaline Kaolin
TMX :	ThioredoXin-related transMembrane protein
Trx :	Thiorédoxin
TrxR:	Thiorédoxin reductase
USC :	Unité sous contrat
UQ :	Ubiquinone
Vit K>O :	Vitamine K epoxyde
VKOR :	Vitamine K époxyde réductase
VKORC1 :	Vitamin K oxyde reductase complex 1
Vmax :	Vitesse maximale

Liste des publications

➤ Publications en lien avec la thèse

Article publié

1. *Identification of pathogenic Leptospira kirschneri serogroup Grippotyphosa in water voles (Arvicola terrestris) from ruminant pastures in Puy-de-Dôme, Central France.*
Auteurs : Elena HARRAN, Adrien PINOT, Angeli KODJO, Zouheira DJELOUADJI, Marine LE GUDAYER, **Daouda Sionfoungo SORO**, Karine GROUD, Virginie LATTARD, & Florence AYRAL

Article accepté

1. *Structural investigation of vitamin K epoxide reductase domain-containing protein in Leptospira species : a potential target for the development of new leptospirosis treatments as an alternative to antibiotics.*
Auteurs : **Sionfoungo Daouda SORO**, Virginie LATTARD, Angeli KODJO, Etienne BENOIT, & Nolan CHATRON

Articles en cours de finalisation

1. *A more physiological reduction of VKOR for in vitro enzymatic assays*
Auteurs : **Sionfoungo Daouda SORO**, Julie PACHOUD, Xavier SERFATY, Sophie RAHUEL- CLERMONT, Alexandre KRIZNIK, Nolan CHATRON, Virginie LATTARD, & Etienne BENOIT.
2. *Dynamics of leptospirosis in an urban Norway rat (Rattus norvegicus) population in densely populated area of Lyon and Bordeaux (France) and risk to public health*
Auteurs : **Sionfoungo Daouda SORO**, Karine GROUD, Sébastien LEFEBVRE, & Virginie LATTARD.
3. *Leptracker: a bioinformatics tool to automatically detect, track and calculate Leptospira motility from microscopy pictures*
Auteurs : **Sionfoungo Daouda SORO**, Virginie LATTARD, Angeli KODJO, Etienne BENOIT, & Nolan CHATRON

Communication orale

1. *Leptospires and vitamin K : molecular modelling study of the effect of antivitamin K on the VKOR of Leptospira interrogans*

Auteurs : **Sionfoungo SORO**, Nolan CHATRON, Angeli KODJO, Etienne BENOIT, & Virginie LATTARD

➤ Publications hors-thèse

Article accepté

1. *Exposure and resistance to anticoagulant rodenticides in invasive and endemic Chadian urban rodent species to develop a rational management strategy.*

Auteurs : Ali Barka MAHAMAT, Karine GROUD, Soudy Imar DJIBRINE, **Sionfoungo Daouda SORO**, Isabelle Fourel, Antoine RACHED, Nolan CHATRON, Etienne BENOIT, & Virginie LATTARD

Article en cours de finalisation

1. *Diversity and distribution of rodent pests in the main urban areas of Chad.*

Auteurs : Ali Barka MAHAMAT, Soudy Imar DJIBRINE, **Sionfoungo Daouda SORO**, Abdessalem HAMMED, Florence AYRAL, Sébastien LEFEBVRE, Karine GROUD, & Virginie LATTARD

Posters

1. *The Black Rats, Rattus rattus: development and domestication of an internal lineage of black rats for laboratory studies.*

Auteurs : Ambre FAFOURNOUX, **Sionfoungo SORO**, Sebastien LEFEBVRE, & Virginie LATTARD

2. *Comparative study of the prevalence of leptospirosis in urban rat populations living in different environments in Lyon, France*

Auteurs : **Sionfoungo SORO**, Karine GROUD, Dellilah MEGARUS, Ambre FAFOURNOUX, & Virginie LATTARD

3. *Exposure and resistance to anticoagulant resistance in urban rodent pests in Chad*

Auteurs : Virginie LATTARD, Ali Barka MAHAMAT, Karine GROUD, Soudy Imar DJIBRINE, **Sionfoungo Daouda SORO**, Nolan CHATRON, & Etienne BENOIT

Résumé

La leptospirose est une zoonose bactérienne re-émergente ubiquitaire causée par un spirochète appartenant au genre *Leptospira*. Son cycle épidémiologique est complexe faisant intervenir l'Homme en tant qu'hôte accidentel. Elle entraîne des répercussions significatives aussi bien chez les humains que chez les animaux. Endémique surtout dans les régions tropicales et intertropicales, de plus en plus de cas sont rapportés dans les pays développés. Elle touche près d'un million de personnes par an mais son incidence réelle reste sous-estimée au regard du polymorphisme de son tableau clinique allant d'un syndrome fébrile anictérique observé dans la grande majorité des cas à des défaillances multiviscérales potentiellement mortelles.

La mise en place de moyens de diagnostics de certitude rapides et fiables, de prise en charge des patients et d'élaboration de vaccin optimal sont des aspects fondamentaux à améliorer. Le traitement de la maladie repose sur l'administration de nombreux antibiotiques dont l'efficacité dans les cas graves est sujette à une prescription précoce. De plus, face à la recrudescence des problèmes d'antibiorésistance devenant de nos jours un véritable problème de santé publique, il apparaît donc fondamental de disposer de moyens alternatifs d'autant plus que la grande diversité de souches bactériennes complexifie d'avantage la compréhension de leurs mécanismes de virulence.

Dans cette perspective, une analyse du génome de *L. interrogans* a montré l'existence d'un gène, VKOR, très proche du gène VKORC1 retrouvé chez les mammifères et impliqué dans le cycle de la vitamine K. La VKORC1 joue un rôle dans le repliement des protéines et est inhibée par les anticoagulants antivitamines K (AVK) chez les mammifères et certaines bactéries. Chez les leptospires, elle pourrait être impliquée dans la formation de ponts disulfures indispensables à leur motilité et à leur virulence.

Nous avons dans un premier temps montré par analyse d'alignement de séquences la présence de la VKOR dans tout le genre *Leptospira* avec une certaine variabilité suivant la souche de leptospires. En l'absence de données structurales, nous avons construit, par des méthodes *in silico*, un modèle 3D de la VKOR à l'échelle atomique. Des simulations de dynamique moléculaire de la protéine ont permis d'identifier les substrats potentiels de la VKOR, les résidus de cystéine les plus susceptibles de former des ponts disulfures, ainsi que ceux qui contribuaient fortement aux interactions.

Dans un second temps, nous avons mis au point un protocole qui pourra servir à la caractérisation de l'activité enzymatique de la VKOR des leptospires, à partir de la VKORC1

des mammifères. Celui-ci est basé sur le système redox combinant le réducteur NADPH et les protéines Thioredoxin reductase (TrxR) et Thioredoxin1 (Trx).

Partant du postulat que l'inhibition de la VKOR pourrait avoir des répercussions sur la motilité des leptospires, nous avons mis au point une méthode de reconstitution de trajectoires basée sur la vidéomicroscopie et l'implémentation d'un script Python afin de suivre le comportement motile des leptospires en présence d'inhibiteurs de la VKOR. Deux études de terrain sur le portage leptospirosique de campagnols terrestres (*Arvicola terrestris*) dans le Puy-de-Dôme et de rats bruns (*Rattus norvegicus*) à Lyon et Bordeaux ont permis l'acquisition de nouvelles souches bactériennes pour les tests d'application de notre méthode. Ces deux études ont permis d'évaluer le risque potentiel de transmission de la leptospirose de ces rongeurs à l'homme dans les zones étudiées.

Le but principal de nos travaux étant de mettre en évidence de nouveaux marqueurs génétiques potentiels des leptospires, cette étude ouvre la voie à une nouvelle cible thérapeutique inhibable par les anticoagulants antivitamines K.

Mots-clés : Leptospires, Motilité, Virulence, VKOR, Cible, Antivitamine K, Modélisation

Abstract

Leptospirosis is a re-emerging bacterial zoonosis that is widely distributed, caused by a spirochete belonging to the genus *Leptospira*. Its epidemiological cycle is complex, involving humans as accidental hosts. This disease has a significant impact on both humans and animals. Endemic mainly in tropical and intertropical regions, an increasing number of cases are being reported in developed countries. It affects almost one million people annually, yet its true incidence is underestimated due to the polymorphism of its clinical presentation. This ranges from the anicteric febrile syndrome observed in the majority of cases to potentially fatal multivisceral failures.

The implementation of rapid and trustworthy diagnostics, patient management, and the development of optimal vaccines are fundamental aspects that need to be improved. Treatment of the ailment relies on administering a broad spectrum of antibiotics, whose effectiveness in severe cases hinges on early prescription. Furthermore, due to the growing concern surrounding antibiotic resistance as a significant public health issue, it is imperative to have alternative approaches readily available. This is particularly crucial considering the vast range of bacterial strains, which further complicates the comprehension of their virulence mechanisms.

With this in mind, an examination of the *L. interrogans* genome revealed the existence of a gene, VKOR, very similar to the mammalian VKORC1 gene, which is involved in the vitamin K cycle. VKORC1 plays a role in protein folding and is inhibited by antivitamin K (AVK) anticoagulants in mammals and select bacteria. In leptospires, VKOR may be involved in the formation of disulphide bridges, which are essential for motility and virulence.

We initiated our study by conducting a sequence alignment analysis to demonstrate VKOR's presence across the *Leptospira* genus, with some variations depending on the leptospires' strain. Absence of structural data led us to employ in silico techniques to generate a 3D model of VKOR at the atomic level. We then utilized molecular dynamics simulations to identify potential substrates of VKOR, select cysteine residues most likely to form disulphide bridges, and determine those that contribute significantly to the interactions.

Secondly, we have developed a protocol for characterising the enzymatic activity of leptospiral VKOR using mammalian VKORC1 as a model. This is based on the redox system which combines the reductant NADPH with the proteins Thioredoxin reductase (TrxR) and Thioredoxin1 (Trx).

Based on the hypothesis that VKOR inhibition could have repercussions on the motility of leptospires, we have created a trajectory reconstruction technique employing videomicroscopy and a Python script to observe the motile conduct of leptospires in the presence of VKOR inhibitors. Two field studies on the carriage of leptospirosis in ground voles (*Arvicola terrestris*) in Puy-de-Dôme and brown rats (*Rattus norvegicus*) in Lyon and Bordeaux enabled us to acquire new bacterial strains suitable for testing the efficacy of our method. These studies facilitated an evaluation of the potential risk for leptospirosis transmission from these rodents to humans in the respective study areas.

As the main aim of our research is to identify potential new genetic markers for leptospires, this study opens the way to a new therapeutic target that can be inhibited by antivitamin K anticoagulants.

Keywords : Leptospires, Motility, Virulence, Target, Antivitamin K, Molecular modelling

I. INTRODUCTION

La problématique du changement climatique est un enjeu de santé mondiale d'actualité importante tant les conséquences sur l'environnement, la santé humaine et animale peuvent être catastrophiques. Pour prendre en compte à la fois la santé environnementale, humaine et animale, le concept « One Health » est apparu dans les années 2000. Ce concept de gestion de la santé part du principe que toute modification d'un de ces trois facteurs aura une influence sur les deux autres. C'est le cas notamment avec la dynamique actuelle du réchauffement climatique et des inondations qui engendrent une perturbation de l'écosystème dans certaines zones dont une des conséquences est la prolifération et la diffusion d'espèces invasives telles que les rongeurs responsables de la transmission de nombreux agents pathogènes (virus, bactéries, parasites) aussi bien à l'Homme qu'aux animaux.

La leptospirose est un exemple paradigmatique de maladie sous influence des modifications climatiques et de prolifération d'espèces invasives. Zoonose bactérienne ubiquitaire causée par un spirochète appartenant au genre *Leptospira*, elle est retrouvée pratiquement dans toutes les zones à l'échelle planétaire faisant d'elle la zoonose la plus répandue (Adler, 2015). La maladie est surtout endémique dans de nombreuses zones tropicales même si de plus en plus de cas sont rapportés dans les pays tempérés aussi bien dans l'hémisphère sud que dans l'hémisphère nord (Bourhy *et al.*, 2017). Elle revêt un tableau clinique très polymorphe allant d'un syndrome fébrile anictérique observé dans la grande majorité des cas à une défaillance multiviscérale potentiellement mortelle marquée par un ictère, une insuffisance rénale et des hémorragies viscérales (Levett, 2001, Bourhy *et al.*, 2012). La maladie affecte de très nombreuses espèces animales y compris l'Homme qui est un hôte accidentel. Son cycle épidémiologique est complexe faisant intervenir de nombreux réservoirs animaux, principalement mammifères. L'exposition aux leptospires se fait suite à un contact direct ou indirect via l'urine ou les sécrétions organiques d'animaux infectés ou par l'intermédiaire d'environnement contaminé (WHO, 2003 ; Xue *et al.*, 2009 ; Haake and Levett, 2015). Les bactéries ont la capacité de survivre plusieurs mois dans l'environnement et leur écologie est particulièrement compliquée compte tenu de la diversité génétique du genre *Leptospira*.

Chaque année, près d'un million de cas de leptospirose humaine dans le monde et presque 60 000 décès sont recensés (Costa *et al.*, 2015). Malgré ce recensement, la maladie reste sous-estimée en général dans de nombreuses régions du fait du manque de système de surveillance dans certaines zones endémiques, du polymorphisme de son tableau clinique et de la difficulté d'un établissement fiable et rapide de son diagnostic.

Il va sans dire que la mise en place d'outils de diagnostics rapides et fiables, de prise en charge des patients et d'élaboration de vaccin optimal sont des aspects primordiaux à améliorer. Entre temps, les cas graves de leptospirose nécessitent la mise en place d'une antibiothérapie précoce très souvent initiée sur la base d'une suspicion alliant une symptomatologie couplée à une exposition récente à certains facteurs de risque de la maladie. De nombreuses molécules d'antibiotiques sont utilisées aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Bien qu'aucun phénomène d'antibiorésistance, véritable problème de santé publique de nos jours, n'ait pas encore été révélé dans le cadre des traitements cliniques de la maladie, la recherche d'alternatives s'avère judicieuse. C'est dans cette perspective que s'inscrit notre travail de thèse qui s'est focalisé sur l'agent pathogène notamment sur un de ses facteurs de virulence.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à une protéine présente chez les leptospires et qui pourrait être impliquée dans la formation des ponts disulfures indispensables à la motilité et la virulence de ces bactéries. Nous l'avons nommée VKOR (Vitamin K epOxide Reductase) par homologie à la VKORC1 (Vitamin K epOxide Reductase Complex subunit 1), enzyme nécessaire au recyclage de la vitamine K chez les mammifères et cible thérapeutique de la warfarine et plus généralement des anticoagulants antivitamines K (AVKs).

L'objectif de ce travail étant de contribuer au développement de nouveaux marqueurs génétiques de virulence et de fournir une nouvelle cible thérapeutique inhibable par les anticoagulants antivitamines K, la première partie de notre manuscrit sera consacrée à une synthèse bibliographique de données recensées dans la littérature scientifique sur la maladie, son agent causal, la formation des ponts disulfures ainsi que les inhibiteurs anticoagulants antivitamines K. La seconde partie explicitera les matériels et méthodes employés dans nos travaux de même que les résultats obtenus présentés sous un format de publications. La dernière partie sera dédiée à une discussion générale des résultats obtenus dans cette thèse afin d'en dégager les limites et perspectives intéressantes.

II. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Généralités sur la leptospirose

1. Historique

Tiré des mots grecs ‘leptós’ pour « mince, fin » et ‘speira’ pour « spirale », *Leptospira* est le genre de la bactérie spirochète responsable de la leptospirose. L’histoire moderne de cette affection selon la plupart des manuels remonte depuis 1886 à Heidelberg, avec la description pour la première fois par Adolf Weil d’un type particulier d’ictère hémorragique associant splénomégalie, néphrite, conjonctivite et éruptions cutanées (Weil, 1886). Cette description correspondant à la forme grave de l’infection a d’ailleurs pris le nom de maladie de Weil. Pourtant, Landouzy avait décrit une maladie similaire en 1883 chez un égoutier sans la reconnaître (Landouzy, 1883). Il est évident lorsqu’on se réfère aux descriptions des textes anciens que la leptospirose existait depuis des millénaires. Par exemple, dans la langue chinoise, on retrouve des termes anciens pour désigner la leptospirose comme « wei ni » qui signifie « jaunisse des cultivateurs du riz ». Au Japon, le mot traditionnel « nanukayami » correspondant à la maladie veut dire « fièvre des sept jours ou fièvre d’automne » (Kitamura and Hara 1918).

En Amérique, des populations indiennes ont été décimées par une épidémie entre 1616 et 1619. La maladie se présentait sous la forme d’un syndrome ictérique (fièvre, jaunisse, céphalées, épistaxis et lésions cutanées). Plusieurs pathologies ont été citées comme étant responsables de cette épidémie notamment la peste, la fièvre jaune, la petite variole, mais aussi la grippe, la varicelle, le typhus, la fièvre typhoïde, la trichinose, les méningites cérébrospinales ainsi que les infections systémiques par le virus de l’hépatite B (HBV) ou D (HDV). Mais, c’est finalement la leptospirose qui a été proposée récemment par les auteurs comme cause des manifestations cliniques observées (Marr and Cathey, 2010). En Europe de l’Ouest, *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae aurait été introduit au XVIII^e siècle au cours de l’extension de l’aire de répartition de *Rattus norvegicus* à partir de l’Eurasie (Levett, 2001).

Longtemps avant la mise en évidence de l’étiologie de la maladie, des liens ont pu être établis entre elle et certaines professions ou environnement en Europe, au Japon, en Australie et dans d’autres contrées au vu de certaines de ses appellations notamment ‘maladie des coupeurs de cannes’, ‘maladie de la boue’, ‘maladie du porcher’ (Alston *et al.*, 1958 ; van Thiel, 1948).

Bien que Stimson (1907) ait observé des spirochètes qu’il a nommé *Spirochaeta interrogans* à cause de leur ressemblance avec un point d’interrogation, dans des coupes de tissus rénaux d’un patient mort de fièvre jaune en utilisant la technique de coloration par dépôt d’argent selon la méthode de Levaditi, la découverte de l’agent causal de la leptospirose a été faite par Inada et

Ido (Inada *et al.*, 1916). Ces derniers ont décrit les leptospires observés dans le foie d'un cobaye à qui ils avaient injecté du sang d'un patient atteint de la maladie de Weil. Ils ont également démontré la transmissibilité expérimentale de la maladie. Parallèlement à la découverte des chercheurs japonais, deux équipes allemandes ont mis en évidence indépendamment des spirochètes dans le sang de cobayes inoculés avec du sang de soldats souffrant de "French disease" dans les tranchées du nord-est de la France durant la première guerre mondiale (Hubener, 1915 ; Uhlenhuth, 1915).

2. Importance sanitaire de la leptospirose

Reconnue comme la zoonose la plus répandue à travers le monde (Adler, 2015), la leptospirose est endémique dans beaucoup de zones tropicales et subtropicales du fait du climat chaud et humide propice au développement des leptospires (Perez *et al.*, 2011). Dans certaines de ces zones géographiques, elle reste une maladie négligée par manque d'informations des populations et de données locales sur sa morbidité et sa mortalité. Se basant sur les données de la littérature, Munoz-zanzi et son équipe (2020) ont établi une carte recensant les différentes épidémies de leptospirose par écorégion de 1970 à 2012 (figure1).

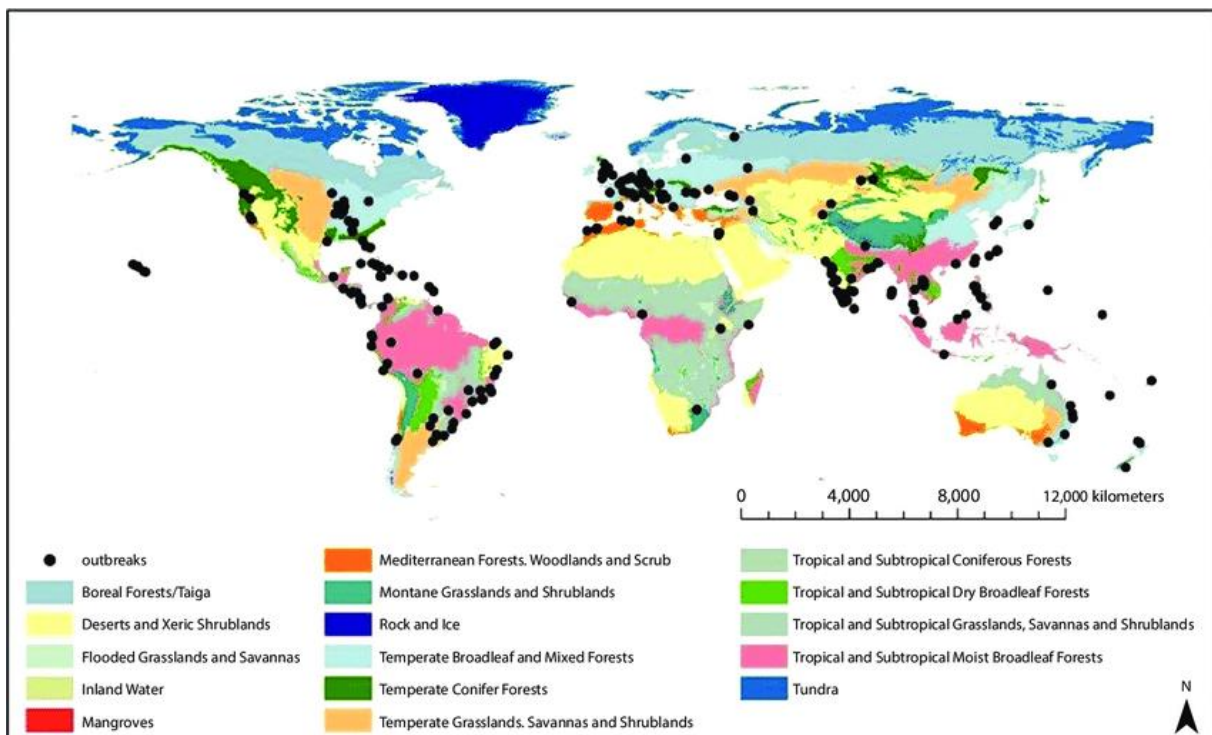


Figure 1 : Distribution mondiale des foyers de leptospirose humaine rapportés dans la littérature par écorégion, obtenue à partir d'une revue systématique de la littérature de 1970 à 2012. (Munoz-Zanzi *et al.*, 2020).

Même si les données récoltées ne se limitent qu'à 2012, leur étude a permis de montrer les zones géographiques ayant rapporté le plus grand nombre d'épidémies notamment l'Amérique latine avec 35,8%, l'Asie du Sud avec 12,9% et l'Amérique du Nord avec 10,7%. Il faut souligner que le rapportage de nombreuses épidémies par certains pays n'est pas à confondre avec les pays à forte incidence de la maladie (figure 2). C'est le cas par exemple de la plupart des pays africains qui sont supposés être une zone à forte incidence de leptospirose alors que la littérature ne mentionne quasiment aucune épidémie. Ce constat a amené, dans leur étude, Costa et ses collaborateurs (2015) à estimer la morbidité mondiale de la leptospirose par pays ou territoire par ajustement en fonction de l'âge et du sexe.

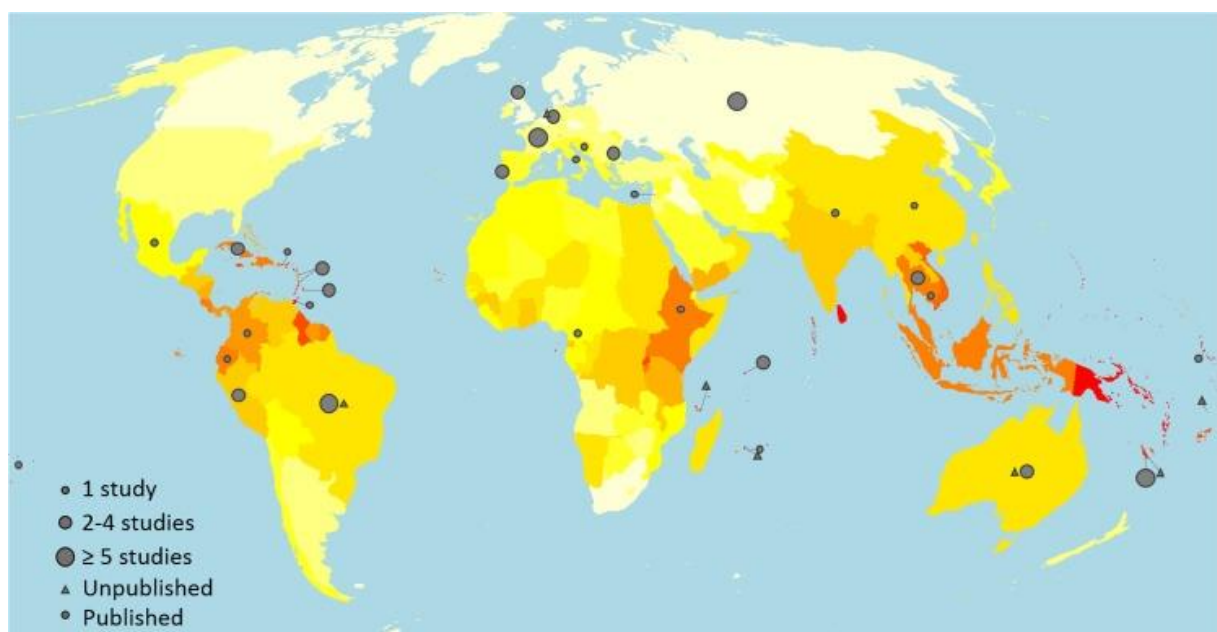


Figure 2 : Morbidité annuelle estimée de la leptospirose par pays ou territoire. (Costa *et al.*, 2015)

L'incidence annuelle de la maladie est représentée par un gradient de couleur exponentiel allant du blanc (0–3), du jaune (7–10), de l'orange (20–25) au rouge (plus de 100), dans les cas pour 100 000 habitants. Les cercles et les triangles indiquent respectivement les pays d'origine des études publiées et de la littérature grise dont la qualité est assurée.

Toujours selon l'étude de Costa et ses collaborateurs (2015), au niveau mondial, la morbidité et la mortalité de la maladie seraient annuellement estimées respectivement à 15 cas et 1 décès, pour 100 000 habitants soit 1,03 millions de malades et 58 000 morts par an (tableau 1).

Tableau I : Estimation annuelle de la morbidité et de la mortalité selon les régions définies par le GBD (Global Burden of Disease) (Costa *et al.*, 2015).

Région GBD	Morbidité ^{ann}	Cas	Mortalité ^{ann}	Décès
Estimation (intervalle de confiance à 95 % de la prédiction)				
Toutes les régions GBD	14.77 (4.38–25.03)	1,030,000 (434,000–1 750,000)	0.84 (0.34–1.37)	58,900 (23,800–95,900)
Pays Asie-Pacifique à revenu élevé	6.95 (2.51–11.87)	14,800 (5,300–25,100)	0.31 (0.13–0.52)	700 (300–1,100)
Asie centrale	5.53 (2.07–9.51)	4,400 (1,600–7,300)	0.29 (0.12–0.49)	200 (100–400)
Asie de l'Est	10.28 (3.58–18.28)	142,000 (49,400–252,000)	0.50 (0.19–0.88)	6,900 (2,600–12,200)
Asie du Sud	17.97 (6.20–32.25)	289,000 (99,800–519,000)	1.02 (0.41–1.71)	16,500 (6,500–27,600)
Asie du Sud-Est	55.54 (20.32–99.53)	266,000 (97,500–477,000)	2.96 (1.65–4.93)	14,200 (5,600–24,000)
Australasie	9.13 (2.79–16.36)	2,400 (700–4,200)	0.40 (0.16–0.69)	100 (0–200)
Caraïbes	50.68 (14.93–87.58)	22,300 (6,700–34,700)	2.90 (1.14–4.72)	1,300 (500–1,900)
Europe centrale	4.02 (1.21–6.85)	4,800 (1,500–8,200)	0.21 (0.08–0.33)	200 (100–400)
Europe orientale	1.43 (0.51–2.69)	2,900 (1,100–5,500)	0.09 (0.04–0.16)	200 (100–300)
Europe occidentale	3.90 (1.45–6.49)	16,300 (6,100–27,100)	0.18 (0.07–0.29)	800 (300–1,200)
Amérique latine andine	21.90 (7.92–39.82)	11,700 (4,200–21,200)	0.96 (0.37–1.68)	500 (200–900)
Amérique latine centrale	15.77 (5.83–27.37)	36,000 (12,300–62,400)	0.68 (0.27–1.15)	1,600 (600–2,600)
Sud de l'Amérique latine	3.87 (1.43–6.74)	2,400 (900–4,100)	0.18 (0.07–0.31)	100 (0–200)
Amérique latine tropicale	13.53 (4.47–26.56)	27,300 (9,000–53,200)	0.66 (0.23–1.28)	1,300 (500–2,600)

^{ann}Les taux annuels de morbidité et de mortalité liés à la leptospirose sont présentés en cas ou en décès, respectivement, pour 100 000 habitants.

Malgré cela, c'est une maladie qui reste sous-estimée du fait de la fréquence des infections asymptomatiques, notamment en zones endémiques (Bharti *et al.*, 2003), de la présentation clinique souvent semblable à de nombreuses autres maladies infectieuses telles que le paludisme ou la dengue (Lozano, 2012) ou encore de la difficulté à établir un diagnostic de certitude (Musso and La Scola, 2013). Même si l'infection a baissé dans certaines régions du globe comme en Europe, elle a réémergé dans d'autres zones urbaines (Jansen *et al.*, 2005 ; Meites *et al.*, 2004 ; Koizumi *et al.*, 2009). C'est par exemple le cas des fréquentes épidémies qui sont observées dans des zones comme le Brésil (Miraglia *et al.*, 2013) ou l'Inde (Kanagavel *et al.*, 2016) ou encore dans d'autres régions tropicales telles que la Malaisie (Benacer *et al.*, 2016) où l'incidence de la leptospirose a augmenté ces dernières années. En Europe, c'est la France qui est le pays le plus touché avec une incidence qui peut être 50 fois plus élevée en France ultra marine qu'en métropole. Le nombre de cas diagnostiqués en France métropolitaine a significativement augmenté durant les dix dernières années, passant de 300 cas en 2014 à environ 600 cas par an actuellement, soit un cas pour 100 000 habitants, et 70 morts par insuffisance rénale, hépatique et parfois atteinte pulmonaire (Bourhy *et al.*, 2017). Outre la France, une augmentation de la maladie a été aussi observée en Hollande (Pijnacker *et al.*, 2016) ou encore en Croatie (Stritof Majetic *et al.*, 2014).

Généralement, les populations les plus sévèrement touchées sont aussi les plus pauvres, notamment les populations des zones rurales ou les populations des favelas en Amérique latine. Outre les conséquences au niveau de la santé, l'infection peut réduire de façon dramatique le revenu familial de ces populations si elle touche par exemple le seul membre travailleur de la famille. Elle peut aussi amener les autres membres de la famille à ne pas pouvoir travailler lorsqu'ils doivent s'occuper du malade ou encore à s'endetter du fait des couts médicaux. Malheureusement, malgré ce constat, la leptospirose reste une maladie peu prise en compte par les pouvoirs publics.

Endémique dans de nombreux pays en développement et ré-émergente dans des régions développées (Strand *et al.*, 2015), de nombreuses études (épidémiologiques, génétiques, écologiques, socio-économiques) sont nécessaires pour une meilleure compréhension et une meilleure gestion de la maladie.

3. Réservoirs et Cycle de transmission

Quelques temps après leur découverte de l'agent étiologique de la leptospirose, l'équipe japonaise a décrit le rôle du rat comme porteur asymptomatique de la bactérie (Ido *et al.*, 1917). Cette découverte a fortement contribué à la compréhension des principes épidémiologiques de transmission de la bactérie par un animal porteur tout en permettant la mise en place de mesures de contrôle de la maladie et d'expérimentation sur les réservoirs animaux potentiels. De nombreuses années se sont écoulées avant que d'autres espèces animales domestiques ou sauvages soient reconnues comme sources excrétrices de leptospires et que le caractère zoonotique de la maladie soit accepté (Faine *et al.*, 1999a). Par exemple au niveau de la faune sauvage, outre les rongeurs (rats et souris) considérés comme les principaux réservoirs des leptospires (Levett, 2001), il a été montré que les érinacéidés et les mustélidés jouent un rôle dans le maintien de certaines souches dans l'environnement (Ayrat *et al.*, 2016 ; Wong *et al.*, 2012). Quant aux espèces domestiques, les bovins pourraient être considérés comme réservoir du serovar Hardjo (Lilenbaum *et al.*, 2014 ; Fávero *et al.*, 2017). Ces hôtes réservoirs qui tolèrent la présence de la bactérie et donc concourent à sa survie sur du long terme doivent être distingués des hôtes accidentels. Ces derniers qui ne sont pas nécessaires à la persistance des leptospires dans l'environnement y sont sensibles avec des signes cliniques allant de bénins à mortels (Ashford *et al.*, 2003).

Toutefois, la distinction entre ces deux types d'hôtes n'est pas toujours claire. En effet, certaines espèces jouant le rôle de réservoir pour un serovar donné, peuvent manifester des signes cliniques graves voire succomber à d'autres serovars (Goarant *et al.*, 2016). Des associations entre différents serovars de leptospires et un ou plusieurs hôtes permettant leur maintien sur le long terme ont pu être établies comme indiqué dans le tableau ci-après (Bharti *et al.*, 2003).

Tableau II : Hôtes réservoirs typiques des serovars communs de *Leptospira* (Bharti *et al.*, 2003)

Hôtes réservoirs	Serovar(s)
Porcs	Pomona, Tarassovi
Bovins	Hardjo, Pomona
Chevaux	Bratislava
Chiens	Canicola
Ovins	Hardjo
Ratons-laveurs	Grippotyphosa
Rats	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Souris	Ballum, Arborea, Bim
Marsupiaux	Grippotyphosa
Chauve-souris	Cynopteri, Wolffi

La leptospirose reste l'une des infections zoonotiques les plus courantes et répandues dans le monde (Levett, 2001). Cela est dû à la diversité de souches de leptospires mais aussi d'hôtes pouvant être potentiellement infectés. La plupart des espèces mammaliennes allant même à certains mammifères marins peuvent contracter la maladie (Babudieri, 1971 ; Vedros *et al.*, 1971, Bharti *et al.*, 2003 ; Adler and Moctezuma, 2010 ; Desvars *et al.*, 2011).

Le cycle de transmission de la leptospirose est assez complexe avec beaucoup de zones d'incertitude. Mais de façon générale, ce cycle se compose d'une phase d'excrétion urinaire par les hôtes de maintenance permettant la dissémination et la persistance de la bactérie dans l'environnement et d'une phase de contamination d'un nouvel hôte via la peau ou les muqueuses rentrant en contact avec un environnement souillé (Figure ci-après).

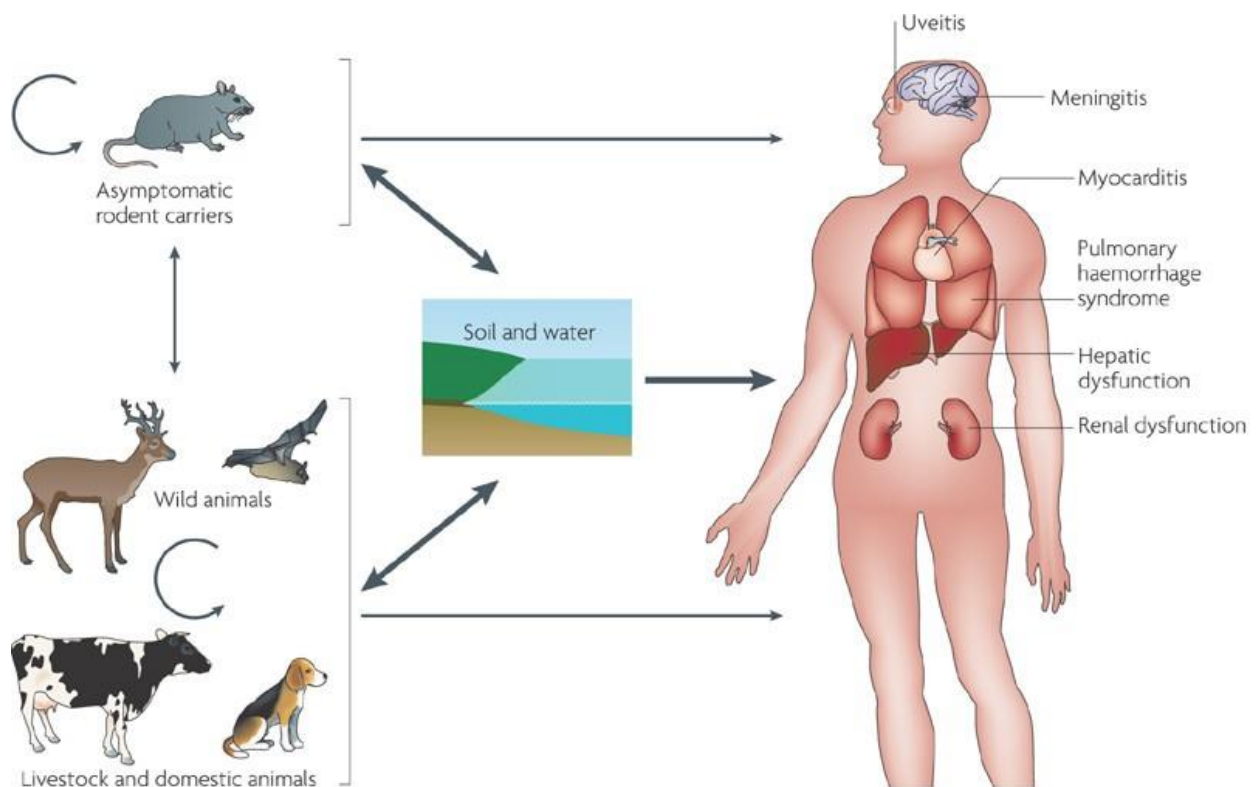


Figure 3 : Cycle d'infection de la leptospirose (Ko *et al.*, 2009)

Le mode principal de contamination de l'homme qui représente un hôte accidentel dans le cycle d'infection des leptospires reste percutané. Toutefois, de rares cas de transmission directe interhumaine ont été décrits (Adler, 2015). En outre, des données semblent imputer à l'homme un rôle partiel dans la dissémination des leptospires puisqu'il a été retrouvé des cas d'excrétion urinaire à distance de toute infection aiguë (Ganoza *et al.*, 2010).

4. Manifestations cliniques de la leptospirose

a. La leptospirose humaine

La leptospirose humaine est une maladie de présentation clinique protéiforme. Après la contamination en général au travers des muqueuses ou de la peau abrasée en contact avec un environnement (eau, sol) souillé, les leptospires établissent rapidement une infection systémique en traversant les barrières tissulaires et par invasion du système sanguin (Faine *et al.*, 1999a). La symptomatologie est assez variable allant d'un simple syndrome grippal spontanément résolutif jusqu'à une forme ictéro-hémorragique grave associée à une défaillance multi-viscérale pouvant entraîner la mort (Levett, 2001 ; Bharti *et al.*, 2003).

Cette variabilité de signes cliniques dépendrait de certains paramètres notamment la virulence de la souche incriminée (*Grippytyphosa* : syndrome grippal, *Icterohaemorrhagiae* : forme sévère) (HAS, 2011), l'importance de l'inoculum contaminant, la porte d'entrée et les facteurs génétiques individuels (Levett, 2001 ; Bharti *et al.*, 2003).

Après une phase d'incubation silencieuse moyenne de 7 à 12 jours mais pouvant s'étendre de 3 à 30 jours (Haake and Levett, 2015), les premiers signes cliniques se manifestent avec la survenue d'une hyperthermie soudaine, de myalgies, de nausée, de malaises, de céphalées, d'hyperhémie conjonctivale et éventuellement d'éruption cutanée. Ce syndrome pseudo-grippal qui peut durer deux à trois jours, reste au stade subclinique dans la majorité des cas de leptospirose et s'interrompt sans laisser de séquelles (Levett, 2001).

Toutefois, dans 10% des cas (Fraga *et al.*, 2015), ce syndrome peut être suivi par une aggravation brutale des symptômes (maladie de Weil), conséquence de l'atteinte et du dysfonctionnement de multiples organes. L'ictère, témoin de l'atteinte hépatique est alors fréquent et en général les patients guéris de la forme ictérique de la maladie retrouvent une fonction hépatique normale. Une insuffisance rénale est aussi très souvent observée et est responsable de la mort de 50% des cas sévères de leptospirose (Fraga *et al.*, 2015).

Des manifestations hémorragiques fréquentes complètent le tableau clinique des formes graves de la maladie. Même si la thrombocytopénie est couramment rencontrée dans ces situations, les taux insuffisants ne permettent pas d'expliquer les saignements. Habituellement, ces saignements sont légers et intègrent pétéchies, ecchymoses et épistaxis. Toutefois, certains cas présentent de sévères hémorragies digestives (méléna, hématomèse) et pulmonaires (hémoptysies). Ces hémorragies pulmonaires peuvent être à l'origine d'un syndrome de détresse respiratoire aigu, nécessitant une prise en charge par ventilation mécanique (Adler, 2015).

Par ailleurs, il n'est pas rare que les patients atteints de leptospirose présentent d'autres complications plus anecdotiques telles que des complications cardiaques dont la fréquence est très certainement sous-estimée, des atteintes cérébro-méningées, des uvéites uni ou bilatérales, des pancréatites ou encore des douleurs articulaires. De ces différentes formes graves, les principaux facteurs pronostics négatifs reconnus sont associés à l'insuffisance rénale aiguë oligurique et l'atteinte respiratoire dans le cadre du syndrome hémorragique pulmonaire (Dupont *et al.*, 1997).

b. La leptospirose animale

La leptospirose chez les animaux est omniprésente. Elle a été trouvée dans presque toutes les régions, à l'exception des régions polaires, et dans pratiquement toutes les espèces animales avec un tableau clinique pouvant varier selon l'espèce. Selon leur statut (hôtes réservoirs ou hôtes sensibles), les animaux sont susceptibles de contracter la maladie ou de participer à sa dissémination.

Les hôtes réservoirs sont principalement rencontrés dans la faune sauvage au sein de laquelle le rat constitue le principal réservoir de la maladie (Levett, 2001). La plupart de ces hôtes présenteront des formes asymptomatiques pour lesquelles, il y aura peu ou pas de signes caractéristiques de la leptospirose. Les hôtes sensibles qui se retrouvent généralement parmi les animaux de compagnie (chiens) mais aussi d'élevage (bovins, chèvres, moutons, chevaux, porcs) sont contaminés de manière accidentelle par les leptospires. Chez ces derniers, on retrouve différentes formes de la maladie en raison de la diversité des symptômes associés. Classiquement, les formes typiques rencontrées sont la forme rénale, la forme ictérique ou hépatique. Toutefois, on y rencontre des signes cliniques moins fréquents permettant de définir des formes atypiques telles que la forme respiratoire, la forme méningée ou encore d'autres formes d'aspects subcliniques (Faine *et al.*, 1999b).

Chez les animaux de compagnie notamment le chien, l'infection par *Leptospira* est probablement inapparente dans la majorité des cas (Prescott *et al.*, 2008). Toutefois, lorsqu'elle se manifeste, la sévérité de la maladie est fonction de la souche infectante, elle-même liée à la localisation géographique et de la réponse immunitaire de l'hôte. Ainsi, alors que certains chiens présenteront des signes mineurs après infection, d'autres développeront une forme grave pouvant conduire à la mort (Goldstein, 2010). Lorsque la maladie se présente sous la forme aiguë, le spectre clinique est très similaire à celui de la leptospirose humaine. Deux types de formes aiguës sont décrites. La première se manifeste sous la forme d'une gastro-entérite associée à des hémorragies digestives. Selon HIGGINS (1981), la diathèse hémorragique serait l'une des manifestations les plus typiques de cette forme de leptospirose. La seconde forme aiguë ictéro-hémorragique est typique de la maladie de Weil. Moins fulgurante que la précédente mais toute aussi fatale, elle a un tropisme principalement hépatique. L'atteinte hépatique qui se manifeste par de l'ictère est associée à de multiples pétéchies et œdèmes mais aussi à une atteinte rénale (Faine *et al.*, 1999b ; Prescott *et al.*, 2008). Outre ces formes aiguës, des cas chroniques même s'ils sont rares peuvent être observés et se manifestent par une uvéite ou des troubles de la reproduction (Sykes *et al.*, 2011 ; André-Fontaine, 2006).

Tandis que le chien semble particulièrement sensible à la maladie, le chat quant à lui est plutôt un porteur chronique de la leptospirose étant donné que peu de cas aigus y ont été décrits (Hartmann *et al.*, 2013). De plus, les infections expérimentales ont permis de montrer une leptospirémie et une leptospirurie chez les chats mais pas une sévérité de la maladie (Larsson *et al.*, 1985). Il pourrait donc être considéré comme un hôte réservoir des leptospires et contribuer à la contamination de l'environnement (Jamshidi *et al.*, 2009).

Concernant les animaux de rente, on observe peu de cas de leptospirose aiguë. Chez les bovins, la forme clinique chronique de la maladie provoque de nombreux troubles reproductifs (avortements, baisse de la production de lait) (Faine *et al.*, 1999a) ou une infection persistante du tractus génital (Lilenbaum and Martins, 2014) responsables de pertes économiques considérables pour l'éleveur. Dans les rares cas d'infection aiguë rencontrés particulièrement chez les jeunes, les signes cliniques observés sont une diminution de l'appétit, l'apparition d'un ictère (Perez *et al.*, 1983) et une diarrhée séreuse, hémorragique avec épreinte et ténésme (Rautureau, 2003).

Chez les petits ruminants, les formes frustes sont également les plus fréquentes (Ciceroni *et al.*, 2000) avec possibilité de transmission vénérienne de la bactérie comme chez les bovins (Lilenbaum *et al.*, 2008). On retrouve les mêmes problèmes de reproduction (mortalité et surtout avortements). Quelques rares cas de leptospirose aiguë ont été observés et les jeunes animaux semblaient y être sensibles. On notait dans ce cas de l'anorexie, un état d'abattement, une hémoglobinurie et de l'ictère (Acha and Szyfres, 1989).

Les chevaux quant à eux présentent une infection très souvent asymptomatique même si les anticorps sont fréquemment mis en évidence chez des animaux sains (Donahue *et al.*, 1995). Généralement, des problèmes notamment de placentites et d'avortements tardifs ou encore de morts nés sont observés chez les juments gestantes (Verma *et al.*, 2013 ; Timoney *et al.*, 2011). Toutefois, des cas graves avec atteinte rénale ou encore hépatique ont été diagnostiqués chez des poulains (Verma *et al.*, 2013). Outre ces différentes situations, la forme clinique la plus fréquente est une uvéite (Verma *et al.*, 2013 ; Ellis, 2015) accompagnée de la présence d'anticorps spécifiques dans l'humeur aqueuse et vitrée (Verma *et al.*, 2010). Expérimentalement, il a été montré que l'uvéite apparaissait 12 à 24 mois après l'inoculation des leptospires (Williams *et al.*, 1971). La persistance ou la récurrence de l'uvéite serait à l'origine de troubles de la vision et de lésions oculaires (atrophie de l'iris, opacification de la cornée et/ou du cristallin, blépharospasme, larmoiement, œdème de la cornée, hypopion, détachement rétinien, voire cécité) (Sandmeyer *et al.*, 2007 ; Wada *et al.*, 2003 ; Brem *et al.*, 1999).

Chez les porcs, généralement porteurs asymptomatiques, les seuls signes souvent observés de la leptospirose sont l'infertilité, les avortements tardifs le plus souvent, la contamination des porcelets par voie transplacentaire et la mortinatalité ou la naissance de porcelets faibles ou malades (Kazami *et al.*, 2002 ; Boqvist *et al.*, 2002). Outre ces troubles de la reproduction ayant un fort impact économique (Bolin, 1994), d'autres formes notamment subcliniques (néphrites interstitielles chroniques conduisant à la saisie des reins à l'abattoir), modérées (fièvre, anorexie, retards de croissance) et sévères (fièvre, ictère, hémorragie, mort) peuvent se manifester (Faine *et al.*, 1999a). Il faut souligner que la transmission vénérienne de la maladie par contamination de la semence par les urines de l'animal infecté est possible chez cet animal (Oriol and Hayward 1974 ; Ellis *et al.*, 1986).

On constate bien que la leptospirose est une maladie aux conséquences désastreuses. Malheureusement, son importance au niveau mondial continuera probablement à prendre de l'ampleur. En effet, les conditions climatiques et démographiques futures pourraient engendrer une augmentation considérable de l'incidence de la maladie ainsi que du nombre d'épidémies (Lau *et al.*, 2010).

5. Facteurs de risques

a. Facteurs de risque liés aux conditions climatiques

Concernant les conditions climatiques, le réchauffement climatique illustre bien le risque d'augmentation de l'incidence de la maladie. Selon les travaux de McMichael et ses collaborateurs (2006), une augmentation des températures mondiales de 1,4 à 5,8°C est à prévoir d'ici 2100. Sachant que la température optimale de croissance des leptospires se situe entre 28 et 30°C, cette augmentation de la température est propice à leur survie dans l'environnement (Levett, 2001). De plus, ce réchauffement provoque l'évaporation des eaux de surfaces, ce qui conduit à une concentration des populations animales et humaines autour des mêmes points d'eau, diminuant ainsi l'effet de dilution des urines contaminées dans une grande étendue d'eau (Dufour *et al.*, 2008).

Par ailleurs, de nombreuses études ont permis également d'établir un lien entre la survenue d'évènements climatiques extrêmes telles que les inondations, et ce dans diverses régions notamment au Brésil (Barcellos and Sabroza 2001), au Laos (Kawaguchi *et al.*, 2008), en Inde (Pappachan *et al.*, 2004), en Australie (Smith *et al.*, 2013), aux Philippines (Amilasan *et al.*, 2012), en Malaisie (Mohd Radi *et al.*, 2018 ; Garba *et al.*, 2017), et l'apparition de la maladie.

Ces phénomènes climatiques, devenant de plus en plus fréquents et intenses (Solomon, 2007), engendrent des mouvements et une concentration des populations humaines et animales dans les mêmes zones épargnées, ce qui favorise le contact entre les hommes et les animaux, hôtes des leptospires (Watson *et al.*, 2007).

b. Facteurs de risque socio-économiques

En dehors des facteurs environnementaux qui impactent très souvent l'incidence de la leptospirose, les facteurs socio-économiques ne sont pas à négliger. En effet, la croissance démographique mondiale est à l'origine d'une urbanisation grandissante favorisant malheureusement aussi des zones d'habitats défavorisées telles que les bidonvilles où les conditions sanitaires précaires permettent la prolifération des rongeurs et donc augmentent le risque infectieux (Lau *et al.*, 2010). Des études ont montré que l'incidence de la maladie était plus importante dans les populations vivant à proximité d'une décharge à ciel ouvert (Reis *et al.*, 2008 ; Sugunan *et al.*, 2009) que chez celles des zones socialement plus riches (WHO, 2010 ; Maciel *et al.*, 2008).

En outre, appelée « Jaunisse des cultivateurs de riz » anciennement en langue chinoise, la leptospirose est une affection à laquelle seraient fortement exposées les personnes travaillant dans les rizières qui sont des zones très humides avec notamment la présence de rongeurs en saison de récolte, ce qui favoriserait la transmission des leptospires (Sharma *et al.*, 2006). En juin 2014, une épidémie avait été signalée parmi les cueilleurs de fraises polonais saisonniers travaillant en Allemagne (Bundesinstitut, 2014). Outre les agriculteurs, d'autres métiers sont qualifiés de professions à risque notamment les égoutiers, les forestiers, les personnes en contact avec les animaux (fermiers, personnels d'abattoirs, pêcheurs, vétérinaires...), ainsi que les mineurs (Sharma *et al.*, 2006 ; Waitkins, 1986 ; Katz *et al.*, 2002 ; Demers *et al.*, 1985).

c. Facteurs de risque liés aux loisirs

L'exposition à la leptospirose à travers les activités de loisirs n'est pas lointaine puisqu'avec le développement du tourisme, des activités nautiques et autres sports pratiqués dans des zones humides, en zones tempérées (Abb, 2002 ; Guarner *et al.*, 2001 ; Morgan *et al.*, 2002) et tropicales (Wilkins *et al.*, 1988 ; Gelman *et al.*, 2002 ; Sejvar *et al.*, 2003), de nombreux cas liés à ces activités ont été établis. Comme exemples, nous pouvons citer entre autres celui de Bornéo en Malaisie où une vingtaine de cas de leptospirose avait été identifiés à la suite de l'EcoChallenge-Sabah, une course d'endurance multisports, qui avait eu lieu du 21 août au 1er septembre 2000 (Sejvar *et al.*, 2003 ; Haake *et al.*, 2002) ou encore celui de Springfield dans

l'illinois en 1998 où trois athlètes avaient été hospitalisés pour leptospirose après un triathlon (Morgan *et al.*, 2002). Également, en 2009, la maladie a été diagnostiquée chez des coureurs après la course "Tchimbe-Raid" en forêt tropicale en Martinique (Hochedez *et al.*, 2011).

D'autres situations de leptospirose ont été mises en lien avec la pratique de sport comme le rafting (Wilkins *et al.* 1988 ; CDC, 1997) ou le canoë-kayak (Boland *et al.*, 2004). C'est le cas en septembre 2016 où un groupe de 14 kayakistes avaient présenté des signes de leptospirose après avoir signalé des contacts avec la rivière Vilaine en Bretagne dans le nord-ouest de la France (Guillois *et al.*, 2018)

Par ailleurs, des activités courantes et simples, telles que le jardinage ou la pêche en eau douce sont aussi des activités qui pourraient exposer les pratiquants aux leptospires (Douglin *et al.*, 1997 ; Lévesque *et al.*, 2007).

Avec l'augmentation des pratiques de loisirs en pleine nature mais surtout des changements climatiques, la leptospirose pourrait devenir une maladie plus fréquente des services de médecine aussi bien des pays en développement tropicaux que des pays riches tempérés, d'où la nécessité de bons outils de diagnostic.

6. Diagnostic

Comme vu précédemment (cf Chapitre Manifestations cliniques de la leptospirose), les signes cliniques de la maladie sont pour la plupart peu spécifiques, à l'exception du syndrome de Weil, et l'expression clinique de la maladie est protéiforme, ce qui rend le diagnostic clinique difficile à établir. Le recours à des méthodes diagnostiques de laboratoire est donc essentiel pour confirmer le diagnostic de la leptospirose. Ces méthodes peuvent être rassemblées suivant 3 domaines à savoir la mise en évidence de la bactérie par microbiologie standard (microscopie et culture), par sérologie et par biologie moléculaire (Picardeau, 2013 ; Haake and Levett, 2015 ; Rajapakse *et al.*, 2015).

a. Observation directe et culture

En cas de suspicion de leptospirose, la recherche des leptospires par observation directe au microscope à fond noir peut être entreprise sur du sang, de l'urine ou encore du liquide céphalo-rachidien. Par cette méthode, le biologiste peut voir les leptospires se mouvoir, ce qui est très évocateur du diagnostic dans un contexte clinique compatible, bien que non spécifique. Malheureusement, cette technique est peu sensible : un seuil de 10^4 leptospires/ml étant requis pour qu'une bactérie par champ soit visible (Budihal and Perwez, 2014).

De plus, elle requiert une certaine expérience pour identifier les leptospires et éviter les faux positifs par confusion avec des débris cellulaires ou des filaments de fibrine (WHO, 2003).

Différentes méthodes de coloration des leptospires notamment des techniques d'immunofluorescence directe, d'imprégnation à l'argent, d'immunohistochimie ou encore d'hybridation *in situ* ont été mises en place pour pallier le problème de faible sensibilité de l'observation directe des prélèvements. Cependant, toutes ces méthodes souffrent des mêmes défauts entre autres les nombres élevés de faux positifs et de faux négatifs que la microscopie à fond noir (Musso and La Scola, 2013).

Ainsi, bien que peu coûteuse pour les laboratoires en possession de microscope à fond noir (Picardeau, 2013), l'usage de cette technique est de plus en plus restreint. Ayant une valeur d'orientation, l'examen direct doit être confirmé par la mise en culture des bactéries (Cf caractéristiques culturales des leptospires).

En pratique, même si cette technique reste le « gold standard », elle est rarement utilisée pour le diagnostic de routine. Toutefois, son importance est avérée lors de l'isolement et l'analyse des souches dans le cadre des études épidémiologiques (Marquez *et al.*, 2017). Pour le diagnostic de routine, des tests plus rapides sont privilégiés.

b. Sérologie

Les tests sérologiques sont très utilisés à travers le monde à cause de la rapidité de réponse diagnostique, de leur faible coût et de leur sensibilité (Signorini *et al.*, 2013). Ils sont basés sur la détection directe ou indirecte d'anticorps (IgM et IgG) dirigés contre la bactérie dans les sérums.

Le gold standard en matière de test sérologique est le test d'agglutination microscopique ou MAT (Goris and Hartskeerl, 2014). Ce test de référence consiste à mettre en contact différentes dilutions du sérum à tester avec un panel de souches de leptospires vivantes, appartenant à différents sérogroupes afin d'induire une agglutination dont le taux sera évalué par observation au microscope à fond noir. Le titre agglutinant considéré étant la plus forte dilution de sérum pour laquelle 50% des leptospires sont agglutinés, le MAT permet d'identifier très souvent avec certitude le sérotype infectant (Levett, 2001). Malheureusement, sa précision n'est pas suffisante pour discriminer les réactivités croisées qui existent entre les serovars d'un même serogroupe ou entre serogroupes (Levett, 2001 ; Maciel *et al.*, 2008).

De plus, certains inconvénients sont à déplorer notamment la nécessité de maintenir en culture des souches de leptospires représentatives au minimum de l'ensemble des serovars circulant dans l'aire géographique considérée, ou si les serovars circulant sont inconnus, de tous les serogroupes connus pour éviter des résultats faussement négatifs (Musso and La Scola, 2013), la réalisation dans certains cas de deux prélèvements à une semaine d'intervalle repoussant ainsi le délai d'obtention du diagnostic (McBride *et al.*, 2005), la faible sensibilité du test généralement au début de la phase aiguë de la maladie (Goris and Hartskeerl, 2014), et de la difficulté de standardiser le test du fait de l'utilisation de leptospires vivants en tant qu'antigènes.

Un autre test largement répandu est le test ELISA (technique d'immuno-absorption par enzyme liée). Il permet de détecter la présence d'anticorps IgM anti-leptospires. C'est un test spécifique du genre *Leptospira* étant donné que très souvent l'antigène utilisé est celui de la bactérie non pathogène *Leptospira biflexa* Patoc partagé par l'ensemble du genre *Leptospira* (Musso and La Scola, 2013). Disponible généralement sous forme de kits commercialisés, le test ELISA peut aussi être fait avec une mixture d'antigènes issues de souches bactériennes locales tels que LipL32 (Bomfim *et al.*, 2005 ; Aviat *et al.*, 2010 ; Chalayon *et al.*, 2011), LipL36 (Flannery *et al.*, 2001), LipL41 (Flannery *et al.*, 2001), Loa22 (Chalayon *et al.*, 2011), OmpL1 (Flannery *et al.*, 2001), ou encore Hsp58 (Flannery *et al.*, 2001). Même si sa sensibilité est supérieure à celle de la MAT pendant la première phase de la maladie (Goris and Hartskeerl, 2014), ce test ne permet pas de distinguer le serogroupe/serovar responsable de l'infection.

De ce fait, cette méthode est utilisée en première intention, ce qui permet un dépistage précoce et la mise en place rapide du traitement (Rosa *et al.*, 2017). L'OMS recommande que la confirmation de ce test soit validée par un autre test, idéalement le MAT (WHO, 2003).

En plus de ces deux techniques, de nombreux autres tests sérologiques ont été développés notamment le test de fixation du complément, l'immunofluorescence, l'hémagglutination, le test de lyse des érythrocytes sensibilisés... (Levett, 2001). Malheureusement, souffrant très souvent d'un défaut de sensibilité et/ou de spécificité, ils ne sont pas largement utilisés (Picardeau, 2013).

c. Méthodes PCR

De nos jours, les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) sont une technique de routine pour le dépistage précoce de la leptospirose. Basée sur la détection du génome bactérien, la PCR peut être faite de façon « conventionnelle », c'est-à-dire suivie d'une migration sur gel

d'agarose après amplification ou en temps réel (RT-qPCR). Différents gènes tels que *rrs* (gène 16S) (Mérien *et al.*, 1992 ; Thaipadunpanit *et al.*, 2011), gène 23S (Woo *et al.*, 1997), *lipL32* (Thaipadunpanit *et al.*, 2011 ; Levett *et al.*, 2005 ; Stoddard *et al.*, 2009), *lfb1* (Mérien *et al.*, 2005), *secY* (Ahmed *et al.*, 2009), IS1533 (Zuerner *et al.*, 1995) ... peuvent être ciblés dans le cadre de sa mise en œuvre. La technique PCR peut être utilisée à différents stades de la maladie puisqu'elle peut s'appliquer sur différents types d'échantillons notamment du sang, de l'urine, du liquide céphalo-rachidien ou encore du tissu (Levett, 2001). Malgré ses nombreux avantages (rapidité, sensibilité, spécificité), elle reste, en plus de nécessiter un personnel qualifié, relativement coûteuse dans de nombreuses régions endémiques à la maladie (Musso and La Scola, 2013).

7. Traitement et mesures préventives

a. Traitement

Le diagnostic de la leptospirose n'étant pas généralement effectué de façon systématique ou tardivement, et l'expression clinique de la maladie se traduisant très souvent par un syndrome grippal d'intensité variable et disparaissant sans traitement spécifique (Adler, 2015 ; Haake and Levett, 2015), le recours à l'antibiothérapie accompagnée parfois de soins de supports d'organes défaillants (atteintes rénale, hépatique et/ou pulmonaire) s'avère nécessaire dans bien des situations.

En effet, bien que des controverses aient été émises quant à l'intérêt de l'antibiothérapie dans le traitement de la leptospirose chez l'homme (Truccolo *et al.*, 2002), l'usage des antibiotiques reste largement recommandé dans les formes cliniques suspectées ou confirmées (Bourhy *et al.*, 2012 ; Haake and Levett, 2015). Idéalement, l'antibiotique doit être administré de façon précoce pour réduire les risques de défaillances graves induites par les leptospores.

Chez l'homme, le choix des antibiotiques est orienté suivant la forme de la maladie : cyclines ou macrolides pour la forme modérée (Phimda *et al.*, 2007 ; Bourhy *et al.*, 2012) et β -lactamines en intraveineuse en cas de forme grave (Bourhy *et al.*, 2012 ; Adler, 2015). Alors que chez l'animal, le choix se base sur des molécules à large spectre d'hôtes. A titre d'exemple chez les animaux, on peut citer l'utilisation de la doxycycline et la pénicilline chez le chien (Goldstein, 2010), de la céfovécine et de la doxycycline chez le chat (Beaudu-Lange and Lange, 2014), de la streptomycine chez les bovins et les porcs (Ellis, 2015) ou encore de la streptomycine et de la pénicilline chez les chevaux (Verma *et al.*, 2013).

Toujours est-il que malgré cette large gamme d'antibiotiques utilisés, la littérature ne fait mention jusqu'à présent d'aucune résistance signalée à leur égard par une souche clinique. Pourtant, même si tel est le constat, avec la recrudescence des problèmes d'antibiorésistance, les mesures préventives mais aussi alternatives dans lesquelles s'inscrivent mes travaux devraient être privilégiées ou envisagées.

b. Mesures préventives

Elles passent par une approche « One Health » tenant compte des interactions entre l'Homme, les animaux domestiques et sauvages et l'environnement avec pour finalité une réduction de l'exposition aux leptospires (Jancloes *et al.*, 2014). A juste titre, les recommandations faites par l'OMS (2003) illustrent bien ce concept. Il s'agit en autres de :

- ❖ La lutte (dératisation et hygiène locale) contre les rongeurs ;
- ❖ La bonne gestion des résidus alimentaires et des décharges ;
- ❖ L'information et la sensibilisation des populations à risque ;
- ❖ Le port de vêtements et équipements de protection lors d'activités à risque ;
- ❖ La désinfection à l'eau potable et au savon ou à l'aide d'une solution antiseptique de toute plaie ou égratignure, ainsi que la protection ultérieure de cette plaie ou égratignure par un pansement étanche ;
- ❖ L'accès à des sources d'eau potable ;
- ❖ Le drainage des terrains marécageux aux abords des habitations et des locaux d'élevage et/ou l'assèchement des collections d'eau ;
- ❖ La mécanisation de certaines activités à risque comme la récolte de riz ou la coupe de canne à sucre ;
- ❖ La bonne gestion des troupeaux ;
- ❖ La mise en place de procédures de sécurité standards dans les laboratoires...

Par ailleurs, la lutte contre le changement climatique est aussi un levier à considérer dans la lutte contre les épidémies de leptospirose étant donné que des corrélations ont été faites entre l'apparition d'épidémies et les catastrophes naturelles telles que les inondations (Lau *et al.*, 2010).

En plus de toutes les méthodes de prévention déjà énumérées, la vaccination et l'antibioprophylaxie sont à prendre en compte. En effet, concernant la vaccination, elle peut être envisagée aussi bien chez l'homme que chez les animaux.

Chez l'homme, elle est surtout recommandée pour les personnes exerçant des activités professionnelles à risque (égoutiers, travailleurs agricoles ou pisciculture, vétérinaires...) (Bourhy *et al.*, 2012). Même si aucune étude n'a permis d'établir clairement, l'efficacité clinique de la vaccination, son usage permet de fortement prévenir l'apparition de la maladie comme l'ont démontré Martínez et ses collaborateurs dans une étude faite en 2004 à Cuba. En effet, ils ont montré une baisse des infections de près de 80% avec une bonne tolérance après vaccination (Martínez *et al.*, 2004). En France, il existe un unique vaccin humain commercialisé sous l'appellation Spirolept®. C'est un vaccin monovalent obtenu à partir d'une souche inactivée de *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae. Le schéma vaccinal comporte deux injections à 15 jours d'intervalle, un premier rappel entre 3 et 6 mois puis tous les 2 ans (Bourhy *et al.*, 2012). Au niveau international, les vaccins humains ne sont disponibles que dans certains pays. Malheureusement, les pays endémiques à la leptospirose qui sont pour la plupart des pays en voie de développement, n'y figurent pas. Outre le problème de disponibilité, la vaccination humaine présente des contraintes liées entre autres à la fréquence des effets secondaires rapportés, la courte durée de maintien de l'immunité nécessitant la réalisation fréquente de rappels vaccinaux, l'absence de protection vis-à-vis des serovars non inclus dans le vaccin, la connaissance limitée des mécanismes de l'immunité protectrice contre la maladie (Bharti *et al.*, 2003).

Chez les animaux (domestiques et d'élevage surtout), la vaccination est aussi à considérer du fait du lien établi entre la dispersion environnementale des leptospires et le risque d'infection de l'homme ; raison pour laquelle certains pays pratiquent en plus la vaccination des chiens et du bétail (Ellis, 2015 ; Gay *et al.*, 2014).

C'est le cas en Nouvelle-Zélande où Thornley et ses collaborateurs (2002) ont montré dans une étude, la réduction des cas de leptospirose humaine à la suite de la mise en œuvre de la vaccination dans de nombreux élevages. Contrairement au vaccin humain qui a un spectre assez étroit (monovalent) généralement, les vaccins animaux ont un spectre un peu plus large mais présentent aussi plus de complications sévères (Spiri *et al.*, 2017).

Compte tenu du coût de la mise au point mais aussi de l'approvisionnement des vaccins, une autre alternative serait l'antibioprophylaxie. Cette méthode a déjà été utilisée lors d'événements sportifs aquatiques ou d'inondations (Sejvar *et al.*, 2003 ; Chusri *et al.*, 2014). Même si les données actuelles ne sont pas suffisantes pour conclure à l'intérêt de son usage de façon générale dans les régions endémiques lors de fortes intempéries, une étude portant sur l'administration de la doxycycline (200mg par semaine par voie orale) à des soldats américains

en poste au Panama a quand même démontré une diminution de l'incidence de la maladie par rapport au groupe placebo (Takafuji *et al.*, 1984). Toutefois, le recours à cette mesure doit être assez restreinte et se faire dans un cadre contrôlé du fait du risque d'apparition de phénomène d'antibiorésistance qui est un problème de santé publique majeur de nos jours.

Ainsi, bien que nécessaires, la mise en œuvre de la plupart de ces mesures reste souvent difficile, notamment dans les régions où la maladie est endémique du fait de l'insuffisance des ressources financières. De plus, bon nombre d'entre elles ont un effet à long terme, minimisant ainsi leur recours en urgence lors d'épidémies.

Il ressort donc qu'il y a encore de nombreuses recherches à entreprendre pour la maîtrise de cette zoonose mais cela passe par une bonne connaissance de l'agent pathogène.

B. Leptospires : agents de la leptospirose

1. Systématique

Les leptospires appartiennent au règne des bactéries, à l'embranchement des Spirochaetes, à la classe des Spirochaetes, à l'ordre des Spirochaetales, à la famille des Leptospiraceae et au genre *Leptospira*. En se basant sur les homologues des séquences du gène rrs codant l'ARN ribosomal 16S, l'ordre des spirochètes a été subdivisé en quatre familles à savoir Brachyspiraceae, Brevinemataceae, Leptospiraceae, Spirochaetaceae (Gupta *et al.*, 2013). Au sein de la famille des Leptospiraceae, on retrouve 3 genres : *Leptospira*, *Leptonema* et *Turneriella* (Levett *et al.*, 2005) qui se distinguent entre autres par la quantité de bases GC de leur génome. Elle est de 33-43% pour *Leptospira*, 53,6% pour *Turneriella* et 54% pour *Leptonema* (Stackebrandt *et al.*, 2013 ; Yasuda *et al.*, 1987).

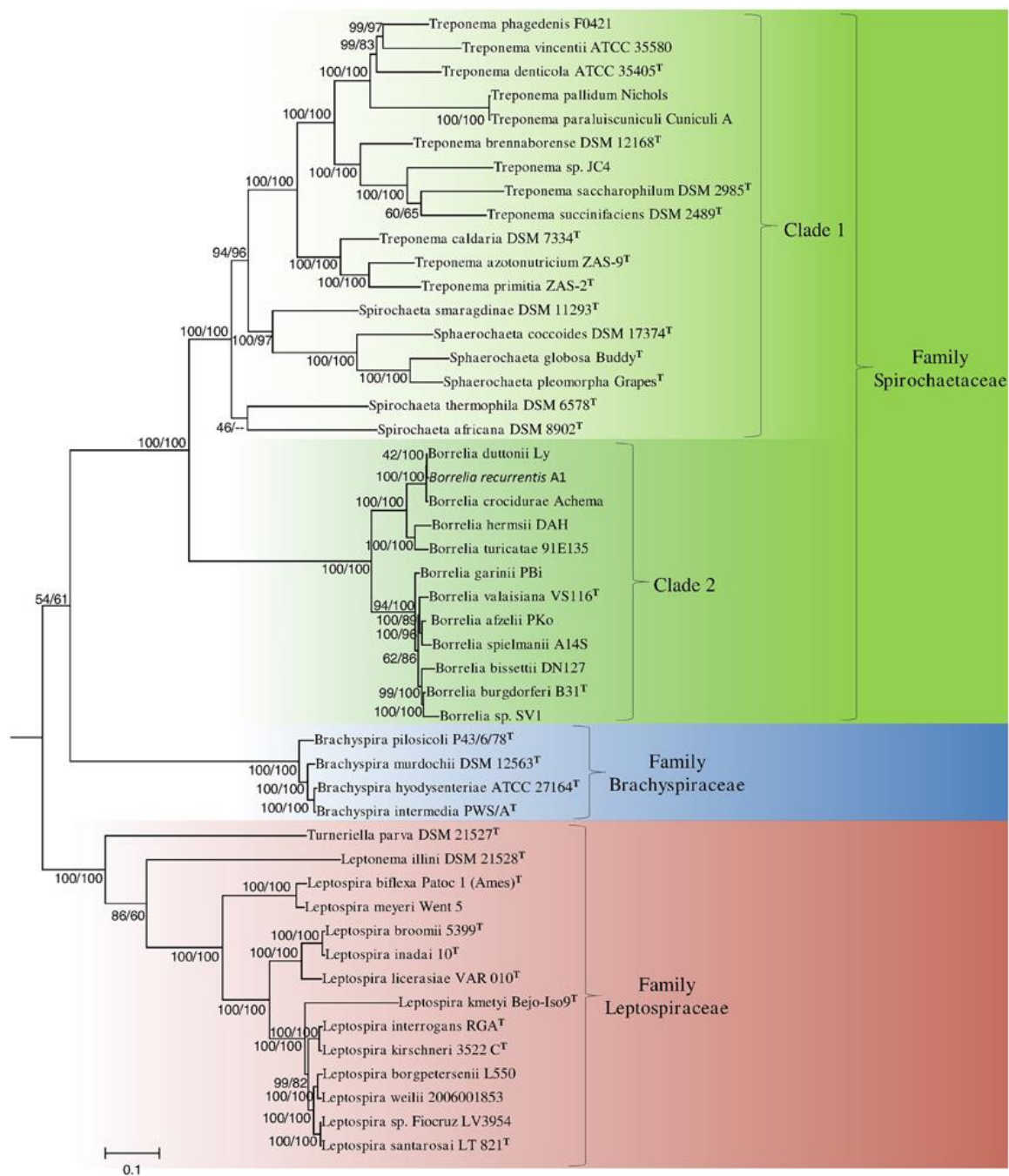


Figure 4 : Arbre phylogénétique des Spirochètes séquencés basé sur l’alignement de séquences en acides aminés de 22 protéines conservées (Gupta *et al.*, 2013).

Les spirochètes incluent donc un grand nombre de bactéries réparties dans différents environnements à l’échelle planétaire (Harwood and Canale-Parola, 1984). On les retrouve aussi bien dans le sol, les lacs, les sédiments, les boues, les mers en association ou non avec des hôtes allant des mammifères aux mollusques jusqu’à l’intestin des termites avec *Treponema primitia* (Graber *et al.*, 2004).

Certaines d'entre elles ont une importance médicale puisque responsables de pathologies aussi bien chez l'homme que chez les animaux. On peut citer entre autres chez l'homme, la syphilis (*Treponema pallidum*), la maladie de Lyme (*Borrelia burgdorferi*), la leptospirose (*Leptospira spp.*) ... ou encore la dysenterie porcine (*Brachyspira hyodysenteriae*) chez l'animal.

2. Classifications

Les différentes classifications ont été envisagées afin de séparer au mieux les bactéries composant le genre *Leptospira*.

a. Classification phénotypique

La pathogénicité est le critère fondamental de cette classification. Elle a permis de distinguer le genre *Leptospira* en deux espèces : *Leptospira interrogans* « sensu lato » regroupant toutes les espèces pathogènes chez l'homme et l'animal et *Leptospira biflexa* « sensu lato » rassemblant toutes les espèces saprophytes isolées de l'environnement (Dikken and Kmety, 1978). Outre le critère de pathogénicité, d'autres caractéristiques peuvent permettre de distinguer les deux catégories de leptospires notamment la motilité, la croissance à 13°C, la sensibilité à la 8-azaguanine.

Tableau III : Caractéristiques distinctives des deux catégories de leptospires.

Caractéristiques	Pathogènes	Saprophytes	Source
Motilité	++	+	Takabe <i>et al.</i> 2013
Croissance à 13°C	-	+	Johnson and Harris, 1967
Résistance à la 8-azaguanine	-	+	Johnson and Rogers, 1964
Temps de génération à 30°C	14 - 18h	6 - 8h	Adler, 2015
Formation de cellules sphériques dans une solution de chlorure de sodium concentrée à 1mol/L	+	-	Levett, 2001

La taille des leptospires peut parfois être utilisée aussi comme critère distinctif vu que très souvent les leptospires pathogènes semblent plus petits que les souches saprophytes. Toutefois, ce critère peut varier en fonction des conditions de cultures (Satou *et al.*, 2015).

De nos jours, cette classification, considérée comme inexacte, est de plus en plus abandonnée étant donné que malgré toutes ces informations, la confirmation de la pathogénicité d'une souche de leptospires requiert en général des tests de virulence sur animal. En effet, des études menées par Thibeaux et ses collaborateurs (2018) ont montré que des souches initialement classées parmi la catégorie des pathogènes, n'étaient pas virulentes chez l'animal.

b. Classification sérologique

Classification historique encore utilisée par les épidémiologistes (Bharti *et al.*, 2003), elle repose sur la formation de complexes anticorps-antigènes lors de la mise en contact d'une souche de leptospire avec un sérum spécifique (Picardeau, 2013). En effet, du fait de la grande variabilité antigénique au sein du genre *Leptospira*, le critère du pouvoir agglutinant a permis de séparer les leptospires et de définir la notion de serovar, correspondant à une entité possédant une unité antigénique. C'est ainsi que plus de 260 serovars pour les leptospires pathogènes et plus de 60 pour les saprophytes ont été décrits (Adler and Moctezuma, 2010). Cette liste n'est d'ailleurs pas exhaustive. L'identification du serovar se fait à partir de la méthode CAAT (cross agglutination adsorption test) en se basant sur les lipopolysaccharides de surface (Cerqueira and Picardeau, 2009). Étant donné que certains serovars avaient une proximité antigénique assez forte, il a été défini la notion de serogroupe pour les rassembler (Guerra *et al.*, 2009). Le serogroupe le plus connu est *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae, dont le nom illustre bien un tableau clinique répandu de la maladie associant ictère et hémorragies, notamment pulmonaires. La méthode CAAT étant longue, coûteuse, complexe, donc difficile à mettre en œuvre, elle a été remplacée par le MAT (microscopic agglutination test) qui a été développé en 1918 par Martin et Pettit (Martin and Pettit, 1918). Malheureusement, cette méthode, en plus de présenter l'inconvénient de limiter l'identification qu'au serogroupe et non au serovar (Levett, 2001), nécessite le maintien de cultures vivantes de souches de référence.

Par ailleurs, les éléments de surface notamment les lipopolysaccharides sur lesquels se fondent la détermination du serovar, peuvent subir un transfert génétique horizontal entre espèces différentes (Haake and Levett, 2015) ; ce qui a pour conséquence un partage de mêmes serovars par différentes espèces (Levett, 2001 ; Picardeau, 2013) (tableau 4).

Tableau IV : Serovars retrouvés chez diverses espèces de leptospires. (Caimi *et al.*, 2020).

Serovar(s)	Espèces
Erinaceiauriti	<i>L. alexanderi</i> - <i>L. kirschneri</i>
Lichuan	<i>L. alexanderi</i> - <i>L. inadai</i>
Nanla	<i>L. alexanderi</i> - <i>L. interrogans</i>
Weaveri	<i>L. alexanderi</i> - <i>L. santarosai</i>
Kenya	<i>L. borgpetersenii</i> - <i>L. mayottensis</i>
Anhoa, Mini, Whitcombi, Worsfoldi	<i>L. borgpetersenii</i> - <i>L. weilii</i>
Mozdok	<i>L. borgpetersenii</i> - <i>L. kirschneri</i>
Sejroe, Tarassovi, Yaan	<i>L. borgpetersenii</i> - <i>L. santarosai</i>
Kremastos, Pyrogenes, Szwajizak, Trinidad	<i>L. interrogans</i> - <i>L. santarosai</i>
Bim, Bulgarica, Dadas, Grippytyphosa, Grippytyphosa type	<i>L. interrogans</i> - <i>L. kirschneri</i>
Moskva, Honghe, Mujunkumi, Mwogolo, Paidjan, Ratnapura, Ramisi, Sokoine, Valbuzzi, Schueffneri	
Australis, Autumnalis, Guidae, Saxkoebing, Tonkini	<i>L. interrogans</i> - <i>L. borgpetersenii</i>
Icterohaemorrhagiae, Lyme	<i>L. interrogans</i> - <i>L. inadai</i>
Guaratuba, Fortbragg, Pomona, Proechimys	<i>L. interrogans</i> - <i>L. noguchii</i>
Perameles	<i>L. interrogans</i> - <i>L. meyeri</i>
Rushan	<i>L. interrogans</i> - <i>L. alstonii</i> – <i>L. noguchii</i>
Mengma	<i>L. interrogans</i> - <i>L. weilii</i>
Kambale	<i>L. kirschneri</i> - <i>L. santarosai</i>
Mangus	<i>L. noguchii</i> - <i>L. inadai</i>
Hardjo	<i>L. interrogans</i> - <i>L. borgpetersenii</i> - <i>L. meyeri</i>
Kunming, Pomona	<i>L. interrogans</i> - <i>L. kirschneri</i> – <i>L. borgpetersenii</i>
Bataviae, Kunming	<i>L. interrogans</i> - <i>L. kirschneri</i> – <i>L. noguchii</i>

Les données sont tirées de différentes bases de données : PubMLST (Public databases for molecular typing and microbial genome diversity), le centre de références de la leptospirose des Pays-Bas, NCBI (National Center for Biotechnology Information) ; et basé sur Levett, 2001 (Levett, 2001), Bharti et ses collaborateurs (Bharti *et al.*, 2003).

Cette classification est indépendante, non corrélée à la classification génétique (Bharti *et al.*, 2003). Alors que le MAT reste utile pour identifier et évaluer la circulation des serogroupes, l'identification des espèces se fait par analyse génomique avec l'emploi de plus en plus ces dernières années des techniques moléculaires.

c. Classification génomique

Avec l'arrivée des méthodes de biologie moléculaire, de nombreuses alternatives palliant l'aspect fastidieux et coûteux des méthodes sérologiques sont offertes pour la classification des leptospires. Ainsi, grâce à la méthode d'hybridation ADN-ADN (Haapala *et al.*, 1969 ; Terpstra *et al.*, 1986 ; Wayne *et al.*, 1987) et au séquençage de l'ADN ribosomal 16S, 22 espèces de leptospires ont été identifiées. Celles-ci ont ensuite été réparties en 3 catégories suivant leur pathogénicité dont 10 espèces pathogènes, 5 espèces intermédiaires et 7 espèces saprophytes (Bourhy *et al.*, 2014 ; Levett, 2015) (Tableau 5).

Tableau V : Classification génomique des espèces de *Leptospira* (Adapté de Bourhy *et al.*, 2014 ; Levett, 2015).

Catégorie	Espèces génomiques
Souches pathogènes	<i>L. interrogans</i>
	<i>L. kirschneri</i>
	<i>L. noguchii</i>
	<i>L. borgpetersenii</i>
	<i>L. weilii</i>
	<i>L. santarosai</i>
	<i>L. alexanderi</i>
	<i>L. alstonii</i>
	<i>L. kmetyi</i>
	<i>L. mayottensis</i>
Souches intermédiaires	<i>L. wolffii</i>
	<i>L. licerasiae</i>
	<i>L. inadai</i>
	<i>L. fanei</i>
	<i>L. broomii</i>
Souches saprophytes	<i>L. wolbachii</i>
	<i>L. meyeri</i>
	<i>L. biflexa</i>
	<i>L. wanthielii</i>
	<i>L. terpstrae</i>
	<i>L. yanagawae</i>
	<i>L. idonii</i>

Ces dernières années, avec le développement de la technologie (séquençage haut débit), de nouvelles techniques de typage moléculaire (VNTR, MLST, MLVA, AP PCRn MST (Marquez *et al.*, 2017)) et de nouveaux centres d'intérêt (métagénomique, analyses environnementales), de nouvelles espèces de leptospires aussi bien pathogènes, intermédiaires que saprophytes ont été identifiées, montant le nombre d'espèces dans le genre *Leptospira* à 64 (Caimi *et al.*, 2020 ; Vincent *et al.*, 2019).

Toujours basée sur la notion de pathogénicité mais dans l’optique de réduire l’appréciation ambiguë de la virulence des souches intermédiaires, Vincent et ses collaborateurs ont proposé une nouvelle classification. Celle-ci subdivise d’abord les souches en deux groupes dont un « pathogène » (identifié par la lettre P) et l’autre « saprophyte » (identifié par la lettre S). Chacun des groupes est ensuite subdivisé en deux sous-groupes : P1 et P2 pour les pathogènes et S1 et S2 pour les saprophytes (figure 5). Les sous-groupes P1 et S1 correspondent respectivement aux groupes « pathogène et saprophyte » de l’ancienne classification à trois catégories (pathogènes, intermédiaires et saprophytes). Le sous-groupe P2 regroupe les espèces anciennement classées comme intermédiaires. Enfin, le sous-groupe S2 correspond à un nouveau groupe rassemblant des espèces saprophytes (Vincent *et al.*, 2019).

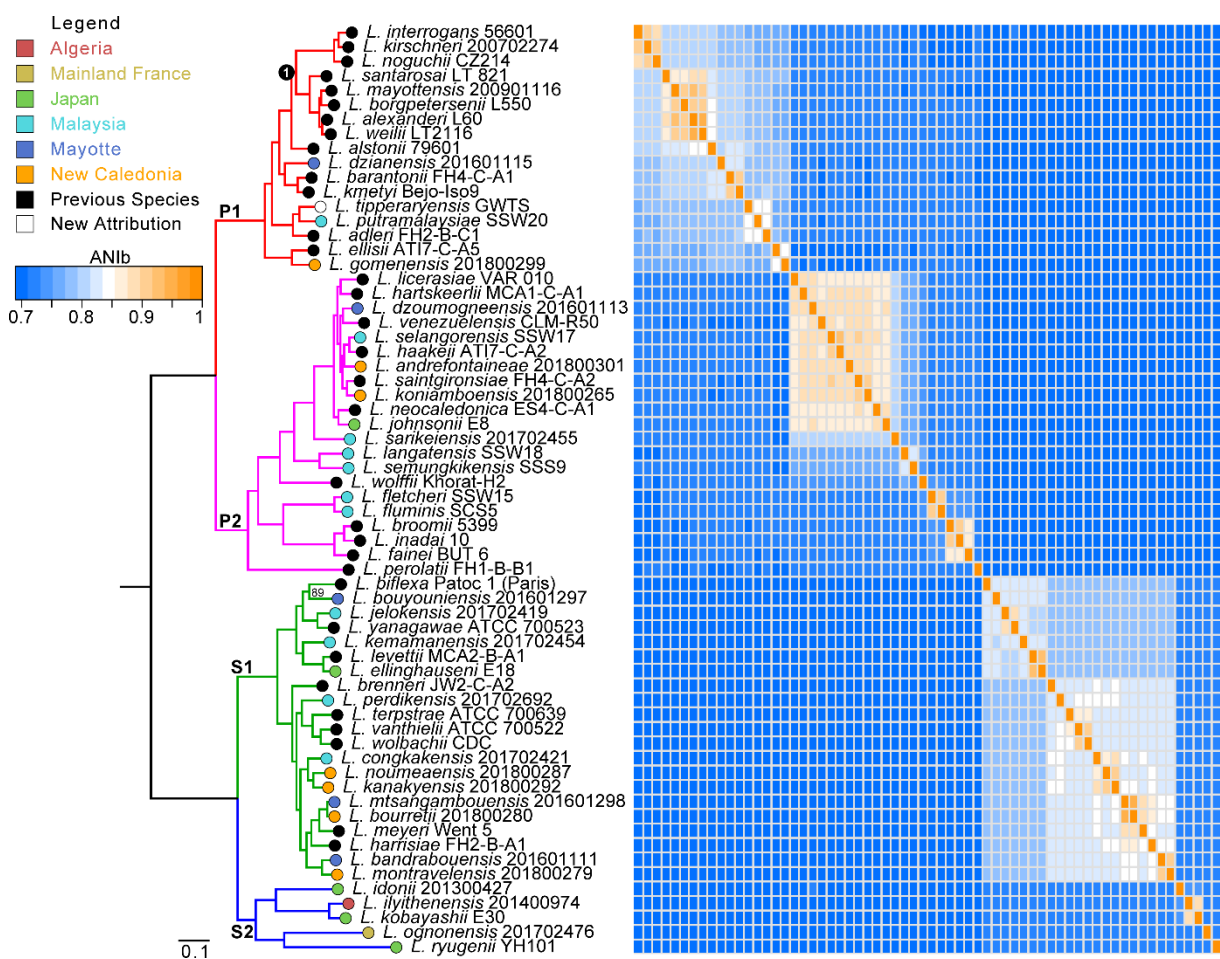


Figure 5 : Arbre phylogénétique des leptospires basé sur les séquences nucléotidiques de 1371 gènes orthologues (Vincent *et al.*, 2019).

Cet arbre phylogénétique représente les valeurs de similarité nucléotidique moyenne ANI (Average Nucleotide Identity) de l’ensemble des séquences génomiques étudiées.

Les différents sous-groupes sont identifiés par des colorations distinctes : P1 (rouge), P2 (violet), S1 (vert) et S2 (bleu). L'origine géographique de chaque espèce est matérialisée par un cercle de couleur.

La valeur bootstrap d'un seul nœud correspondant à la séparation entre les souches *L. biflexa* Patoc 1 et *L. bouyouniensis* 201601297 est indiquée étant donné celles des autres est à 100%. Dans le sous-groupe P1, le nœud 1 indique le nœud de descendance des espèces pathogènes rencontrées fréquemment dans les infections humaines.

Récemment, 04 nouvelles espèces dont 02 pathogènes (*L. ainazelensis* et *L. ainlahdjerensis*) appartenant au sous-groupe P1 et 02 saprophytes (*L. abararensis* et *L. chreensis*) rattachés au sous-groupe S1 ont été isolées à partir d'échantillons d'eau douce en Algérie (Korba *et al.*, 2021), faisant passer le nombre d'espèces de leptospires actuellement à 68 (Arent *et al.*, 2022).

Au vu de toutes ces observations, il va sans dire que le genre *Leptospira* est assez diversifié et que de nouvelles espèces seront certainement identifiées encore dans le futur. Au-delà de la classification des espèces de leptospires, la génomique permet d'obtenir également d'importantes informations concernant l'implication de certains gènes dans la pathogénicité.

3. Caractéristiques microbiologiques

a. Caractéristiques morphologiques

Bien que partageant un certain nombre de caractéristiques communes avec les autres spirochètes, les leptospires possèdent une morphologie unique. Flexibles, elles ont une forme hélicoïdale avec une longueur allant de 6 à 20 μm et un diamètre autour de 0,1 μm (Adler, 2015 ; Picardeau, 2017). Leur petite taille nécessite donc d'employer des techniques de microscopie à fond noir ou à contraste de phase pour pouvoir les visualiser directement (Bharti *et al.*, 2003).

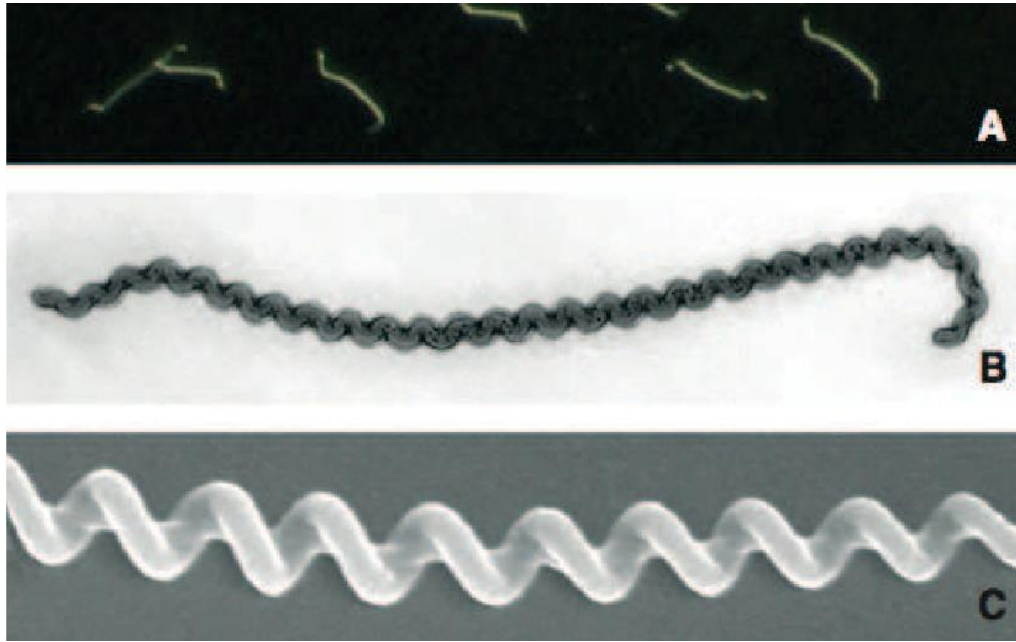


Figure 6 : Leptospires en microscopie à fond noir (A) et en microscopie électronique (B et C) (Bourhy *et al.*, 2012).

La structure de la bactérie comporte un cylindre protoplasmique hélicoïdal d'une vingtaine à une trentaine de spires régulières et très serrées entouré par une double membrane associant à la fois des caractéristiques des organismes à Gram⁺ et à Gram⁻. En effet, La paroi interne, comparable à celle des bactéries Gram positives, est étroitement associée à la membrane plasmique et permet l'adhésion au peptidoglycane, ce qui leur confère rigidité, forme et résistance (Cameron, 2015). La couche externe, quant à elle, se rapprochant grandement de celle des bactéries Gram négatives, contient des protéines de surface et un lipopolysaccharide (LPS), bien qu'atypique et présentant une toxicité moindre que celui des bactéries Gram négatives (Adler and Moctezuma, 2010). Chez les spirochètes, ce LPS n'est d'ailleurs présent que chez *Leptospira* (Patra *et al.*, 2015).

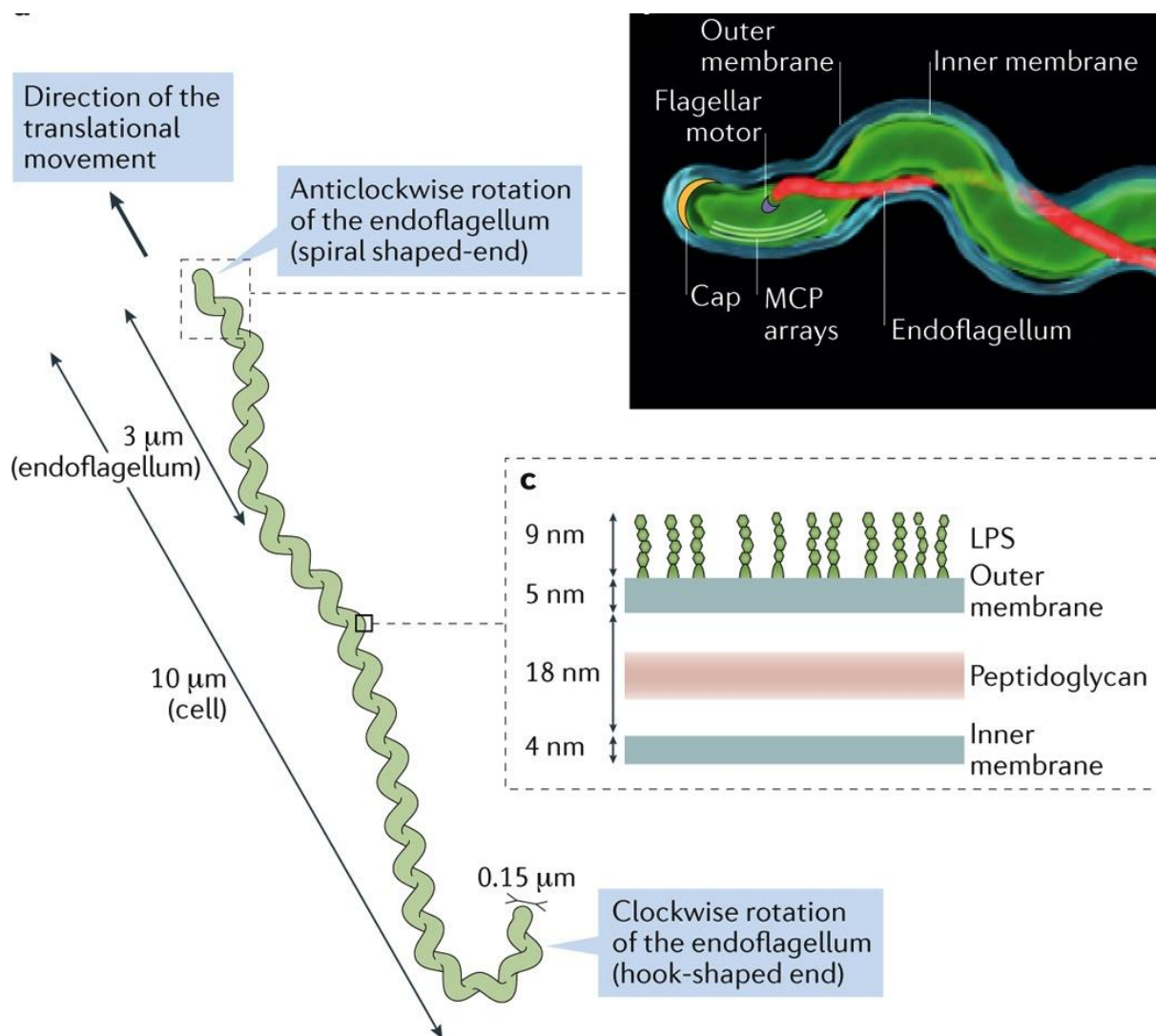


Figure 7 : Morphologie cellulaire et structure de l'enveloppe de *L.interrogans* (Picardeau, 2017).

Dans l'espace périplasmique c'est-à-dire entre la membrane protoplasmique et la paroi externe, les leptospires présentent deux flagelles ou endoflagelles insérés par un corps basal à chacune des extrémités subterminales du cylindre protoplasmique, leur conférant leur motilité (Picardeau *et al.*, 2001 ; Charon *et al.*, 2002 ; Liao *et al.*, 2009). La configuration structurale des extrémités (crochet ou spirale) des flagelles détermine le mouvement ou l'état statique de la bactérie. Ainsi, trois types de mouvements ont été notés : une rotation autour de l'axe central, un mouvement rectiligne dans la direction de l'extrémité non courbée de la bactérie et un mouvement circulaire (Bharti *et al.*, 2003). Par ailleurs, la présence de chimiorécepteurs conditionnerait également la direction de leur mouvement dans le milieu suivant la concentration d'attractants ou de répulsifs (Lambert *et al.*, 2012).

b. Caractéristiques génomiques

Comparé aux autres spirochètes notamment *Borrelia* et *Treponema*, le génome des leptospires a une taille assez importante de l'ordre de 3,8 à 4,6 mégabases (Picardeau, 2015). Il est composé de deux chromosomes circulaires avec un pourcentage de base GC compris entre 35 et 45% en fonction des différentes souches (Picardeau, 2017). Chez les leptospires saprophytes notamment *L. biflexa*, un réplicon circulaire de 74 kb ainsi qu'un prophage circulaire nommé LE1 ont en plus été mis en évidence (Saint Girons *et al.*, 1990 ; Bourhy *et al.*, 2005 ; Picardeau *et al.*, 2008). Le chromosome principal, avec une taille variant de 3,6 à 4,3 mégabases contre 350 kilobases pour le plus petit, regroupe 90% des principaux gènes du génome (Zuerner *et al.*, 1993) nécessaires au fonctionnement de base de l'organisme (Picardeau, 2015). L'ensemble du génome compte environ 3500 gènes (Xue *et al.*, 2009) dont 1100 composent le core-génome (Fouts *et al.*, 2016). Le core-génome correspond aux gènes partagés par l'ensemble des bactéries du genre *Leptospira* et l'intégralité des gènes présents dans les bactéries représente le pan-génome. Une analyse comparative des génomes de *Leptospira spp.* montre des différences entre les espèces pathogènes et les espèces saprophytes (Picardeau *et al.*, 2008) mais cela ne se limite pas à cette catégorisation car des différences importantes ont aussi été observées au sein même des leptospires pathogènes (Xue *et al.*, 2009) (figure8).

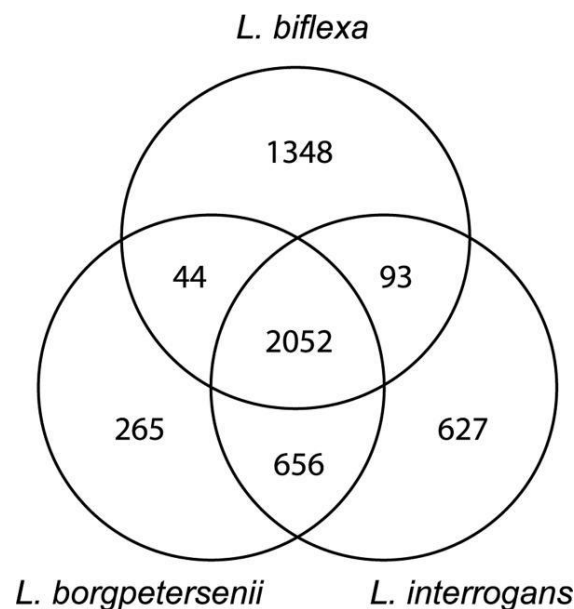


Figure 8 : Diagramme de Venn indiquant le nombre de gènes uniques et partagés entre *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* et *L. biflexa* (Picardeau *et al.*, 2008).

Le pan-génomique du genre *Leptospira* est plus ouvert chez les espèces appartenant au sous-clade P1, illustrant la grande diversité génétique au sein des pathogènes (Vincent *et al.*, 2019). Cela suppose que l'ensemble du répertoire des gènes du genre *Leptospira* reste encore à explorer d'autant plus que bon nombre de gènes uniques aux leptospires pathogènes ont des fonctions inconnues, ce qui suggère l'existence de mécanismes de pathogénicité uniques au genre *Leptospira*.

c. Caractéristiques métaboliques

Les leptospires sont des organismes ayant des besoins nutritionnels particuliers. Ce sont des bactéries chimio-organotrophes qui ont comme source principale de carbone et donc d'énergie que les acides gras à longues chaînes. Ces longues chaînes d'acides gras sont métabolisées par β -oxydation (Levett, 2001). Outre la source d'énergie, certains éléments sont indispensables à leur croissance notamment les apports azotés par l'ion ammonium (Shenberg, 1967), les apports vitaminiques (vitamine B1 et B12) ainsi que du fer ferreux (Bourhy *et al.*, 2012 ; Ellinghausen and McCullough, 1965). Des souches plus exigeantes requièrent d'autres composants tels que la biotine, le pyruvate de sodium, le glycérol, la thiamine ou encore du calcium ou du magnésium.

Pour ce qui est de leur activité enzymatique, les leptospires sont à la fois oxydase et catalase positive (Levett, 2001). L'existence d'une activité lipasique a aussi été signalée chez *Leptospira biflexa* alors que celle-ci est très faible voire absente chez *Leptospira interrogans* (Kossey, 2004).

d. Caractéristiques culturelles

Malgré leur sensibilité à la dessiccation, la chaleur, les acides ou encore les désinfectants basiques (Mohammed *et al.*, 2011), il est possible de cultiver les leptospires. Organismes aérobies ou microaérophiliques, leur croissance est lente et nécessite de rassembler certaines conditions notamment une température optimale comprise entre 28 et 30°C, un milieu contenant des composants (vitamines B1 et B12, acides gras à longue chaîne et sels d'ammonium...) permettant de satisfaire leurs besoins métaboliques particuliers et un PH variant de 7 à 8 (Adler, 2015). Pour ce faire, plusieurs milieux de culture (Fletcher, Korthof, Shenberg...) ont été définis mais le plus couramment utilisé et qui rassemble au mieux les besoins complexes des leptospires est le milieu EMJH (Ellinghausen, Mac Cullough codifié par Johnson et Harris en 1967). Ce milieu fait suite à la modification du milieu d'Ellinghausen et Mac Cullough (milieu EM) mis au point en 1965 (Cinco, 1981).

La culture des leptospires est aussi possible en milieu solide en rajoutant 1,2% d'agar noble au milieu EMJH (Slamti and Picardeau, 2012). Toutefois, cette option est difficilement utilisable pour isoler les souches bactériennes du fait de la prolifération rapide d'autres organismes.

Pour éviter la croissance de contaminants lors de la mise en culture, le milieu peut être rendu sélectif en rajoutant des antimétabolites et/ou antibiotiques dont les plus couramment utilisés sont le 5-fluorouracile et la néomycine (Bharti *et al.*, 2003). Dans cette même veine, Chakraborty et ses collaborateurs ont proposé en 2011 l'utilisation d'un mélange d'antibiotiques (Sulfaméthoxazole, Triméthoprime, Amphotéricine B, Fosfomycine, 5-Fluorouracil) appelé STAFF pour encore mieux contrôler le développement de microorganismes interférents (Chakraborty *et al.*, 2011).

Le contrôle de la croissance des leptospires se fait en utilisant un microscope à fond noir et leur dénombrement grâce à une chambre de comptage de Petroff-Hausser (Humberd *et al.*, 2005). La lenteur de leur croissance nécessite que les cultures soient conservées jusqu'à 13 semaines après ensemencement avant de pouvoir être déclarées négatives (Levett, 2001).

4. Virulence et pouvoir pathogène

De manière générale, la virulence d'une bactérie se traduit par sa capacité à induire une infection. Pour ce faire, elle doit être capable de survivre dans l'environnement de l'hôte, de se multiplier et d'y causer des dommages. Ainsi, pour y arriver, elle a recours à des facteurs de virulence. Même si la mise en évidence des gènes codant ces facteurs est une problématique pas encore totalement élucidée (Lautier and Nasser, 2005), beaucoup de gènes ont été décrits.

a. Protéines impliquées dans la pathogénie

i. Protéines de surface

Situées sur la membrane externe des leptospires, ces protéines jouent un rôle essentiel dans l'invasion, la dissémination, l'évasion du système immunitaire et la colonisation des tissus de l'hôte. Plus de 30 protéines de surface (figure 9) ont déjà été recensées principalement grâce à des méthodes *in silico* (Raja *et al.*, 2015).

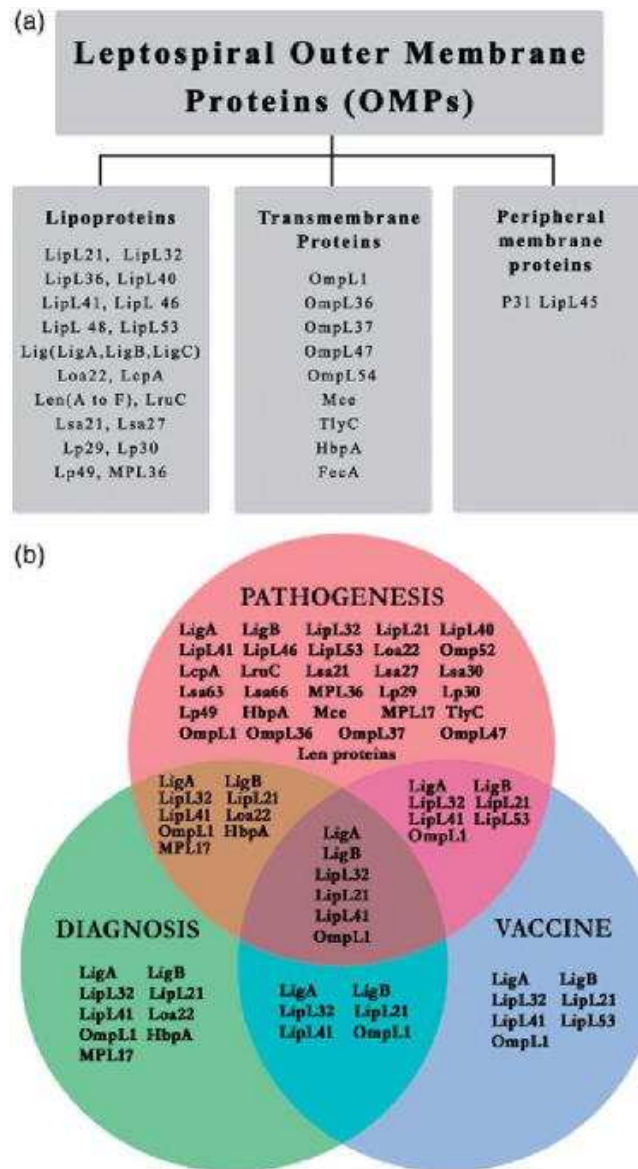


Figure 9 : Classification des protéines de surface des leptospires pathogènes : implication dans la pathogénèse, le diagnostic et l'efficacité des vaccins (Raja *et al.*, 2015).

Même si pour la plupart, elles peuvent avoir plusieurs fonctions dans le processus infectieux, leur propriété d'adhésion est la caractéristique majeure corrélée à la virulence. Cette faculté leur permet de se lier aux composants protéiques et glucidiques (glycosaminoglycanes) de la matrice extracellulaire de l'hôte. Ainsi, on retrouve des protéines capables de se fixer à la fibronectine (OmpL1, LipL32, ...), à la laminine (toutes les protéines du groupe Len ou Lsa) ou encore à l'élastine (LigB, OmpL37, OmpL47) pour ne citer que celles-ci (Murray, 2015). Outre les composants de la matrice extracellulaire, certaines protéines de surface peuvent interagir avec d'autres récepteurs de l'hôte.

C'est le cas par exemple de LigA ou B qui peuvent se lier à des protéines régulatrices du complément (facteurs H et I, fibrinogène), ou encore les protéines LenA ou Lsa24 qui fixent le facteur H régulateur du complément et le plasminogène (Murray, 2015).

Cette faculté d'adhésion des protéines de surface mise en évidence lors de tests *in vitro* à l'aide de protéines recombinantes laissent à penser qu'elles joueraient un rôle crucial dans la survie de la bactérie donc indirectement impliquées dans la virulence du pathogène. Toutefois, il existe des protéines qui ont des rôles plus directs.

ii. Protéines aux propriétés d'échappement du système immunitaire

Connu pour être fortement immunogène chez les bactéries à Gram négatifs, le lipopolysaccharide (LPS) est aussi un élément essentiel de l'interaction des leptospires. D'ailleurs, les leptospires sont les seuls spirochètes à posséder le LPS comme composant de leur membrane externe (Haake and Matsunaga, 2010).

Protégeant les leptospires de la réaction du complément (Murray *et al.*, 2010), le LPS est reconnu de façon unique par le système immunitaire des hôtes de la bactérie (Werts *et al.*, 2001). Cette reconnaissance se fait par les TLR ou Toll-like receptors qui sont une famille bien connue de récepteurs jouant un rôle important dans la réponse immunitaire innée de l'hôte. Contrairement aux autres bactéries pour lesquelles le LPS est reconnu par le TLR4, celui des leptospires est reconnu par le TLR2 en majorité (Nahori *et al.*, 2005). Chez l'homme uniquement, cette reconnaissance ne se fait que par le TLR2 (Werts *et al.*, 2001). La structure atypique du lipide A du LPS de *Leptospira* qui possède un unique phosphate méthylé, non retrouvé dans le lipide A d'autres bactéries expliquerait l'incapacité de détection par les TLR4 (Que-Gewirth *et al.*, 2004).

Par ailleurs, une autre voie d'échappement des leptospires au système immunitaire se ferait par la libération de cytokines qui seraient à l'origine de l'inflammation. Cette réaction immunitaire pourrait éventuellement expliquer les dommages locaux observés des tissus lors d'une infection (Vernel-Pauillac and Merien, 2006).

iii. Protéines à activité hémolytique

Considérées comme facteurs de virulence du fait qu'elles ne soient produites que par des leptospires pathogènes (Narayanavari *et al.*, 2012), les sphingomyélinases hydrolysent les sphingomyélines de la membrane plasmique de l'hôte en céramides et phosphorylcholine.

Les leptospires produisent ces enzymes lors de l'invasion de l'organisme pour obtenir des nutriments tels que le fer à partir des érythrocytes de l'hôte, nécessaires à leur croissance et à leur survie (Carvalho *et al.*, 2010). Leur présence entraînant des perturbations tissulaires chez l'hôte, elles sont impliquées dans les manifestations hémorragiques observées lors des formes graves de l'infection et potentiellement perturbent le fonctionnement des organes pouvant conduire à la mort (Che *et al.*, 2019).

Outre l'hémolysine de type sphingomyélinase, on retrouve également l'hémolysine de type non-sphingomyélinase. A ce jour, l'analyse du génome des leptospires pathogènes a révélé la présence d'au moins neuf gènes codant pour de potentielles hémolysines parmi lesquelles cinq gènes SphH, Sph1, Sph2, Sph3 et Sph4 codent pour l'hémolysine de type sphingomyélinase, et quatre gènes hlpA, hlyC, hlyX et hlyA pour des hémolysines sans activité d'hydrolyse des sphingomyélines (Zhang *et al.*, 2005).

Hormis tous ces types de protéines, d'autres facteurs de virulence ont aussi été identifiés mais correspondent plus à des facteurs importants pour la physiologie ou encore la survie liée à l'adaptation de ces bactéries à leur environnement. C'est le cas par exemple de l'hème oxydase HemO essentielle pour la virulence (Murray *et al.*, 2009). Cette enzyme permet l'acquisition de fer nécessaire pour la croissance de la bactérie par la dégradation de l'hème. Il y a également ClpB (Lourdault *et al.*, 2011) qui jouerait un rôle dans la croissance mais aussi dans la résistance au stress oxydatif comme le gène KatE (Eshghi, *et al.*, 2012).

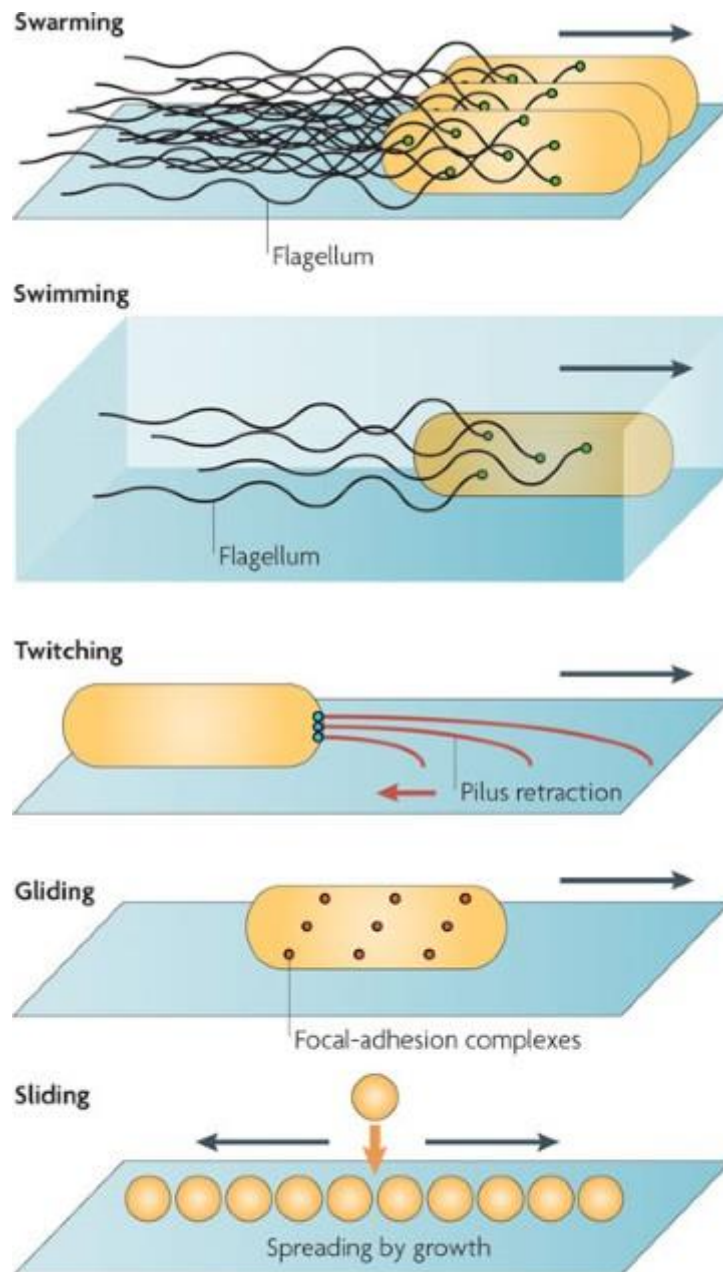
Il ressort donc que beaucoup de gènes sont impliqués de façon directe ou indirecte dans la virulence des leptospires. Etant donné que les mécanismes de virulence des leptospires ne sont pas encore totalement élucidés et avec le développement des outils génétiques, de nouveaux gènes pourraient être mis encore en évidence. C'est dans ce sens que s'inscrit un volet de notre travail de thèse.

Au regard des fonctions des gènes décrits précédemment entre autres leur implication dans l'évasion du système immunitaire ou encore la résistance au stress oxydatif, le chimiotactisme et la motilité pourraient également jouer un rôle important dans l'adaptation des bactéries à l'environnement. En effet, cette capacité permettrait aux leptospires de migrer vers des niches plus favorables chez l'hôte et aussi éviter la résistance immune.

b. Chimiotactisme et motilité

Le phénomène de chimiotactisme mis en évidence depuis les années 1960 par Julius Adler et ses collaborateurs correspond à la capacité d'une bactérie à adapter son comportement motile en fonction de l'environnement dans lequel elle se trouve en prenant des informations sur la composition chimique de ce milieu. Ainsi, les composés chimiques induisant une migration de la bactérie vers eux sont nommés attractants, tandis que ceux conduisant à un déplacement de la bactérie dans la direction opposée sont appelés repellants (Adler, 1965). Cette faculté permettrait ainsi à la bactérie de migrer vers des environnements plus propices à son développement. Il va sans dire que ce mécanisme est impliqué dans l'optimisation des organes locomoteurs pour la recherche de nutriments et donc essentiel pour la survie de la bactérie (Taylor and Stocker, 2012).

Les organes locomoteurs sont divers et induisent différents types de motilité bactérienne avec des vitesses pouvant aller de quelques micromètres par minutes à $160\mu\text{m/s}$ (Jarrel and McBride, 2008). Ainsi, on peut distinguer comme type de motilité bactérienne entre autres le « twitching » (Mattick, 2002 ; Kearns, 2010), le « gliding » (Braun *et al.*, 2005 ; Nan and Zusman, 2011), le « kinking » (Yang *et al.*, 2009) ou encore la motilité flagellaire qui est un des types de motilité les mieux étudiés (Bardy *et al.*, 2003).



Nature Reviews | Microbiology

Figure 10 : Différents types de motilité observés chez les bactéries (Kearns, 2010).

C'est dans le dernier type de motilité (motilité flagellaire) cité précédemment que se retrouvent les spirochètes et notamment les leptospires. L'organelle locomoteur est le flagelle. Alors que chez les bactéries possédant cette organelle, celle-ci se situe à différentes localisations entre autres polaire (*Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter*), lophotriche (*Helicobacter*; *Spirillum*), pérित्रиче (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*) ou médian (*Rhodobacter*), chez les spirochètes, elle est péripłasmique. Cette localisation atypique des flagelles leur vaut d'ailleurs le nom d'endoflagelles et confère aux spirochètes une motilité unique (Charon *et al.*, 2012).

i. Structure du flagelle

La structure globale du flagelle est assez bien conservée chez les procaryotes (Liu and Ochman, 2007). De façon générale, le flagelle est un assemblage protéique complexe nécessitant l'utilisation de plus de 40 protéines pour sa synthèse (Berg, 2003). Il est constitué de 6 éléments bien conservés quelques que soient les espèces (Macnab, 2003) que sont :

- ✓ Le **corps basal** constitué d'un anneau membranaire intégral « MS ring » avec les protéines FliF, d'un anneau périplasmique « P-ring » et d'un anneau de la membrane externe « L-ring » ;
- ✓ Le **moteur** constitué des protéines MotA et MotB ;
- ✓ Le **switch** du moteur composé des protéines FliG, FliM et FliN ;
- ✓ **L'appareil d'exportation** similaire à un système de sécrétion de type III, composé des protéines FlhA, FlhB, FliO, FliP, FliQ, FliR ;
- ✓ Le **crochet** constitué principalement par la flagelline flgE ;
- ✓ Le **filament** composé majoritairement de la flagelline FliC et qui correspond à la partie la plus distale sécrétée en dernier.

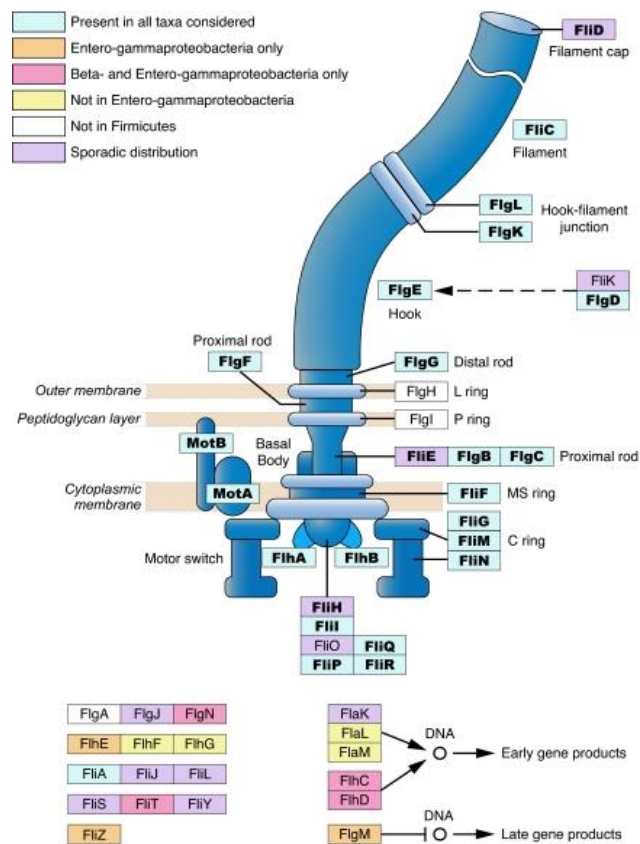


Figure 11: Structure du flagelle basée sur la distribution des protéines flagellaires d'espèces bactériennes flagellées (Liu and Ochman, 2007).

Malgré la localisation atypique du flagelle chez les spirochètes, ses éléments constitutifs sont globalement bien conservés par rapport aux autres bactéries (Liu and Ochman, 2007). De plus, des études menées par Zhao et ses collaborateurs ont permis de mettre en évidence une particularité chez ce groupe bactérien qui est la présence d'une structure en collier surmontant le rotor et comprise dans le stator (Zhao *et al.*, 2014).

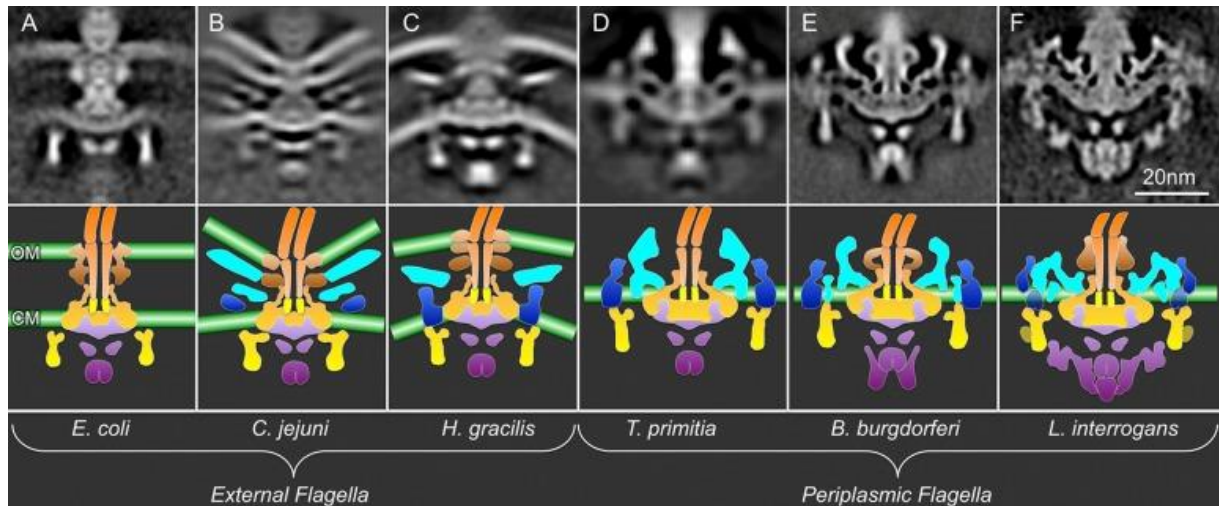


Figure 12 : Structure du moteur flagellaire de 6 bactéries modèles (Zhao *et al.*, 2014).

Images du haut : représentation en Cryo-tomographie ; Images du bas : représentation en cartoon avec différentes couleurs. Violet : Système de sécrétion de type III, Jaune : C-ring FliM, G, N et FliY pour leptospires, Bleu foncé : Mot A et B, Bleu clair : structure en collier, Orange : partie proximale du flagelle.

Leur étude a permis de montrer que la conformation du C-ring des leptospires était différente de celle des autres spirochètes. En effet, le C-ring comporterait un anneau supplémentaire constitué de protéines FliY autour de lui-même et qui serait probablement en contact avec FliM et FliN. FliY est une phosphatase qui jouerait un rôle probable dans la régulation du switch du moteur flagellaire.

ii. Fonctionnement du flagelle

Le moteur flagellaire fonctionne par un mécanisme rotatif qui est actionné par des ions qui traversent la membrane cytoplasmique en suivant un gradient électrochimique (Fung and Berg, 1995). Il peut être subdivisé en 2 composantes : le stator constitué des protéines membranaires MotA et B et le rotor composé des protéines FliG, FliM et FliN. Par interaction avec FliG, les protéines MotA et MotB permettent la transduction électromécanique engendrant la rotation du moteur flagellaire (Kojima *et al.*, 2004).

Par ailleurs, le moteur flagellaire qui est capable de tourner dans le sens horaire (Clockwise : CW), peut aussi tourner dans le sens anti-horaire (Counter-Clockwise : CCW) par interaction avec FliM (Kojima *et al.*, 2004) qui a pour facteur de régulation CheY (Khan *et al.*, 2000). Ainsi, chez les leptospires, le déplacement se fait en coordonnant les moteurs flagellaires à chacune des extrémités (Charon *et al.*, 2012). De ce fait, 4 types de motilité ont été mis évidence :

- Lorsque les flagelles ont le même sens de rotation à chaque extrémité soit CW ou CCW, deux types de motilité dits non translationnels sont définis. La rotation CW entraîne une morphologie en crochet au niveau de chaque extrémité. Ces dernières effectuent une gyration sur l'axe défini par le corps cellulaire. En revanche, lorsque les flagelles ont une rotation CCW, les extrémités sont spiralées mais effectuent aussi une gyration sur l'axe longitudinal (Charon *et al.*, 1984).
- Lorsque les flagelles ont un sens de rotation différent à chaque extrémité, les deux types de motilité définis sont dits translationnels. Cette asymétrie de rotation engendre un déplacement de la bactérie dont le sens sera fonction du type de rotation observé à chaque extrémité. L'avant est défini par l'extrémité où l'on retrouve le sens de rotation CCW et l'arrière par le sens de rotation CW. Lorsque le sens de rotation change à chacune des extrémités, on observe également un déplacement de la bactérie en sens inverse. Ce changement de sens correspond au passage du premier type de motilité translationnel au second.

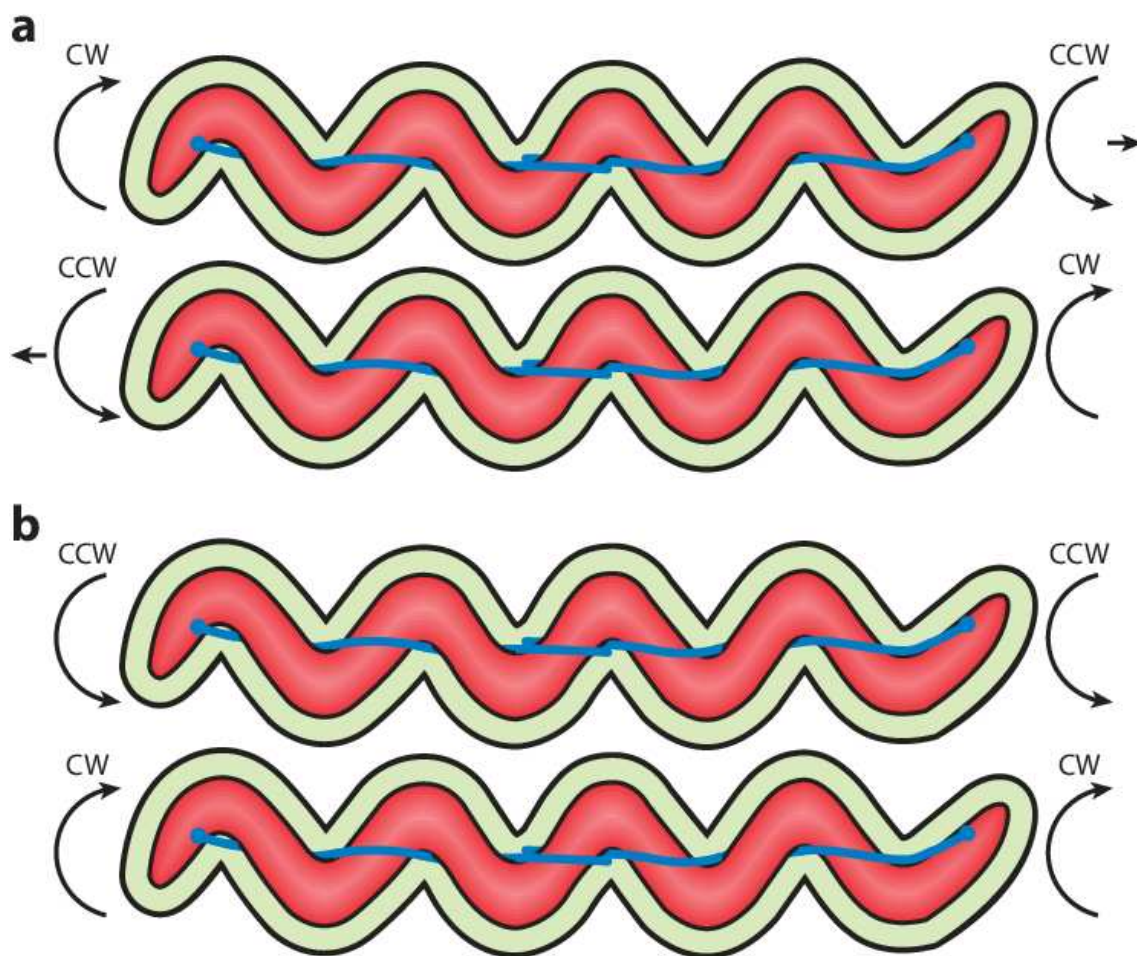


Figure 13 : Représentation des 4 types de motilité ; a- les 2 types translationnels et b- les 2 types non translationnels ; flèches incurvées indiquent le sens de rotation du flagelle ; flèches droites indiquent la direction de déplacement. (Charon *et al.*, 2012).

Par ailleurs, l'ancrage des flagelles dans la membrane plasmique des leptospires augmenterait la force de rotation, ce qui contribuerait à un meilleur déplacement de la bactérie.

Outre le moteur flagellaire, le bon fonctionnement du flagelle repose également sur la stabilité et le bon fonctionnement des autres protéines dont certaines requièrent la formation de ponts disulfures telles que FlgI (Dailey and Berg, 1993).

iii. Implication de la motilité dans la virulence

Les caractéristiques particulières de la motilité révélées chez les spirochètes en général et les leptospires en particulier leur permettent de se déplacer dans différents environnements : que ce soit en milieu liquide ou sur des surfaces solides (Tahara *et al.*, 2018), ou encore en milieu visqueux (Harman *et al.*, 2012).

De plus, avec leur morphologie atypique, elles ont une meilleure pénétration des tissus donc une bonne dissémination dans les organes de l'hôte, ce qui serait important dans leur virulence (Li *et al.*, 2010 ; Sultan *et al.*, 2010). D'ailleurs, Xu et collaborateurs ont récemment montré que le mécanisme de motilité « le crawling » est associé à la pathogénicité des leptospires (Xu *et al.*, 2020).

En outre, en se basant sur des données de transcriptomiques et de protéomiques, Caimano et ses collaborateurs ont aussi montré une éventuelle implication de la motilité dans la virulence des leptospires (Caimano *et al.*, 2014). Il faut souligner que l'inactivation de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des endoflagelles a conduit à une atténuation de la virulence de la bactérie. C'est le cas entre autres de *FliY* (Liao *et al.*, 2009) ou *FlaA* (Lambert *et al.*, 2012) ou encore *FcpA* (Wunder Jr *et al.*, 2016).

La motilité est donc un facteur important pour la bactérie car impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que la survie, la virulence, ... Toutefois, la satisfaction de cette faculté motile réside sur le bon fonctionnement de l'organe locomoteur qu'est le flagelle. Ce dernier résulte d'un assemblage protéique complexe dont toute perturbation protéique comme celle dans la formation de ponts disulfures pourrait impacter le bon déplacement de la bactérie.

C. Le mécanisme de formation des ponts disulfures

De nombreuses protéines des cellules aussi bien bactériennes qu'eucaryotes possèdent très souvent des ponts disulfures, indispensables à la stabilité de leur conformation native. Ces ponts disulfures sont mis en place chez les bactéries Gram-négatives par les oxydoréductases de thiol-disulfure de la famille des Dsb avec l'enzyme DsbA comme oxydase principale. L'implication de cette enzyme dans la virulence de certaines bactéries comme *E. coli* ou encore *Vibrio Cholerae* a été démontrée.

1. Généralités sur les ponts disulfures et les protéines les contenant

Les ponts disulfures sont indispensables pour le repliement correct et la stabilité des structures tertiaires des protéines. Leur présence protège les protéines d'un environnement pouvant être riche en protéases ou bien particulièrement oxydant (Hogg, 2003). Etant donné que bon nombre de protéines possèdent des ponts disulfures, celles-ci peuvent être regroupées en deux catégories :

- les protéines dont la liaison cystéine-cystéine est indispensable à la stabilité de leur conformation native ;
- les protéines possédant un couple de cystéines alternant entre une forme oxydée (présence du pont) et une forme réduite. Le cycle d'oxydation-réduction du pont disulfure produit dans ce cas sera soit à la base de leur activité protéique en tant qu'enzyme (exemple de la ribonucléotide réductase (Jordan and Reichard, 1998)), soit engagé dans l'activation-inactivation de la protéine (exemple du facteur de transcription OxyR (Zheng *et al.*, 1998)).

2. Le système de formation des ponts disulfures

a. La formation d'un pont disulfure

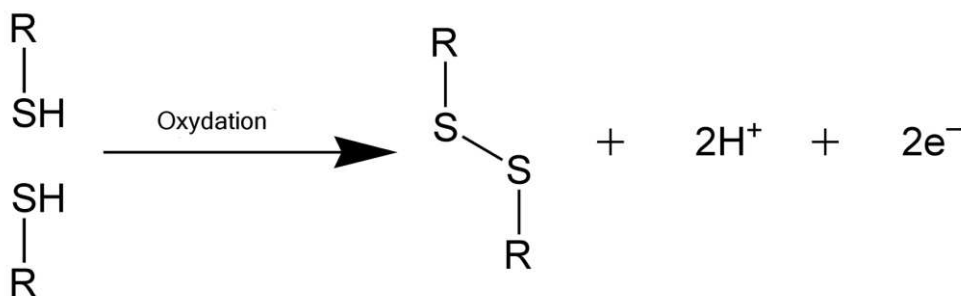


Figure 14 : Réaction de formation d'un pont disulfure.

La formation d'un pont disulfure entre deux groupements sulfhydriles (-SH) est une réaction d'échange de deux électrons entre un oxydant et un accepteur d'électron. Cette réaction implique l'oxydation de deux groupements thiols sur deux résidus cystéines pour former une liaison covalente (Figure 14).

La vitesse de la réaction dépend de l'accessibilité des sites actifs, de la différence de potentiels redox entre les partenaires redox et de la probabilité des atomes de soufre à pouvoir se placer à la distance nécessaire pour que l'échange thiol-disulfure puisse avoir lieu.

In vivo, la synthèse est un processus spontané et précis contrairement à la formation *in vitro* qui est extrêmement lente ($t_{1/2} > 15$ min) avec parfois des ponts qui ne sont pas forcément corrects (Freedman, 1991). A titre d'exemple, Peters et ses collaborateurs ont montré que les 17 ponts disulfures de l'albumine de rat se formaient en 30 secondes *in vivo* alors qu'*in vitro* le processus pouvait prendre plusieurs heures (Peters and Davidson, 1982). Ces différences entre les vitesses de réaction observées *in vivo* et *in vitro* ont permis de suggérer l'existence *in vivo* d'enzymes catalysant la formation des ponts disulfures. Ainsi, le premier catalyseur mis en évidence fut la Protein Disulfide Isomerase (PDI) (Freedman, 1991) qui est une protéine eucaryote présente dans le réticulum endoplasmique. Chez les procaryotes, alors qu'on avait toujours pensé que les réactions étaient spontanées, la première machinerie catalysant la formation de ponts disulfures dans une protéine a été identifiée chez *E. coli* par l'équipe de Jon Beckwith et nommée « dsbA » pour « disulfide bond » (Bardwell *et al.*, 1991). En effet, l'identification a été faite chez un mutant d'*E. coli* incapable de former des ponts disulfures sur les protéines du périplasme. Leurs travaux ont ainsi permis de mettre en évidence des protéines à activité d'oxydoréductase de thiols, capables de catalyser les échanges thiol-disulfures *in vivo*. L'activité redox de ces protéines repose sur deux cystéines constituant un motif catalytique CXXC, caractéristique du domaine dit « thioredoxin fold », retrouvé dans les thioredoxines, protéines aux propriétés redox importantes.

b. La formation des ponts disulfures dans le périplasme bactérien

Pour se protéger des agents oxydants qui pourraient endommager leurs protéines cytoplasmiques, les bactéries ont développé des systèmes enzymatiques comme ceux de la thiorédoxine-thiorédoxine réductase et de la glutarédoxine-glutarédoxine réductase (Carmel-Harel and Storz, 2000). Par exemple, la concentration cytoplasmique en glutathion, d'environ 5 mM avec un rapport GSH/GSSG allant de 50/1 à 200/1, permet en partie de prévenir la formation de ponts disulfures protéiques (Hwang *et al.*, 1992).

Par contre, dans le périplasma, on retrouve de nombreuses protéines possédant des ponts disulfures (Dutton *et al.*, 2008 ; Hiniker and Bardwell, 2004), et donc des substrats de la machinerie d'oxydation permettant le repliement oxydatif. Ces protéines font parties de la famille des Dsb. Elles ont un domaine de type TRX (à l'exception de DsbB) contenant le motif CXXC au sein de leur site actif. Selon la fonction redox de l'enzyme, le motif CXXC peut être réduit (Dsb-(SH)₂ avec un dithiol) ou oxydé (Dsb-S₂ avec un pont disulfure formé). La machinerie assurant la formation et la réduction des ponts disulfures périplasmiques se fait suivant deux voies principales : une voie d'oxydation (DsbA et DsbB) et une voie d'isomérisation (DsbC, DsbG, DsbD) des ponts disulfures (Figure 15) que nous n'allons pas aborder ici.

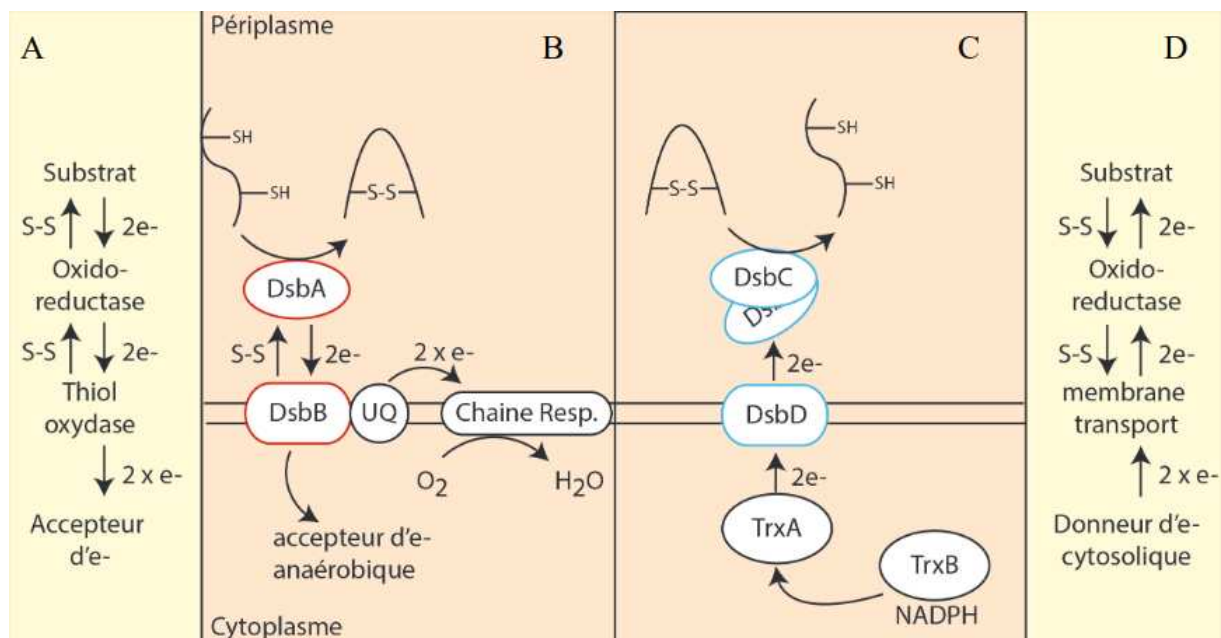


Figure 15 : Voies de formation des ponts disulfures dans le périplasma bactérien (figure adaptée de Kojer and Riemer, 2014)

A : Flux d'électrons lors de la formation des ponts disulfures.

B : Voie d'oxydation permettant la formation des ponts disulfures dans le périplasma bactérien.

C : voie d'isomérisation/réduction dans le périplasma bactérien.

D : Flux d'électrons lors de la réduction des ponts disulfures

La voie d'oxydation DsbA-DsbB

Le gène *dsbA* code pour une protéine monomérique périplasmique de 21 kD. C'est l'enzyme la mieux caractérisée chez la bactérie *E. coli* et elle sert de référence pour l'étude des homologues identifiés chez d'autres organismes.

DsbA renferme un site actif redox au motif CXXC (C30-P31-H32-C33) présent dans le domaine TRX (Martin *et al.*, 1993) et actif dans son état oxydé (Kishigami *et al.*, 1995). Son pont disulfure catalytique instable (Zapun *et al.*, 1993) peut être rapidement transmis à une protéine sécrétée nouvellement dans le périplasme par un mécanisme d'échange thiol-disulfure. Après la formation transitoire d'un intermédiaire covalent entre C30, la cystéine N-terminale du motif CXXC de DsbA et le substrat protéique, le pont disulfure est transféré à la protéine en cours de repliement et DsbA est libérée sous son état réduit.

Pour effectuer un autre cycle d'oxydation catalytique après transfert de son pont disulfure, DsbA doit être ré-oxydée. C'est ainsi qu'intervient l'enzyme membranaire DsbB (Bardwell *et al.*, 1993). Avec une masse moléculaire de 21 kD, DsbB est constituée de quatre segments transmembranaires et deux boucles périplasmiques, P1 et P2, comprenant chacune une paire de cystéines oxydées *in vivo*, C41/C44 et C104/C130, respectivement (Jander *et al.*, 1994).

DsbB ré-oxyde DsbA grâce au pouvoir oxydant de la chaîne de transport des électrons (Kobayashi *et al.*, 1997 ; Bader *et al.*, 1999). En présence d'oxygène, deux électrons de DsbA sont transférés par DsbB réduit vers l'ubiquinone (UQ) oxydée (Bader *et al.*, 1999 ; Bader *et al.*, 2000). L'ubiquinone réduite est ensuite ré-oxydée par les oxydases terminales, qui transmettent les électrons jusqu'à l'accepteur final O₂, couplant ainsi repliement oxydatif et respiration. En condition anaérobie, les électrons de DsbA sont plutôt transférés par DsbB à une ménaquinone (Bader *et al.*, 1999). Les électrons sont ensuite transférés de la ménaquinone vers l'accepteur final d'électron autre que l'oxygène. Ces quinones sont les accepteurs d'électrons de DsbB et expliquent pourquoi le processus oxydatif de formation de ponts disulfures se passe également en absence d'oxygène.

c. Implication du système Dsb dans la virulence bactérienne

Les protéines Dsb sont fortement impliquées dans la biogénèse de toxines bactériennes et de facteurs de virulence (Lasica and Jagusztyn-Krynicka, 2007). En effet, l'inactivation de gènes codant pour le système Dsb chez de nombreuses espèces microbiennes pathogènes telles *Vibrio cholerae* (Peek and Taylor, 1992), *Pseudomonas aeruginosa* (Barbieri and Sun, 2004), *Salmonella enterica* (Miki *et al.*, 2004) ou *Helicobacter pylori* (Godlewska *et al.*, 2006) conduirait à une réduction de leur virulence. Par exemple, en prenant le complexe DsbA/DsbB, il a été montré que les mutants de délétion *dsbA* - ou *dsbB* - sont beaucoup moins mobiles car les protéines FlgI, constituant du moteur flagellaire, ne sont pas correctement assemblées (Dailey and Berg, 1993).

Tableau VI : Quelques exemples de bactéries chez lesquelles le processus de motilité impliqué dans la pathogénicité serait dépendant de l'activité DsbA/DsbB.

Souches bactériennes	Cible du système Dsb	Protéine impliquée	Dsb	Référence
<i>Salmonella enterica</i>	FliC et FliB	DsbA		Agudo <i>et al.</i> , 2004
<i>Escherichia coli</i>	FliI et FliC	DsbA		Hiniker & Bardwell, 2004
<i>Campylobacter jejuni</i>	Inconnue	DsbI et DsbB		Raczko <i>et al.</i> , 2005
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	FliI	Homologue (DsbB)	VKOR	Dutton <i>et al.</i> , 2008

d. Diversité du système de formation des ponts disulfures

Quand bien même que le système Dsb ait été largement étudié chez *E. coli*, ce dernier n'est pas un modèle standard pour toutes les bactéries (figure 16). En effet, le système de formation des ponts disulfures est extrêmement variable chez les bactéries. Une analyse du génome de 375 bactéries a permis de mettre en évidence que la plupart des Protéobactéries auraient un système Dsb avec une DsbA et une DsbB, mais qu'il existerait également une grande diversité de systèmes Dsb dans cet embranchement bactérien (Dutton *et al.*, 2008).

Par exemple, certaines bactéries ne codent ni pour DsbA, ni pour DsbB. C'est le cas de *Streptococcus pyogenes* chez qui les liaisons isopeptidiques remplaceraient les liaisons disulfures et stabiliseraient les structures de certaines protéines sécrétées (Kang *et al.*, 2007).

D'autres bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, ne posséderaient pas de DsbB mais ont une DsbA qui serait aussi bien stable sous la forme réduite qu'oxydée (Heras *et al.*, 2008) contrairement à son homologue chez *E. coli*. Cela suggérerait qu'un environnement oxydant maintiendrait DsbA de *S. aureus* sous sa forme oxydée au lieu d'une enzyme homologue à DsbB d'*E. coli*.

Par ailleurs, Dutton et ses collaborateurs ont montré que même si certaines bactéries ne possédaient pas de DsbB, bon nombre d'entre elles entre autres *Mycobacterium tuberculosis*, *Synechococcus sp.*, *Leptospira interrogans* codaient pour une enzyme dont le rôle serait analogue à celui de DsbB.

Ils l'appelèrent « Vitamine K oxide reductase (VKOR) » chez *Mycobacterium tuberculosis* (Dutton *et al.*, 2008) en référence à la VKOR humaine, enzyme impliquée dans le processus de la coagulation sanguine. En effet, chez cette dernière, les vitamines K1 et K2 peuvent remplacer l'ubiquinone comme accepteur d'électrons. De plus, la structure de la VKOR de *Mycobacterium tuberculosis* serait très similaire à celle de la VKOR humaine avec en particulier, une organisation en 4 passages transmembranaires très semblable et une structure du site catalytique remarquablement conservée (Goodstadt and Ponting, 2004). Ainsi alors que chez ces bactéries, on a un système Dsb formé de deux entités bien distinctes : DsbA et analogue VKOR, certaines d'entre elles telles que *Synechococcus sp.* et *Leptospira interrogans* ont la particularité d'avoir leurs protéines DsbA et l'homologue VKOR fusionnées, formant de ce fait un unique système Dsb (Dutton *et al.*, 2008). L'homologue VKOR de *Synechococcus sp.*, qui a été cristallisé, possède également les 4 domaines transmembranaires de la VKOR humaine, plus un domaine transmembranaire supplémentaire correspondant à une « DsbA-like » (Li *et al.*, 2010).

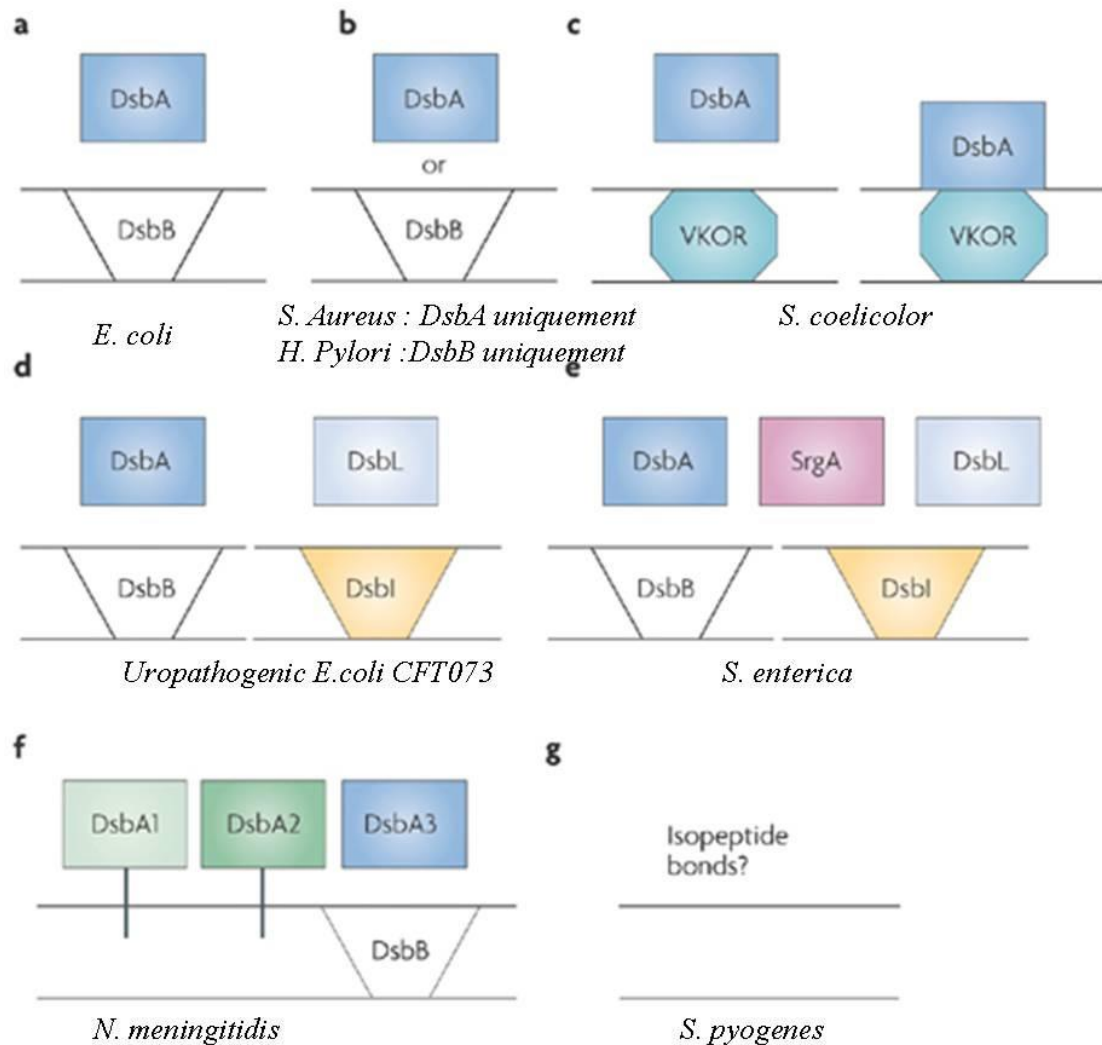


Figure 16 : Schéma des différents types d'oxydations mis en évidence chez les bactéries. (Heras *et al.*, 2009).

Bien que les processus cellulaires dans lesquels la VKOR bactérienne (et DsbB) et la VKOR humaine sont impliquées (formation de liaisons disulfures et coagulation sanguine) soient très différents, les réactions enzymatiques qu'elles effectuent sont assez analogues vu que dans les deux cas elles assurent le transfert d'électrons d'une protéine de type thiorédoxine à une quinone. La VKOR humaine peut transférer les électrons de la protéine disulfure isomérase (PDI), également membre de la famille des thiorédoxines et principal catalyseur de la formation des liaisons disulfures dans les protéines sécrétées eucaryotes, à la vitamine K, une quinone, dans la membrane du réticulum endoplasmique (Goodstadt and Ponting, 2004, Wajih *et al.*, 2007).

Cette réaction produit de la vitamine K réduite, qui est nécessaire comme cofacteur pour l'enzyme γ -carboxylase, permettant à cette enzyme d'effectuer des modifications post-traductionnelles essentielles à l'activité de plusieurs facteurs de coagulation (Stafford, 2005). Ainsi, le rôle biologique de la VKOR humaine en a fait une cible privilégiée dans les traitements anticoagulants conduisant au développement de plusieurs molécules inhibitrices de type anti-vitamine K (AVK) pour bloquer son activité et stopper par ricochet le processus de coagulation. Par ailleurs, Ces molécules notamment la warfarine inhiberaient l'activité de la VKOR de *Mycobacterium tuberculosis* mais aussi de *Synechococcus sp.* (Dutton *et al.*, 2010). Mais aucune donnée à notre connaissance sur l'effet de cette molécule sur la VKOR de leptospire n'est disponible, d'où l'un des intérêts de notre travail.

D. Les inhibiteurs anticoagulants antivitamines K de l'activité VKOR

1. Historique

Le premier inhibiteur a été identifié de façon fortuite comme c'est le cas dans bon nombre de découvertes dans l'histoire. En effet, il faut remonter dans les années 1920 aux États Unis et au Canada où dans des régions agricoles, certains animaux d'élevages bovins présentaient des syndromes hémorragiques spontanés et mortels. Après enquête, le vétérinaire F. W. Schofield montrait deux ans plus tard que ces manifestations étaient dues à l'ingestion d'aliments moisissés (trèfle, luzerne) importés d'Europe. Le retrait de ces aliments dans la ration quotidienne des animaux avait permis leur rétablissement (Schofield, 1984). Mais, ce n'est qu'en 1939 que la molécule responsable de ces hémorragies a été identifiée par Karl Paul Gerhard Link, un biochimiste américain, qui était parvenu à isoler sa structure cristalline. Il s'agissait de la 3,3'-diméthylène-4-hydroxycoumarine qu'il a nommé dicoumarol après l'avoir synthétisée. Cette molécule résultait de la dégradation du fourrage car durant ce processus la coumarine était oxydée en 4-hydroxycoumarine puis se couplait au formaldéhyde pour enfin se dimériser formant ainsi le dicoumarol.

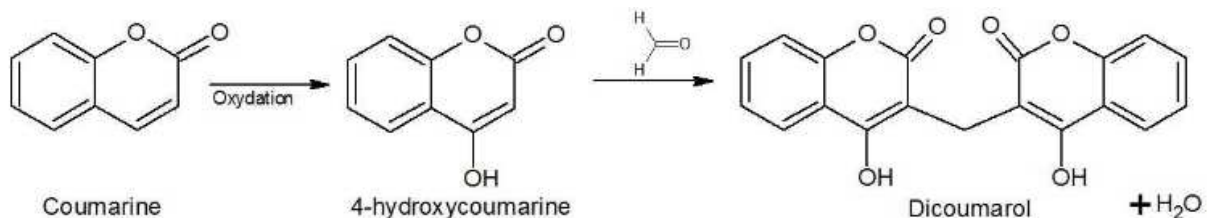


Figure 17 : Formation du dicoumarol.

Vingt ans plus tard, Link a démontré que l'action délétère du dicoumarol pouvait être contrée par l'injection de vitamine K, révélant ainsi la fonction antivitamine K du dicoumarol (Link, 1959). Son équipe et lui ont développé 106 analogues du dicoumarol. Ayant montré les effets anticoagulants du dicoumarol chez l'homme, ces molécules sont utilisées en médecine humaine dans le cadre de la prévention de survenue des problèmes thromboemboliques (thromboses, infarctus du myocarde, prothèses valvulaires cardiaques...). Par ailleurs, ces molécules sont également utilisées comme rodenticides afin de gérer la prolifération des rongeurs. L'une d'elles, la warfarine (« warf » pour Wisconsin Alumni Research Foundation et « arine » pour coumarine) appelée ainsi en l'honneur de l'institution ayant financé leur recherche à cette époque, a connu un essor fulgurant après avoir été utilisée pour traiter le président américain

Eisenhower qui avait fait une crise cardiaque en 1955 (Sadler, 2004). Utilisée comme rodenticide depuis 1948, c'est d'ailleurs la seule molécule utilisée aussi bien en médecine humaine que dans la gestion des populations de rongeurs. Hormis celle-ci, les molécules utilisées en médecine humaine sont différentes de celles utilisées comme rodenticides.

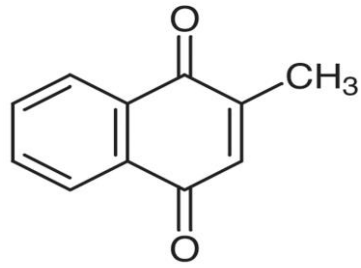
2. Structure et classification

Toutes les molécules d'AVKs synthétisées depuis la découverte du dicoumarol peuvent être classées en 3 catégories en fonction de leur structure chimique. En effet, elles ont toutes été développées à partir de trois noyaux principaux : la 4-hydroxycoumarine, la 4-hydroxythiocoumarine et l'indane-1,3-dione. Tous ces noyaux ont en commun une naphtoquinone (2-méthyl-1,4-naphtoquinone) nécessaire aux transferts d'électron et qui est aussi la structure de base de la vitamine K (Kralt *et al.*, 1967).

En médecine humaine, les AVKs utilisés sont soit des dérivés du noyau 4-hydroxycoumarine : coumafène, acénocoumarol, tiocloumarol... ou soit des dérivés de l'indane-1,3-dione : fluindione, phénindione. En France, seuls sont utilisés le coumafène, l'acénocoumarol et la fluindione.

Dans le cadre de la gestion des populations de rongeurs, les molécules utilisées proviennent des 3 catégories de noyaux chimiques citées précédemment. Nous y retrouvons entre autres le coumafène, le coumatétralyl, la bromadiolone, le difénacoum, la chlorophacinone, le diféthialone...

Par ailleurs, l'analogie structurale de ces composés avec la vitamine K leur confère un mécanisme d'action commun.



2-methyl 1,4 naphthoquinone

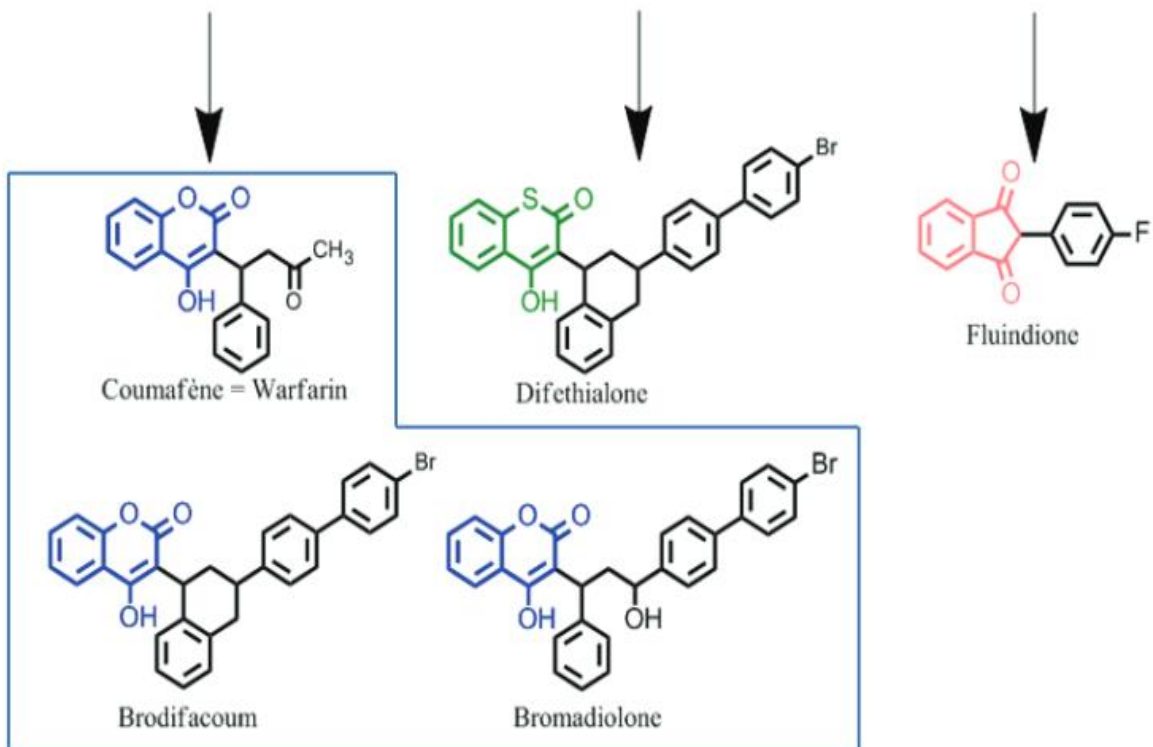
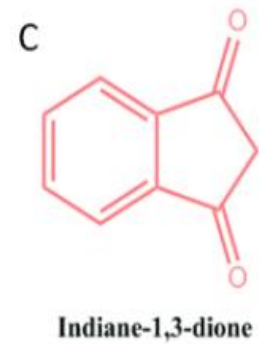
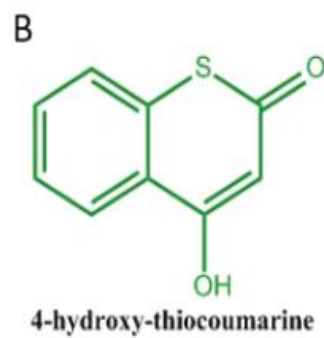
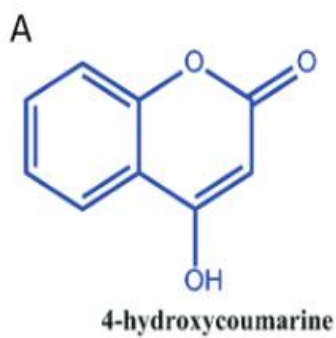


Figure 18 : Structure chimique du noyau 2-methyl 1,4 naphthoquinone commune à tous les AVKs et celle des trois classes d'AVKs et de leurs dérivés.

3. Mécanisme d'action

Inhibiteurs non compétitifs de la VKORC1 (Lasseur *et al.*, 2005), les AVKs empêchent le recyclage de la vitamine K en agissant au niveau de deux étapes successives du cycle : la réduction de la vitamine K époxyde en vitamine K quinone d'une part et la réduction de la vitamine K quinone en vitamine K hydroquinone d'autre part (Rost *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2004). Une inhibition potentielle de la NQO1 par le dicoumarol a également été décrite (Ernster, 1960). La restriction de la biodisponibilité de la vitamine K hydroquinone suite à cette inhibition provoque une diminution de l'activité gamma-glutamyl-carboxylase. Les facteurs de la coagulation vitamine K dépendant restent donc sous forme inactive, ce qui ne leur permet pas de se fixer et donc de se concentrer grâce à la pince dicarboxylique sur l'agrégat plaquettaire, perturbant ainsi la cascade de la coagulation.

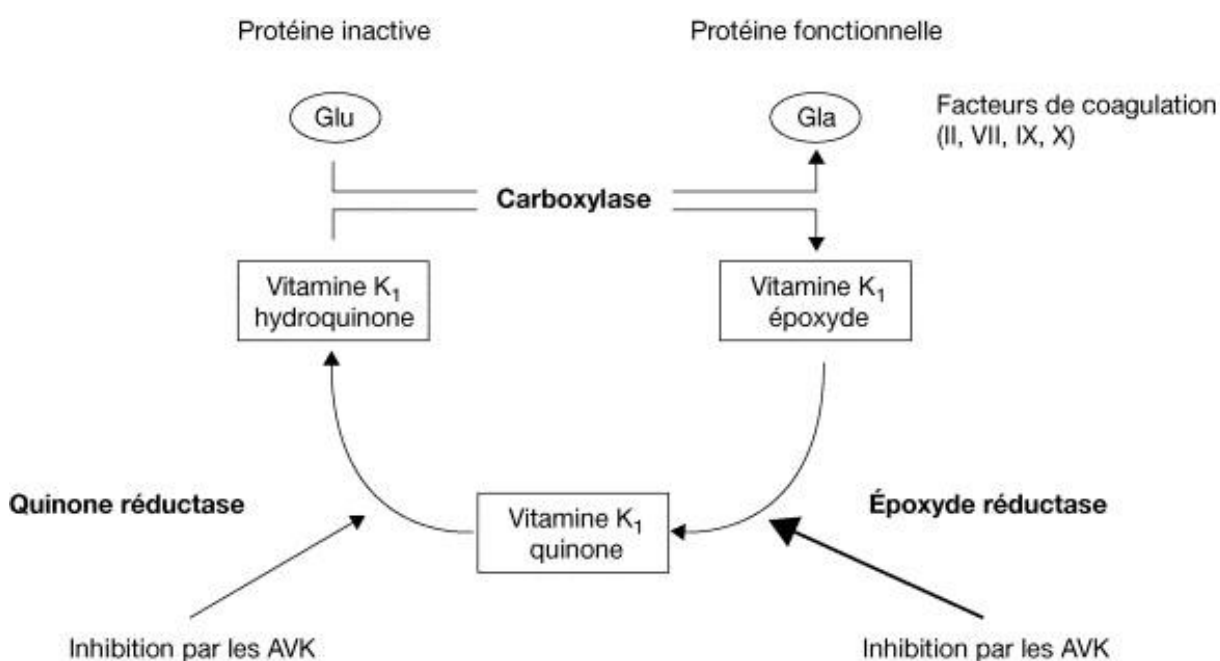


Figure 19 : Cycle de la vitamine K et mode d'action des antivitamines K (Gamelin and Harry, 2005).

Malgré l'utilisation intensive des AVKs à travers le monde aussi bien en médecine humaine que dans la gestion des populations des rongeurs, leur mécanisme concret d'inhibition de VKORC1 reste incertain à ce jour. En effet, Silverman a proposé en 1980, un mécanisme d'inhibition pour les AVKs dérivés du noyau 4-hydroxycoumarine. Il a suggéré une acylation par l'inhibiteur d'une des 2 cystéines du site actif de VKORC1, ou éventuellement d'un acide aminé tiers nucléophile et spatialement proche du site actif.

Le thioester résultant de cette réaction, instable et difficile à mettre en évidence en condition de pH neutre, rendrait compte du caractère irréversible de l'inhibition ; ce qui serait cohérent avec le mécanisme d'inhibition non compétitive mis en évidence en 2005 (Tie and Stafford, 2008).

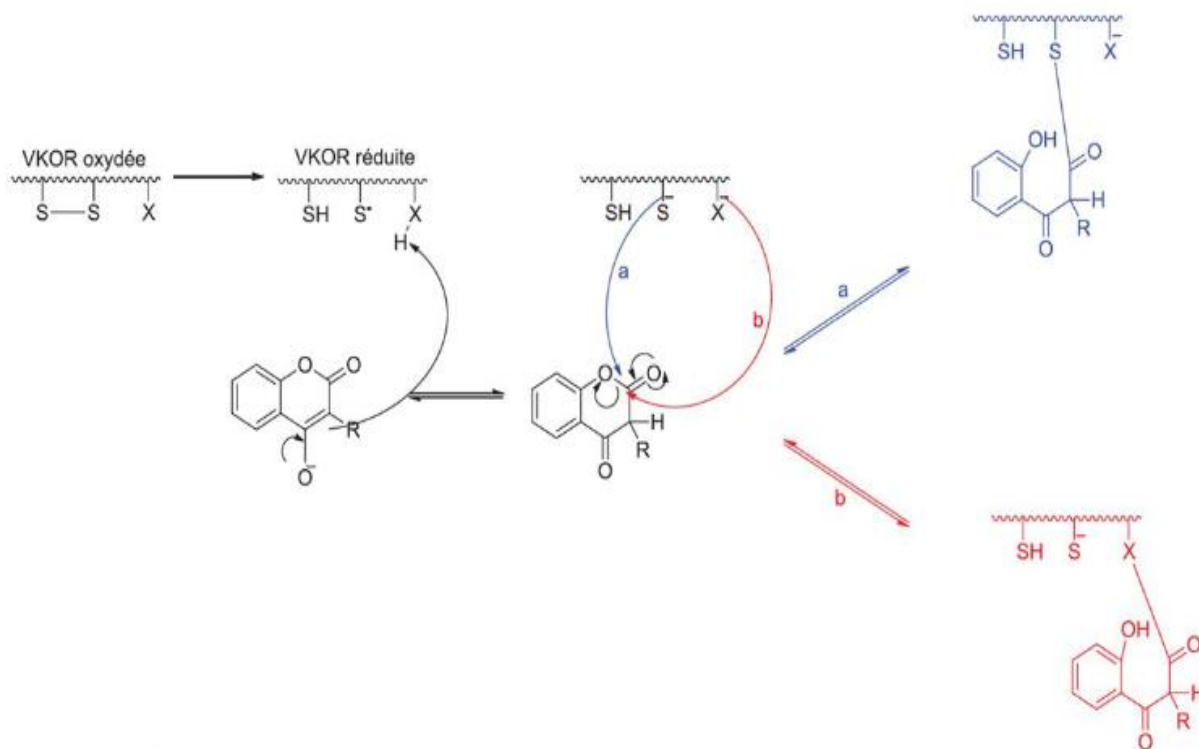


Figure 20 : Mécanisme d'inhibition de VKORC1 par les AVK selon Silverman, 1980.

(a) Cas d'une acylation d'un des résidus de cystéine du site actif par l'AVK. (b) Cas d'une acylation d'un acide aminé nucléophile spatialement proche du site actif par l'AVK.

Cependant, d'autres études ont rapporté que le coumatène interagirait plutôt avec la VKOR oxydée et bloquerait la réduction de la VKOR contredisant le mécanisme décrit par Silverman (1980). Les auteurs ont même suggéré que l'effet inhibiteur du coumatène serait plus conséquent lorsque la VKOR est incubée avec l'inhibiteur préalablement à l'introduction du dithiothréitol (Fasco *et al.*, 1983).

Enfin, plus récemment, Rishavy et ses collaborateurs ont proposé l'hypothèse selon laquelle la fixation du coumatène constituerait une barrière empêchant la cascade de transfert d'électrons nécessaire à l'activation de la VKORC1 (Rishavy *et al.*, 2011).

Face à cette incertitude sur le mécanisme d'inhibition de la VKORC1 par les AVKs, les études par modélisation moléculaire pourraient être une piste pour répondre à plusieurs interrogations.

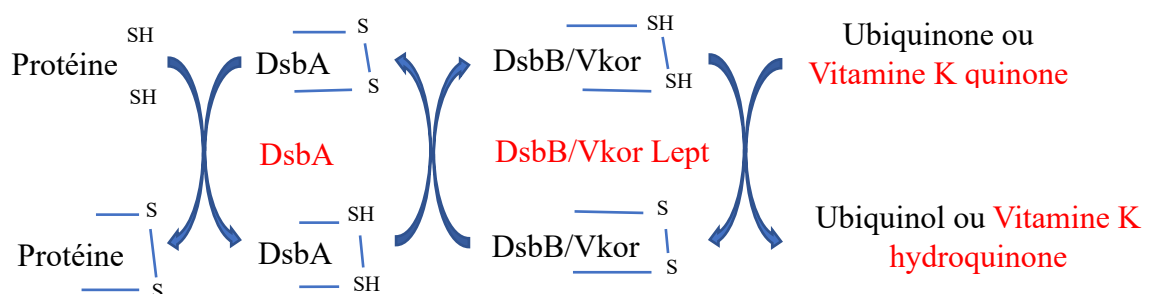
Dans le cas des leptospires, la description structurale de l'enzyme est d'autant plus complexe dans la mesure où il n'existe pas à ce jour à notre connaissance de structure 3D résolue expérimentalement.

III. OBJECTIFS DE LA THESE

Comme nous l'avons rapporté précédemment, la leptospirose est une zoonose bactérienne à répartition mondiale causée par un spirochète du genre *Leptospira*. C'est une maladie émergente voire ré-émergente dans de nombreuses régions du monde du fait des phénomènes de changements climatiques et de la croissance démographique galopante. Elle constitue un véritable enjeu sanitaire et économique au vu des conséquences qu'elle peut engendrer.

Rapportée chez plus de 150 espèces mammaliennes (Ko *et al.*, 2009), la leptospirose est une maladie à symptomatologie peu spécifique allant d'une infection subclinique voire asymptomatique à un syndrome grave d'infection multiviscérale. Son traitement repose sur une antibiothérapie qui la plupart du temps est mise en place sur la base d'une suspicion alliant une symptomatologie clinique compatible avec la maladie à une exposition récente à certains facteurs de risque connus. S'il est vrai que jusqu'à présent aucune résistance aux antibiotiques utilisés dans le cadre du traitement n'a été rapportée, il est judicieux d'envisager des alternatives au vu de la recrudescence des phénomènes d'antibiorésistance qui constituent de nos jours un véritable problème de santé publique. Il va sans dire pour cela qu'une meilleure compréhension des facteurs de virulence mais aussi des mécanismes de pathogénicité s'avère indispensable. C'est dans ce cadre que s'inscrit l'originalité de ce travail de thèse qui avait pour objectif global d'étudier la motilité des leptospires, un facteur de virulence potentiellement vitamine K dépendant.

La motilité est une faculté essentielle à la physiologie et la survie de la bactérie dans l'environnement. Cette capacité motile joue un rôle dans la virulence des leptospires pathogènes. Etant donné que l'organelle responsable de leur motilité est le flagelle, une analyse de cette dernière montre qu'elle est constituée d'un assemblage protéique dont certaines possèdent des ponts disulfures indispensables à leur bon fonctionnement. Chez plusieurs bactéries pathogènes, la formation des ponts disulfures fait intervenir une enzyme de type thiorédoxine, la DsbA, qui lorsqu'elle est mutée, conduit à des diminutions importantes de leur virulence. Cette enzyme est réduite au cours de la formation du pont disulfure de la protéine cible. Sa ré-oxydation est assurée par une seconde enzyme, la DsbB qui utilise une ubiquinone qui est réduite en Ubiquinol au cours de la catalyse.



Chez certaines bactéries, la DsbB est remplacée par une enzyme homologue appelée VKOR en référence à la Vitamine K epoxide reductase impliquée dans le processus de coagulation sanguine chez les mammifères. L'analyse du génome des leptospires montre l'existence de gènes codant pour cette enzyme homologue mais il n'existe à notre connaissance aucune étude portant sur cette protéine.

Pour mener à bien notre étude, des objectifs spécifiques ont été définis :

Objectif 1 : Modéliser en 3D la protéine VKOR des leptospires et étudier les interactions avec ses ligands.

Il a été question de faire une analyse structurale de la séquence peptique de la VKOR des leptospires. Il s'est agi pour nous de voir s'il y avait une conservation des acides aminés constituant la séquence de VKOR entre les leptospires pathogènes et saprophytes et de caractériser le site actif de la protéine. Nous avons par la suite comparé la séquence de VKOR des leptospires à celle des mammifères sur laquelle de nombreuses études ont été menées, puis terminé par une étude de l'affinité de la VKOR des leptospires aux anticoagulants étant donné que celle des mammifères est très affine à ces molécules. Nous avons tenté de répondre à ce premier objectif par une approche par modélisation moléculaire (**Article 1 : *Structural investigation of vitamin K epoxide reductase domain-containing protein in Leptospira species: a potential target for the development of new leptospirosis treatments as an alternative to antibiotics***).

Objectif 2 : Développer une méthode de caractérisation de l'activité enzymatique de la VKOR des leptospires applicable à la protéine analogue des mammifères, la VKORC1.

Dans ce second objectif, nous avons cherché à caractériser l'activité de la VKOR des leptospires par une approche *in vitro*. Le manque de recul sur cette enzyme, nous a amené à développer une méthode plus physiologique de caractérisation de l'activité enzymatique par le système Trx/trxR dépendant en nous servant de la VKORC1 de mammifères (**Article 2 : *A more physiological reduction of VKOR for in vitro enzymatic assays***).

Objectif 3 : Développer un outil permettant d'étudier la motilité des leptospires sur des souches de laboratoire mais aussi des souches de terrain récemment isolées.

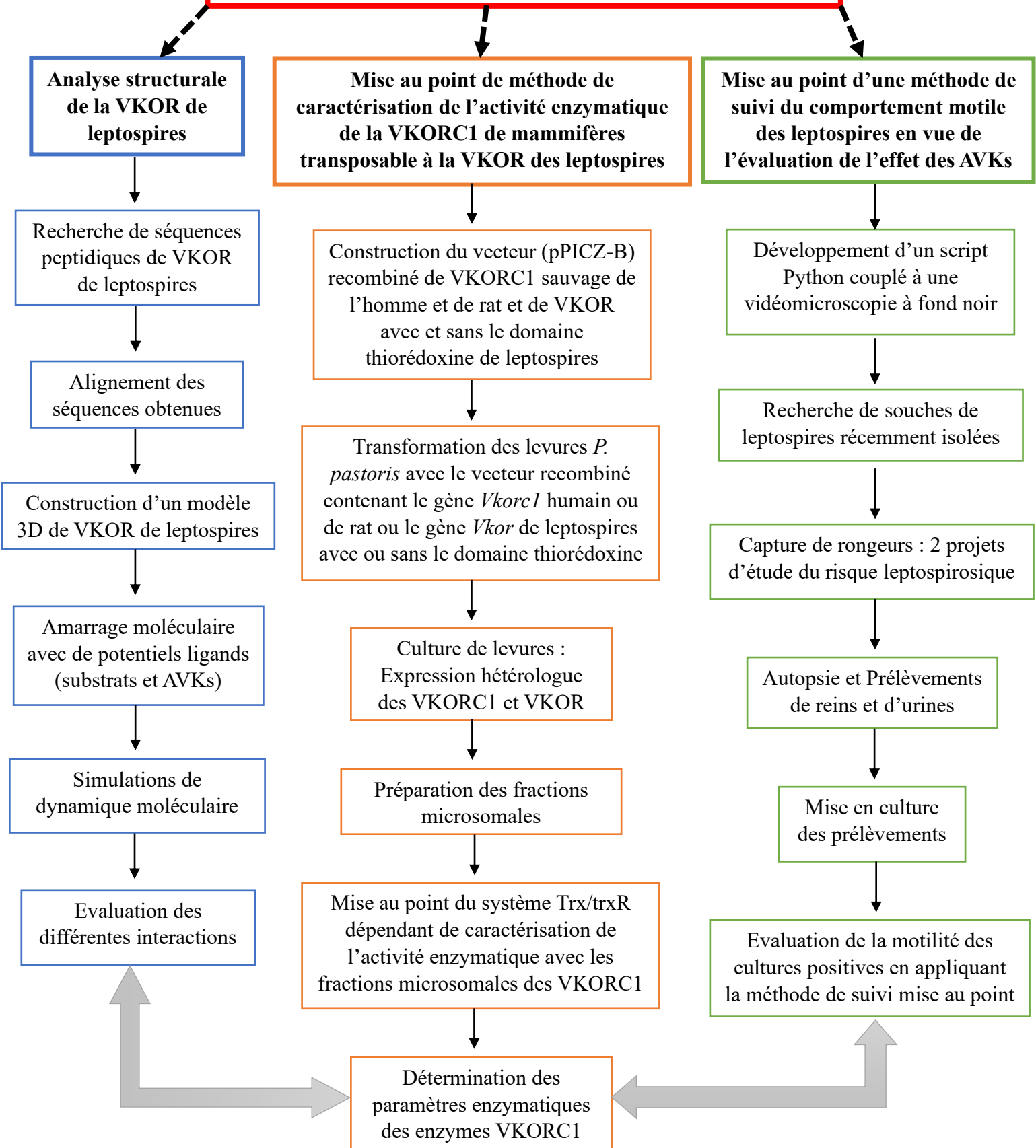
La VKOR serait indispensable à l'intégrité de certaines protéines essentielles au bon fonctionnement du flagelle. Elle pourrait être sensible à l'effet des anticoagulants, ce qui aurait

des répercussions sur la motilité des leptospires. Afin de pouvoir suivre cette motilité lors d'exposition des leptospires aux AVKs, il s'est agi pour nous de mettre au point un outil de suivi de leur motilité (**Article 5 : *Lepttracker: a bioinformatics tool to automatically detect, track and calculate Leptospira motility from microscopy pictures***).

L'application de cet outil a nécessité de disposer de souches de leptospires ayant une bonne motilité. Cette démarche nous a amené à faire du travail de terrain pour la capture de rongeurs sauvages dans l'optique d'obtenir des souches de leptospires récemment isolées (**Article 3 : *Identification of pathogenic Leptospira kirschneri serogroup Grippityphosa in water voles (Arvicola terrestris) from ruminant pastures in Puy-de-Dôme, Central France*** et **Article 4 : *Dynamics of leptospirosis in an urban Norway rat (Rattus norvegicus) population in densely populated area of Lyon and Bordeaux (France) and risk to public health***).

Face à ces différents objectifs, la stratégie mise en place durant ce travail de thèse est résumée dans le schéma ci-après.

Leptospires et vitamine K : identification d'un nouveau facteur de virulence vitamine k dépendant, la VKOR





IV. MATERIELS & METHODES

Pour répondre aux objectifs que nous nous sommes fixés dans ce travail, deux approches ont été utilisées. Nous allons dans cette partie aborder de manière succincte toutes les différentes étapes méthodologiques de chaque approche auxquelles nous avons eu recours, étant donné que chacune d'elle sera détaillée de façon plus explicite dans les articles rédigés ou en cours de rédaction.

A. Approche par modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire est une approche qui associe la bio-informatique et la biophysique pour prévoir la réactivité d'une molécule ou d'un système de molécules. Elle permet à partir de la composition et du placement des atomes d'une molécule, de représenter et de visualiser sa structure tridimensionnelle (3D), ce qui concourt à une meilleure compréhension du fonctionnement de la molécule, de son déplacement ainsi que de son interaction avec d'autres protéines ou ligands (Warshel, 1991). Pour ce faire, il est donc indispensable de disposer des coordonnées spatiales de la molécule à étudier que l'on peut retrouver à travers diverses banques de données telles que la *Protein Data Bank* en ce qui concerne des études sur des protéines.

1. Exploitation des banques de données

Les banques de données sont des bibliothèques de stockage de connaissances générées dans divers domaines. Hébergées sur des serveurs disponibles en ligne ou installés localement, les informations disponibles sur ces banques sont vérifiées et validées. Dans le cadre de nos travaux, nous avons eu à exploiter *GenBank* (Benson *et al.*, 2003), *UniProt* (Magrane, 2011), *Protein Data Bank (PDB)* (Berman *et al.*, 2000) et *BIGSdb* (Jolley and Maiden, 2010).

Base de données américaine en libre accès, la *GenBank* recense l'ensemble des séquences nucléotidiques publiquement disponibles ainsi que leur traduction en protéines. *UniProt* pour *Universal Protein Ressource* est quant à elle une banque de données qui contient des informations sur les séquences peptidiques de milliers de protéines tandis que la *Protein Data Bank* regroupe l'ensemble des structures tridimensionnelles, résolues par cristallographie aux rayons X, par spectroscopie RMN ou par cryomicroscopie. Pour ce qui est de la *BIGSdb*, c'est une plateforme de taxonomie et de nomenclature des souches basées sur la génomique et nous avons eu à utiliser pour notre travail, celle de l'Institut Pasteur sur les leptospires.

2. Alignement de séquences obtenues

Sachant que la séquence peptidique d'une protéine renferme des informations pour la compréhension de structure tridimensionnelle et partant de l'hypothèse qui sous-tend que des protéines possédant des séquences similaires risquent fort d'avoir des propriétés physico-chimiques identiques, l'alignement de séquences s'avère une étape indispensable dans l'étude d'une protéine d'intérêt. Pour permettre la comparaison en un laps de temps de la séquence cible aux milliers de séquences stockées dans les bases de données, plusieurs outils informatiques ont été développés. Dans le cadre de nos travaux, nous avons eu recours aux algorithmes *BLAST* (Altschul *et al.*, 1990) et *Clustal Omega* (Sievers *et al.*, 2011).

BLAST pour *Basic Local Alignment Search Tool* s'exécute par comparaison de paires d'acides aminés à la suite de laquelle s'obtient un score indiquant le degré de similitude entre les séquences alignées. Plus ce score est élevé, plus important est le degré de similitude. L'alignement peut être global ou partiel selon le paramétrage effectué au départ. L'alignement global prend en compte tous les caractères de chaque séquence alors que l'alignement local se focalise sur les zones les mieux conservées. Toujours est-il que l'alignement avec *BLAST* permet d'établir des liens évolutifs et fonctionnels entre séquences et d'identifier la famille de gènes ou de protéines à laquelle est potentiellement apparentée la séquence d'intérêt.

Outil d'alignement multiple de séquences, *Clustal Omega* fonctionne en remplaçant chaque séquence par un vecteur n éléments, où chaque élément représente simplement sa distance par rapport à l'une des n « séquences référencées ». Ces vecteurs sont par la suite regroupés rapidement grâce à des méthodes conventionnelles telles que K-means ou UPGMA. Ensuite, par comparaison de deux profils de modèle de Markov caché, les alignements sont en fin de compte réalisés. Cet outil renferme également d'autres fonctions permettant d'ajouter de nouvelles séquences aux alignements existants ou de se servir des alignements existants pour aider à aligner de nouvelles séquences afin d'améliorer sa précision.

3. Construction d'un modèle 3D

Pour une protéine cible dont la structure 3D n'a pas été résolue expérimentalement, il est possible de combler le manque d'informations structurales en construisant un modèle. La conception du modèle se fera à partir d'une protéine homologue dont la structure 3D a été résolue expérimentalement et présentant une séquence peptidique similaire. Il s'agit de la modélisation par homologie dont le principe repose sur la relation séquence-structure-fonction des protéines et sur le fait que la structure 3D de protéines homologues est relativement bien

conservée à travers l'évolution. La réalisation de la modélisation par homologie comprend trois grandes étapes :

❖ **L'identification de la protéine homologue**

Cette identification s'obtient en alignant la séquence de la protéine d'intérêt à toutes les séquences disponibles dans différentes bases de données. Une des méthodes les plus utilisées à cette fin est *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) qui permet d'établir des liens évolutifs et fonctionnels quantifiés par des scores entre séquences et d'identifier la famille de gènes ou de protéines à laquelle est potentiellement apparentée la séquence de la protéine d'intérêt. Plus la protéine homologue présentera de similitude avec la protéine d'intérêt, plus le modèle construit sera fiable.

❖ **L'alignement des séquences**

C'est l'étape qui suit une fois la protéine homologue identifiée. Il s'agit à ce niveau de faire un alignement total des deux séquences afin de repérer les zones conservées et les régions divergentes (insertion ou délétion d'acides aminés) appelées « gap ».

Différents logiciels tels que Clustal Omega peuvent être utilisés à cette fin. Cette étape est très importante car le modèle généré pourrait probablement être faussé si l'alignement est incorrect. Un point critique est aussi de vérifier que les régions non conservées ne soient pas situées dans le site catalytique de la protéine car il est préférable que la protéine homologue choisie ait un site catalytique conservé par rapport à la protéine d'intérêt.

❖ **La construction du modèle**

Cette étape consiste à générer la structure 3D de la protéine d'intérêt à partir de la protéine homologue via différents logiciels tels que *MODELLER (version 9.2)* (Webb and Sali, 2016).

Ce dernier a été utilisé au début de la thèse pour générer la structure tridimensionnelle de notre protéine d'intérêt. Il permet d'imposer un repliement tridimensionnel particulier à certains domaines de la protéine cible tels que les ponts disulfures. De façon simpliste, il suffit de fournir un alignement de la séquence à modéliser avec les structures du modèle, les coordonnées atomiques des modèles et un fichier de script. Ensuite, *MODELLER* calcule automatiquement un modèle contenant tous les atomes non-hydrogènes, en quelques minutes.

Il existe outre *MODELLER* d'autres logiciels de prédictions de structures. De façon générale, ces logiciels peuvent ne pas fournir de modèles couvrant l'intégralité de la structure cible et leur précision atomique globale dépend non seulement de la pertinence des modèles, mais également de la modélisation des régions sans base de modèle.

Face à l'avalanche de protéines de structures tridimensionnelles inconnues malgré des techniques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Loquet *et al.*, 2010) ou la Cryo microscopie électronique (Fujii *et al.*, 2010), il aura fallu attendre lors de la CASP 14 (Critical Assessment for Structure Prediction) en 2020, pour voir émerger un logiciel *AlphaFold 2* (Jumper *et al.*, 2021) qui a surpassé les différents logiciels utilisés pour la construction du modèle dans la modélisation par homologie. Cet outil d'intelligence artificiel a particulièrement bien réussi à prédire la structure de la façon la plus précise de cibles classées comme les plus difficiles par les organisateurs. Développé par DeepMind, filiale de Google, il résulte d'une combinaison d'approches bio-informatiques et physiques. Sa précision réside dans le fait qu'il incorpore de nouvelles architectures de réseaux neuronaux et des procédures d'entraînement basées sur les contraintes évolutives, physiques et géométriques des structures protéiques. La prédiction des coordonnées tridimensionnelles des atomes lourds de la protéine cible se fait en utilisant la séquence d'acides aminés primaires comme entrée.

C'est donc cet outil que nous avons finalement utilisé pour la construction de notre modèle. De façon pratique, il nous a fallu juste fournir la séquence peptidique de notre protéine d'intérêt et le logiciel nous a généré le modèle. Une fois le modèle construit, l'étude de l'interaction de notre protéine d'intérêt avec des ligands (des substrats potentiels et AVKs dans notre cas) s'est faite dans un premier temps par Docking moléculaire.

4. Docking moléculaire ligand/protéine

Le Docking moléculaire est une technique informatique empirique utilisée pour la prédiction des interactions probables entre des ligands (substrat, activateur ou inhibiteur) et les acides aminés composant la structure d'une protéine. C'est un outil qui est très sollicité pour la recherche de nouvelles molécules à visée thérapeutique notamment dans le criblage de plusieurs molécules afin d'identifier celles pouvant avoir une forte activité sur une protéine d'intérêt ou au contraire de repérer la cible d'une molécule ayant des activités biologiques intéressantes. Par ailleurs, il peut aussi être utilisé pour mettre en évidence les résidus à explorer dans une protéine d'intérêt dont la structure 3D a été définie, afin d'optimiser l'affinité du ligand. L'amarrage moléculaire se déroule généralement en deux étapes :

- L'étape de positionnement du ligand dans le site actif de la protéine correspondant à l'échantillonnage des différentes conformations possibles que peut prendre le ligand dans le site actif. Chaque conformation prédite est appelée *pose*.
- L'étape d'évaluation des interactions énergétiques potentielles entre le ligand et la protéine et de classement des conformations prédites grâce à une fonction notation qui est le *scoring*.

Différents programmes de Docking peuvent être utilisés pour exécuter ces deux étapes. Ces logiciels peuvent être répartis en deux catégories selon la méthode choisie : la simulation de trajectoire et l'ajustement de fragments.

Concernant la simulation de trajectoire, cette méthode consiste à explorer à partir d'une position initiale aléatoire, plusieurs conformations du ligand par évaluation de l'énergie d'affinité ligand/protéine. Le complexe ligand/protéine le plus stable correspond à la position du ligand ayant la plus basse énergie. On retrouve comme outils de Docking dans cette catégorie *AutoDock* (Morris *et al.*, 1998) ou encore *Glide* (Friesner *et al.*, 2004) pour ne citer que ceux-là.

Pour ce qui est de la seconde méthode, l'ajustement de fragments, elle est basée sur la complémentarité des formes. Le ligand dans ce cas, est décomposé en plusieurs fragments puis reconstruit dans le site actif de la protéine, en essayant de faire correspondre les géométries et les fonctions chimiques. Comme outils de Docking utilisés à cette fin, on peut citer entre autres les logiciels *GOLD* (Jones *et al.*, 1997), *FlexX* (Rarey *et al.*, 1996), *DOCK* (Ewing *et al.*, 2001). Cette méthode est beaucoup plus rapide que la simulation de trajectoire qui bien qu'elle soit plus lente prend en revanche mieux en compte la flexibilité du ligand et permet l'exploration de régions plus vastes.

Dans le cas de notre travail, nous avons réalisé nos tests de Docking en ayant recours au logiciel *AutoDock 4* (Morris *et al.*, 2009) ainsi que son interface graphique *AutoDockTools*. Cet outil qui permet la simulation d'amarrage de ligand flexible sur un récepteur rigide, associe une méthode d'évaluation de l'énergie à partir de grilles de potentiels et différentes méthodes d'exploration allant de la dynamique moléculaire aux algorithmes génétiques. L'évaluation de l'interaction ligand/protéine suit plusieurs étapes :

- Préparation des fichiers de coordonnées atomiques du ligand et de la protéine

Il s'agit dans cette étape de vérifier et d'affiner la structure de la protéine et du ligand. La protéine doit être représentée avec tous ses hydrogènes polaires ainsi que toutes les charges partielles de tous ses atomes. Sur le ligand qui contient également tous ses hydrogènes et charges partielles, on définit les liaisons qui seront en libre rotation. Une fois la préparation terminée, la protéine et le ligand sont sauvegardés au bon format.

- Génération d'une boîte contenant la grille et calcul des grilles de potentiel d'interaction

La grille est une matrice tridimensionnelle englobant la région cible (site catalytique dans notre cas) de la protéine (figure 21). Les dimensions de la grille prédéfinies par l'utilisateur, définissent une boîte qui sera la zone à explorer par le ligand. Chaque point de la grille enregistre le potentiel d'interaction entre une sonde, constituée d'un ou plusieurs atomes du ligand, et l'ensemble des atomes de la protéine. Le calcul de l'énergie d'interaction est effectué par *AUTOGRID*, un programme d'*AUTODOCK*. Le but est d'évaluer très rapidement l'énergie de liaison pour les différentes configurations du ligand à chaque point de la grille.

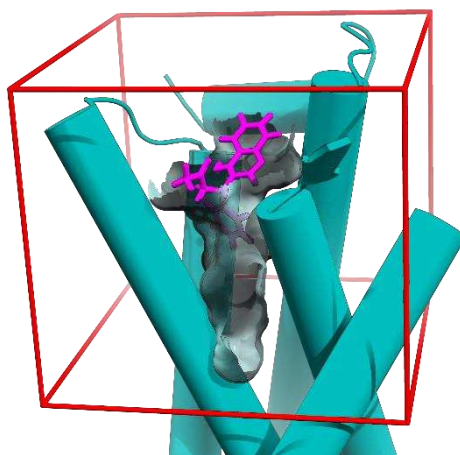


Figure 21 : Schéma d'une grille de potentiel englobant le site actif de la protéine d'intérêt

- Recherche et proposition des configurations d'amarrage

Au cours de cette étape, le programme *AUTODOCK* va rechercher le complexe protéine/ligand le plus favorable en déplaçant et modifiant les conformations du ligand. Les différentes positions et configurations du ligand sont échantillonnées rapidement via un algorithme génétique lamarckien. La fonction de notation des poses du ligand basée sur un champ de force semi-empirique détermine l'énergie d'interaction entre la protéine et le ligand.

Les poses les plus favorables sont sauvegardées après avoir défini lors du paramétrage le nombre de poses à conserver (100 dans notre cas). Plus le score obtenu pour une pose est négatif et plus l'interaction protéine/ligand est forte.

➤ Analyse des résultats

A la fin du Docking, un fichier est généré et avec *AUTODOCK*, l'on peut déjà faire une première analyse. Nous y reviendrons dans la partie **Analyses des données après Docking moléculaire**.

5. Dynamique moléculaire

Alors qu'avec le Docking moléculaire, la protéine est maintenue fixe, la dynamique moléculaire permet de prendre en compte la grande flexibilité de la molécule. En effet, celle-ci est dotée d'une plasticité conformationnelle qui lui permet d'interagir avec d'autres molécules. La dynamique moléculaire permet d'étudier la trajectoire de la molécule en lui appliquant des lois de la mécanique newtonienne (Frenkel and Smit, 1996). La molécule étant considérée comme un assemblage d'atomes dont les positions spatiales varient au cours du temps, le mouvement de chaque atome est déterminé en intégrant les équations de Newton :

$$F_i(t) = m_i \cdot a_i(t)$$

Où : $F_i(t)$ = Force s'exerçant sur l'atome i ; m_i = Masse de l'atome i

$a_i(t)$ = Accélération de l'atome i

L'accélération étant elle-même dérivée des coordonnées d'un atome i à un instant t, il en ressort que : $F_i(t) = m_i \cdot dv_i(t)/dt = m_i \cdot d^2r_i(t)/dt^2$

Si r_1, r_2, \dots, r_n sont les coordonnées des différents atomes à un instant t, il est possible de déterminer la force F_i s'exerçant sur un atome donné i par dérivation par rapport à ses coordonnées spatiales de la fonction énergie potentielle $E(r_1, r_2, \dots, r_n)$. Cette fonction énergie potentielle qui correspond à la somme des différentes interactions inter (entre atomes non liés chimiquement) et intramoléculaires (entre atomes liés chimiquement) du système, est définie par la relation :

$$E_{\text{potentielle}} = E_{\text{liée}} + E_{\text{non liée}}$$

Avec $E_{\text{liée}} = E_{\text{élongation}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{dièdre}}$ et

$E_{\text{non liée}} = E_{\text{électrostatiques}} + E_{\text{Van der Waals}}$

L'énergie « liée » se réfère aux contributions des liaisons, angles et angles dièdres étant donné que les atomes sont considérés comme des sphères non déformables. Ainsi, $E_{\text{elongation}}$, E_{angle} et $E_{\text{dièdre}}$ correspondent aux énergies de déformations des liaisons et angles considérés entre atomes et de la rotation de l'angle dièdre correspondant. Sachant que pour maîtriser le système, il faut également nécessairement prendre en compte les interactions entre les atomes éloignés, cela a permis l'introduction des termes d'énergie « non liée ». Cette énergie correspond aux interactions Van der Waals et électrostatiques entre les atomes.

Les paramètres et équations nécessaires à l'utilisation de cette méthode sont répertoriés dans un champ de force. Compte tenu du fait que la force change suivant la position des atomes, il est judicieux pour obtenir la trajectoire de ces derniers de réaliser une intégration numérique sur de petits intervalles de temps (pas d'intégration de l'ordre de la femtoseconde à la nanoseconde).

Plusieurs champs de force (CHARMM, AMBER, MM2, GROMOS...) peuvent être utilisés selon le système à étudier (présence de petites molécules ou acides aminés spécifiques, lipides, ADN, ARN, champs de force polarisés, etc...).

De façon pratique, le champ de force utilisé dans le cadre de nos travaux ainsi que les différents paramètres appliqués aux simulations de dynamique moléculaire de notre protéine d'intérêt suivent un protocole qui est sensiblement toujours le même quel que soit le logiciel utilisé.

a. Recours au logiciel *Gromacs* et utilisation du champ de force CHARMM36

Nous avons eu recours à une version actualisée du logiciel *GROMACS* (Van Der Spoel *et al.*, 2005) pour préparer nos simulations de dynamique moléculaire. Ce logiciel est bien adapté pour les molécules biochimiques (protéines, lipides, acides nucléiques) ayant beaucoup d'interactions liées et non liées compliquées. Il permet de fractionner un système simulé en groupe d'atomes constituant les différentes entités le caractérisant.

Composé de plusieurs sous-programmes exécutables en ligne de commande et permettant d'améliorer les performances de simulations sans sacrifier la précision, il renferme de nombreux champs de force (AMBER, CHARMM, GROMOS, OPLS) pouvant être modifiables par l'utilisateur en fonction de l'étude à mener.

Etant dans une approche tout-atome vu que tous les atomes du système sont considérés et simulés, nous avons utilisé comme champ de force, CHARMM36 (Best *et al.*, 2012).

C'est un champ de force tout-atome qui est bien adapté aux simulations de dynamique moléculaire des protéines et des lipides.

b. Construction d'un modèle de bicouche lipidique

C'est une étape cruciale dans la préparation des simulations de dynamique moléculaire portant sur des protéines membranaires (cas de notre protéine d'intérêt). De ce fait, en fonction de l'étude à mener, il est important de pouvoir simplifier ou modifier la composition de la membrane ce qui justifie la mise à disposition de membranes modèles. Le choix d'une membrane modèle dépend de sa propriété, de l'interaction à étudier mais aussi des limites de la technique envisagée. L'avantage en préparation de dynamique moléculaire est que la membrane modèle est prête à l'emploi pour avoir été déjà pré-équilibrée.

Outre l'existence de ces membranes modèles, il existe des logiciels permettant de générer des membranes sur mesure selon l'étude à mener. Cependant, celles-ci requièrent une étape de pré-équilibration avant leur usage dans la dynamique moléculaire. C'est cette option que nous avons retenue pour la construction de notre membrane.

Ainsi, nous avons généré notre membrane à partir du serveur Membrane Builder (MemBuilder) (Ghahremanpour *et al.*, 2014). Il a pour avantages de permettre de choisir le type de membrane à construire, la composition et les dimensions de celle-ci et le type de champs de force (AMBER, CHARMM, GROMOS) à utiliser. De plus, à la fin de la construction, la membrane est présentée en formats .pdb et .gro qui sont des formats pris en compte par *GROMACS*. Nous avons donc construit une membrane lipidique de 300 molécules de DLPC (1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine).

c. Solvation et Ionisation du système

Dans le souci de reproduire le milieu biologique dans lequel les interactions ont lieu, il est important que le système soit immergé dans un environnement aqueux. L'eau étant le solvant majoritaire du milieu biologique, elle a été choisie dans notre cas et implémentée avec le modèle d'eau TIP3P (Price and Brooks, 2004) qui permet de limiter les temps de calcul.

Dans ce modèle, la géométrie de la molécule d'eau est fixe et chaque atome, assigné d'une charge ponctuelle, est un point d'interaction. Par ailleurs, voulant partir d'un système totalement neutre pour faire la simulation, certaines molécules d'eau ont été remplacées par des ions (en général Na^+ ou Cl^-) afin de neutraliser les charges partielles de la protéine étudiée.

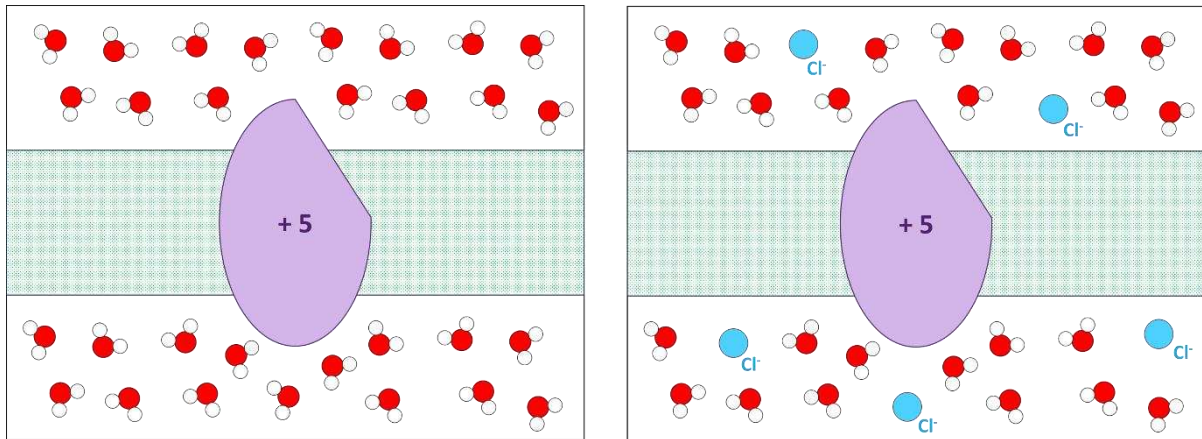


Figure 22 : Exemple de neutralisation du système par ajout de 5 ions Cl⁻.

Afin de pouvoir réaliser les simulations de dynamique moléculaire avec contrôle de la température et de la pression, la création d'une boîte s'avère nécessaire autour de notre système d'intérêt. Pour éviter les risques de sortie des atomes lors de la simulation, la boîte doit répondre aux conditions périodiques aux limites de telle sorte que lorsqu'un atome franchit une des faces de la boîte, il réapparaît automatiquement au niveau de la face opposée. Le système simulé est de cette façon virtuellement répété à l'infini (Figure 23).

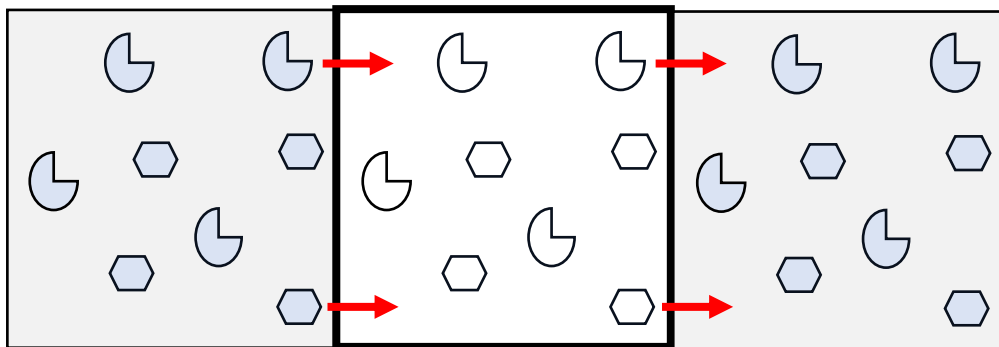


Figure 23 : Représentation du principe de conditions périodiques aux limites.

La boîte de simulation est délimitée par le cadre central noir à fond blanc. Sur chaque face de la boîte, sont répétées à l'infini ses copies. Les atomes sont représentés par les formes géométriques et le tiret rouge indique le mouvement d'un atome franchissant les limites de la boîte.

Ainsi, dans de telles conditions, la boîte qui ne peut être que sous certaines formes (cubique, octaédrique...), doit être suffisamment grande pour éviter l'interaction de la biomolécule avec elle-même par moment, en particulier au travers des forces électrostatiques. Dans notre cas, la boîte construite avait une forme cubique du fait de la membrane que nous avons générée.

d. Minimisation de l'énergie potentielle

Au cours de cette étape, il s'agit d'arriver à une structuration physiquement réaliste de l'eau et des lipides autour de la biomolécule. En effet, avec l'impulsion de l'énergie cinétique, la stabilité du système va être rompue. Par conséquent, si la structuration initiale du système (biomolécule + solvant) n'est pas stable, il y a des risques de voir apparaître des clashes stériques entre la protéine et les molécules d'eau ou les lipides. La minimisation permet donc d'épurer toutes les imperfections d'interactions entre ces molécules.

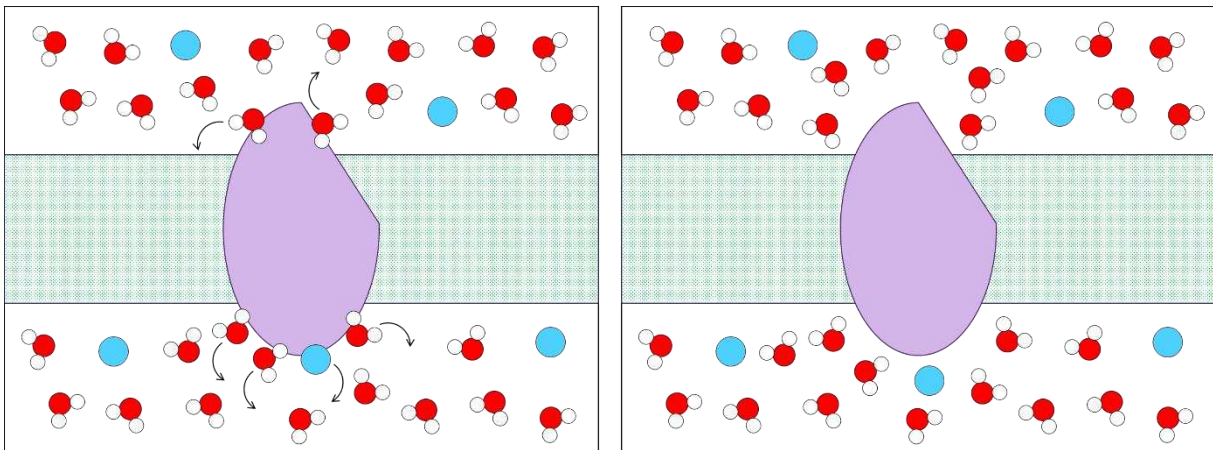


Figure 24: Etape de minimisation d'énergie pour s'affranchir des aberrations d'interactions entre molécules.

e. Equilibration de la température à volume constant

A la fin de l'étape de la minimisation, le système énergiquement stable obtenu se trouve dans un état dont la température est à zéro Kelvin (0K). Pour être dans des conditions de température reflétant le milieu biologique, l'étape de thermalisation qui passe également par une courte simulation de dynamique moléculaire s'avère donc indispensable. Pour cela, un algorithme de contrainte est utilisé pour fixer les longueurs et angles de liaison interatomiques de la protéine étudiée ainsi qu'un thermostat de Berendsen (Berendsen *et al.*, 1984) qui régule l'énergie cinétique des molécules en fonction de la différence de température pour atteindre notre température escomptée. Celle-ci a été équilibrée à 310K (37°C) durant une simulation de 100ps.

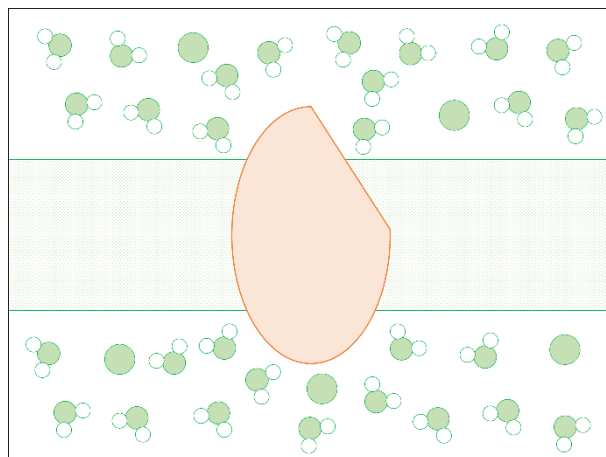


Figure 25 : Etape de thermalisation du système (protéine en orange considérée comme fixe, molécules vertes libres).

f. Equilibration de la pression à température constante

Tout comme la température, les conditions physiologiques du milieu biologique imposent une certaine pression. Dans notre cas, la pression biologiquement pertinente est fixée à 1 bar. De ce fait, étant donné que la pression de notre système ne se trouve pas à cette valeur, il y a lieu de faire à nouveau une courte simulation de dynamique moléculaire pour atteindre cet équilibre tout en maintenant la température constante.

Ayant une corrélation avec le volume de la boîte de simulation, la pression peut être contrôlée en faisant varier la taille de la boîte. En effet, ce contrôle s'est fait en utilisant un algorithme qui reliant les fluctuations de pression au volume arrive à maintenir la pression constante par ajustement des coordonnées atomiques. Cette étape d'équilibration de la pression s'est faite pendant 1ns, toujours en considérant les atomes de la protéine comme fixes et les atomes de solvant (eau + ions + lipides) libres.

g. Lancement de la dynamique moléculaire

Cette étape correspond à l'étape de production des données utiles et pertinentes pour l'étude. Soulignons qu'avec le serveur en ligne SwissParam développé par le Swiss Institute of Bioinformatics (SIB, <http://www.swissparam.ch/>), les paramètres topologiques de chaque ligand avaient été obtenus. Par la suite, durant les différentes phases d'équilibration, le ligand avait été systématiquement couplé à la protéine VKOR pour former une entité unique considérée comme notre biomolécule.

C'est cette entité qui avait été ensuite insérée dans la bicouche lipidique. Pour le couplage de température et pression, le système avait été subdivisé en 3 entités : VKOR+ligand, bicouche lipidique et eau+ions, puis en 2 entités : VKOR+ligand+bicouche lipidique et eau+ions pour la suppression des mouvements latéraux durant les étapes de dynamiques.

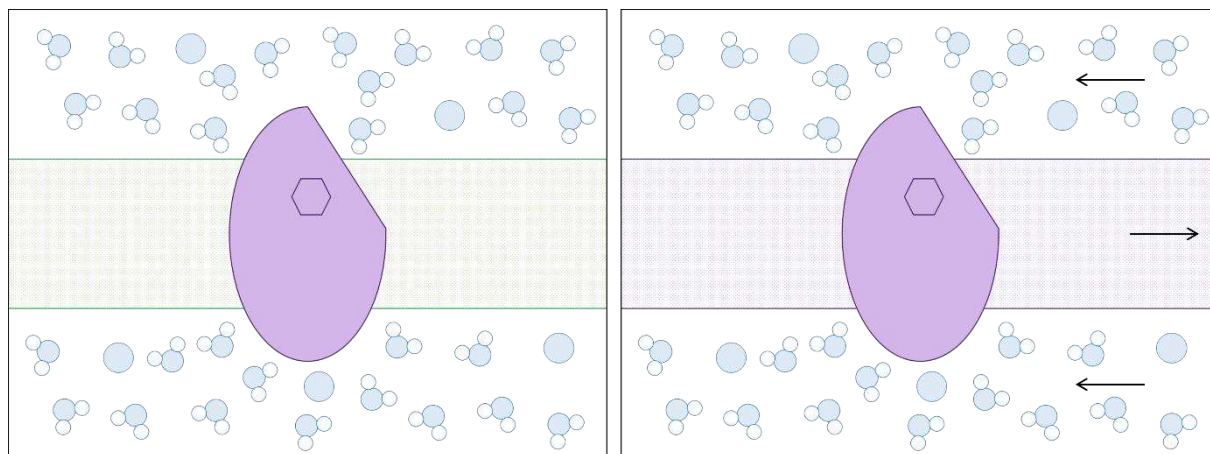


Figure 26 : Subdivision du système pour l'équilibration de la pression et pour la dynamique moléculaire.

A gauche : Subdivision du système en trois groupes (VKOR+ligand en violet, lipides en vert, eau+ions en bleu) pour l'équilibration de la pression. A droite : Regroupement des molécules en deux catégories (VKOR+ligand+lipides en violet, eau+ions en bleu) afin d'empêcher les mouvements latéraux entre ces deux groupes lors de la dynamique moléculaire

Ainsi, une fois toutes les étapes de préparation terminées, avant le lancement de la simulation dynamique moléculaire dite de production, les contraintes qui avaient été appliquées aux coordonnées atomiques de la biomolécule ont été levées afin de lui permettre une exploration libre de son espace conformationnel. Enfin, le lancement des simulations a été effectué sur le supercalculateur Jean Zay de l'IDRIS (mobilisant 1 GPU pour une vitesse de simulation de 50 ns/j).

Pendant cette simulation, toutes les caractéristiques du système à chaque configuration prise vont être enregistrées afin de permettre par la suite d'effectuer toutes les analyses nécessaires à l'étude.

6. Analyse des données obtenues

a. Après Docking moléculaire

AUTODOCK permet de regrouper les solutions en clusters (présentation en histogrammes) en fonction de leur proximité spatiale. En effet, la similarité entre deux configurations est obtenue par le calcul de RMSD pour Root Mean Square Deviation (la racine de la moyenne des carrés des écarts). Ainsi, deux conformations sont classées dans le même cluster que si leur RMSD est inférieur à une valeur seuil définie lors de la génération des paramètres.

La meilleure conformation est celle ayant la plus basse énergie et qui se trouve idéalement dans le cluster le plus peuplé.

b. Après dynamique moléculaire

Plusieurs calculs ont été utilisés pour l'analyse des données fournies par les simulations de dynamique moléculaire.

○ Calcul de RMSD

Ce calcul mesure la distance de déplacements des différentes conformations prises par la protéine par rapport à sa position de départ. Il permet ainsi de valider la stabilité de la protéine durant la simulation.

Par ailleurs, il est possible aussi avec cette méthode de calculer les déplacements du ligand (substrat ou inhibiteur) par rapport à la protéine (à nouveau utilisée comme référence). Cela permet également de vérifier la stabilité du ligand vis à vis de la protéine lors de la simulation.

○ Mesure de distance substrat-cystéine catalytique de VKOR

La mesure de cette distance permet de renseigner sur les probabilités d'interaction entre le substrat et la cystéine catalytique de la protéine. Elle facilite le choix du meilleur substrat d'interaction avec le site catalytique de la protéine. En effet, plus cette distance est petite et plus le substrat a de chance d'interagir avec la protéine. Il existe dans *GROMACS* une fonction qui permet de faire cette mesure. Cette fonction permet de calculer les distances entre les paires d'atomes en fonction du temps.

○ Calcul de l'énergie libre de liaison (ELL) avec MM-PBSA

Le calcul de l'ELL entre deux entités permet d'apprécier leur affinité. Dans notre cas, il s'agit d'estimer l'affinité entre nos ligands (substrats et inhibiteurs) choisis et notre protéine d'intérêt.

Plusieurs méthodes de calcul de l'ELL sont disponibles mais nous avons opté pour la MM-PBSA (Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area). A partir des coordonnées extraites de la dynamique moléculaire, cette méthode qui combine mécanique moléculaire et modèles de solvant, permet de calculer l'énergie libre d'un système placé dans un milieu continu avec une constante diélectrique. Ce milieu continu correspond ici au solvant.

L'énergie libre du système dans le solvant tient compte de deux énergies :

→ L'énergie en phase gazeuse (E_{MM}) calculée en mécanique moléculaire.

→ L'énergie de solvation ($E_{Solvation}$) résultant du potentiel électrostatique obtenu par la résolution de l'équation de Poisson Boltzmann et de l'énergie associée à la surface accessible au solvant.

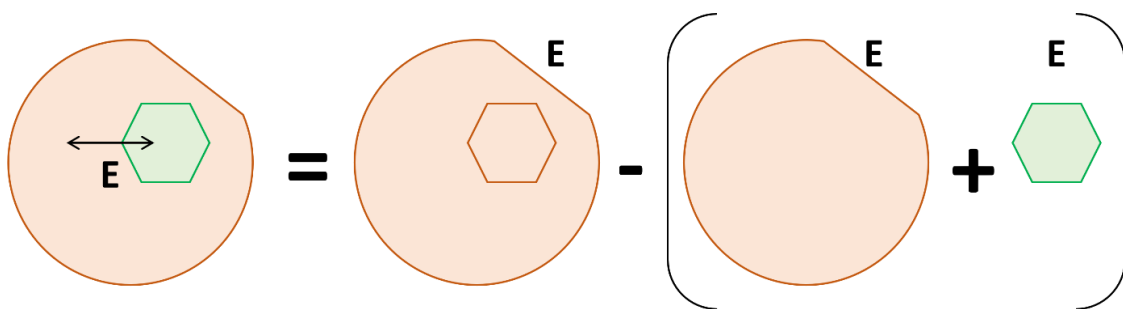
Ces deux énergies sont calculées pour chaque élément de la réaction 1 (complexe protéine-ligand, protéine et ligand) et la différence conduit à l'énergie libre d'interaction du complexe protéine-ligand.

Réaction 1 : Protéine (P) + Ligand (L) \longrightarrow Complexe protéine-ligand (C)

L'ELL est donc donnée par l'expression générale :

$$\Delta E_{liaison} = E_{complexe} - (E_{protéine} + E_{ligand})$$

Avec $E_{complexe}$ correspondant à l'ELL du complexe protéine-ligand, $E_{protéine}$ à l'ELL de la protéine seule et E_{ligand} à l'ELL du ligand seul.



En pratique, il existe un module additionnel dans *GROMACS* qui nous a permis d'obtenir toutes nos ELL.

c. Outils de visualisation

Pour le Docking moléculaire, *AutoDock* renferme une interface graphique qui permet de visualiser toutes les conformations obtenues et les résultats de clusterings. Nous avons utilisé cette option.

Pour ce qui est de la dynamique moléculaire, deux outils ont été utilisés. Il s'agit des programmes de visualisation VMD (Visual Molecular Dynamics) (Humphrey *et al.*, 1996) et PyMOL (Schrödinger, 2015). VMD nous a servi pour le contrôle des trajectoires générées par les différentes simulations de dynamique moléculaire, ce qui nous permettait de nous assurer de l'intégrité de notre modèle protéique durant ces simulations. Quant à PyMOL, nous y avons eu recours pour effectuer toutes les représentations structurales sur lesquelles sont fondées l'analyse de notre protéine d'intérêt.

B. Approche expérimentale

1. Culture bactérienne

L'obtention de souches bactériennes pour effectuer nos tests sur la motilité a nécessité de faire des mises en culture. Pour cela, nous avons utilisé deux voies pour obtenir nos souches :

Tout d'abord, des souches de leptospires pathogènes (*L. interrogans*, *L. kirschnerii*, *L. borgpetersenii*) et non pathogènes (*L. biflexa*) nous ont été fournies par le Laboratoire d'Analyses Vétérinaires (LAV) devenu un pôle de la Plateforme d'Analyses Vétérinaires de VetAgro Sup (Campus vétérinaire, Marcy l'étoile, France). Ces souches ont été inoculées dans du milieu EMJH et incubées à 30°C pendant une semaine. Le contrôle de leur croissance et de leur motilité a été fait par observation au microscope à fond noir.

Par ailleurs, ces souches fournies par le LAV étant des souches de référence, nous avons voulu également faire des tests sur des souches sauvages. Cela nous a amené à faire du terrain en participant à deux projets dont l'un portait sur la leptospirose chez les campagnols dans le Puy-de-Dôme et l'autre sur la leptospirose chez les rats urbains à Lyon et Bordeaux. Au cours de ces campagnes, des échantillons de reins et d'urines ont été prélevés sur les animaux capturés et mis en culture toujours en milieu EMJH après une série de dilution. Après avoir vortexé les tubes de la dernière dilution, ceux-ci ont été incubés à 30°C. La présence et la croissance éventuelle des leptospires ont été évaluées de façon hebdomadaire par examen des milieux de culture au microscope à fond noir, pendant 10 semaines. Si au bout de cette période, aucun leptospire n'était observé, la culture était déclarée négative. Pour les cultures positives, des repiquages ont été réalisés.

Par la suite, des prélèvements ont été effectués pour nos différents tests notamment le suivi du comportement motile des leptospires dans leur milieu de culture après ajout de différentes concentrations de warfarine. Ce suivi a nécessité la mise en place d'une méthode de vidéomicroscopie associée à un script Python. Le reste des cultures positives de départ a été conservé à -80°C pour d'éventuelles études futures.

2. Caractérisation de l'activité de VKOR

La caractérisation de l'activité de VKOR a nécessité l'expression de protéines recombinantes dans la levure méthylothrophique *Pichia pastoris*. Ce recours permet un fort taux d'expression de la protéine cible en présence de méthanol. En effet, la levure *Pichia pastoris* a la faculté de pouvoir utiliser le méthanol comme seule source carbonée via l'alcool oxydase (AOX1), première enzyme de la voie de métabolisation du méthanol chez cette espèce. Son expression est contrôlée par le promoteur du gène Aox1, fortement et exclusivement inductible par le méthanol. Les ADNc codant les protéines d'intérêt sont placés sous le contrôle de ce promoteur.

a. Optimisation des séquences nucléotidiques

Les protéines d'intérêt concernées dans cette étude sont hVKORC1 pour la VKOR humaine, rVKORC1 pour la VKOR de rat, IgLept-VKOR pour la protéine VKOR tout entière de leptospire et shLept-VKOR pour la protéine VKOR de leptospire sans le domaine thiorédoxine. Afin de favoriser l'expression de ces protéines d'intérêt dans *Pichia pastoris*, la composition de leurs séquences nucléotidiques a tout d'abord été optimisée puis sous-clonée pour produire les vecteurs pPICZ-hVKORC1, pPICZ-rVKORC1, pPICZ-IgLept-VKOR et pPICZ-shLept-VKOR. Toute cette étape d'optimisation a été réalisée par Genscript (Piscataway, NJ, USA) pour pPICZ-hVKORC1 et pPICZ-rVKORC1 et par Genewiz (Leipzig, Allemagne) pour pPICZ-IgLept-VKOR et pPICZ-shLept-VKOR. Les matrices obtenues ont servi pour transformer les bactéries compétentes

b. Transformation des bactéries compétentes

Dans de la glace, 25µl de bactéries compétentes (Stellar) ont été décongelées puis mises au contact de nos plasmides pendant 15 min. Ensuite, les cellules ont été soumises à un choc thermique en les plaçant dans un bain marie à 42°C pendant 45 secondes puis refroidies pendant 5 min dans la glace. Cela étant, les bactéries ont été mises en suspension dans du milieu SOC (Ozyme) qui avait été pré-incubé à 37°C. Ensuite, toute la suspension a été incubée à 37°C durant au moins 45 min avant d'être étalée sur un milieu LB-Agar, contenant 100 µg/ml de zéocine. Les boîtes de pétri ont par la suite été incubées pendant 1 nuit dans une étuve à 37°C. Trois ou quatre colonies résistantes ont été mises en culture dans un milieu LB contenant 100 µg/mL de zéocine. Les ADN plasmidiques ont ensuite été extraits à partir de ces cultures au moyen du kit QIAprep® Spin-miniprep pour la mini-préparation et du kit QIAGEN® plasmid midi pour la midi-préparation suivant les recommandations du fournisseur.

La séquence des plasmides obtenus a été vérifiée par séquençage à l'aide de l'amorce AOX-sens par GenoScreen (Lille, France).

c. Transformations des levures compétentes

La transformation des levures consiste en l'intégration du gène d'intérêt dans le génome de la levure par recombinaison au niveau de la séquence 3'-AOX (Figure 23).

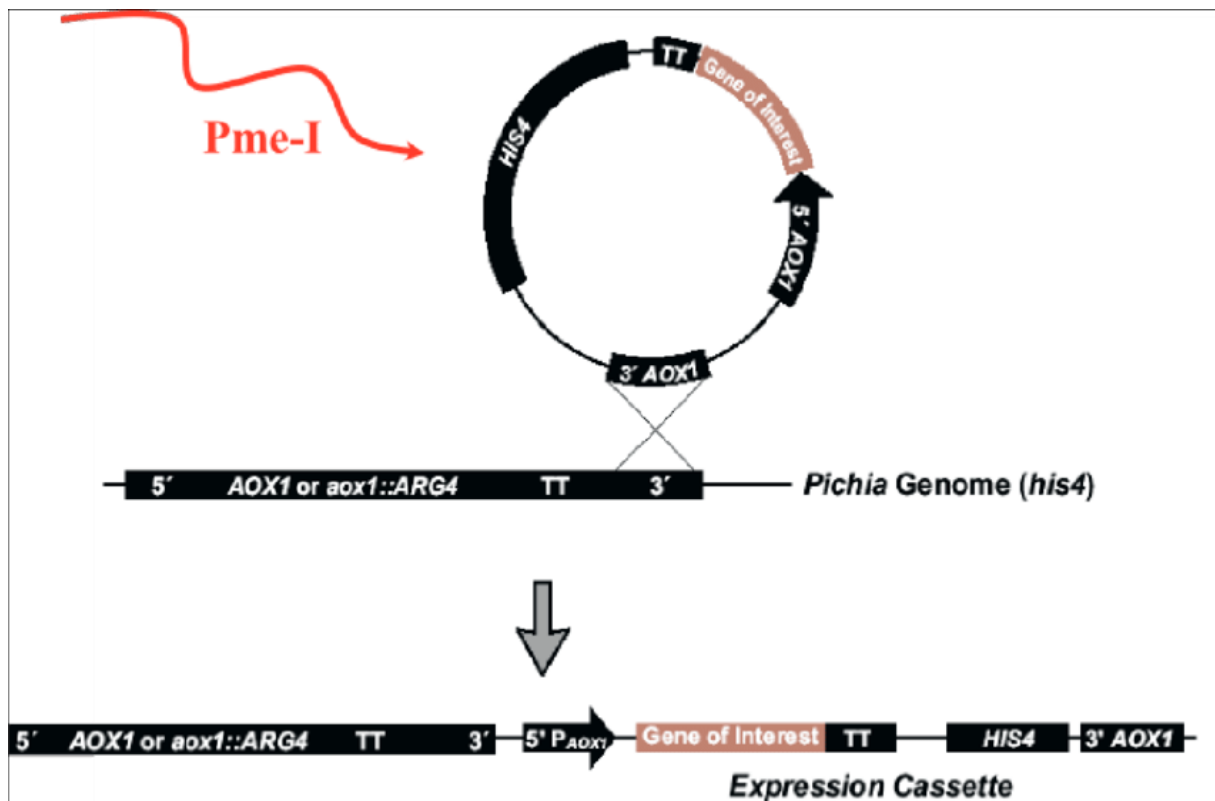


Figure 27: Principe d'intégration d'un gène d'intérêt dans le génome de la levure *Pichia pastoris*

Les levures compétentes ont été transformées grâce au kit de transformation *Pichia* EasyComp™ (Invitrogen) en suivant les recommandations du fournisseur. Brièvement, les cellules ont été mises au contact de l'ADN plasmidique préalablement linéarisé par l'enzyme de restriction *PmeI* dans un tampon contenant du polyéthylène glycol pendant 1 h à 30°C. La transformation a été réalisée en faisant subir un choc thermique aux levures en les plaçant dans un bain marie à 42°C pendant 10 min puis en les refroidissant dans la glace pendant 5 min. Les levures ont ensuite été mises en suspension dans du milieu YPD (1 % (p/v) extrait de levure, 2 % (p/v) peptone, 2 % (p/v) D-glucose) et incubées sous agitation à 30°C pendant 3 h. Par la suite, elles ont été collectées et re-suspendues dans une solution saline avant d'être étalées sur un milieu YPD-Agar (2 % (p/v) Agar) contenant 100 µg/mL de zéocine (Invitrogen).

Les boîtes d'étalement ont été incubées durant 2 jours dans une étuve à 30°C. Trois ou quatre colonies résistantes ont été mises en culture dans le milieu YPD comme décrit ci-dessus.

d. Expression des protéines recombinantes

La production de nos protéines recombinantes s'est déroulée en deux phases : une phase de croissance des levures au cours de laquelle le glycérol a été utilisé comme source carbonée et une phase d'induction du promoteur AOX1 durant laquelle le glycérol a été remplacé par du méthanol comme source de carbone.

Les levures ont été cultivées sous agitation dans du milieu BMGY constitué de 1 % (p/v) d'extrait de levure, de 2 % (p/v) de peptone, de 0,1 M de phosphate (pH 6,0), de 1 % (v/v) de glycérol et de 1,34 % (p/v) de Yeast Nitrogen Base (YNB) pendant 48 h à 30 °C en ajoutant 2% de glycérol toutes les 4 h.

Ensuite, les levures en croissance exponentielle (densité optique à 600 nm ≥ 6) ont été centrifugées à 3000 g pendant 10 min à 4°C, puis elles ont été reprises dans le milieu d'induction BMMY (milieu de culture dans lequel le glycérol est remplacé par le méthanol). Cela étant, les levures ont été remises sous agitation à 30°C et la production de la protéine d'intérêt a été induite par ajout de méthanol (1 % (v/v)) 3 fois par jour notamment matin, midi et soir. Au bout de 48 h d'induction, les levures ont été collectées par centrifugation à 3000 g pendant 10 min à 4°C avant la préparation des fractions membranaires.

e. Préparation des fractions microsomales

Nos culots de levures ont été remis en suspension dans un tampon de broyage 50 mM de phosphate de sodium (pH 7,4) contenant du KCl 1,15 % (w/v). Ensuite, en se servant de l'agitateur Dispermat® LC30 (VMAGETZMANN, Allemagne), les levures ont été broyées par des billes de Zircon sous agitation constante à 8000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Le lysat a par la suite été centrifugé à 10000 g durant 10 min à 4°C, ce qui a permis l'élimination des débris cellulaires, des noyaux et des mitochondries. Le surnageant a été récupéré puis à nouveau centrifugé à 100 000 g pendant 1 h à 4°C à l'aide d'une centrifugeuse Sorvall® LYNX 6000 (Thermo Scientific, USA). Les culots, qui constituent les microsomes, ont ensuite été repris et homogénéisés dans un tampon 50 mM HEPES (pH 7,4), contenant du glycérol 20 % (v/v). Enfin, les microsomes ont été aliquotés dans des tubes Eppendorf et stockés à -80 °C jusqu'à utilisation.

f. Dosage des fractions microsomales

La mesure de la quantité de protéines dans nos différents échantillons a été faite selon la méthode de Bradford (1976) dont le principe repose sur la fixation du Bleu Brillant de Coomassie G-250 (réactif Bio-Rad, Bio-Rad, Hercules, CA) sur les résidus basiques des protéines entraînant une variation du maximum d'absorbance de 465 à 595 nm (effet bathochrome). L'absorbance à 595 nm va donc être proportionnelle à la quantité de colorant liée et donc à la quantité de protéines dans l'échantillon. La concentration en protéines est calculée par rapport à une gamme d'albumine sérique bovine (BSA, fraction V, Sigma) de 0 à 10 mg/ml traitée dans les mêmes conditions que les échantillons.

g. Analyse de l'expression des protéines d'intérêt

Cette étape a consisté à faire un western blot après avoir réalisé dans un premier temps un SDS-PAGE. En effet, la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire a été réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions réductrices. Ce SDS-PAGE (6%-12%) a été effectué en suivant le protocole décrit par Laemmli. Ensuite, s'en est suivi le western blot qui a consisté à transférer les protéines présentes sur le gel d'électrophorèse sur une membrane de Polyvinylidene fluoride (PVDF) qui a subi par la suite divers traitements immunochimiques. Le transfert des protéines sur la membrane PVDF a été réalisé en se référant au protocole décrit par Towbin et ses collaborateurs en 1979. Les protéines d'intérêt ont été décelées par immunorévélation après usage d'anticorps.

Succinctement, après avoir saturé la membrane avec une solution de BSA 5% diluée dans un tampon TBS-T, celle-ci a été incubée toute une nuit à 4°C avec un anticorps primaire anti-c-myc de lapin (1/2000^{ème}) (Cell Signaling). Après cette incubation, trois rinçages successifs au TBS-T ont été réalisés puis la membrane a été mise pendant 1h à température ambiante au contact d'un anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à une peroxydase (1/2000^{ème}) (Cell Signaling). Enfin, la détection terminale a été réalisée en incubant la membrane avec une solution ECL RevelBlot® Plus (Ozyme) puis révélée par chimiluminescence à l'aide de l'imageur Syngene® (Ozyme).

h. Mise au point de l'activité enzymatique

Toutes nos incubations ont été réalisées dans un tampon HEPES 200 mM (pH 7,4) contenant 150mM de KCl. Les microsomes hVKORC1 utilisés pour la mise au point, ont d'abord été pré-incubés avec le système NADPH/TrxR/Trx (NADPH 200 μ M, 0,5 μ M TrxR, 50 μ M Trx) seul ou complété par un système de recyclage du NADPH (1,3 mM NADP, 3,3 mM glucose-6-phosphate, 0,4 U/mL glucose-6-phosphate-déshydrogénase) pendant 30 minutes. Ensuite, la réaction qui s'est faite dans un volume final de 1mL, a été déclenchée en ajoutant 200 μ M de substrat c'est à dire la vitamine K1>O.

Pour les essais pilotés par le système dithiothréitol (DTT), les microsomes ont été pré-incubés dans le tampon décrit précédemment pendant 30 minutes, avant l'ajout de la vitamine K1>O. La réaction a été amorcée par l'ajout de 1 mM de DTT.

Les milieux réactionnels des deux systèmes ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C. Ensuite, les réactions ont été arrêtées par ajout de 2 ml d'isopropanol suivi d'une centrifugation à 3000 g pendant 5 minutes, puis ajout de 2 ml d'hexane. Après une nouvelle centrifugation à 3000 g pendant 5 min, la phase organique a été récupérée et évaporée à sec sous flux d'azote. Les résidus secs ont été immédiatement remis en suspension dans 200 μ L de méthanol et analysés par chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC/MS).

La séparation des produits a été réalisée par chromatographie inverse sur une colonne Xbridge BEH C18 (2.1mm \times 50mm, 2.5 μ m, Waters, Milford, MA, USA) maintenue à 48°C. La séparation a été assurée en condition isocratique par utilisation d'une phase mobile méthanol/eau/acide formique (96/4/0.1). Le débit était de 0.4 ml/min. Le volume injecté était de 1 μ l. Les échantillons étaient protégés de la lumière. La détection du produit a été réalisée par MS avec une source APCI en mode positif.

La pression du nébuliseur a été réglée à 60 psi, la température de gaz sec à 280°C, le flux de gaz sec à 5 l/min, et la température de vaporisation à 380°C. La tension du capillaire a été fixée à 4000V, et l'aiguille corona utilisée était 10 μ A. L'ion initial (451.4) correspondait à la vitamine K. Les critères d'identification de la vitamine K1 était le temps de rétention (4.1min) et la production du fragment 187 à partir de l'ion 451. La vitamine K époxyde correspondait à la fragmentation de l'ion initial (467.1). Le critère d'identification de la vitamine K1>O était le temps de rétention (3.1min). La linéarité et la précision ont été testées de 50 à 4000 ng/ml.

La réponse était linéaire sur toute la gamme de concentration testée avec un coefficient de corrélation (R^2) au-dessus de 0,99. La précision était comprise entre 80 et 120% des concentrations théoriques.

i. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de GraphPad Prism version 9.3.1 pour Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com. La valeur de K_m et V_{max} ont été déterminées par régression non linéaire à partir de l'équation de Michaelis-Menten :

$$V = (V_{max} \times S) / (K_m + S)$$

Où V , représente la vitesse initiale

K_m , la constante de Michaelis-Menten

S , la concentration en substrat (mM)

V_{max} , la vitesse maximale de la réaction.

La détermination des constantes d'inhibition K_i des différents inhibiteurs utilisés a été effectuée par régression non linéaire en utilisant le modèle $\log(\text{inhibiteur})$ vs réponse normalisée avec la même version de GraphPad Prism. Les comparaisons entre les groupes ont été réalisées à l'aide du test d'interaction non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunnett, ou du test de Mann-Whitney.

V. RESULTATS

A. Analyse structurale de la VKOR de *Leptospira sp.*

1. Objectifs

Comme nous avons eu à le mentionner précédemment, il existe dans le génome des leptospires un gène VKOR proche du gène VKORC1 retrouvé chez les mammifères et intervenant dans le cycle de la vitamine K. Cependant, il se trouve qu'aucune étude portant sur ce gène ne soit disponible à ce jour à notre connaissance alors qu'il pourrait être une cible pour le développement d'une alternative thérapeutique au regard de l'émergence de phénomènes d'antibiorésistance.

Du fait de la diversité des souches de leptospires réparties de façon simpliste en souches pathogènes et saprophytes, nous nous sommes attelés dans cette partie à faire une analyse de la séquence de ce gène afin de faire ressortir les variabilités pouvant exister entre les différentes souches et à construire sa structure 3D.

2. Méthodes

Plus de 700 séquences de différentes souches de leptospires récupérées sur différentes bases de données ont été alignées et analysées. Ensuite, grâce aux outils et techniques (Docking et DM) de modélisation moléculaire, nous avons construit la structure tridimensionnelle de notre protéine d'intérêt. Partant du modèle construit, nous avons étudié les substrats potentiels (Vitamine K quinone, ubiquinone 1 et ubiquinone 4) de la VKOR des leptospires ainsi que son affinité avec la warfarine.

3. Résultats principaux

L'analyse des séquences VKOR de leptospires obtenues a permis de confirmer la présence de notre protéine cible chez ce groupe bactérien. La taille de la séquence de la VKOR était différente selon qu'on soit dans le groupe pathogène (404 acides aminés) ou saprophytes (408 acides aminés).

Les séquences des espèces saprophytes semblaient plus conservées que celles des espèces pathogènes avec respectivement 68 acides aminés conservés pour le premier groupe contre 34 pour le second. La cartographie des résidus conservés sur la structure de la protéine a révélé qu'ils formaient le cœur hydrophobe du domaine thiorédoxine (Trx) ou qu'ils entouraient la cavité du domaine VKOR.

La région non conservée identifiée à partir de l'alignement des séquences correspondait à la cinquième hélice transmembranaire du domaine VKOR et à la première hélice du domaine Trx. 10 résidus étaient strictement conservés, spécifiques à chaque groupe et partageant le même emplacement sur la structure protéique. Pour les espèces pathogènes, il s'agissait de I25, K27, S44, S53 retrouvés dans le domaine VKOR et G203, F346, R347, I359, V363, I399 présents dans le domaine Trx. Quant aux leptospires saprophytes, il était question des acides aminés A25, E27, G45, A54 localisés dans le domaine VKOR ainsi que des résidus D208, L351, K352, L364, I368 et L403 situés dans le domaine Trx.

Au niveau des interactions structurales entre notre protéine d'intérêt et les différentes molécules, l'amarrage moléculaire a révélé un positionnement commun de tous les ligands notamment qu'ils faisaient tous face au site catalytique C129-C132. Après dynamique moléculaire, les distances de positionnement mesurées par rapport au résidu C132 étaient proches de l'ordre de 4 Å. Toutefois, le calcul de l'énergie de liaison a fait ressortir une meilleure affinité de notre protéine pour la vitamine K quinone et l'ubiquinone 4 avec respectivement -60 Kcal/mol et -52 Kcal/mol. 6 résidus principaux ont été identifiés comme étant systématiquement impliqués dans la liaison des ligands : L24, V52, I71, D114, L117 et C132 avec l'acide aminé D114 qui était le seul à contribuer défavorablement à l'énergie de liaison des différentes molécules.

L'ensemble des résultats de cette étude ont fait l'objet d'un article accepté dans le journal *Biomolecular Structure and Dynamics* et présenté ci-après :

Article 1 : Structural investigation of vitamin K epoxide reductase domain-containing protein in *Leptospira* species: a potential target for the development of new leptospirosis treatments as an alternative to antibiotics

Structural investigation of vitamin K epoxide reductase domain-containing protein in Leptospira species: a potential target for the development of new leptospirosis treatments as an alternative to antibiotics

Sionfoungo Daouda SORO, Virginie LATTARD, Angeli KODJO, Etienne BENOIT, & Nolan CHATRON*

USC 1233 RS2GP, INRAe, VetAgro Sup, Université de Lyon, 69280 Marcy l'Etoile, France

*Auteur correspondant

Keywords : Leptospirosis, motility, VKOR, inhibitor, structural interactions, therapeutic alternative

Structural investigation of vitamin K epoxide reductase domain-containing protein in *Leptospira* species: a potential target for the development of new leptospirosis treatments as an alternative to antibiotics

Sionfoungo Daouda Soro¹, Virginie Lattard¹, Angeli Kodjo¹, Etienne Benoît¹, Nolan Chatron¹

1. USC 1233-RS2GP, VetAgro Sup, INRAE, Université de Lyon, 69280 Marcy L'Etoile, France

Abstract

Leptospirosis is a widely spread zoonosis worldwide, and is induced by the motile bacteria *Leptospira*. This disease can lead to hemorrhagic symptoms, multi-visceral and renal failures, causing one million cases and around 60,000 deaths each year. The motility of *Leptospira* is highly involved in their virulence and is ensured by the presence of two flagella in the periplasm. Several proteins that require disulfide bridges formation are essential for flagellar function. In *Leptospira*, these redox reactions are catalyzed by the vitamin K epoxide reductase domain-containing protein (VKORdcp). The aim of the present work was the study of VKORdcp conservation among *Leptospira* species and of its interactions with putative substrates and inhibitor. Our results evidenced the presence of ten amino acids specific of either pathogenic or saprophytic species. Moreover, structural investigation indicated a higher affinity of the enzyme towards vitamin K1 quinone, compared to ubiquinone. Finally, characterization of the binding of a potential inhibitor revealed the involvement of some VKORdcp amino acids that have not been present in the human enzyme, especially the polar residue D114. Our study thus paves the way for the future development of *Leptospira* VKORdcp inhibitors, capable of blocking the bacteria motility. Such molecules might therefore offer a promising therapeutic alternative to antibiotics, especially in the event of the emergence of antibiotic-resistant strains.

Keywords

Leptospirosis, motility, vitamin K epoxide reductase domain-containing protein, inhibitor, structural interactions, therapeutic alternative

Introduction

Leptospirosis is the most widespread zoonosis worldwide [1] and is endemic in many tropical and subtropical areas due to the warm, humid climate, which is conducive to the development of *Leptospira* [2], the motile bacteria responsible for the disease. The geographical areas that reported the highest number of leptospirosis epidemics are Latin America (35.8%), South Asia (12.9%) and North America (10.7%) [3]. Indeed, frequent epidemics were observed in Brazil [4], India [5] or Malaysia [6].

Symptoms of leptospirosis are highly variable, remaining limited to a simple flu-like syndrome with no sequelae in most cases [7]. However, this syndrome may be followed by a sudden worsening of symptoms in 10% of cases [8], leading to severe ictero-hemorrhagic forms in the most severe cases: multi-visceral failure leading to death [7], [9], renal failure responsible for the death of 50% of severe cases of leptospirosis [8]. Hemorrhagic manifestations have also been reported, possibly leading to acute respiratory distress syndrome [1]. Worldwide, the annual morbidity and mortality of the disease have been estimated at 15 cases and 1 death per 100,000 inhabitants respectively, i.e., 1.03 million sufferers and 58,000 deaths per year [10]. The use of antibiotics is the most recommended method in suspected or confirmed clinical forms [11], [12]. Although some strains of *Leptospira* showed spontaneous resistance to streptomycin and spectinomycin [13], they currently remain susceptible to antibiotics used in human medicine [14].

The pathogenicity of *Leptospira* is due to several factors. Sphingomyelinases, responsible for the hydrolysis of host membrane sphingomyelins into ceramides and phosphorylcholine, are produced by exclusively pathogenic *Leptospira* [15]. More than 30 surface proteins were identified as being involved in immune escape, invasion, dissemination, and colonization of host tissues [16]. These motor skills are accentuated by the atypical morphology of *Leptospira* (spirochetes), further enhancing their virulence [17], [18].

The motility of *Leptospira* is therefore strongly implicated in their virulence. This motility is induced by the presence of flagella in the bacterial periplasm [19], which enable them to move in a wide variety of environments: liquid media, solid surfaces [20] and viscous media [21]. Several proteins requiring the formation of disulfide bridges, such as FliG1, are essential for flagellar function [22]. Many other periplasmic proteins are functionalized via disulfide bridge formation [23], [24].

The enzyme responsible for these redox reactions was first identified in *Escherichia coli*: Disulfide bond A (DsbA) [24]. The catalytic site of DsbA is composed of the oxidoreductase specific CxxC motif [25] (two cysteine residues separated by two random amino acids), the oxidized state of which constitutes the active form [26]. DsbA is reoxidized by a second oxidoreductase, DsbB [27], via electron transfer to its substrate ubiquinone [28]–[30]. The DsbA/DsbB complex is thus involved in the production of bacterial toxins and in several virulence mechanisms [31], its inactivation caused a reduction in the virulence of several microbial species (*Vibrio cholerae* [32], *Pseudomonas aeruginosa* [33], *Salmonella enterica* [34], *Helicobacter pylori* [35]).

The DsbA/DsbB complex has therefore been studied in several bacterial strains, such as *Mycobacterium tuberculosis* [36]. However, in some bacteria, including *Synechococcus* and *Leptospira*, this complex is replaced by a single enzyme: the vitamin K epoxide reductase domain-containing protein (VKORdcp) [23], which has a thioredoxin domain equivalent to DsbA and a vitamin K epoxide reductase (VKOR) domain equivalent to DsbB (Figure 1). This VKORdcp enzyme can substitute vitamin K1 quinone for ubiquinone as an electron acceptor. Furthermore, warfarin (a well-known VKOR inhibitor used in human therapy) was described to inhibit DsbB activity in *Mycobacterium tuberculosis* and VKOR activity in *Synechococcus sp* [36]. Nevertheless, no study of interactions between warfarin and *Leptospira* VKORdcp was reported to the best of our knowledge.

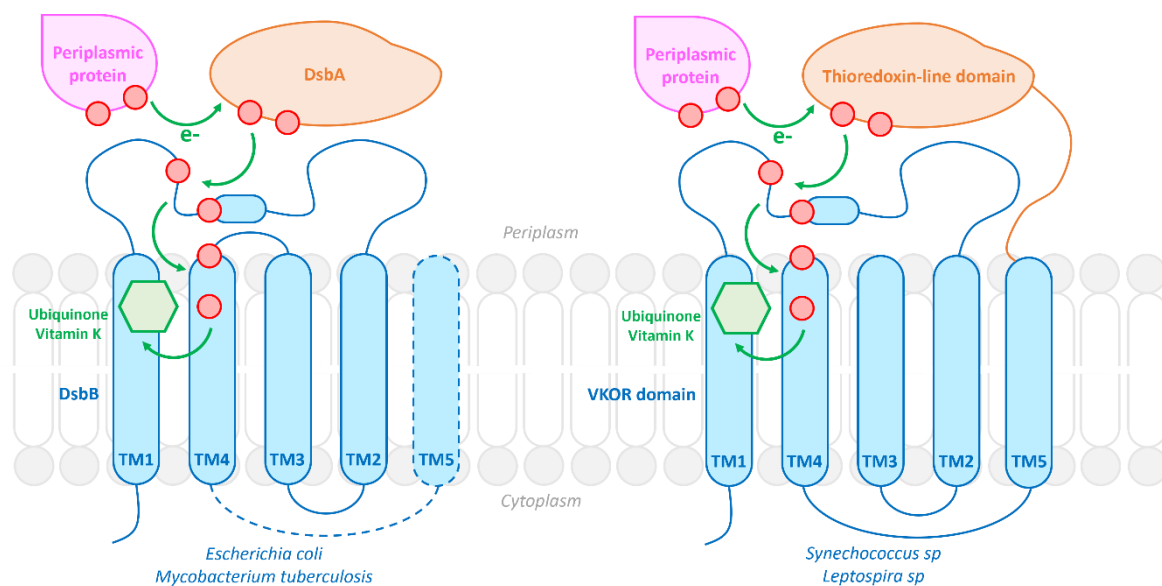


Figure 1. DsbA/DsbB complex and vitamin K epoxide reductase domain-containing protein enzyme in bacteria. Dashed transmembrane helix TM5 was found in DsbB protein of *Mycobacterium tuberculosis* but not of *Escherichia coli*. Electron transfers are indicated by green arrows, cysteine residues involved in these transfers are shown as red circles.

The aim of our study was thus the structural characterization of the *Leptospira* vitamin K epoxide reductase domain-containing protein by molecular modelling, and the investigation of its potential substrates (vitamin K1 quinone, ubiquinone 1 and ubiquinone 4) and warfarin binding. Inhibition of this enzyme in *Leptospira* would prevent the formation of disulfide bridges in the periplasm, thereby inhibiting toxin production and blocking bacterial motility, thus ultimately reducing their virulence.

This new control strategy could therefore provide an alternative to the drugs currently in use, and thus prevent the emergence of antibiotic-resistant strains. The results of our study demonstrated the conservation of several hydrophobic amino acids in the protein active site among all *Leptospira* species. 10 amino acids specific to pathogenic and saprophytic species were also identified, enabling us to distinguish species according to their pathogenicity based on the enzyme peptide sequence. We also identified a preferential structural interaction with vitamin K1 quinone, followed by ubiquinone 4. Finally, as the residues contributing most to substrate binding and especially warfarin binding were globally different compared to the human VKOR, our study opens the way to the search for future enzyme-specific inhibitors in *Leptospira*, which would constitute a promising alternative to antibiotics.

Results

Conservation of vitamin K epoxide reductase domain-containing protein in *Leptospira* species

An alignment was performed including 747 peptide sequences of *Leptospira* vitamin k epoxide reductase domain-containing protein (VKORdcp) retrieved from databases (details about *Leptospira* species, sequences numbers and pathogenicity are given in the Material & Methods sections, the complete alignment is presented in Supporting Information S1). 91 amino acids were strictly conserved among all the considered species (Figure 2), mostly hydrophobic: 66 residues (73 % of conserved residues) compared with 25 non-hydrophobic ones (27 %). 27 conserved residues were located in the vitamin K epoxide reductase (VKOR) domain, from residue 1 to residue 150. Four conserved cysteine residues were identified: C40 and C49 in one hand and C129-C132 in the other hand, the latter pattern (CxxC) constituting the oxidoreductases specific active site. The 64 remaining conserved residues were all in the thioredoxin-like (Trx) domain, from residues 200 to 404. Strikingly, no conserved residues were identified in the region linking these two domains (between residues 150-200), that appeared as less conserved compared to VKOR and Trx domains (roughly 60-80 % versus 80-100 %).

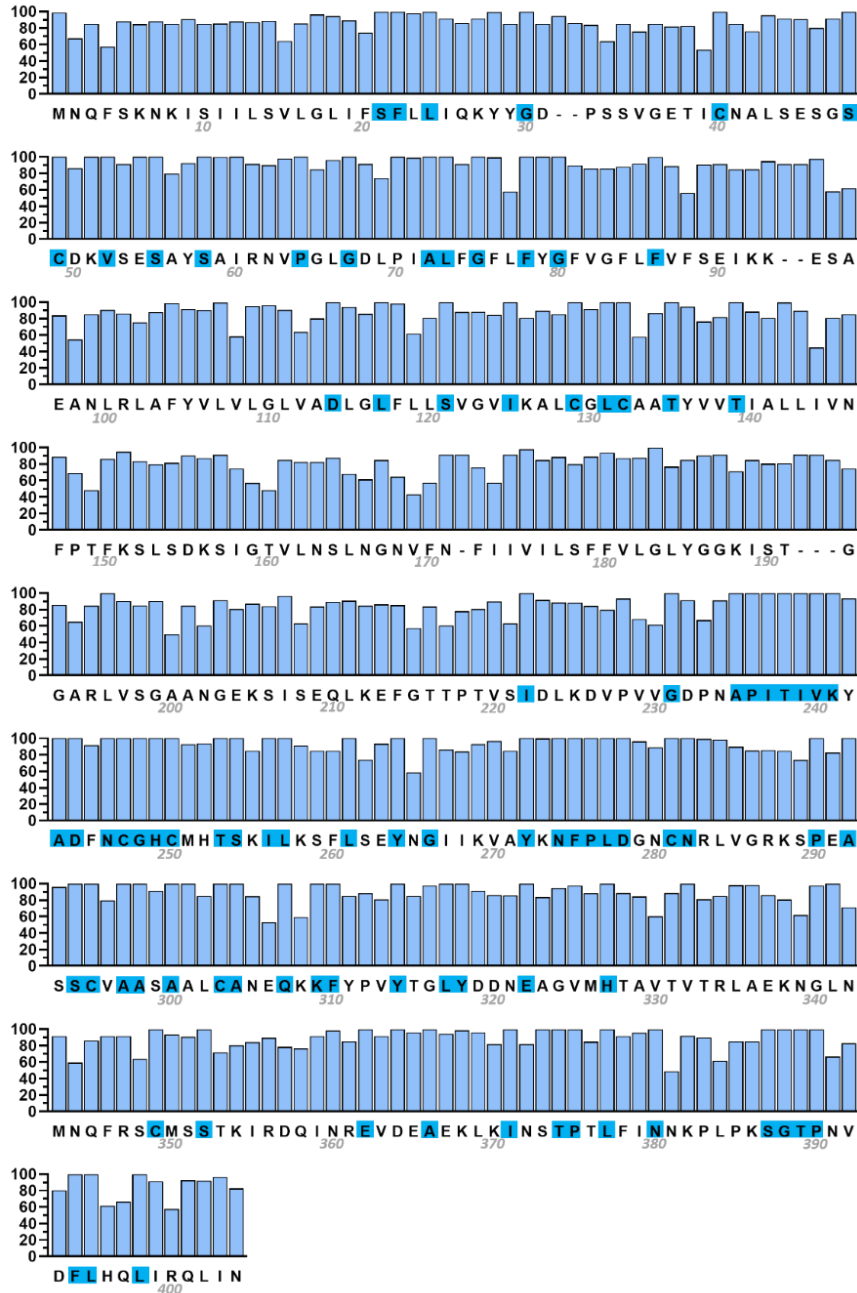


Figure 2. Consensus sequence of vitamin K epoxide reductase domain-containing protein in *Leptospira* species. The sequence is written in bold, with amino acid positions in grey italics. Strictly conserved residues are highlighted in blue. The percentage of residue conservation is shown as blue bars.

Mapping of the conserved residues onto the protein structure revealed that they either formed the hydrophobic core of the Trx domain or surrounded the cavity of the VKOR domain (Figure 3A). Indeed, side chains of these amino acids provided hydrophobic interactions that stabilised the Trx domain helices together (Figure 3B) or literally delimited the cavity inside the VKOR domain (Figure 3C). The non-conserved region previously identified from the sequences alignment corresponded to the fifth transmembrane helix of the VKOR domain and the first helix of the Trx domain.

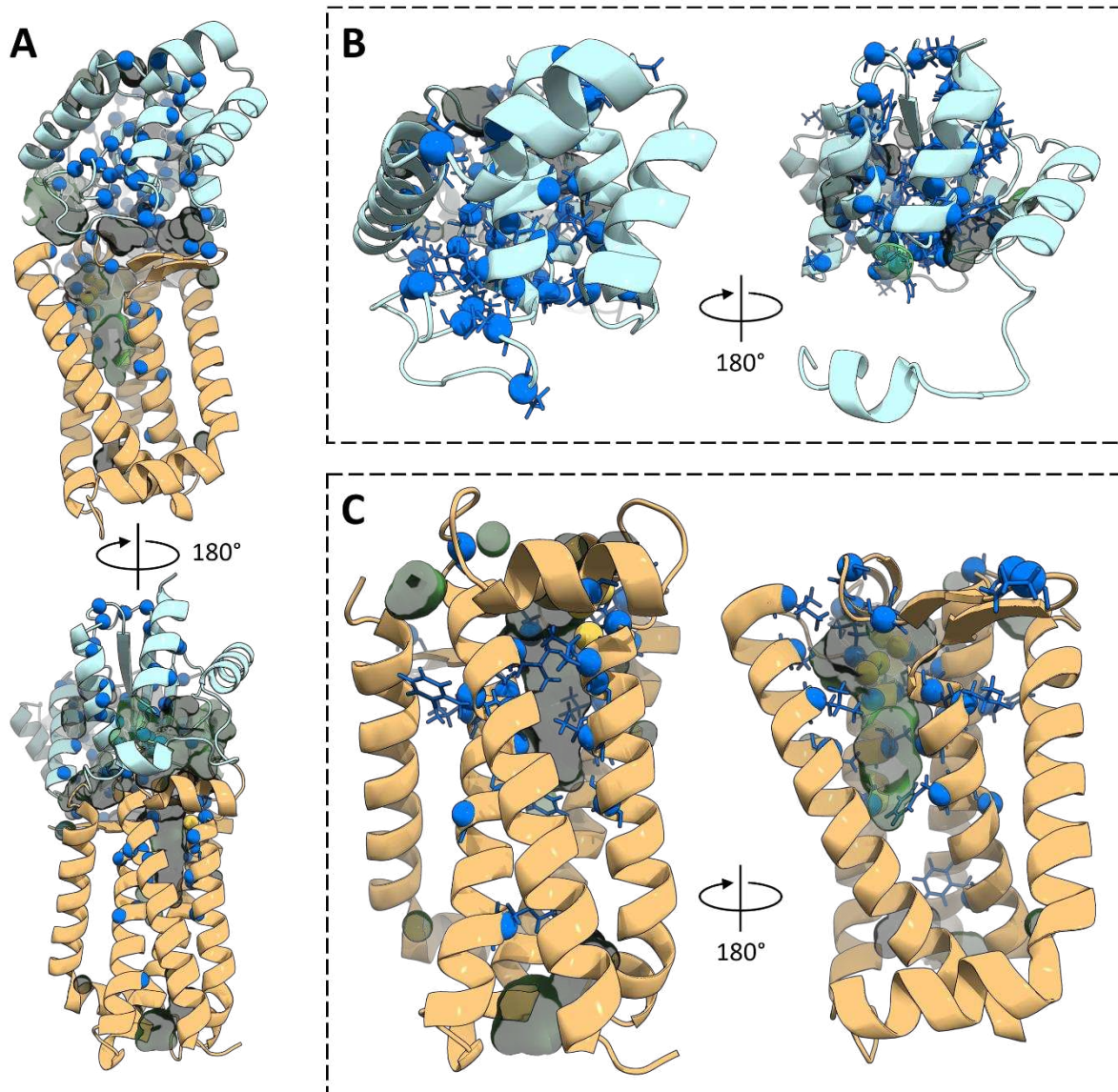


Figure 3. Structure representation of the conserved residues of *Leptospira* vitamin K epoxide reductase domain-containing protein. **A/** Full protein structure. **B/** Thioredoxin-like domain. **C/** Vitamin K epoxide reductase domain. The protein structure is depicted as cartoon, the VKOR domain is coloured in lightorange, the Trx domain in lightblue. Cavities are shown as transparent green surfaces. Strictly conserved amino acids are presented as spheres (α -carbon atoms), sticks (side chains) and coloured in dark blue. Sulfur atoms of the conserved cysteine residus C40, C49, C132 and C135 and shown as yellow spheres.

Afterwards, *Leptospira* species were considered according to their pathogenicity: VKORdcp sequences from pathogenic and saprophytic species were respectively aligned. Consensus sequence of pathogenic *Leptospira* carried 404 amino acids, whereas saprophytic *Leptospira* revealed a 408 residues-length consensus sequence (Figure 4).

Pathogenic	MNQFSKNKIS	IILSVLGLIF	SFLLIQKY YG	DP-SSVGETI	CNAL SE SGSC	DKV SE SAYSA
Saprophytic	MNRKNLALAG	VVGGVIGLIV	SFLLAIEY FG	IGTENIANS	CSALGG GDSC	LKV AE SSYSA
Pathogenic	IRNV PGL GDL	PIAL FG FLFY	GFVGF LFVFS	EIKKE--SAE	ANLRLA FY VL	VLGLVADL GL
Saprophytic	IPGV PFL GNV	PIALL GF GFY	GLLTY SFFLV	TKAKSNEEV	KFISLL FP VL	VLGLL FD LIL
Pathogenic	FLL SVG VIIKA	LCGL CA ATYV	VTIALL LIV NF	PTFKSLSDKS	IGTVLNSLNG	NVFN FI VIVLS
Saprophytic	FGIS VGI IGT	ICQL CF VTYI	VTIALL LGI L	LLWKTEGKPK	LNVPVALKEG	-ITTL GL VYFF
Pathogenic	FFVL GLY GK	ISTGGAR---	LV SGA ANG EK	SISEQLKEFI	TTPTV SID LK	DVPV VD PN A
Saprophytic	SF SLG FAT SK	MWVSGASS NT	LAT SR G MD SA	EIQSKIAAYF	QEPT LGI NVT	GSP FI GK KDA
Pathogenic	PITIV KY ADF	NCG H CM H TS K	ILK S FL SEYN	GII K VAY K NF	PLD G NC N RL M	GRKS PE AS SC
Saprophytic	PITIV KY ADY	NCG H CL H TS H	ILH T VL SE YD	GMV R VVY K NF	PLD G T C N RLM	QQ PR P G AS SC
Pathogenic	VA ASAAL CAN	E Q K K FYPV YT	GLY DDNEAGV	MHTAV TV TRL	AE K N GL NM N V L	FR SC MS ST KI
Saprophytic	VAA I AA I CAD	KQ G K F EP MYR	GLY DN LE K GV	AHSGSS VV N L	AN S I GL N V NS	LK AC MA SE KA
Pathogenic	RD QIN RE VD E	AE KL KI NS TP	TL F IN N K PL PK	SG TP NV D FL H	QL IR QL IN	
Saprophytic	QN QL NA E IDE	AE KL NI Q STP	SLY IN DR RI-E	SG TP NI FL K	TL LE QI IQ	

Figure 4. Consensus sequences of vitamin K epoxide reductase domain-containing protein in pathogenic and saprophytic *Leptospira* species, respectively. Amino acid positions are written in grey. Strictly conserved residues in all species are highlighted in blue. Strictly conserved amino acids either in pathogenic or in saprophytic species are written in bold green. Specific residues for pathogenic or saprophytic species are written in bold red.

34 amino acids were strictly conserved among pathogenic species, 22 of which were hydrophobic ones (65 %). Saprophytic species sequences appeared as more constant, with 68 conserved residues including 45 hydrophobic ones (66 %). 10 residues were identified as specific of either pathogenic or saprophytic species. In other words, 10 residues were strictly conserved among pathogenic *Leptospira* but were never detected in saprophytic strains, and vice versa. Specific residues of pathogenic species were I25, K27, S44, S53 in the VKOR domain and G203, F346, R347, I359, V363, I399 in the Trx domain. Amino acids A25, E27, G45, A54 (VKOR domain) were specific of saprophytic *Leptospira*, as well as residues D208, L351, K352, L364, I368 and L403 (Trx domain).

From a structural perspective, conserved residues of the Trx domain in pathogenic species only were mostly located in the hydrophobic core (Figure 5A), whereas they were more evenly distributed in saprophytic species (Figure 5B) and were also found at the surface of the protein. Location of conserved residues in the VKOR domain were very similar for both pathogenic and saprophytic *Leptospira*, at the top of transmembrane helices and at the underside of the loop, around the protein pocket (Figure 5). The 10 specific residues of either pathogenic or saprophytic species logically shared the same location on the protein structure of both groups: they were essentially in the hydrophobic core of the Trx domain, with a few amino acids at the protein surface (Figure 5) and they were close to the protein cavity in the VKOR domain (especially I25/A25, K27/E27 and S53/A54, Figure 5, side frames).

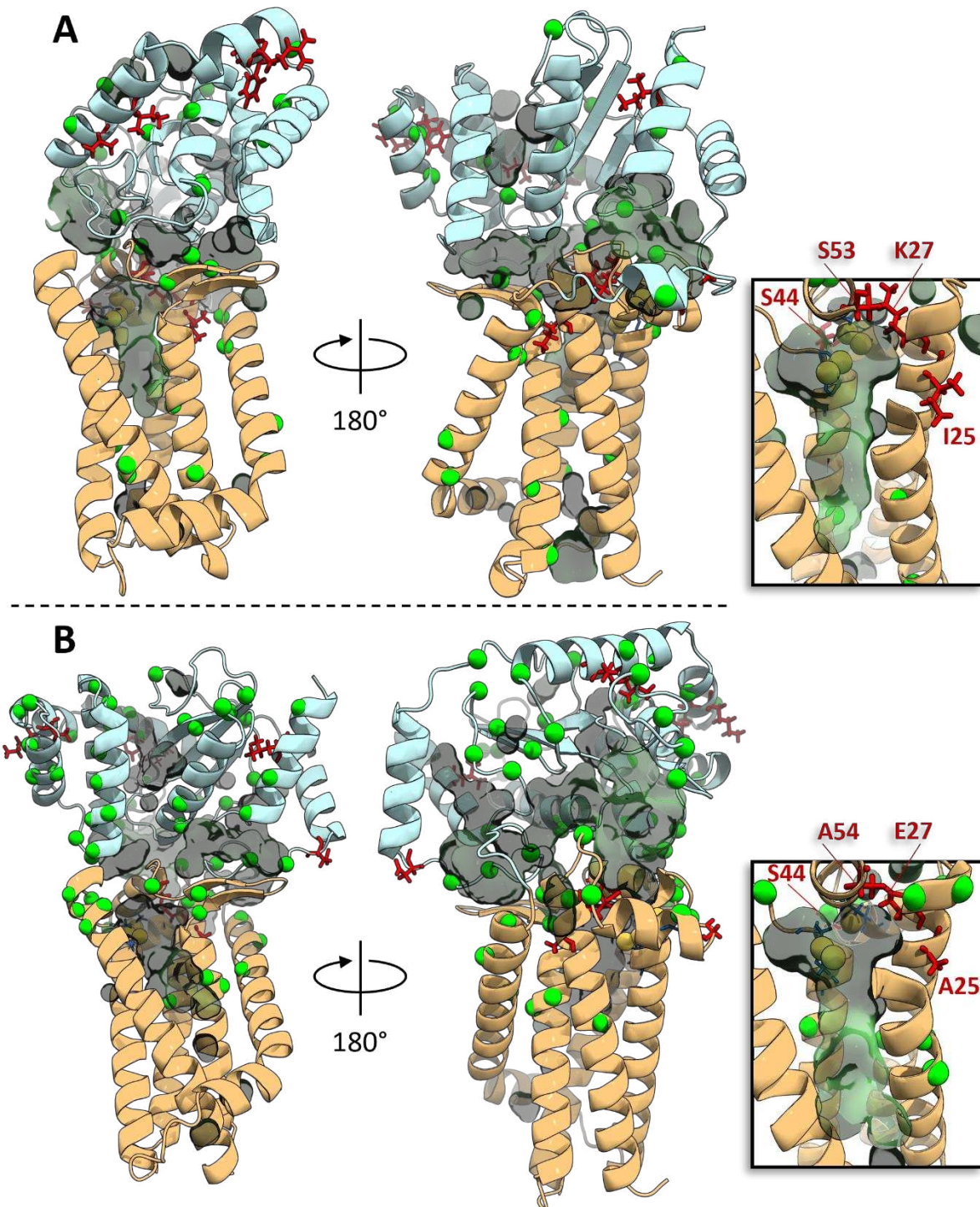


Figure 5. Structural location of conserved and specific residues of vitamin K epoxide reductase domain-containing protein in pathogenic and saprophytic *Leptospira* species. A/ Structure of pathogenic species protein. B/ Structure of saprophytic species protein. Side frames/ Focus on the cavity of the VKOR domain. The protein structure is depicted as cartoon, cavities are shown as transparent green surfaces. Strictly conserved residues either in pathogenic or in saprophytic species are shown as green spheres. Specific residues of pathogenic and saprophytic species are depicted as red sticks. Sulfur atoms of the conserved cysteine residues C40, C49, C132 and C135 are shown as yellow spheres.

Binding of putative substrates and inhibitor to vitamin K epoxide reductase domain-containing protein of *Leptospira interrogans*

Structural interactions between the VKORdcp of the pathogenic *Leptospira interrogans* and three potential quinone substrates was then evaluated, as well as the binding of a well described VKOR inhibitor: Warfarin. Vitamin K1 quinone, ubiquinone 1 and ubiquinone 4 were considered as putative substrates (Table 1). The enzyme catalytic site (C129-C132) was considered in the partially oxidized state for the investigation of substrates binding, and as fully oxidized for the study of warfarin binding [17]. Molecular docking of the four molecules revealed a common positioning between all ligands: They were all facing the C129-C132 oxidoreductase active site. Distance to C132 residue was measured over molecular dynamics simulations to assess the likeliness of each potential substrate to be reduced by the protein. The binding free energy was also calculated to estimate both substrates and inhibitor affinity towards the enzyme.

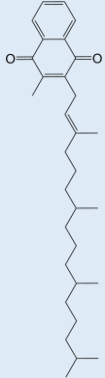
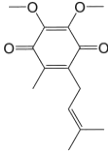
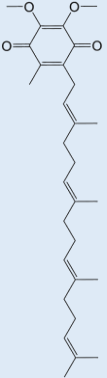
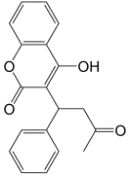
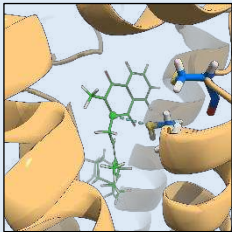
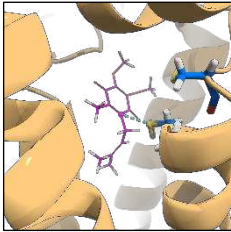
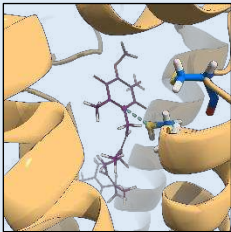
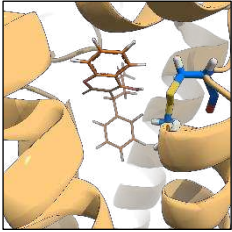
	Vitamin K1 quinone	Ubiquinone 1	Ubiquinone 4	Warfarin
				
				
<i>Kcal/mol</i>				
Distance to C132 (Å)	3.86 ± 0.25	4.06 ± 0.38	3.99 ± 0.31	
Binding Free Energy	-60.01 ± 7.24	-34.02 ± 2.51	-52.35 ± 4.63	-40.50 ± 2.46
<i>Van der Waals</i>	<i>-61.81 ± 6.28</i>	<i>-36.44 ± 2.55</i>	<i>-55.68 ± 5.07</i>	<i>-45.22 ± 2.27</i>
<i>Electrostatic</i>	<i>-0.72 ± 0.19</i>	<i>-0.77 ± 0.22</i>	<i>-0.65 ± 0.18</i>	<i>-0.93 ± 0.18</i>
<i>Polar</i>	<i>8.89 ± 1.38</i>	<i>7.13 ± 0.90</i>	<i>10.00 ± 1.40</i>	<i>10.00 ± 1.23</i>
<i>Non-polar</i>	<i>-6.35 ± 0.39</i>	<i>-3.94 ± 0.17</i>	<i>-6.01 ± 0.40</i>	<i>-4.31 ± 0.18</i>

Table 1. Binding of potential substrates and inhibitor towards the vitamin k epoxide reductase domain-containing protein of *Leptospira interrogans*. Ligands chemical structure and position obtained after molecular docking are presented in the first row. Distance to C132 is shown as cyan dashes on structural representations, for each substrate. The measured values (in Å) and the calculated binding free energy (in kcal/mol) of each ligand are indicated in bold. Energetic components of the global binding energy are written in grey italics.

The measured distances with respect to C132 residue remained tightly close for the three potential substrates, around 4 Å. Although the slight differences between them were statistically significant, they were extremely low (0.2 Å maximum, Supporting Information S2) and were therefore considered negligible.

However, the calculated binding energies revealed major and statistically significant differences (Supporting Information S3), implying distinct affinities of the substrates and warfarin towards the enzyme. Vitamin K1 quinone appeared as the best candidate for binding to the enzyme, with a value of -60 kcal/mol. It was followed by ubiquinone 4, with a binding energy value of -52 kcal/mol. Ubiquinone 1 proved to have the lowest affinity with the protein, with a -34 kcal/mol binding energy. Its affinity was even lower than that of warfarin, that showed a binding energy around -40 kcal/mol.

Main contributions of the amino acids of VKORdcp to the binding energy of substrates or inhibitor were then investigated. 6 major residues were identified as systematically involved in ligands binding: L24, V52, I71, D114, L117 and C132 (Figure 6). Profiles of vitamin K1 quinone and ubiquinone 4 were virtually identical, with the main contribution of 2 more residues: F74 and F78. Residue S58 contributed to the binding of both ubiquinone 1 and warfarin. Finally, residues A72 and L120 in one hand, and Y28 and Y136 in the other hand, were involved in the binding of ubiquinone 1 and warfarin, respectively. Amino acid D114 was the only residue that revealed an unfavourable contribution to the binding energy of the different ligands. A complete and detailed summary of the amino acids contribution is presented in Supporting Information S4).

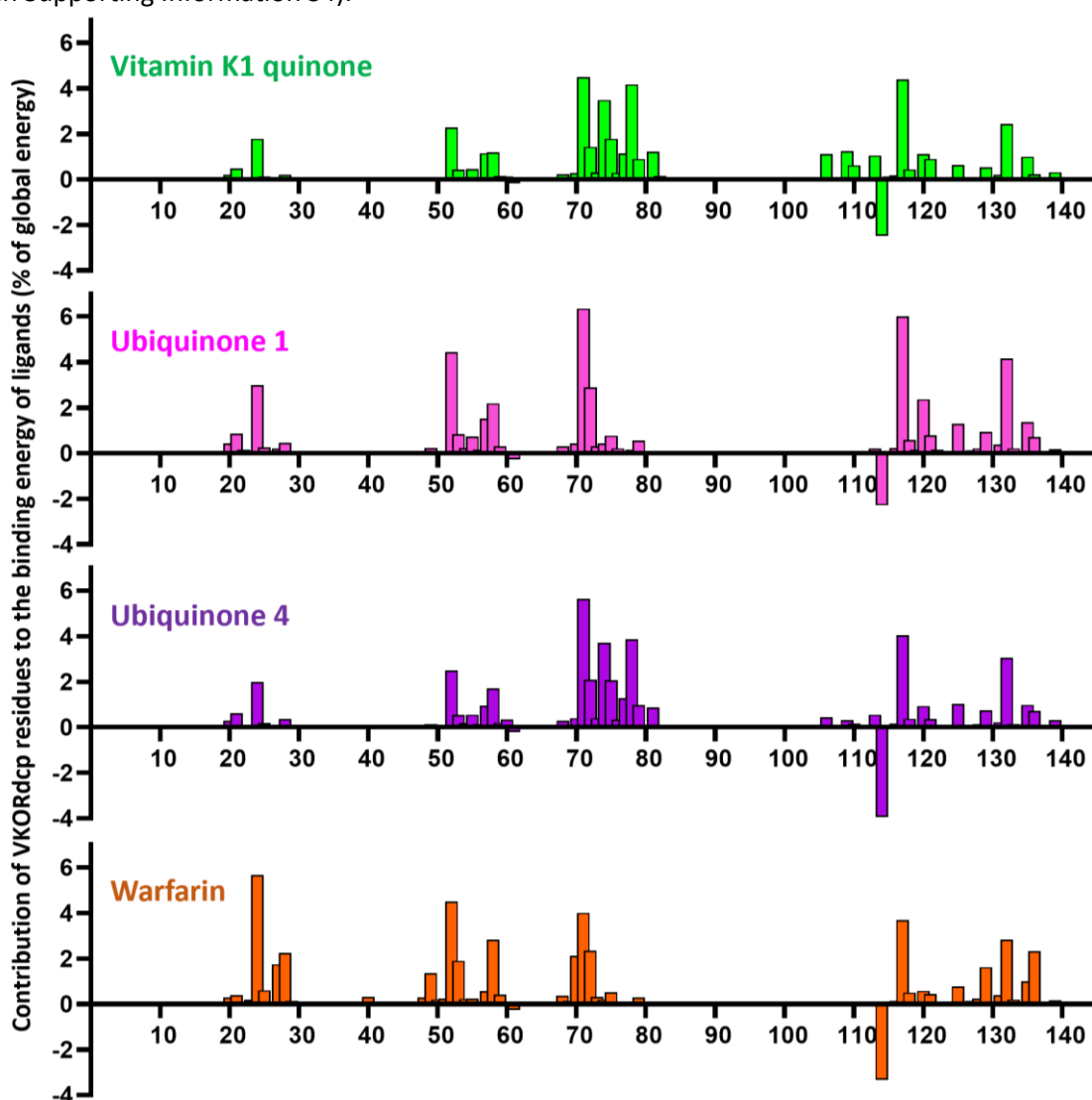


Figure 6. Contribution of the VKORdcp residues to the binding energy of the different ligands. Numbers of the protein amino acids are written on the x axis. Contributions of the residues are indicated as a percentage of the total binding energy, for each ligand. Contributions for vitamin K1 quinone, ubiquinones 1 and 4, and warfarin are show as green, pink, violet and orange bars, respectively.

Finally, location of the previously identified contributing residues on the *Leptospira interrogans* VKORdcp structure was studied. Amino acids L24, Y28, V52, S58, L120Q, C132 and Y136 only interacted with the naphthoquinone/ubiquinone/hydrocoumarin head of the considered ligands (Figure 7). The substrates and inhibitors core was thus kept close to the C132 catalytic site via hydrophobic contacts (leucine, tyrosine and valine residues) and polar interactions (tyrosine and serine residues). VKORdcp amino acids I71, A72 and L117 were involved in both head and hydrophobic tail contacts. F74, F78 and D114 were only involved in contact with the hydrophobic tail of ligands, which was thus stabilised solely by hydrophobic contacts (F74 and F78), with residue D114 contributing unfavourably to the binding energy.

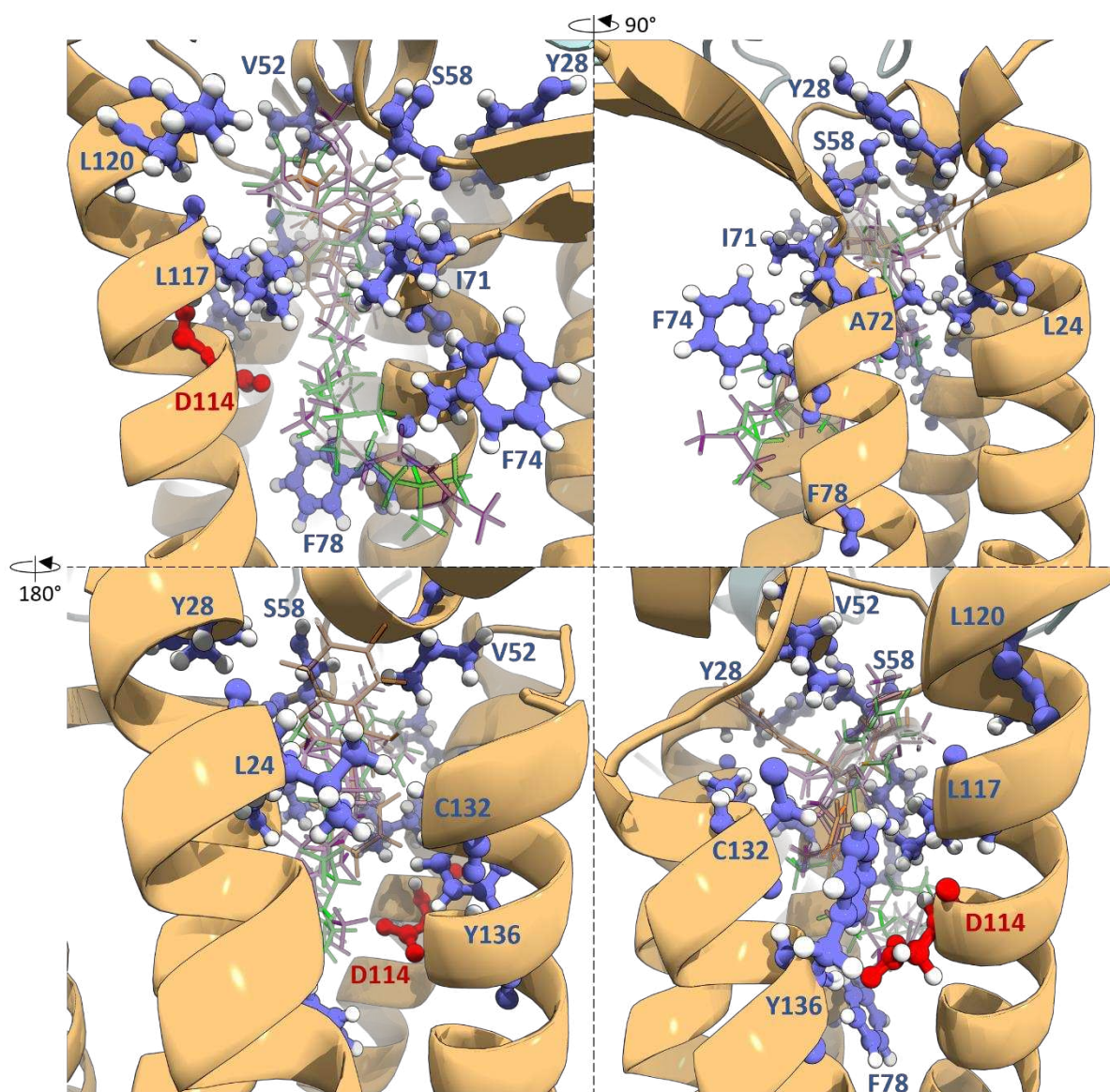


Figure 7. Main structural contributions of VKORdcp residues to the binding of substrates and inhibitor. Protein structure is presented as lightorange cartoon. Vitamin K1 quinone, ubiquinone 1, ubiquinone 4 and warfarin are depicted as green, pink, violet and orange transparent sticks, respectively. Mainly contributing residues are shown as blue sticks and spheres. The non-favourably contributing residue D114 is indicated by red sticks and spheres.

Discussion

The aim of our study was to characterize the structure of the vitamin K epoxide reductase domain-containing protein (VKORdcp) enzyme in *Leptospira* for the future design of a new class of drugs. These molecules might expand the therapeutic arsenal available for the treatment of leptospirosis, especially in cases of proven resistance to current antibiotics. Indeed, VKORdcp is a particularly interesting target because of its crucial involvement in *Leptospira* motility, via its major role in the formation of disulfide bridges that allow the functionalization of many proteins.

The obtained results revealed amino acids that were strictly conserved across all *Leptospira* species (Figure 2). These residues were predominantly hydrophobic, and mainly located around the active site (VKOR domain) and in the hydrophobic core of the thioredoxin domain (Figure 3). In addition, considering *Leptospira* species according to their pathogenic or saprophytic nature could reveal amino acids specific to one group or the other. So, the peptide sequence appeared to be more conserved in saprophytic species, with 68 conserved residues versus 34 in pathogenic species (Figure 4). However, these results should be treated with caution: only 57 sequences from saprophytic species were included in our study, while 676 sequences from pathogenic strains were considered. This bias could be explained by the fact that most studies focused on pathogenic species, which are of major interest in human and animal health. Nevertheless, 10 residues were identified as specific to pathogenic or saprophytic species (Figure 5), as they were strictly conserved in one group but never found in the other. This characteristic suggested the possibility of deducing the pathogenic or saprophytic character of a *Leptospira* strain from the peptide sequence of VKORdcp, although other already proven methods have been commonly used (microscopy, cultures, serology or molecular biology [12], [51], [52]). The identification of these 10 specific amino acids also opened the way to the search for inhibitors specific to pathogenic *Leptospira*. However, a more in-depth study was required to assess the involvement of these 10 residues in the binding of potential VKORdcp substrates and inhibitors.

We therefore investigated the potential binding of three possible substrates (vitamin K1 quinone, ubiquinone 1 and ubiquinone 4) to the VKORdcp of pathogenic *Leptospira interrogans*. The choice of this strain was induced by its involvement in most severe cases of human leptospirosis. Vitamin K1 quinone was found to have the best affinity for the enzyme, followed by ubiquinone 4 (Table 1). These molecules occupied the same space in the enzyme cavity, and the amino acids contributing most to their binding were strictly identical (Figures 6 and 7). The difference in affinity between the two substrates was therefore due solely to a difference in overall binding energy (Table 1) and not to the involvement of amino acids specific to one or another molecule. The use of vitamin K1 quinone as an electron acceptor by VKORdcp would partly explain the bleeding disorders observed in some cases of leptospirosis [1]: as vitamin K is essential for blood coagulation [53], *Leptospira* could therefore cause host depletion, leading to a coagulation defect. Finally, ubiquinone 1 had a low binding energy with the enzyme: this molecule, by analogy with vitamin K3 in humans, carries a too short hydrophobic tail to ensure correct binding to the protein [54]. Indeed, unlike vitamin K1 quinone and ubiquinone 4, ubiquinone 1 could not interact with residues F74 and F78 of VKORdcp, largely contributing to substrates binding (Figures 6 and 7). Substrates stabilization in the VKORdcp cavity was ensured by exclusively hydrophobic interactions, via residues L24, V52, I71, F74, F78, L117 and C132. Amino acids L24, V52, F78, L117 and, of course, the catalytic C132 residue were strictly conserved among all *Leptospira* species. Thus, they could constitute a reliable basis to be targeted for the design of VKORdcp specific inhibitors. To refine this hypothesis, we therefore needed to describe VKORdcp amino acids involvement in the binding of a putative inhibitor.

Thus, we finally characterized the interactions between VKORdcp from *Leptospira interrogans* and warfarin: this historic and well-described VKOR inhibitor, used in human therapy, has been reported as capable of inhibiting VKOR from *Mycobacterium tuberculosis* and *Synechococcus sp* [36]. The binding energy between warfarin and VKORdcp nevertheless appeared to be relatively low, closer to the value obtained for ubiquinone 1 than for vitamin K1 quinone or ubiquinone 4. This low affinity could again be explained by the absence of interactions with residues F74 and F78 of the protein (Figures 6 and 7). Residues that contributed most to warfarin binding were L24, Y28, V52, S58, I71, L117, C132 and Y136,

with L24, V52, S58 and L117 conserved between all *Leptospira* species. Interestingly, and in contrast to the substrates, polar interactions via tyrosine and serine residues were thus identified between the inhibitor and the enzyme. However, residues Y28, V52, L117 and Y136 corresponded to mammalian conserved residues Y25, V54, L120 and Y139 respectively, all four of which were reported as involved in warfarin binding in both rodents and humans. Indeed, Y25F, L120Q, Y139C, Y139F, Y139S mutations in rats and mice [55], [56] and V54L and Y139H mutations in human [57], [58] have been described as inducing warfarin resistances: in rodents or patients carrying one of these mutations, the dose of warfarin required to inhibit the VKOR enzyme is significantly higher (i.e. 7.95 μM for the human V54L mutant *versus* 1.65 μM for the wild-type enzyme [57]). The conservation of the four Y28, V52, L117 and Y136 amino acids between *Leptospira* and mammalian enzymes could therefore complicate the development of inhibitors specific to *Leptospira* VKORdcp. Furthermore, the use of warfarin for the inhibition of *Leptospira* VKORdcp would not be suitable: firstly because of its poor affinity towards the enzyme, and more importantly because it would also inhibit patients VKOR, leading to severe blood coagulation troubles in addition to those potentially induced by leptospirosis. The fact is that the VKOR enzyme is crucial for the blood coagulation mechanism in humans: it is responsible for recycling vitamin K1, which is essential for activating several coagulation factors [59]. The inhibition of human VKOR enzyme would thus result in the disruption of blood coagulation.

But the presence of a particular residue could change the situation: D114, identified as unfavorable for interactions between VKORdcp and warfarin (as well as substrates, Figure 6). This polar amino acid interacted with the hydrophobic tail of substrates and the side chain of warfarin (Figure 7), hence its negative role in inhibitor and substrate affinity. However, this residue has not been found in human VKOR, paving the way for the search for inhibitors with a polar group on their side chain. Such a feature could make it possible to design future molecules with high affinity for *Leptospira* VKORdcp, while minimizing their interaction with human VKOR: the inhibitor's polar group would be unfavorable to its interaction with the hydrophobic binding site of the human enzyme.

A final noteworthy piece of information was the lack of involvement of residues specific to pathogenic *Leptospira* in interactions with warfarin. The development of VKORdcp inhibitors specific to pathogenic *Leptospira* strains therefore appears to be very complex, potential future molecules would therefore be generic to all *Leptospira* species. On the other hand, targeting L24, S58, F78 and especially D114 residues appeared as a promising strategy for the specific inhibition of *Leptospira* VKORdcp: our results demonstrated the involvement of these amino acids in the binding of substrate and inhibitor, as well as their conservation among all *Leptospira* species. Since they have not been found in human VKOR, structure-based design of molecules binding to these residues might lead to VKORdcp inhibitors that would exhibit poor affinity for the human protein, a mandatory feature for leptospirosis drugs development.

In conclusion, our study laid the structural foundations for the development of future inhibitors specific to *Leptospira* VKORdcp. These molecules would inhibit post-translational oxidations of periplasmic proteins, thus preventing their functionalization [Dutton 2008, Beckwith 1991]. As these proteins include bacterial toxins and proteins essential for flagella function [Lasica 2007, Dailey 1993], inhibition of VKORdcp would greatly reduce the virulence of targeted bacteria. Such a control strategy would be a promising alternative to the antibiotics currently in use and would limit the risk of resistant strains emerging.

Material & Methods

Leptospira vitamin K epoxide reductase domain-containing protein sequences and alignments

747 sequences of *Leptospira* VKORdcp protein were retrieved from the *Leptospira* core genome multilocus sequence typing (cgMLST) of the Institut Pasteur [37] and from the GenBank databases [38]. 676 sequences came from pathogenic *Leptospira* species and 57 referred to saprophytic strains, the pathogenicity of the 14 remaining sequences were not defined. All species and numbers of VKORdcp sequences are listed in the table below.

<i>Leptospira</i> species	Number of VKORdcp sequences	Pathogenic / Saprophytic
<i>abaraensis</i>	1	Pathogenic
<i>adleri</i>	2	Pathogenic
<i>ainlahdjerensis</i>	1	Pathogenic
<i>alstonii</i>	2	Pathogenic
<i>barantonii</i>	2	Pathogenic
<i>borgpetersenii</i>	99	Pathogenic
<i>ellisii</i>	2	Pathogenic
<i>interrogans</i>	330	Pathogenic
<i>kirschneri</i>	66	Pathogenic
<i>kmetyi</i>	9	Pathogenic
<i>mayottensis</i>	23	Pathogenic
<i>noguchii</i>	30	Pathogenic
<i>santarosai</i>	33	Pathogenic
<i>stimsonii</i>	3	Pathogenic
<i>tipperaryensis</i>	1	Pathogenic
<i>weillii</i>	15	Pathogenic
<i>yasudae</i>	8	Pathogenic
<i>broomii</i>	2	Pathogenic
<i>dzoumogneensis</i>	1	Pathogenic
<i>fainei</i>	1	Pathogenic
<i>fletcheri</i>	1	Pathogenic
<i>fluminis</i>	1	Pathogenic
<i>haakeii</i>	1	Pathogenic
<i>hartskeerlii</i>	1	Pathogenic
<i>inadai</i>	6	Pathogenic
<i>langatensis</i>	2	Pathogenic
<i>licerasiae</i>	7	Pathogenic
<i>saintgironisae</i>	3	Pathogenic
<i>sarikeiensis</i>	1	Pathogenic
<i>selangorensis</i>	3	Pathogenic
<i>semungkisensis</i>	1	Pathogenic
<i>venezuelensis</i>	5	Pathogenic
<i>wolffii</i>	13	Pathogenic
<i>ainazelensis</i>	1	Saprophytic
<i>bandrabouensis</i>	7	Saprophytic
<i>brenneri</i>	1	Saprophytic
<i>chreensis</i>	1	Saprophytic
<i>congkakensis</i>	3	Saprophytic
<i>harrisiae</i>	3	Saprophytic
<i>kemamanensis</i>	4	Saprophytic
<i>meyeri</i>	15	Saprophytic
<i>montravelensis</i>	2	Saprophytic
<i>mtsangambouensis</i>	4	Saprophytic
<i>perdikensis</i>	1	Saprophytic
<i>vanthielii</i>	3	Saprophytic
<i>wolbachii</i>	5	Saprophytic
<i>yanagawae</i>	2	Saprophytic
<i>ilyithenensis</i>	1	Saprophytic
<i>ognonensis</i>	1	Saprophytic
Unkown	3	Saprophytic
Unkown	14	Unknown

Leptospira vitamin K epoxide reductase domain-containing protein molecular modelling

All *Leptospira* VKORdcp structural models were built using AlphaFold [39] Colab notebook [40]. The VKORdcp consensus sequence (Figure 2) was used as input to generate the model presented in Figure 3 (depiction of structural location of conserved residues between all *Leptospira* species). The VKORdcp consensus sequences of pathogenic and saprophytic *Leptospira* (Figure 4) were used as inputs to generate the 3D models used in Figures 5A and 5B, respectively (location of conserved and specific residues among pathogenic and saprophytic *Leptospira* strains). The VKORdcp sequence of *Leptospira interrogans* was retrieved from UniProt [41] (entry identifier: Q8F9R4) to build the 3D model used for investigation of structural interactions of substrates and warfarin towards VKORdcp.

Molecular docking procedures

Chemical structures of vitamin K1 quinone, ubiquinone1, ubiquinone 4 and warfarin were first drawn using ChemDraw software, energy minimization was performed using MM94 in Chem3D then structures were exported as a mol2.

Molecular docking was performed using AutoDock 4.2 software [42]. Ligands mol2 and protein pdb files conversion to pdbqt files was performed using AutoDock routines. 100 Genetic Algorithm runs were carried out for each compound, with 150-sized populations, a maximum of 2500000 evaluations (medium level), no more than 27,000 generations and gene mutations and crossover rates of 0.02 and 0.8, respectively.

Molecular dynamics simulations

Molecular dynamics (MD) systems were built and prepared as described in our previous paper [43]. MD simulations were performed using GROMACS 2018 package software [44], the CHARMM-36 force field was applied [45]. Compounds force field parameters were obtained using the SwissParam webserver [46], from structures in mol2 format files. Each ligand-VKORdcp complex was first embedded into a previously equilibrated DLPC membrane [47] using the *membed* function of GROMACS software. Solvation, energy minimization, 100-ps temperature and 1-ns pressure equilibrations were carried out using GROMACS routines. Two 100-ns MD simulations were finally performed on each ligand-VKORdcp complex, then the two trajectories were concatenated and analysed as one 200-ns MD simulation.

Distances measurement, binding free energy and residues contributions calculations

Distance measurements between the C132 residue of VKORdcp and vitamin K1 quinone, ubiquinone 1, ubiquinone 4 or warfarin over MD simulations were performed using the *dist* function of GROMACS. The binding free energy of VKORdcp-ligand complexes and the contributions of VKORdcp residues to the binding energy were calculated using the Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) method [48] implemented for GROMACS software [49].

Graphics

Vitamin K1 quinone, ubiquinone 1, ubiquinone 4 and warfarin chemical structures were drawn using ChemDraw software. Graphics were drawn using GraphPad Prism software and 3D figures were prepared using PyMOL software [50].

Hardware

MD simulation was performed on GENCI Jean-Zay supercomputer (HPE SGI 8600) at IDRIS, CNRS. All MD analyses and molecular docking procedures were performed on a Dell Precision Tower 7910 workstation, with an Intel Xeon E5-2650v4 CPU and a Quadro M4000 GPU.

Ancillary Information

Supporting Information

- S1. Alignment of vitamin K epoxide reductase domain-containing protein peptide sequences retrieved from databases (attached pdf file)
- S2. Statistical differences between distances to C132 residue of VKORdcp substrates (vitamin K1 quinone, ubiquinone 1, ubiquinone 4)
- S3. Statistical differences between binding energy of VKORdcp substrates and inhibitor (vitamin K1 quinone, ubiquinone 1, ubiquinone 4, warfarin)
- S4. Detailed contribution of VKORdcp residue to the binding energy of each ligand (vitamin K1 quinone, ubiquinone 1, ubiquinone 4, warfarin)

Corresponding Authors Information

Sionfoungo Daouda Soro: sionfoungo.soro@vetagro-sup.fr
Nolan Chatron: nolan.chatron@vetagro-sup.fr

Author Contributions

All the authors contributed equally to this manuscript preparation.

Acknowledgement

This work was granted access to the HPC resources of IDRIS under the allocation 2019-A0090711979 made by GENCI.

Abbreviations Used

DsbA, disulfide bond forming enzyme A
DsbB, disulfide bond forming enzyme B
Trx, thioredoxin
VKOR, vitamin K epoxide reductase
VKORdcp, vitamin K epoxide reductase domain-containing protein

References

- [1] B. Adler, Ed., *Leptospira and Leptospirosis*, 1st ed. 2015. in Current Topics in Microbiology and Immunology, no. 387. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg : Imprint: Springer, 2015. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8.
- [2] J. Perez, F. Brescia, J. Becam, C. Mauron, and C. Goarant, 'Rodent Abundance Dynamics and Leptospirosis Carriage in an Area of Hyper-Endemicity in New Caledonia', *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 10, p. e1361, Oct. 2011, doi: 10.1371/journal.pntd.0001361.
- [3] C. Munoz-Zanzi *et al.*, 'A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970–2012', *Rev. Panam. Salud Pública*, vol. 44, p. 1, Jul. 2020, doi: 10.26633/RPSP.2020.78.
- [4] F. Miraglia *et al.*, 'Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni isolates from Brazil', *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 77, no. 3, pp. 195–199, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.003.
- [5] M. Kanagavel, A. A. Princy Margreat, M. Arunkumar, S. G. Prabhakaran, S. Shanmughapriya, and K. Natarajaseenivasan, 'Multilocus sequence typing (MLST) of leptospiral strains isolated from two geographic locations of Tamil Nadu, India', *Infect. Genet. Evol.*, vol. 37, pp. 123–128, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.meegid.2015.11.008.
- [6] D. Benacer *et al.*, 'Epidemiology of human leptospirosis in Malaysia, 2004–2012', *Acta Trop.*, vol. 157, pp. 162–168, May 2016, doi: 10.1016/j.actatropica.2016.01.031.
- [7] P. N. Levett, 'Leptospirosis', *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 14, no. 2, pp. 296–326, Apr. 2001, doi: 10.1128/CMR.14.2.296-326.2001.
- [8] T. R. Fraga, E. Carvalho, L. Isaac, and A. S. Barbosa, 'Leptospira and Leptospirosis', in *Molecular Medical Microbiology*, Elsevier, 2015, pp. 1973–1990. doi: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00107-4.
- [9] A. R. Bharti *et al.*, 'Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance', *Lancet Infect. Dis.*, vol. 3, no. 12, pp. 757–771, Dec. 2003, doi: 10.1016/S1473-3099(03)00830-2.
- [10] F. Costa *et al.*, 'Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review', *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 9, no. 9, p. e0003898, Sep. 2015, doi: 10.1371/journal.pntd.0003898.
- [11] M. Klein, X. Argemi, and S. Kepka, 'Céphalées fébriles aux urgences : un cas de leptospirose', *Ann. Fr. Médecine Urgence*, vol. 7, no. 3, pp. 194–196, Jun. 2017, doi: 10.1007/s13341-017-0747-z.
- [12] D. A. Haake and P. N. Levett, 'Leptospirosis in Humans', in *Leptospira and Leptospirosis*, B. Adler, Ed., in Current Topics in Microbiology and Immunology, vol. 387. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, pp. 65–97. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_5.
- [13] D. Poggi, P. Oliveira De Giuseppe, and M. Picardeau, 'Antibiotic Resistance Markers for Genetic Manipulations of *Leptospira* spp', *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 14, pp. 4882–4885, Jul. 2010, doi: 10.1128/AEM.00775-10.
- [14] G. Liegeon, T. Delory, and M. Picardeau, 'Antibiotic susceptibilities of livestock isolates of leptospira', *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 51, no. 5, pp. 693–699, May 2018, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.12.024.
- [15] S. A. Narayanavari, N. M. Kishore, and M. Sritharan, 'Structural Analysis of the Leptospiral Sphingomyelinases: in silico and Experimental Evaluation of Sph2 as an Mg⁺⁺-Dependent Sphingomyelinase', *Microb. Physiol.*, vol. 22, no. 1, pp. 24–34, 2012, doi: 10.1159/000337013.

- [16] V. Raja and K. Natarajaseenivasan, 'Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of leptospiral outer membrane proteins (OMPs)', *Crit. Rev. Microbiol.*, vol. 41, no. 1, pp. 1–17, Jan. 2015, doi: 10.3109/1040841X.2013.787387.
- [17] C. Li, H. Xu, K. Zhang, and F. T. Liang, 'Inactivation of a putative flagellar motor switch protein FliG1 prevents *Borrelia burgdorferi* from swimming in highly viscous media and blocks its infectivity', *Mol. Microbiol.*, vol. 75, no. 6, pp. 1563–1576, Mar. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07078.x.
- [18] S. Z. Sultan, J. E. Pitzer, M. R. Miller, and Md. A. Motaleb, 'Analysis of a *Borrelia burgdorferi* phosphodiesterase demonstrates a role for cyclic-di-guanosine monophosphate in motility and virulence: *B. burgdorferi* c-di-GMP influences motility and virulence', *Mol. Microbiol.*, vol. 77, no. 1, pp. 128–142, Jul. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07191.x.
- [19] N. W. Charon *et al.*, 'The Unique Paradigm of Spirochete Motility and Chemotaxis', *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 66, no. 1, pp. 349–370, Oct. 2012, doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150145.
- [20] H. Tahara *et al.*, 'The mechanism of two-phase motility in the spirochete *Leptospira* : Swimming and crawling', *Sci. Adv.*, vol. 4, no. 5, p. eaar7975, May 2018, doi: 10.1126/sciadv.aar7975.
- [21] M. W. Harman *et al.*, 'The heterogeneous motility of the Lyme disease spirochete in gelatin mimics dissemination through tissue', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 8, pp. 3059–3064, Feb. 2012, doi: 10.1073/pnas.1114362109.
- [22] F. E. Dailey and H. C. Berg, 'Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli*.', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 90, no. 3, pp. 1043–1047, Feb. 1993, doi: 10.1073/pnas.90.3.1043.
- [23] R. J. Dutton, D. Boyd, M. Berkmen, and J. Beckwith, 'Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, no. 33, pp. 11933–11938, Aug. 2008, doi: 10.1073/pnas.0804621105.
- [24] J. C. A. Bardwell, K. McGovern, and J. Beckwith, 'Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo', *Cell*, vol. 67, no. 3, pp. 581–589, Nov. 1991, doi: 10.1016/0092-8674(91)90532-4.
- [25] J. L. Martin, J. C. A. Bardwell, and J. Kuriyan, 'Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo', *Nature*, vol. 365, no. 6445, pp. 464–468, Sep. 1993, doi: 10.1038/365464a0.
- [26] S. Kishigami, Y. Akiyama, and K. Ito, 'Redox states of DsbA in the periplasm of *Escherichia coli*', *FEBS Lett.*, vol. 364, no. 1, pp. 55–58, May 1995, doi: 10.1016/0014-5793(95)00354-C.
- [27] J. C. Bardwell, J. O. Lee, G. Jander, N. Martin, D. Belin, and J. Beckwith, 'A pathway for disulfide bond formation in vivo.', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 90, no. 3, pp. 1038–1042, Feb. 1993, doi: 10.1073/pnas.90.3.1038.
- [28] T. Kobayashi, S. Kishigami, M. Sone, H. Inokuchi, T. Mogi, and K. Ito, 'Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 94, no. 22, pp. 11857–11862, Oct. 1997, doi: 10.1073/pnas.94.22.11857.
- [29] M. W. Bader, T. Xie, C.-A. Yu, and J. C. A. Bardwell, 'Disulfide Bonds Are Generated by Quinone Reduction', *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 34, pp. 26082–26088, Aug. 2000, doi: 10.1074/jbc.M003850200.

- [30] M. Bader, W. Muse, D. P. Ballou, C. Gassner, and J. C. A. Bardwell, 'Oxidative Protein Folding Is Driven by the Electron Transport System', *Cell*, vol. 98, no. 2, pp. 217–227, Jul. 1999, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81016-8.
- [31] A. M. Łasica and E. K. Jagusztyn-Krynicka, 'The role of Dsb proteins of Gram-negative bacteria in the process of pathogenesis', *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 31, no. 5, pp. 626–636, Sep. 2007, doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00081.x.
- [32] J. A. Peek and R. K. Taylor, 'Characterization of a periplasmic thiol:disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*.', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 89, no. 13, pp. 6210–6214, Jul. 1992, doi: 10.1073/pnas.89.13.6210.
- [33] J. T. Barbieri and J. Sun, 'Pseudomonas aeruginosa ExoS and ExoT', in *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, in *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 152. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005, pp. 79–92. doi: 10.1007/s10254-004-0031-7.
- [34] T. Miki, N. Okada, and H. Danbara, 'Two Periplasmic Disulfide Oxidoreductases, DsbA and SrgA, Target Outer Membrane Protein SpiA, a Component of the Salmonella Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System', *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 33, pp. 34631–34642, Aug. 2004, doi: 10.1074/jbc.M402760200.
- [35] R. Godlewska *et al.*, 'Helicobacter pylori protein oxidation influences the colonization process', *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 296, no. 4–5, pp. 321–324, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.ijmm.2005.11.010.
- [36] R. J. Dutton, A. Wayman, J.-R. Wei, E. J. Rubin, J. Beckwith, and D. Boyd, 'Inhibition of bacterial disulfide bond formation by the anticoagulant warfarin', *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 1, pp. 297–301, Jan. 2010, doi: 10.1073/pnas.0912952107.
- [37] J. Guglielmini, P. Bourhy, O. Schiettekatte, F. Zinini, S. Brisse, and M. Picardeau, 'Genus-wide *Leptospira* core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance', *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 13, no. 4, p. e0007374, Apr. 2019, doi: 10.1371/journal.pntd.0007374.
- [38] D. A. Benson *et al.*, 'GenBank', *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. D1, pp. D36–D42, Nov. 2012, doi: 10.1093/nar/gks1195.
- [39] J. Jumper *et al.*, 'Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold', *Nature*, vol. 596, no. 7873, pp. 583–589, Aug. 2021, doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- [40] M. Mirdita, K. Schütze, Y. Moriwaki, L. Heo, S. Ovchinnikov, and M. Steinegger, 'ColabFold: making protein folding accessible to all', *Nat. Methods*, vol. 19, no. 6, pp. 679–682, Jun. 2022, doi: 10.1038/s41592-022-01488-1.
- [41] The UniProt Consortium *et al.*, 'UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023', *Nucleic Acids Res.*, vol. 51, no. D1, pp. D523–D531, Jan. 2023, doi: 10.1093/nar/gkac1052.
- [42] G. M. Morris *et al.*, 'AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility', *J. Comput. Chem.*, vol. 30, no. 16, pp. 2785–2791, Dec. 2009, doi: 10.1002/jcc.21256.
- [43] N. Chatron, R. Abi Khalil, E. Benoit, and V. Lattard, 'Structural Investigation of the Vitamin K Epoxide Reductase (VKORC1) Binding Site with Vitamin K', *Biochemistry*, vol. 59, no. 13, pp. 1351–1360, Apr. 2020, doi: 10.1021/acs.biochem.9b01084.

- [44] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, and H. J. C. Berendsen, 'GROMACS: Fast, flexible, and free', *J. Comput. Chem.*, vol. 26, no. 16, pp. 1701–1718, Dec. 2005, doi: 10.1002/jcc.20291.
- [45] R. B. Best *et al.*, 'Optimization of the Additive CHARMM All-Atom Protein Force Field Targeting Improved Sampling of the Backbone ϕ , ψ and Side-Chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles', *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 8, no. 9, pp. 3257–3273, Sep. 2012, doi: 10.1021/ct300400x.
- [46] V. Zoete, M. A. Cuendet, A. Grosdidier, and O. Michielin, 'SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules', *J. Comput. Chem.*, vol. 32, no. 11, pp. 2359–2368, Aug. 2011, doi: 10.1002/jcc.21816.
- [47] J. P. M. Jämbeck and A. P. Lyubartsev, 'Derivation and Systematic Validation of a Refined All-Atom Force Field for Phosphatidylcholine Lipids', *J. Phys. Chem. B*, vol. 116, no. 10, pp. 3164–3179, Mar. 2012, doi: 10.1021/jp212503e.
- [48] T. Hou, J. Wang, Y. Li, and W. Wang, 'Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations', *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 51, no. 1, pp. 69–82, Jan. 2011, doi: 10.1021/ci100275a.
- [49] R. Kumari, R. Kumar, Open Source Drug Discovery Consortium, and A. Lynn, '*g_mmpbsa* —A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations', *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 54, no. 7, pp. 1951–1962, Jul. 2014, doi: 10.1021/ci500020m.
- [50] 'The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8', Schrödinger, LLC: New York, NY, USA, 2015.
- [51] M. Picardeau, 'Diagnosis and epidemiology of leptospirosis', *Médecine Mal. Infect.*, vol. 43, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.medmal.2012.11.005.
- [52] S. Rajapakse, C. Rodrigo, S. M. Handunnetti, and S. Fernando, 'Current immunological and molecular tools for leptospirosis: diagnostics, vaccine design, and biomarkers for predicting severity', *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 14, no. 1, p. 2, 2015, doi: 10.1186/s12941-014-0060-2.
- [53] H. Dam, 'The antihemorrhagic vitamin of the chick', *Biochem. J.*, vol. 29, no. 6, pp. 1273–1285, Jun. 1935, doi: 10.1042/bj0291273.
- [54] N. Chatron, A. Hamed, E. Benoît, and V. Lattard, 'Structural Insights into Phylloquinone (Vitamin K1), Menaquinone (MK4, MK7), and Menadione (Vitamin K3) Binding to VKORC1', *Nutrients*, vol. 11, no. 1, p. 67, Jan. 2019, doi: 10.3390/nu11010067.
- [55] J. Goulois *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: Target resistance to rodenticides in *Rattus rattus*', *Pest Manag. Sci.*, vol. 72, no. 3, pp. 544–550, Mar. 2016, doi: 10.1002/ps.4020.
- [56] A. Hodroge, C. Longin-Sauvageon, I. Fourel, E. Benoit, and V. Lattard, 'Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants', *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 515, no. 1–2, pp. 14–20, Nov. 2011, doi: 10.1016/j.abb.2011.08.010.

[57] A. Hodroge *et al.*, 'VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity', *J. Thromb. Haemost.*, vol. 10, no. 12, pp. 2535–2543, Dec. 2012, doi: 10.1111/jth.12019.

[58] K. J. Czogalla *et al.*, 'Human VKORC1 mutations cause variable degrees of 4-hydroxycoumarin resistance and affect putative warfarin binding interfaces', *Blood*, vol. 122, no. 15, pp. 2743–2750, Oct. 2013, doi: 10.1182/blood-2013-05-501692.

[59] J. W. Suttie, 'VITAMIN K-DEPENDENT CARBOXYLASE', *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 54, no. 1, pp. 459–477, Jun. 1985, doi: 10.1146/annurev.bi.54.070185.002331.

B. Développement d'une approche enzymatique de caractérisation de l'activité VKOR par le système NADPH/Trx/TrxR dépendant : Application sur la VKORC1 de mammifère

1. Objectifs

De nombreuses études de caractérisation de l'activité de VKORC1 existent du fait de l'implication de cette enzyme dans le cycle de la vitamine K et dans les phénomènes de résistance aux anticoagulants. En revanche, chez son homologue bactérien qui intervient dans la formation des ponts disulfures indispensables dans le repliement et la stabilité des certaines protéines cruciales pour la survie de la bactérie, très peu de travaux ont été réalisés. Chez les leptospires, aucune étude d'ailleurs à notre connaissance ne porte sur cette protéine. Bien qu'ayant des fonctions très différentes, ces 2 protéines (mammifère et bactérienne) ont un mécanisme d'oxydoréduction assez similaire.

Le cycle de réaction catalysée par la VKORC1 laisse entrevoir qu'elle ne peut fonctionner toute seule et qu'elle a besoin d'un partenaire enzymatique redox ayant un domaine thiorédoxine pour être ramenée à des équivalents de réduction. Même si ce partenaire n'a pas encore été clairement défini, le candidat probable serait la PDI ou un membre de la famille TMX. Chez la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*, ce partenaire serait la DsbA ; cette dernière étant fusionnée à VKOR chez les leptospires.

Pour les études de mesure de l'activité de la VKORC1 dans la plupart des essais *in vitro*, le partenaire réducteur utilisé pour initier la réaction est le dithiothréitol (DTT). Ce choix reste assez discutable d'autant plus que ce n'est pas une référence physiologique. Certaines études ont suggéré le système Trx au détriment du DTT. Convaincus que cette méthode serait plus apte à refléter la réalité physiologique chez les mammifères et plus transposable pour la caractérisation de l'activité de la VKOR bactérienne, nous nous sommes fixés pour objectif de valider la méthode de caractérisation de l'activité VKORC1 par le système NADPH/Trx/TrxR.

2. Méthodes

Dans un premier temps, les protéines hVKORC1 et rVKORC1 ont été exprimées en levures *Pichia pastoris*. Ensuite, afin de valider notre méthode de caractérisation de l'activité VKOR, notre travail a consisté à comparer les propriétés catalytiques (K_m , V_{max}) de nos protéines et leur sensibilité à la warfarine en utilisant le test classique ayant recours au DTT et le test NADPH/Trx/TrxR seul ou avec système de recyclage du NADPH.

3. Résultats principaux

Tout comme dans le test avec DTT, l'activité enzymatique de la VKORC1 était maintenue avec le système NADPH/Trx/TrxR. Trx est le facteur limitant de la réaction. Le transfert d'électrons du NADPH à la Trx médié par la TrxR étant assez lent, ce qui a pour conséquence une oxydation de tout le NADPH réduit, l'activité VKOR était maintenue plus longtemps en couplant notre système avec le mécanisme auto-régénérant (NADP, du glucose-6-phosphate et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase) du NADPH.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie sont présentés dans un article en cours de finalisation et exposé ci-après :

Article 2 : A more physiological reduction of VKOR for in vitro enzymatic assays

À la suite de la mise au point de cette méthode avec la VKORC1 de mammifères, il est bon de souligner que des travaux sont en cours pour la caractérisation enzymatique de la VKOR des leptospires. Les données préliminaires obtenues laissent entrevoir des résultats encourageants qui sont présentés dans la section « Perspectives ».

A more physiological reduction of VKOR for in vitro enzymatic assays

Sionfoungo Daouda SORO¹, Julie PACHOUD¹, Xavier SERFATY¹, Sophie RAHUEL- CLERMONT², Alexandre KRIZNIK², Nolan CHATRON¹, Virginie LATTARD¹, & Etienne BENOIT^{1*}.

¹USC 1233 RS2GP, INRAe, VetAgro Sup, Université de Lyon, 69280 Marcy l'Etoile, France

²Université de Lorraine, CNRS, IMoPA, Biopôle, campus Biologie-Santé, F-54000 Nancy, France

*Auteur correspondant

Keywords : VKOR activity, VKORC1, redox partner, Trx system

A more physiological reduction of VKORC1 for *in vitro* enzymatic assays.

Sionfoungo SORO, Julie PACHOUD, Xavier SERFATY, Sophie RAHUEL-CLERMONT, Alexandre KRIZNIK, Nolan CHATRON, Virginie LATTARD, Etienne BENOIT.

USC1233 RS2GP, INRAE, VetAgro Sup, University of Lyon, F-69280 Marcy l'étoile France.

IMoPA, UMR 7365, CNRS, Lorraine University, 54505 Vandoeuvre lès Nancy, France.

INTRODUCTION

Vitamin K is involved in several biological processes, including coagulation, calcium metabolism and various cytoprotective processes. These actions are achieved through a post-translational modification, the gamma carboxylation of Glu residues into Gla residues of a group of proteins called vitamin K dependent proteins (VKDP) leading to their activation. Gamma carboxylation involves an enzyme, the gamma-glutamyl-carboxylase (GGCX), which uses vitamin K in the hydroquinone form (KH₂), which is converted to vitamin K epoxide (K>O) during the reaction. VKORC1 reduces K>O to KH and then to KH₂. It therefore reduces vitamin K epoxide and recycles vitamin K hydroquinone, significantly limiting the dietary requirement for vitamin K.

VKORC1 is inhibited by vitamin K antagonists (VKAs). These drugs are still widely used in humans to prevent and treat thrombotic syndromes. These VKAs are also widely used in rodents as rodent poisons. In humans, more than thirty mutations distributed throughout the protein have been described in patients requiring more or less increased doses of VKA to prevent thrombotic syndromes (Hodroge et al. 2011; Watzka et al 2011). Nevertheless, the causes of variations in VKA dosage in humans are very diverse and the association between VKORC1 mutation and resistance to VKA is sometimes difficult to establish with certitude. In rodents, particularly rats and mice, VKORC1 mutations have also become extremely frequent as a result of intense selection and have been demonstrated, contrary to humans, to lead to a drastic decrease in the efficacy of VKAs, resulting in the development and use of VKAs that are more effective but also extremely persistent in tissues and therefore often very ecotoxic. Robust, biologically relevant methods for measuring VKORC1 enzymatic activity are therefore essential for assessing the consequences of VKORC1 mutations in humans and rodents. Understanding the impact of mutations is essential for adapting the choice and dose of anticoagulant therapies in humans, for implementing appropriate rodent population management strategies, and for developing new, less ecotoxic molecules.

VKORC1 is an ER-anchored transmembrane protein of 163 amino acids with 4 transmembrane domains, a luminal loop and a catalytic site where K>O is reduced to KH and KH to KH₂. It has four cysteine residues (C43, C51, C132 and C135) strictly conserved across all species. Residues C132 and C135 form the catalytic site of VKORC1 - the CxxC motif being the active site of most proteins in the oxidoreductase family - while residues C43 and C51 transfer the redox power to this catalytic site (Figure 1). The reducing power of VKORC1 is conferred by thioredoxin (Trx)-type oxidoreductases. Various proteins have been suggested as possible protein partners for VKORC1, such as PDI, TMX1 and 4, Erp18. However, the precise identity of VKORC1's

protein partner(s) remains to be elucidated. The protein partner enables to reduce the disulfide bridge present in the luminal loop (C43 and C51). The resulting thiol groups in the luminal loop enable the reduction of the disulfide bridge present in the catalytic site (C132 and C135). The presence of thiol groups in the catalytic site enables reduction of the substrate, vit K>O.

VKORC1 homologous have been described in certain bacteria. *Synechococcus* VKOR has been sequenced and subsequently crystallized (Weikai Li et al. 2010). This protein has an N-terminal part of about 160 amino acids relatively similar to mammalian VKORC1, with 4 transmembrane domains and the highly conserved amino acids identified as important for catalysis in mammalian, including the 4 cysteines (C50, C56, C130 and C133) involved in the two disulfide bridges associated with the transfer of reducing power (Figure 1). However, *Synechococcus* VKOR has an additional fifth C-terminal transmembrane domain containing two additional cysteines (C209 and C 212) and a luminal C-terminus compared with mammalian VKORC1. This additional amino acid part of VKOR is similar to thioredoxin, a bacterial enzyme involved in disulfide bridge reduction. This part acts as the protein partner of mammalian VKORC1 and is reduced by a thioredoxin reductase enzyme (TrxR). (Goodstadt et al. 2004.) (Weikai Li et al. 2010).

Several in vitro assays have been used to measure VKORC1 activity in microsomal fractions and assess the impact of VKORC1 mutations on VKA sensitivity. In practice, chemical agents such as DTT have been often used to mimic the protein partner of VKORC1 and thus reduce VKORC1 to enable it to function. However, these reducing agents appear problematic, as some authors have suggested that DTT may directly access the interior of the catalytic site and thus reduce the disulfide bridge between C132 and C135, or even directly reduce K>O to KH and the latter to KH₂. Bypassing the first step of the catalytic mechanism, corresponding to the reduction of the disulfide bridge between C132 and C135 by cysteines C43 and C51 of the luminal loop during activity assays, would prevent any characterization of consequences of VKORC1 mutations in the luminal loop, might bias the results obtained for the other mutations located on the rest of the protein, and might even lead to major background noise if DTT directly would reduce K>O. Therefore, we attempted to propose a more physiological way of testing VKORC1 activity by replacing DTT with a potential protein partner. Since the identity of the mammalian VKORC1 protein partner has not been fully elucidated and the *Synechococcus* VKOR domain is reduced by a domain homologous to bacterial thioredoxin, we tested the effects of bacterial thioredoxin, in the presence of thioredoxin reductase and reduced NADP, on the catalysis of mammalian VKORC1, and we compared the reducing effects of this system with the reducing effect of DTT, thereby establishing a method for studying VKORC1 on a more physiological basis.

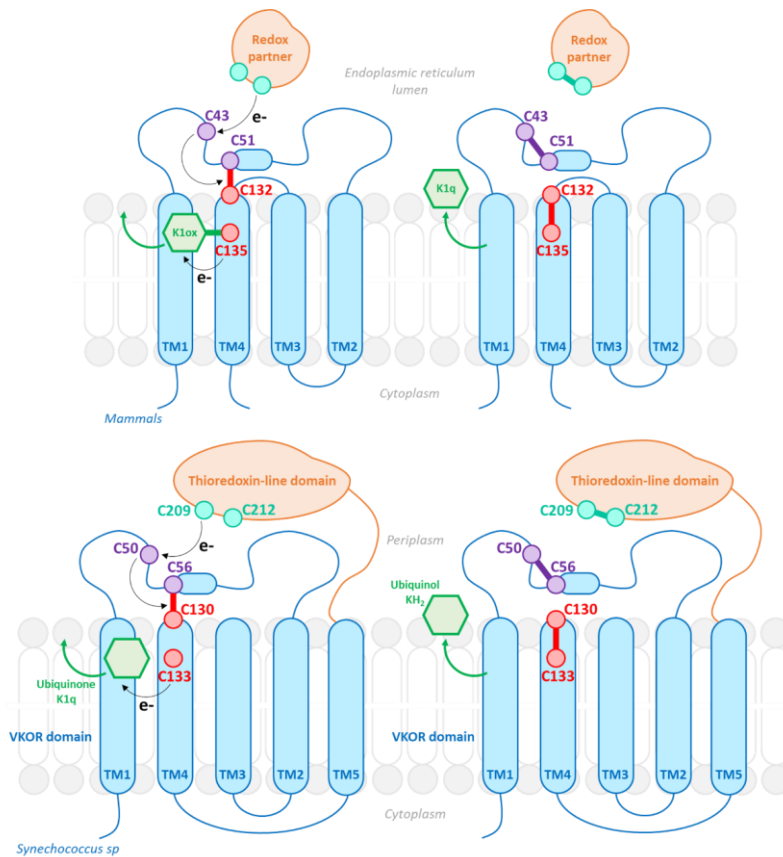


Fig. 1 :

MATERIALS AND METHODS

Materials

Vitamin K quinone (VQ, Alfa Aesard, L10575), Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (Alfa Aesard, J61181), NADP (Acros Organics, 227575000), Glucose-6-Phosphate (Acros Organics, 446980010), Yeast Extract (xxxx), HEPES (xxxx), NaCl (xxxx), KCl (xxxx), Glycerol (Acros Organics, xxxx), AccuPrime Taq polymerase high fidelity (Invitrogen™, 12346086), Zeocin™ (Gibco™, R25001), *Pichia EasyComp™* Transformation Kit (Invitrogen™, K173001), Ampicillin and Kanamycin were provided by Fisher Scientific, France. DTT (PanReac AppliChem, A1101,0025) was provided by VWR France. Vitamin K epoxide (Kox) was synthesised from VQ using a very well-established protocol (Fasco Principe 1980), and its purity higher than 99 %

was estimated by LC/MS. *E. coli* thioredoxin 1 (Trx) and thioredoxin reductase (TrxR) were produced and purified as described previously (Mössner, et al 1998, Mulrooney et al. 1997).

Methods

Heterologous expression of recombinant rVKORC1 and hVKORC1 proteins in Pichia pastoris yeast

P. pastoris SMD1168 strain was transformed with human (i.e., wild type hVKORC1, hVKORC1-C43A, hVKORC1-C51A) or rat (rVKORC1-Y139F) constructions in pPICZB plasmid using *Pichia* EasyComp™ Transformation Kit (Invitrogen™). Transformants were then selected on YPD plates (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) containing 100 g/mL Zeocin (Invitrogen), and precultured in a classical medium containing 10 g·L⁻¹ yeast extract, 20 g·L⁻¹ peptone and 10 g·L⁻¹ glycerol with 100 µg·mL⁻¹ Zeocin™, for 48 hours at 30°C in a rotary shaker (200 rpm). The transformed yeast culture was then inoculated and grown in a BMGY growth medium (1% yeast extract, 2% peptone, 100 mM potassium phosphate, pH 5.0, 1.34% yeast nitrogen base, and 1% glycerol) for 72 hours. Expression was induced by 1% methanol for 48 h at 30 °C in a rotary shaker (200 rpm). Yeast cells were collected by centrifugation (3000g, 10 min, 4°C) and immediately frozen at -20 °C.

Preparation of VKORC1 overexpressing yeast microsomal fractions

After pellet (30 to 60 g) resuspension in 100 mM HEPES, 250 mM sucrose, 1 M NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mM DTT (pH 8) to a final volume of 100 mL, yeasts were broken down with 450 g zirconium oxide beads (0.5 mm diameter) at 0 °C with a DISPERMAT® LC50 (VMA-GETZMANN, Germany) at 8000 rpm for 20 minutes. The yeast grist was centrifuged at 4°C and at 500 x g for 5 min, then at 20 000 x g for 10 min and supernatants were further centrifuged at 4 °C and 100 605 x g for 2h. Pellets were resuspended in 100 mM HEPES, 150 mM KCl, 20 % glycerol (pH 7.4) with a tight-fitting Potter-Elvehjem grinder and membrane fractions were aliquoted and kept at -80 °C.

Enzymatic assays for the measurement of kinetic parameters

All incubations were performed in a 200 mM HEPES, 150 mM KCl buffer (pH adjusted to 7.4 with saturated NaOH, 1 mL final). For assays involving the Trx system, *P. pastoris* VKOR microsomes (from 0 to 2 mg of total proteins) were pre-incubated with the NADPH/TrxR/Trx system (NADPH 200 µM, 0,5 µM TrxR, 50 µM Trx) alone or supplemented with an NADPH recycling system (1,3 mM NADP, 3,3 mM glucose-6-phosphate, 0,4 U/mL glucose-6-phosphate-dehydrogenase) for 30 minutes, and the reaction was then started by adding 200 µM of substrate vitamin K epoxide (Kox). For DTT-driven assays, the VKOR microsomes were preincubated in buffer for 30 minutes, before addition of Kox, and the reaction was started with 1 mM DTT. The reaction media were incubated at 37°C for 30 minutes, and the reaction was then quenched with 2 mL isopropanol, and 2 mL hexane was added for liquid-liquid extraction. After 10 minutes of centrifugation at 5000 g, the hexane layer was recovered and dried under a flow of nitrogen. Dried residues were resuspended in 200 µL methanol and run through liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS).

Commenté [SR1]: On pourrait mettre un schéma du système couplé de base/ avec régénération de NADPH ?

The LC/MS used was an Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) 6120 Quadrupole LC/MS with an Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI). Detection was made with APCI source in positive mode. The parameters used are described in [ref Hodroge, 2011, Matagrín 2013, Fourel, 2020]. Identification criteria for vitamin K quinone (VQ) (retention time t_r : 3.9 min, m/z (+) 451.3, vitamin K epoxide (Kox) (t_r : 2.9 min for Kox, m/z ratio (m/z (+) =467,3).

Determination of kinetic constants V_{max} , K_m and V_{max} and statistical analysis:

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 9.3.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com. K_m was determined by nonlinear regression using the GraphPad Prism Michaelis-Menten model. IC₅₀ of warfarin, phenindione and brodifacoum were determined by nonlinear regression using the log(inhibitor) vs normalized response model with the same version of GraphPad Prism. Comparisons between groups were made using either non-parametric Kruskal-Wallis interaction test followed by Dunnett's multiple comparison test, or Mann-Whitney test. For each of these tests, p value < 0.05 is considered significant (*), as well as p value < 0.01 (**), p value < 0.001(***), and p value < 0.0001 (****).

RESULTS

The NADPH/TrxR/Trx system sustains mammalian VKORC1 activity.

First, we tested the effectiveness of the NADPH/TrxR/Trx system as a redox partner for VKORC1 in an in vitro system. For this, yeast microsomes overexpressing human VKORC1 (0.2 mg) were incubated with K[>]O in the presence or absence of purified bacterial TrxR and Trx expressed by E. coli, in the presence or absence of NADPH. In the figure 2 are presented the results obtained with the complete and incomplete Trx system (NADPH, Trx R, TRX). The results obtained showed that the complete system (Trx+TrxR+NADPH) sustained the VKOR activity catalyzed by recombinant human VKORC1 with an efficiency similar to that of DTT and that each element of the Trx system was clearly necessary.

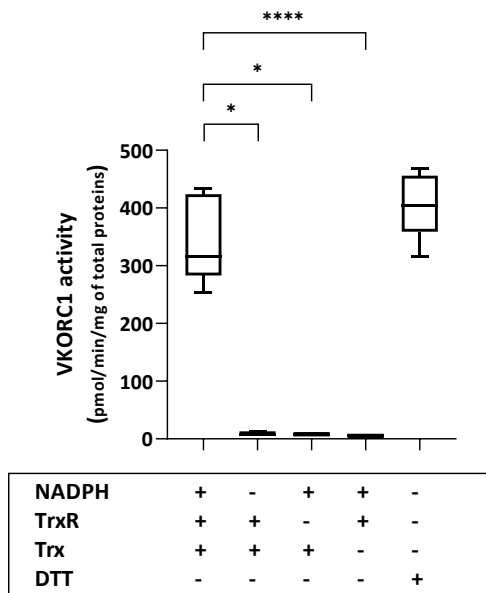


Fig. 2: Assessment of VKOR activity with an *in vitro* NADPH/TrxR/Trx-driven assay.

VKOR activity (pmol vitamin K quinone/min/mg of microsomal proteins) is presented using as the redox partner either 1 mM DTT or the complete or uncomplete system NADPH 200 μ M +/- TrxR 0.5 μ M +/- TRX 50 μ M. The results are presented as median, quartiles, minimum and maximums for at least 8 totally independent experiments with two replicates for each of these experiments. Non-parametric Kruskal-Wallis' test, followed by Dunnett's multiple comparison test, were performed to assess the differences between each group, which were represented by *. The difference between positive control DTT-VKOR (lane 5) and lanes 2, 3, and 4 is obviously significant but was not represented for the sake of readability.

After verifying the dependence of the VKOR activity catalyzed by yeast microsomes overexpressing hVKORC1 on each component of the TrX system, the linearities of the VKOR activity as a function of the enzyme concentration using an incubation time of 30 minutes, and as a function of the incubation time using 0.2 mg of microsomal proteins were tested. Results are presented in Figure 3 and demonstrated that VKOR activity catalyzed by human VKORC1 was linear as a function of time (at least for 45 min) and as a function of the quantity of proteins (at least up to 0.4 mg of total proteins).

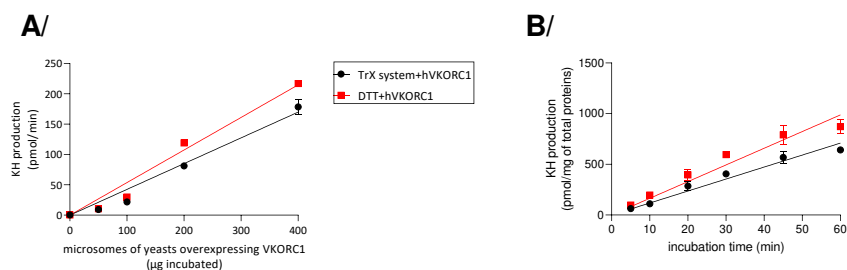


Fig. 3: VKOR activity catalysed by microsomal fractions of yeasts overexpressing human VKORC1 A/ as a function of the quantity of yeast proteins added in the incubation (with an incubation time of 30 min) and B/ as a function of the incubation time (with 0.2 mg of total proteins incubated). VKOR activity was determined with 200 μ M of K>O in a presence of a complete NADPH/TrxR/Trx system or in the presence of DTT (1 mM)

To ensure we were not hindering VKOR activity by providing it with a limiting amount of reducing power, we also evaluated VKOR activity in the NADPH/TrxR/Trx-driven system by independently increasing concentrations of NADPH, TrxR, and then Trx. VKOR activity increased with TrxR concentration, as well as with NADPH and Trx concentration, until reaching a plateau at around 0,5 μ M for TrxR, at around 200 μ M for NADPH and at approximately 50 μ M for Trx, which decided us on using these TrxR and Trx concentrations for the subsequent assays. Nevertheless, to be sure to maintain a constant reductive pressure (NADPH > 200 μ M), we decided to generate NADPH in continuous excess via a self-regenerating system comprising NADP, glucose-6-phosphate, and glucose-6-phosphate dehydrogenase (1,3 mM NADP, 3,3 mM glucose-6-phosphate, 0,4 U/mL glucose-6-phosphate-dehydrogenase), and pre-incubated this self-regenerating NADPH system, TrxR, Trx and VKOR microsomes together in buffer for 30 minutes before prompting the reaction with the K>O substrate.

The NADPH/TrxR/Trx system allows physiological activation of VKOR.

In an attempt to respond to repeated concerns of the scientific community regarding non-physiological K>O reduction with the traditionally used DTT, we compared the NADPH/TrxR/Trx system with DTT regarding two putative unnatural reactions reported to occur with DTT assays. Indeed, it has been suggested DTT can bypass the whole VKORC by reducing K>O directly, as well as bypass the luminal loop disulfide Cys43-Cys51 thought to relay the reducing power to the active site's disulfide Cys132-Cys135 (Figure 1).

DTT or Trx-system were not able to reduce K>O directly in incubation buffer when tested without any microsomes. When blank *P. pastoris* microsomes were used to evaluate the possibility of non-specific enzymatic reduction involving a membrane-bound protein different from VKORC1, neither DTT nor the Trx system drove the production of vitamin KH product (Fig. 4).

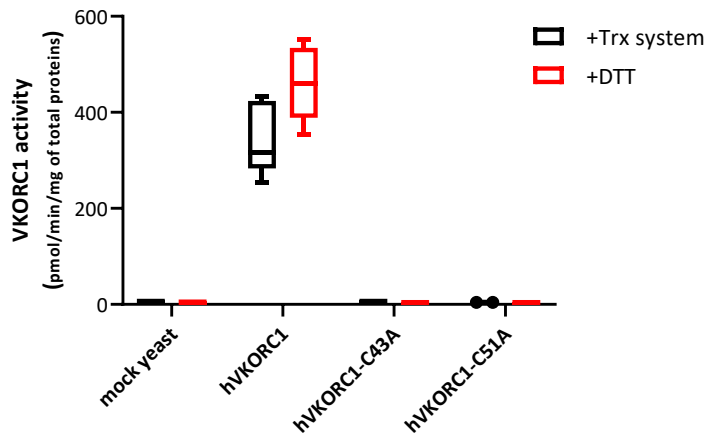


Fig. 4: The NADPH/TrxR/Trx system is not responsible for non-enzymatic side reactions
 Enzymatic assays were performed with either DTT (1 mM) or the Trx-system (see Material and Methods), in plain buffer, with “blank” VKOR-free *Pichia pastoris* microsomes, with wild type hVKORC1 microsomes or with C43A or C51A hVKORC1 mutants, as described on the graphs above. Products of the reaction were analysed by LC/MS. Each result is presented as median with quartiles of at least 5 independent experiments, with two replicates for each of these experiments. Non-parametric Kruskal-Wallis’ test, followed by Dunnett’s multiple comparison test, were performed to assess the differences between each group and significant differences were represented by *.

To further decipher the mechanism of reduction of VKOR by the Trx system, we expressed in *P. pastoris* human VKORC1 in which each one of the loop cysteines, Cys51 or Cys43, was mutated into Ala and prepared microsomes. The NADPH/TrxR/Trx-driven enzymatic assays performed using these loop cysteine mutants showed no activity (Fig.4). Therefore, both loop cysteines are essential to the VKOR reduction pathway with the Trx system *in vitro*. Likewise, Cys51Ala and Cys43Ala mutants were also unable to drive K>O reduction in the reference DTT-driven *in vitro* assay, under experimental conditions similar to those used for the Trx-driven assay (see Fig.4), showing that both VKOR loop cysteines are essential for *in vitro* VKOR activity regardless of its partner reductant. These results also exclude the direct reduction by DTT of the cysteines 132 and 135 of the catalytic site in our experimental conditions.

Kinetic parameters obtained with the NADPH/TrxR/Trx system are comparable to those obtained in the presence of DTT.

To compare the ability of redox systems to support VKOR activity, kinetic constants were compared in the presence of DTT or the complete Trx system complemented by the NADPH-regenerating system. VKOR activity was determined at different K>O concentrations. Reaction rates of human VKORC1 towards vit K>O followed the Michaelis-Menten model (Fig.5), in both DTT and Trx systems, enabling determination of kinetic parameters. Km values were 44 μ M [CI_{95%}: 33-57] and 67 μ M [CI_{95%}: 46-96] for the Trx-driven assay and the DTT-driven assay, respectively and difference was statistically different (p-value=0.0038). Vmax values were 296 pmol/min/mg of total proteins [CI_{95%}: 273-322] and 512 pmol/min/mg of total proteins [CI_{95%}:

449-593] for the Trx-driven assay and the DTT-driven assay, respectively and difference was statistically different (p -value<0.0001).

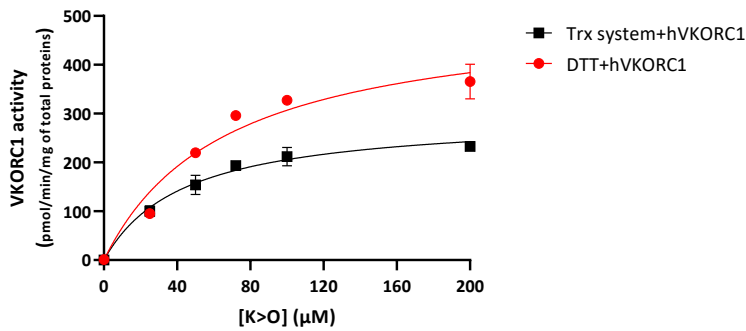


Fig. 5: VKORC1 activity as a function of the K>O concentration using the DTT (red line) or the NADPH/TrxR/Trx-driven assay (black line).

The curve was fitted by non-linear regression using the Michaelis-Menten model on GraphPad Prism ($R^2=0.9828$ for Trx-driven assay and $R^2=0.9666$ for DTT-driven assay). Each value plotted above is the mean \pm SD of two or three individual determinations.

To compare the ability of VKAs to inhibit VKOR activity according to the nature of the reducing partner (i.e. either DTT or the complete Trx system under saturating conditions), the VKOR activity catalysed by yeast microsomes overexpressing hVKORC1 was determined in the presence of different concentrations of warfarin or phenindione, and the IC50s determined (Fig.6). For warfarin (Fig.6, panel A) and phenindione (Fig.6, panel B) inhibition, the IC50s determined in the DTT-driven assay or the Trx complete system (with an NADPH-regenerating system)-driven assay were not statistically significant. For warfarin, IC50 were, respectively, 2.5 μ M [$CI_{95\%}$: 1.5-6.1] and 1.0 μ M [$CI_{95\%}$: 5.5-6.7], for the DTT- or the Trx complete system-assay. For phenindione, IC50 were, respectively, 0.6 μ M [$CI_{95\%}$: 0.3-2.8] and 0.6 μ M [$CI_{95\%}$: 0.4-1.3], for the DTT- or the Trx complete system-assay.

To avoid any effect when VKORC1 is mutated and has a mutation conferring severe resistance to VKAs, we assessed the effect of VKAs on the rVKORC1-Y139F protein, described as highly resistant to first-generation VKAs. In both systems, rVKORC1-Y139F was resistant to first-generation VKAs ($IC_{50}>100\mu$ M). However, it remained sensitive to second-generation VKAs, as shown in panel C of figure 6. For brodifacoum, IC50 were, respectively, 0.07 μ M [$CI_{95\%}$: 0.03-0.2] and 0.09 μ M [$CI_{95\%}$: 0.05-0.3], for the DTT- or the Trx complete system-assay and were not statistically significant.

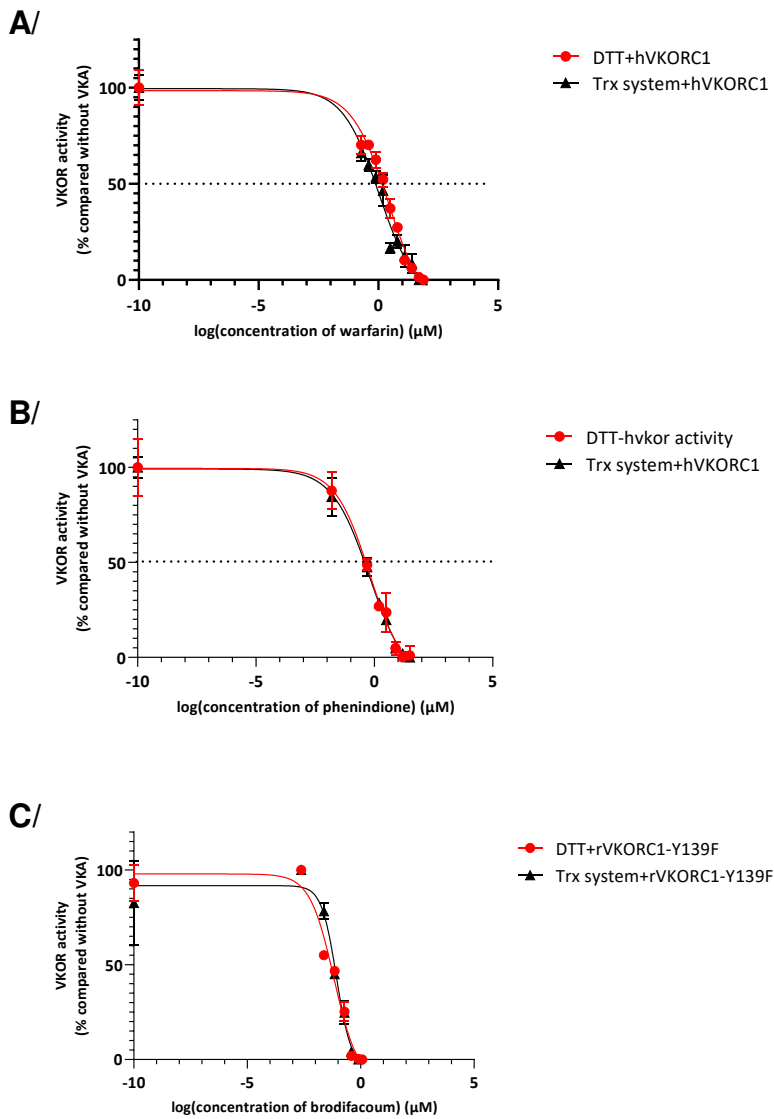


Fig. 6: Susceptibility of VKOR activity catalysed by yeast microsomes overexpressing VKORC1 enzymes to VKAs. A/ Susceptibility of hVKORC1 to warfarin using the DTT-driven assay (red line) or the NADPH/TrxR/Trx-driven assay (black line), B/ Susceptibility of hVKORC1 to phenindione using the DTT-driven assay (red line) or the NADPH/TrxR/Trx-driven assay (black line), C/ Susceptibility of rVKORC1-Y139F to brodifacoum using the DTT-driven assay (red line) or the NADPH/TrxR/Trx-driven assay (black line).

DISCUSSION

VKORC1 mutations have been described in many animal species, including humans, and have physiological and pharmacodynamic consequences that can be very significant in both humans and rodents. The characterisation of the effects of VKORC1 mutations is an important issue that is being addressed in a variety of ways. One of the most widely used methods is the measurement of VKORC1 activity on microsomes using DTT as a reducing agent. However, other indirect methods are also described, such as methods using HEK-type cell cultures, in vivo approaches in animals and even in silico approaches.

The method of measuring VKORC1 activity using DTT could cause a direct reduction of the disulphide bridge of the active site (C132-C135) short-circuiting the luminal cysteines, which would imply a shunt in the reaction mechanism of VKOR reduction. This leads to difficulties in interpreting the consequences of mutations in the loop and does not allow, in particular, work on the interactions between the proteins providing the reducing power to VKORC1 in mammals. Hodroge et al (*J Thromb Haemost* 2012; 10: 2535-43) worked on these mutations in human VKORC1 and observed that of the 26 mutations described 17 were present in the luminal loop and 9 of these were completely inactive. It would be important to repeat this work and show that the proteins biologically involved in the reduction of VKORC1 interact with VKORC1 and in particular with the luminal loop, which could explain these results.

Indirect methods such as those using cellular approaches developed in particular by the Tie team (Tie J-K, Jin D-Y, Straight DL, Stafford DW. Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells. *Blood*. 2011;117(10):2967-74) (culture of HEK cells) expressing VKORC1 also have limitations because VKOR activity is measured indirectly, for example by measuring gamma carboxylated coagulation factor IX in the presence of vit KH2 or by assessing the ratio between KO and KH. This type of method has a major limitation relating to the entry of vit KH or vit KO into the cultured cell. However, this approach involves a VKORC1 reduction mechanism that is perfectly physiological.

The in vivo efficacy of a VKA obviously depends on its ability to inhibit VKORC1, but more importantly on its pharmacokinetic properties, which vary considerably from one VKA to another. Using Wistar rats into which genes from mutant wild-type rodents have been introduced, it is possible to compare the effects of a VKA according to the mutation of the introduced gene (Grandemange A et al. 2009). The resistance factor corresponding to the ratio of lethal doses 50 of VKAs as a function of the VKORC1 gene mutation is highly correlated with the ratio of IC50s obtained using the classical enzymatic approach.

Each of these approaches has its limitations. However, when compared to the assessment of enzymatic activity in the presence of DTT, a major limitation, corresponding to the non-physiological aspect of VKORC1 reduction, remains controversial. For this reason, we sought to develop a method using a protein partner to assess VKORC1 activity. Given the structural proximity between human VKORC1 and VKORC1 from *Synechococcus* sp, the development of a method based on the use of bacterial thioredoxin was essential.

The development of this method has shown that the activity is dependent on cysteines 43 and 51 of the luminal loop, is proportional to the incubation time and the amount of protein

incubated, and that the catalytic and inhibition constants are in agreement with the results obtained using the DTT method. The V_{max} observed is slightly lower. However, this method requires the availability of Trx and TrxR and verification that the catalysed reaction is not dependent on the concentrations of Trx or TrxR or NADPH. However, this method opens up important prospects for understanding the interaction between VKORC1 and its protein partners. It would be important to be able to use this method to test the proteins potentially involved in the reduction of VKORC1, such as PDI, TMX1, TMX4 and ERP18. It will be necessary to test the reducing power of TrxR on these proteins or to replace TrxR with an ERO1-type enzyme. It would then be particularly interesting to compare the efficacy of these proteins to assess the role of these proteins in VKORC1 activity and then to consider testing the consequences of mutations in the luminal loop on the efficacy of mutant VKORC1

.A similar application could be envisaged to determine the protein partner of VKORC1L1, an enzyme that is a paralog of VKORC1 but expressed mainly in extrahepatic tissues.

Finally, such a method, which avoids the use of DTT, is essential to work on the second action of VKORC1, namely the reductase activity of VKORC1 on vitamin K quinone, transforming it into vitamin K hydroquinone. The reducing effect of DTT on vitamin KH is very significant and it seems unlikely that a method using DTT would be acceptable.

C. Etudes de portage leptospirosique chez des campagnols terrestres et des rats urbains ayant conduit à l'obtention de nouvelles souches de terrain

1. Objectifs

Les souches de référence mises à notre disposition ayant subi plusieurs cycles de repiquage, il a été jugé judicieux pour notre étude d'avoir également des souches bactériennes de terrain pour s'assurer que la motilité des leptospires n'était pas trop impactée par ce paramètre de repiquages successifs. Pour ce faire, nous avons eu à participer à deux projets de recherche portant sur le portage leptospirosique chez des campagnols terrestres dans le Puy de Dôme (article 3) et des populations de rats urbains à Lyon et Bordeaux (article 4).

2. Méthodes

Au cours de ces deux projets, des rongeurs ont été capturés et autopsiés. Outre, les prélèvements d'échantillons de reins et éventuellement d'urine pour la détection des leptospires, des mises en culture de prélèvements rénaux dans des milieux EMJH ont également été effectués. Incubées entre 28 et 30°C, ces cultures ont été contrôlées chaque semaine par observation au microscope à fond noir. Au bout de deux mois, les cultures négatives ont été jetées. Quant aux cultures positives, une partie a été utilisée pour nos différents tests et la seconde partie a été conservée à - 80°C.

3. Résultats principaux

Brièvement, ces deux études nous ont permis d'obtenir des nouvelles souches de leptospires pour nos travaux. De plus, elles ont permis de mettre en évidence le portage de *Leptospira Kirschnerii* serogroupe Grippytyphosa dans les populations de campagnols terrestres (*Arvicola terrestris*) dans le Puy-de-Dôme et de *Leptospira interrogans* serogroupe Icterohaemorrhagiae dans des populations de rats urbains à Lyon et Bordeaux.

Les résultats de l'étude sur les campagnols terrestres (article 3) ont fait l'objet d'un article publié dans le journal « *Pathogens* » sous le titre « **Identification of pathogenic *Leptospira kirschneri* serogroup Grippytyphosa in water voles (*Arvicola terrestris*) from ruminant pastures in Puy-de-Dôme, Central France.** ». Quant aux résultats de l'étude sur les rats urbains (article 4), un article est en cours de finalisation. Ces deux articles sont présentés ci-après.

**Identification of pathogenic *Leptospira kirschneri*
serogroup Grippotyphosa in water voles (*Arvicola
terrestris*) from ruminant pastures in Puy-de-Dôme,
Central France.**

Elena Harran^{1,2*}, Adrien Pinot¹, Angeli Kodjo¹, Zouheira Djelouadji¹, Marine Le Gudayer³, **Daouda Sionfoungo Soro¹**, Karine Groud¹, Virginie Lattard¹ and Florence Ayrat^{1,3}

¹ USC 1233-RS2GP, VetAgro Sup, Université de Lyon, Marcy L'Etoile 69280, France

² Faculty of Arts and Sciences, Holy Spirit University of Kaslik (USEK), P.O. Box 446, Jounieh, Lebanon




³ Laboratoire des Leptospires et d'Analyses Vétérinaires, VetAgro Sup, Université de Lyon, Marcy L'Etoile 69280, France

*Auteur correspondant

Keywords : Leptospirosis, water voles, maintenance hosts, reservoir, diagnosis, epidemiology.

Article

Identification of Pathogenic *Leptospira kirschneri* Serogroup Grippotyphosa in Water Voles (*Arvicola terrestris*) from Ruminant Pastures in Puy-de-Dôme, Central France

Elena Harran ^{1,2,*} , Adrien Pinot ¹, Angeli Kodjo ¹, Zouheira Djelouadji ¹, Marine Le Gudayer ³, Soro Sionfoungo Daouda ¹, Karine Groud ¹, Virginie Lattard ¹  and Florence Ayrat ^{1,3} 

¹ USC 1233-RS2GP, VetAgro Sup, Université de Lyon, 69280 Marcy L'Etoile, France

² Faculty of Arts and Sciences, Holy Spirit University of Kaslik (USEK), Jounieh P.O. Box 446, Lebanon

³ Laboratoire des Leptospires et d'Analyses Vétérinaires, VetAgro Sup, Université de Lyon, 69280 Marcy L'Etoile, France

* Correspondence: elena_harran@hotmail.com

Abstract: Rodents are the primary reservoirs for pathogenic *Leptospira* species, which cause leptospirosis. Among the key potential carriers are water voles, whose population outbreaks can consequently pose a major threat to human and animal health. We studied the prevalence, prominence, and epidemiology of pathogenic *Leptospira* species in water voles in central France. First, 46 voles were captured, and DNA was extracted from kidney, lung, liver, blood, and urine and tested for the presence of *Leptospira* using three molecular methods: PCR, O-antigen typing, and variable number tandem repeat (VNTR) typing. We also attempted to culture leptospire from kidney and urine samples. In addition, we investigated leptospiral antibodies in serum samples from 60 sheep using microscopic agglutination testing. These animals co-occurred with the voles, so we sought to assess their degree of exposure and involvement in pathogen dynamics. The overall prevalence of infection was 76.1% (CI_{95%} [61.2%, 87.4%]). The only strain found was *L. kirschneri* serogroup Grippotyphosa and a similar VNTR profile was acquired. Leptospire were successfully cultured from kidney and urine samples for four voles. Three sheep had low antibody titers against the *Leptospira* serogroup Grippotyphosa. Taken together, our results suggest the exclusive carriage of *L. kirschneri* serogroup Grippotyphosa among water voles in central France. Nevertheless, their ability to act as reservoir hosts that transmit the pathogen to co-occurring livestock remains unclear and merits further research.

Keywords: leptospirosis; water voles; maintenance hosts; reservoir; diagnosis; epidemiology



Citation: Harran, E.; Pinot, A.; Kodjo, A.; Djelouadji, Z.; Le Gudayer, M.; Sionfoungo Daouda, S.; Groud, K.; Lattard, V.; Ayrat, F. Identification of Pathogenic *Leptospira kirschneri* Serogroup Grippotyphosa in Water Voles (*Arvicola terrestris*) from Ruminant Pastures in Puy-de-Dôme, Central France. *Pathogens* **2023**, *12*, 260. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020260>

Academic Editor: Valentina Virginia Ebani

Received: 12 January 2023

Revised: 3 February 2023

Accepted: 4 February 2023

Published: 6 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Leptospirosis is considered to be the world's most widespread bacterial zoonosis and is responsible for 1.03 million cases of illness and 60,000 deaths annually [1,2]. The clinical manifestations of the disease depend on the host. For example, infections may be asymptomatic and highly persistent in rodents, lead to subclinical and chronic disease in domestic ruminants, or cause severe, potentially fatal illness in humans [2–6]. Transmission in humans and animals is mainly indirect, and incidence is higher in warm and humid climatic zones [7,8]. Global climate change is likely behind the recent increase in leptospirosis incidence and outbreaks [9,10], a trend that has been observed in the human population of mainland France since 2014 [11]. Awareness is thus growing that leptospirosis represents a significant threat to public health [12–14]. That said, little is known about many fundamental aspects of leptospirosis epidemiology, such as pathogen ecology and pathogen dynamics in wildlife hosts. Consequently, we have a limited understanding of disease drivers and effective prevention strategies.

The genus *Leptospira* currently comprises 68 species of highly diverse bacteria that form two clades—the pathogens and the saprophytes—that each, in turn, contain two subclades (P1 and P2 vs. S1 and S2); these groups differ in their virulence and genetic characteristics [15]. Among the pathogenic species, *L. interrogans*, *L. kirschneri*, and *L. borgpetersenii* predominate and circulate worldwide; *L. interrogans* is most commonly seen in individual cases of leptospirosis, while *L. kirschneri* is regularly associated with outbreaks in humans [5,16,17]. *Leptospira* species are categorized into serogroups that are further divided into serovars [18]. In epidemiological studies conducted in nature, it is essential to reliably characterize *Leptospira* serogroups via standardized laboratory tests [1] because there are strong associations between certain serogroups and hosts [5,19].

Pathogenic *Leptospira* species can infect all mammal species, but their dynamics and dissemination are host specific. For example, some mammals may act as maintenance hosts for particular serogroups, while others act as accidental hosts. In the latter group, the outcome of infection is either recovery or death. The pathogen does not naturally persist in accidental hosts; however, except in the case of humans, accidental hosts can contribute to ecosystem-level pathogen persistence if they co-occur with hosts of either type [20]. Conversely, maintenance hosts tend to be infected by particular serogroups that colonize the kidneys and are shed in the urine over long periods of time [21]. They may act as chronic selective carriers of particular *Leptospira* serogroups in a range of ecosystems and possibly transmit the pathogen to accidental hosts [1]. For example: brown rats (*Rattus norvegicus*) are thought to be selective carriers of the serogroup Icterohaemorrhagiae and cause accidental infections in humans [22,23]. Cattle (*Bos taurus*) are selective carriers of the serogroup Sejroe [24]; dogs (*Canis familiaris*) of the serogroup Canicola [25]; and swine (*Sus scrofa*) of the serogroups Australis and Pomona [5,26–28]. Although rats, cattle, dogs, and pigs might serve as maintenance hosts for other *Leptospira* serogroups, experimental research has yet to explore this question. Particular *Leptospira* serogroups persist within ecosystems thanks to specific host–pathogen relationships and ecological interactions, which means that ecosystems each possess their own set of maintenance mechanisms and levels of environmental contamination [20,29]. The hosts making the greatest contributions to these dynamics form the maintenance community and can end up infecting target species of concern [20,21]. Over the past 50 years, mainland France has witnessed dramatic shifts in land cover as a result of agricultural development, leading to decreased biodiversity [30]. In the current pasture ecosystems of central France, water voles (*Arvicola terrestris*) and domestic ruminants are the dominant fauna [31]. They co-occur and may share a number of epidemiological connections.

Outbreaks of water vole populations occur every 6 years on average, with densities peaking at 500–1000 individuals/hectare for 1–3 years [32,33]. If a vole population is headed toward an outbreak and is hosting a pathogenic *Leptospira* species, humans, livestock, and other animals in the same environment may be at risk [34]. Recently in Europe, the presence of *Leptospira* species has been reported in a variety of voles, such as common voles (*Microtus arvalis*), field voles (*Microtus agretis*), water voles (*Arvicola terrestris*), and bank voles (*Myodes glareolus*). These studies were mainly conducted in Germany and Spain and specifically identified *L. kirchneri*, *L. borgpetersenii*, and *L. interrogans* [35–38]. A handful of more detailed studies have been carried out on European water vole populations, including two in eastern France. One showed that water voles were carrying *Leptospira* species but did not identify any genetic profile [39]. The second found *L. kirschneri* to be the only species present [40]. However, research has yet to address the prevalence of *Leptospira* species in water voles in central France while also examining the voles' potential role in transmitting leptospires to hosts such as domestic ruminants. This issue is particularly important to address given the regular occurrence of vole outbreaks.

Our study's major aim was to investigate the potential role of water voles and sheep in *Leptospira* epidemiology in pasture ecosystems in central France. To this end, our specific objectives were as follows: (1) characterize *Leptospira* prevalence in vole populations during outbreaks; (2) determine whether leptospires were present in vole tissues to clarify

potential infection type (chronic vs. acute) and transmission pathways; (3) obtain complete genetic profiles, namely serogroup identity, and assess whether selective carriage could be occurring; and (4) ascertain whether water voles might transmit leptospire to co-occurring sheep.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement on Vole Sampling

The authors confirm that all the research described herein complied with national and institutional regulations related to the care and use of animals (APAFiS, no. 37713, project authorization no. 2238).

2.2. Provision of Sheep Blood Samples

Sheep blood samples collected for annual herd prophylaxis program were used in this study after obtaining owner consent.

2.3. Sampling Sites

We trapped water voles in three different livestock breeding sites over a single day in November 2021. The pastures were separated by 1.4 to 1.6 km and were located in the French administrative department of Puy-de-Dôme. This department is in central France and nearly 50% of its surface area (400,000 ha) is dedicated to agriculture, mainly in the form of grasslands [41]. Vole outbreaks are common in Puy-de-Dôme; population densities can exceed 500 voles/ha [42,43]. We selected these three study sites because they had large vole populations and displayed specific environmental characteristics, notably agricultural lands with crops organized into plot systems (Figure 1).

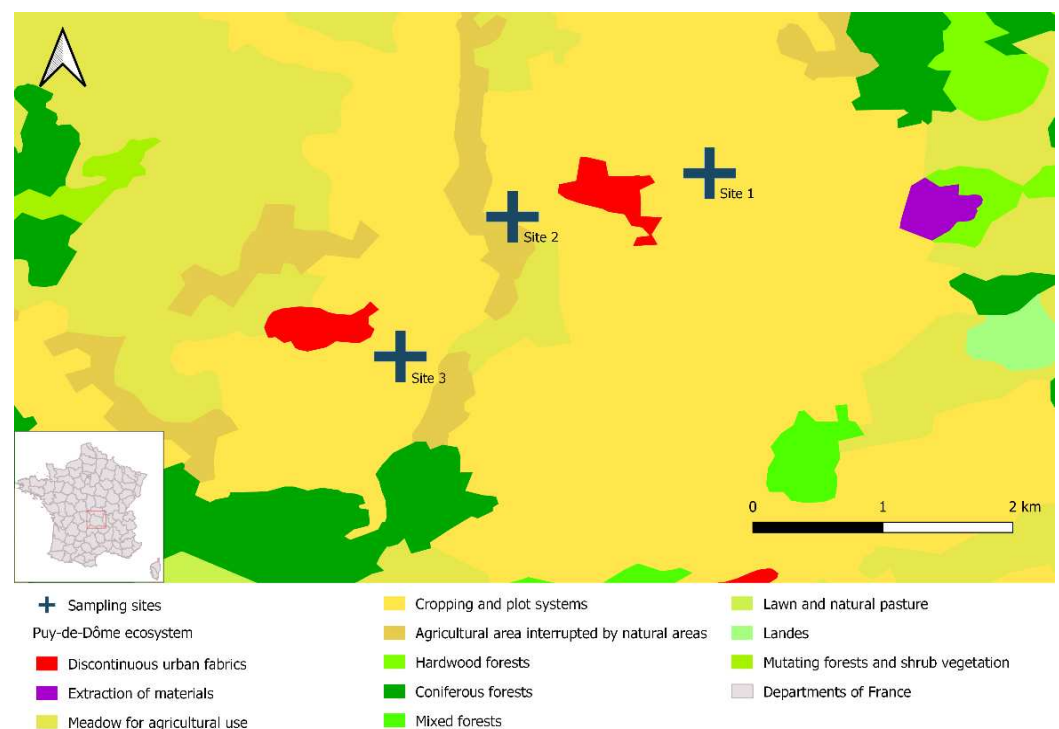


Figure 1. Location of the three study sites in Puy-de-Dôme, France. The map was created with DIVA-GIS (v. 7.5) and data from Corine Land Cover (2018 Edition, mainland France); it was designed with QGIS 3.16.1 Hannover.

2.4. Vole Trapping and Sampling

Voies were live captured using tube traps and lethally captured using Topcat traps. The 26 living voles were immediately anaesthetized using isoflurane and euthanized via

cardiac puncture and cervical dislocation. They were quickly dissected to take tissue samples, which were then stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 weeks, at which point the molecular analyses were conducted. These animals are hereafter referred to as the euthanized voles. Twenty voles were lethally captured. Their entire bodies were immediately frozen and then stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dissection and tissue sampling occurred 10 weeks later and were immediately preceded by a 24-h thawing period. These animals are hereafter referred to as the cold-stored voles. For each vole, we noted the following: sex (presence of genital tract = females, presence of testes/penis = male), length (body = from nose to anus and overall = from nose to tail), and state of sexual maturity (developed uterus for females, presence of seminal vesicles for males).

For both groups, dissection and tissue sampling took place as follows. Three sets of dissecting instruments were alternated during these processes. To prevent cross-contamination, the instruments were regularly cleaned and disinfected, notably between tissue sampling within animals and between dissections across animals. When possible, samples of kidney, lung, liver, blood, and urine were collected for each animal. Kidney and lung samples were obtained to evaluate evidence of renal colonization and pulmonary carriage, respectively; the latter has been described in rats [44]. Blood and liver samples were obtained to assess the occurrence of acute septicemic infection, and urine was obtained to evaluate the possibility of leptospire excretion. All the samples were stored individually in 2-mL Eppendorf tubes at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the molecular analyses could be carried out.

2.5. Sheep Sampling

Serological diagnosis is considered adequate to define *Leptospira*-status among sheep herds and determine circulating leptospiral antibodies (with antibodies persisting several months) by the World Organization for Animal Health (WOAH) [45]. At least 10% of the herd was sampled, in order to gather relevant data at the herd level as recommended by the WOAH [45].

Site 3 hosted a herd of nearly 200 sheep. Consequently, samples were taken from 2 batches of 30 sheep at 2 time points: 6 months after the grazing period and 6 months after the initial sampling period, which was 2 weeks immediately after the next grazing period.

2.6. Culturing *Leptospira* from Urine and Renal Tissue

We attempted to culture *Leptospira* bacteria from urine and kidney samples using Ellinghausen–McCullough–Johnson–Harris (EMJH) medium. First, EJMH and EJMH STAFF media were prepared under sterile conditions, as described elsewhere [46]. Briefly, a volume of 1 mL of urine was collected and a piece of fresh kidney tissue of about 1 cm^3 was crushed inside the tube of a sterile syringe of 5 mL using the plunger. A volume of 1 mL of both preparations was independently added to a first tube containing EJMH STAFF medium. The tubes were vortexed for a few seconds, yielding a 1/10 dilution. Next, 1 mL of the diluted solutions was transferred to a second set of tubes that contained EJMH medium. These tubes were vortexed for a few seconds, yielding a 1/100 dilution. The tubes were then incubated at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Over a two-month period, we regularly assessed the presence or potential growth of leptospira on the medium via dark-field microscopy (DFM) [47]. If no leptospira were observed during that period, culture was considered negative.

2.7. Extraction and Detection of *Leptospira* DNA

DNA was isolated from kidney, lung, liver, blood and urine using a DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and from successful cultures (containing at least 5×10^6 cells) using a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). In both cases, we followed the manufacturer's instructions. The quantitation of the β -actin endogenous housekeeping gene using real time PCR (RT-PCR) was used to assess the efficiency of DNA extraction and the absence of inhibitors for each sample and served as an internal control for the target gene expression [48]. RT-PCR targeting the 16S rRNA gene was performed using AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents (Applied Biosystems) and specific primers

previously described to detect for pathogenic *Leptospira* species [49]. The PCR conditions were as follows: 10 min at 95 °C as the denaturation step, and 40 cycles of (a) 15 s at 95 °C as the amplification step and (b) 1 min at 60 °C as the annealing step. Each run included a negative control (the PCR mix without the target DNA) and a positive control (DNA from the *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae ENVN strain). When a sample had a cycle threshold (C_T) that was equal to or less than 40, it was considered to be positive for *Leptospira*.

2.8. Genetic Characterization of *Leptospira*

2.8.1. Conventional PCR Targeting the 16S rDNA Gene

Samples found to be positive for *Leptospira* via RT-PCR were then subject to conventional PCR (cPCR) targeting the 16S rDNA gene, using specific primers described elsewhere [50]. We used a HotStarTaq DNA Polymerase Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and the following cPCR conditions: 15 min at 95 °C as the first denaturation step; 40 cycles of (a) 15 s at 95 °C for the second denaturation step, (b) 30 s at 57 °C as the annealing step, and (c) 1 min at 72 °C as the initial elongation step; and 10 min at 72 °C as the final elongation step. Each run included a negative control (the PCR mix without the target DNA) and a positive control (DNA from the *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae ENVN strain). The amplified products were verified utilizing electrophoresis on 1% agarose gel (30 min at 100 v). Under ultraviolet light (UV) conditions, the products' molecular weights were assessed via comparisons with a 100-bp ladder (Invitrogen) and the positive control. The products were then subject to Sanger sequencing (performed by Genoscreen, Lille, France). ChromasPro (v. 2.6.6) was used to assemble the sequences, creating contigs. We then identified the *Leptospira* species present using an NCBI Nucleotide BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, (accessed on 1 November 2022)).

2.8.2. Molecular Typing of *Leptospira* DNA Based on O-Antigen and Variable Number Tandem Repeat (VNTR) Methods

To identify the *Leptospira* strains present, we used two forms of molecular typing, one using O-antigen and one using VNTR. O-antigen typing was performed on positive samples ($C_T \leq 40$) obtained from renal tissue and successful cultures, using primers conceived in previous article [51]. The cPCR conditions were as follows: 15 min at 95 °C as the first denaturation step; 30 cycles of (a) 30 s at 94 °C as the second denaturation step, (b) 30 s at 60 °C, and (c) 1 min at 72 °C as the initial extension step; and 10 min at 72 °C as the final extension step. Each run included a negative and a positive control. The PCR mix without the target DNA was the negative control. DNA from the *L. kirschneri* serovar Grippotyphosa Moskva V strain and from the *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae ENVN strain were the positive controls; they allowed serogroup differentiation. The amplified products were verified utilizing electrophoresis on 1% agarose gel (30 min at 100 v). Under UV conditions, the products' molecular weights were assessed via comparisons with a 100-bp ladder (Invitrogen) and the positive control.

VNTR typing was performed on positive samples ($C_T < 35$) obtained from renal tissue and successful cultures. VNTR-4, VNTR-7, and VNTR-10 loci were amplified using primers described elsewhere [52]. The cPCR conditions were as follows: 15 min at 95 °C as the first denaturation step; 40 cycles of (a) 30 s at 95 °C as the second denaturation step, (b) 30 s at 54 °C (VNTR-4/VNTR-7) or 52 °C (VNTR-10) as the annealing step, (c) 1 min at 72 °C as the initial extension step; and 10 min at 72 °C as the final extension step. Each run included a negative control as well as VNTR-specific positive controls: there were 4 controls for VNTR-4 (copies 0-1-2-3), 2 controls for VNTR-7 (copies 1 and 2), and 4 controls for VNTR-10 (copies 4-7-11-12). The amplified products were verified utilizing electrophoresis on 1% agarose gel (30 min at 100 v). Under UV conditions, the products' molecular weights were assessed via comparisons with a 100-bp ladder (Invitrogen) and the positive controls. Band sizes were used to deduce the copy number of the repeats relative to each VNTR and, thus, establish a VNTR profile for each sample.

2.9. Microagglutination Testing

Microscopic agglutination test (MATs) were carried out on the sheep's blood samples using a panel of live isolated leptospire. We considered a series of 12 serogroups (and their associated serovars): Australis (Australis, Bratislava, Munchen), Autumnalis (Autumnalis, Bim), Ballum (Castellonis), Bataviae (Bataviae), Canicola (Canicola), Grippotyphosa (Grippotyphosa, Vanderhoedoni), Icterohaemorrhagiae (Icterohaemorrhagiae, Copenhageni), Panama (Panama, Mangus), Pomona (Pomona, Mozdok), Pyrogenes (Pyrogenes), Sejroe (Sejroe, Saxkoebing, Hardjo, Wolffi), and Tarassovi (Tarassovi) (Table S1). Leptospire agglutination was assessed using DFM. Any samples with an agglutination level of at least 50% were further diluted to establish the titer endpoint for each of the 22 serovars tested. A titer of 1:100 was used as the cut-off threshold for seropositivity, as per WOAH guidelines [45]. MAT results were analyzed at the serogroup level [53]. The putative serogroup responsible for an infection was identified when a titer was obtained against one or more serovars in a given serogroup or when the maximum titer against a given serogroup was at least three-fold higher than those against any other serogroups. We classified samples as displaying equal dominance when they reacted to two or more serogroups but there was less than a threefold difference in titers. In such instances, the result was deemed to be inconclusive; such is a frequent outcome given cross reactions.

2.10. Data Analysis

A vole was considered to be infected with *Leptospira* if at least one specimen was tested positive. The characteristics of infected and uninfected voles were compared using Rstudio (v. 1.3.1093, Apricot Nasturtium). An ANOVA (t.test function) was performed to evaluate the influence of length on infection status. A Chi-square test (chisq.test function) was used to assess the influences of sex, sexual maturity, category, and study site on infection status, including the estimate of *p*-value to consider small populations. The 95% confidence intervals for prevalence were calculated using the binom.test function.

3. Results

3.1. Vole Characteristics

Among the voles sampled, there were more females than males (56.5% [26/46] vs. 43.5% [20/46], respectively). Over half had reached sexual maturity (56.5% [26/46]). Their average body length (nose to anus) was 15 cm, and average overall length (nose to tail) was 20.5 cm. Vole characteristics differed among the three study sites (Figure 2).

Most voles displayed an absence of morphological abnormalities in their tissues. Just three euthanized voles were found to have liver cysts. Additional information is available in Table S2.

3.2. Vole Infection Status

3.2.1. Cultures

Leptospire were successfully cultured from the tissues ($n = 4$ kidney samples, $n = 1$ urine sample) of four euthanized voles.

3.2.2. Characteristics of Infected Voles

Based on the RT-PCR results for the kidney samples, infection status was unrelated to vole sex, sexual maturity status, or site of origin. However, euthanized voles were more likely than cold-stored voles to be infected; the same was true for voles with greater overall lengths (Table 1).

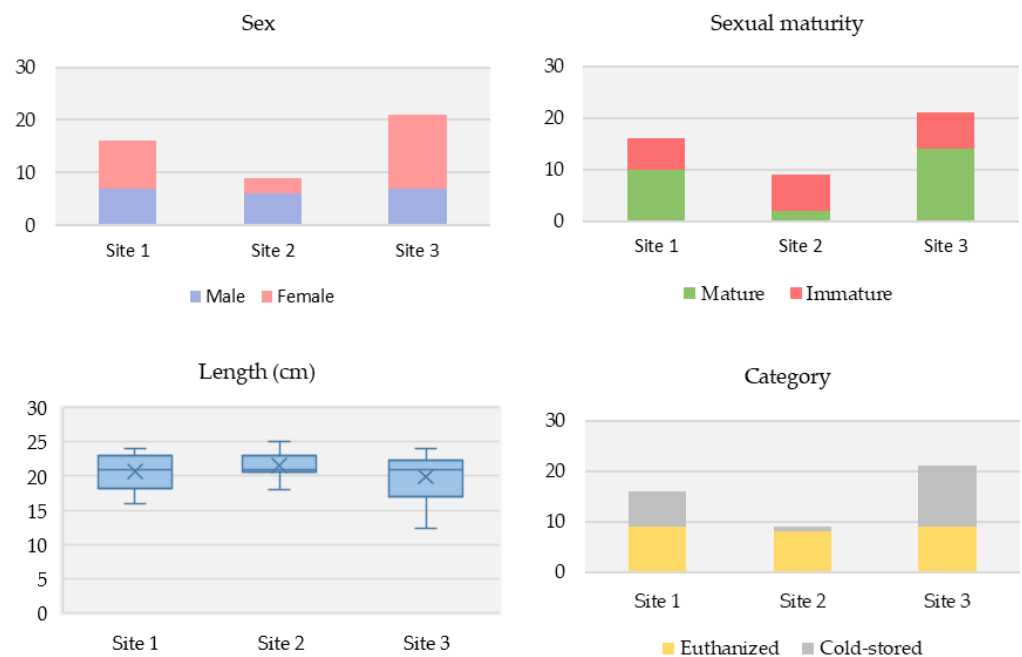


Figure 2. Differences in vole characteristics across the three Puy-de-Dôme study sites. (**Top left**): Sex. (**Top right**): Sexual maturity status. (**Bottom left**): Overall average length. (**Bottom right**): Sampling category.

Table 1. Relationship between infection status (positive vs. negative) and vole characteristics based on the RT-PCR results for kidney samples.

Characteristics	Subcategory	Total (%) (n = 46)	Positive (%) (n = 35)	Negative (%) (n = 11)	p-Value *
Sex	Male	20 (43.5)	15 (42.9)	5 (45.4)	1
	Female	26 (56.5)	20 (57.1)	6 (54.5)	
Sexual maturity	Mature	26 (56.5)	22 (62.9)	4 (36.4)	0.2
	Immature	20 (43.5)	13 (37.1)	7 (63.6)	
Sampling category	Euthanized	26 (56.5)	25 (71.4)	1 (9.1)	0.001
	Cold-stored	20 (43.5)	10 (28.6)	10 (90.9)	
Site	Site 1	16 (34.8)	15 (42.9)	1 (9.1)	-
	Site 2	9 (19.6)	8 (22.9)	1 (9.1)	1
	Site 3	21 (45.6)	12 (34.2)	9 (81.8)	0.3
Overall length (cm)	Median (Q1–Q3)	21 (18.25–22.6)	21 (19.5–22.8)	17 (16.5–21.8)	0.03

* determined using the most appropriate test (Chi-squared test or Anova exact test).

3.2.3. Detecting *Leptospira* Infection in Voles

Based on the RT-PCR results, 35 of the 46 voles were positive for *Leptospira* DNA, resulting in an overall prevalence of 76% (CI_{95%} [61%, 87%]). Although the differences were not statistically significant, prevalence tended to vary among the study site: site 1 had a prevalence of 93.7% (CI_{95%} [69.7%, 99.8%], n = 16); site 2 had a prevalence of 88.9% (CI_{95%} [51.7%, 99.7%], n = 9); and site 3 had a prevalence of 57.1% (CI_{95%} [34%, 78.2%], n = 21) (Figure 3).

All the voles that tested positive had positive kidney samples. In most cases, their other specimens (urine, lung, liver, and blood) also tested positive (Figure 4). Among the 25 positive euthanized voles, all but one had multiple infected specimens. Among the 10 positive cold-stored voles, infections were detected solely in the kidney specimens (9/10) or in both the kidney and urine specimens (1/10).

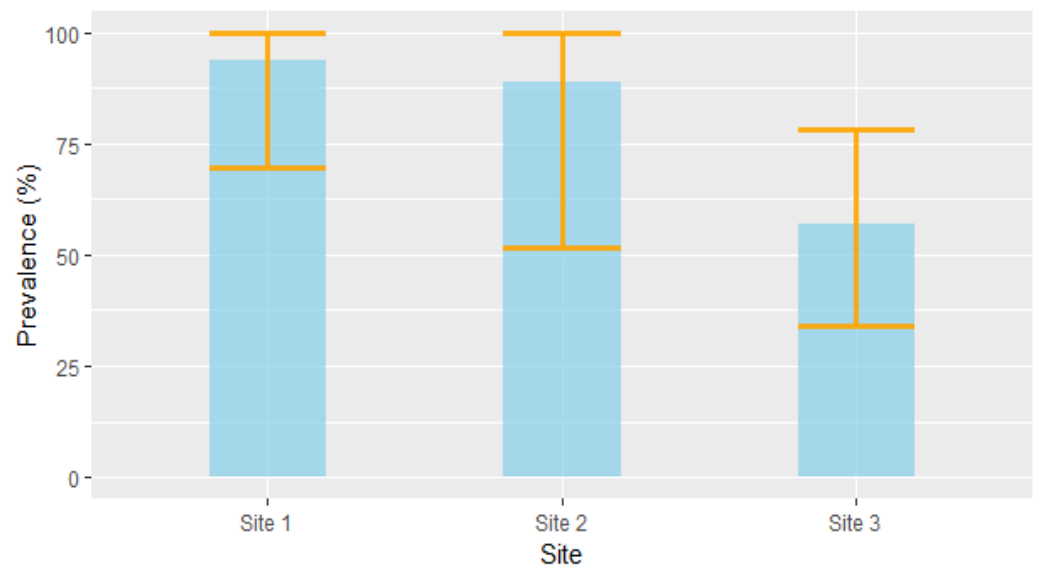


Figure 3. Prevalence (\pm CI_{95%}) of *Leptospira* infection in voles across the three study sites.

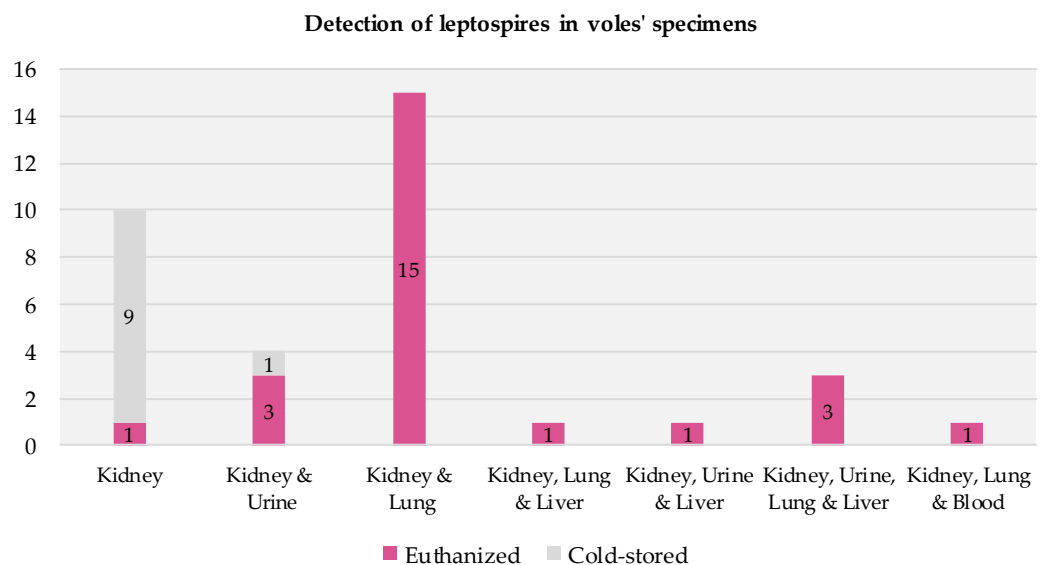


Figure 4. Presence of infection across specimens in voles testing positive for *Leptospira* via RT-PCR.

3.2.4. Molecular Typing of *Leptospira* Strains in Voles

We obtained the predicted 330-bp fragments when we conducted cPCR on *Leptospira* DNA obtained from the vole specimens (i.e., kidney, lung, liver, blood, and urine) and successful cultures that had tested positive via RT-PCR ($C_T \leq 40$); the positive controls confirmed result reliability [54]. In the BLAST search, all the sequences displayed high nucleotide affinity (97–100%) with *L. kirschneri* (GenBank accession number MK726123.1).

O-antigen typing was applied to DNA obtained from kidney samples ($n = 19$ samples) and successful cultures ($n = 4$) that had tested positive via RT-PCR ($C_T \leq 40$); the positive controls confirmed result reliability. Evidence was found for the presence of the *Leptospira* serogroup Grippotyphosa (GRIP) but not for the *Leptospira* serogroup Icterohaemorrhagiae (IH).

Two VNTR profiles were observed in the DNA obtained from the kidney samples. The 1-2-11 profile was complete and had 1 TR copy at the VNTR 4 locus, 2 TR copies at the VNTR 7 locus, and 11 TR copies at the VNTR 10 locus. The 1-2-X profile was incomplete and had 1 TR copy at the VNTR 4 locus, 2 TR copies at the VNTR 7 locus, and no observable amplification at the VNTR 10 locus. The first profile was seen in 9 of the 14 samples, and the second profile was seen in 5 of the 14 samples. The first VNTR profile was also seen

in all four of the DNA samples from the successful cultures. A summary of the molecular typing results for the DNA obtained from the kidney samples is provided in Table 2.

Table 2. Molecular results for *Leptospira* DNA extracted from renal tissue.

Voles	RT-PCR Positive	Presence of <i>L. kirschneri</i>	O-Antigen—GRIP	VNTR Profile 1-2-11	VNTR Profile 1-2-X
Nb/Nbt	35/46	35/35	19/35	9/14 [†]	5/14 [†]

Nb, number of voles testing positive; Nbt, total number of voles tested; RT-PCR, real time PCR; GRIP, Grippotyphosa; VNTR, variable number of tandem repeat; [†], positivity threshold: $C_T < 35$.

3.3. *Leptospira* Seroprevalence in Sheep

Microagglutination Testing

In the first sampling round, four sheep were seropositive (MAT titers $\geq 1:100$). Their reactions to the *Leptospira* serogroups were as follows: two reacted to IH (titer values = 1:100); one reacted to IH and GRIP (both titer values = 1:100); and one reacted to Sejroe (SJ) (titer value = 1:200).

In the second sampling round, two sheep were seropositive (MAT titers = 1:100), and both reacted to GRIP.

4. Discussion

This study shows the important and potential exclusive carriage of *L. kirschneri* serogroup Grippotyphosa in water vole populations across three Puy-de-Dôme pastures, as well as the seroconversion of sympatric sheep likely exposed to *Leptospira* serogroup Grippotyphosa following their grazing on site 3.

Leptospira infections in water voles

Across all three water vole populations, the prevalence of *Leptospira* infection was 76% (CI_{95%} [61%, 87%]). In infected animals, pathogenic *Leptospira* DNA was consistently found in the kidneys, which is unsurprising since these organs are frequently colonized by leptospires [1,55,56]. What is surprising is that this prevalence is markedly higher than that seen in *R. norvegicus* in France (26%, CI_{95%} [20%, 33%]) [57], an intriguing result because *R. norvegicus* is considered to be the primary reservoir host for the pathogen causing human leptospirosis [23]. Such findings underscore that *Leptospira* prevalence can be extremely high in water vole populations, which highlights the need to explore their role in the epidemiology of leptospirosis.

If anything, it seems likely that 76% was an underestimate given that 20 of the 46 voles making up our sample belonged to the cold-stored group, which was less likely than the euthanized group to test positive for infection. This pattern may stem from methodological differences. The euthanized voles immediately underwent dissection and tissue sampling, and the molecular analyses occurred after just four weeks of sample cold storage. In contrast, the cold-stored voles went about ten weeks before dissection and tissue sampling were conducted. DNA concentrations start to decline after such lengths of time [58] because freezing affects bacterial richness and abundance; consequently, the likelihood of detecting any *Leptospira* DNA probably fell [59–61]. In addition, compared to the euthanized voles, the cold-stored voles experienced one additional cycle of freezing/thawing prior to the molecular analyses. It is known that the number of freezing/thawing cycles can cause DNA degradation and reduce amplification success, leading to a higher probability of false negatives [62–64]. Finally, the thawing period experienced by the cold-stored voles could have allowed the intestinal microbiota to trickle through the permeable intestinal tissue. If leptospires were present, their concentrations could have been diluted by this other source of bacteria, reducing the detectability of *Leptospira* DNA. That said, no such phenomenon has ever been reported in the literature.

In past research, certain rodent characteristics have been associated with infection status. Indeed, females are at greater risk of *Leptospira* infections than are males [65–67]. Furthermore, sexually mature rodents have a higher probability than juveniles of acquiring

the pathogen because they can experience direct transmission during copulation and they spend more time exploring the outer environment [68]. Our study's small sample size ($n = 46$) might be inadequate for testing whether sex and sexual maturity influence infection status in water voles.

Evidence of chronic *Leptospira* infection in water voles

To better understand how water voles contribute to *Leptospira* epidemiology in pasture ecosystems, it is necessary to determine whether they experience acute or chronic infection. Indeed, if the infection is chronic and has a limited impact on host health, the bacteria could more easily be maintained in the kidneys and shed over prolonged periods of time, such as occurs in rats [22]. The tissue infection patterns we observed provide insight into this question. None of the voles we captured displayed morphological abnormalities (e.g., nephritis or hemorrhaging) that could be attributed to *Leptospira* [69,70]. At the same time, leptospires were clearly present in one or more of the voles' tissues. Out of the 35 infected voles, 14 had positive kidney or kidney and urine samples but negative lung, liver, and blood samples. Such results suggest that bacterial presence is long lasting and stable in the kidneys. This pattern is seen in chronic infections in rats: leptospires remain in the kidneys long after they have been cleared from other organs (~one week post infection) [71]. In the other infected voles, *Leptospira* was simultaneously present in multiple tissues. The latter was unlikely to be evidence of an acute infection because leptospires were absent from the blood in all but one case.

Potential modes of *Leptospira* transmission in water voles

To assess whether voles could shed *Leptospira* in their urine, it is necessary to evaluate whether leptospires in the urine are viable, which can be assessed by culturing bacteria from urine samples [72,73]. In the case of one infected animal (euthanized vole 10), we obtained a successful culture from both urine and kidney samples. This finding provides evidence of leptospire viability and suggests that the other voles with positive urine samples could have been shedding viable *Leptospira*. Overall, samples from 4 of the 26 euthanized voles gave rise to successful cultures, even though *Leptospira* bacteria are notoriously challenging to isolate because of their slow growth [74]. One reason that successful cultures were not obtained for the other infected voles could relate to pathogen concentrations. The greater the pathogen concentration in a sample, the lower the C_T value and the higher the probability of obtaining a successful culture [75,76]. Indeed, kidney and urine samples with C_T values exceeding 22 never resulted in successful cultures. These results indicate that culturing is a far less sensitive technique than is PCR, as highlighted by numerous studies [77,78].

Observations supporting selective *Leptospira* carriage by water voles

In our study, genotype related to serogroup GRIP was reported for most of the infected voles (except for those for which $C_T \geq 34$) through O-antigen typing, a finding that suggests selective carriage is occurring.

The VNTR results provide additional support for this idea. Nine of the 14 voles with low C_T values (≤ 28) were found to carry *Leptospira* with the same genetic profile: 1 TR copy at VNTR4; 2 TR copies at VNTR7; and 11 TR copies at VNTR10. Five voles with higher C_T values (range: 29.8–34.4) carried *Leptospira* with a similar but incomplete profile: 1 TR copy at VNTR4; 2 TR copies at VNTR7; and X TR copies at VNTR10. Voles are territorial and live in colonies whose members display restricted movements. Therefore, a given population is likely to maintain a given *Leptospira* strain. We hypothesize that the incomplete second profile is actually the same as the first. Our second profile is the same as an incomplete *L. kirschneri* profile obtained from voles in eastern France [40]; as such, it might also be identical to our complete genetic profile. These findings provide support for the notion that even voles in distant ecosystems selectively carry *Leptospira* with similar genetic profiles. The complete profile we obtained does not match up with any of the profiles described previously [52], which may suggest it is an unreported profile for the serogroup GRIP. Future research should use next-generation sequencing to completely characterize the

genomes of these strains. The results should reveal the regions that best differentiate the strains, allowing for easier identification.

Role of water voles in *Leptospira* epidemiology

O-antigen and VNTR typing both yielded support for the hypothesis that voles selectively carry and maintain *Leptospira* related to the serogroup GRIP. Thus, the pathogen is likely present in large concentrations in pasture soils. The MATs revealed that 3 of the 60 sheep tested had antibodies (titer = 1:100) against the serogroup GRIP, suggesting they had previously been infected by the latter serogroup. Previous research using MATs found similarly low antibody titers in sheep [79–81]. We might have expected higher seropositivity in the sheep given the markedly high pathogen prevalence in the water voles. Furthermore, Puy-de-Dôme experiences climatic conditions (e.g., regular rainfall and stable relative humidity) that should promote the survival of any leptospires present in diluted animal urine [82,83]. However, it may be that sheep rarely come in contact with water vole urine. In grasslands, most voles remain underground in burrows that are permanently sealed, although they may occasionally open up during dry periods; as a result, the animals rarely come up to the soil surface [84]. It is also possible that sheep display a low rate of seroconversion following infection [5]. Consequently, the frequency of transmission between water voles and sheep remains unclear, as does the degree to which sheep may be accidental hosts. Beyond understanding that water voles are maintenance hosts for *L. kirschneri* serogroup GRIP, we know little about the role played by these rodents in leptospirosis epidemiology.

Studying the water vole's predators could be instructive. Research in mainland France characterized the *Leptospira* bacteria behind renal infections in various wildlife species and discovered that genetic profile diversity was greater in species that prey upon rodents [85]. Notably, *L. kirschneri* serogroup GRIP was detected in certain mustelids, while foxes (*Vulpes vulpes*) tended to harbor *L. interrogans*. In contrast, no wolves (*Canis lupus*) were found to be infected. Furthermore, other studies found that canines were seropositive for the serogroup GRIP in France [86], as were wolves in Italy [87]. It is evident that further research is needed to clarify how the water vole's predators might contribute to *Leptospira* transmission.

Over recent years, several leptospirosis outbreaks in human populations in France have been linked to *L. kirschneri* associated to the serogroup GRIP [14,88]. In addition, these same *Leptospira* strain have been found to cause accidental infections in domestic animals [89–91]. To date, a single study has sought to characterize the genetic profiles of pathogenic *Leptospira* serogroups in wild mammals in France: none of the animal species tested appeared to be a maintenance host for the serogroup GRIP [85]. Consequently, none of them seem to be responsible for cases of leptospirosis provoked by this *Leptospira* serogroup. Given that our results strongly support the water vole's role as a maintenance host of *L. kirschneri* serogroups GRIP, they can inform future work tracking the sources of *Leptospira* infections in humans and domestic animals.

5. Conclusions

This study found a high prevalence of *Leptospira* infection in water vole populations in central France. Across infections and sites, a single profile emerged: *L. kirschneri* serogroup GRIP. This finding suggests that water voles selectively carry this *Leptospira* strain, an idea supported by results from RT-PCR, cPCR, O-antigen typing, and VNTR typing. At the same time, the water vole's contribution to infections in domestic animals remains undetermined given the low seroprevalence observed in sheep co-occurring in the same habitat. It is important to take this research further because the water vole is the first species to be identified as a selective carrier of *L. kirschneri* serogroup GRIP. To clarify the epidemiology of leptospirosis in France, additional studies should be conducted on voles as well as on the wild and domestic animals that share the same habitat.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens12020260/s1>—Table S1: List of the reference strains employed in the MAT antigen panel; Table S2: Vole characteristics across the study sites and the RT-PCR results; and Table S3: Antibody titers against different *Leptospira* serovars in sheep.

Author Contributions: Writing—original draft preparation, E.H.; methodology, E.H., A.P., M.L.G., K.G., V.L. and F.A.; formal analysis, E.H.; conceptualization, E.H., A.P., V.L. and F.A.; resources, A.K., V.L. and F.A.; writing—review and editing, F.A.; supervision, F.A.; validation: E.H., A.P., A.K., Z.D., M.L.G., S.S.D., K.G., V.L. and F.A.; project administration, F.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by E.H. PhD grants from AUF, USEK, and CNRS-L as well as by SAARA (réseau Santé Animale Auvergne Rhône Alpes) 2021 project funds and the Pôle EVAAS (Pôle Expertise Vétérinaire et Agronomique Animaux Sauvages) project 1.3.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are provided in the main text and the Supplementary Materials.

Acknowledgments: We thank Patrice Sage and Richard Randanne for their help with sheep sampling; Ambre Fafournoux for aiding with vole sampling in the field and for providing technical support; and Marta Garcia Lopez for furnishing technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Levett, P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, *14*, 296–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Costa, F.; Hagan, J.E.; Calcagno, J.; Kane, M.; Torgerson, P.; Martinez-Silveira, M.S.; Stein, C.; Abela-Ridder, B.; Ko, A.I. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003898. [[CrossRef](#)]
- Bharti, A.R.; Nally, J.E.; Ricaldi, J.N.; Matthias, M.A.; Diaz, M.M.; Lovett, M.A.; Levett, P.N.; Gilman, R.H.; Willig, M.R.; Gotuzzo, E.; et al. Leptospirosis: A Zoonotic Disease of Global Importance. *Lancet Infect. Dis.* **2003**, *3*, 757–771. [[CrossRef](#)]
- Zaki, S.R.; Shieh, W.-J.; Epidemic Working Group at Ministry of Health in Nicaragua; Pan American Health Organisation; US Department of Agriculture; Centers for Disease Control and Prevention. Leptospirosis Associated with Outbreak of Acute Febrile Illness and Pulmonary Haemorrhage, Nicaragua, 1995. *Lancet* **1996**, *347*, 535–536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ellis, W.A. Animal Leptospirosis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2015**, *387*, 99–137.
- Boey, K.; Shiokawa, K.; Rajeev, S. Leptospira Infection in Rats: A Literature Review of Global Prevalence and Distribution. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Meerburg, B.G.; Singleton, G.R.; Kijlstra, A. Rodent-Borne Diseases and Their Risks for Public Health. *Crit. Rev. Microbiol.* **2009**, *35*, 221–270. [[CrossRef](#)]
- Yatbantoong, N.; Chaiyarat, R. Factors Associated with Leptospirosis in Domestic Cattle in Salakphra Wildlife Sanctuary, Thailand. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 1042. [[CrossRef](#)]
- Joshi, Y.P.; Kim, E.-H.; Cheong, H.-K. The Influence of Climatic Factors on the Development of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome and Leptospirosis during the Peak Season in Korea: An Ecologic Study. *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lau, C.L.; Smythe, L.D.; Craig, S.B.; Weinstein, P. Climate Change, Flooding, Urbanisation and Leptospirosis: Fuelling the Fire? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *104*, 631–638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bourhy, P.; Picardeau, M.; Septfonds, A.; Trombert, S.; Cart-tanneur, E. Émergence de La Leptospirose Humaine En France Métropolitaine? Actualités Sur La Surveillance. *Médecine Mal. Infect.* **2017**, *47*, S150. [[CrossRef](#)]
- Perra, A.; Servas, V.; Terrier, G.; Postic, D.; Baranton, G.; André-Fontaine, G.; Vaillant, V.; Capek, I. Clustered Cases of Leptospirosis in Rochefort, France, June 2001. *Eurosurveill* **2002**, *7*, 131–136. [[CrossRef](#)]
- Nardone, A.; Capek, I.; Baranton, G.; Campèse, C.; Postic, D.; Vaillant, V.; Liénard, M.; Desenclos, J.C. Risk Factors for Leptospirosis in Metropolitan France: Results of a National Case-Control Study, 1999–2000. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2004**, *39*, 423272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Guillois, Y.; Bourhy, P.; Ayral, F.; Pivette, M.; Decors, A.; Aranda Grau, J.H.; Champenois, B.; Malhère, C.; Combes, B.; Richomme, C.; et al. An Outbreak of Leptospirosis among Kayakers in Brittany, North-West France, 2016. *Eurosurveill* **2018**, *23*, 1700848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Arent, Z.; Pardyak, L.; Dubniewicz, K.; Plachno, B.; Kotula-Balak, M. Leptospira Taxonomy: Then and Now. *Med. Weter* **2022**, *78*, 489–496. [[CrossRef](#)]
- Picardeau, M. Virulence of the Zoonotic Agent of Leptospirosis: Still Terra Incognita? *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 297–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Philip, N.; Affendy, N.B.; Ramli, S.N.A.; Arif, M.; Raja, P.; Nagandran, E.; Renganathan, P.; Taib, N.M.; Masri, S.N.; Yuhana, M.Y.; et al. *Leptospira Interrogans* and *Leptospira Kirschneri* Are the Dominant *Leptospira* Species Causing Human Leptospirosis in Central Malaysia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, 8197. [[CrossRef](#)]
18. Kmety, E.; Dikken, H. *Classification of the Species Leptospira Interrogans and History of Its Serovars*; University Press: Groningen, The Netherlands, 1993.
19. Tsujimoto, M.; Kajikawa, Y.; Tomita, J.; Matsumoto, Y. A Review of the Ecosystem Concept—Towards Coherent Ecosystem Design. *Technol. Forecast. Soc. Change* **2018**, *136*, 49–58. [[CrossRef](#)]
20. Roberts, M.G.; Heesterbeek, J.A.P. Characterizing Reservoirs of Infection and the Maintenance of Pathogens in Ecosystems. *J. R. Soc. Interface* **2020**, *17*, 20190540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Viana, M.; Mancy, R.; Biek, R.; Cleaveland, S.; Cross, P.C.; Lloyd-Smith, J.O.; Haydon, D.T. Assembling Evidence for Identifying Reservoirs of Infection. *Trends Ecol. Evol.* **2014**, *29*, 270–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Thiermann, A.B. The Norway Rat as a Selective Chronic Carrier of *Leptospira Icterohaemorrhagiae*. *J. Wildl. Dis.* **1981**, *17*, 39–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Haake, D.A.; Levett, P.N. Leptospirosis in Humans. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2015**, *387*, 65–97. [[PubMed](#)]
24. Thiermann, A.B. Experimental Leptospirosis Infections in Pregnant Cattle with Organisms of the Hebdomadis Serogroup. *Am. J. Vet. Res.* **1982**, *43*, 780–784.
25. Schuller, S.; Francey, T.; Hartmann, K.; Hugonnard, M.; Kohn, B.; Nally, J.E.; Sykes, J. European Consensus Statement on Leptospirosis in Dogs and Cats. *J. Small Anim. Pract.* **2015**, *56*, 159–179. [[CrossRef](#)]
26. Ellis, W.A.; Straw, B.E.; D’Allaire, S.; Mengeling, W.L.; Taylor, D.J. *Diseases of Swine*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2012.
27. Bertasio, C.; Papetti, A.; Scaltriti, E.; Tagliabue, S.; D’Incau, M.; Boniotti, M.B. Serological Survey and Molecular Typing Reveal New *Leptospira* Serogroup Pomona Strains among Pigs of Northern Italy. *Pathogens* **2020**, *9*, 332. [[CrossRef](#)]
28. Cilia, G.; Bertelloni, F.; Piredda, I.; Ponti, M.N.; Turchi, B.; Cantile, C.; Parisi, F.; Pinzauti, P.; Armani, A.; Palmas, B. Presence of Pathogenic *Leptospira* Spp. in the Reproductive System and Fetuses of Wild Boars (*Sus Scrofa*) in Italy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008982. [[CrossRef](#)]
29. Jacquot, M.; Abrial, D.; Gasqui, P.; Bord, S.; Marsot, M.; Masseglia, S.; Pion, A.; Poux, V.; Zilliox, L.; Chapuis, J.-L.; et al. Multiple Independent Transmission Cycles of a Tick-Borne Pathogen within a Local Host Community. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Newbold, T.; Hudson, L.N.; Arnell, A.P.; Contu, S.; De Palma, A.; Ferrier, S.; Hill, S.L.; Hoskins, A.J.; Lysenko, I.; Phillips, H.R. Has Land Use Pushed Terrestrial Biodiversity beyond the Planetary Boundary? A Global Assessment. *Science* **2016**, *353*, 288–291. [[CrossRef](#)]
31. Fichet-Calvet, E.; Pradier, B.; Quéré, J.-P.; Giraudoux, P.; Delattre, P. Landscape Composition and Vole Outbreaks: Evidence from an Eight Year Study of *Arvicola Terrestris*. *Ecography* **2000**, *23*, 659–668. [[CrossRef](#)]
32. Delattre, P.; Giraudoux, P.; Baudry, J.; Musard, P.; Toussaint, M.; Truchetet, D.; Stahl, P.; Poule, M.L.; Artois, M.; Damange, J.-P.; et al. Land Use Patterns and Types of Common Vole (*Microtus Arvalis*) Population Kinetics. *Agric. Ecosyst. Environ.* **1992**, *39*, 153–168. [[CrossRef](#)]
33. Giraudoux, P.; Delattre, P.; Habert, M.; Quéré, J.P.; Deblay, S.; Defaut, R.; Duhamel, R.; Moissenet, M.F.; Salvi, D.; Truchetet, D. Population Dynamics of Fossorial Water Vole (*Arvicola Terrestris* Scherman): A Land Use and Landscape Perspective. *Agric. Ecosyst. Environ.* **1997**, *66*, 47–60. [[CrossRef](#)]
34. Johnsen, K.; Devineau, O.; Andreassen, H.P. Phase- and Season-Dependent Changes in Social Behaviour in Cyclic Vole Populations. *BMC Ecol.* **2019**, *19*, 5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mayer-Scholl, A.; Hammerl, J.A.; Schmidt, S.; Ulrich, R.G.; Pfeffer, M.; Woll, D.; Scholz, H.C.; Thomas, A.; Nöckler, K. *Leptospira* spp. in Rodents and Shrews in Germany. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2014**, *11*, 7562–7574. [[CrossRef](#)]
36. Jeske, K.; Emirhar, D.; García, J.T.; González-Barrio, D.; Olea, P.P.; Fons, F.R.; Schulz, J.; Mayer-Scholl, A.; Heckel, G.; Ulrich, R.G. Frequent *Leptospira* spp. Detection but Absence of Tula Orthohantavirus in *Microtus* Spp. Voles, Northwestern Spain. *J. Wildl. Dis.* **2021**, *57*, 733–742. [[CrossRef](#)]
37. Fischer, S.; Mayer-Scholl, A.; Imholt, C.; Spierling, N.G.; Heuser, E.; Schmidt, S.; Reil, D.; Rosenfeld, U.M.; Jacob, J.; Nöckler, K. *Leptospira* Genomespecies and Sequence Type Prevalence in Small Mammal Populations in Germany. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2018**, *18*, 188–199. [[CrossRef](#)]
38. Obiegala, A.; Albrecht, C.; Dafalla, M.; Drewes, S.; Oltersdorf, C.; Turni, H.; Imholt, C.; Jacob, J.; Wagner-Wiening, C.; Ulrich, R.G. *Leptospira* spp. in Small Mammals from Areas with Low and High Human Hantavirus Incidences in South-West Germany. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 312–318. [[CrossRef](#)]
39. Villette, P.; Afonso, E.; Couval, G.; Levret, A.; Galan, M.; Tatar, C.; Cosson, J.F.; Giraudoux, P. Consequences of Organ Choice in Describing Bacterial Pathogen Assemblages in a Rodent Population. *Epidemiol. Infect.* **2017**, *145*, 3070–3075. [[CrossRef](#)]
40. Marquez, A. Gestion de Populations de Rongeurs Dans Un Contexte Leptospirosique. PhD Thesis, Université de Lyon, Lyon, France, 2019.
41. Auzias, D.; Labourdette, J.-P. AUVERGNE. Petit Futé: Paris, France; Volume 2017, ISBN 979-10-331-5942-1.
42. Meillour, N.-L.; Descamps, A.; Le Danvic, C.; Grandmougin, M.; Saliou, J.-M.; Klopp, C.; Milhes, M.; Bompard, C.; Chesneau, D.; Poissenot, K. Identification of Potential Chemosignals in the European Water Vole *Arvicola Terrestris*. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18378. [[CrossRef](#)]

43. Truchetet, D.; Couval, G.; Michelin, Y.; Giraudoux, P. Exploring the Factors That Affect Water Vole (*Arvicola Terrestris*) Outbreaks in Grasslands. *Fourrages* **2014**, *220*, 279–284.
44. Zilber, A.-L.; Belli, P.; Artois, M.; Kodjo, A.; Djelouadji, Z. First Observation of *Leptospira Interrogans* in the Lungs of *Rattus Norvegicus*. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 9656274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. World Organization of Animal Health—OIE. Chapter 3.1.12. Leptospirosis. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*; World Organization of Animal Health: Paris, France, 2021.
46. Chakraborty, A.; Miyahara, S.; Villanueva, S.Y.; Saito, M.; Gloriani, N.G.; Yoshida, S. A Novel Combination of Selective Agents for Isolation of *Leptospira* Species. *Microbiol. Immunol.* **2011**, *55*, 494–501. [[CrossRef](#)]
47. Picardeau, M. Diagnosis and Epidemiology of Leptospirosis. *Med. Mal. Infect.* **2013**, *43*, 1–9. [[CrossRef](#)]
48. Toussaint, J.F.; Sailleau, C.; Breard, E.; Zientara, S.; De Clercq, K. Bluetongue Virus Detection by Two Real-Time RT-QPCRs Targeting Two Different Genomic Segments. *J. Virol. Methods* **2007**, *140*, 115–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Waggoner, J.J.; Balassiano, I.; Abeynayake, J.; Sahoo, M.K.; Mohamed-Hadley, A.; Liu, Y.; Vital-Brazil, J.M.; Pinsky, B.A. Sensitive Real-Time PCR Detection of Pathogenic *Leptospira* Spp. and a Comparison of Nucleic Acid Amplification Methods for the Diagnosis of Leptospirosis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e112356. [[CrossRef](#)]
50. Merien, F.; Amouriaux, P.; Perolat, P.; Baranton, G.; Saint Girons, I. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* spp. in Clinical Samples. *J. Clin. Microbiol.* **1992**, *30*, 2219–2224. [[CrossRef](#)]
51. Cai, C.-S.; Zhu, Y.-Z.; Zhong, Y.; Xin, X.-F.; Jiang, X.-G.; Lou, X.-L.; He, P.; Qin, J.-H.; Zhao, G.-P.; Wang, S.-Y.; et al. Development of O-Antigen Gene Cluster-Specific PCRs for Rapid Typing Six Epidemic Serogroups of *Leptospira* in China. *BMC Microbiol.* **2010**, *10*, 67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Murray, C.K.; Gray, M.R.; Mende, K.; Parker, T.M.; Samir, A.; Rahman, B.A.; Habashy, E.E.; Hospenthal, D.R.; Pimentel, G. Use of Patient-Specific *Leptospira* Isolates in the Diagnosis of Leptospirosis Employing Microscopic Agglutination Testing (MAT). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *105*, 209–213. [[CrossRef](#)]
54. Scarcelli, E.; Piatti, R.M.; Fedullo, J.D.L.; Simon, F.; Cardoso, M.V.; Castro, V.; Miyashiro, S.; Genovez, M.É. *Leptospira* spp. Detection by Polymerase Chain Reaction (PCR) in Clinical Samples of Captive Black-Capped Capuchin Monkey (*Cebus Apella*). *Braz. J. Microbiol.* **2003**, *34*, 143–146. [[CrossRef](#)]
55. Agudelo-Flórez, P.; Murillo, V.E.; Londoño, A.F.; Rodas, J.D. Histopathological Kidney Alterations in Rats Naturally Infected with *Leptospira*. *Biomédica* **2013**, *33*, 82–88.
56. Hartskeerl, R.A.; Terpstra, W.J. Leptospirosis in Wild Animals. *Vet. Q.* **1996**, *18* (Suppl. S3), S149–S150. [[CrossRef](#)]
57. AYRAL, F.; ARTOIS, J.; ZILBER, A.-L.; WIDÉN, F.; POUNDER, K.C.; AUBERT, D.; BICOUT, D.J.; ARTOIS, M. The Relationship between Socioeconomic Indices and Potentially Zoonotic Pathogens Carried by Wild Norway Rats: A Survey in Rhône, France (2010–2012). *Epidemiol. Infect.* **2015**, *143*, 586–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Romanazzi, V.; Traversi, D.; Lorenzi, E.; Gilli, G. Effects of Freezing Storage on the DNA Extraction and Microbial Evaluation from Anaerobic Digested Sludges. *BMC Res. Notes* **2015**, *8*, 420. [[CrossRef](#)]
59. Bahl, M.I.; Bergström, A.; Licht, T.R. Freezing Fecal Samples Prior to DNA Extraction Affects the Firmicutes to Bacteroidetes Ratio Determined by Downstream Quantitative PCR Analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **2012**, *329*, 193–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Kwambana, B.A.; Mohammed, N.I.; Jeffries, D.; Barer, M.; Adegbola, R.A.; Antonio, M. Differential Effects of Frozen Storage on the Molecular Detection of Bacterial Taxa That Inhabit the Nasopharynx. *BMC Clin. Pathol.* **2011**, *11*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Metzler-Zebeli, B.U.; Lawlor, P.G.; Magowan, E.; Zebeli, Q. Effect of Freezing Conditions on Fecal Bacterial Composition in Pigs. *Animals* **2016**, *6*, 18. [[CrossRef](#)]
62. Cameron, C.E.; Zuerner, R.L.; Raverty, S.; Colegrove, K.M.; Norman, S.A.; Lambourn, D.M.; Jeffries, S.J.; Gulland, F.M. Detection of Pathogenic *Leptospira* Bacteria in Pinniped Populations via PCR and Identification of a Source of Transmission for Zoonotic Leptospirosis in the Marine Environment. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 1728–1733. [[CrossRef](#)]
63. Lucchesi, P.; Arroyo, G.H.; Etcheverría, A.I.; Parma, A.E.; Seijo, A.C. Recommendations for the Detection of *Leptospira* in Urine by PCR. *Rev. Da Soc. Bras. De Med. Trop.* **2004**, *37*, 131–134. [[CrossRef](#)]
64. Shao, W.; Khin, S.; Kopp, W.C. Characterization of Effect of Repeated Freeze and Thaw Cycles on Stability of Genomic DNA Using Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Biopreserv. Biobank.* **2012**, *10*, 4–11. [[CrossRef](#)]
65. Easterbrook, J.D.; Kaplan, J.B.; Vanasco, N.B.; Reeves, W.K.; Purcell, R.H.; Kosoy, M.Y.; Glass, G.E.; Watson, J.; Klein, S.L. A Survey of Zoonotic Pathogens Carried by Norway Rats in Baltimore, Maryland, USA. *Epidemiol. Infect.* **2007**, *135*, 1192–1199. [[CrossRef](#)]
66. Costa, F.; Porter, F.H.; Rodrigues, G.; Farias, H.; de Faria, M.T.; Wunder, E.A.; Osikowicz, L.M.; Kosoy, M.Y.; Reis, M.G.; Ko, A.I.; et al. Infections by *Leptospira Interrogans*, Seoul Virus, and *Bartonella* Spp. Among Norway Rats (*Rattus Norvegicus*) from the Urban Slum Environment in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2014**, *14*, 33–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Krijger, I.M.; Ahmed, A.A.A.; Goris, M.G.A.; Groot Koerkamp, P.W.G.; Meerburg, B.G. Prevalence of *Leptospira* Infection in Rodents from Bangladesh. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 2113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Minter, A.; Diggle, P.J.; Costa, F.; Childs, J.; Ko, A.I.; Begon, M. Evidence of Multiple Intraspecific Transmission Routes for *Leptospira* Acquisition in Norway Rats (*Rattus Norvegicus*). *Epidemiol. Infect.* **2017**, *145*, 3438–3448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Tucunduva de Faria, M.; Athanazio, D.A.; Gonçalves Ramos, E.A.; Silva, E.F.; Reis, M.G.; Ko, A.I. Morphological Alterations in the Kidney of Rats with Natural and Experimental *Leptospira* Infection. *J. Comp. Pathol.* **2007**, *137*, 231–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

70. Miller, N.G.; Allen, J.E.; Wilson, R.B. The Pathogenesis of Hemorrhage in the Lung of the Hamster during Acute Leptospirosis. *Med. Microbiol. Immunol.* **1974**, *160*, 269–278. [[CrossRef](#)]
71. Athanazio, D.A.; Silva, E.F.; Santos, C.S.; Rocha, G.M.; Vannier-Santos, M.A.; McBride, A.J.; Ko, A.I.; Reis, M.G. Rattus Norvegicus as a Model for Persistent Renal Colonization by Pathogenic *Leptospira* Interrogans. *Acta Trop.* **2008**, *105*, 176–180. [[CrossRef](#)]
72. Mori, M.; Bourhy, P.; Le Guyader, M.; Van Esbroeck, M.; Djelouadji, Z.; Septfons, A.; Kodjo, A.; Picardeau, M. Pet Rodents as Possible Risk for Leptospirosis, Belgium and France, 2009 to 2016. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, 16–00792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Goy-Thollot, I.; Djelouadji, Z.; Nennig, M.; Hazart, G.; Hugonnard, M. Screening for *Leptospira* DNA in Blood and Urine from 30 Apparently Healthy Dogs. *Rev. Vet. Clin.* **2018**, *53*, 79–86. [[CrossRef](#)]
74. Benacer, D.; Zain, S.N.M.; Amran, F.; Galloway, R.L.; Thong, K.L. Isolation and Molecular Characterization of *Leptospira* Interrogans and *Leptospira* Borgpetersenii Isolates from the Urban Rat Populations of Kuala Lumpur, Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2013**, *88*, 704–709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Public Health Ontario. *An Overview of Cycle Threshold Values and Their Role in SARS-CoV-2 Real-Time PCR Test Interpretation*; Queen's Printer for Ontario: Toronto, ON, Canada, 2020; pp. 1–14.
76. Waggoner, J.J.; Balassiano, I.; Mohamed-Hadley, A.; Vital-Brazil, J.M.; Sahoo, M.K.; Pinsky, B.A. Reverse-Transcriptase PCR Detection of *Leptospira*: Absence of Agreement with Single-Specimen Microscopic Agglutination Testing. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0132988. [[CrossRef](#)]
77. Wagenaar, J.; Zuerner, R.L.; Alt, D.; Bolin, C.A. Comparison of Polymerase Chain Reaction Assays with Bacteriologic Culture, Immunofluorescence, and Nucleic Acid Hybridization for Detection of *Leptospira* Borgpetersenii Serovar Hardjo in Urine of Cattle. *Am. J. Vet. Res.* **2000**, *61*, 316–320. [[CrossRef](#)]
78. Fornazari, F.; da Silva, R.C.; Richini-Pereira, V.B.; Beserra, H.E.O.; Luvizotto, M.C.R.; Langoni, H. Comparison of Conventional PCR, Quantitative PCR, Bacteriological Culture and the Warthin Starry Technique to Detect *Leptospira* spp. in Kidney and Liver Samples from Naturally Infected Sheep from Brazil. *J. Microbiol. Methods* **2012**, *90*, 321–326. [[CrossRef](#)]
79. Campos, Â.P.; Miranda, D.F.H.; Rodrigues, H.W.S.; da Silva Carneiro Lustosa, M.; Martins, G.H.C.; Mineiro, A.L.B.B.; Castro, V.; Azevedo, S.S.; de Sousa Silva, S.M.M. Seroprevalence and Risk Factors for Leptospirosis in Cattle, Sheep, and Goats at Consorted Rearing from the State of Piauí, Northeastern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* **2017**, *49*, 899–907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. da Costa, D.F.; da Silva, A.F.; de Brasil, A.W.L.; Loureiro, A.P.P.; dos Santos, F.A.; de Azevedo, S.S.; Lilenbaum, W.; Alves, C.J. Leptospirosis in Native Mixed-Breed Sheep Slaughtered in a Semiarid Region of Brazil. *Ciência Rural* **2016**, *47*. [[CrossRef](#)]
81. Amorim, R.M.; Nascimento, E.M.; Santarosa, B.P.; Dantas, G.N.; Ferreira, D.O.L.; Gonçalves, R.C.; Ullmann, L.S.; Langoni, H. Soroprevalência Da Leptospirase Em Ovinos Da Região Centrooeste Do Estado De São Paulo. *Veterinária E Zootec.* **2016**, *23*, 297–305.
82. Bellocchi, G.; Martin, R.; Shtiliyanova, A.; Touhami, H.B.; Carrère, P. Vul' Clim–Climate Change Vulnerability Studies in the Region Auvergne (France). FACCE MACSUR Mid-term Scientific Conference, "Achievements, Activities, Advancement", Sassari, Italy, 1–4 April 2014.
83. Nau, L.H.; Obiegala, A.; Król, N.; Mayer-Scholl, A.; Pfeffer, M. Survival Time of *Leptospira* Kirschneri Serovar Grippotyphosa under Different Environmental Conditions. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0236007. [[CrossRef](#)]
84. Meylan, A. Fossorial Forms of the Water Vole, *Arvicola Terrestis* (L.), in Europe 1. *EPPO Bull.* **1977**, *7*, 209–218. [[CrossRef](#)]
85. Ayral, F.; Djelouadji, Z.; Raton, V.; Zilber, A.-L.; Gasqui, P.; Faure, E.; Baurier, F.; Vourc'h, G.; Kodjo, A.; Combes, B. Hedgehogs and Mustelid Species: Major Carriers of Pathogenic *Leptospira*, a Survey in 28 Animal Species in France (2012/2015). *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Ayral, F.C.; Bicot, D.J.; Pereira, H.; Artois, M.; Kodjo, A. Distribution of *Leptospira* Serogroups in Cattle Herds and Dogs in France. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *91*, 756–759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Bregoli, M.; Pesaro, S.; Ustulin, M.; Vio, D.; Beraldo, P.; Galeotti, M.; Cocchi, M.; Lucchese, L.; Bertasio, C.; Boniotti, M.B.; et al. Environmental Exposure of Wild Carnivores to Zoonotic Pathogens: *Leptospira* Infection in the First Free Living Wolf (*Canis Lupus* Linnaeus, 1758) Found Dead in the Friuli Venezia Giulia Region. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 2512. [[CrossRef](#)]
88. 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**, *10*, 162–170. [[CrossRef](#)]
89. Hamond, C.; Martins, G.; Bremont, S.; Medeiros, M.A.; Bourhy, P.; Lilenbaum, W. Molecular Characterization and Serology of *Leptospira* Kirschneri (Serogroup Grippotyphosa) Isolated from Urine of a Mare Post-Abortion in Brazil. *Zoonoses Public Health* **2016**, *63*, 191–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Soares, P.M.; Gomes, D.O.; Macedo, F.P.; Soares, M.M.; Lemes, K.R.; Jaeger, L.H.; Lilenbaum, W.; Lima, A.M.C. Serological and Molecular Characterization of *Leptospira* Kirschneri Serogroup Grippotyphosa Isolated from Bovine in Brazil. *Microb. Pathog.* **2020**, *138*, 103803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Haller, O. Current Topics in Microbiology and Immunology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1981**, *92*, 25–52. [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Dynamics of leptospirosis in an urban Norway rat (*Rattus norvegicus*) population in densely populated area of Lyon and Bordeaux (France) and risk to public health

Sionfoungo Daouda Soro¹, Karine Groud¹, Sébastien Lefebvre¹, & Virginie Lattard¹

¹ USC 1233-RS2GP, VetAgro Sup, Université de Lyon, Marcy L'Etoile 69280, France

*Auteur correspondant

Keywords : Leptospirosis, urban Norway rat, reservoir, risk , epidemiology.

Dynamics of leptospirosis in an urban Norway rat (*Rattus norvegicus*) population in densely populated area of Lyon and Bordeaux (France) and risk to public health

Sionfoungo SORO, Karine GROUD, Nolan CHATRON, Angeli KODJO, Sébastien LEFEBVRE, Virginie LATTARD*

USC1233 RS2GP, INRAe, VetAgro Sup, University of Lyon, F-69280 Marcy l'Étoile, France

*corresponding author: Virginie Lattard

1 Introduction

Leptospirosis, a zoonosis of worldwide occurrence (Levett 2001), caused by a *Leptospira* spirochete, is a genuine public health issue, with significant consequences for both humans and animals (Haake 2015 ; Ellis 2015). In humans, symptoms are highly variable, making diagnosis complex, ranging from a mild flu-like syndrome to severe forms with multi-organ failure resulting in pulmonary hemorrhage, jaundice, meningitis, often leading ultimately to respiratory and/or renal failure with high mortality rates (Seijo 2002; Silva 2002; Dolhnikoff 2007; Daher 1999; Rajapakse 2022). Approximately 1 million individuals worldwide are afflicted by this disease, which causes nearly 60,000 deaths every year (Costa 2015). This variability in clinical signs, found in many other disorders, and the lack of awareness among clinicians contribute to misdiagnosis of the disease, despite the existence of commonly used diagnostic tests (Levett 2001 ; WHO 2003). In animals, it can lead to significant economic losses for farmers due to abortions and stillbirths (Ellis 2015).

Leptospirosis, once considered a bacterial disease that mainly affected rural populations (Levett 1999 ; Baranton 2006), is now deemed a re-emerging public health concern in many countries. The disease is on the rise in developed countries where certain leisure sports (Boland 2004 ; Guillois 2018) and the presence of unhealthy urban environments (Socolovschi 2011) exacerbate the issue, making it an increasing threat to urban health. Metropolitan France is not exempt as it has one of the highest incidence rates in Europe (Baranton, 2006), estimated to be at 1 case per 100,000 inhabitants in 2014 and 2015 (Bourhy, 2017).

Transmission to humans or animals occurs through direct or indirect contact with infected animals' urine or body secretions, or via contaminated environments (Who, 2003; Xue, 2009; Haake, 2015). A range of animal species, such as fish, amphibians, reptiles, birds, and mammals, can act as hosts for leptospires, as revealed by various studies (Who 2003, Adler 2010, Haake 2015). Some species are susceptible and considered accidental hosts, presenting a severe form of the infection with severe clinical signs but excreting a limited quantity of leptospires; others are chronic, asymptomatic carriers, hosting the bacteria in the kidney and excreting it abundantly and intermittently in their urine. These chronic carriers thus ensure the persistence of leptospires in the environment, to which accidental hosts are exposed. Among chronic carriers, the brown rat (*Rattus norvegicus*) is considered the main known reservoir for *Leptospira* infections (Twigg 1973, Faine 1999, Haake 2015, Himsworth 2014) and plays a major epidemiological role in the transmission of leptospirosis as they are prevalent in urban areas and strongly linked to human activities. Indeed, the brown rat

is a synanthropic species (Shochat 2010), requiring humans to maintain its population (Aplin, 2003). They are also able to adapt quickly and easily to a variety of environments. As a result, they massively colonize urban areas, and can reach very high population densities in certain zones, particularly in areas of insalubrious and dilapidated infrastructures (Bradley 2007; Despommier 2006), which present favorable environmental conditions for their proliferation: abundant food sources and easy nesting areas. Because of its destructive behavior, its proliferation is the cause of numerous conflicts (Aplin 2003).

Nowadays, many large cities have problems with rat infestations and must therefore deal with this leptospirosis risk. According to the prevalence reported in the literature (Easterbrook, 2007 ; Koizumi, 2009 ; Krøjgaard, 2009 ; Shao et al, 2022 ; Bedoya-Pérez et al, 2023), this risk seems to vary between cities, and even within the same city (Ayrál et al, 2015). Indeed, prevalence ranging from a few percent to almost 70% are reported in the literature. Unfortunately, the "age" factor is never considered as an adjustment variable. Depending on the mode of intraspecific transmission, the "age" factor may be crucial, depending on whether the rat is contaminated mainly via the environment or through contact with its congeners. Considering the difficulty of trapping brown rats in cities, studying the dynamics of leptospirosis infections within the same brown rat population is a real challenge. However, this is a crucial question, and a more comprehensive understanding of the dynamics of leptospirosis infections in brown rats could help to mitigate the role of brown rats in the spread of the disease, by contributing to the implementation of appropriate surveillance program and possibly measures to prevent their contamination.

The aim of this study was (1) to describe the prevalence of leptospire carriage in two different brown rat populations located in poor urban areas with high human population densities and under different climatic constraints, (2) to identify the age-related influence on leptospire carriage and (3) to identify the mode(s) of contamination within the rat population. To achieve this, an innovative and original trapping method was used to access the entire population, rather than a very limited and unrepresentative sample.

2 Materials and methods

2.1 Ethics status

This study benefited from pest control campaigns carried out by approved social landlords around social housing, following multiple complaints from residents. The social landlords commissioned pest control operators (PCO) to biologically manage the outbreaks without the use of rodenticides, using ferrets to dislodge rats from their galleries and trapping them with nets when they emerged from their galleries.

After trapping, experimental procedures on the rats was performed according to an experimental protocol following international guidelines and with approval from the ethics committee of the Veterinary School of Lyon and French authorities (authorization n°#37713-2022042712262465). 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.

2.2 Study area and period

The captures were carried out between February and June 2023 around social housing units with high human population densities, high levels of insalubrity, and high brown

rat population densities, with numerous signs of presence and rats visible in vegetation areas in the middle of the day. Captures were made in all surrounding vegetated plots where rat galleries were visible, to capture all or almost all of the rat population present in the vicinity of the housing. Two social housing sectors were included in the study. The largest area of social housings was in the city of Lyon (more than 500,000 inhabitants), capital of the Auvergne-Rhône-Alpes region (Figure 1, on the right). This city is in southeastern of France (Blanchard 1918) and has a semi-continental climate with Mediterranean influences (Annick 2010), with more rainfall in summer than in winter. The social housings area was in the 8th arrondissement, south-east of Lyon. The trapping area covered approximately 6 hectares around 10 buildings. Trapping lasted from February to June 2023, with 2 to 3 trapping sessions per spot of vegetation in which galleries and/or signs of presence were detected. The last trapping confirmed that there were no more individuals in the spot. The second area of social housings was in Bordeaux (more than 250,000 inhabitants), capital of the Nouvelle-Aquitaine region (Figure 1, on the left). This city is in southwestern of France (Blanchard 1918) and has an oceanic climate. The social housings area was located to the north of the Grand Parc district. The capture area was more limited, covering around 0.3 hectares around a single building. Trapping lasted a full week, with 2 to 3 trapping sessions per spot of vegetation. The last trapping confirmed that there were no more individuals in the spot.

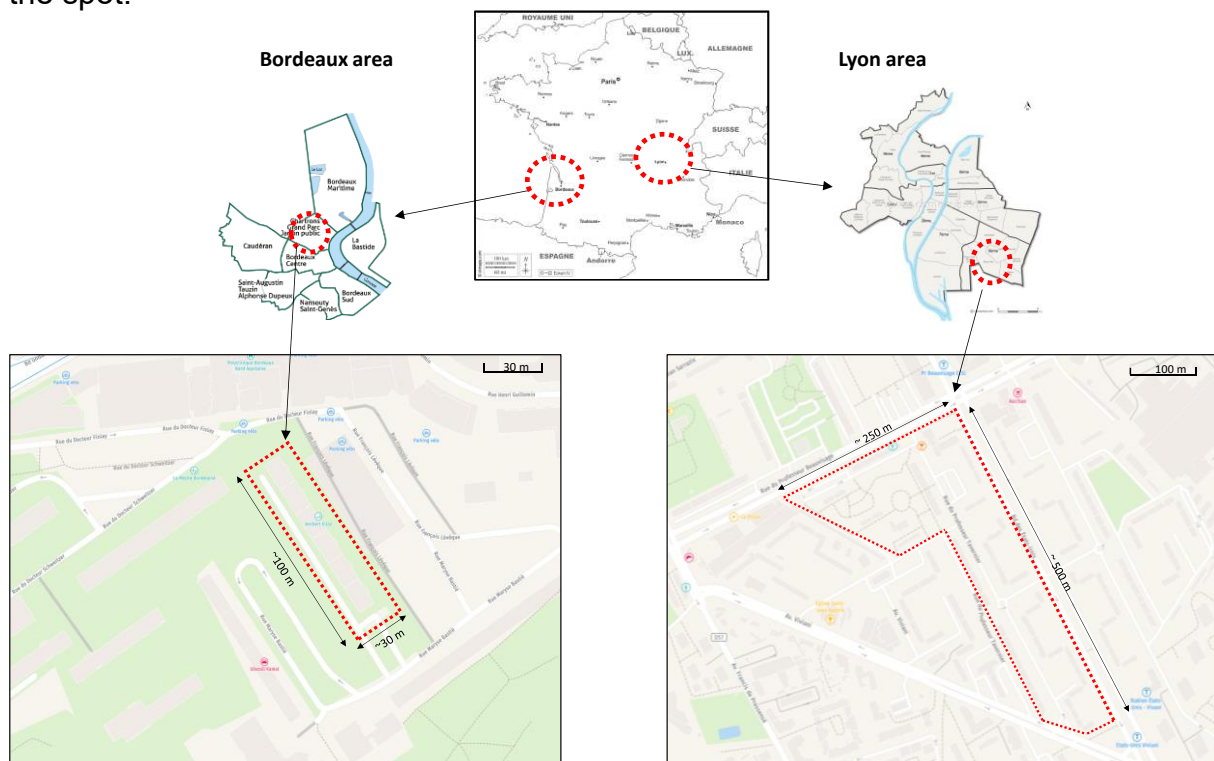


Figure 1 : Trapping areas in Bordeaux and Lyon, France

2.3 Trapping method

The rodents were captured by PCO commissioned by the social landlords. The PCO implemented an innovative biological trapping method that enabled us to capture all or almost all the rats present in our study areas. The rats were captured alive using specially trained ferrets (15 ferrets were used to cover all the areas). The first step was to detect all the galleries present in the study areas. For trapping rats, after sealing off the area around the gallery(ies) with robust fine-meshed nets, the ferrets were released within the restricted perimeter. The ferrets infiltrated the tunnels, prompting the rats to

abandon their burrows and resurface. The rats were then captured alive by the PCOs using landing nets. Once all the rats had been dislodged, the ferrets left the galleries. When all the ferrets had finished their hunting work, the galleries were dismantled with shovels and picks by the PCOs to ensure that all the rats had left and to retrieve any offspring remaining in the nests. The rats were then transported in cages to a laboratory in Lyon and Bordeaux to be anaesthetized and euthanized for sampling.

2.4 Collection of individual morphological parameters

In the laboratory, the rats were promptly anesthetized with isoflurane and euthanized by cardiac puncture and cervical dislocation. In accordance with the guidelines of Herbreteau et al (2011), various metrics including sex, weight, height, body length, and tail length were meticulously documented for each animal. The height, body length, and tail length were all measured in centimeters with a precision of 0.5 cm. The weight was measured using an electronic scale to an accuracy of 0.5 g. Sex was determined based on ano-genital distance and/or observation of testicles and verified at autopsy. All data, including the date and trapping location, were recorded in a database.

2.5 Sampling of kidney tissue and possibly urine and embryos and isolation of *Leptospira*

Each animal was autopsied aseptically. One kidney was removed, transferred to sterile tube, and stored at -80°C until DNA extraction. To evaluate potential excretion of leptospire by the rats, urine when present was also collected by direct puncture in the bladder using sterile needle and syringe, and part of it was stored for DNA extraction. The second kidney of a series of rats was also collected, crushed using a sterile single-use syringe and transferred, along with the second part of the aseptically harvested urine, into EMJH medium tubes for isolation of *Leptospira*. After following dilutions cascades (1/10, 1/100, 1/1000), the culture tubes were incubated aerobically at $28-30^{\circ}\text{C}$ for two months with weekly dark-field microscopic observation to assess the potential presence and growth of leptospire (Picardeau 2013).

Embryos of all pregnant females were also carefully individually collected to avoid contamination with maternal tissue, then measured to determine gestational stage, in accordance with the procedure outlined by Butler (2018). When embryonic development permitted, kidneys were also collected. Embryos and kidneys from embryos were placed in sterile tubes and stored at -80°C until DNA extraction.

2.6 DNA extraction

Prior to extraction, sterile phosphate-buffered saline was used to rinse kidneys and embryos to remove environmental debris and contaminants (Azhari 2018). A sterile single-use syringe was then used to grind them. DNA was extracted from the kidney or embryo grindings as well as from the preserved urine portion that had been preserved using the BioExtract SuperBall kit (Biosellal, Dardilly, France) in accordance with the manufacturer's guidelines. The efficiency of DNA extraction and the presence of inhibitors were assessed by quantification of the endogenous β -actin housekeeping gene by real-time PCR (qPCR) (Toussaint 2007). DNA extracts were then stored at -20°C until used for *Leptospira* molecular analysis.

2.7 *Leptospira* detection and species identification

Detection of pathogenic leptospire was performed by qPCR targeting a partial region of the 16S rRNA gene using specific taqman primers and probe, as described by Waggoner et al. (2014). Amplification reactions were performed using the AgPath-ID™ One-Step RT-PCR kit (Life technologies, Courtaboeuf-Les Ulis, France) according to

the manufacturer's instructions. The Mx3000P® RT-PCR detection system (Agilent Technology, Courtaboeuf-Les Ulis, France) was used for all tests. Each reaction was performed in a total volume of 25 µl containing 2X PCR buffer, 400 nM of each primer, 400 nM TaqMan probe and 4 µl DNA. Amplification conditions were : 95°C for 10 minutes for denaturation phase, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C for amplification step and 1 minute at 60°C for annealing phase.

Leptospira-positive samples were then subjected to further *L. interrogans* strain-specific qPCR, as described by Ferreira et al. (2014). Amplification reactions were also carried out using the AgPath-ID™ One-Step RT-PCR kit (Life technologies, Courtaboeuf-Les Ulis, France) according to the manufacturer's instructions and the Mx3000P® RT-PCR detection system (Agilent Technology, Courtaboeuf-Les Ulis, France). For this PCR, 25 µl of reaction mixture were prepared containing 2X PCR buffer, 400 nM of each primer, 400 nM or 120 nM TaqMan probe and 4 µl of DNA. The amplification program used started with a denaturation step at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C for the amplification phase and 1 minute at 60°C or 63°C for the annealing phase. A positive control (DNA from the ENVN serovar Icterohaemorrhagiae strain of *L. interrogans*) and a negative control (4 µl of nuclease-free water) were included in each PCR protocol, and data analysis was performed using the detection system RT-PCR equipment according to the manufacturer's instructions.

2.8 Determination of serogroup and serovar of *Leptospira* for positive samples

For sample positive for *L. interrogans* carriage, serogroup was determined by PCR amplification of the O antigen using specific primers for serogroup Icterohaemorrhagiae (Cai 2010). Each reaction was performed using Platinum SuperFi II Green PCR Master Mix (Fisher Scientific, Illkirch, France), in a final volume of 20 µl containing 500 nM of each primer and 2 µl of DNA. Amplification was achieved by an initial denaturation at 98°C for 30 seconds followed by 35 cycles of denaturation at 98°C for 10 seconds, annealing at 60°C for 10 seconds and polymerization at 72°C for 30 seconds, followed by a 5 min terminal elongation. A positive control (DNA from *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae ENVN) and a negative control (2µl of nuclease-free water) were included for each analysis. Amplification products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel. Fragments were visualized using a UV transilluminator and their molecular weight was compared to a 100 bp ladder (Invitrogen) and to the positive control. PCR products were sequenced by Genoscreen (Lille, France) for serogroup confirmation.

The serovar was identified using the lic12008 gene-centered method. The presence of an insertion at the 5' end of the lic12008 gene in serovar Icterohaemorrhagiae, but not in serovar Copenhageni enabled the differentiation between both serovars (Santos, 2018). PCR amplification was carried out according to the same conditions than previously. The PCR products obtained, after verification by electrophoresis on 1% agarose gel, were sequenced by Genoscreen (Lille, France). Sequences were read with ChromasPro 2.6.6 software and analyzed using CLC sequence viewer 7.6.1 software.

2.9 Statistical analysis

Statistical modeling was conducted to assess the utility of rat-related and urban criteria as predictors of leptospirosis infection in rats. Simple logistic regression (SLR) was employed to investigate the association between the prevalence of leptospirosis and the explanatory variables. Subsequently, a multivariate logistic regression model (GLM) was implemented, incorporating weight, sex, and location as variables.

Variation inflation factors were calculated using the ‘car’ package in R to confirm the absence of significant collinearity (VIF < 5).

In the context of real-time PCR cycle threshold (Ct) analysis, a Kruskal-Wallis test was utilized, followed by a post hoc Dunn’s test, to assess the impact of weight on this parameter. Additionally, a multivariate linear regression model was constructed to identify the influence of city, sex, and weight. Normality of residuals and homoscedasticity were assessed graphically.

3 Results

3.1 Characteristics of rat populations

A total of 508 rats (*R. norvegicus*) were trapped and included in this study, comprising 407 rats trapped between February and June 2023 in the 6 ha-trapping area in Lyon and 101 rats trapped in June 2023 in the 0.3 ha-trapping area in Bordeaux. *R. norvegicus* species was confirmed by morphological measurements and cytochrome b sequencing. The “Lyon” sampling consisted of 180 female rats, 180 male rats and 47 juvenile rats whose sex was not determined. Median weight of mature adult rats (i.e., >200g) was 362.8 g [CI_{95%}: 349.4-381.9] with median head/body and tail lengths of 22.5 cm [CI_{95%}: 22.0-22.9] and 19.0 cm [CI_{95%}: 19.0-19.5], respectively. The “Bordeaux” sampling consisted of 48 female rats and 53 male rats. Median weight of mature adult rats (i.e., >200g) was 347.1 g [CI_{95%}: 288.9-394.6] with median head/body and tail lengths of 22.0 cm [CI_{95%}: 21.0-23.0] and 20.5 cm [CI_{95%}: 19.0-21.0], respectively. Rats of all ages (from newborns to very old adults) were present at both sites and were divided by weight category (Table 1). Proportions of animals between weight categories were not statistically significant between spots of trapping ($X^2=11.74$, $df=6$, $p=0.0681$).

Table1: Characteristics of rat populations according to sex and weight class

Population of rats	6 ha-trapping area in Lyon n=407	0.3 ha-trapping area in Bordeaux n=101
Sex ratio	Males: 44.2% (n=180) Females: 44.2% (n=180) Not identified: 11.6% (n=47)	Males: 52.5%(n=53) Females: 47.5% (n=48)
Weight class	0-50g	18.4% (n=75)
	50-100g	8.4% (n=34)
	100-200g	11.8% (n=48)
	200-300g	16.0% (n=65)
	300-400g	23.8% (n=97)
	400-500g	16.5% (n=67)
	> 500g	5.2% (n=21)

3.2 Overall prevalence of Leptospira infection in rat populations in the study areas

Based on qPCR targeting a partial region of the 16S rRNA gene performed from kidney DNA, 210 of the 407 rats trapped in the study area of Lyon were positive for Leptospira DNA, resulting in an overall prevalence of 51.6% [CI_{95%}: 46.8-56.4]. In the study area

of Bordeaux, 29 of the 101 rats were positive for *Leptospira* DNA, resulting in an overall prevalence of 28.7% [CI_{95%}: 20.8-38.2].

For rats captured in the Lyon study area, leptospire were successfully cultured from the tissues (kidneys and urine) of 22 rats (13 females and 9 males) out of 157 (14%, [CI_{95%}: 9.4-20.3]) for which culture was performed. Cultures considered negative were either cultures in which no leptospire was detected after 7 weeks of culture at 30°C, or cultures in which contaminants were detected very quickly after inoculation preventing the detection of any leptospire. Among the positive cultures, 2 were from rats with weight higher than 500g (n=9); 6 from rats with weight comprised between 400 and 500g (n=44); 10 from rats with weight comprised between 300 and 400 g (n=54); 4 from rats with weight comprised between 200 and 300 g (n=24); 0 from rats with weight lower than 200 g (n=26). Among rats with positive culture, two were not detected as positive by qPCR. For other, Ct obtained for qPCR were comprised between 17.4 and 39.5.

For rats captured in the Bordeaux study area, leptospire were successfully cultured from the tissues (kidneys and urine) of a single female rat weighing over 500g. This rat was also found positive by qPCR. This low success rate was linked to a high rate of contamination by *Proteus* and *E.coli*.

Considering the positive results obtained by qPCR and culture, the overall prevalence in Bordeaux remained unchanged from that calculated on the basis of qPCR results, i.e. 28.7% [CI_{95%}: 20.8-38.2]. In Lyon, the overall prevalence increased slightly to 51.8% [CI_{95%}: 47.0-56.3].

3.3 Molecular typing of *Leptospira* strain in *R. norvegicus* in Lyon and Bordeaux study areas

L. interrogans-specific qPCR was applied on all the 239 positive samples. All the rats positive for leptospira was found positive for *Leptospira interrogans* irrespective of their location.

O-antigen typing was applied to DNA obtained from kidneys (10% of positive samples) and successful cultures; positive controls confirmed the robustness of the results. O typing revealed the presence of serogroup *Leptospira Icterohaemorrhagiae* (IH) in all samples analyzed, in both the Lyon and Bordeaux study areas. Diagnostic marker lic12008 enabled us to identify the serovar of the strain in positive rats (10% of positive samples + successful cultures) from both cities, which was *Leptospira interrogans Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae*.

3.4 Infection status of rats according to weight category, sex, period of trapping and city.

Infection status was analyzed based on weight categories. Results are presented in Figure 2. In Lyon, the *Leptospira* prevalence was 21.3% [CI_{95%}: 13.6-31.9] among individuals weighing less than 50g, 23.5% [CI_{95%}: 12.4-40] among individuals weighing less than 50g and between 30-40% among those weighing between 50 and 300g. The prevalence exceeded 80% for individuals weighing above 300g. In Bordeaux, the prevalence of *Leptospira* was below 35% for all weight categories except those

weighing over 400g, where carriage exceeded 80%. The graphical illustrations of the prevalence rates are displayed in Figure 4.

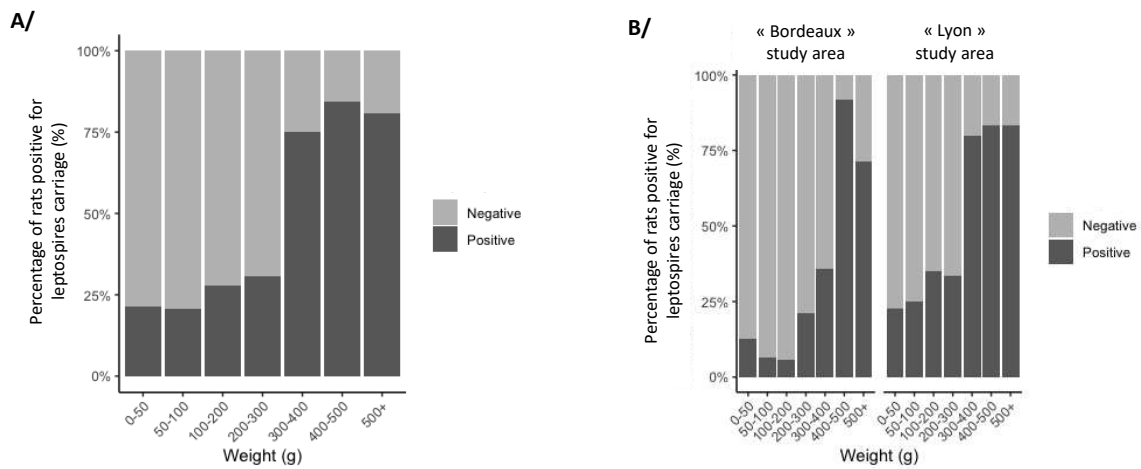


Figure 2: Evolution of prevalences of *Leptospira* infection in trapped rats according to the weight categories. In A/ globalizing all the rats included in the study, B/ considering only the rats included in the study area of Lyon and in the study area of Bordeaux.

Infection status was also analyzed according to the sex. Results are presented in Figure 3. More females were found positive for *Leptospira* in both study areas of Lyon and Bordeaux.

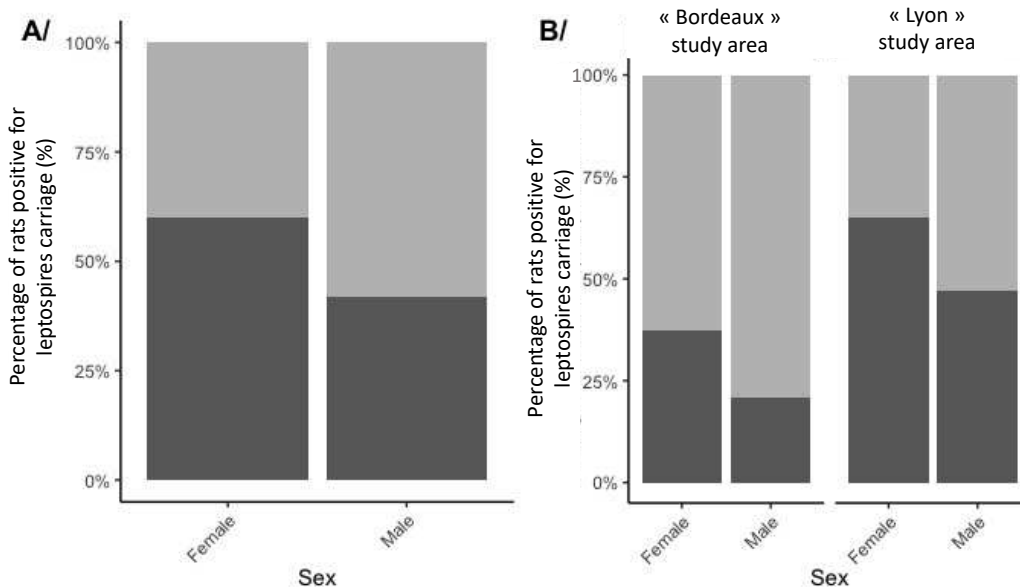


Figure 3: Prevalences of *Leptospira* infection in trapped rats according to the sex. In A/ globalizing all the rats included in the study, B/ considering only the rats included in the study area of Lyon and in the study area of Bordeaux.

To statistically analyze the results, the weight categories were grouped based on the trend of prevalence in each category. As a result, our redefinition has created four weight categories: 0-200g, 200-300g, 300-400g, and over 400g. In the simple logistic regression (SLR) model, *Leptospira* positivity was not influenced by gender regardless of city. On the other hand, the probability of being positive increased with increasing weight.

Table 2: Odds ratio using the SRL model for testing positive for *Leptospira interrogans* to determine factors affecting *Leptospira* prevalence by study areas.

Covariates		Lyon study area			Bordeaux study area		
		OR	CI _{95%}	p	OR	CI _{95%}	p
Sex	F	Ref			Ref		
	M	0.48	0.32-0.70	<0.001	0.44	0.17-1.04	0.066
Weight	<200g	Ref			Ref		
	200-300g	1.39	0.77-2.49	0.268	3.00	0.64-14.2	0.152
	300-400g	11	6.51-19.3	<0.001	6.25	1.4-30	0.016
	>400g	13.8	7.78-25.5	<0.001	60	13.9-362	<0.001
Month of trapping	April	Ref					
	February	0.57	0.35-0.91	0.020	-	-	-
	June	0.41	0.06-2.16	0.313	-	-	-
	March	1.0	0.69-1.53	0.902	-	-	-

SRL, Simple Logistic Regression; OR, odds ratio; p-value<0.05: statistically significant compared to corresponding reference (ref)

In the generalized linear mixed model (GLMM), *Leptospira* positivity showed an increase with higher weight, but it was also associated with the city (Table 3). However, there was no discernible difference in the correlation between sex and *Leptospira* positivity.

Table 3: Odds ratio using the GLMM model for testing positive for *Leptospira interrogans* among *Rattus norvegicus* included in the study, and incorporating the study area, the sex and the weight category.

Covariates		OR	CI _{95%}	p
Study area	Bordeaux area	Ref		
	Lyon area	3.55	2.01-6.50	<0.001
Sex	F	Ref		
	M	0.68	0.44-0.1.06	<0.09
Weight	<200g	Ref		
	200-300g	1.05	0.57-1.88	0.88
	300-400g	7.03	3.99-12.73	<0.001
	>400g	19.58	9.93-41.76	<0.001

GLMM, Generalized linear mixed model; OR, odds ratio; p-value<0.05: statistically significant compared to corresponding reference (ref)

3.5 Analysis of the CT-values obtained by PCRq targeting a partial region of the 16S rRNA gene in positive rats according to their weight categories.

The CT (cycle threshold) is defined as the number of cycles required for the fluorescent signal to exceed background levels. The lower the Ct is, the higher the bacterial load is. Positive animals were grouped by Ct category (*i.e.* animals with a Ct value <25, between 25 and 30, between 30 and 35 and >35) and by weight category (animals weighing less than 200 g were grouped together, due to the lower number of positive individuals in these categories). The percentages of positive animals in each category are shown in figure 5. On the basis of the qPCR results, and after taking into account

the new weight categories, it was evident that the PCR Ct value characterizing bacterial load depended on weight rather than city. The majority of *Leptospira*-positive animals in the higher weight categories had a PCR Ct value below 30 in both study areas of Lyon and Bordeaux (Figure 5, panel B). On the contrary, in rat categories weighing less than 200g, Ct-values were predominantly higher than 35.

In the study area of Bordeaux, a significant difference in Ct was observed between animals weighting more than 400 g and those weighting less than 200 g (Figure 5, panel C). In the study area of Lyon where number of trapped animals was higher, significant differences were observed between animals weighting more than 300 g and animals weighting less than 300 g (Figure 5, panel C).

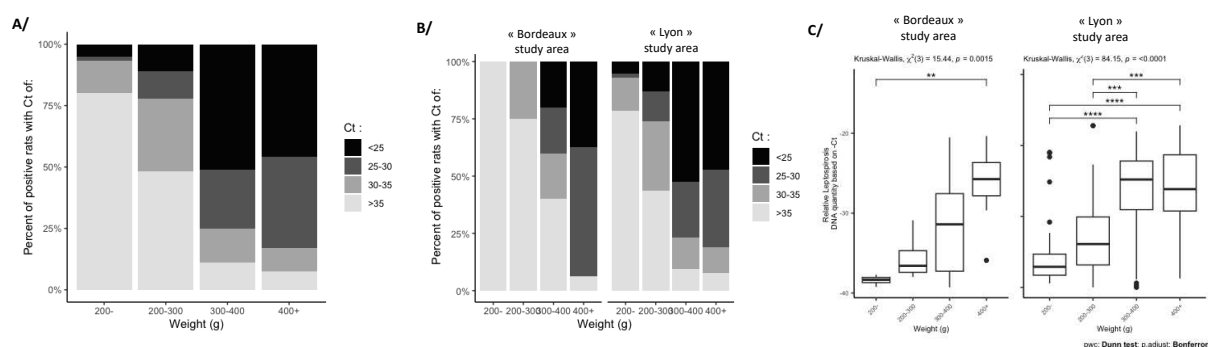


Figure 4: Distribution of *Leptospira*-positive rats according to their Ct value and median Ct value by weight category. In A/ Distribution of rats according to their Ct, including all the positive rats of the study, B/ Distribution of rats according to their Ct, including only the positive rats detected in the study area of Lyon or in the study area of Bordeaux, C/ median Ct value by weight category. Statistical analysis of Ct values between weight categories was done using Kruskal-wallis test, followed by pairwise comparison using Dunn's test with a Bonferroni adjustment (p -value<0.05, difference statistically significant).

In the generalized linear mixed model (GLMM), the weight factor had a significant effect on the Ct PCR value compared to sex (Table 4).

Table 4: Odds ratio using the GLMM model for Ct values obtained with the *Leptospira*-testing qPCR targeting a partial region of the 16S rRNA gene incorporating the study area, the sex and the weight category for *R. norvegicus* with Ct<40.

Covariates		OR	CI _{95%}	p
Study area	Bordeaux area	Ref		
	Lyon area	1.09	1.00-1.19	0.04
Sex	F	Ref		
	M	0.98	0.93-0.1.04	0.58
Weight	<200g	Ref		
	200-300g	0.97	0.87-1.07	0.50
	300-400g	1.21	1.12-1.31	<0.001
	>400g	1.23	1.14-1.33	<0.001

GLMM, Generalized linear mixed model; OR, odds ratio; p -value<0.05: statistically significant compared to Ref.

3.6 *Leptospira* infection status of rat embryos

In the Lyon study area, 32 females out of 180 (17.8%) were pregnant, including 14 weighing over 300g, 6 over 400g and 9 over 500g. Of the 32 females, 28 were positive

for leptospire carriage. At necropsy, all embryos were carefully collected separately to avoid contamination. Litters of 13 positive females were selected based on the maternal weight, the Ct value of leptospira-testing qPCR performed on females and embryo size. The total number of embryos collected from these females was 98, with an average number of embryos per female of 7.5 ± 2.6 (Table 5). The smallest embryos were at least 1cm in size, indicating that all females were in the last stage of gestation. When possible (embryo weight >3 g), embryo kidneys were isolated from the rest of the body. Leptospira carriage assays were performed by leptospira-testing qPCR using either DNA extracted from the embryo crush or DNA extracted from the kidney and the rest of the body. All analyses were negative.

Table 5: Characteristics of pregnant females and their litter used for Leptospira-testing qPCR

	weight category	Ct Leptospira-testing qPCR for female	n embryos (n analyzed)	weight (g) mean \pm SD
Female 1	300-400	26.10	2 (6)	0.95 ± 0.05
Female 2	300-400	25.93	8 (8)	0.95 ± 0.08
Female 3	300-400	26.89	9 (9)	4.86 ± 0.11
Female 4	300-400	37.11	8 (9)	1.84 ± 0.05
Female 5	300-400	20.47	5 (5)	2.12 ± 0.08
Female 6	300-400	23.99	9 (9)	1.49 ± 0.11
Female 7	300-400	25.01	1 (1)	6.00 ± 0.00
Female 8	400-500	17.77	9 (9)	1.76 ± 0.09
Female 9	400-500	30.17	8 (9)	1.71 ± 0.10
Female 10	400-500	29.11	8 (8)	2.84 ± 0.07
Female 11	400-500	38.75	1 (5)	1.50 ± 0.00
Female 12	500-600	26.17	10 (10)	3.28 ± 0.17
Female 13	600-700	28.30	10 (10)	3.16 ± 0.13

4 Discussion

The study provides evidence of the existence of *Leptospira interrogans* in brown rat populations in densely populated urban regions in Lyon and Bordeaux. Additionally, the research reveals the dynamics of leptospirosis in these rat populations, thus enhancing comprehension of the persistence and transmission of zoonotic pathogens in urban settings (Blasdell 2019). The findings suggest that the prevalence of *Leptospira* increases with the growth in weight of the animals. This finding supports previous research by Easterbrook (2007), Krøjgaard (2009), Vanasco (2003), and Himsworth (2013), indicating a greater incidence of leptospirosis in adult rats compared to juvenile rats due to the positive correlation between age and weight (Davis, 1953). However, in these studies, not all age categories of rats were accounted for in the categorization into mature and immature, as very young animals that did not venture far from the nests were not captured. This limitation is common in rat studies, where Sherman type traps and other rat traps are placed on the surface, making it impossible to capture all ages. It should be noted that only adults and subadults leaving the nest were captured, hence the originality of the trapping method with ferrets used in our study. These predatory animals having the ability to access the interior of rat burrows, flushed out all animals present, enabling us to capture all individuals on the trapping site and obtain data on all age categories therefore weights.

An aspect of our study worth noting is that the obtained prevalence can be designated as the "real prevalence" of the area as it considers all animals present at the trapping site, due to the implementation of our capture method. This contrasts with the majority of leptospirosis prevalence studies in rats, where animals are captured at different locations. Given that environmental factors can influence the transmission of leptospires, it is evident that the risk of rats carrying these bacteria will vary depending on the location of traps. This variability creates bias in determining the prevalence rate and can be referred to as "relative prevalence." We should bear in mind that previous studies did not consider very young rats when assessing the prevalence of leptospirosis in "immature" rats, whereas our study does.

Moreover, rats weighing over 300g in Lyon and rats weighing over 400g in Bordeaux had 2 to 4 times greater prevalence than lower weight rats. This can be attributed to the colonial nature of rats, as well as environmental exposure. Typically, rats in this weight category are the most dominant and therefore have a greater chance of observing aggressive behavior amongst these rodents. This aggressive behaviour is observed during foraging activities as well as territorial defence or acquisition of new territories, resulting in multiples bites on these animals (Barnett 1963, Barnett 1951, Clapperton 2006), an important source of transmission of *L. interrogans* present in the environment. In addition, the possible involvement of the environment in the mode of transmission may explain the high overall prevalence observed in Lyon (50.9%) compared to Bordeaux (28.7%). The rats sampled in Bordeaux were captured in an area around a residential block without access to underground pipes. However, in Lyon, the rats had access to underground wastewater, providing an environment conducive to the survival of leptospires. However, caution must be exercised when interpreting the difference in prevalence between these two cities, as the sample sizes were not equal and captures were not made during the same periods.

In addition to the high prevalence rate found in rats weighing over 300g, these rats also displayed a significant bacterial load, as demonstrated by the Ct values. The correlation between the Ct value and the concentration of pathogens in a sample dictates that the lower the Ct value, the higher the concentration of the pathogen (Public Health Ontario, 2020). This observation indicates enduring carriage but above all establishes the nonexistence of pathogenic consequences of *Leptospira* infection in rats (Athanasio 2008).

Although the prevalence of bacteria in smaller rats was lower compared to larger ones, our results suggest that they can also carry the bacteria. Transmission of the germs among young individuals can occur through various modes, with social play behavior being one of them. During social play, young rats learn and mimic adult behaviors (Schweinfurth 2020), which increases their exposure to contaminated environments. Transmission through breast milk has also been suggested by DE Oliveira et al. (2016) as they demonstrated the presence of leptospires in milk and breast tissue. However, this mode of transmission does not appear to have a significant epidemiological impact and necessitates further confirmatory studies. Furthermore, it is possible that smaller rats, in which bacteria was found, may have lost their immunity since it appears that with the transfer of maternal antibody, infection could be delayed (Dohmae 1995). In addition to transmission through milk, contamination of infants may arise through the infected mother's urine or saliva, during urogenital grooming and while cleaning her young. In utero transmission has been proposed as a possibility (Warp, 1940), and Schnurrenberger et al. (1970) confirmed it by isolating *L. icterohaemorrhagiae* from fetuses. However, our findings are not similar to theirs as we obtained negative results for all tested embryos. It is important to note that our embryos were stored in cold

conditions for several weeks. Cold storage for long periods can cause a decrease in DNA concentrations (Romanazzi, 2015), which may have reduced the chances of detecting *Leptospira* DNA in our embryos, as seen in other studies (Bahl 2012, Kwambana 2011 ; Metzler-Zebeli 2016).

Our research findings indicate also that globally the prevalence of infected animals was unrelated to sex. This can be attributed to the fact that if we take into account the role of the contaminated environment in transmitting leptospires between rats, gender does not seem to be a factor. This finding is consistent with the previous results reported by Nuttall et al. (1929). However, when considering the outcomes from each city, we observed a consistent conclusion regarding the prevalence of infection in Lyon. On the other hand, in Bordeaux, sex seemed to influence the prevalence since we found many more infected females compared to males, which further corroborates the findings of Easterbrook et al. (2007).

Leptospires were cultured from kidney and urine samples, showing rat involvement in contaminating their environment by excreting viable leptospires. Only 22 positive cultures were obtained demonstrating the difficulty of isolating these slow-growing bacteria (Benacer 2013). The low percentage of positivity of this approach justifies its decreased use as a means of detecting leptospires in routine diagnosis. This prompted us in our study to deem an animal positive was which had a positive qPCR outcome even if its bacterial culture was negative.

Genotyping the leptospiral DNA allowed for the demonstration of the maintenance and circulation of *L. interrogans* belonging to the *Icterohaemorrhagiae* serogroup with specificity for the *Icterohaemorrhagiae* serovar within the rat colonies trapped in Lyon and Bordeaux. This discovery confirms the role of rats as a reservoir and supports the theory that a leptospira strain is linked to a colony of rats (Ayrat 2015). Furthermore, the implication of this strain in severe cases of human leptospirosis highlights the potential infection risk incurred by the population. This is especially relevant because the capture sites in both Lyon and Bordeaux were situated in areas with high population density and environmental factors conducive to rat proliferation. As a result, there is an increased likelihood of human exposure to this strain in these areas.

5 Conclusions and perspectives

This study has unveiled an association between *L. interrogans* infection and weight in two urban rat populations residing in high human density areas of Lyon and Bordeaux. The findings show that rats with high weight are more prone to contracting a *Leptospira* infection than their lighter counterparts. As a result, these findings call for a revision of the urban rat control strategy which relies on trapping and poisoning in the context of leptospirosis prevention. Additionally, it has been highlighted that *L. interrogans Icterohaemorrhagiae Icterohaemorrhagiae* is prevalent strain in the various capture zones. As the incidence of human leptospirosis associated with urban rats appears to be on the rise (Himsworth 2013), it would be valuable interesting to undertake additional studies such as an evaluation of the disease's occurrence within the local human population.

6 References

- Adler B. & de la Peña Moctezuma A., **2010**. *Leptospira and leptospirosis*. Veterinary microbiology, 140 (3-4), 287–296.
- Aplin K. P., Chesser T., & Have J. T., **2003**. *Evolutionary biology of the genus Rattus : profile of an archetypal rodent pest*. Aciar monograph series, 96, 487-498.
- Athanzio D. A., Silva E. F., Santos C. S., Rocha G. M., Vannier-Santos M. A., McBride A. J., Ko A. I., & Reis M. G., **2008**. *Rattus norvegicus as a model for persistent renal colonization by pathogenic Leptospira interrogans*. Acta tropica, 105(2), 176–180.
- Auffray A., Brisson A., Tamburini A., Dziak V., Maloisel V., & Martinoni-Lapierre S., « Climat de la région Rhône-Alpes » [archive], sur auvergne-rhone-alpes.developpement-durable.gouv.fr, consulté le **31 août 2023**
- Ayral F., Artois J., Zilber A. L., Widén F., Pounder K. C., Aubert D., ... & Artois M., **2015**. *The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats : a survey in Rhône, France (2010–2012)*. Epidemiology & Infection, 143 (3), 586-599.
- Ayral F., Zilber A. L., Bicout D. J., Kodjo A., Artois M., & Djelouadji Z., **2015**. *Distribution of Leptospira interrogans by multispacer sequence typing in urban Norway rats (Rattus norvegicus): a survey in France in 2011-2013*. PLoS One, 10 (10), e0139604.
- Azhari N.N., Alia S.N., Joseph N., Philip N., Mustapha N.F., Ishak S.N., Mohd-Taib F.S., Nor S.M., Yusof M.A., Mohd Sah S.A., Mohd Desa M.N.B., Bashiru G., Zeppelini C.G., Costa F., Sekawi Z. & Neela V.K., **2018**. *Molecular characterization of pathogenic Leptospira sp. in small mammals captured from the human leptospirosis suspected areas of Selangor state, Malaysia*. Acta Tropica 188 : 68-77.
- Bahl M. I., Bergström A., & Licht T. R., **2012**. *Freezing fecal samples prior to DNA extraction affects the Firmicutes to Bacteroidetes ratio determined by downstream quantitative PCR analysis*. FEMS microbiology letters, 329(2), 193–197.
- Baranton G., & Postic D., **2006**. *Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003*. International Journal of Infectious Diseases, 10 (2), 162-170.
- Barnett S. A., **1963**. *The rat : A study in behavior*. Chicago : Aldine Pub Co.
- Barnett S. A., & Spencer M. M., **1951**. *Feeding, social behaviour and interspecific competition in wild rats*. Behaviour, 229-242.
- Benacer D., Mohd Zain S. N., Amran F., Galloway R. L., & Thong K. L., **2013**. *Isolation and molecular characterization of Leptospira interrogans and Leptospira borgpetersenii isolates from the urban rat populations of Kuala Lumpur, Malaysia*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 88(4), 704–709.
- Blanchard R., **1918**. *Trois grandes villes du Sud-Est*. Revue de Géographie Alpine, 6 (2), 153-210.
- Blasdell K. R., Morand S., Perera D., & Firth C., **2019**. *Association of rodent-borne Leptospira spp. with urban environments in Malaysian Borneo*. PLoS neglected tropical diseases, 13(2), e0007141.
- Boland M., Sayers G., Coleman T., Bergin C., Sheehan N., Creamer E., O'Connell M., Jones L., & Zochowski W., **2004**. *A cluster of leptospirosis cases in canoeists following a competition on the River Liffey*. Epidemiology and infection, 132 (2), 195–200.
- Bourhy P., Septfons A., & Picardeau M., **2017**. *Diagnostic, surveillance et épidémiologie de la leptospirose en France*. Bull Epidemiol Hebdo 8-9 : 131- 137.
- Bradley C.A., Altizer S., **2007**. *L'urbanisation et l'écologie des maladies de la faune*. Tendances Ecol. Evol. 22: 95-102.

Butler H., **2018**. *An atlas for staging mammalian and chick embryos*. Crc Press.

Cai C. S., Zhu Y. Z., Zhong Y., Xin X. F., Jiang X. G., Lou X. L., He P., Qin J. H., Zhao G. P., Wang S. Y., & Guo X. K., **2010**. *Development of O-antigen gene cluster-specific PCRs for rapid typing six epidemic serogroups of Leptospira in China*. BMC microbiology, 10, 67.

Clapperton B. K., & Zealand N., **2006**. *A review of the current knowledge of rongent behaviour in relation to control devices*. Science for Conservation 263 : 1–55.

Costa F., Hagan J. E., Calcagno J., Kane M., Torgerson P., Martinez-Silveira M. S., Stein C., Abela-Ridder B., & Ko, A. I., **2015**. *Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review*. PLoS neglected tropical diseases, 9 (9), e0003898.

Daher E., Zanetta D. M., Cavalcante M. B., & Abdulkader R. C., **1999**. *Risk factors for death and changing patterns in leptospirosis acute renal failure*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 61 (4), 630-634.

Davis D. E., **1953**. *The characteristics of rat populations*. The Quarterly review of biology, 28(4), 373–401.

DE Oliveira D., Figueira C. P., Zhan L., Pertile A. C., Pedra G. G., Gusmão I. M., Wunder E. A., Rodrigues G., Ramos E. A., Ko A. I., Childs J. E., Reis M. G., & Costa F., **2016**. *Leptospira in breast tissue and milk of urban Norway rats (Rattus norvegicus)*. Epidemiology and infection, 144(11), 2420–2429.

Despommier D., Ellis B.R., Wilcox B.A., **2006**. *The role of ecotones in emerging infectious diseases*. EcoHealth. 3 : 281–289.

Dohmae K., & Nishimune Y., **1995**. *Protection against hantavirus infection by dam's immunity transferred vertically to neonates*. Archives of virology, 140(1), 165–172.

Dolhnikoff M., Mauad T., Bethlem E. P., & Carvalho C. R., **2007**. *Leptospiral pneumonias*. Current opinion in pulmonary medicine, 13 (3), 230-235.

Easterbrook J. D., Kaplan J. B., Vanasco N. B., Reeves W. K., Purcell R. H., Kosoy M. Y., Glass G. E., Watson J., & Klein S. L., **2007**. *A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA*. Epidemiology and infection, 135 (7), 1192–1199.

Ellis W. A., **2015**. *Animal Leptospirosis*. In: Leptospira and Leptospirosis. Springer, Berlin, Heidelberg, 99–137. (Current Topics in Microbiology and Immunology).

Faine S., Adler B., Bolin C., Pérolat P., **1999**. *Leptospira and leptospirosis*. Second Edition. MediSci, Melbourne, Australia.

Ferreira A. S., Costa P., Rocha T., Amaro A., Vieira M. L., Ahmed A., Thompson G., Hartskeerl R. A., & Inácio J., **2014**. *Direct detection and differentiation of pathogenic Leptospira species using a multi-gene targeted real time PCR approach*. PloS one, 9 (11), e112312.

Guillois Y., Bourhy P., Ayrat F., Pivette M., Decors A., Aranda Grau J. H., Champenois B., Malhère C., Combes B., Richomme C., Le Guyader M., King L. A., & Septfons A., **2018**. *An outbreak of leptospirosis among kayakers in Brittany, North-West France, 2016*. Euro surveillance : European communicable disease bulletin, 23 (48), 1700848.

Haake D. A. & Levett P. N., **2015**. *Leptospirosis in humans*. Current topics in microbiology and immunology, 387, 65–97.

Herbreteau V., Jittapalapong S., Rerkamnuaychoke W., Chaval Y., Cosson J. F., & Morand S., **2011**. *Protocols for field and laboratory rodent studies* (pp. 5-p). Kasetsart University.

Himsworth C. G., Jardine C. M., Parsons K. L., Feng A. Y., & Patrick D. M., **2014**. *The characteristics of wild rat (Rattus spp.) populations from an inner-city neighborhood*

with a focus on factors critical to the understanding of rat-associated zoonoses. *PLoS one*, 9 (3), e91654.

Himsworth C. G., Bidulka J., Parsons K. L., Feng A. Y., Tang P., Jardine C. M., Kerr T., Mak S., Robinson J., & Patrick D. M., **2013**. *Ecology of Leptospira interrogans in Norway rats (Rattus norvegicus) in an inner-city neighborhood of Vancouver, Canada*. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(6), e2270.

Koizumi N., Muto M., Tanikawa T., Mizutani H., Sohmura Y., Hayashi E., Akao N., Hoshino M., Kawabata H., & Watanabe H., **2009**. *Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring Leptospira interrogans in urban areas of Tokyo, Japan*. *Journal of medical microbiology*, 58 (Pt 9), 1227–1230.

Krøjgaard L. H., Villumsen S., Markussen M. D., Jensen J. S., Leirs H., & Heiberg A. C., **2009**. *High prevalence of Leptospira spp. in sewer rats (Rattus norvegicus)*. *Epidemiology and infection*, 137 (11), 1586–1592.

Kwambana B. A., Mohammed N. I., Jeffries D., Barer M., Adegbola R. A., & Antonio M., **2011**. *Differential effects of frozen storage on the molecular detection of bacterial taxa that inhabit the nasopharynx*. *BMC clinical pathology*, 11, 2.

Levett P. N., **1999**. *Leptospirosis: re-emerging or re-discovered disease?*. *Journal of Medical Microbiology*, 48 (5), 417-418.

Levett P. N., **2001**. *Leptospirosis*. *Clinical microbiology reviews*, 14 (2), 296–326.

Metzler-Zebeli B. U., Lawlor P. G., Magowan E., & Zebeli Q., **2016**. *Effect of Freezing Conditions on Fecal Bacterial Composition in Pigs*. *Animals : an open access journal from MDPI*, 6(3), 18.

Nuttall G. H. F., **1929**. *Leptospira icterohaemorrhagiae in Oxford rats*. *Journal of Hygiene*, 29, 218-226.

Picardeau M., **2013**. *Diagnosis and epidemiology of leptospirosis*. *Medecine et maladies infectieuses*, 43 (1), 1–9.

Public Health Ontario, **2020**. *An Overview of Cycle Threshold Values and Their Role in SARS-CoV-2 Real-Time PCR Test Interpretation*. Queen's Printer for Ontario ; Toronto, ON, Canada. pp. 1–14.

Rajapakse S., **2022**. *Leptospirosis: clinical aspects*. *Clinical medicine (London, England)*, 22 (1), 14–17.

Romanazzi V., Traversi D., Lorenzi E., & Gilli G., **2015**. *Effects of freezing storage on the DNA extraction and microbial evaluation from anaerobic digested sludges*. *BMC research notes*, 8, 420.

Santos L. A., Adhikarla H., Yan X., Wang Z., Fouts D. E., Vinetz J. M., Alcantara L. C. J., Hartskeerl R. A., Goris M. G. A., Picardeau M., Reis M. G., Townsend J. P., Zhao H., Ko A. I., & Wunder E. A., Jr, **2018**. *Genomic Comparison Among Global Isolates of L. interrogans Serovars Copenhageni and Icterohaemorrhagiae Identified Natural Genetic Variation Caused by an Indel*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 193.

Schnurrenberger P. R., Hanson L. E., & Martin R. J., **1970**. *Leptospirosis: long-term surveillance on an Illinois farm*. *American journal of epidemiology*, 92(4), 223–239.

Schweinfurth M. K., **2020**. *The social life of Norway rats (Rattus norvegicus)*. *eLife*, 9, e54020.

Seguin B., Boucaud-Maître Y., Quenin P., & Lorgue G., **1986**. *Bilan épidémiologique d'un échantillon de 91 rats (Rattus norvegicus) capturés dans les égouts de Lyon*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A : Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 261 (4), 539-546.

Seijo A., Coto H., San Juan J., Videla J., Deodato B., Cernigoi B., ... & Parma, A., **2002**. *Lethal leptospiral pulmonary hemorrhage: an emerging disease in Buenos Aires, Argentina*. Emerging infectious diseases, 8 (9), 1004.

Silva J. J. P. D., Dalston M. O., Carvalho J. E. M. D., Setúbal S., Oliveira J. M. C. D., & Pereira M. M., **2002**. *Clinicopathological and immunohistochemical features of the severe pulmonary form of leptospirosis*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 35, 395-399.

Shochat E., Lerman S. B., Anderies J. M., Warren P. S., Faeth S. H., Nilon C. H., **2010**. *Invasion, competition, and biodiversity loss in urban ecosystems*. Bioscience 60: 199–208.

Socolovschi C., Angelakis E., Renvoisé A., Fournier P. E., Marié J. L., Davoust B., ... & Raoult D., **2011**. *Strikes, flooding, rats, and leptospirosis in Marseille, France*. International Journal of Infectious Diseases, 15 (10), e710-e715.

Toussaint J. F., Sailleau C., Breard E., Zientara S., & De Clercq K., 2007. *Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments*. Journal of virological methods, 140 (1-2), 115-123.

Twigg G. I., **1973**. *Rat-borne leptospirosis in wildlife and on the farm*. Mammal Review, 3 (2), 37-42.

Vanasco N. B., Sequeira M. D., Sequeira G., & Tarabla H. D., **2003**. *Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina*. Preventive veterinary medicine, 60 (3), 227–235.

Waggoner J. J., Balassiano I., Abeynayake J., Sahoo M. K., Mohamed-Hadley A., Liu Y., Vital-Brazil J. M., & Pinsky B. A., **2014**. *Sensitive real-time PCR detection of pathogenic Leptospira spp. and a comparison of nucleic acid amplification methods for the diagnosis of leptospirosis*. PloS one, 9 (11), e112356.

Warp T. G., & Turner T. B., **1940**. *Natural Infection of the Fetus with Lepiospira ieterohemorrhagiae in a Wild Rat*. American Journal of Tropical Medicine, 20, 727-730.

World Health Organization, **2003**. *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. pp 2-21. doi: 10.1590/S0036-46652003000500015.

Xue F., Yan J., & Picardeau M., **2009**. *Evolution and pathogenesis of Leptospira spp. : lessons learned from the genomes*. Microbes and infections, 11 (3), 328-333.

D. Développement d'une méthode de vidéomicroscopie couplée à un script Python pour l'évaluation du comportement motile des leptospires en présence d'inhibiteurs de la VKOR

1. Objectifs

Comme explicité précédemment, la VKOR serait indispensable au repliement et à la stabilité de certaines protéines notamment des protéines flagellaires qui sont cruciales pour l'intégrité et le bon fonctionnement du flagelle. Cette enzyme pourrait être sensible aux Anticoagulants Antivitamine K qui sont inhibiteurs de la VKORC1 des mammifères.

Ainsi, outre la caractérisation structurale *in silico* de la VKOR et la validation d'une méthode pour la caractérisation *in vitro* de son activité enzymatique, nous avons entrepris une étude qui a nécessité de mettre au point une méthode pour apprécier le comportement motile des leptospires puis, à l'avenir, évaluer l'efficacité d'inhibiteurs potentiels de la VKOR.

2. Méthodes

Partant des cultures de souches bactériennes de terrain obtenues mais aussi des souches de référence mises à notre disposition par le Laboratoire d'Analyses Vétérinaires, des échantillons ont été prélevés. Après différents temps d'incubation bien définis à 30°C, la motilité des bactéries a été observée. Pour cela, un microscope à fond noir associé à une caméra a été utilisé pour la visualisation et l'enregistrement des leptospires. Ensuite, nous avons élaboré un script Python regroupant l'intégralité de l'analyse de motilité par microscopie : choix de la zone de la vidéo à analyser, de la plage de temps et de la fréquence d'images à considérer, puis traitement de l'image pour l'identification et le suivi des leptospires.

3. Résultats principaux

Des plages d'observations ont été définies et toutes les leptospires présentes ont été prises en compte. Ensuite, les leptospires ont été regroupés en 3 catégories (selon leur type de déplacement : fixed, spinning ou mobile) et la vitesse de déplacement des leptospires du groupe mobile a été calculée, ce qui a permis d'apprécier le comportement motile des leptospires suivant le temps d'incubation. Les résultats de cette section sont consignés dans l'article 5 également en cours de finalisation.

Article 5 : Leptracker: a bioinformatics tool to automatically detect, track and calculate Leptospira motility from microscopy pictures

Après la mise au point de notre outil de suivi de motilité des leptospires, celui-ci a été utilisé pour évaluer le comportement motile des leptospires en présence d'anticoagulants. Les résultats de cette évaluation ne sont pas totalement concluants et donc seront discutés ultérieurement.

Leptracker: a bioinformatics tool to automatically detect, track and calculate *Leptospira* motility from microscopy pictures

Sionfoungo Daouda SORO, Virginie LATTARD, Angeli KODJO, Etienne BENOIT, & Nolan CHATRON*

USC 1233 RS2GP, INRAe, VetAgro Sup, Université de Lyon, 69280 Marcy l'Etoile, France

*Auteur correspondant

Keywords : Leptospirosis, motility, VKOR, inhibitor, structural interactions, therapeutic alternative

Leptracker: a bioinformatics tool to automatically detect, track and calculate Leptospira motility from microscopy pictures

Sionfoungo Daouda Soro¹, Virginie Lattard¹, Angeli Kodjo¹, Etienne Benoît¹, Nolan Chatron¹

1. USC 1233-RS2GP, VetAgro Sup, INRAE, Université de Lyon, 69280 Marcy L'Etoile, France

Abstract

Keywords

Introduction

Materials and Methods

Bacterial culture

The pathogenic strain *Leptospira interrogans* serovar icteroheamorrhagiae strain verdun, used for this study, was provided by the veterinary analysis laboratory of Vetagro-sup in Lyon, France. The cells were grown for 7 days at 30° C in liquid Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) medium until they reached the mid-exponential phase (optical density at 420 nm, approximately 0.3). The cells were observed under a dark-field microscope to assess their condition.

Microscopy analysis

At a given incubation time, 5µl of bacterial culture were collected and observed with darkfield microscope (Olympus BX 53) on which a camera (Canon EOS 250D) was connected. 20 seconds videos were recorded, focusing on different regions of each microscope slide. A recording frequency of 50 frames per second was applied, with a high-definition resolution (1280 x 720 pixels). *Leptospira* motility was then characterized using our home-developed program.

Motility analysis: Leptracker program

We developed an all-in-one Python script (v 3.2) for *Leptospira* detection, tracking and for their motility calculation. Some requirements have to be complied with before running the code: the three libraries Skimage, Numpy and Matplotlib need to be implemented. Skimage is used for movies conversion into binary black and white pictures; Numpy is essential for pictures conversion into arrays then pixels processing (for *Leptospira* recognition, tracking and motility calculation); Matplotlib is required to generate graphical outputs as results of motility calculation. Finally, the program can (for the time being) only be executed on a Linux computer.

The code can be split into three main steps:

- 1- indication of the movie to consider and the parameters used for the analysis
- 2- pictures extraction and processing, *Leptospira* detection and tracking, motility calculation
- 3- graphical and table outputs generation

Step 1: Analysis parameters selection

The user is prompted to input all the required data for Leptracker analysis:

- extension and name of the video to be analysed
 - duration (in seconds) and number of frames per second to consider
- Once this information has been indicated, the program automatically displays the first frame with pixels numbering, so that the user can select an area of interest. This is done by entering:
- the x and y positions of the upper left pixel of the selected area (distances towards the frame left and top boundaries, respectively)
 - the width (x dimension) and height (y dimension) of the area of interest (in pixels).

An example of input data is shown in Figure 1 and will be kept for further illustrations.

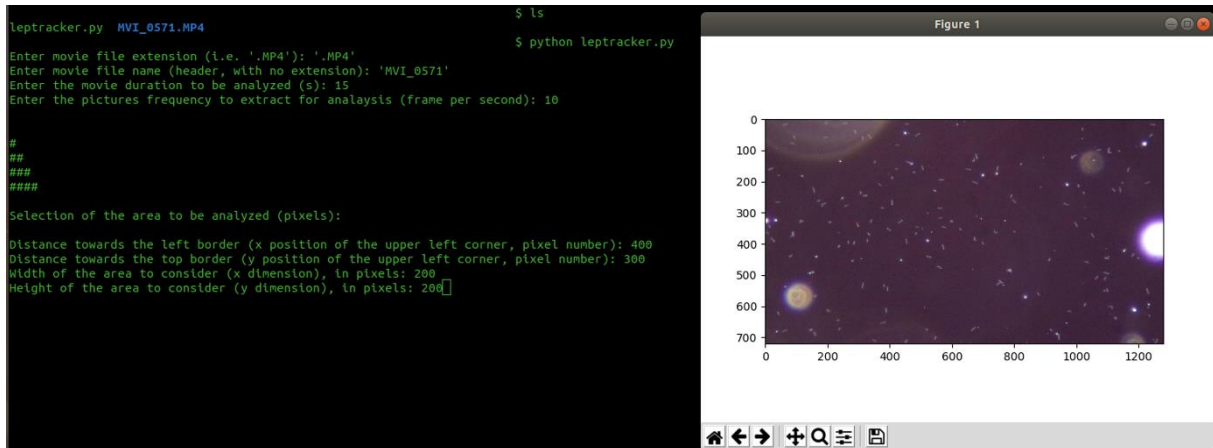


Figure 1: analysis parameters required for Leptracker, interactively entered by the user.

Step 2: Video processing, Leptospira tracking, motility calculation (core of the algorithm)

Once all the analysis parameters have been specified, the program starts to automatically process the video to consider. This involves several intermediate stages:

- frames extraction according to the desired frequency and duration (this operation is not shown)
- frames cropping to focus on the selected area of interest (a counter is displayed to enable the user to follow this stage progression, Figure 2)

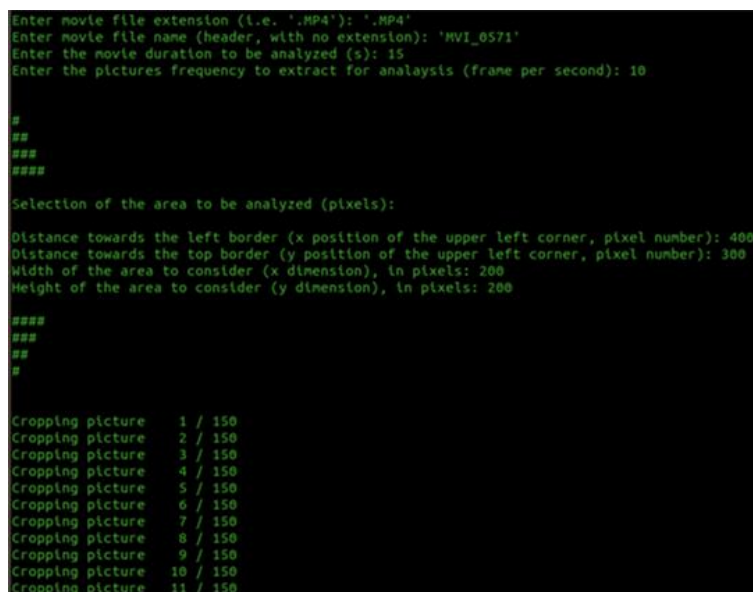


Figure 2: Counter to follow the progression of frames cropping, according to the selected parameters.

- *Leptospira* detection: each cropped frame is converted into a strictly black (background) and white (*Leptospira*) picture (Figure 3). The *Triangle threshold* of Skimage is used, since it gives the best discrimination between *Leptospira* and the dark field background (Supporting Information, Figure S1). *Leptospira* are enhanced after picture filtering, to prevent white dots disruption in case of low contrast: each white pixel is extended to the eight neighbouring pixels (Figure 3C). Then, the geometrical centre of each white dot (*Leptospira*) is identified (Figure 3C and 3D) and its coordinates are stored in an array (Figure 3E), for all cropped frames. Only dots over 30 pixels² are considered, to rule out dust. Each analysed frame is stored as a picture then combined with the native and the black-and-white-filtered pictures (Figure 4), then finally assembled into a single movie (Supporting Information, Figure S2)

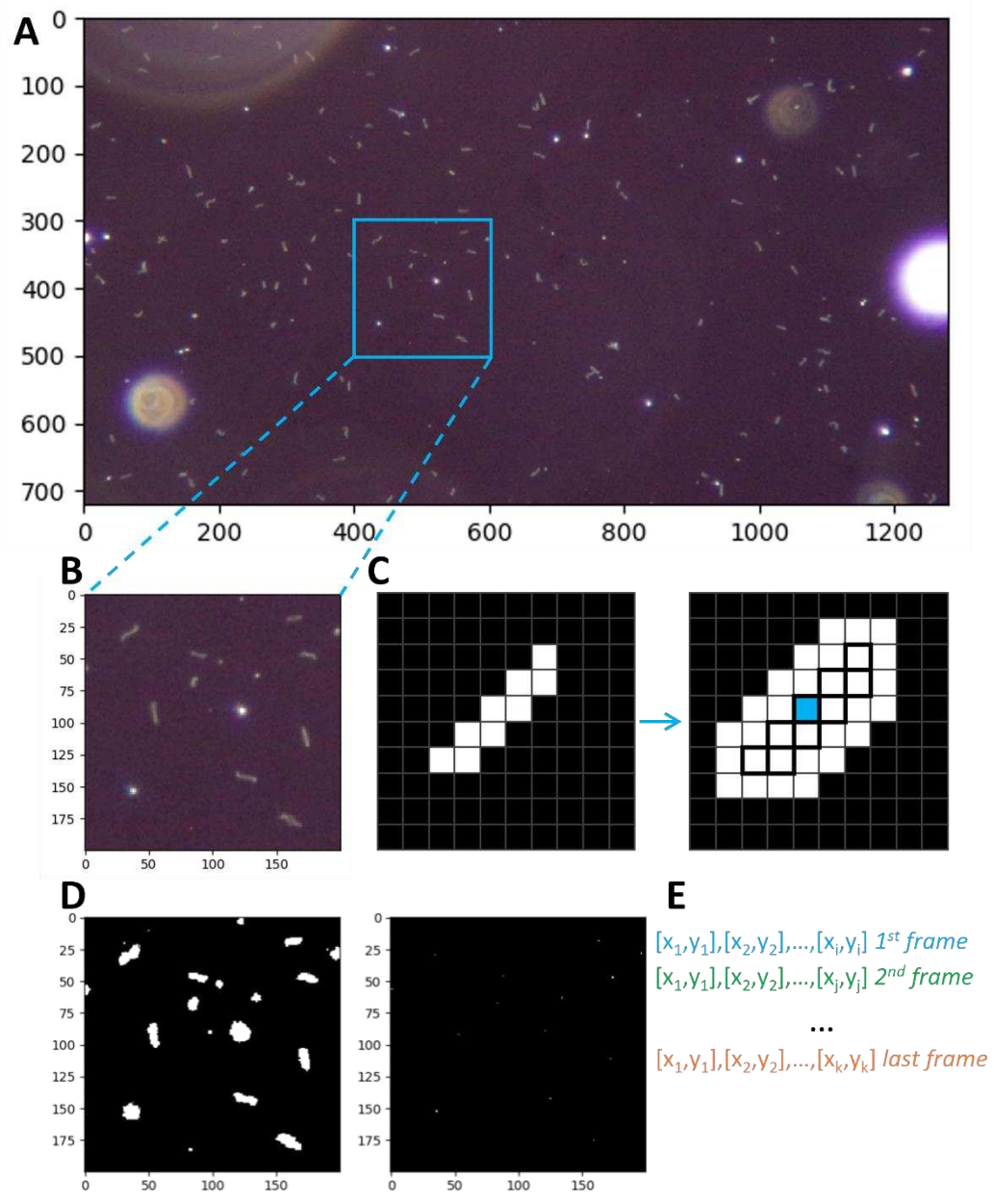


Figure 3:

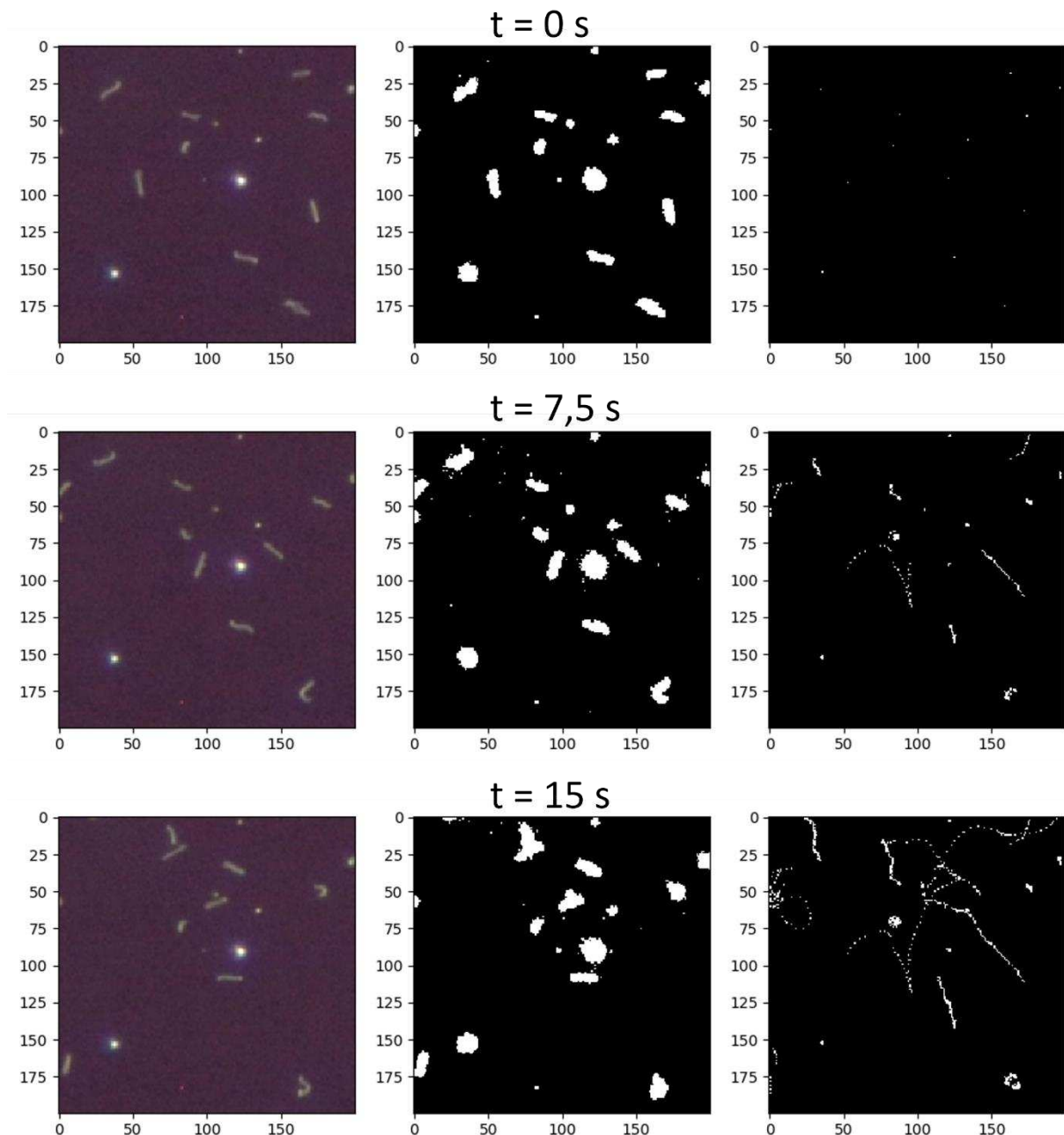


Figure 4:

- *Leptospira* trajectories reconstruction: a closest neighbour algorithm is applied to the previously generated array. Starting from the upper left corner of the first frame, each analysed frame is screened until white dot (corresponding to a *Leptospira* geometrical centre) is found (Figure 5). Whereupon the corresponding *Leptospira* is searched on the next frame, in a restricted area (10 pixels around the dot, in our case, to save calculations time), then the two detected dots are bound between the two frames (coordinates are stored in a new array, which is then used for explorer area, covered distance and speed calculations). If two or many dots are detected in the surrounding area, the closest one is automatically picked (Figure 5). This step is repeated until no more dot is detected, then the algorithm restarts from the second *Leptospira* detected on the first frame, and so on until all the *Leptospira* detected over all the frames have been evaluated.

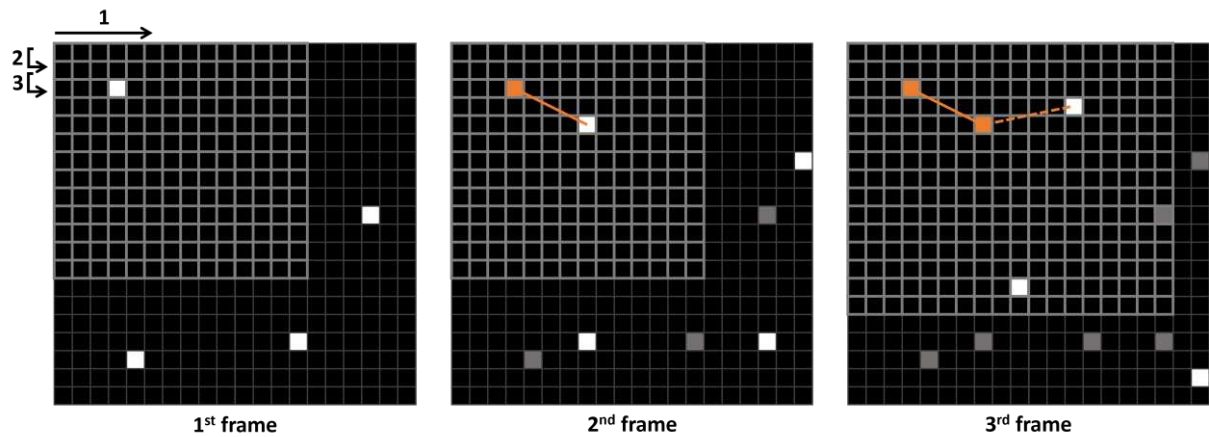


Figure 5:

- *Leptospira* classification and speed calculation: only *Leptospira* that are detected at least half the time are considered (in our case, 7.5 seconds for a 15 second video). First, *Leptospira* are categorized depending on their movement patterns (Figure 6), based on two parameters: the explored area (A , in pixels) and the ratio of the covered distance (D) over the area (A), named rD/A . If $A \leq 30$ and $rD/A \geq 4$, the *Leptospira* is defined as fixed (Figure 6C). If $A \leq 200$ and $rD/A \leq 4$, the *Leptospira* is considered as spinning (Figure 6D). If $A > 200$ and $rD/A \leq 0.5$, the *Leptospira* is classified as mobile (Figure 6B). Finally, if a *Leptospira* does not fit to any group, it remains as “undefined”. Once this analysis has been performed, pixels distances are converted into μm , based on a Neubauer cell dimensions (Figure 7), then each individual *Leptospira* speed is calculated, as well as the average of the mobile population. A counter is displayed to follow the overall analysis step (Figure 8).

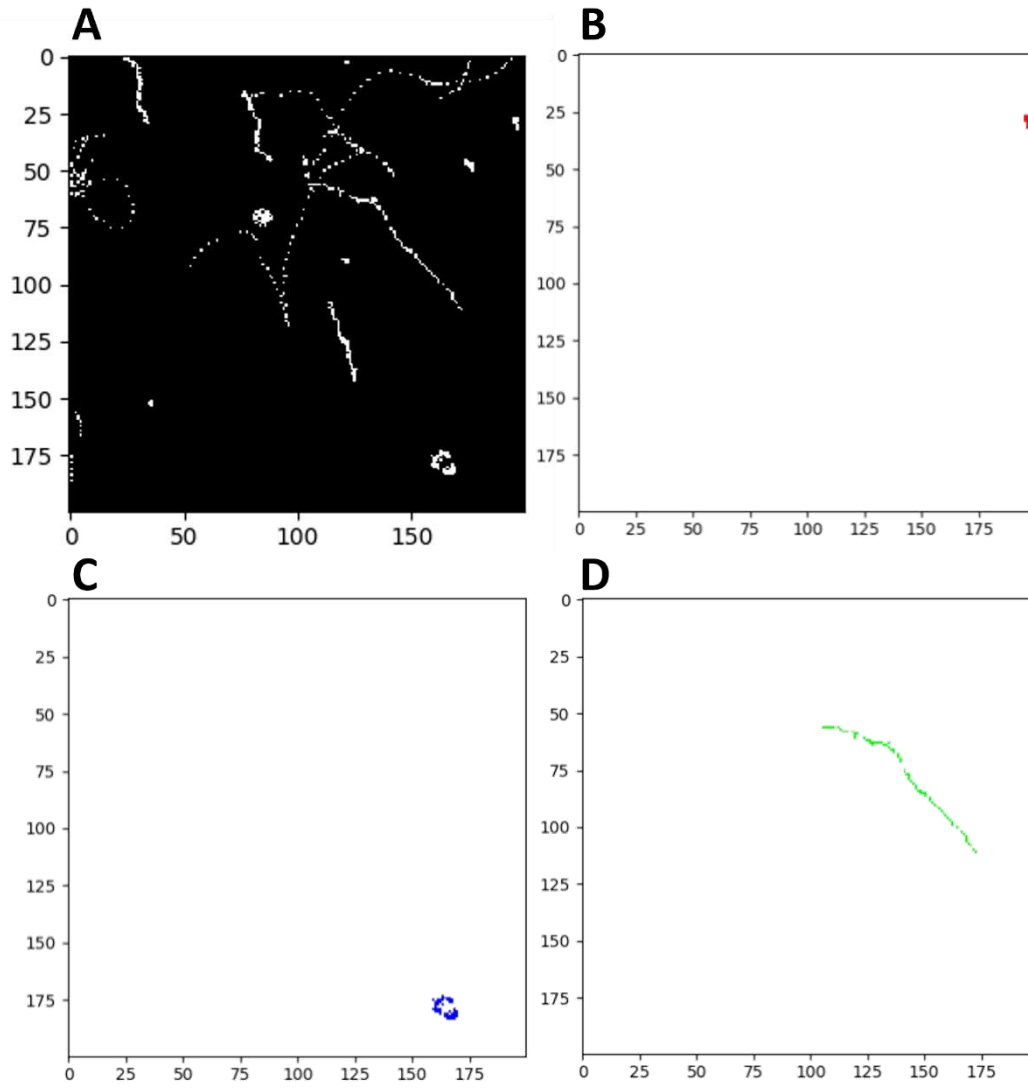


Figure 6:

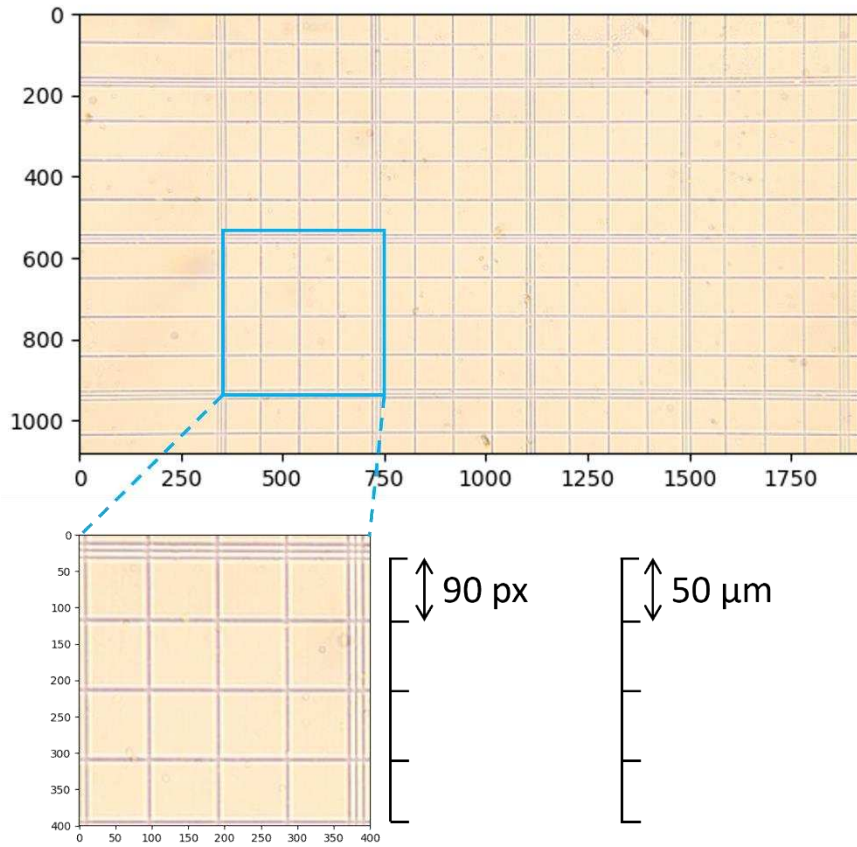


Figure 7:

```

Cropping picture 145 / 150
Cropping picture 146 / 150
Cropping picture 147 / 150
Cropping picture 148 / 150
Cropping picture 149 / 150
Cropping picture 150 / 150
Analyzing picture 1 / 150
Analyzing picture 2 / 150
Analyzing picture 3 / 150
Analyzing picture 4 / 150
Analyzing picture 5 / 150
Analyzing picture 6 / 150
Analyzing picture 7 / 150
Analyzing picture 8 / 150
Analyzing picture 9 / 150
Analyzing picture 10 / 150
Analyzing picture 11 / 150
Analyzing picture 12 / 150
Analyzing picture 13 / 150
Analyzing picture 14 / 150
Analyzing picture 15 / 150
Analyzing picture 16 / 150

```

Figure 8:

Step 3: Graphical and table outputs generation

Once all the video has been processed, a picture reporting the trajectory of each single detected *Leptospira* is generated using Matplotlib, with the calculated speed mentioned. An overview picture of all the *Leptospira*, the proportion of fixed, spinning and mobile ones, as well as the average speed of the mobile group is also produced. Finally, a summary table (csv format) is written, containing the same information as numerical data, as well as the analysis parameters. All these outputs are automatically generated. Examples of graphical and table outputs are shown in the Results section. A short summary of the analysed *Leptospira* and the total calculation time are displayed at the end of this step (Figure 9).

```
Analyzing picture 147 / 150
Analyzing picture 148 / 150
Analyzing picture 149 / 150
Analyzing picture 150 / 150
Analyzing leptospira n° 1 ...
Analyzing leptospira n° 2 ...
Analyzing leptospira n° 3 ...
Analyzing leptospira n° 4 ...
Analyzing leptospira n° 5 ...
Analyzing leptospira n° 6 ...
Analyzing leptospira n° 7 ...
Analyzing leptospira n° 8 ...
Analyzing leptospira n° 9 ...
Analyzing leptospira n° 10 ...
Analyzing leptospira n° 11 ...
  11 leptospira identified
  4 fixed (36.36 %)
  2 rotating (18.18 %)
  5 mobile (45.45 %)
  0 undefined (0.00 %)
Average speed (calculated on mobile leptospira only): 9.41 +/- 6.04 um/s
Calculation time = 490 seconds
```

Figure 9:

Results & Discussion

Our program has been tested on 19 video samples, with a selected interest area of 200 x 200 pixels for each one. On the first video, 11 *Leptospira* were detected, including 4 fixed, 2 spinning and 5 mobiles, respectively accounting for 36 %, 18 % and 45 % of the detected *Leptospira*. Mobile *Leptospira* revealed and average speed of $5.23 \pm 3.36 \mu\text{m/s}$ and ranked from $2.71 \mu\text{m/s}$ to $11.72 \mu\text{m/s}$. These data were recorded as numerical (Table 1), which allows the user to carry out statistical analyses or generate graphical representations of the obtained values. Output pictures of each *Leptospira* trajectory, classification and speed were also generated, as well as an overview picture that summarized the distinct groups proportions and the average speed calculated for mobile *Leptospira* (Figure 10).

Analysis paramaters			
Movie	MVI_0571.MP4		
Duration (s)	15		
Number of picture/second	10		
Analyzed area (pixels)	Upper left corner x	400	
	Upper left corner y	300	
	Width	200	
	Height	200	
Distance cutoff (pixels)	10		
Identified Leptospira			
Number	Type	Speed (um/s)	
1	Mobile	2.71	
2	Fixed	3.46	
3	Mobile	3.93	
4	Fixed	2.97	
5	Spinning	6.54	
6	Fixed	2.13	
7	Mobile	5.00	
8	Mobile	2.77	
9	Fixed	0.52	
10	Spinning	4.16	
11	Mobile	11.72	
Summary			
11 leptospira identified	Fixed	4	36.36 %
	Spinning	2	18.18 %
	Mobile	5	45.45 %
	Undefined	0	0.00 %
Average speed	$5.23 \pm 3.36 \mu\text{m/s}$ (calculated on mobile leptospira only)		

Table 1:

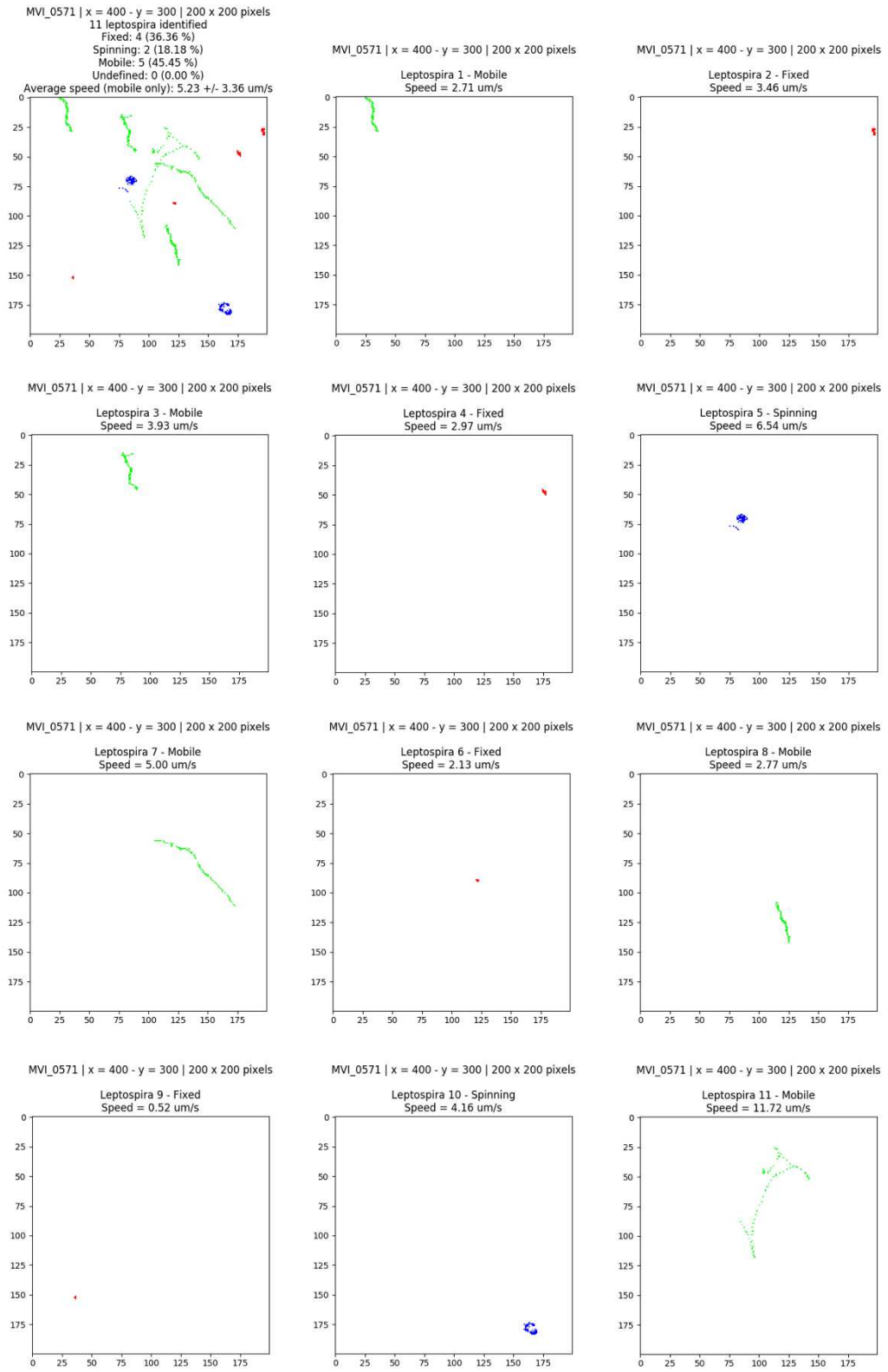


Figure 10:

A total of 150 *Leptospira* have been detected, tracked and analysed over the 19 processed videos. Obtained results revealed 16 % of fixed *Leptospira*, 20 % of spinning, 61 % of mobiles and 3 % of undefined ones. The average speed was of $7.16 \pm 1.70 \mu\text{m/s}$ for the mobile ones (Table 2). Unidentified *Leptospira* therefore accounted for only 3% of all the bacteria analysed, which meant that our three defined categories have been suitably calibrated. These unidentified movements corresponded to an intermediate category between spinning and mobile bacteria (Supporting Information, Figure S2).

Overview		
150 leptospira identified		
Fixed	24	16.00 %
Spinning	30	20.00 %
Mobile	91	60.67 %
Undefined	5	3.33 %
Average speed	7.16 +/- 1.70 $\mu\text{m/s}$	(calculated on mobile <i>Leptospira</i> only)

Table 2:

Classification of *Leptospira* according to their motion style (fixed, spinning or mobile) has already been performed (Guo 2012) but was visibly carried out by hand. Such an analysis appeared to be useful for distinct proportions monitoring in various media or after addition of a tested compound that could act on *Leptospira* motility. Thus, one improvement brought by our Leptracker program is the automatic classification of *Leptospira* as fixed, spinning or mobile, timesaving for the user. The individual speed calculation also allows manual refinement in case of misclassification: one can easily pick a given *Leptospira* from a group to another and fine-tune groups proportions and average speed of mobiles *Leptospira*, using numerical data from the generated table.

However, one major case remains to be addressed in our algorithm, where 2 *Leptospira* cross paths on a video. In such a situation, they form a single white dot and are so considered as a unique *Leptospira*, which interrupts their trajectories reconstruction step: one will still be tracked, but the trajectory of the second one will be split into two separate paths, so considered as two distinct *Leptospira*. This issue could be address by including previous direction information into the trajectory reconstruction step, that would also increase the calculations time.

In another hand, the algorithm has been set to process HD video (1280 x 720 pixels) in the present study, which then conditioned the various analyses: threshold size for *Leptospira* detection, neighbour searching area, distances and areas covered and therefore definition of groups and calculation of speeds. So, if one would use the program to process some different resolution videos (Full HD, 4K, 480p, ...), a scale adjustment for pixel to μm conversion would be required. The issue might be addressed in a future update by including a resolution normalization, so the user would be prompted to indicate the movie resolution at the beginning of the program execution. In this way, all the previously mentioned parameters would be adapted according to the resolution.

On the other hand, our program has several advantages over other methods used in the literature. Firstly, it is an all-in-one system, performing all stages from selection of the area to be analyzed, through image processing, *Leptospira* tracking and speed calculation, to the final step of generating results. There is therefore no need for multiple software packages to process the images and perform the calculations, as is the case with the Visual Basic Applications macro developed for Excel (Takabe 2012, Tahara 2018), which requires pre-processing often carried out via ImageJ (Xu 2020, Guo 2012, Jackson 2018). Secondly, it is independent of the video capture system and microscope used, and can therefore analyze any video format, which is not always the case (Wunder 2018). In addition, although our program is less visually appealing than other software (Wunder 2018), the image processing algorithm used is based on picture contrast and not on the detection of a particular color. The program could thus be extended to the study of other microorganisms, involving other microscopy techniques (fluorescence, for example). This algorithm also enables Leptracker to be effective on rough and low-

contrast images. Finally, although Leptracker can currently only be run on Linux, it uses exclusively free libraries and therefore requires no license to be applied or modified.

With the current advent of artificial intelligence, it appears as obvious that a deep learning algorithm would outperform the results obtained with the method developed here. However, the lack of data compared with other areas of medical imaging (i.e., radiology or cytometry) makes this approach rather hard to implement at the present time.

Conclusion

The Leptracker program enables the user to select an area to be analyzed from any microscopy video, then automatically processes the images, identifies and tracks the present *Leptospira*, and finally calculates their speeds and classifies them according to their type of movement. All these steps are included in a single, free program, modifiable to the user's needs. Our algorithm for classifying *Leptospira* according to their type of movement (fixed, spinning, mobile) proved particularly effective, with only 3% of undefined bacteria. Leptracker also came with drawbacks, which are summarized along with the advantages in the Table 3.

Advantages	Drawbacks
all-in-one: choice of area of interest, image processing, <i>Leptospira</i> tracking, speed calculation, automatic classification according to movement type	only available under Linux (for the time being)
independent of microscopy and video capture systems	no graphical interface (for now), less accurate and visually less attractive than Carl Zeiss AxioVision system (Wunder 2018)
free, manually configurable (threshold size for <i>Leptospira</i> detection, closest neighbour search distance, filter based on image appearance time)	trajectory disruption when two <i>Leptospira</i> cross paths
works on low-contrast or poor-quality images	calibrated on HD videos (1280 x 720 pixels) and a given strain of <i>Leptospira</i> (<i>interrogans</i>): threshold parameter of limit size detection, classification of movements to be normalized according to the species studied and video resolution (this last point may be rectified in a future update)
summary and detailed analysis of the studied <i>Leptospira</i> automatically generated in digital, image and video formats	

Table 3. Advantages and drawbacks of the Mapping of Atom Densities algorithm.

The Leptracker method therefore has a clearly defined field of application: detecting, tracking, calculating *Leptospira* speed and classifying them according to their movement patterns, from dark-field microscopy videos. One of the main applications of Leptracker would be the investigation of a medium composition or a given substance impact on *Leptospira* motility, that could either change the proportions of fixed, spinning or mobile ones or modify their speed. Since the detection algorithm is based on contrast and independent from the colours, the Leptracker program could be adapted to the study of other microorganisms implying other microscopy techniques, until some AI algorithm would be available.

Supporting Information

Figure S1:

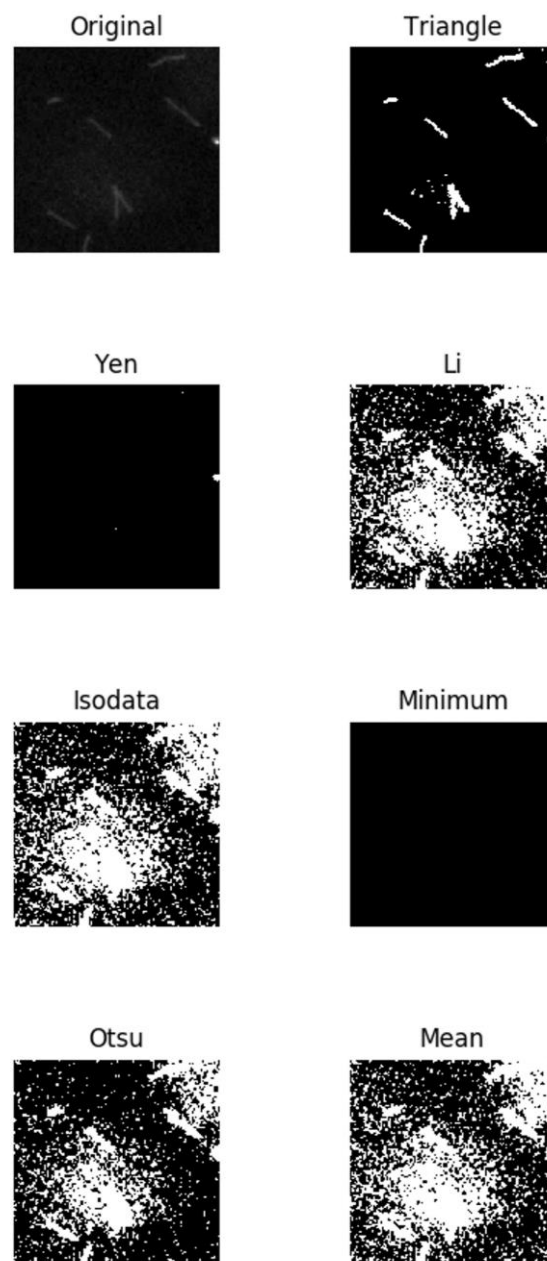
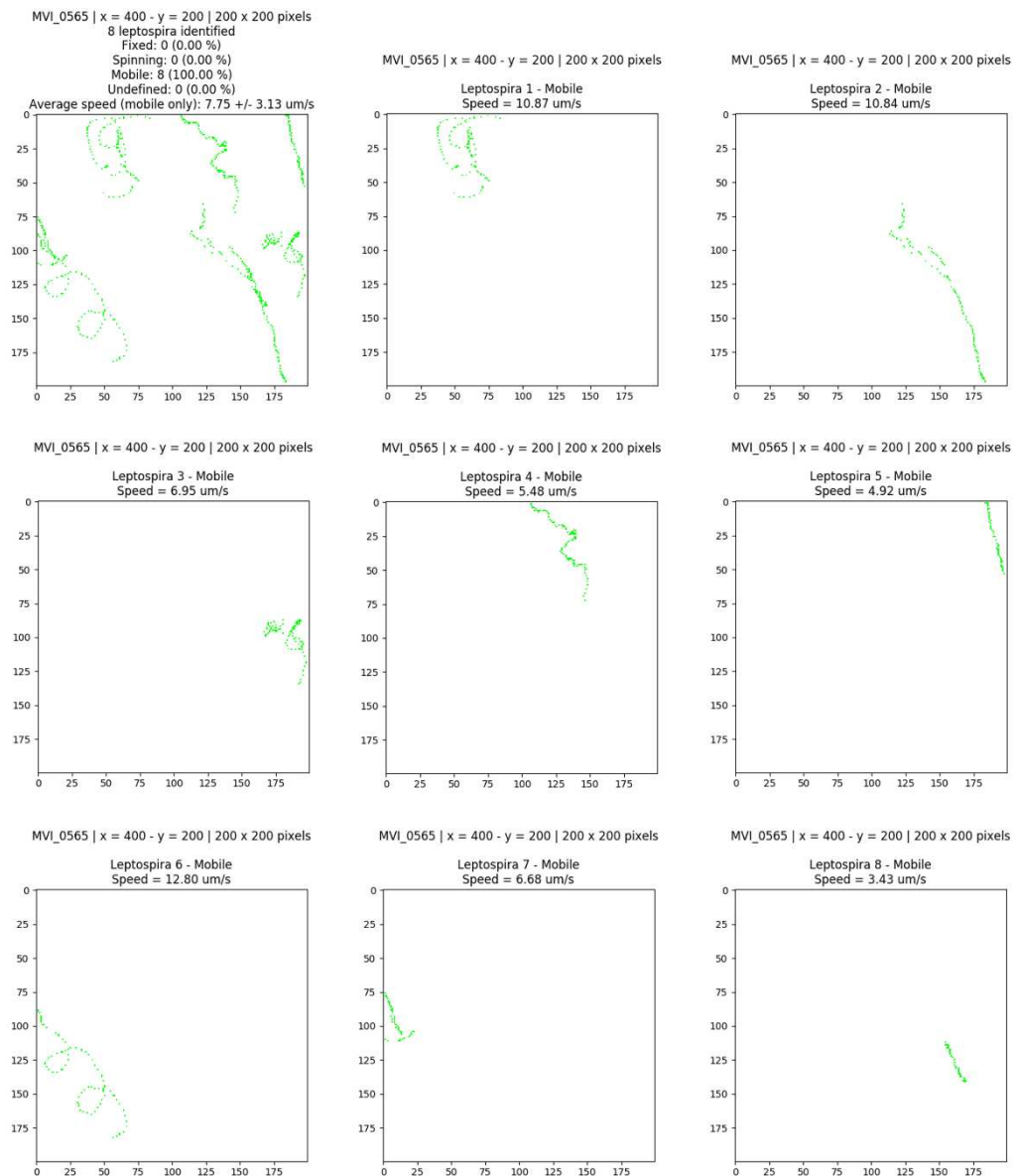
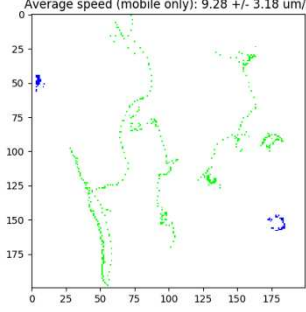


Figure S2 :

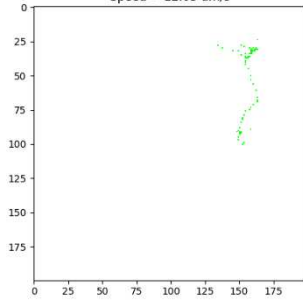


MVI_0565 | x = 700 - y = 300 | 200 x 200 pixels
8 leptospira identified
Fixed: 0 (0.00 %)
Spinning: 2 (25.00 %)
Mobile: 6 (75.00 %)
Undefined: 0 (0.00 %)
Average speed (mobile only): 9.28 +/- 3.18 um/s



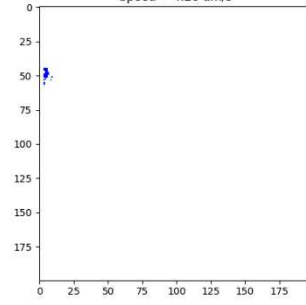
MVI_0565 | x = 700 - y = 300 | 200 x 200 pixels

Leptospira 1 - Mobile
Speed = 12.05 um/s



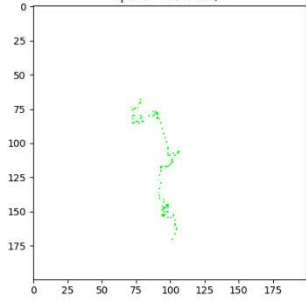
MVI_0565 | x = 700 - y = 300 | 200 x 200 pixels

Leptospira 2 - Spinning
Speed = 4.28 um/s



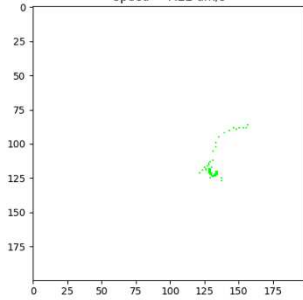
MVI_0565 | x = 700 - y = 300 | 200 x 200 pixels

Leptospira 3 - Mobile
Speed = 8.46 um/s



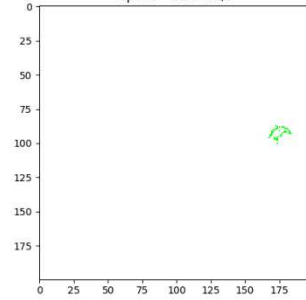
MVI_0565 | x = 700 - y = 300 | 200 x 200 pixels

Leptospira 4 - Mobile
Speed = 7.22 um/s



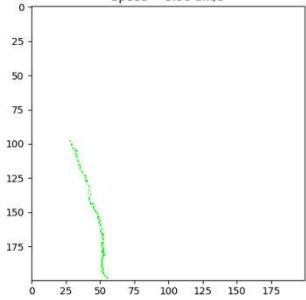
MVI_0565 | x = 700 - y = 300 | 200 x 200 pixels

Leptospira 5 - Mobile
Speed = 7.03 um/s



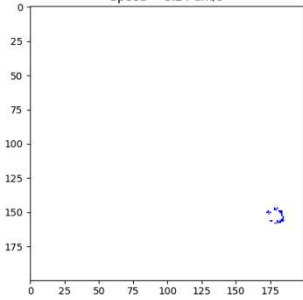
MVI_0565 | x = 700 - y = 300 | 200 x 200 pixels

Leptospira 6 - Mobile
Speed = 5.96 um/s



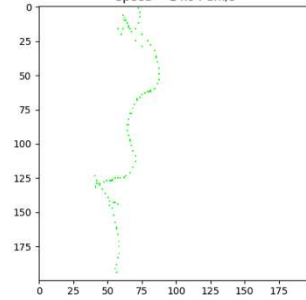
MVI_0565 | x = 700 - y = 300 | 200 x 200 pixels

Leptospira 7 - Spinning
Speed = 8.24 um/s

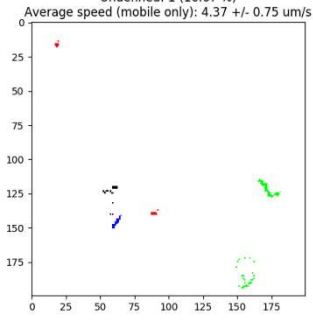


MVI_0565 | x = 700 - y = 300 | 200 x 200 pixels

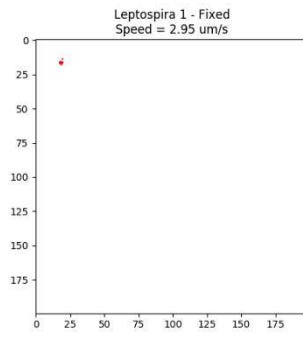
Leptospira 8 - Mobile
Speed = 14.94 um/s



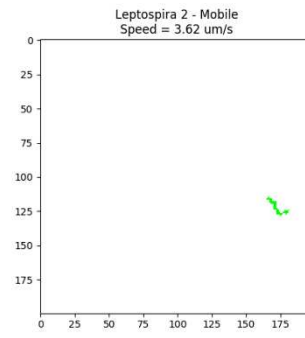
MVI_0566 | x = 400 - y = 300 | 200 x 200 pixels
6 leptospira identified
Fixed: 2 (33.33 %)
Spinning: 1 (16.67 %)
Mobile: 2 (33.33 %)
Undefined: 1 (16.67 %)



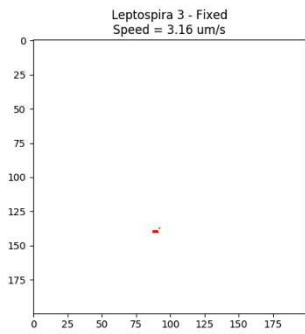
MVI_0566 | x = 400 - y = 300 | 200 x 200 pixels



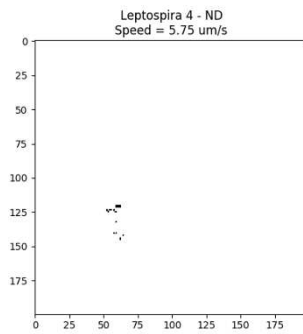
MVI_0566 | x = 400 - y = 300 | 200 x 200 pixels



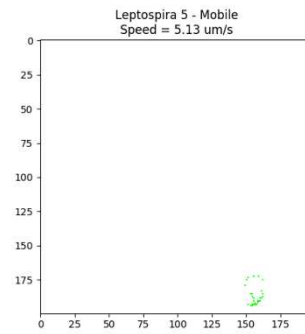
MVI_0566 | x = 400 - y = 300 | 200 x 200 pixels



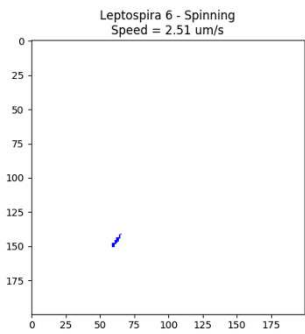
MVI_0566 | x = 400 - y = 300 | 200 x 200 pixels



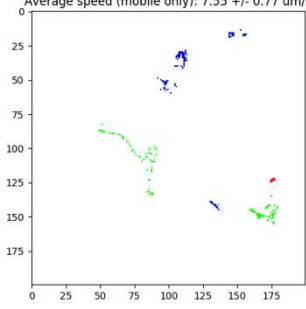
MVI_0566 | x = 400 - y = 300 | 200 x 200 pixels



MVI_0566 | x = 400 - y = 300 | 200 x 200 pixels

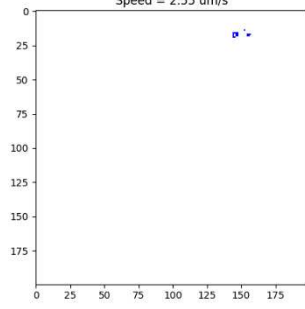


MVI_0566 | x = 700 - y = 400 | 200 x 200 pixels
7 leptospira identified
Fixed: 1 (14.29 %)
Spinning: 4 (57.14 %)
Mobile: 2 (28.57 %)
Undefined: 0 (0.00 %)
Average speed (mobile only): 7.55 +/- 0.77 um/s



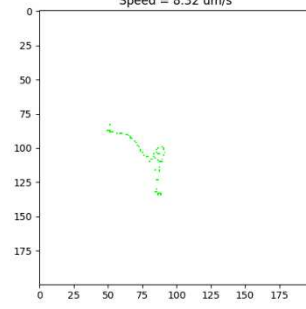
MVI_0566 | x = 700 - y = 400 | 200 x 200 pixels

Leptospira 1 - Spinning
Speed = 2.55 um/s



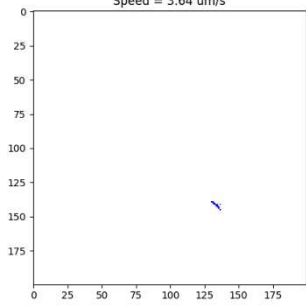
MVI_0566 | x = 700 - y = 400 | 200 x 200 pixels

Leptospira 2 - Mobile
Speed = 8.32 um/s



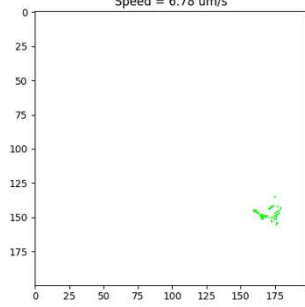
MVI_0566 | x = 700 - y = 400 | 200 x 200 pixels

Leptospira 3 - Spinning
Speed = 3.64 um/s



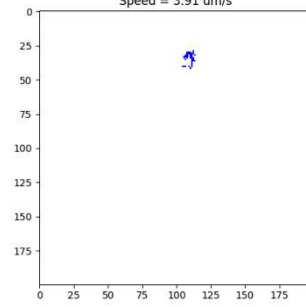
MVI_0566 | x = 700 - y = 400 | 200 x 200 pixels

Leptospira 4 - Mobile
Speed = 6.78 um/s



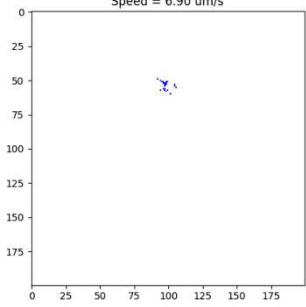
MVI_0566 | x = 700 - y = 400 | 200 x 200 pixels

Leptospira 5 - Spinning
Speed = 3.91 um/s



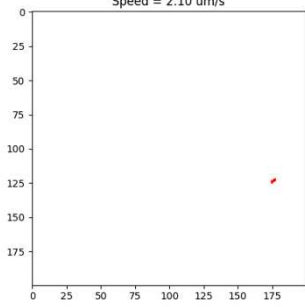
MVI_0566 | x = 700 - y = 400 | 200 x 200 pixels

Leptospira 6 - Spinning
Speed = 6.90 um/s

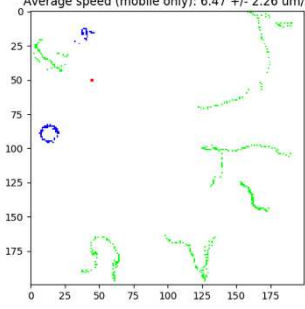


MVI_0566 | x = 700 - y = 400 | 200 x 200 pixels

Leptospira 7 - Fixed
Speed = 2.10 um/s

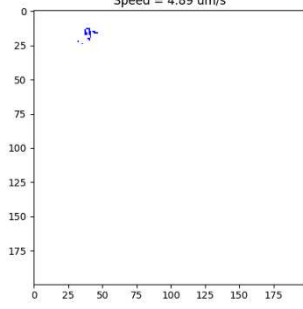


MVI_0566 | x = 800 - y = 200 | 200 x 200 pixels
9 leptospira identified
Fixed: 1 (11.11 %)
Spinning: 2 (22.22 %)
Mobile: 6 (66.67 %)
Undefined: 0 (0.00 %)
Average speed (mobile only): 6.47 +/- 2.26 um/s



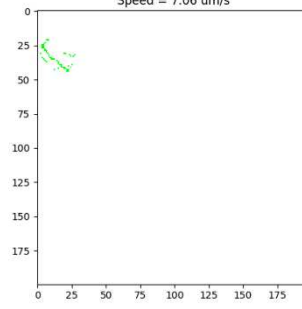
MVI_0566 | x = 800 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 1 - Spinning
Speed = 4.89 um/s



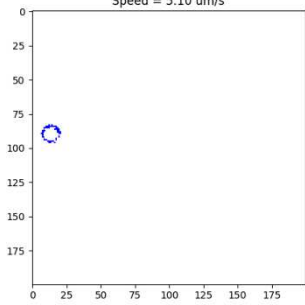
MVI_0566 | x = 800 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 2 - Mobile
Speed = 7.06 um/s



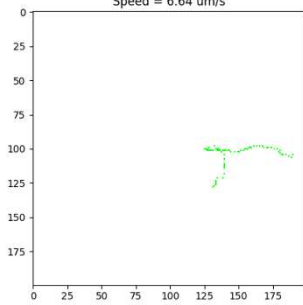
MVI_0566 | x = 800 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 3 - Spinning
Speed = 5.10 um/s



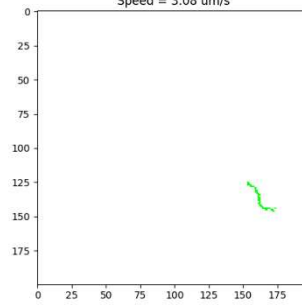
MVI_0566 | x = 800 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 4 - Mobile
Speed = 6.64 um/s



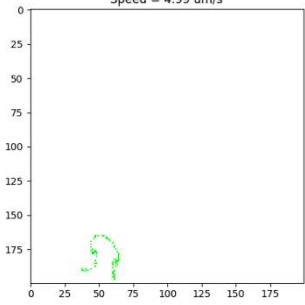
MVI_0566 | x = 800 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 5 - Mobile
Speed = 3.08 um/s



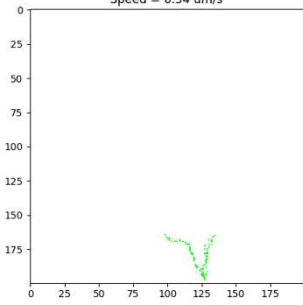
MVI_0566 | x = 800 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 6 - Mobile
Speed = 4.99 um/s



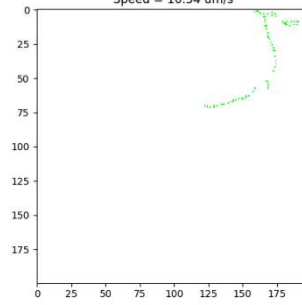
MVI_0566 | x = 800 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 7 - Mobile
Speed = 6.54 um/s



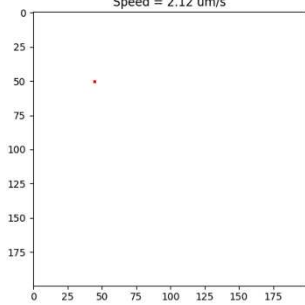
MVI_0566 | x = 800 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 8 - Mobile
Speed = 10.54 um/s

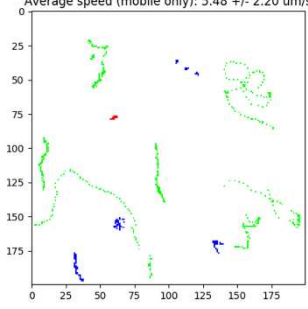


MVI_0566 | x = 800 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 9 - Fixed
Speed = 2.12 um/s

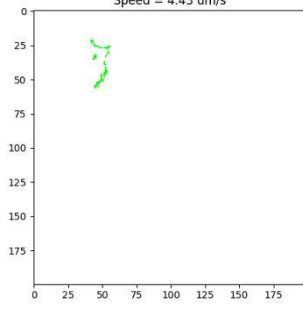


MVI_0571 | x = 200 - y = 200 | 200 x 200 pixels
12 leptospira identified
Fixed: 1 (8.33%)
Spinning: 4 (33.33%)
Mobile: 7 (58.33%)
Undefined: 0 (0.00%)
Average speed (mobile only): 5.48 +/- 2.20 um/s



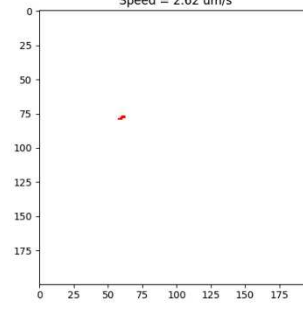
MVI_0571 | x = 200 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 1 - Mobile
Speed = 4.43 um/s



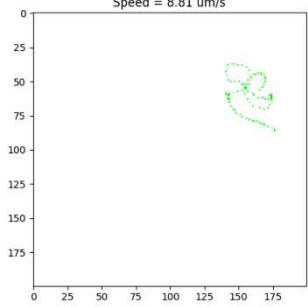
MVI_0571 | x = 200 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 2 - Fixed
Speed = 2.62 um/s



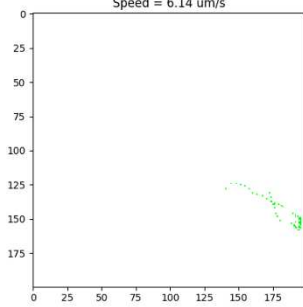
MVI_0571 | x = 200 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 3 - Mobile
Speed = 8.81 um/s



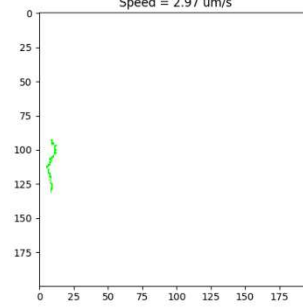
MVI_0571 | x = 200 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 4 - Mobile
Speed = 6.14 um/s



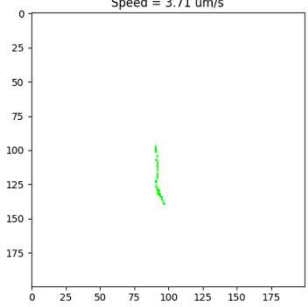
MVI_0571 | x = 200 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 5 - Mobile
Speed = 2.97 um/s



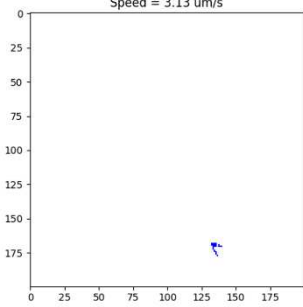
MVI_0571 | x = 200 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 6 - Mobile
Speed = 3.71 um/s



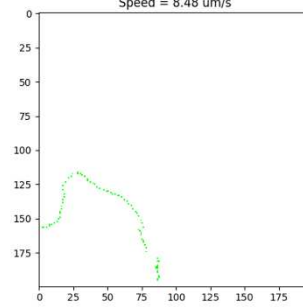
MVI_0571 | x = 200 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 7 - Spinning
Speed = 3.13 um/s



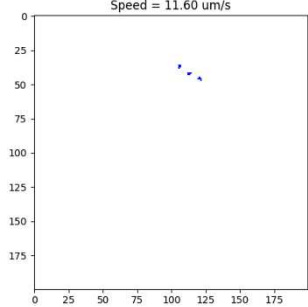
MVI_0571 | x = 200 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 8 - Mobile
Speed = 8.48 um/s



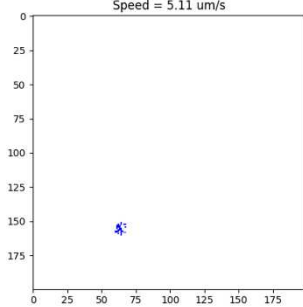
MVI_0571 | x = 200 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 9 - Spinning
Speed = 11.60 um/s



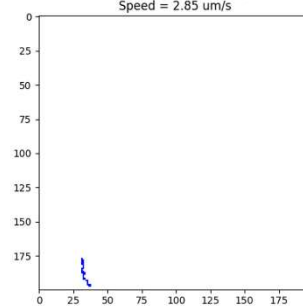
MVI_0571 | x = 200 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 10 - Spinning
Speed = 5.11 um/s



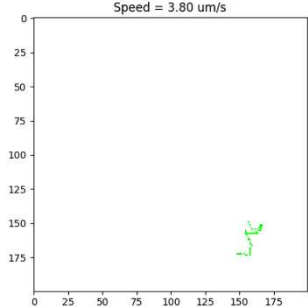
MVI_0571 | x = 200 - y = 200 | 200 x 200 pixels

Leptospira 11 - Spinning
Speed = 2.85 um/s

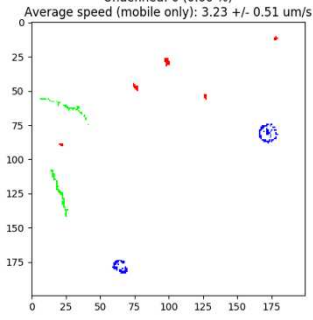


MVI_0571 | x = 200 - y = 200 | 200 x 200 pixels

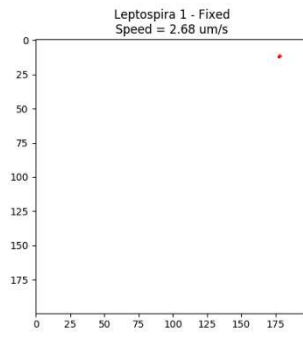
Leptospira 12 - Mobile
Speed = 3.80 um/s



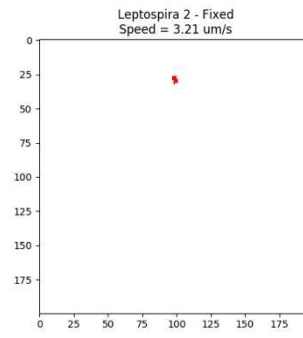
MVI_0571 | x = 500 - y = 300 | 200 x 200 pixels
9 leptospira identified
Fixed: 5 (55.56 %)
Spinning: 2 (22.22 %)
Mobile: 2 (22.22 %)
Undefined: 0 (0.00 %)



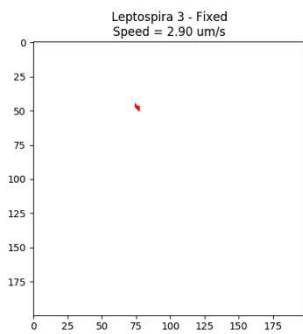
MVI_0571 | x = 500 - y = 300 | 200 x 200 pixels



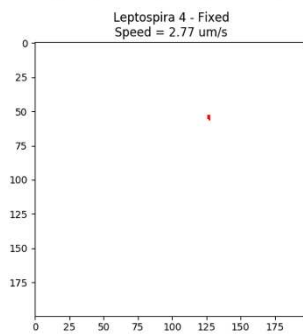
MVI_0571 | x = 500 - y = 300 | 200 x 200 pixels



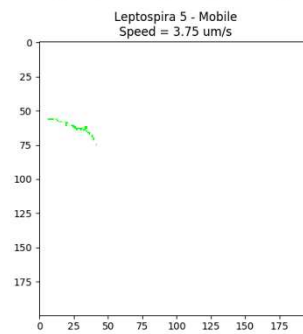
MVI_0571 | x = 500 - y = 300 | 200 x 200 pixels



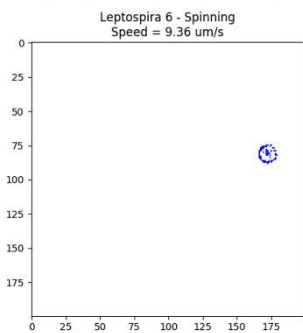
MVI_0571 | x = 500 - y = 300 | 200 x 200 pixels



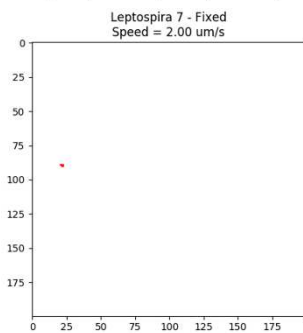
MVI_0571 | x = 500 - y = 300 | 200 x 200 pixels



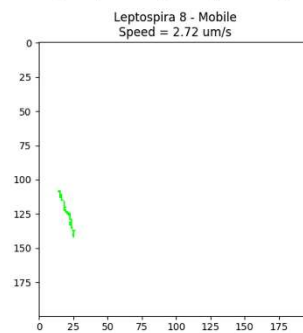
MVI_0571 | x = 500 - y = 300 | 200 x 200 pixels



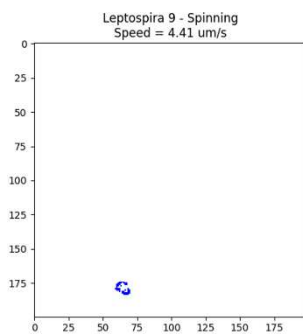
MVI_0571 | x = 500 - y = 300 | 200 x 200 pixels



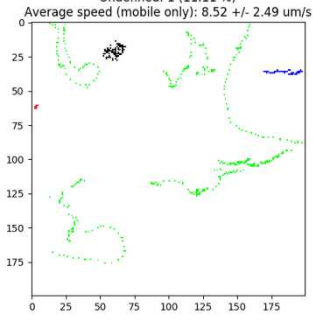
MVI_0571 | x = 500 - y = 300 | 200 x 200 pixels



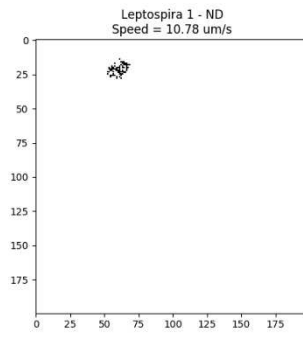
MVI_0571 | x = 500 - y = 300 | 200 x 200 pixels



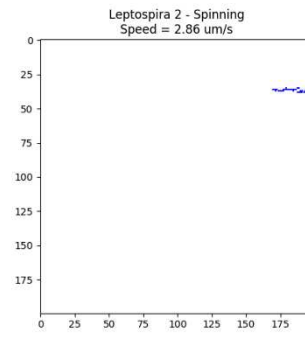
MVI_0575 | x = 200 - y = 50 | 200 x 200 pixels
9 leptospira identified
Fixed: 1 (11.11 %)
Spinning: 1 (11.11 %)
Mobile: 6 (66.67 %)
Undefined: 1 (11.11 %)



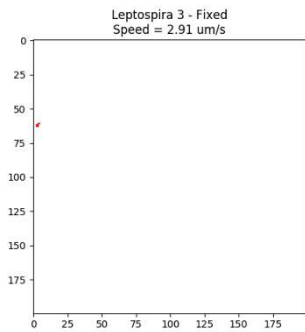
MVI_0575 | x = 200 - y = 50 | 200 x 200 pixels



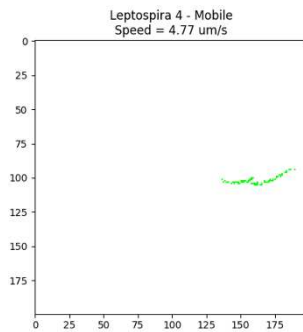
MVI_0575 | x = 200 - y = 50 | 200 x 200 pixels



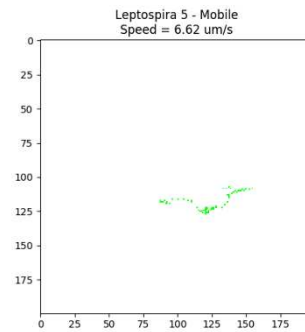
MVI_0575 | x = 200 - y = 50 | 200 x 200 pixels



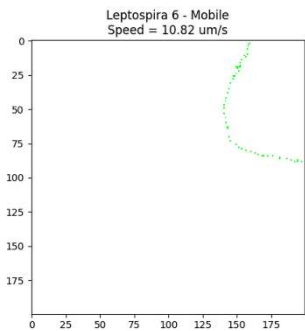
MVI_0575 | x = 200 - y = 50 | 200 x 200 pixels



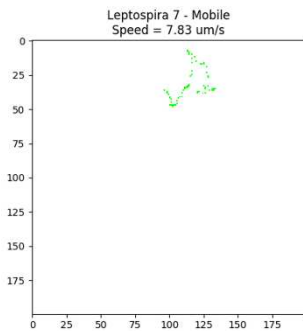
MVI_0575 | x = 200 - y = 50 | 200 x 200 pixels



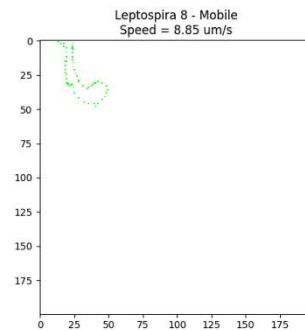
MVI_0575 | x = 200 - y = 50 | 200 x 200 pixels



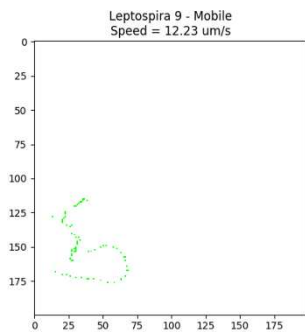
MVI_0575 | x = 200 - y = 50 | 200 x 200 pixels



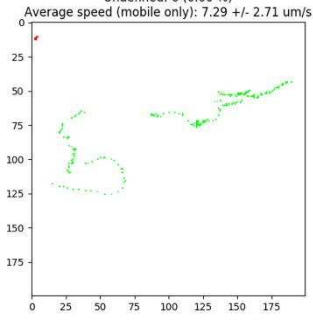
MVI_0575 | x = 200 - y = 50 | 200 x 200 pixels



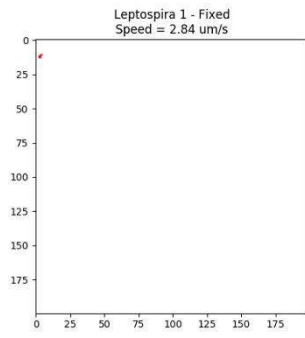
MVI_0575 | x = 200 - y = 50 | 200 x 200 pixels



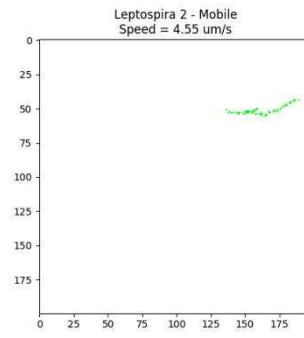
MVI_0575 | x = 200 - y = 100 | 200 x 200 pixels
4 leptospira identified
Fixed: 1 (25.00 %)
Spinning: 0 (0.00 %)
Mobile: 3 (75.00 %)
Undefined: 0 (0.00 %)



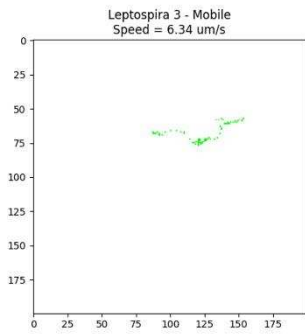
MVI_0575 | x = 200 - y = 100 | 200 x 200 pixels



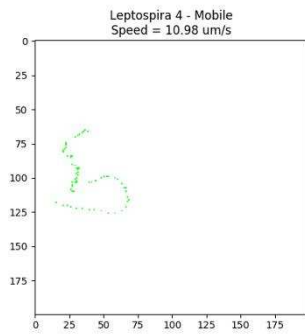
MVI_0575 | x = 200 - y = 100 | 200 x 200 pixels



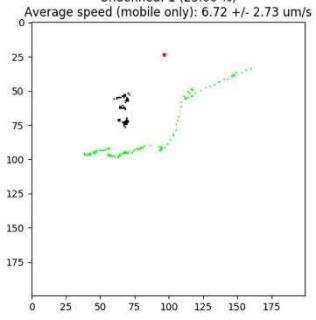
MVI_0575 | x = 200 - y = 100 | 200 x 200 pixels



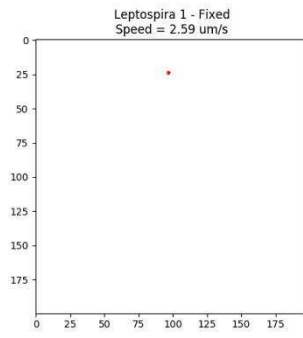
MVI_0575 | x = 200 - y = 100 | 200 x 200 pixels



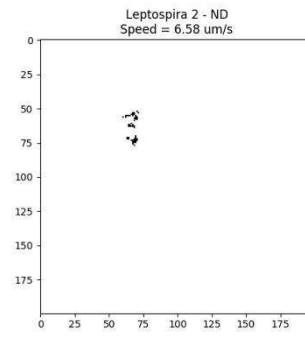
MVI_0575 | x = 750 - y = 50 | 200 x 200 pixels
4 leptospira identified
Fixed: 1 (25.00 %)
Spinning: 0 (0.00 %)
Mobile: 2 (50.00 %)
Undefined: 1 (25.00 %)



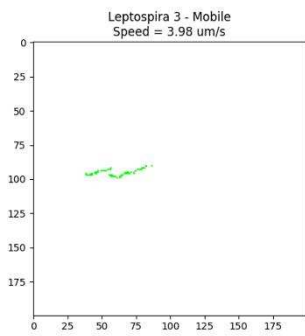
MVI_0575 | x = 750 - y = 50 | 200 x 200 pixels



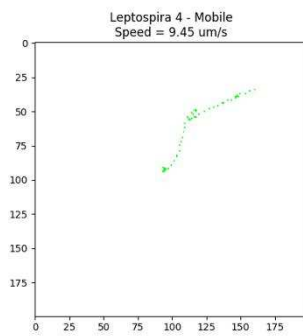
MVI_0575 | x = 750 - y = 50 | 200 x 200 pixels



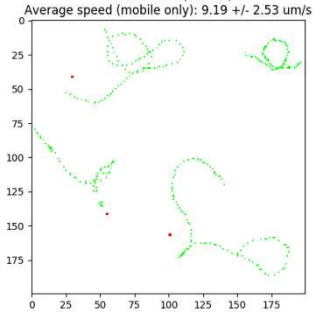
MVI_0575 | x = 750 - y = 50 | 200 x 200 pixels



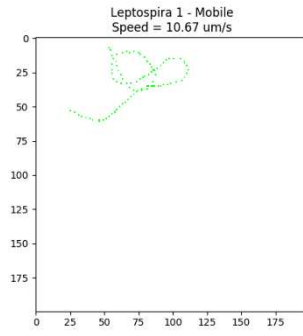
MVI_0575 | x = 750 - y = 50 | 200 x 200 pixels



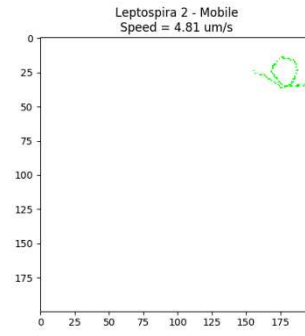
MVI_0583 | x = 600 - y = 250 | 200 x 200 pixels
7 leptospira identified
Fixed: 3 (42.86 %)
Spinning: 0 (0.00 %)
Mobile: 4 (57.14 %)
Undefined: 0 (0.00 %)



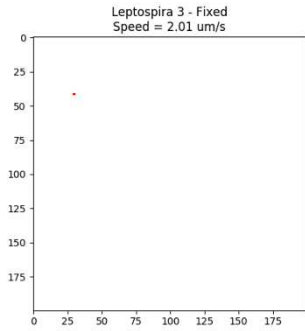
MVI_0583 | x = 600 - y = 250 | 200 x 200 pixels



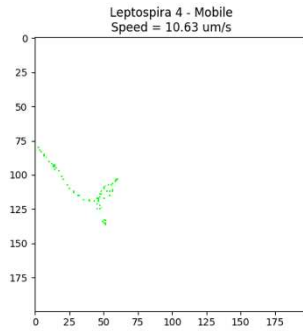
MVI_0583 | x = 600 - y = 250 | 200 x 200 pixels



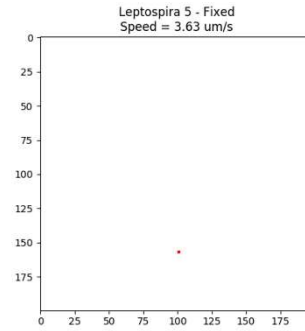
MVI_0583 | x = 600 - y = 250 | 200 x 200 pixels



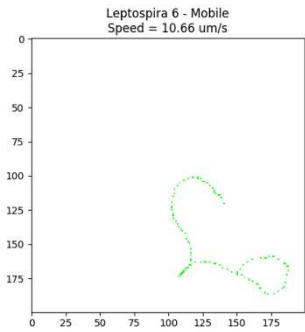
MVI_0583 | x = 600 - y = 250 | 200 x 200 pixels



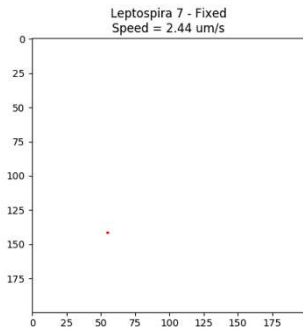
MVI_0583 | x = 600 - y = 250 | 200 x 200 pixels



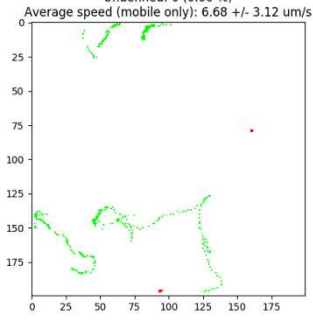
MVI_0583 | x = 600 - y = 250 | 200 x 200 pixels



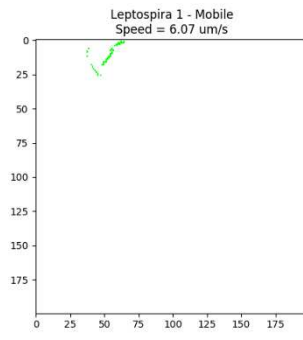
MVI_0583 | x = 600 - y = 250 | 200 x 200 pixels



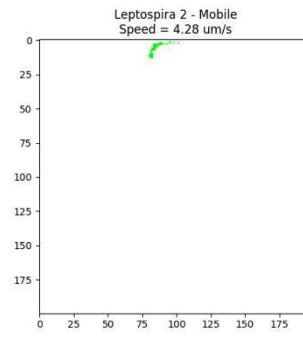
MVI_0677 | x = 500 - y = 400 | 200 x 200 pixels
7 leptospira identified
Fixed: 2 (28.57 %)
Spinning: 0 (0.00 %)
Mobile: 5 (71.43 %)
Undefined: 0 (0.00 %)



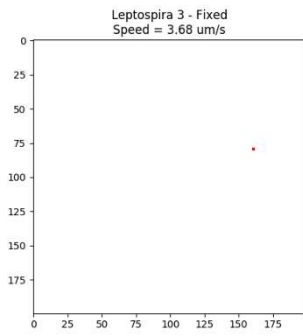
MVI_0677 | x = 500 - y = 400 | 200 x 200 pixels



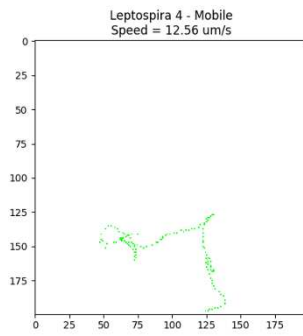
MVI_0677 | x = 500 - y = 400 | 200 x 200 pixels



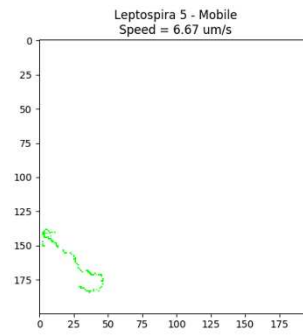
MVI_0677 | x = 500 - y = 400 | 200 x 200 pixels



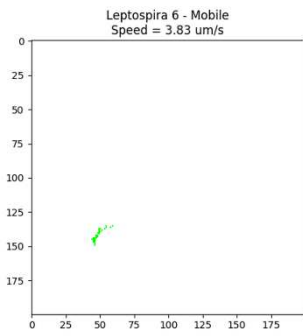
MVI_0677 | x = 500 - y = 400 | 200 x 200 pixels



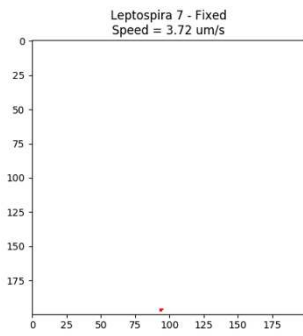
MVI_0677 | x = 500 - y = 400 | 200 x 200 pixels



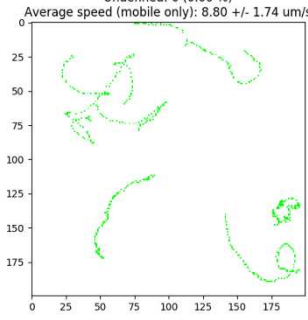
MVI_0677 | x = 500 - y = 400 | 200 x 200 pixels



MVI_0677 | x = 500 - y = 400 | 200 x 200 pixels

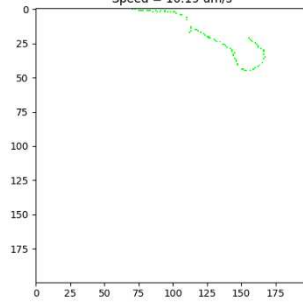


MVI_0679 | x = 100 - y = 100 | 200 x 200 pixels
6 leptospira identified
Fixed: 0 (0.00 %)
Spinning: 0 (0.00 %)
Mobile: 6 (100.00 %)
Undefined: 0 (0.00 %)
Average speed (mobile only): 8.80 +/- 1.74 um/s



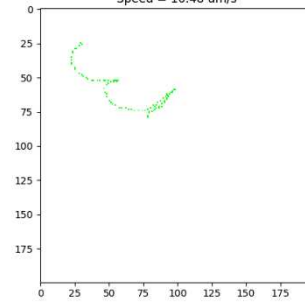
MVI_0679 | x = 100 - y = 100 | 200 x 200 pixels

Leptospira 1 - Mobile
Speed = 10.19 um/s



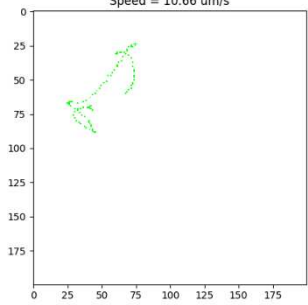
MVI_0679 | x = 100 - y = 100 | 200 x 200 pixels

Leptospira 2 - Mobile
Speed = 10.48 um/s



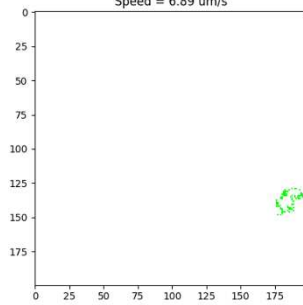
MVI_0679 | x = 100 - y = 100 | 200 x 200 pixels

Leptospira 3 - Mobile
Speed = 10.66 um/s



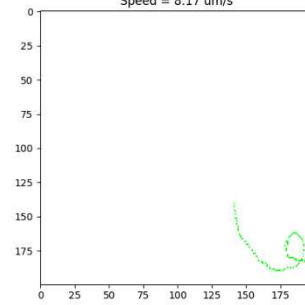
MVI_0679 | x = 100 - y = 100 | 200 x 200 pixels

Leptospira 4 - Mobile
Speed = 6.89 um/s



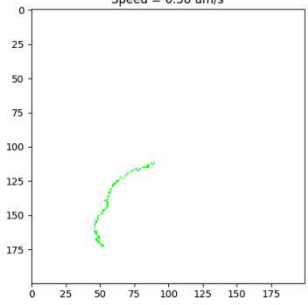
MVI_0679 | x = 100 - y = 100 | 200 x 200 pixels

Leptospira 5 - Mobile
Speed = 8.17 um/s

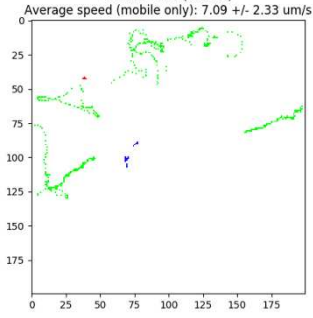


MVI_0679 | x = 100 - y = 100 | 200 x 200 pixels

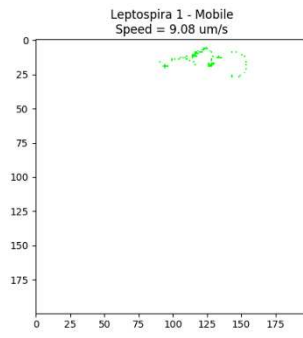
Leptospira 6 - Mobile
Speed = 6.38 um/s



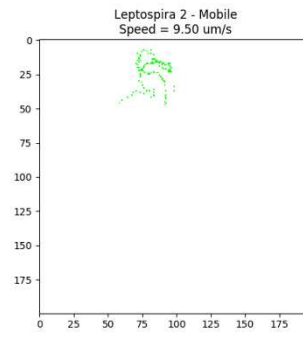
MVI_0679 | x = 480 - y = 380 | 200 x 200 pixels
8 leptospira identified
Fixed: 1 (12.50 %)
Spinning: 1 (12.50 %)
Mobile: 6 (75.00 %)
Undefined: 0 (0.00 %)



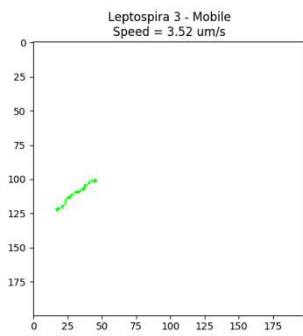
MVI_0679 | x = 480 - y = 380 | 200 x 200 pixels



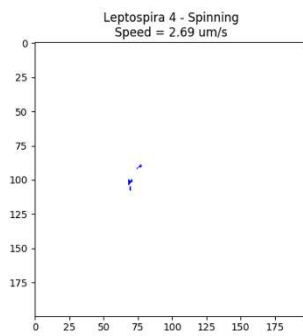
MVI_0679 | x = 480 - y = 380 | 200 x 200 pixels



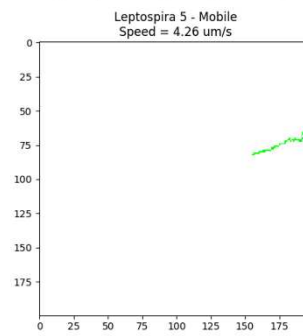
MVI_0679 | x = 480 - y = 380 | 200 x 200 pixels



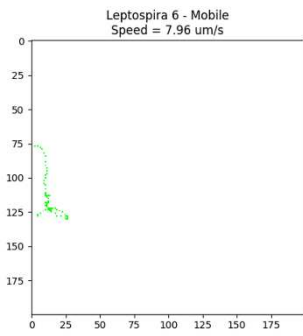
MVI_0679 | x = 480 - y = 380 | 200 x 200 pixels



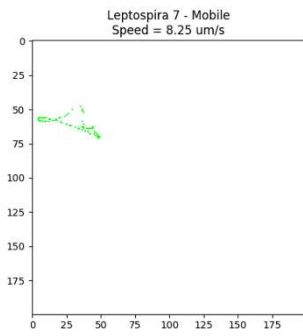
MVI_0679 | x = 480 - y = 380 | 200 x 200 pixels



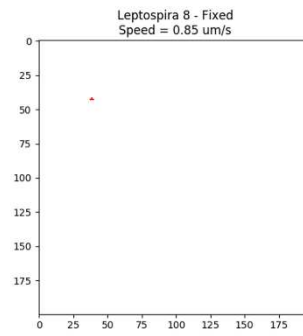
MVI_0679 | x = 480 - y = 380 | 200 x 200 pixels



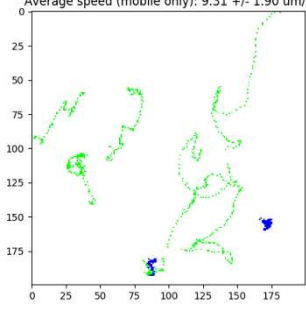
MVI_0679 | x = 480 - y = 380 | 200 x 200 pixels



MVI_0679 | x = 480 - y = 380 | 200 x 200 pixels

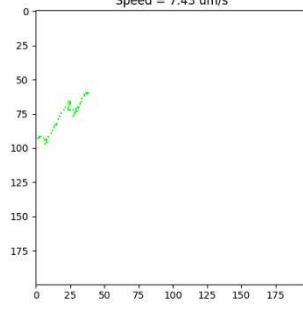


MVI_0687 | x = 280 - y = 380 | 200 x 200 pixels
8 leptospira identified
Fixed: 0 (0.00 %)
Spinning: 2 (25.00 %)
Mobile: 6 (75.00 %)
Undefined: 0 (0.00 %)
Average speed (mobile only): 9.31 +/- 1.90 um/s



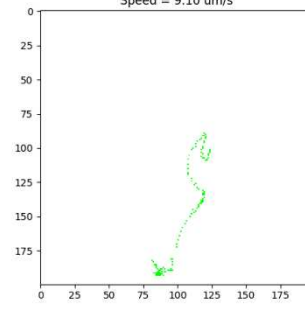
MVI_0687 | x = 280 - y = 380 | 200 x 200 pixels

Leptospira 1 - Mobile
Speed = 7.43 um/s



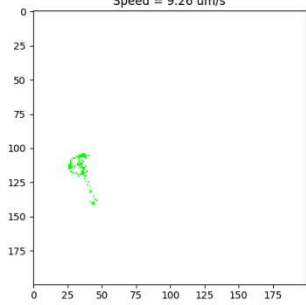
MVI_0687 | x = 280 - y = 380 | 200 x 200 pixels

Leptospira 2 - Mobile
Speed = 9.10 um/s



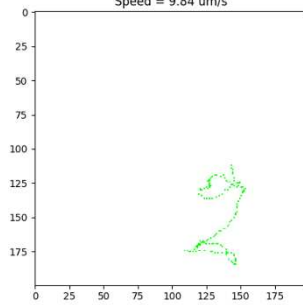
MVI_0687 | x = 280 - y = 380 | 200 x 200 pixels

Leptospira 3 - Mobile
Speed = 9.26 um/s



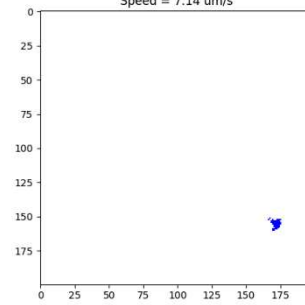
MVI_0687 | x = 280 - y = 380 | 200 x 200 pixels

Leptospira 4 - Mobile
Speed = 9.84 um/s



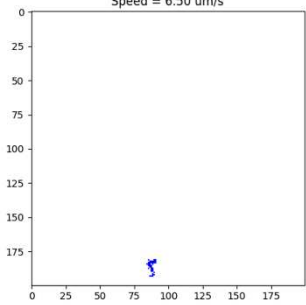
MVI_0687 | x = 280 - y = 380 | 200 x 200 pixels

Leptospira 5 - Spinning
Speed = 7.14 um/s



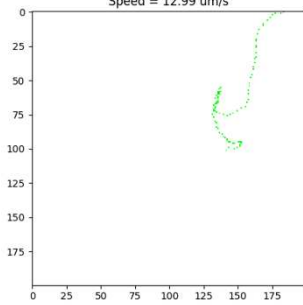
MVI_0687 | x = 280 - y = 380 | 200 x 200 pixels

Leptospira 6 - Spinning
Speed = 6.50 um/s



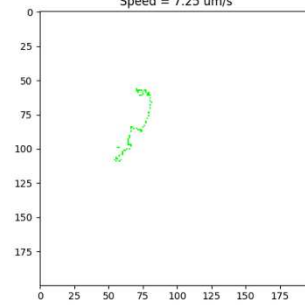
MVI_0687 | x = 280 - y = 380 | 200 x 200 pixels

Leptospira 7 - Mobile
Speed = 12.99 um/s

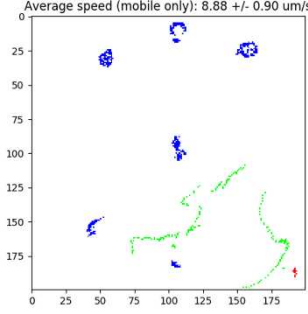


MVI_0687 | x = 280 - y = 380 | 200 x 200 pixels

Leptospira 8 - Mobile
Speed = 7.25 um/s

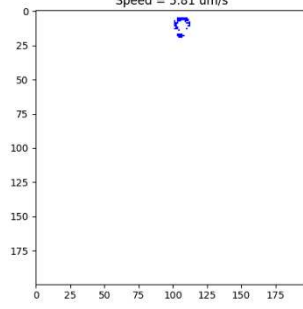


MVI_0687 | x = 950 - y = 500 | 200 x 200 pixels
9 leptospira identified
Fixed: 1 (11.11 %)
Spinning: 6 (66.67 %)
Mobile: 2 (22.22 %)
Undefined: 0 (0.00 %)
Average speed (mobile only): 8.88 +/- 0.90 um/s



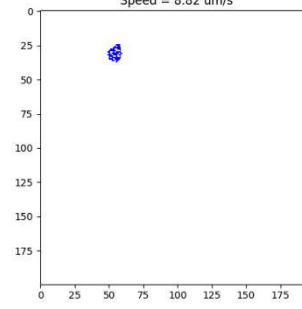
MVI_0687 | x = 950 - y = 500 | 200 x 200 pixels

Leptospira 1 - Spinning
Speed = 5.81 um/s



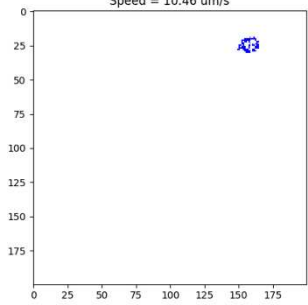
MVI_0687 | x = 950 - y = 500 | 200 x 200 pixels

Leptospira 2 - Spinning
Speed = 8.82 um/s



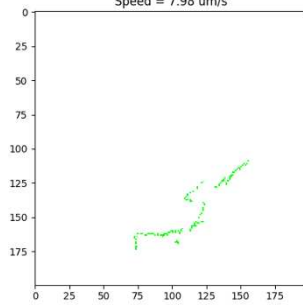
MVI_0687 | x = 950 - y = 500 | 200 x 200 pixels

Leptospira 3 - Spinning
Speed = 10.46 um/s



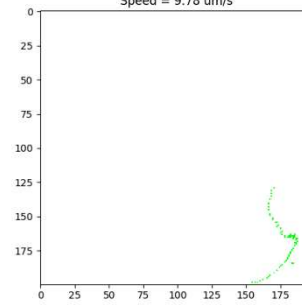
MVI_0687 | x = 950 - y = 500 | 200 x 200 pixels

Leptospira 4 - Mobile
Speed = 7.98 um/s



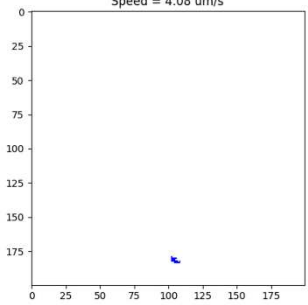
MVI_0687 | x = 950 - y = 500 | 200 x 200 pixels

Leptospira 5 - Mobile
Speed = 9.78 um/s



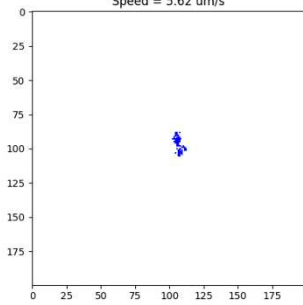
MVI_0687 | x = 950 - y = 500 | 200 x 200 pixels

Leptospira 6 - Spinning
Speed = 4.08 um/s



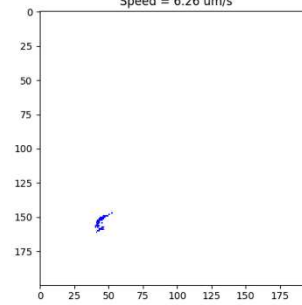
MVI_0687 | x = 950 - y = 500 | 200 x 200 pixels

Leptospira 7 - Spinning
Speed = 5.62 um/s



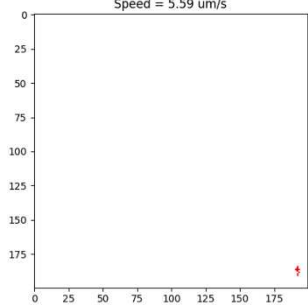
MVI_0687 | x = 950 - y = 500 | 200 x 200 pixels

Leptospira 8 - Spinning
Speed = 6.26 um/s

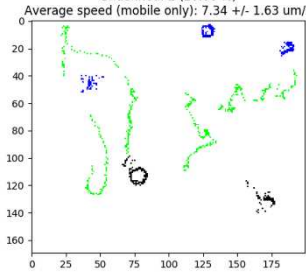


MVI_0687 | x = 950 - y = 500 | 200 x 200 pixels

Leptospira 9 - Fixed
Speed = 5.59 um/s

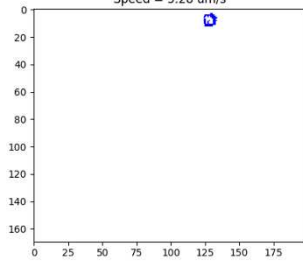


MVI_0699 | x = 250 - y = 550 | 200 x 200 pixels
 10 leptospira identified
 Fixed: 0 (0.00 %)
 Spinning: 3 (30.00 %)
 Mobile: 5 (50.00 %)
 Undefined: 2 (20.00 %)
 Average speed (mobile only): 7.34 +/- 1.63 um/s



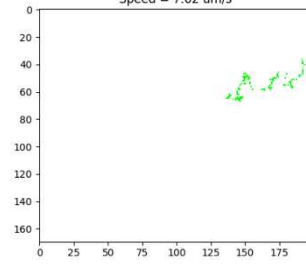
MVI_0699 | x = 250 - y = 550 | 200 x 200 pixels

Leptospira 1 - Spinning
 Speed = 5.28 um/s



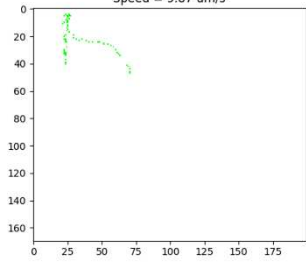
MVI_0699 | x = 250 - y = 550 | 200 x 200 pixels

Leptospira 2 - Mobile
 Speed = 7.62 um/s



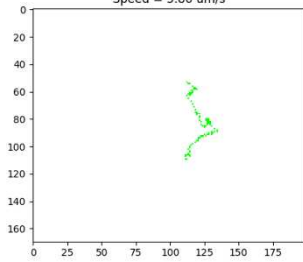
MVI_0699 | x = 250 - y = 550 | 200 x 200 pixels

Leptospira 3 - Mobile
 Speed = 9.87 um/s



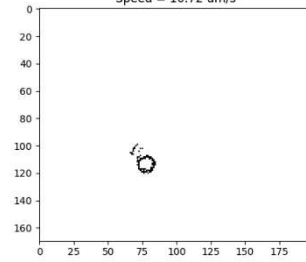
MVI_0699 | x = 250 - y = 550 | 200 x 200 pixels

Leptospira 4 - Mobile
 Speed = 5.80 um/s



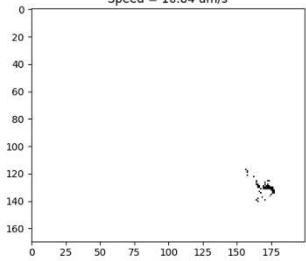
MVI_0699 | x = 250 - y = 550 | 200 x 200 pixels

Leptospira 5 - ND
 Speed = 10.72 um/s



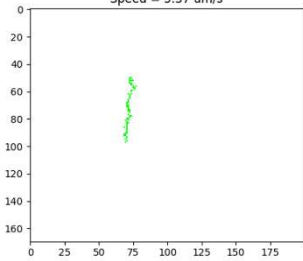
MVI_0699 | x = 250 - y = 550 | 200 x 200 pixels

Leptospira 6 - ND
 Speed = 10.84 um/s



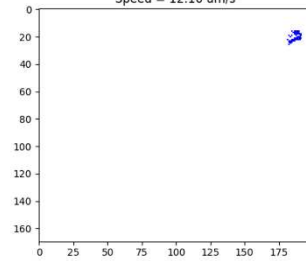
MVI_0699 | x = 250 - y = 550 | 200 x 200 pixels

Leptospira 7 - Mobile
 Speed = 5.37 um/s



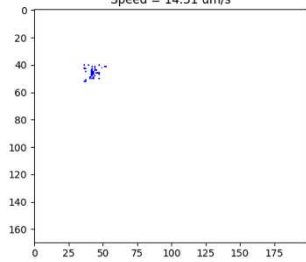
MVI_0699 | x = 250 - y = 550 | 200 x 200 pixels

Leptospira 8 - Spinning
 Speed = 12.16 um/s



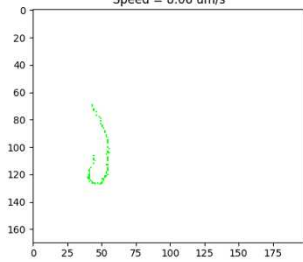
MVI_0699 | x = 250 - y = 550 | 200 x 200 pixels

Leptospira 9 - Spinning
 Speed = 14.31 um/s

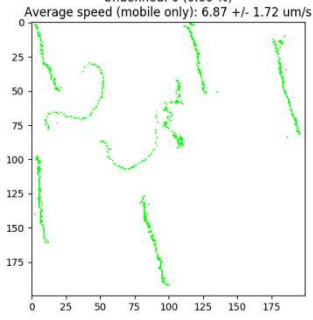


MVI_0699 | x = 250 - y = 550 | 200 x 200 pixels

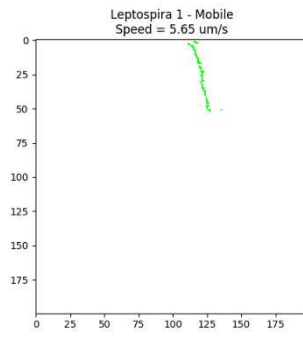
Leptospira 10 - Mobile
 Speed = 8.06 um/s



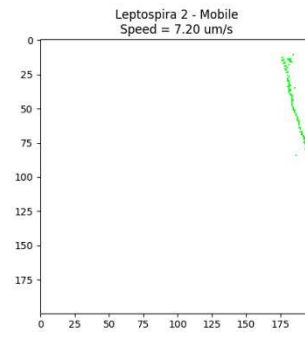
MVI_0704 | x = 700 - y = 150 | 200 x 200 pixels
8 leptospira identified
Fixed: 0 (0.00 %)
Spinning: 0 (0.00 %)
Mobile: 8 (100.00 %)
Undefined: 0 (0.00 %)



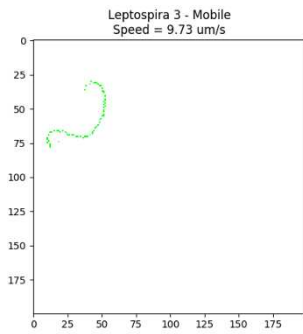
MVI_0704 | x = 700 - y = 150 | 200 x 200 pixels



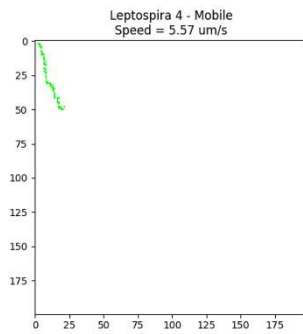
MVI_0704 | x = 700 - y = 150 | 200 x 200 pixels



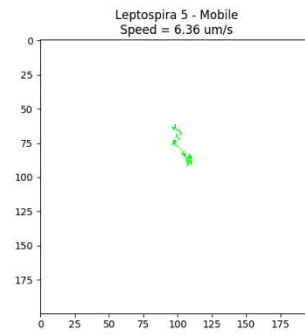
MVI_0704 | x = 700 - y = 150 | 200 x 200 pixels



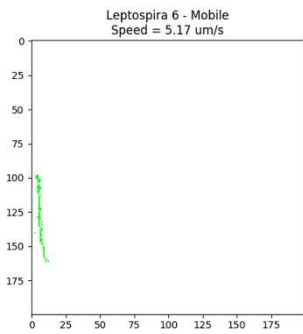
MVI_0704 | x = 700 - y = 150 | 200 x 200 pixels



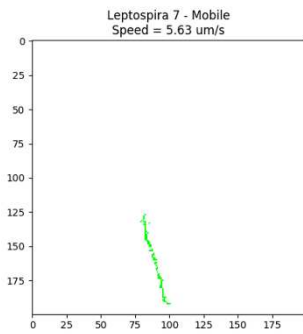
MVI_0704 | x = 700 - y = 150 | 200 x 200 pixels



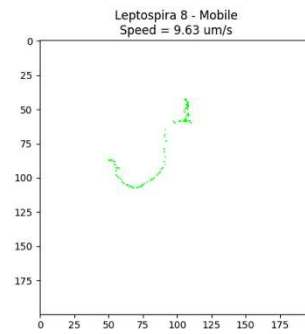
MVI_0704 | x = 700 - y = 150 | 200 x 200 pixels



MVI_0704 | x = 700 - y = 150 | 200 x 200 pixels



MVI_0704 | x = 700 - y = 150 | 200 x 200 pixels





VI. DISCUSSION GENERALE

En raison de sa répartition planétaire, du risque d'épidémies liées à certaines conditions environnementales et de ses taux de létalité pouvant potentiellement être élevés si la maladie n'est pas traitée précocement, la leptospirose, zoonose bactérienne négligée, devient de plus en plus un sujet de préoccupation majeure en santé publique. C'est une maladie complexe dans laquelle interviennent de multiples modes de transmission, une variété d'hôtes, une multitude de serovars pathogènes, diverses manifestations cliniques, et nécessitant le recours à des analyses complexes pour une confirmation du diagnostic. Cette complexité suscite dès suspicion de la maladie l'usage d'antibiotiques notamment la pénicilline, la doxycycline ou encore les céphalosporines... pour lesquels l'efficacité reste mitigée et discutable (Brett-Major and Coldren, 2012, Griffith *et al.*, 2006, Griffith *et al.*, 2007). Outre ce constat, il se développe de plus en plus une nouvelle problématique de santé publique qu'est la résistance aux antibiotiques. Même si jusqu'à présent aucun phénomène de résistance n'a été observé dans le cas du traitement clinique de la leptospirose, il va sans dire que face à la recrudescence de la problématique d'antibiorésistance mais aussi des changements généraux observés (changements climatiques, urbanisation galopante) qui favoriseraient l'émergence ou la ré-émergence de la leptospirose, des mesures alternatives de lutte devraient être envisagées. Le travail présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans cette vision avec pour objectif de mettre en évidence de nouveaux marqueurs génétiques de virulence des leptospires pouvant être de nouvelles cibles thérapeutiques.

Notre attention s'est donc portée sur une protéine nommée VKOR par homologie à la VKORC1, enzyme retrouvée chez les mammifères et intervenant dans le cycle de la vitamine K. Selon les travaux de bio-informatiques menés par Landeta *et al.* (2018), cette protéine est l'équivalent de la DsbB et serait impliquée avec la DsbA dans la formation des ponts disulfures. Ces derniers permettent de stabiliser certaines protéines bactériennes destinées à être sécrétées que l'on retrouve dans certains facteurs de virulence ou toxines. Ce qui nous a amenés à nous intéresser à la motilité considérée comme un facteur de virulence (Josenhans and Suerbaum, 2002). Des études antérieures ont été menées sur la motilité des leptospires notamment sur l'analyse de leur virulence suite à des mutations sur des protéines du flagelle telles que *FliY* (Liao *et al.*, 2009) ou encore *FlaA* (Lambert *et al.*, 2012) mais pas sur une protéine faisant intervenir les ponts disulfures.

En revanche, chez la bactérie *E. coli*, une étude de ce genre a déjà été menée sur une telle protéine en l'occurrence la *FlgI* (Dailey and Berg, 1993) montrant l'importance du complexe DsbA/DsbB et de la formation des ponts disulfures, d'où l'intérêt de notre étude sur la VKOR qui remplace la DsbB d'autant plus que c'est une protéine qui à notre connaissance n'a fait l'objet d'aucune étude spécifique chez les leptospires jusqu'à ce jour.

Dans une approche *in silico*, nous avons construit un modèle structural de la protéine étant donné qu'aucune conformation tridimensionnelle résolue expérimentalement au niveau atomique n'était disponible, ce qui constitue un frein pour une description éclairée du fonctionnement de la VKOR d'un point de vue structural. Bien avant la construction du modèle, au vu de la diversité des espèces de leptospires, nous avons recherché et aligné toutes les séquences VKOR disponibles des différentes espèces de leptospires. 747 séquences peptidiques ont été obtenues et comptaient de façon consensuelle en fonction de la classification basée sur la pathogénicité 404 et 408 résidus respectivement pour les pathogènes et les saprophytes. L'analyse des séquences a permis de faire ressortir 10 résidus spécifiques strictement conservés dans chaque catégorie de leptospires pouvant servir de base pour orienter sur la pathogénicité d'une nouvelle souche inconnue. D'ailleurs, nous nous sommes servis de ce critère pour classer des séquences inconnues présentes dans notre base de données de départ.

En outre, l'analyse de l'alignement des séquences a également permis de faire ressortir de façon généralisée 91 acides aminés strictement conservés dont 27 localisés dans le domaine VKOR et 64 dans le domaine thiorédoxine. Sur les 27 résidus conservés du domaine VKOR, quatre résidus de cystéines ont été identifiés notamment C40 et C49 d'une part et C129-C132 d'autre part formant un motif CXXC. Ce dernier, caractéristique du site actif des oxydoréductases, constituerait le site actif de la VKOR des leptospires et confirmerait l'appartenance de notre protéine d'intérêt à cette famille d'enzymes catalysant les réactions d'oxydoréduction. Cette idée de conservation des résidus de cystéine et de site actif CXXC est en adéquation avec les travaux de Goodstadt et Ponting effectués en 2004 (Goodstadt and Ponting, 2004). Ils avaient montré à partir de l'alignement des séquences peptidiques de 32 espèces que les résidus de cystéine formant le motif CXXC de même que les deux autres étaient strictement conservés et que ceux du motif CXXC représentaient le site actif des VKORs. La numérotation des cystéines était fonction de l'espèce puisque chez l'homme par exemple elles correspondaient à C43, C51 et C132-C135 (Goodstadt and Ponting, 2004).

Après l'analyse des séquences, s'en est suivie la construction du modèle structural de la VKOR. Celle-ci a été effectuée avec l'outil de prédiction des structures protéiques *AlphaFold* (**voir partie Méthodologie**). La prédiction obtenue indique une structure constituée d'un domaine VKOR à cinq hélices transmembranaires fusionné avec son partenaire réducteur qui est un domaine de type thiorédoxine.

Ce modèle structural est semblable à la structure cristallisée de la VKOR de *Synechococcus sp.* (Li *et al.*, 2010) chez qui le cycle enzymatique de la protéine suggère un mécanisme d'auto-activation par transfert du pouvoir réducteur du domaine thiorédoxine vers le site actif (Cys130 et Cys133) par l'intermédiaire des résidus C50 et C56 (Liu *et al.*, 2014). Chez cette bactérie, le motif CXXC (Cys130 et Cys133) se trouve à proximité d'une molécule de quinone. Cette molécule indispensable dans le mécanisme de transfert d'électrons correspond à une ubiquinone dans le cas du complexe DsbA/DsbB (Li *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2014) ou une vitamine K quinone dans le cas de la VKORC1 (Stafford, 2005), d'où une de nos interrogations à savoir : Quel est le potentiel substrat de quinone de la VKOR des leptospires ? Nous avons donc montré toujours *in silico* que aussi bien l'ubiquinone 4 que la vitamine K quinone pouvaient être utilisées comme substrat. Une telle éventualité concernant la vitamine K quinone qui permet l'activation de la gamma-carboxylation de protéines vitamines K dépendantes est assez plausible d'autant plus que le génome des leptospires possède le gène d'une enzyme impliquée dans le métabolisme de la vitamine K chez les mammifères, la VKD carboxylase analogue de la GGCX. Mais étonnamment leur génome ne contient aucun gène codant pour une protéine susceptible d'être gamma-carboxylée (Rishavy *et al.*, 2005). Cela laisse à penser que les leptospires pourraient utiliser la vitamine K de l'hôte, ce qui pourrait contribuer à baisser ses réserves donc indirectement à perturber sa capacité de coagulation. D'ailleurs, des résultats non publiés d'une étude sont en faveur de cette hypothèse puisqu'ils ont montré chez le chien atteint de leptospirose que le TCK et le temps de Quick avaient augmenté alors que le facteur VII avait clairement baissé. Il serait donc intéressant de vérifier cette éventualité chez le hamster infecté en suivant l'évolution en fonction du temps des stocks hépatiques en vitamines K, du temps de Quick, du TCK ainsi que la gamma carboxylation des facteurs de coagulation vitamines K dépendants.

Ayant mis en évidence les substrats potentiels de la VKOR, nous avons cherché à caractériser son activité enzymatique. Pour cela, nous avons dans un premier temps exprimé avec succès la protéine recombinante avec ou sans son domaine thiorédoxine dans la levure *Pischia pastoris* qui est une méthode qui a été mise en place au sein de notre équipe et dont la fiabilité a été démontrée (Hodroge *et al.*, 2011). Le recours à ce modèle d'expression se justifie par le fait qu'il permet d'obtenir en peu de temps une biomasse et un niveau d'expression suffisants de protéines recombinantes pour la suite des essais enzymatiques. Pour éviter les biais de codons lors de l'expression en levure, nous avons fait synthétiser les séquences optimisées du gène avec et sans le domaine thiorédoxine.

Par manque de recul sur l'activité enzymatique de notre protéine d'intérêt et afin de mettre au point notre méthodologie de caractérisation, nous avons utilisé comme alternative la VKORC1 des mammifères qui utilise la vitamine K quinone comme substrat lors du cycle de la vitamine K (figure 28) et pour laquelle plusieurs études portant sur ses propriétés catalytiques sont disponibles.

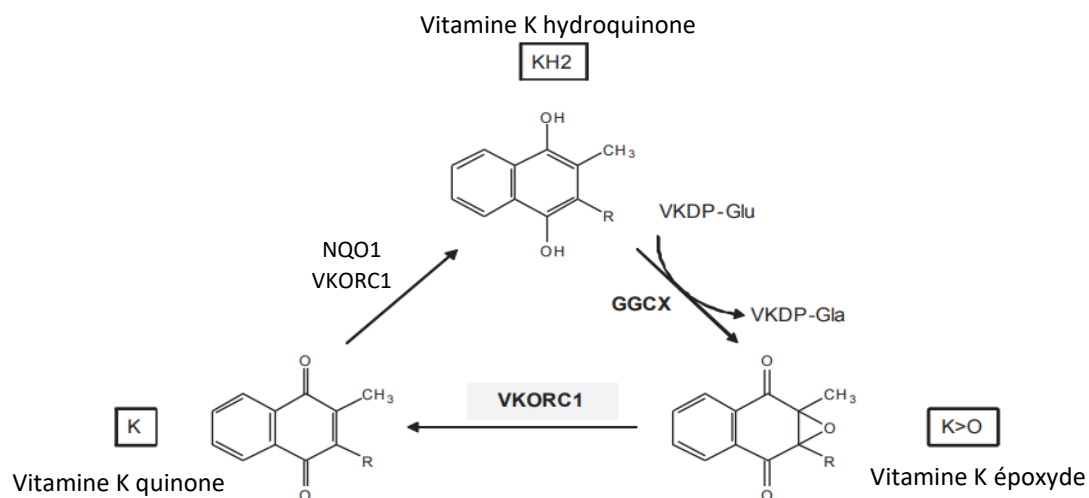


Figure 28 : Cycle de la vitamine K (Tie and Stafford, 2008).

Le cycle de la VKORC1 se passe en deux étapes distinctes : i) Le transfert du pouvoir réducteur au travers de protéines mal identifiées telles que PDI, TMX1, TMX4 ou encore Erp18 vers la boucle luminale de VKORC1 et ses deux cystéines 43 et 51. La réduction de ces cystéines conduira plus tard à la réduction des cystéines catalytiques 132 et 135, ii) La catalyse de la réduction de l'époxyde de vitamine K (vit K>O) illustrée à travers la figure ci-dessus.

Nous avons mis au point une méthode d'évaluation de VKORC1 qui utilise la vit K^{>O} comme substrat, des microsomes de levures exprimant la VKORC1 de différentes espèces et de très nombreux mutants éventuellement impliqués dans la résistance aux AVKs. Nous avons utilisé comme partenaire redox le DTT qui initie la réaction enzymatique *in vitro*. La vitamine K quinone produite a ensuite été dosée en LC-MS permettant ainsi de déterminer l'activité enzymatique de VKORC1 et d'établir les constantes catalytiques et les caractéristiques des inhibiteurs (nature de l'inhibition et mesure des K_i).

L'utilisation par la suite des microsomes de levures recombinantes exprimant soit la VKOR des Leptospires avec ou sans son domaine thiorédoxine, n'a pas permis la réduction de vit K^{>O}, confirmant ainsi des résultats préliminaires obtenus en modélisation de cette VKOR qui prédisaient que la Vit K^{>O} était trop encombrante par rapport au site catalytique de la VKOR des leptospires alors que la vitamine K quinone présentait une affinité plus importante.

Nous avons alors décidé de travailler sur la réduction de la vitamine K quinone et l'hydroquinone. Néanmoins, alors que la mesure de l'activité K^{>O} réductase est utilisée dans de nombreuses publications, l'évaluation de la réaction quinone réductase est seulement évoquée au détour de certaines publications (Fasco *et al.*, 1980).

Dans cette mesure, nous avons produit de la vitamine K hydroquinone par voie chimique pour mettre en place une méthode de dosage analogue à celle utilisée pour le dosage de la vitamine K quinone. La réaction utilisée pour réduire la vitamine K utilise du DTT (100mM). La vitesse de la réaction était très importante puisqu'en approximativement une heure nous avons réduit totalement 200 nanomoles de vitamine K. Le dosage de l'hydroquinone formée a été réalisé en LC-MS en mode négatif et la valeur du rapport m/z utilisé était de 451 uma. Le temps de rétention sur colonne C18 était inférieur à celui de la vitamine K (3.9 min) et de celui de l'époxyde (3 min) et était de l'ordre de 2 minutes. La difficulté à laquelle nous avons été immédiatement confrontés fut le fait que la solution étalon contenant le DTT ne pouvait pas être diluée dans un solvant contenant de l'oxygène (eau, méthanol, éthanol...) car l'hydroquinone se réoxydait très rapidement en quinone rendant très improbable l'extraction puis le dosage dans des conditions simples de cette hydroquinone.

Au terme de cette première étape nous nous sommes retrouvés face à deux difficultés majeures :

Premièrement, l'efficacité du DTT comme réducteur chimique de la vitamine K rend peu raisonnable l'utilisation du DTT comme donneur de pouvoir redox à VKOR dans la mesure où la production enzymatique d'hydroquinone sera évidemment discutable.

L'utilisation de ce DTT dans la réduction de l'époxyde pourtant beaucoup moins facilement réduit par le DTT a déjà été discuté par différents auteurs qui indiquaient qu'une partie de la réaction pouvait avoir une origine purement chimique. Ainsi, le mécanisme de la réduction au travers d'abord de la boucle luminale qui ensuite réduit le site catalytique pourrait, en présence de DTT, ne pas être respecté : le DTT pourrait réduire directement le site catalytique, rendant peu crédible les résultats obtenus sur les mutations de la boucle luminale.

C'est donc pour pallier cette difficulté que nous avons donc décidé de mettre en place un système permettant un fonctionnement beaucoup plus physiologique de la catalyse, en éliminant le DTT et en le substituant par la thiorédoxine.

Cela correspond en fait au fonctionnement de la VKOR de leptospire et de *Synechococcus sp.* mais aussi au fonctionnement de la VKORC1 des mammifères qui utilisent le pouvoir redox de différentes protéines appartenant au groupe des thiorédoxines. Cette évolution méthodologique indispensable n'a pu être réalisée qu'en utilisant toujours une enzyme que nous connaissions, la VKORC1 de mammifères, et non une enzyme dont nous ne maîtrisons pas le fonctionnement. Nous avons montré que le DTT pouvait être parfaitement substitué par un système régénérant le NADP réduit (NADP, G6P, G6PDH) en présence de thiorédoxine réductase bactérienne et de thiorédoxine bactérienne. Ainsi, les constantes enzymatiques (V_{max} et K_m) ainsi que les constantes d'inhibition (K_i pour différents AVK et pour certaines mutations) étaient similaires, que l'on utilise le DTT ou le système thiorédoxine. De plus, l'utilisation de VKORC1 mutées sur la boucle luminale a montré que les cystéines de cette boucle étaient indispensables à la catalyse et que ni le DTT ni la thiorédoxine n'attaquaient directement le pont disulfure du site catalytique.

Le second obstacle correspond à l'instabilité de l'hydroquinone. Cet obstacle n'a pas encore été complètement contourné mais nous vous présentons dans la section « Perspectives » les résultats encourageants qui nous permettront sûrement de le contourner dans quelques mois.

Comme nous l'avons souligné précédemment la motilité est un facteur important dans la virulence mais aussi dans la survie de la bactérie et la VKOR pourrait impacter cette motilité à travers le mécanisme de formation des ponts disulfures de certaines protéines flagellaires. Ainsi, toute perturbation du fonctionnement de la VKOR pourrait impacter la motilité. Partant de là, nous nous sommes dit qu'en agissant sur la VKOR, il serait intéressant de pouvoir suivre l'effet sur la motilité des bactéries.

Afin de pouvoir visualiser le comportement motile de la bactérie, nous avons donc mis au point une méthode de reconstitution de trajectoires basée sur la vidéomicroscopie et un script Python développé au sein du laboratoire. Le suivi de trajectoire bactérienne n'est pas nouveau puisque la première étude en la matière qui portait sur la bactérie *E. coli* date des années 70 (Berg and Brown, 1972) et il existe bien d'autres études de ce genre de nos jours. Cependant, peu d'études portant sur les leptospires et ayant recours aux techniques de tracking assisté par ordinateur sont disponibles.

Bien que le développement d'outils informatiques soit assez intéressant pour les études du comportement motile, il faudrait que ceux-ci soient plus faciles d'accès et d'utilisation assez large, d'où l'intérêt de notre méthode. Notre script Python sera en Open Access et accessible contrairement à certains algorithmes utilisés dans des études de motilité chez les leptospires comme MATLAB dont l'acquisition peut être onéreuse ou VDA excel dont l'utilisation par des tiers nécessite qu'ils aient leurs propres copies d'Excel. Un autre avantage est que notre script permet de combiner le traitement d'images obtenues de la vidéomicroscopie et le calcul de vitesse des leptospires en une seule fois. Notre méthode permet aussi de suivre le déplacement de plusieurs leptospires en même temps, ce qui n'avait pas été le cas avec le système d'analyse automatisé mis en place par Charon et son équipe dans leur étude sur *Leptospira illini* (aujourd'hui *Leptonema illini*) (Charon *et al.*, 1984).

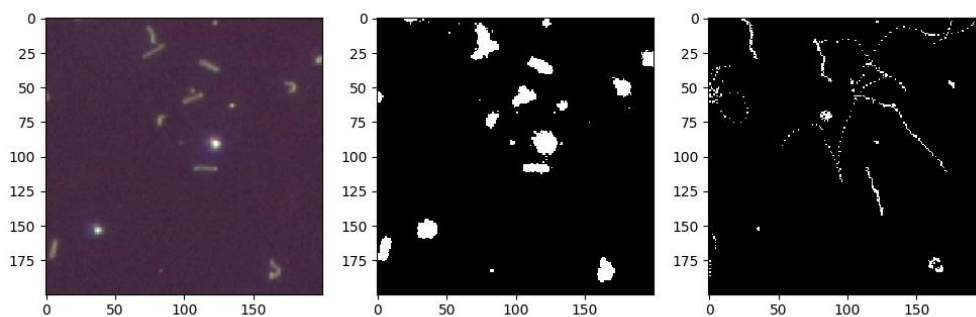


Figure 29 : Application du script Python pour le traitement d'images.

Notre technique permet également de classer les bactéries présentes dans le champ de vision délimité en trois catégories : celles qui se déplacent (mobile), celles qui font des mouvements giratoires sur place (spinning) et celles qui sont statiques (fixed). Ensuite, elle permet de calculer la vitesse de déplacement de celles de la première catégorie. Le calcul ne se limite pas qu'aux variations de vitesse et aux apparences de trajectoires mais prend en compte le revirement de la bactérie qui correspond à une réorientation pendant son déplacement.

Cette réorientation qui fait suite au passage du premier type de motilité translationnelle au deuxième type de motilité translationnelle, fait référence à la motilité atypique des leptospires subdivisée en 4 types (Charon *et al.*, 1984). Bien qu'ayant de nombreux avantages, l'inconvénient majeur de notre script est qu'il ne peut être exécuté que sous Linux à l'heure actuelle.

Notre méthode nous permettait donc de pouvoir suivre l'évolution du comportement motile des leptospires après ajout d'inhibiteurs de la VKOR dans leur milieu de culture. Afin de réaliser cette partie de nos travaux, la mise à disposition de cultures bactériennes s'est avérée nécessaire. Bien qu'ayant à disposition des souches bactériennes provenant du Laboratoire d'Analyses Vétérinaires de VETAGRO SUP, nous avons constaté que leur motilité n'était pas constante rendant difficile la reproductibilité et l'interprétation de nos tests. Cette inconstance de la motilité pouvait être due à plusieurs facteurs notamment au nombre élevé de repiquages que les leptospires avaient subi.

Les repiquages successifs des souches bactériennes peuvent entraîner des mutations ou des altérations génétiques, ce qui peut affecter leur comportement motile et d'autres caractéristiques. Pour remédier à ce problème, nous avons participé à deux projets de terrain qui ont permis d'obtenir de nouvelles souches de leptospires à partir de populations de campagnols terrestres dans le Puy-de-Dôme et de rats urbains à Lyon et Bordeaux en France. Outre l'obtention de souches fraîchement isolées, ces études de terrain étaient importantes car elles sont un bon indicateur du danger de transmission de la leptospirose lié à ces animaux dans ces régions étudiées. La prolifération de ces rongeurs, porteurs de plus de 40 agents pathogènes zoonotiques (Buckle and Smith, 2015), pouvant constituer un véritable risque pour la santé humaine, l'évaluation du potentiel de transmission de la leptospirose de ces animaux à l'homme va contribuer à une meilleure compréhension de la maladie, en particulier en ce qui concerne les souches de leptospires associées à ces populations de rongeurs. Ce qui va avoir des implications pour la surveillance, la prévention et le contrôle de la maladie.

Chez les campagnols terrestres, l'étude a montré que ces derniers présentaient une forte prévalence de l'ordre de 76%. Ce résultat était assez surprenant dans la mesure où la prévalence obtenue chez ces animaux était nettement plus élevée que celle observée chez le rat brun (*Rattus norvegicus*), considéré comme le principal réservoir de la leptospirose humaine (Haake and Levett, 2015). En effet, Ayral et collaborateurs avaient obtenu une prévalence globale de 26% chez les rats en France (Ayral *et al.*, 2015).

Même si nos études sur les rats urbains à Lyon et Bordeaux ont révélé des prévalences plus élevées de l'ordre respectivement de 50.9% et 28.7%, celles-ci restaient inférieures à la prévalence observée chez les campagnols. La souche circulante chez les campagnols était *L. kirschneri* serogroupe Grippytyphosa qui n'est pas la souche prédominante retrouvée chez les rats. Etant donné que les souches appartenant au serogroupe Grippytyphosa sont secondairement impliquées dans les cas de leptospirose humaine après le serogroupe Icterohaemorrhagiae en France (Picardeau, 2013), cette étude a permis de montrer la nécessité d'explorer un peu plus le rôle des campagnols dans l'épidémiologie de la leptospirose au vu de l'augmentation des variations de densités des populations de campagnols terrestres suite aux changements des pratiques agricoles (Giraudoux *et al.*, 1997).

Concernant l'étude sur les rats urbains, elle a permis de montrer la dynamique de la leptospirose au sein de ces populations de rongeurs contribuant à une meilleure compréhension de la persistance et la transmission d'agents pathogènes zoonotiques en milieu urbain (Blasdell *et al.*, 2019).

La souche circulante mise en évidence aussi bien dans les populations de rats à Lyon qu'à Bordeaux était *L. interrogans* serogroupe Icterohaemorrhagiae. Cette souche étant la plus fréquemment incriminée dans la leptospirose humaine (Zilber, 2015), cette étude a permis de mettre en évidence le risque potentiel de contamination qu'encourent les populations humaines locales de ces zones de prolifération des rats.

Les nouvelles souches bactériennes obtenues à l'issue de ces deux études de terrain étaient plus stables du point de vue de leur motilité. Nous étions donc à même de pouvoir mener notre étude de suivi du comportement motile des leptospires dans leur milieu de culture après ajout d'inhibiteurs de la VKOR. Mais, il restait poser la question des inhibiteurs potentiels de la VKOR des leptospires.

La warfarine a été proposée comme inhibiteur potentiel de la VKOR des leptospires. Cette éventualité s'est justifiée par le fait qu'en plus d'être l'inhibiteur historique de la VKORC1 utilisé en thérapie humaine et comme rodenticide, il a été rapporté que la warfarine était capable d'inhiber la VKOR de *Mycobacterium tuberculosis* et *Synechococcus sp* (Dutton *et al.*, 2010). Cependant, nos résultats de modélisation moléculaire ont montré qu'elle n'avait pas une très bonne affinité avec la VKOR des leptospires.

De plus, les résultats préliminaires du suivi du comportement motile des leptospires en présence de la warfarine ont montré qu'il fallait incorporer des concentrations élevées de cette molécule afin d'observer une baisse de la motilité des bactéries.

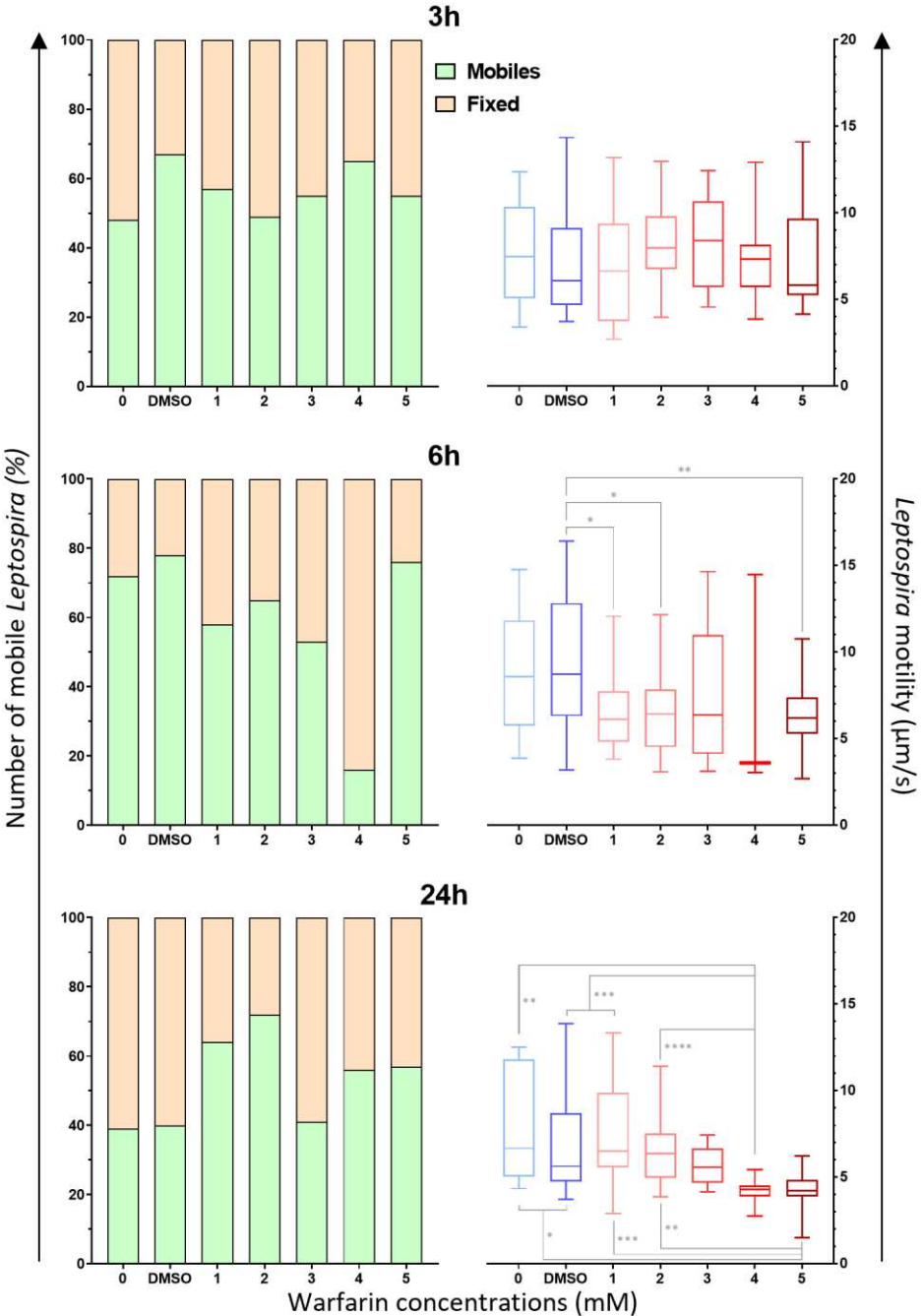


Figure 30 : Effet de différentes concentrations de warfarine sur la motilité des leptospires.

Cet état de fait est pour nous rassurant dans la mesure où l'utilisation de cette molécule pour inhiber la VKOR des leptospires ne serait pas adaptée. En effet, le recours à cette molécule aura pour conséquence d'inhiber également la VKORC1 des patients, ce qui conduirait à de graves troubles de la coagulation sanguine en plus de ceux potentiellement induits par la leptospirose.

Toutefois, lors de l'évaluation *in silico* du substrat potentiel de la VKOR des leptospires, nous avons identifié les résidus qui contribuaient fortement aux interactions pour la fixation des substrats sur la protéine. Ces résidus, au nombre de six (L24, V52, I71, D114, L117 et C132) pourraient être une bonne cible pour la conception d'inhibiteurs spécifiques de la VKOR des leptospires d'autant plus que cinq d'entre eux (L24, V52, L117, D114 et C132) sont strictement conservés chez toutes les espèces de leptospires. Cette perspective de développement d'inhibiteurs portant sur ces résidus à l'exception du résidu V52 se justifie aussi par le fait qu'aucune mutation portant sur leurs correspondances chez les mammifères induisant des résistances aux inhibiteurs de la VKORC1 n'a été décrite jusqu'à ce jour à notre connaissance. Quant au résidu V52, nous avons montré qu'il fait partie des quatre résidus Y28, V52, L117 et Y136 fortement impliqués dans l'interaction de la VKOR des leptospires et la warfarine. Ces quatre résidus correspondent respectivement aux résidus conservés chez les mammifères Y25, V54, L120 et Y139, qui ont tous été signalés comme impliqués dans la liaison de la warfarine chez les humains et les rongeurs. Des mutations décrites portant sur ces résidus ont induit des résistances à la warfarine chez l'homme (Hodroge *et al.*, 2012 ; Czogalla *et al.*, 2013) et chez les rongeurs (Goulois *et al.*, 2016 ; Lasseur *et al.*, 2005), ce qui justifie que leur prise en compte dans le développement d'inhibiteurs de la VKOR compliquerait l'obtention de molécules spécifiques aux leptospires.

VII. CONCLUSION

Après avoir rappelé de manière succincte les connaissances bibliographiques portant sur la leptospirose et ses agents bactériens qui permettent d'exposer toute la complexité de cette zoonose, cette thèse présente les travaux menés dans l'objectif de mettre en évidence un nouveau marqueur génétique de virulence des leptospires et donc de fournir une nouvelle cible thérapeutique inhibable par les anticoagulants antivitamines K.

Le marqueur génétique identifié est une protéine nommée VKOR par homologie à l'enzyme VKORC1 retrouvée chez les mammifères, impliquée dans le recyclage de la vitamine K et jouant un rôle capital dans le processus de la coagulation sanguine. Chez certaines bactéries notamment les leptospires, cette protéine correspond à la DsbB et est impliquée dans le processus de formation des ponts disulfures indispensables à la stabilité et au bon fonctionnement de protéines destinées à être sécrétées entre autres certaines protéines flagellaires et des toxines.

Bien que des travaux antérieurs d'alignement de séquences de plusieurs espèces bactériennes avaient mis en évidence son existence chez *L. interrogans*, nous avons dans un premier temps, par une analyse de l'alignement de toutes les séquences disponibles des leptospires, montré que la VKOR est présente dans tout le genre *Leptospira* et qu'elle présente une certaine variabilité suivant la souche de leptospires. Ensuite, par manque de données expérimentales ainsi que de structure tridimensionnelle résolue expérimentalement à ce jour rendant difficile la description détaillée de son fonctionnement chez les leptospires, nous avons tenté d'apporter par des approches de la modélisation moléculaire des éléments de réponse à certaines interrogations. La modélisation moléculaire permet d'établir *in silico* des modèles structuraux à l'échelle atomique à partir desquels les simulations de dynamique moléculaire ouvrent l'accès au détail des mouvements atomiques. L'association de la modélisation moléculaire, des simulations de dynamique moléculaire et de la biologie structurale aboutit à la description des relations entre la séquence, la structure, la dynamique et la fonction biologique des protéines, par des approches de biologie computationnelle.

Nous avons donc construit un modèle 3D de la VKOR des leptospires en utilisant *AlphaFold*, un outil d'intelligence artificiel. Le modèle obtenu présente une structure avec deux domaines fusionnés : un domaine VKOR à cinq hélices transmembranaires relié par sa cinquième hélice à un domaine thiorédoxine. Les simulations de dynamique moléculaire ont révélé un rapprochement privilégié entre les atomes de soufre des cystéines C40 et C49 d'une part et

C129 et C132 d'autre part, ces résidus étant ceux intervenant dans le mécanisme de transfert d'électrons entre la VKOR et son substrat.

Nous avons toujours au cours de cette approche de modélisation moléculaire identifié les substrats potentiels de la VKOR des leptospires et mis en évidence les résidus qui contribuaient fortement aux interactions. Au nombre de six (L24, V52, I71, D114, L117 et C132), ces résidus, à l'exception du résidu V52, pourraient être une bonne cible pour la conception d'inhibiteurs spécifiques de la VKOR des leptospires d'autant plus que quatre (L24, L117, D114 et C132) sont strictement conservés chez toutes les espèces de leptospires. L'exclusion du résidu V52 s'est justifié par le fait que le développement d'un inhibiteur ciblant ce résidu ne serait pas spécifique aux leptospires et pourrait entraîner des conséquences chez l'hôte.

Dans un second temps, pour une approche *in vitro*, nous avons mis au point un protocole qui pourra servir à la caractérisation de l'activité enzymatique de la VKOR des leptospires, à partir de la VKORC1 des mammifères. Pour se rapprocher le plus des conditions physiologiques, celle-ci est basée sur le système redox combinant le réducteur NADPH et les protéines Thioredoxin reductase (TrxR) et Thioredoxin1 (Trx). L'adoption de cette méthode permettrait de se passer du dithiothréitol (DTT), utilisé pour initier la réaction enzymatique de la VKORC1 *in vitro* dans la majorité des travaux publiés.

Parallèlement, dans un troisième volet, partant du postulat que l'inhibition de la VKOR pourrait avoir des répercussions sur la motilité des leptospires, nous avons développé une méthode de reconstitution de trajectoires basée sur la vidéomicroscopie et l'implémentation d'un script Python afin de suivre le comportement motile des leptospires en présence d'inhibiteurs de la VKOR. Accessible, cette méthode peut être transposable pour d'autres applications dans d'autres laboratoires de recherche.

Par ailleurs, l'acquisition de souches de leptospires pour la réalisation des tests de mise au point de la méthode nous a amené à participer à deux études de terrains sur le portage leptospirosique des campagnols terrestres dans le Puy-de-Dôme et des rats urbains dans des zones densément peuplées à Lyon et Bordeaux. Ces deux études ont permis d'évaluer le risque potentiel de transmission de la leptospirose de ces rongeurs à l'homme dans les zones étudiées. Elles vont donc contribuer à une meilleure compréhension de la maladie, en particulier en ce qui concerne les souches de leptospires associées à ces populations de rongeurs, ce qui devrait avoir des implications pour la surveillance, la prévention et le contrôle de la maladie.

VIII. PERSPECTIVES

Ce travail de thèse exploratoire a permis de révéler un marqueur génétique des leptospires qui pourrait être un facteur de virulence essentiel tant en épidémiologie moléculaire qu'en thérapeutique. En tant qu'étude pionnière, il ouvre la voie à de nombreuses investigations qui devront être menées pour une meilleure optimisation de nos résultats. Plusieurs domaines sont concernés par ces investigations, ce qui pourrait conduire à des projets de collaboration entre laboratoires de recherche.

➤ Dans le domaine de la modélisation moléculaire

Nos résultats ont montré que la warfarine n'était pas un bon inhibiteur de la VKOR des leptospires et révélé les résidus qui contribuaient aux interactions de notre protéine d'intérêt et de ses substrats. Partant de ces résidus, des mutants peuvent être définis afin de décrire les mécanismes de modification du cycle enzymatique (suractivation ou inactivation) toujours dans l'optique du développement de nouveaux inhibiteurs de la VKOR. Par ailleurs, lors de la préparation des simulations de dynamique moléculaire, la membrane utilisée était composée d'un seul type de phospholipides. La composition de la membrane des bactéries étant plus complexe et hétérogène, il serait intéressant d'étudier les mécanismes d'interactions de la VKOR en intégrant d'autres composants de la membrane.

➤ Dans le domaine de la génétique et de l'expérimentation animale

Nous avons mis en évidence la séquence de VKOR dans le génome des leptospires. Cependant, comment est-ce qu'elle est apparue chez les leptospires ? Quel autre rôle pourrait-elle avoir chez la bactérie ? Son absence lui pourrait-elle être fatale ? Est-ce que des leptospires knockoutés pour ce gène seraient immobiles ? quelle sera la virulence de ces souches KO sur un modèle animal sensible à la leptospirose ? Voici autant de questions que suscitent nos résultats sur le plan de la génétique et de l'expérimentation animale.

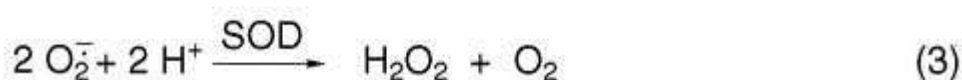
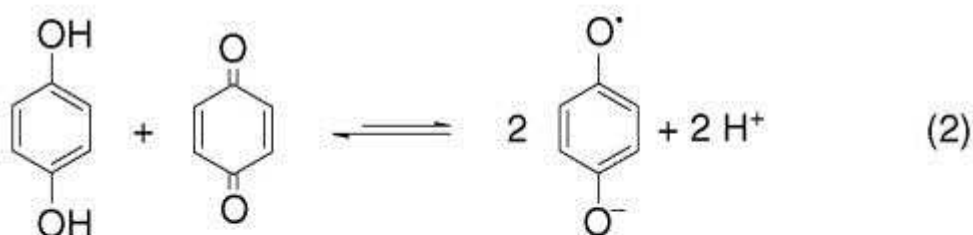
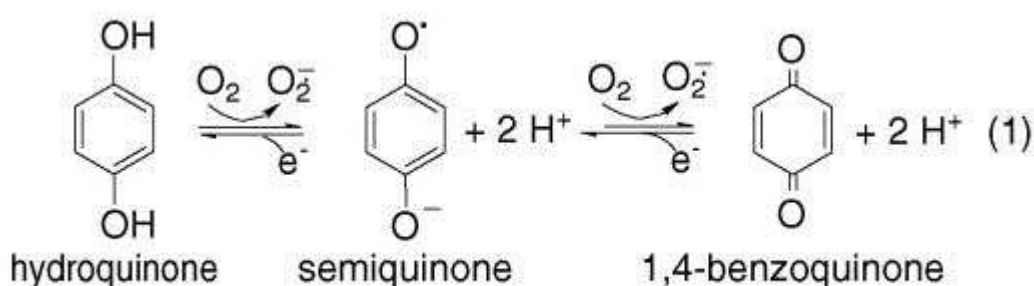
➤ Dans le domaine de la biologie moléculaire

L'analyse de la séquence de VKOR des leptospires ayant montré une certaine variation en fonction des souches, cette dernière peut-elle être utilisée pour discriminer les souches ? Existe-t-il des mutations pouvant être liées à la virulence des souches ? ou encore existe-t-il des souches pour lesquelles un phénomène de résistance peut être observé ? Voici autant d'interrogations qui mériteraient d'être approfondies.

➤ Dans le domaine de la biochimie

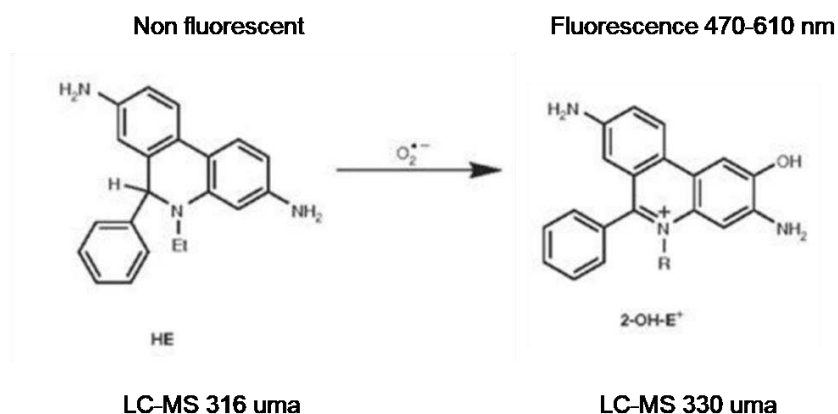
Nous avons mis en place un système d'étude enzymatique se passant du DTT et remplacé par une protéine Trx-like et du NAD(P)H2 pour apporter le pouvoir réducteur à la VKORC1. La transposition de ce système à la VKOR des leptospires pour sa caractérisation enzymatique est en cours et les résultats déjà obtenus sont encourageants pour contourner l'instabilité de l'hydroquinone, une des problématiques auxquelles nous nous sommes retrouvés confronter.

En effet, l'instabilité de l'hydroquinone en présence d'oxygène est liée au fait que l'hydroquinone se réoxyde d'abord en semiquinone puis en quinone en libérant à chacune de ces deux étapes un anion radical superoxyde O_2^- .



Cet anion radical superoxyde peut être dosé en présence de différentes sondes qui peuvent être colorées ou fluorescentes comme le dihydroéthidium.

La structure du dihydroéthidium et l'interaction de cette molécule avec l'anion radical superoxyde produit le 2-Hydroxyéthidium qui est fluorescent contrairement au dihydroéthidium. Dans la mesure où la masse du métabolite (330 uma) est plus élevée que celle du substrat (316 uma), une méthode de mesure en LC-MS est envisageable.



Pour mettre en place une méthode de dosage de l'anion radical superoxyde, nous avons utilisé une réaction biochimique très fréquemment décrite pour produire de l'anion radical superoxyde.



En utilisant cette réaction en présence de concentration croissante de xanthine, nous avons pu observer une augmentation nette de la fluorescence (excitation 470nm, émission 610nm), néanmoins les concentrations de xanthine nécessaires étaient bien plus fortes que les concentrations attendues de KH2 au cours de l'activité de la VKORC1. En conséquence, nous avons essayé de doser l'hydroxy-éthidium (330uma) issu du dihydroéthidium (316uma). Les résultats obtenus ont été encourageants car la sensibilité de la méthode est apparue nettement augmentée par le dosage en LC/MS.

La réaction de la DHE en présence d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ peut également être suivie en spectrométrie de masse. Essayant de suivre la réaction par cette méthode, nous avons cherché à évaluer différents paramètres tels que l'influence de la concentration en xanthine ou en XO ou en DHE de façon à optimiser les conditions permettant d'évaluer la fluorescence du 2-OH-E⁺.

Exemple de protocole permettant d'évaluer la fluorescence en fonction de la concentration en

Xanthine :

- Plaque 96 puits
- Volume : 0.2 mL/puits
- DHE 1 μL par puits soit 125 μM
- Xanthine : puits à 25 μM (5 μL), puits à 5 μM (1 μL), 1.25 μM (0.25 μL), 0 μM (0 μL)
- Réaction déclenchée par 1 μL de Xanthine Oxydase.

Tous les puits/tubes ont été réalisés en dupliqua afin de vérifier la répétabilité et/ou une éventuelle erreur de manipulation.

Nous avons mesuré la fluorescence à l'aide d'un lecteur de microplaques et avons effectué une analyse cinétique détaillée de la réaction en fluorimétrie à 470nm-610nm sur une période de 1h30mn.

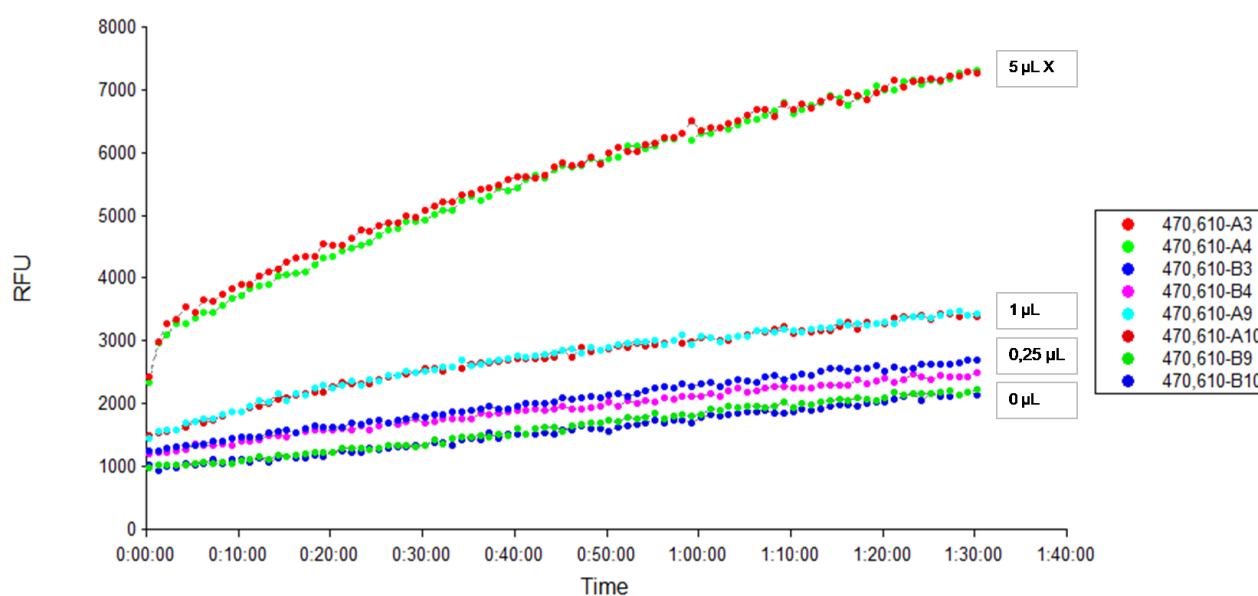


Figure : Graphique de l'évolution de la fluorescence en fonction de la concentration en Xanthine (X 5µl correspond à 25 µM)

La pente était dépendante de la concentration en Xanthine. Les variations de fluorescence sont très significatives pour les valeurs de X allant de 25 à 5 µM (5 à 1µL). La concentration de 1,25µM (0,25µL) est difficilement quantifiable par cette approche.

Nous sommes donc en mesure de mesurer indirectement l'anion radical superoxyde par cette méthode.

Nous avons voulu ensuite vérifier que nous sommes en capacité de mesurer l'hydroquinone de vitamine K (KH₂) par ce même système. La synthèse chimique de KH₂ est réalisée selon le protocole publié par l'équipe de M. Fasco (1980).

Les solutions de vitamine K étaient de 20mg/mL dans une solution aqueuse d'Emulgen 911 (10 % v/v). La vitamine K hydroquinone a été préparée en incubant 0,02 mL de la solution de vitamine K-émulgen 911 avec 1 ml de chlorhydrate de tris (hydroxyméthyl) aminométhane 0,2M (Tris-HCl), 0,15 M de KCl, et du dithiothréitol 0,1 M à pH 8,5, dans un flacon scellé sous vide à 20°C pendant 18 heures.

Nous avons réalisé l'expérience de façon similaire (200 μL par puits, 1 μL de DHE et une quantité variable de KH_2) et avons pu observer de la fluorescence (470/610nm).

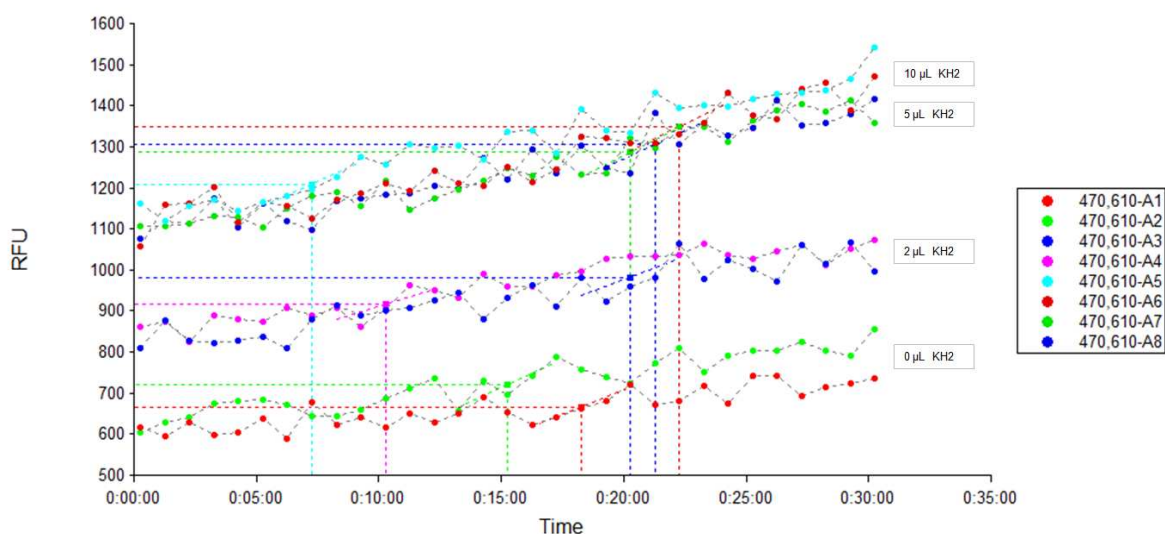


Figure : Graphique de l'évolution de la fluorescence en fonction de la concentration en KH_2

Le DHE détecte bien la production d' O_2^- libéré lors de la réoxydation de la KH_2 . Pour 1 μL de KH_2 par puits, on aurait une concentration de l'ordre de 5 μM dans le puits.

Il apparaît que même si la concentration en KH_2 est très surestimée suite à la réoxydation qui a dû se faire pendant la purification de la KH_2 , la sensibilité de la méthode doit être faible et très certainement limitante par rapport à l'objectif de produire enzymatiquement la KH_2 avec une mesure en continu de la fluorescence.

Nous avons donc poursuivi cette étude en testant la capacité à réduire la vitamine K quinone en présence d'un système Trx complet et des microsomes de levures exprimant la VKORC1 et en présence de DHE.

Nous avons réalisé un système enzymatique semblable dans une plaque Elisa :

- Tampon d'incubation (qsp 200 μL)
- Microsomes de levure exprimant une VKORC1 non mutée (WT) (2 μL /puits)
- Système régénérant (100 μL /puits)
- TrxR (1 μL /puits)
- Trx (8 μL /puits)
- DHE (1 μL /puits)

Une pré-incubation pendant 30min à 37°C a été effectuée afin d'optimiser la réduction du donneur d'électrons Trx.

La réaction a été initiée en ajoutant 0 ; 2 ou 4 μL de substrat vitamine K quinone (K) puis son suivi s'est fait par fluorimétrie.

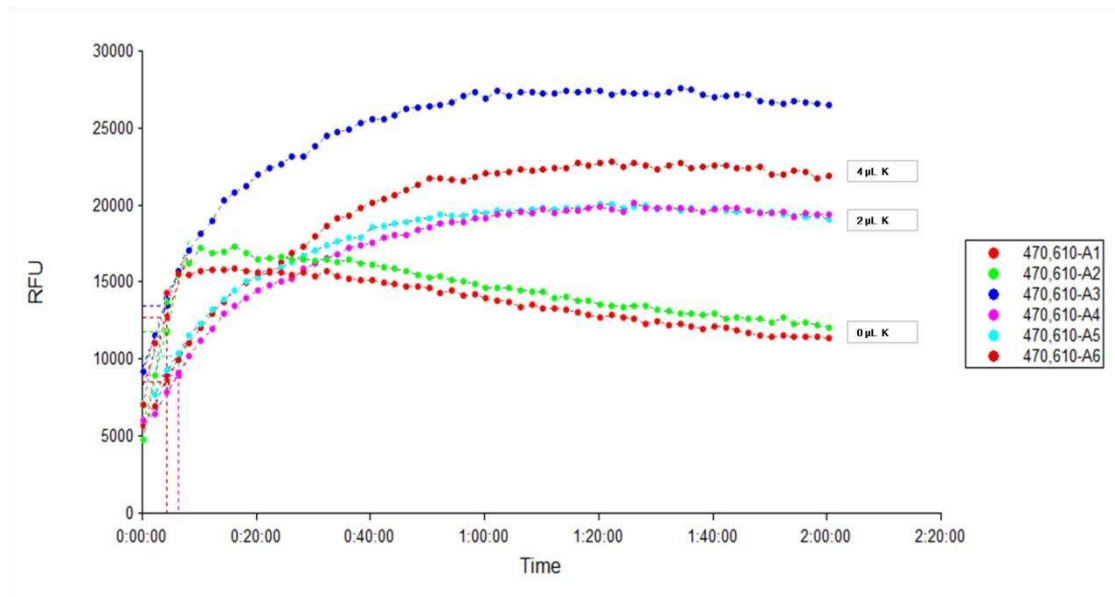


Figure : Suivi de la fluorescence en fonction de la concentration en vitamine K quinone

Nous avons constaté que la fluorescence augmentait en fonction de la quantité en vitamine K : le DHE détectait bien l' $\text{O}_2^{\cdot -}$ et nous pouvions quantifier la vitamine K hydroquinone en fonction de l' $\text{O}_2^{\cdot -}$ formé.

Pour confirmer ce résultat, nous avons effectué la même manipulation en ajoutant des AVKs.

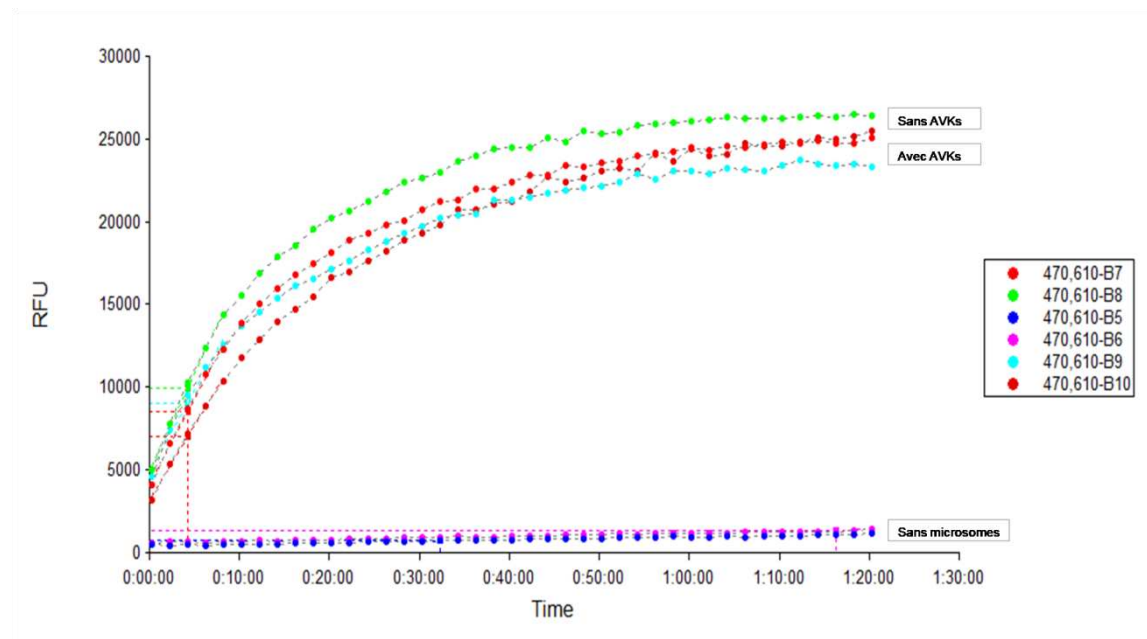


Figure : Suivi de la fluorescence en fonction de la présence ou non d'AVKs

Nous étions censés obtenir une courbe qui diminuait en fonction de la quantité en AVKs car l'enzyme est inhibée par les AVKs. Malheureusement, nous avons obtenu des résultats semblables à ceux sans AVKs.

Il n'y a donc pas que l'enzyme VKOR qui catalyse la réaction mais probablement d'autres enzymes métalliques présentes dans les microsomes de levures qui libèrent également de l'anion radical superoxyde.

En effet, pour confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé la même manipulation avec des levures « blanches » qui ne contiennent pas l'enzyme VKOR.

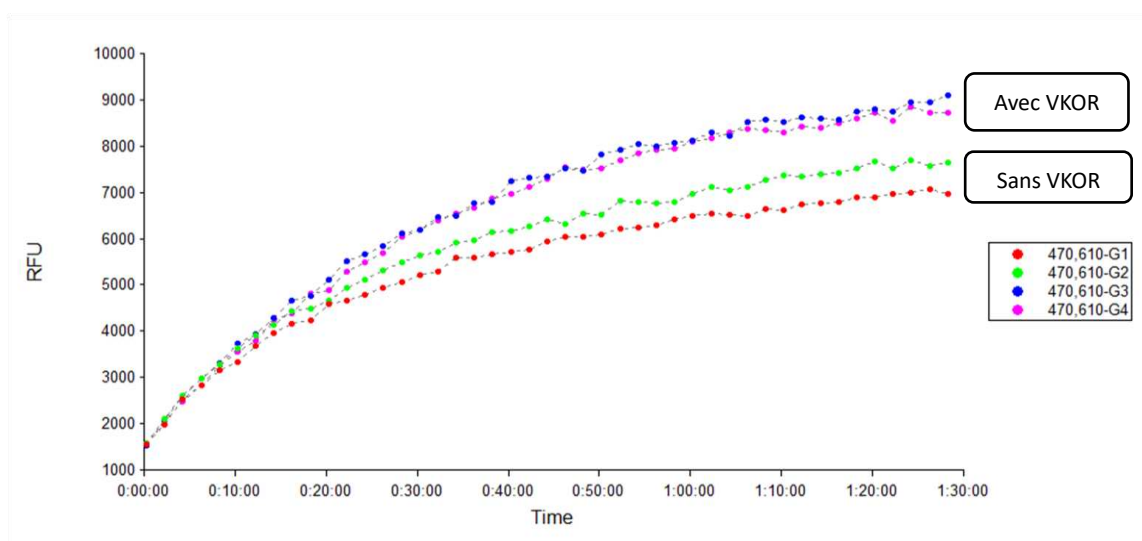


Figure : Suivi de la fluorescence en fonction de la présence ou non de l'enzyme VKOR

L'évolution de la fluorescence dans le temps n'est donc pas dépendante de la présence de VKORC1 recombinante dans les microsomes. Il ne s'agit donc pas seulement de l'enzyme VKOR qui catalyse la réaction de K en KH_2 puis la production de O_2^- . Les levures « blanches » et recombinantes doivent certainement aussi exprimer une enzyme présentant une activité quinone réductase.

En conclusion, notre système utilisant la DHE ne permet pas d'évaluer l'activité de la VKORC1 exprimée en microsomes de levures. **Néanmoins si on arrive à purifier l'enzyme VKOR, on éviterait la libération d' O_2^- des autres enzymes présentes chez les levures.** Ainsi, la fluorescence observée ne proviendrait que de l'enzyme VKOR.

Un travail complémentaire a aussi été réalisé avec la mesure du 2-OH E par LC-MS. Ce travail a montré que le seuil de détection de la méthode LC-MS était largement inférieur à la méthode fluorimétrie.

Néanmoins, nous travaillons sur la production et la purification de VKORC1 pour clore ce chapitre qui évidemment sera suivi par un dernier chapitre correspondant à la caractérisation de l'activité VKOR bactérienne purifiée.

Une fois, ce chapitre clos, il serait intéressant de voir si ce modèle peut être utilisable pour établir une relation entre une éventuelle mutation de la VKOR et une potentielle résistance phénotypique.



IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

A

- Abb J., **2002**. *Acute leptospirosis in a triathlete*. Wilderness & environmental medicine, 13 (1), 45–47. [https://doi.org/10.1580/1080-6032\(2002\)013\[0045:aliat\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1580/1080-6032(2002)013[0045:aliat]2.0.co;2)
- Acha P. N. & Szyfres B., **1989**. Leptospirosis. In: Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. World Health Organization, Scientific Publication No. 503, 93-97. Pan American Health Organization, Washington, DC.
- Adler J., **1965**. *Chemotaxis in Escherichia coli*. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, 30, 289–292. <https://doi.org/10.1101/sqb.1965.030.01.030>
- Adler B. & de la Peña Moctezuma A., **2010**. *Leptospira and leptospirosis*. Veterinary microbiology, 140 (3-4), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Adler B. (Ed.), **2015**. *Leptospira and Leptospirosis*, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8>
- Agudo D., Mendoza M. T., Castañares C., Nombela C., & Rotger R., **2004**. *A proteomic approach to study Salmonella typhi periplasmic proteins altered by a lack of the DsbA thiol: disulfide isomerase*. Proteomics, 4 (2), 355–363. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300554>
- Ahmed A., Engelberts M. F., Boer K. R., Ahmed N., & Hartskeerl R. A., **2009**. *Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials*. PloS one, 4 (9), e7093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007093>
- Alston J. M., Broom J. C., & Doughty C. J. A., **1958**. *Leptospirosis in man and animals*. E & S Livingstone, Edinburgh
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., & Lipman D. J., **1990**. *Basic local alignment search tool*. Journal of molecular biology, 215 (3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amilasan A. S., Ujiie M., Suzuki M., Salva E., Belo M. C., Koizumi N., Yoshimatsu K., Schmidt W. P., Marte S., Dimaano E. M., Villarama J. B., & Ariyoshi K., **2012**. *Outbreak of leptospirosis after flood, the Philippines, 2009*. Emerging infectious diseases, 18 (1), 91–94. <https://doi.org/10.3201/eid1801.101892>
- André-Fontaine G., **2006**. *Canine leptospirosis--do we have a problem?*. Veterinary microbiology, 117 (1), 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.005>
- Arent Z., Pardyak L., Dubniewicz K., Płachno B., & Kotula-Balak M., **2022**. *Leptospira taxonomy: Then and now*. Medycyna Weterynaryjna, 78(10), 489-496.
- Ashford R.W., **2003**. *When is a reservoir not a reservoir?*. Emerging infectious diseases, 9 (11), 1495-1496.
- Aviat F., Rochereau-Roulet S., Branger C., Estavoyer J. M., Chatrenet B., Orsonneau J. L., Thorin C., & Andre-Fontaine G., **2010**. *Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis*. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 33 (5), 375–387. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2009.01.001>

Ayral F., Artois J., Zilber A. L., Widén F., Pounder K. C., Aubert D., Bicout D. J., & Artois M., **2015**. *The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats : a survey in Rhône, France (2010-2012)*. *Epidemiology and infection*, 143(3), 586–599. <https://doi.org/10.1017/S0950268814001137>

Ayral 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 (9), e0162549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162549>

B

Babudieri B., **1971**. *Isolation and study of antigenic mutants of saprophytic and pathogenic Leptospiras*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, 218(1), 75–86.

Bader M., Muse W., Ballou D. P., Gassner C., & Bardwell J. C., **1999**. *Oxidative protein folding is driven by the electron transport system*. *Cell*, 98 (2), 217–227. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81016-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81016-8)

Bader M. W., Xie T., Yu C. A., & Bardwell J. C., **2000**. *Disulfide bonds are generated by quinone reduction*. *The Journal of biological chemistry*, 275 (34), 26082–26088. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003850200>

Baranton G. & Old I. G., **1995**. *The Spirochaetes: a different way of life*. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 93 (2), 63-95.

Barbieri J. T. & Sun J., **2004**. *Pseudomonas aeruginosa ExoS and ExoT*. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 152, 79–92. <https://doi.org/10.1007/s10254-004-0031-7>

Barcellos C. & Sabroza P. C., **2001**. *The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro*. *Cadernos de saude publica*, 17 Suppl, 59–67. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2001000700014>

Bardwell J. C., McGovern K., & Beckwith J., **1991**. *Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo*. *Cell*, 67 (3), 581–589. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90532-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90532-4)

Bardwell J. C., Lee J. O., Jander G., Martin N., Belin D., & Beckwith J., **1993**. *A pathway for disulfide bond formation in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (3), 1038–1042. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.3.1038>

Bardy S. L., Ng S. Y. M., & Jarrell K. F., **2003**. *Prokaryotic motility structures*. *Microbiology*, 149 (Pt 2), 295–304. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25948-0>

Beaudu-Lange C. & Lange E., **2014**. *Unusual clinical presentation of leptospirosis in a cat*. *Revue Vétérinaire Clinique*, 49 (3), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.anicom.2014.05.001>

Benacer D., Thong K. L., Min N. C., Bin Verasahib K., Galloway R. L., Hartskeerl R. A., Souris M., & Mohd Zain S. N., **2016**. *Epidemiology of human leptospirosis in Malaysia, 2004-2012*. *Acta tropica*, 157, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.01.031>

- Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., & Wheeler D. L., **2003**. *GenBank*. Nucleic acids research, 31 (1), 23–27. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg057>
- Berendsen H. J., Postma J. V., Van Gunsteren W. F., DiNola A. R. H. J., & Haak J. R., **1984**. *Molecular dynamics with coupling to an external bath*. The Journal of chemical physics, 81 (8), 3684-3690.
- Berg H. C., & Brown D. A., **1972**. *Chemotaxis in Escherichia coli analysed by three-dimensional tracking*. Nature, 239 (5374), 500–504. <https://doi.org/10.1038/239500a0>
- Berg H. C., **2003**. *The rotary motor of bacterial flagella*. Annual review of biochemistry, 72, 19–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161737>
- Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., & Bourne P. E., **2000**. *The Protein Data Bank*. Nucleic acids research, 28 (1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Best R. B., Zh, X., Shim J., Lopes P. E., Mittal J., Feig M., & Mackerell A. D. Jr, **2012**. *Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain $\chi(1)$ and $\chi(2)$ dihedral angles*. Journal of chemical theory and computation, 8 (9), 3257–3273. <https://doi.org/10.1021/ct300400x>
- Bharti A. R., Nally J. E., Ricaldi J. N., Matthias M. A., Diaz M. M., Lovett M. A., Levett P. N., Gilman R. H., Willig M. R., Gotuzzo E., Vinetz J. M., & Peru-United States Leptospirosis Consortium, **2003**. *Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance*. The Lancet. Infectious diseases, 3 (12), 757–771. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00830-2)
- Blasdell K. R., Morand S., Perera D., & Firth C., **2019**. *Association of rodent-borne Leptospira spp. with urban environments in Malaysian Borneo*. PLoS neglected tropical diseases, 13(2), e0007141.
- Boland M., Sayers G., Coleman T., Bergin C., Sheehan N., Creamer E., O'Connell M., Jones L., & Zochowski W., **2004**. *A cluster of leptospirosis cases in canoeists following a competition on the River Liffey*. Epidemiology and infection, 132 (2), 195–200. <https://doi.org/10.1017/s0950268803001596>
- Bolin C. A., **1994**. *Diagnosis of leptospirosis in swine*. Swine Health and Production, 2 (3), 23-24.
- Bomfim M. R., Ko A., & Koury M. C., **2005**. *Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis*. Veterinary microbiology, 109 (1-2), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.05.002>
- Boqvist S., Thu H. T., Vågsholm I., & Magnusson U., **2002**. *The impact of Leptospira seropositivity on reproductive performance in sows in southern Viet Nam*. Theriogenology, 58 (7), 1327–1335. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00971-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00971-8)
- Bourhy P., Frangeul L., Couvé E., Glaser P., Saint Girons I., & Picardeau M., **2005**. *Complete nucleotide sequence of the LE1 prophage from the spirochete Leptospira biflexa and characterization of its replication and partition functions*. Journal of bacteriology, 187 (12), 3931–3940. <https://doi.org/10.1128/JB.187.12.3931-3940.2005>

Bourhy P., Hochedez P., & Picardeau M., **2012**. *Leptospirose*. Maladies infectieuses. Elsevier Masson Ed., Paris, 9, 1-12.

Bourhy P., Collet L., Brisse S., & Picardeau M., **2014**. *Leptospira mayottensis* sp. nov., a pathogenic species of the genus *Leptospira* isolated from humans. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64 (Pt12), 4061–4067.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.066597-0>

Bourhy P., Septfonds A., & Picardeau M., **2017**. *Diagnostic, surveillance et épidémiologie de la leptospirose en France*. *Bull Epidemiol Hebd*, 8-9, 131-137.

Bradford M. M., **1976**. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.

Braun T. F., Khubbar M. K., Saffarini D. A., & McBride M. J., **2005**. *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility genes identified by mariner mutagenesis. *Journal of bacteriology*, 187 (20), 6943–6952. <https://doi.org/10.1128/JB.187.20.6943-6952.2005>

Brem S., Gerhards H., Wollanke B., Meyer P., & Kopp H., **1999**. *35 leptospira isolated from the vitreous body of 32 horses with recurrent uveitis (ERU)*. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, 112 (10-11), 390–393.

Brett-Major D. M., & Coldren R., **2012**. *Antibiotics for leptospirosis*. The Cochrane database of systematic reviews, (2), CD008264. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008264.pub2>

Budihal S. V., & Perwez K., **2014**. *Leptospirosis diagnosis: competency of various laboratory tests*. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 8 (1), 199–202.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/6593.3950>

Buckle A. P., Smith R. H., editors, **2015**. *Rodent pests and their control*. 2nd edition. Wallingford, Oxfordshire ; Boston, MA : CAB ; 422 p.

Bundesinstitut für Risikobewertung, **2014**. *Leptospirose – eine seltene, aber immer häufiger auftretende Erkrankung*. Berlin : BfR/RKI, 1-2.

C

Caimano M. J., Sivasankaran S. K., Allard A., Hurley D., Hokamp K., Grassmann A. A., Hinton J. C., & Nally J. E., **2014**. *A model system for studying the transcriptomic and physiological changes associated with mammalian host-adaptation by Leptospira interrogans serovar Copenhageni*. *PLoS pathogens*, 10 (3), e1004004.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004004>

Caimi K. & Ruybal P., **2020**. *Leptospira spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 81, 104241.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104241>

Cameron C. E., **2015**. *Leptospiral structure, physiology, and metabolism*. *Current topics in microbiology and immunology*, 387, 21–41. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_3

Carmel-Harel O. & Storz G., **2000**. *Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the Escherichia coli and saccharomyces cerevisiae responses to oxidative stress*. Annual review of microbiology, 54, 439–461.

<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.439>

Carvalho E., Barbosa A. S., Gómez R. M., Oliveira M. L., Romero E. C., Gonçalves A. P., Morais Z. M., Vasconcellos S. A., & Ho P. L., **2010**. *Evaluation of the expression and protective potential of Leptospiral sphingomyelinases*. Current microbiology, 60 (2), 134–142.

<https://doi.org/10.1007/s00284-009-9519-3>

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), **1997**. *Outbreak of leptospirosis among white-water rafters--Costa Rica, 1996*. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 46 (25), 577–579.

Cerqueira G. M. & Picardeau M., **2009**. *A century of Leptospira strain typing*. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 9 (5), 760–768. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.009>

Chakraborty A., Miyahara S., Villanueva S.Y.A.M., Saito M., Gloriani N.G., Yoshida S., **2011**. *A novel combination of selective agents for isolation of Leptospira species : Selective medium for Leptospira*. Microbiology and Immunology, 55 (7), 494–501.

<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00347.x>

Chalayon P., Chanket P., Boonchawalit T., Chattanadee S., Srimanote P., & Kalambaheti T., **2011**. *Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 105 (5), 289–297.

<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.01.008>

Charon N. W., Daughtry G. R., McCuskey R. S., & Franz G. N., **1984**. *Microcinematographic analysis of tethered Leptospira illini*. Journal of bacteriology, 160 (3), 1067–1073.

<https://doi.org/10.1128/jb.160.3.1067-1073.1984>

Charon N. W. & Goldstein S. F., **2002**. *Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes*. Annual review of genetics, 36, 47–73.

<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.36.041602.134359>

Charon N. W., Cockburn A., Li C., Liu J., Miller K. A., Miller M. R., Motaleb M. A., & Wolgemuth C. W., **2012**. *The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis*. Annual review of microbiology, 66, 349–370. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150145>

Che R., Ding S., Zhang Q., Yang W., Yan J., & Lin X., **2019**. *Haemolysin Sph2 of Leptospira interrogans induces cell apoptosis via intracellular reactive oxygen species elevation and mitochondrial membrane injury*. Cellular microbiology, 21 (1), e12959.

<https://doi.org/10.1111/cmi.12959>

Chusri S., McNeil E. B., Hortiwakul T., Charenmak B., Sritrairatchai S., Santimaleeworagun W., Pattharachayakul S., Suksanan P., Thaisomboonsuk B., & Jarman R. G., **2014**. *Single dosage of doxycycline for prophylaxis against leptospiral infection and leptospirosis during urban flooding in southern Thailand: a non-randomized controlled trial*. Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy, 20 (11), 709–715.

<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2014.07.016>

Ciceroni L., Lombardo D., Pinto A., Ciarrocchi S., & Simeoni J., **2000**. *Prevalence of antibodies to Leptospira serovars in sheep and goats in Alto Adige-South Tyrol*. Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health, 47 (3), 217–223. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2000.00333.x>

Cinco M., **1981**. Culture des leptospires. Méd. Mal. Infect., 11 (12), 57-59.

Costa F., Hagan J. E., Calcagno J., Kane M., Torgerson P., Martinez-Silveira M. S., Stein C., Abela-Ridder B., & Ko, A. I., **2015**. *Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review*. PLoS neglected tropical diseases, 9 (9), e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>

Czogalla K. J., Biswas A., Wendeln A. C., Westhofen P., Müller C. R., Watzka M., & Oldenburg J., **2013**. *Human VKORC1 mutations cause variable degrees of 4-hydroxycoumarin resistance and affect putative warfarin binding interfaces*. Blood, 122(15), 2743–2750. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-501692>

D

Dailey F. E. & Berg H. C., **1993**. *Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90 (3), 1043–1047. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.3.1043>

Demers R. Y., Frank R., Demers P., & Clay M., **1985**. *Leptospiral exposure in Detroit rodent control workers*. American journal of public health, 75 (9), 1090–1091. <https://doi.org/10.2105/ajph.75.9.1090>

Desvars A., Cardinale E., & Michault A., **2011**. *Animal leptospirosis in small tropical areas*. Epidemiology and infection, 139 (2), 167–188. <https://doi.org/10.1017/S0950268810002074>

Dikken H. & Kmety E., **1978**. *Chapter VIII serological typing methods of leptospires*. In Methods in microbiology (Vol. 11, pp. 259-307). Academic Press.

Donahue J. M., Smith B. J., Poonacha K. B., Donahoe J. K., & Rigsby C. L., **1995**. *Prevalence and serovars of leptospira involved in equine abortions in central Kentucky during the 1991-1993 foaling seasons*. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 7 (1), 87–91. <https://doi.org/10.1177/104063879500700114>

Douglin C. P., Jordan C., Rock R., Hurley A., & Levett P. N., **1997**. *Risk factors for severe leptospirosis in the parish of St. Andrew, Barbados*. Emerging infectious diseases, 3 (1), 78–80. <https://doi.org/10.3201/eid0301.970114>

Dufour B., Moutou F., Hattenberger A. M., & Rodhain F., **2008**. *Global change : impact, management, risk approach and health measures--the case of Europe*. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 27 (2), 529–550.

Dupont H., Dupont-Perdrizet D., Perie J. L., Zehner-Hansen S., Jarrige B., & Daijardin J. B., **1997**. *Leptospirosis: prognostic factors associated with mortality*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 25 (3), 720–724. <https://doi.org/10.1086/513767>

Dutton R. J., Boyd D., Berkmen M., & Beckwith J., **2008**. *Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105 (33), 11933–11938. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804621105>

Dutton R. J., Wayman A., Wei J. R., Rubin E. J., Beckwith J., & Boyd D., **2010**. *Inhibition of bacterial disulfide bond formation by the anticoagulant warfarin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107 (1), 297–301. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912952107>

E

Ellinghausen H.C. & McCullough W.G., **1965**. *Nutrition of Leptospira pomona and growth of 13 others serotypes : fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80*. American journal of veterinary research, 26, 45–51.

Ellis W. A., McParland P. J., Bryson D. G., & Cassells J. A., **1986**. *Boars as carriers of leptospire of the Australis serogroup on farms with an abortion problem*. The Veterinary record, 118 (20), 563. <https://doi.org/10.1136/vr.118.20.563>

Ellis W. A., **2015**. *Animal Leptospirosis*. In: Leptospira and Leptospirosis. Springer, Berlin, Heidelberg, 99–137. (Current Topics in Microbiology and Immunology).

Ernster L., **1960**. *Transhydrogenase and TPNH oxidase activities of rat-liver mitochondria*. Biochimica et biophysica acta, 38, 170–173. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(60\)91217-8](https://doi.org/10.1016/0006-3002(60)91217-8)

Eshghi A., Lourdault K., Murray G. L., Bartpho T., Sermswan R. W., Picardeau M., Adler B., Snarr B., Zuerner R. L., & Cameron C. E., **2012**. *Leptospira interrogans catalase is required for resistance to H₂O₂ and for virulence*. Infection and immunity, 80 (11), 3892–3899. <https://doi.org/10.1128/IAI.00466-12>

Ewing T. J., Makino S., Skillman A. G., & Kuntz I. D., **2001**. *DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases*. Journal of computer-aided molecular design, 15 (5), 411–428. <https://doi.org/10.1023/a:1011115820450>

F

Faine S., Adler B., Bolin C., Pérolat P., **1999a**. *Leptospira and leptospirosis*. Melbourne, Australia: MediSci. 296 p.

Faine S., Adler B., Bolin C., Pérolat P., **1999b**. *Leptospira and leptospirosis*. Second Edition. MediSci, Melbourne, Australia.

Fasco M. J., & Principe L. M., **1980**. *Vitamin K1 hydroquinone formation catalyzed by a microsomal reductase system*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 97 (4), 1487–1492.

Fasco M. J., Principe L. M., Walsh W. A., & Friedman P. A., **1983**. *Warfarin inhibition of vitamin K 2,3-epoxide reductase in rat liver microsomes*. Biochemistry, 22 (24), 5655–5660. <https://doi.org/10.1021/bi00293a031>

Fávero J. F., de Araújo H. L., Lilienbaum W., Machado G., Tonin A. A., Baldissera M. D., Stefani L. M., & Da Silva A. S., **2017**. *Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation*. *Microbial pathogenesis*, 107, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.032>

Flannery B., Costa D., Carvalho F. P., Guerreiro H., Matsunaga J., Da Silva E. D., Ferreira A. G., Riley L. W., Reis M. G., Haake D. A., & Ko A. I., **2001**. *Evaluation of recombinant Leptospira antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis*. *Journal of clinical microbiology*, 39 (9), 3303–3310. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3303-3310.2001>

Fouts D.E., Matthias M.A., Adhikarla H., Adler B., Amorim-Santos L., Berg D.E., Bulach D., Buschiazzi A., Chang Y.-F., Galloway R.L., Haake D.A., Haft D.H., Hartskeerl R., Ko A.I., Levett P.N., Matsunaga J., Mechaly A.E., Monk J.M., Nascimento A.L.T., Nelson K.E., Palsson B., Peacock S.J., Picardeau M., Ricaldi J.N., Thaipandungpanit J., Wunder E.A., Yang X.F., Zhang J.-J., & Vinetz J.M., **2016**. *What Makes a Bacterial Species Pathogenic?: Comparative Genomic Analysis of the Genus Leptospira*. *PLoS neglected tropical diseases*, 10 (2), e0004403. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004403>

Fraga T. R., Carvalho E., Isaac L., & Barbosa A. S., **2015**. *Leptospira and leptospirosis*. In *Molecular Medical Microbiology*, Elsevier, p. 1973-1990.

Freedman, R. B., **1991**. *Protein disulfide isomerase*. In: Nall, B.T. and Dill, K.A., Editors. *Conformation and Forces in Protein Folding*, American Association for the Advancement of Science, Washington DC., 204-214.

Frenkel D. & Smit B., **1996**. *Understanding molecular simulations : From algorithms to Applications*. Academic press: San, Diego.

Friesner R. A., Banks J. L., Murphy R. B., Halgren T. A., Klicic J. J., Mainz D. T., Repasky M. P., Knoll E. H., Shelley M., Perry J. K., Shaw D. E., Francis P., & Shenkin P. S., **2004**. *Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy*. *Journal of medicinal chemistry*, 47 (7), 1739–1749. <https://doi.org/10.1021/jm0306430>

Fujii T., Iwane A. H., Yanagida T., & Namba K., **2010**. *Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy*. *Nature*, 467 (7316), 724–728. <https://doi.org/10.1038/nature09372>

Fung D. C. & Berg H. C., **1995**. *Powering the flagellar motor of Escherichia coli with an external voltage source*. *Nature*, 375 (6534), 809–812. <https://doi.org/10.1038/375809a0>

G

Gamelin L. & Harry P., **2005**. *Rodenticides*. *EMC – Toxicologie – pathologie*, 2 (3), 89-97

Ganoza C. A., Matthias M. A., Saito M., Cespedes M., Gotuzzo E., & Vinetz J. M., **2010**. *Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by Leptospira*. *PLoS neglected tropical diseases*, 4 (2), e612. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000612>

- Garba B., Bahaman A. R., Khairani-Bejo S., Zakaria Z., & Mutalib A. R., **2017**. *Retrospective Study of Leptospirosis in Malaysia*. *EcoHealth*, 14 (2), 389–398.
<https://doi.org/10.1007/s10393-017-1234-0>
- Gay N., Soupé-Gilbert M. E., & Goarant C., **2014**. *Though not reservoirs, dogs might transmit Leptospira in New Caledonia*. *International journal of environmental research and public health*, 11 (4), 4316–4325. <https://doi.org/10.3390/ijerph110404316>
- Gelman S. S., Gundlapalli A. V., Hale D., Croft A., Hindiyeh M., & Carroll K. C., **2002**. *Spotting the spirochete: rapid diagnosis of leptospirosis in two returned travelers*. *Journal of travel medicine*, 9 (3), 165–167. <https://doi.org/10.2310/7060.2002.23165>
- Ghahremanpour M. M., Arab S. S., Aghazadeh S. B., Zhang J., & van der Spoel D., **2014**. *MemBuilder: a web-based graphical interface to build heterogeneously mixed membrane bilayers for the GROMACS biomolecular simulation program*. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30 (3), 439–441. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt680>
- Giraudoux P., Delattre P., Habert M., Quéré J. P., Deblay S., Defaut R., ... & Truchetet D., **1997**. *Population dynamics of fossorial water vole (Arvicola terrestris scherman) : a land use and landscape perspective*. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 66 (1), 47-60.
- Goarant C., **2016**. *Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries*. *Research and reports in tropical medicine*, 7, 49–62.
<https://doi.org/10.2147/RRTM.S102543>
- Godlewska R., Dzwonek A., Mikuła M., Ostrowski J., Pawłowski M., Bujnicki J. M., & Jagusztyn-Krynicka E. K., **2006**. *Helicobacter pylori protein oxidation influences the colonization process*. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 296 (4-5), 321–324. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.11.010>
- Goldstein R. E., **2010**. *Canine leptospirosis*. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 40 (6), 1091–1101. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.008>
- Goodstadt L. & Ponting C. P., **2004**. *Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism*. *Trends in biochemical sciences*, 29 (6), 289–292.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.04.004>
- Goris M. G. & Hartskeerl R. A., **2014**. *Leptospirosis serodiagnosis by the microscopic agglutination test*. *Current protocols in microbiology*, 32, 12E.5.1-12E.5.18.
<https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc12e05s32>
- Goulois J., Chapuzet A., Lambert V., Chatron N., Tchertanov L., Legros L., Benoît E., & Lattard V., **2016**. *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 management science*, 72(3), 544–550. <https://doi.org/10.1002/ps.4020>
- Graber J. R., Leadbetter J. R., & Breznak J. A., **2004**. *Description of Treponema azotonutricium sp. nov. and Treponema primitia sp. nov., the first spirochetes isolated from termite guts*. *Applied and environmental microbiology*, 70 (3), 1315–1320.
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1315-1320.2004>

Griffith M. E., Hospenthal D. R., & Murray C. K., **2006**. *Antimicrobial therapy of leptospirosis*. Current opinion in infectious diseases, 19 (6), 533–537.
<https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3280106818>

Griffith M. E., Moon J. E., Johnson E. N., Clark K. P., Hawley J. S., Hospenthal D. R., & Murray C. K., **2007**. *Efficacy of fluoroquinolones against Leptospira interrogans in a hamster model*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 51 (7), 2615–2617.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00240-07>

Guarner J., Shieh W. J., Morgan J., Bragg S. L., Bajani M. D., Tappero J. W., & Zaki S. R., **2001**. *Leptospirosis mimicking acute cholecystitis among athletes participating in a triathlon*. Human pathology, 32 (7), 750–752. <https://doi.org/10.1053/hupa.2001.25599>

Guerra M. A., **2009**. *Leptospirosis*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 234 (4), 472–430. <https://doi.org/10.2460/javma.234.4.472>

Guillois Y., Bourhy P., Ayrat F., Pivette M., Decors A., Aranda Grau J. H., Champenois B., Malhère C., Combes B., Richomme C., Le Guyader M., King L. A., & Septfons A., **2018**. *An outbreak of leptospirosis among kayakers in Brittany, North-West France, 2016*. Euro surveillance : European communicable disease bulletin, 23 (48), 1700848.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.48.1700848>

Gupta R. S., Mahmood S., & Adeolu M., **2013**. *A phylogenomic and molecular signature based approach for characterization of the phylum Spirochaetes and its major clades: proposal for a taxonomic revision of the phylum*. Frontiers in microbiology, 4, 217.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00217>

H

Haake D. A., Dundoo M., Cader R., Kubak B. M., Hartskeerl R. A., Sejvar J. J., & Ashford D. A., **2002**. *Leptospirosis, water sports, and chemoprophylaxis*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 34 (9), e40–e43.
<https://doi.org/10.1086/339942>

Haake D. A. & Matsunaga J., **2010**. *Leptospira : a spirochaete with a hybrid outer membrane*. Molecular microbiology, 77 (4), 805–814.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07262.x>

Haake D. A. & Levett P. N., **2015**. *Leptospirosis in humans*. Current topics in microbiology and immunology, 387, 65–97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5

Haapala D. K., Rogul M., Evans L. B., & Alexander A. D., **1969**. *Deoxyribonucleic acid base composition and homology studies of Leptospira*. Journal of bacteriology, 98 (2), 421–428.
<https://doi.org/10.1128/jb.98.2.421-428.1969>

Harman M. W., Dunham-Ems S. M., Caimano M. J., Belperron A. A., Bockenstedt L. K., Fu H. C., Radolf J. D., & Wolgemuth C. W., **2012**. *The heterogeneous motility of the Lyme disease spirochete in gelatin mimics dissemination through tissue*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109 (8), 3059–3064.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1114362109>

- Hartmann K., Egberink H., Pennisi M. G., Lloret A., Addie D., Belák S., Boucraut-Baralon C., Frymus T., Gruffydd-Jones T., Hosie M. J., Lutz H., Marsilio F., Möstl K., Radford A. D., Thiry E., Truyen U., & Horzinek M. C., **2013**. *Leptospira species infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management*. Journal of feline medicine and surgery, 15 (7), 576–581. <https://doi.org/10.1177/1098612X13489217>
- Harwood C. S. & Canale-Parola E., **1984**. *Ecology of spirochetes*. Annual review of microbiology, 38, 161–192. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.38.100184.001113>
- HAS, **2011**. *DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA LEPTOSPIROSE* - Note de cadrage.
- Heras B., Kurz M., Jarrott R., Shouldice S. R., Frei P., Robin G., Cemazar M., Thöny-Meyer L., Glockshuber R., & Martin J. L., **2008**. *Staphylococcus aureus DsbA does not have a destabilizing disulfide. A new paradigm for bacterial oxidative folding*. The Journal of biological chemistry, 283 (7), 4261–4271. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707838200>
- Higgins R., **1981**. *A minireview of the pathogenesis of acute leptospirosis*. The Canadian veterinary journal, 22 (9), 277–278.
- Hiniker A. & Bardwell J. C., **2004**. *In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases*. The Journal of biological chemistry, 279 (13), 12967–12973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311391200>
- Hochedez P., Rosine J., Théodose R., Abel S., Bourhy P., Picardeau M., Quénel P., & Cabié A., **2011**. *Outbreak of leptospirosis after a race in the tropical forest of Martinique*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 84 (4), 621–626. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0502>
- Hodroge A., Longin-Sauvageon C., Fourel I., Benoit E., & Lattard V., **2011**. *Biochemical characterization of spontaneous mutants of rat VKORC1 involved in the resistance to antivitamin K anticoagulants*. Archives of biochemistry and biophysics, 515 (1-2), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.08.010>
- Hodroge A., Matagrín B., Moreau C., Fourel I., Hammed A., Benoit E., & Lattard V., **2012**. *VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 10(12), 2535–2543. <https://doi.org/10.1111/jth.12019>
- Hogg P. J., **2003**. *Disulfide bonds as switches for protein function*. Trends in biochemical sciences, 28 (4), 210–214. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00057-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00057-4)
- Hübener E. A., **1915**. *Beiträge zur Aetiologie der Weilschen Krankheit*. Dtsch Med Wochenschr, 41 : 1275-1277.
- Humberd C. M., Murray C. K., Stuart S. K., Reeb B. A., & Hospenthal D. R., **2005**. *Enumerating leptospire using the coulter counter*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 73 (5), 962–963.
- Humphrey W., Dalke A., & Schulten K., **1996**. *VMD : visual molecular dynamics*. Journal of molecular graphics, 14 (1), 33–28. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)

Hwang C., Sinskey A. J., & Lodish H. F., **1992**. *Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum*. *Science* (New York, N.Y.), 257 (5076), 1496–1502.
<https://doi.org/10.1126/science.1523409>

I

Ido Y., Hoki R., Ito H., & Wani H., **1917**. *The rat as a carrier of spirochaeta icterohaemorrhagiae, the causative agent of weil's disease (Spirochaetosis icterohaemorrhagica)*. *The Journal of experimental medicine*, 26 (3), 341–353.
<https://doi.org/10.1084/jem.26.3.341>

Inada R., Ido Y., Hoki R., Kaneko R., & Ito H., **1916**. *The etiology, mode of infection, and specific therapy of weil's disease (Spirochaetosis icterohaemorrhagica)*. *The Journal of experimental medicine*, 23 (3), 377–402. <https://doi.org/10.1084/jem.23.3.377>

J

Jamshidi S., Akhavizadegan M. A., Bokaie S., Maazi N., & Ghorbanali A., **2009**. *Serologic study of feline leptospirosis in Tehran, Iran*. *Iranian Journal of Microbiology* 1 : 32-36.

Jancloes M., Bertherat E., Schneider C., Belmain S., Munoz-Zanzi C., Hartskeerl R., & Benschop J., **2014**. *Towards a “one health” strategy against leptospirosis*. *Planet@ Risk*, 2 (3), 204-206.

Jander G., Martin N. L., & Beckwith J., **1994**. Two cysteines in each periplasmic domain of the membrane protein DsbB are required for its function in protein disulfide bond formation. *The EMBO journal*, 13 (21), 5121–5127.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06841.x>

Jansen A., Schöneberg I., Frank C., Alpers K., Schneider T., & Stark K., **2005**. *Leptospirosis in germany, 1962–2003*. *Emerging infectious diseases*, 11 (7), 1048.

Jarrell K. F. & McBride M. J., **2008**. *The surprisingly diverse ways that prokaryotes move*. *Nature reviews. Microbiology*, 6 (6), 466–476. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1900>

Johnson R. C. & Rogers P., **1964**. *Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire with 8-azaguanine*. *Journal of bacteriology*, 88 (6), 1618–1623.
<https://doi.org/10.1128/jb.88.6.1618-1623.1964>

Johnson R. C. & Harris, V. G., **1967**. *Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire. I. Growth at low temperatures*. *Journal of bacteriology*, 94 (1), 27–31.
<https://doi.org/10.1128/jb.94.1.27-31.1967>

Jolley K. A. & Maiden M. C., **2010**. *BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level*. *BMC bioinformatics*, 11, 595.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-595>

Jones G., Willett P., Glen R. C., Leach A. R., & Taylor R., **1997**. *Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking*. *Journal of molecular biology*, 267 (3), 727–748.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>

Jordan A. & Reichard P., **1998**. *Ribonucleotide reductases*. *Annual review of biochemistry*, 67, 71–98. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.71>

Josenhans C., & Suerbaum S., **2002**. *The role of motility as a virulence factor in bacteria*. International journal of medical microbiology : IJMM, 291(8), 605–614. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00173>

Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Židek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S. A. A., Ballard A. J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., ... , & Hassabis D., **2021**. *Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold*. Nature, 596 (7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

K

Kanagavel M., Princy Margreat A. A., Arunkumar M., Prabhakaran S. G., Shanmughapriya S., & Natarajaseenivasan K., **2016**. *Multilocus sequence typing (MLST) of leptospiral strains isolated from two geographic locations of Tamil Nadu, India*. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 37, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.11.008>

Kang H. J., Coulibaly F., Clow F., Proft T., & Baker E. N., **2007**. *Stabilizing isopeptide bonds revealed in gram-positive bacterial pilus structure*. Science (New York, N.Y.), 318 (5856), 1625–1628. <https://doi.org/10.1126/science.1145806>

Katz A. R., Ansdell V. E., Effler P. V., Middleton C. R., & Sasaki D. M., **2002**. *Leptospirosis in Hawaii, 1974-1998 : epidemiologic analysis of 353 laboratory-confirmed cases*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 66 (1), 61–70. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.61>

Kawaguchi L., Sengkeopraseuth B., Tsuyuoka R., Koizumi N., Akashi H., Vongphrachanh P., Watanabe H., & Aoyama A., **2008**. *Seroprevalence of leptospirosis and risk factor analysis in flood-prone rural areas in Lao PDR*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 78 (6), 957–961.

Kazami A., Watanabe H., Hayashi T., Kobayashi K., Ogawa Y., Yamamoto K., & Adachi Y., **2002**. *Serological survey of leptospirosis in sows with premature birth and stillbirth in Chiba and Gunma prefectures of Japan*. The Journal of veterinary medical science, 64 (8), 735–737. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.735>

Kearns D. B., **2010**. *A field guide to bacterial swarming motility*. Nature reviews. Microbiology, 8 (9), 634–644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>

Khan S., Pierce D., & Vale R. D., **2000**. *Interactions of the chemotaxis signal protein CheY with bacterial flagellar motors visualized by evanescent wave microscopy*. Current biology : CB, 10 (15), 927–930. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00629-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00629-1)

Kishigami S., Akiyama Y., & Ito K., **1995**. *Redox states of DsbA in the periplasm of Escherichia coli*. FEBS letters, 364 (1), 55–58. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00354-c](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00354-c)

Kitamura H. & Hara H., **1918**. *Ueber den Erreger von "Akiyami"*. Tokyo Med J, 2056-2057

Ko A. I., Goarant C., & Picardeau M., **2009**. *Leptospira : the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen*. Nature reviews. Microbiology, 7 (10), 736–747. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2208>

Kobayashi T., Kishigami S., Sone M., Inokuchi H., Mogi T., & Ito K., **1997**. *Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing Escherichia coli cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94 (22), 11857–11862.

<https://doi.org/10.1073/pnas.94.22.11857>

Kobayashi Y., **2001**. *Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view*. Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy, 7 (1), 10–15. <https://doi.org/10.1007/s101560170028>

Koizumi N., Muto M., Tanikawa T., Mizutani H., Sohmura Y., Hayashi E., Akao N., Hoshino M., Kawabata H., & Watanabe H., **2009**. *Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring Leptospira interrogans in urban areas of Tokyo, Japan*. Journal of medical microbiology, 58 (Pt 9), 1227–1230. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.011528-0>

Kojer K. & Riemer J., **2014**. *Balancing oxidative protein folding: the influences of reducing pathways on disulfide bond formation*. Biochimica et biophysica acta, 1844 (8), 1383–1390. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.02.004>

Kojima S. & Blair D. F., **2004**. *Solubilization and purification of the MotA/MotB complex of Escherichia coli*. Biochemistry, 43 (1), 26–34. <https://doi.org/10.1021/bi0354051>

Korba A. A., Lounici H., Kainiu M., Vincent A. T., Mariet J. F., Veyrier F. J., Goarant C., & Picardeau M., **2021**. *Leptospira ainlahdjerensis sp. nov., Leptospira ainzelensis sp. nov., Leptospira abararensis sp. nov. and Leptospira chreensis sp. nov., four new species isolated from water sources in Algeria*. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 71 (12), 10.1099/ijsem.0.005148. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005148>

Kosossey C., **2004**. *La leptospirose canine : revue bibliographique*. Thèse Méd. Vét. ENVA, N°135, 150p.

Kralt T., Bots J. P. L., Moed H. D., & Ariens E. J., **1967**. *Anticoagulants. Part I: Synthesis of 2,3-disubstituted 1,4-naphthoquinones and 4-hydroxycoumarins*. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas, 86 : 961-970. <https://doi.org/10.1002/recl.19670860907>

L

Laemmli U. K., **1970**. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227 (5259), 680–685.

Lambert A., Picardeau M., Haake D. A., Sermswan R. W., Srikram A., Adler B., & Murray G. A., **2012**. *FlaA proteins in Leptospira interrogans are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath*. Infection and immunity, 80(6), 2019–2025. <https://doi.org/10.1128/IAI.00131-12>

Lambert A., Takahashi N., Charon N. W., & Picardeau M., **2012**. *Chemotactic Behavior of Pathogenic and Nonpathogenic Leptospira Species*. Appl. Environ. Microbiol., 78 (23), 8467–8469. <https://doi.org/10.1128/AEM.02288-12>

Landeta C., Boyd D., & Beckwith J., **2018**. *Disulfide bond formation in prokaryotes*. Nature microbiology, 3 (3), 270-280. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0106-2>

- Landouzy L. T. J., **1883**. *Typhus hépatique*. Gazette Des Hôpitaux Civils et Militaires, 56, 913–914.
- Larsson C. E., Santa Rosa C. A., Larsson M. H., Birgel E. H., Fernandes W. R., & Paim G. V., **1985**. *Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis*. Int J Zoonoses 12 (2) : 111-119.
- Łasica A. M. & Jagusztyn-Krynicka E. K., **2007**. *The role of Dsb proteins of Gram-negative bacteria in the process of pathogenesis*. FEMS Microbiol Rev., 31(5), 626-36.
doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00081.x.
- Lasseur R., Longin-Sauvageon C., Videmann B., Billeret M., Berny P., & Benoit E., **2005**. *Warfarin resistance in a French strain of rats*. J Biochem Mol Toxicol., 19(6), 379-85.
doi: 10.1002/jbt.20104.
- Lau C. L., Smythe L. D., Craig S. B., & Weinstein P., **2010**. *Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire?*, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 104 (10), 631-638. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.07.002.
- Lautier T. & Nasser W., **2005**. *Régulation des gènes de virulence par la phase de croissance chez les bactéries à Gram négatif*. Regard sur la Biochimie, 1, 19-28.
- Lévesque B., Messier V., Bonnier-Viger Y., Couillard M., Côté S., Ward B. J., Libman M. D., Gingras S., Dick D., & Dewailly E., **2007**. *Seroprevalence of zoonoses in a Cree community (Canada)*. Diagn Microbiol Infect Dis., 59 (3), 283-6.
doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.06.002.
- Levett P. N., **2001**. *Leptospirosis*. Clinical microbiology reviews, 14 (2), 296–326.
<https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- Levett P. N., Morey R. E., Galloway R. L., Turner D. E., Steigerwalt A. G., & Mayer L. W., **2005**. *Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR*. Journal of medical microbiology, 54 (1), 45–49. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45860-0>
- Levett P. N., **2015**. *Systematics of leptospiraceae*. Current topics in microbiology and immunology, 387, 11–20. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_2
- Li C., Xu H., Zhang K., & Liang F. T., **2010**. *Inactivation of a putative flagellar motor switch protein *FliG1* prevents *Borrelia burgdorferi* from swimming in highly viscous media and blocks its infectivity*. Molecular microbiology, 75 (6), 1563–1576.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07078.x>
- Li T., Chang C. Y., Jin D. Y., Lin P. J., Khvorova A., & Stafford D. W., **2004**. *Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase*. Nature, 427 (6974), 541–544.
<https://doi.org/10.1038/nature02254>
- Li W., Schulman S., Dutton R. J., Boyd D., Beckwith J., & Rapoport T. A., **2010**. *Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase*. Nature, 463 (7280), 507–512.
<https://doi.org/10.1038/nature08720>
- Liao S., Sun, A., Ojcius D. M., Wu S., Zhao J., & Yan J., **2009**. *Inactivation of the *fliY* gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of *Leptospira interrogans* strain Lai*. BMC microbiology, 9, 253. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-253>

Lilenbaum W., Vargas R., Brandão F. Z., Cortez A., de Souza S. O., Brandão P. E., Richtzenhain L. J., & Vasconcellos S. A., **2008**. *Detection of Leptospira spp. in semen and vaginal fluids of goats and sheep by polymerase chain reaction*. *Theriogenology*, 69 (7), 837–842. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.10.027>

Lilenbaum W. & Martins G., **2014**. *Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology*. *Transboundary and emerging diseases*, 61 Suppl 1, 63–68. <https://doi.org/10.1111/tbed.12233>

Link K. P., **1959**. *The discovery of dicumarol and its sequels*. *Circulation*, 19 (1), 97–107. <https://doi.org/10.1161/01.cir.19.1.97>

Liu R. & Ochman H., **2007**. *Stepwise formation of the bacterial flagellar system*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (17), 7116–7121. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700266104>

Liu S., Cheng W., Fowle Grider R., Shen G., & Li W., **2014**. *Structures of an intramembrane vitamin K epoxide reductase homolog reveal control mechanisms for electron transfer*. *Nature communications*, 5, 3110. <https://doi.org/10.1038/ncomms4110>

Loquet A., Gardiennet C., & Böckmann A., **2010**. *Protein 3D structure determination by high-resolution solid-state NMR*. *Comptes Rendus Chimie*, 13 (4), 423-430.

Lourdault K., Cerqueira G. M., Wunder Jr E. A., & Picardeau M., **2011**. *Inactivation of clpB in the pathogen Leptospira interrogans reduces virulence and resistance to stress conditions*. *Infection and immunity*, 79 (9), 3711–3717. <https://doi.org/10.1128/IAI.05168-11>

Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Lim S., Shibuya K., Aboyans V., Abraham J., Adair T., Aggarwal R., Ahn S. Y., Alvarado M., Anderson H. R., Anderson L. M., Andrews K. G., Atkinson C., Baddour L. M., Barker-Collo S., Bartels D. H., Bell M. L., Benjamin E. J., ..., & Memish Z. A., **2012**. *Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. *Lancet* (London, England), 380 (9859), 2095–2128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)

M

Maciel E. A., de Carvalho A. L., Nascimento S. F., de Matos R. B., Gouveia E. L., Reis M. G., & Ko A. I., **2008**. *Household transmission of leptospira infection in urban slum communities*. *PLoS neglected tropical diseases*, 2 (1), e154. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000154>

Macnab R. M., **2003**. *How bacteria assemble flagella*. *Annual review of microbiology*, 57, 77–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090832>

Magrane M. & UniProt Consortium, **2011**. *UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data*. *Database : the journal of biological databases and curation*, 2011, bar009. <https://doi.org/10.1093/database/bar009>

- Marquez A., Djelouadji Z., Lattard V., & Kodjo A., **2017**. *Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospire*. International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology, 20 (4), 184–193.
<https://doi.org/10.2436/20.1501.01.302>
- Marr J. S. & Cathey J. T., **2010**. *New hypothesis for cause of epidemic among native Americans, New England, 1616-1619*. Emerging infectious diseases, 16 (2), 281–286.
<https://doi.org/10.3201/eid1602.090276>
- Martin J. L., Bardwell J. C., & Kuriyan J., **1993**. *Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo*. Nature, 365 (6445), 464–468.
<https://doi.org/10.1038/365464a0>
- Martin L. & Pettit A., **1918**. *Séro-diagnostic de la spirochète ictérohémmorragique*.
- Martínez R., Pérez A., Quiñones M.delC., Cruz R., Alvarez A., Armesto M., Fernández C., Menéndez J., Rodríguez I., Baró M., Díaz M., Rodríguez J., Sierra G., Obregón A. M., Toledo M. E., & Fernández N., **2004**. *Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba [Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba]*. Revista panamericana de salud publica, 15 (4), 249–255.
<https://doi.org/10.1590/s1020-49892004000400005>
- Mattick J. S., **2002**. *Type IV pili and twitching motility*. Annual review of microbiology, 56, 289–314. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160938>
- McBride A. J., Athanazio D. A., Reis M. G., & Ko A. I., **2005**. *Leptospirosis*. Current opinion in infectious diseases, 18 (5), 376–386. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000178824.05715.2c>
- McMichael A. J., Woodruff R. E., & Hales S., **2006**. *Climate change and human health: present and future risks*. Lancet (London, England), 367 (9513), 859–869.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68079-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68079-3)
- Meites E., Jay M. T., Deresinski S., Shieh W. J., Zaki S. R., Tompkins L., & Smith D. S., **2004**. *Reemerging leptospirosis, California*. Emerging infectious diseases, 10 (3), 406–412.
<https://doi.org/10.3201/eid1003.030431>
- Mérien F., Amouriaux P., Perolat P., Baranton G., & Saint Girons I., **1992**. *Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples*. Journal of clinical microbiology, 30 (9), 2219–2224. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.9.2219-2224.1992>
- Merien F., Portnoi D., Bourhy P., Charavay F., Berlioz-Arthaud A., & Baranton G., **2005**. *A rapid and quantitative method for the detection of Leptospira species in human leptospirosis*. FEMS microbiology letters, 249 (1), 139–147.
<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.011>
- Miki T., Okada N., & Danbara H., **2004**. *Two periplasmic disulfide oxidoreductases, DsbA and SrgA, target outer membrane protein SpiA, a component of the Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion system*. The Journal of biological chemistry, 279 (33), 34631–34642.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M402760200>

Miraglia F., Matsuo M., Morais Z. M., Dellagostin O. A., Seixas F. K., Freitas J. C., Hartskeerl R., Moreno L. Z., Costa B. L., Souza G. O., Vasconcellos S. A., & Moreno A. M., **2013**. *Molecular characterization, serotyping, and antibiotic susceptibility profile of Leptospira interrogans serovar Copenhageni isolates from Brazil*. Diagnostic microbiology and infectious disease, 77 (3), 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.003>

Mohammed H., Nozha C., Hakim K., Abdelaziz F., & Rekia B., **2011**. *Leptospira : morphology, classification and pathogenesis*. J. Bacteriol. Parasitol., 2 (6), p. 4, doi: 10.4172/2155- 9597.1000120.

Mohd Radi M.F., Hashim J.H., Jaafar M.H., Hod R., Ahmad N., Mohammed Nawi A., Baloch G.M., Ismail R., & Farakhin Ayub N.I., **2018**. *Leptospirosis Outbreak After the 2014 Major Flooding Event in Kelantan, Malaysia : A Spatial-Temporal Analysis*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 98 (5), 1281–1295. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0922>

Morgan J., Bornstein S. L., Karpati A. M., Bruce M., Bolin C. A., Austin C. C., Woods C. W., Lingappa J., Langkop C., Davis B., Graham D. R., Proctor M., Ashford D. A., Bajani M., Bragg S. L., Shutt K., Perkins B. A., Tappero J. W., & Leptospirosis Working Group, **2002**. *Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998*. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 34 (12), 1593–1599. <https://doi.org/10.1086/340615>

Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., & Olson A. J., **1998**. *Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function*. Journal of computational chemistry, 19 (14), 1639-1662.

Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S., & Olson A. J., **2009**. *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility*. Journal of computational chemistry, 30 (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>

Munoz-Zanzi, C., Groene, E., Morawski, B.M., Bonner, K., Costa, F., Bertherat, E., & Schneider, M.C., **2020**. *A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970–2012*. Revista Panamericana de Salud Pública 44, e78. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.78>

Murray G. L., Srikram A., Henry R., Puapairoj A., Sermswan R. W., & Adler B., **2009**. *Leptospira interrogans requires heme oxygenase for disease pathogenesis*. Microbes and infection, 11 (2), 311–314. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.11.014>

Murray G. L., Srikram A., Henry R., Hartskeerl R. A., Sermswan R. W., & Adler B., **2010**. *Mutations affecting Leptospira interrogans lipopolysaccharide attenuate virulence*. Molecular microbiology, 78 (3), 701–709. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07360.x>

Murray G. L., **2015**. *The molecular basis of leptospiral pathogenesis*. Current topics in microbiology and immunology, 387, 139–185. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_7

Musso D. & La Scola B., **2013**. *Laboratory diagnosis of leptospirosis: a challenge*. Journal of microbiology, immunology, and infection, 46 (4), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.03.001>

N

Nahori M. A., Fournié-Amazouz E., Que-Gewirth N. S., Balloy V., Chignard M., Raetz C. R., Saint Girons I., & Werts C., **2005**. *Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells*. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 175 (9), 6022–6031. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.6022>

Nan B. & Zusman D. R., **2011**. *Uncovering the mystery of gliding motility in the myxobacteria*. *Annual review of genetics*, 45, 21–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132547>

Narayanavari S. A., Kishore N. M., & Sritharan M., **2012**. *Structural analysis of the Leptospiral sphingomyelinases: in silico and experimental evaluation of Sph2 as an Mg-dependent sphingomyelinase*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 22 (1), 24–34. <https://doi.org/10.1159/000337013>

O

Oriel J. D. & Hayward A. H., **1974**. *Sexually-transmitted diseases in animals*. *The British journal of venereal diseases*, 50 (6), 412–420. <https://doi.org/10.1136/sti.50.6.412>

P

Pappachan M. J., Sheela M., & Aravindan K. P., **2004**. *Relation of rainfall pattern and epidemic leptospirosis in the Indian state of Kerala*. *Journal of epidemiology and community health*, 58 (12), 1054. <https://doi.org/10.1136/jech.2003.018556>

Patra, K.P., Choudhury, B., Matthias, M.M., Baga, S., Bandyopadhyaya, K., Vinetz, J.M., **2015**. *Comparative analysis of lipopolysaccharides of pathogenic and intermediately pathogenic Leptospira species*. *BMC Microbiol* 15, 244. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0581-7>

Peek J. A. & Taylor R. K., **1992**. *Characterization of a periplasmic thiol:disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (13), 6210–6214. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.6210>

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 neglected tropical diseases*, 5 (10), e1361. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001361>

Perez Bonilla Q., Dorado Sanchez E., & Borallo Mira J., **1983**. *Une enzootie de leptospire bovine*. *Point Vét.*, 15 (71), 51-54.

Peters T., Jr & Davidson L. K., **1982**. *The biosynthesis of rat serum albumin. In vivo studies on the formation of the disulfide bonds*. *The Journal of biological chemistry*, 257 (15), 8847–8853.

Phimda K., Hoontrakul S., Suttinont C., Chareonwat S., Losuwanaluk K., Chueasuwanchai S., Chierakul W., Suwancharoen D., Silpasakorn S., Saisongkorh W., Peacock S. J., Day N. P., & Suputtamongkol Y., **2007**. *Doxycycline versus azithromycin for treatment of leptospirosis and scrub typhus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51 (9), 3259–3263. <https://doi.org/10.1128/AAC.00508-07>

Picardeau M., Brenot A., & Saint Girons I., **2001**. *First evidence for gene replacement in Leptospira spp. Inactivation of L. biflexa flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella*. Molecular microbiology, 40 (1), 189–199.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02374.x>

Picardeau M., Bulach D. M., Bouchier C., Zuerner R. L., Zidane N., Wilson P. J., Creno S., Kuczek E. S., Bommezzadri S., Davis J. C., McGrath A., Johnson M. J., Boursaux-Eude C., Seemann T., Rouy Z., Coppel R. L., Rood J. I., Lajus A., Davies J. K., Médigue C., ..., & Adler B., **2008**. *Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis*. PloS one, 3 (2), e1607.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001607>

Picardeau M., **2013**. *Diagnosis and epidemiology of leptospirosis*. Medecine et maladies infectieuses, 43 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005>

Picardeau M., **2015**. *Genomics, proteomics, and genetics of leptospira*. Current topics in microbiology and immunology, 387, 43–63. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_4

Picardeau M., **2017**. *Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita?*. Nature reviews. Microbiology, 15 (5), 297–307.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>

Pijnacker R., Goris M. G., Te Wierik M. J., Broens E. M., van der Giessen J. W., de Rosa M., Wagenaar J. A., Hartskeerl R. A., Notermans D. W., Maassen K., & Schimmer B., **2016**. *Marked increase in leptospirosis infections in humans and dogs in the Netherlands, 2014*. Euro surveillance, 21 (17). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30211>

Prescott J., **2008**. *Canine leptospirosis in Canada : a veterinarian's perspective*. CMAJ : Canadian Medical Association journal, 178(4), 397–398.

<https://doi.org/10.1503/cmaj.071092>

Price D. J. & Brooks C. L. 3rd, **2004**. *A modified TIP3P water potential for simulation with Ewald summation*. The Journal of chemical physics, 121 (20), 10096–10103.

<https://doi.org/10.1063/1.1808117>

Q

Que-Gewirth N. L., Ribeiro A. A., Kalb S. R., Cotter R. J., Bulach D. M., Adler B., Girons I. S., Werts C., & Raetz C. R., **2004**. *A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in leptospira interrogans lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2*. The Journal of biological chemistry, 279 (24), 25420–25429. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400598200>

R

Raczko A. M., Bujnicki J. M., Pawłowski M., Godlewska R., Lewandowska M., & Jagusztyn-Krynicka E. K., **2005**. *Characterization of new DsbB-like thiol-oxidoreductases of Campylobacter jejuni and Helicobacter pylori and classification of the DsbB family based on phylogenomic, structural and functional criteria*. Microbiology (Reading, England), 151(Pt 1), 219–231. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27483-0>

Raja V. & Natarajaseenivasan K., **2015**. *Pathogenic, diagnostic and vaccine potential of leptospiral outer membrane proteins (OMPs)*. *Critical reviews in microbiology*, 41 (1), 1–17. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.787387>

Rajapakse S., Rodrigo C., Handunnetti S. M., & Fernando S. D., **2015**. *Current immunological and molecular tools for leptospirosis: diagnostics, vaccine design, and biomarkers for predicting severity*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14, 2. <https://doi.org/10.1186/s12941-014-0060-2>

Rarey M., Kramer B., Lengauer T., & Klebe G., **1996**. *A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm*. *Journal of molecular biology*, 261 (3), 470–489. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0477>

Rautureau S., **2003**. *Bilan du statut sanitaire des bovins et des porcs vis à vis de la leptospirose dans l'union européenne*. Thèse Méd. Vét. ENVN, N° 29, 75 p.

Reis R. B., Ribeiro G. S., Felzemburgh R. D., Santana F. S., Mohr S., Melendez A. X., Queiroz A., Santos A. C., Ravines R. R., Tassinari W. S., Carvalho M. S., Reis M. G., & Ko A. I., **2008**. *Impact of environment and social gradient on Leptospira infection in urban slums*. *PLoS neglected tropical diseases*, 2 (4), e228. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000228>

Rishavy M. A., Hallgren K. W., Yakubenko A. V., Zuerner R. L., Runge K. W., & Berkner K. L., **2005**. *The vitamin K-dependent carboxylase has been acquired by Leptospira pathogens and shows altered activity that suggests a role other than protein carboxylation*. *The Journal of biological chemistry*, 280 (41), 34870–34877. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504345200>

Rishavy M. A., Usabalieva A., Hallgren K. W., & Berkner K. L., **2011**. *Novel insight into the mechanism of the vitamin K oxidoreductase (VKOR): electron relay through Cys43 and Cys51 reduces VKOR to allow vitamin K reduction and facilitation of vitamin K-dependent protein carboxylation*. *The Journal of biological chemistry*, 286 (9), 7267–7278. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.172213>

Rosa M. I., Reis M. F. D., Simon C., Dondossola E., Alexandre M. C., Colonetti T., & Meller F. O., **2017**. *IgM ELISA for leptospirosis diagnosis: a systematic review and meta-analysis*. *Ciencia & saude coletiva*, 22 (12), 4001–4012. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172212.14112016>

Rost S., Fregin A., Ivaskevicius V., Conzelmann E., Hörtnagel K., Pelz H. J., Lappégard K., Seifried E., Scharrer I., Tuddenham E. G., Müller C. R., Strom T. M., & Oldenburg J., **2004**. *Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2*. *Nature*, 427 (6974), 537–541. <https://doi.org/10.1038/nature02214>

S

Sadler J. E., **2004**. *Medicine: K is for koagulation*. *Nature*, 427 (6974), 493–494. <https://doi.org/10.1038/427493a>

Saint Girons I., Margarita D., Amouriaux P., & Baranton G., **1990**. *First isolation of bacteriophages for a spirochaete: potential genetic tools for Leptospira*. *Research in microbiology*, 141 (9), 1131–1138. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(90\)90086-6](https://doi.org/10.1016/0923-2508(90)90086-6)

Sandmeyer L. S., Grahn B. H., & Breaux C. B., **2007**. *Diagnostic ophthalmology. Anterior and posterior uveitis with inflammatory retinal detachment, most likely secondary to equine recurrent uveitis*. The Canadian veterinary journal, 48 (1), 97–98.

Satou K., Shimoji M., Tamotsu H., Juan A., Ashimine N., Shinzato M., Toma C., Nohara T., Shiroma A., Nakano K., Teruya K., Terabayashi Y., Ohki S., Koizumi N., Okano S., Suzuki T., & Hirano T., **2015**. *Complete Genome Sequences of Low-Passage Virulent and High-Passage Avirulent Variants of Pathogenic Leptospira interrogans Serovar Manilae Strain UP-MMC-NIID, Originally Isolated from a Patient with Severe Leptospirosis, Determined Using PacBio Single-Molecule Real-Time Technology*. Genome announcements, 3 (4), e00882-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00882-15>

Schofield F. W., **1984**. *A Brief Account of a Disease in Cattle Simulating Hemorrhagic Septicaemia due to Feeding Sweet Clover*. The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne, 25 (12), 453–455.

Schrödinger L., **2015**. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. (No Title)*.

Sejvar J., Bancroft E., Winthrop K., Bettinger J., Bajani M., Bragg S., Shutt K., Kaiser R., Marano N., Popovic T., Tappero J., Ashford D., Mascola L., Vugia D., Perkins B., Rosenstein N., & Eco-Challenge Investigation Team, **2003**. *Leptospirosis in "Eco-Challenge" athletes, Malaysian Borneo, 2000*. Emerging infectious diseases, 9 (6), 702–707. <https://doi.org/10.3201/eid0906.020751>

Sharma S., Vijayachari P., Sugunan A. P., Natarajaseenivasan K., & Sehgal S. C., **2006**. *Seroprevalence of leptospirosis among high-risk population of Andaman Islands, India*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 74 (2), 278–283.

Shenberg E., **1967**. *Growth of pathogenic Leptospira in chemically defined media*. Journal of bacteriology, 93 (5), 1598–1606. <https://doi.org/10.1128/jb.93.5.1598-1606.1967>

Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T. J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J. D., & Higgins D. G., **2011**. *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*. Molecular systems biology, 7, 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>

Signorini M. L., Lottersberger J., Tarabla H. D., & Vanasco N. B., **2013**. *Enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose human leptospirosis: a meta-analysis of the published literature*. Epidemiology and infection, 141 (1), 22–32. <https://doi.org/10.1017/S0950268812001951>

Silverman R. B., **1980**. *A model for a molecular mechanism of anticoagulant activity of 3-substituted 4-hydroxycoumarins*. Journal of the American Chemical Society, 102 (16), 5421–5423.

Slamti L. & Picardeau M., **2012**. *Construction of a library of random mutants in the spirochete Leptospira biflexa using a mariner transposon*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 859, 169–176. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-603-6_9

Smith J. K., Young M. M., Wilson K. L., & Craig S. B., **2013**. *Leptospirosis following a major flood in Central Queensland, Australia*. Epidemiology and infection, 141 (3), 585–590. <https://doi.org/10.1017/S0950268812001021>

Solomon S. (Ed.), **2007**. *Climate change 2007-the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC* (Vol. 4). Cambridge university press.

Spiri A. M., Rodriguez-Campos S., Matos J. M., Glaus T. M., Riond B., Reusch C. E., Hofmann-Lehmann R., & Willi B., **2017**. *Clinical, serological and echocardiographic examination of healthy field dogs before and after vaccination with a commercial tetravalent leptospirosis vaccine*. BMC veterinary research, 13 (1), 138.
<https://doi.org/10.1186/s12917-017-1056-x>

Stackebrandt E., Chertkov O., Lapidus A., Nolan M., Lucas S., Hammon N., Deshpande S., Cheng J. F., Tapia R., Goodwin L. A., Pitluck S., Liolios K., Pagani I., Ivanova N., Mavromatis K., Mikhailova N., Huntemann M., Pati A., Chen A., Palaniappan K., ..., & Klenk H. P., **2013**. *Genome sequence of the free-living aerobic spirochete *Turneriella parva* type strain (H(T)), and emendation of the species *Turneriella parva**. Standards in genomic sciences, 8 (2), 228–238. <https://doi.org/10.4056/sigs.3617113>

Stafford D. W., **2005**. *The vitamin K cycle*. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH, 3 (8), 1873–1878. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01419.x>

Stimson A. M., **1907**. *Note on an organism found in yellow-fever tissue*. Public Health Reports (Washington), 22 (18), 541.

Stoddard R. A., Gee J. E., Wilkins P. P., McCaustland K., & Hoffmaster A. R., **2009**. *Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene*. Diagnostic microbiology and infectious disease, 64 (3), 247–255.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.014>

Strand, T., Löhmus, M., Persson Vinnersten, T., Råsbäck, T., Sundström, K., Bergström, T., & Lundkvist, Å., **2015**. *Highly Pathogenic *Leptospira* Found in Urban Brown Rats (*Rattus norvegicus*) in the Largest Cities of Sweden*. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.), 15 (12), 779-781. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1800>

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 tropica, 131, 111–116.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.12.009>

Sugunan A. P., Vijayachari P., Sharma S., Roy S., Manickam P., Natarajaseenivasan K., Gupte M. D., & Sehgal S. C., **2009**. *Risk factors associated with leptospirosis during an outbreak in Middle Andaman, India*. The Indian journal of medical research, 130 (1), 67–73.

Sultan S. Z., Pitzer J. E., Miller M. R., & Motaleb M. A., **2010**. *Analysis of a *Borrelia burgdorferi* phosphodiesterase demonstrates a role for cyclic-di-guanosine monophosphate in motility and virulence*. Molecular microbiology, 77 (1), 128–142.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07191.x>

Sykes J. E., Hartmann K., Lunn K. F., Moore G. E., Stoddard R. A., & Goldstein R. E., **2011**. *2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention*. Journal of veterinary internal medicine, 25 (1), 1–13.
<https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x>

T0

- Tahara H., Takabe K., Sasaki Y., Kasuga K., Kawamoto A., Koizumi N., & Nakamura S., **2018**. *The mechanism of two-phase motility in the spirochete Leptospira : Swimming and crawling*. Science advances, 4 (5), eaar7975. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar7975>
- Takabe K., Nakamura S., Ashihara M., & Kudo S., **2013**. *Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic Leptospira*. Microbiology and immunology, 57 (3), 236–239. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12018>
- Takafuji E. T., Kirkpatrick J. W., Miller R. N., Karwacki J. J., Kelley P. W., Gray M. R., McNeill K. M., Timboe H. L., Kane R. E., & Sanchez J. L., **1984**. *An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis*. The New England journal of medicine, 310 (8), 497–500. <https://doi.org/10.1056/NEJM198402233100805>
- Taylor J. R. & Stocker R., **2012**. *Trade-offs of chemotactic foraging in turbulent water*. Science (New York, N.Y.), 338 (6107), 675–679. <https://doi.org/10.1126/science.1219417>
- Terpstra W. J., Schoone G. J., & ter Schegget J., **1986**. *Detection of leptospiral DNA by nucleic acid hybridisation with 32P- and biotin-labelled probes*. Journal of medical microbiology, 22 (1), 23–28. <https://doi.org/10.1099/00222615-22-1-23>
- Thaipadungpanit J., Chierakul W., Wuthiekanun V., Limmathurotsakul D., Amornchai P., Boonslip S., Smythe L. D., Limpai boon R., Hoffmaster A. R., Day N. P., & Peacock S. J., **2011**. *Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study*. PloS one, 6 (1), e16236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016236>
- Thibeaux R., Iraola G., Ferrés I., Bierque E., Girault D., Soupé-Gilbert M. E., Picardeau M., & Goarant C., **2018**. *Deciphering the unexplored Leptospira diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence*. Microbial genomics, 4 (1), e000144. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144>
- Thornley C. N., Baker M. G., Weinstein P., & Maas E. W., **2002**. *Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand*. Epidemiology and infection, 128 (1), 29–36. <https://doi.org/10.1017/s0950268801006392>
- Tie J. K. & Stafford D. W., **2008**. *Structure and function of vitamin K epoxide reductase*. Vitamins and hormones, 78, 103–130. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(07\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(07)00006-4)
- Timoney J. F., Kalimthusamy N., Velineni S., Donahue J. M., Artiushin S. C., & Fetting M., **2011**. *A unique genotype of Leptospira interrogans serovar Pomona type kennewicki is associated with equine abortion*. Veterinary microbiology, 150 (3-4), 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.049>
- Towbin H., Staehelin T., & Gordon J., 1979. *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76 (9), 4350–4354.

Truccolo J., Charavay F., Merien, F., & Perolat, P., **2002**. *Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46 (3), 848–853.
<https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.848-853.2002>

U

Uhlenhuth P., **1915**. *Experimentelle Untersuchung uber die sogenannte Weilsche Krankheit (ansteckende Gelbsucht)*. *Med Klin*, 44, 1202-1203.

V

Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A. E., & Berendsen H. J., **2005**. *GROMACS : fast, flexible, and free*. *Journal of computational chemistry*, 26 (16), 1701–1718.
<https://doi.org/10.1002/jcc.20291>

Van Thiel P. H., **1948**. *The leptospires*. Universitaire Pers Leiden, Leiden

Vedros N. A., Smith A. W., Schonewald J., Migaki G., & Hubbard R. C., **1971**. *Leptospirosis epizootic among California sea lions*. *Science (New York, N.Y.)*, 172 (3989), 1250–1251.
<https://doi.org/10.1126/science.172.3989.1250>

Verma A., Kumar P., Babb K., Timoney J. F., & Stevenson B., **2010**. *Cross-reactivity of antibodies against leptospiral recurrent uveitis-associated proteins A and B (LruA and LruB) with eye proteins*. *PLoS neglected tropical diseases*, 4 (8), e778.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000778>

Verma A., Stevenson B., & Adler B., **2013**. *Leptospirosis in horses*. *Veterinary microbiology*, 167 (1-2), 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.012>

Vernel-Pauillac F. & Merien F., **2006**. *Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans**. *Infection and immunity*, 74 (7), 4172–4179.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00447-06>

Vincent A. T., Schiettekatte O., Goarant C., Neela V. K., Bernet E., Thibeaux R., Ismail N., Mohd Khalid M. K. N., Amran F., Masuzawa T., Nakao R., Amara Korba A., Bourhy P., Veyrier F. J., & Picardeau M., **2019**. *Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics*. *PLoS neglected tropical diseases*, 13 (5), e0007270.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270>

Vinetz J. M., Wilcox B. A., Aguirre A., Gollin L. X., Katz A. R., Fujioka R. S., ..., & Chang H., **2005**. *Beyond disciplinary boundaries: leptospirosis as a model of incorporating transdisciplinary approaches to understand infectious disease emergence*. *EcoHealth*, 2, 291-306.

W

Wada S., Yoshinari M., Katayama Y., Anzai T., Wada R., & Akuzawa M., **2003**. *Nonulcerative keratouveitis as a manifestation of Leptospiral infection in a horse*. *Veterinary ophthalmology*, 6 (3), 191–195. <https://doi.org/10.1046/j.1463-5224.2003.00288.x>

- Waitkins S. A., **1986**. *Leptospirosis as an occupational disease*. British journal of industrial medicine, 43 (11), 721–725. <https://doi.org/10.1136/oem.43.11.721>
- Wajih N., Hutson S. M., & Wallin R., **2007**. *Disulfide-dependent protein folding is linked to operation of the vitamin K cycle in the endoplasmic reticulum. A protein disulfide isomerase-VKORC1 redox enzyme complex appears to be responsible for vitamin K1 2,3-epoxide reduction*. The Journal of biological chemistry, 282 (4), 2626–2635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608954200>
- Warshel A., **1991**. *Computer Modeling of Chemical Reactions in Enzymes and Solutions*. Edition Wiley.
- Watson J. T., Gayer M., & Connolly M. A., **2007**. *Epidemics after natural disasters*. Emerging infectious diseases, 13 (1), 1–5. <https://doi.org/10.3201/eid1301.060779>
- Wayne L. G., Brenner D. J., Colwell R. R., Grimont P. A. D., Kandler O., Krichevsky M. I., Murray R. G. E., Moore W. E. C., Stackebrandt E., Starr M. P., Moore L. H., Truper H. G., **1987**. *Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 37 (4), 463–464. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-463>
- Webb B. & Sali A., **2016**. *Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER*. Current protocols in protein science, 86, 2.9.1–2.9.37. <https://doi.org/10.1002/cpps.20>
- Weil A., **1886**. *Ueber eine eigenthümliche, mit Milztumor, Icterus and Nephritis einhergehende, acute Infectiouskrankheit*. Dtsch Arch Klin Med 39 : 209-232.
- Werts C., Tapping R. I., Mathison J. C., Chuang T. H., Kravchenko V., Saint Girons I., Haake D. A., Godowski P. J., Hayashi F., Ozinsky A., Underhill D. M., Kirschning C. J., Wagner H., Aderem A., Tobias P. S., & Ulevitch R. J., **2001**. *Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism*. Nature immunology, 2 (4), 346–352. <https://doi.org/10.1038/86354>
- Wilkins E., Cope A., & Waitkins S., **1988**. *Rapids, rafts, and rats*. Lancet (London, England), 2 (8605), 283–284. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(88\)92580-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(88)92580-9)
- Williams R. D., Morter R. L., Freeman M. J., & Lavignette A. M., **1971**. *Experimental chronic uveitis. Ophthalmic signs following equine leptospirosis*. Investigative ophthalmology, 10 (12), 948–954.
- Wong M., Katz A. R., Li D., & Wilcox B. A., **2012**. *Leptospira infection prevalence in small mammal host populations on three Hawaiian islands*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 87 (2), 337–341. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0187>
- Woo T. H., Smythe L. D., Symonds M. L., Norris M. A., Dohnt M. F., & Patel B. K., **1997**. *Rapid distinction between Leptospira interrogans and Leptospira biflexa by PCR amplification of 23S ribosomal DNA*. FEMS microbiology letters, 150 (1), 9–18. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10343.x>

World Health Organization, **2003**. *Human leptospirosis : guidance for diagnosis, surveillance and control*. pp 2-21. doi: 10.1590/S0036-46652003000500015.

World Health Organization, **2010**. *Report of the first meeting of the Leptospirosis burden Epidemiology Reference Group (LERG)*. Geneva, Switzerland : World Health Organization, 40 p.

Wunder Jr, E. A., Figueira, C. P., Benaroudj, N., Hu, B., Tong, B. A., Trajtenberg, F., ... & Ko, A. I., 2016. *A novel flagellar sheath protein, FcpA, determines filament coiling, translational motility and virulence for the Leptospira spirochete*. *Molecular microbiology*, 101(3), 457-470.

X

Xu, J., Koizumi, N., & Nakamura, S., **2020**. *Crawling Motility on the Host Tissue Surfaces Is Associated With the Pathogenicity of the Zoonotic Spirochete Leptospira*. *Frontiers in microbiology*, 11, 1886. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01886>

Xue F., Yan J., & Picardeau M., **2009**. *Evolution and pathogenesis of Leptospira spp. : lessons learned from the genomes*. *Microbes and infections*, 11 (3), 328-333. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.12.007>

Y

Yang J., Wolgemuth C. W., & Huber G., **2009**. *Kinematics of the swimming of Spiroplasma*. *Physical review letters*, 102 (21), 218102. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.102.218102>

Yasuda, P.H., Steigerwalt, A.G., Sulzer, K.R., Kaufmann, A.F., Rogers, F., & Brenner, D.J., **1987**. *Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New Leptospira Species*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37 (4), 407–415. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-407>

Z

Zapun A., Bardwell J. C., & Creighton T. E., **1993**. *The reactive and destabilizing disulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation in vivo*. *Biochemistry*, 32 (19), 5083–5092. <https://doi.org/10.1021/bi00070a016>

Zhang Y. X., Geng Y., Bi B., He J. Y., Wu C. F., Guo X. K., & Zhao G. P., **2005**. *Identification and classification of all potential hemolysin encoding genes and their products from Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae serovar Lai*. *Acta pharmacologica Sinica*, 26 (4), 453–461. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00075.x>

Zhao X., Norris S. J., & Liu J., **2014**. *Molecular architecture of the bacterial flagellar motor in cells*. *Biochemistry*, 53 (27), 4323–4333. <https://doi.org/10.1021/bi500059y>

Zheng M., Aslund F., & Storz G., **1998**. *Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation*. *Science (New York, N.Y.)*, 279 (5357), 1718–1721. <https://doi.org/10.1126/science.279.5357.1718>

Zilber A. L., **2015**. *Rôle du rat brun (Rattus norvegicus) dans la persistance des leptospires en conditions naturelles*. Thèse : 235p

Zuerner R. L., Herrmann J. L., & Saint Girons I., **1993**. *Comparison of genetic maps for two Leptospira interrogans serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity*. Journal of bacteriology, 175 (17), 5445-5451.
<https://doi.org/10.1128/jb.175.17.5445-5451.1993>

Zuerner R. L., Alt D., & Bolin C. A., **1995**. *IS1533-based PCR assay for identification of Leptospira interrogans sensu lato serovars*. Journal of clinical microbiology, 33 (12), 3284–3289. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.12.3284-3289.1995>

X. ANNEXES

Dans cette partie, seront présentés les posters et articles (accepté et en finalisation) qui sont le fruit d'autres projets auxquels j'ai eu l'occasion de m'investir également durant mes travaux de thèse.

- ✓ **Poster 1** : « The black rats, *Rattus rattus*: Development and domestication of an internal lineage of black rats for laboratory studies. » a été présenté au congrès international du FELASA en 2022.
- ✓ **Poster 2** : « Comparative study of the prevalence of leptospirosis in urban rat populations living in different environments in Lyon, France » a été présenté au congrès de l'ISWAVLD en 2023.
- ✓ **Poster 3** : « Exposure and resistance to anticoagulant resistance in urban rodent pests in Chad » a été exposé au congrès de l'EVPMC en 2023.
- ✓ Article accepté dans le journal international *Pest Management Science* : « Exposure and resistance to anticoagulant rodenticides in invasive and endemic Chadian urban rodent species to develop a rational management strategy »
- ✓ Article en cours de finalisation : « Diversity and distribution of rodent pests in the main urban areas of Chad »

ANNEXE 1

The Black Rats, *Rattus Rattus*: DEVELOPMENT AND DOMESTICATION OF AN INTERNAL LINEAGE OF BLACK RATS FOR LABORATORY STUDIES

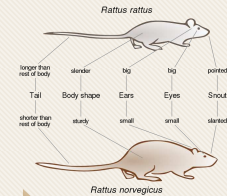
Ambre Fafournoux, Sionfoungo Soro, Sebastien Lefebvre, Virginie Lattard

USC 1233 RS2GP, INRAe, VetAgro Sup, Univ Lyon, F-69280 Marcy l'Etoile, France



Context

- *Rattus Rattus* : a very little known species, little studied and rarely referenced over the literature
- The black rat carry zoonotic agents and is responsible for agricultural losses
- Behavior and diet of black rats differ from those of brown rats (*Rattus norvegicus*). Black and brown rats are unfortunately often confused.
- Lack of knowledge makes black rat populations difficult to manage



➤ The rats were captured from our wild farmed terrariums where their are entirely self-managed. We only intervene to renew water and food.

➤ We installed nine pairs in our quarantine. First accommodations : plexiglass boxes with small wooden crates on SAFE performance litter and hay. Two bottles of water were permanently available as well as SAFE A04, fruits and vegetables.

➤ During the change of habitat, the couples were installed with a transparent red PVC shelter, a PVC tube, a wooden strip and cotton cubes. Following this change, we had litters of pups.



Wild black rat that cannot be caught or approached.



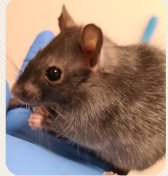
Boxe dimensions : 70cm/70cm/70cm



➤ During a distribution of fresh food, live capture traps were placed in the room housing the black rats

➤ Accommodation was abandoned for conventional rat cages after a month. It was too complex to maintain and monitor and above all bulky and too heavy to be moved.

➤ Over five couples have been followed.
➤ Each 29 to 32 days couples had new babies (between 4 to 6)



Without restraints the animal remains in the hand without trying to flee.

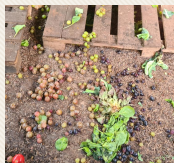
During acclimatization, the diet gradually changed. At the start they had 50% fresh fruits and vegetables and 50% SAFE A04 food caps. Then we went after three weeks to 40% fresh food, 60% A04 and thereafter every two weeks the percentage of fresh food decreased by 10% to increase by 10% in A04.

Following this change, the rodents were also dewormed using Ivermectin and a health check was carried out with a view to store them in FPS animal facilities and in the near future start research on them.

Results

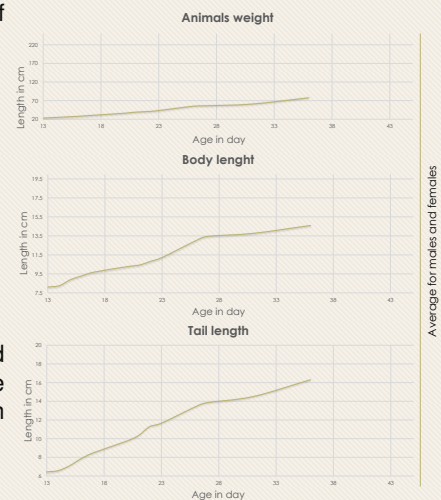
Change observed in the behavior of wild animals from their capture to the third generation of breeding. At the third generation :

- The animals are calmer and no longer jump around.
- Changing cages is done without the animal trying to flee.
- Handling the animals is easier and they no longer try to jump or climb far and fast.
- Change of diet made without complication (from fresh produce to SAFE A04 food)



Even if they remain lively and agile, the animals let themselves be caught with less difficulty and are less afraid of humans. In only three generations they have been largely domesticated and the stress of human presence and contact is visibly reduced. Without restraints the animal remains in the hand or on the handler without trying to flee.

➔ New datas have been collected from the third generation (weight, body and tail length)



Outlook

- Use for behavioral study
 - in group
 - in couple
 - isolated
 - etc
- Use for morphological study
 - birth
 - several days/month
 - adult
 - death
- Research of food preferences
 - possible studies on new forms of rat poison baits adapted to the *Rattus Rattus*

New data

taking information on development, weight, coat...

New data



ANNEXE 2

Comparative study of the prevalence of leptospirosis in urban rat populations living in different environments in Lyon, France

P-94

S. SORO¹, K. GROUD¹, D. MEGARUS¹, A. FAFOURNOUX¹, V. LATTARD¹

¹ vetagro-sup, Marcy l'étoile, France

*Corresponding Auteur: sionfoungo,soro@vetagro-sup.fr

P-94

Introduction

- ✓ Leptospirosis: Re-emerging bacterial zoonosis of worldwide distribution



Considered as the main reservoirs

Able to adapt to different urban environments and proliferate

- ✓ In Europe, metropolitan France is one of the countries with the highest number of cases of human leptospirosis
- ✓ Since characterization of transmission dynamics of leptospires between individuals not yet fully elucidated and the environment would play a determining role

Objective: To compare the prevalence of leptospirosis between populations of urban rats living in different environments in Lyon.

Materials and Methods

- ✓ Using three environments in densely human population areas of Lyon:

sewers



surface areas communicating with sewers



surface areas without communication with underground pipes



- ✓ Capture alive rats in different sites with two-entry rat traps and ferrets
- After capture, Carrying kidney sampling ➡ Using BioExtract SuperBall kit for Genomic DNA extraction
- Using the real-time molecular biology PCR technique targeting the pathogenic 16S rRNA gene for Leptospire detection

Results

- ❖ In total, 59 rats are collected

Table1: Prevalence rates by environment

	sewer	urban surface area with communication with sewer	urban surface area without communication with sewer
Number of rats	18	19	22
Leptospire prevalence rate (%)	50.00 [29.03-70.96]	63.16 [41.04-80.85]	4.55 [0.23-21.80]

Table2: Prevalence rates by sex

	Males	Females
Number of rats	34	25
Prevalence rates	41.18 [26.37-57.78]	32.00 [17.20-51.60]

- ❖ Circulating strain found belongs to **Icterohaemorrhagiae serogroup**

Conclusion

- ❑ Higher prevalence of leptospires in rat populations living in sewers and in surface areas accessing underground pipes
- ❑ These areas characterized by presence of sewage, suggesting an environmental influence in the persistence and circulation of leptospires in rats
 - Planning the detection of leptospires in sewage to confirm the suggesting:
 - Development of method for detecting leptospires in sewage
 - Development of method for culturing leptospires in sewage

ANNEXE 3

Exposure and resistance to anticoagulant resistance in urban rodent pests in Chad

Virginie Lattard, Ali Barka Mahamat, Karine Groud, Soudy Imar Djibrine, Sionfoungo Soro, Nolan Chatron, Etienne Benoit
USC1233, INRAE/Vetagro-sup, Marcy l'étoile, France
*Corresponding Auteur: virginie.lattard@vetagro-sup.fr

INTRODUCTION

- Rodent pest management involves the widespread use of anticoagulant rodenticides (AR).
- This use has resulted in the selection of resistance alleles in the *Vkorc1* gene, encoding the target enzyme of ARs.
- Mutations have been widely reported in many countries.
- In Africa, while rodents are a major problem because of the transport and transmission of zoonotic pathogens and the damage they cause to crops, the use of ARs and the spread of resistance alleles are poorly documented.

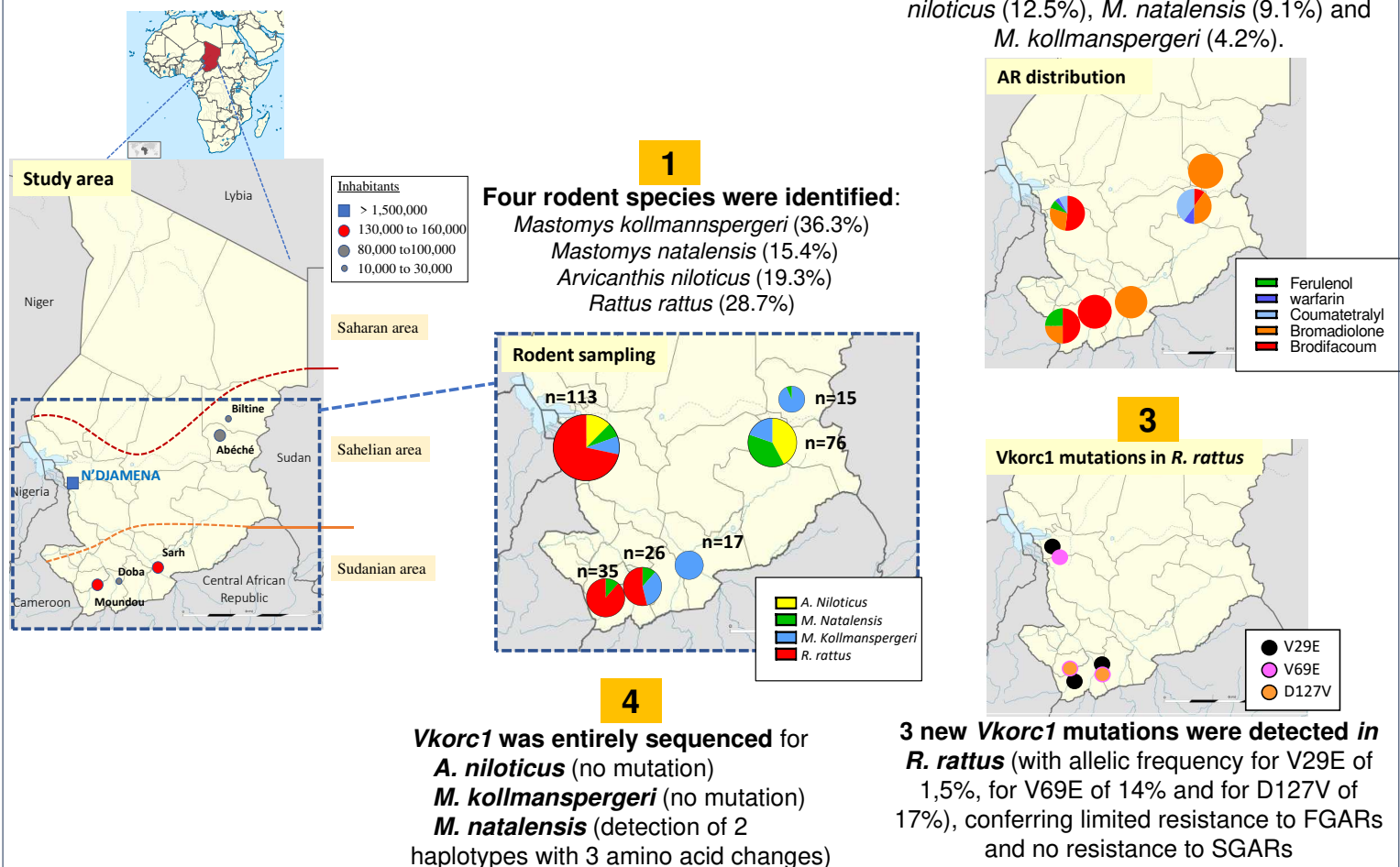
OBJECTIVES

To document the use of ARs and the distribution of AR resistance in Chad, one of Africa's largest countries at the crossroads of North and Central Africa.

METHODS

- Sampling of rodent in urban areas in Chad
- Species identification by *cytochrome b* sequencing
- Exposure to ARs by measurement in liver
- Detection of resistance by *Vkorc1* sequencing
- Consequences of new mutations analyzed by protein engineering and enzymology.

RESULTS



DISCUSSION

Exposure to ARs and the presence of *Vkorc1* gene mutations have been detected in Chad. These results should argue for the implementation of a reasoned management of rodent populations in Africa to avoid the spread of ARs resistance.

ANNEXE 4

Exposure and resistance to anticoagulant rodenticides in invasive and endemic Chadian urban rodent species to develop a rational management strategy.

Short title: Resistance to anticoagulant rodenticide in urban Chadian rodents

Ali Barka MAHAMAT^{1,2}, Karine GROUD¹, Soudy Imar DJIBRINE^{2,3}, Sionfoungo Daouda SORO¹, Isabelle Fourel¹, Antoine RACHED¹, Nolan CHATRON¹, Etienne BENOIT¹, Virginie LATTARD¹ *

¹USC 1233 RS2GP, VetAgro Sup, INRAe, University of Lyon, Lyon, France

²Department of Biomedical and Pharmaceutical Sciences, National Higher Institute of Science and Technology, Abeche, Chad

³Food Quality Control Center, N'Djamena, Chad

*, Corresponding author: Virginie Lattard

Email: Virginie.lattard@vetagro-sup.fr, Phone: +33(0)4 78 87 27 27; Fax: +33(0)4 78 87 05 16

Abstract

Rodent management involves the use of anticoagulant rodenticides (ARs). This use has resulted in the selection of numerous resistance alleles in the *Vkorc1* gene, encoding the target enzyme of ARs. In Africa, while rodents are a major problem due to their transport and transmission of zoonotic pathogens and damage to crops, the use of ARs and the spread of resistance alleles are poorly documented. Through rodent sampling in Chad, one of the largest countries in Africa, bordering many countries, without access to the sea and subject to a great diversity of climate, located at the crossroads of central and northern Africa, representative of both northern and central African countries, we attempt to make progress on these 2 points.

Using a sampling of nearly 300 rodents composed of invasive and endemic rodents collected in 6 of Chad's largest cities, exposure to ARs was analyzed by their quantification in the liver; the spread of AR resistance alleles was analyzed by *Vkorc1* sequencing. We demonstrate the use of both ARs generations in Chadian cities and report the total sequencing of the *Vkorc1* for 44 *M. natalensis* with detection of two different haplotypes, the sequencing of the *Vkorc1* for 2 other endemic rodent species, *M. kollmannspergeri* and *A. niloticus*, and finally the detection of three new missense mutations, V29E, V69E, D127V in *R. rattus*. potentially associated to resistance to ARs.

These results should argue for the implementation of a reasoned management of rodent populations in Africa to avoid the spread of ARs resistance alleles.

Keywords: Rodent, endemic species, invasive species, anticoagulant rodenticides, *Vkorc1*, resistance

1. Introduction

Because of their adaptability and great prolificacy, rodents have colonized all continents except Antarctica and have adapted to all ecosystems, urban, agricultural, forest and desert. Africa has not been spared from rodent outbreaks, despite sometimes extreme climatic conditions prevailing there. Thus, this continent is host to more than 400 species of rodents, of which more than 70 damage crops¹. Rodents pose a threat to agricultural productivity and food security^{2,3}. They are also a threat to public health due to their proximity to humans in ultra-fast-growing urban settlements, providing an environment conducive for rodent outbreaks through poor housing quality, food availability, shelter, and nesting sites^{4,5}. This proximity of rodents to humans poses a major risk to humans due to their widespread carriage of zoonotic pathogens, including Lassa fever, plague, leptospirosis, and toxoplasmosis^{6,7}.

Since the 1950s, the control of rodent outbreaks has been based on chemical control and mainly the use of anticoagulant rodenticides (ARs). These molecules overcome the food aversion of rodents through their mechanism of action with a delayed clinical response. These molecules inhibit the enzyme VKORC1^{8,9}, which is involved in the recycling of vitamin K. This enzyme catalyzes the reduction of vitamin K epoxide to vitamin K quinone and then hydroquinone. Vitamin K hydroquinone is the essential cofactor for the gamma-carboxylation of coagulation factors II, VII, IX and X. In the presence of ARs, vitamin K is not recycled and the pool of activable coagulation factors is progressively depleted, leading to hemorrhage and death.

ARs were first developed in the 1950s with the development of the first generation of molecules (FGARs) led by warfarin. Among these, we can also mention coumatetralyl, coumachlor and chlorophacinone. Shortly after the beginning of the use of FGARs, resistances were described first in Europe, notably in England^{10,11}, then in the United States¹², Australia¹³, Canada¹⁴, Japan¹⁵. The second generation of molecules (SGARs) was then developed. These include bromadiolone, difenacoum, flocoumafen, brodifacoum and difethialone. These molecules are more toxic, but also more ecotoxic because of their very long persistence in the tissues. They are responsible for secondary poisoning leading to wildlife mortality¹⁶.

Resistance to ARs has been described as essentially supported by mutations in the *Vkorc1* gene resulting in weak or no inhibition of the enzyme by ARs. Various mutations have been described in commensal rodents and humans in western or Asian cities and countryside^{17,18,19,20}. In Africa, studies devoted to rodent resistance to rodenticides are extremely rare²⁴. While the presence of brown rats, black rats and house mice is reported in many African countries, the use of ARs is poorly documented. Are they used extensively? Could their use have led to the selection of resistance alleles? Given the extensive trade between Europe and Africa, could European resistance have spread to Africa through transport? In addition to brown rats, black rats and mice, other rodents are present in the environment close to humans, in particular *Mastomys natalensis*, which is the most widespread and abundant rodent pest species of sub-Saharan Africa involved in the transmission of Lassa virus. Knowledge of the exposure and susceptibility of African rodents to ARs is almost non-existent. Through a sampling of rodents, consisting of various endemic rodents as well as invasive rodents, conducted in Chad in 6 of the main cities, this study aims to explore the exposure, and resistance to ARs of rodents in Africa.

2. Materials and methods

2.1 Ethic statements

Rodent samples were collected with the national network of pest control operators. This study was thus not considered to be an “experimental procedure” as defined by the French and Chadian legislation (Rural Code, Article R214–89) and was therefore not subject to an ethical committee approval. This study complied with the ethical standards of European regulations governing the care and use of animals in research (Directive 2010/63/EU).

All the owners of the sites where the captures were carried out were informed of the project and methods and agreed to it.

2.2 Study area and trapping method

This study was conducted in the Republic of Chad, a landlocked country of 1,284,000 square kilometers located at the crossroads of North and Central Africa (Figure 1) characterized by three distinct climatic zones, the Sahara desert in the North (with annual rainfall less than 50 mm), the Sahelian belt in the center (with annual rainfall from 300 to 600 mm) and the Sudanian area in the South (with annual rainfall more than 900 mm). Trapping campaigns were organized in the main cities of the Sahelian, i.e., N'Djaména (the Capital), Abeche and Biltine, and Sudanian areas, i.e., Moundou, Doba, Sarh. Trappings were conducted in individual houses, warehouses and field. A total of 38 different trapping sites in Chad, i.e., 18 houses, 10 warehouses and 10 fields were involved in this study.

Rodent trappings in Chad were conducted from 2019 to 2021 using lethal traps (20 to 25 traps per site) homogeneously distributed over the trapping site where traces of rodents were detected. Baiting was carried out with cucumber and peanut butter. Depending on rodent abundance, trapping was conducted on one or two consecutive days. When traps were set for 2 days, traps were inspected daily and re-baited if necessary. After trapping, fragments of tail and liver were collected and stored at -20°C until their use for genomic DNA extraction and AR extraction.

2.3 AR measurement in liver of rodents

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 described²⁵. 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, 2.7µm) 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 (LOQ) was between 1 and 2 ng/g wet weight (ww).

2.4 Genomic DNA extraction

Genomic DNA extraction was performed from a fragment of tail using the NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's recommendations.

2.5 Species identification

Species determination was performed by the sequencing of the mitochondrial cytochrome *b* gene (*cytb*), as previously described by Pagès *et al.*²⁶. Primers used for its amplification are presented in Table 1. Briefly, Cytochrome *b* amplification was performed using *cytb*-S (5'-ACCAATGACATGAAAAATCATCGTT-3') and *cytb*-AS (5'-TCTCCATTTCTGGTTTACAAGAC-3') primers (10 pmol of each), 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 1213 base pairs (bp)-amplified product was sequenced on both strands; the resulting sequence was submitted to blast analysis.

2.6 Sequencing of *Vkorc1* of *R. rattus*

Genomic DNA extracted from tail was amplified using specific primers of *Vkorc1* gene. In order to sequence the entire *Vkorc1* gene, two sets of primers were systematically used. The sequences of the first primer set VKOR-F1 and VKOR-R1 were (5'- GGTTCCTCCCTCTTGTGTCTG-3') and (5'- GGGTCACCAAGACATGAGGTG-3') for rats^{23,27}. 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'- ACTTGGGCAAGGCTCATGTG-3') and (5'- AAGAGTAGGGGACAAGGTGGC-3') for rats^{23,27}. They were used to amplify exon 2 and exon 3 of *Vkorc1* gene. PCR were performed using set1 or set2 of primers (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, 62°C for 20 s, 68°C for 50 s, and a final extension step at 68°C for 10 min. The 1327 bp- and 1354 bp-amplified products were sequenced on both strands (Biofidal, France). Obtained sequences were subsequently compared with the published *Vkorc1* gene sequence of *R. rattus* (Genbank n°AB702679.1).

2.7 Sequencing of *Vkorc1* of other rodent species

For *M. natalensis*, specific primers to amplify exon 1, 2 or 3 were designed from the Genbank published sequence MF768468.1. For the other 2 species for which sequences were not published, sequence fragments were first amplified and sequenced using primers used for *Vkorc1* sequencing of other rodent species published in the literature²⁷ or used for the above-described sequencing. From the resulting sequence, specific primers were designed to amplify exons 1, 2 and 3. The sequences of the different sets of primers are presented in Table 1. Amplifications were performed with the Platinum SuperFi II Green PCR Master Mix kit (Invitrogen, Cergy Pontoise) in a final reaction volume of 20 µl containing 2 µl of DNA, 10 µl of the ready-made 2X Platinum™ SuperFi™ II Green PCR mix, 0.5µl of sense primer and antisense primer (10µM) and 7 µl of water. Amplification was performed at 98°C for 30s followed by 35 cycles at 98°C for 10s, 60°C for 10s, 72°C for 30s and final 5 minutes at 72°C. Amplified products were sequenced (Biofidal, France). Obtained sequences were subsequently compared with the published *Vkorc1* gene sequences of *M. natalensis* (Genbank n° MF768468.1), *M. musculus* (Genbank n° NM178600.2) or *R. rattus* (Genbank n°AB702679.1).

2.8 Heterologous expression of mutated *R. rattus* VKORC1 and VKOR activity assays

Expression of mutated *R. rattus* VKORC1 proteins and microsomal vitamin K epoxide reductase (VKOR) activity were done as previously described²³.

3. Results

283 rodents were captured and included in the study. 113 rodents were collected from N'Djamena, 77 from Abeche, 26 from Doba, 15 from Biltine, 35 from Moundou and 17 from Sarh.

In N'Djamena, the rodents were divided into 4 species, i.e., 81 *R. rattus*, 10 *M. kollmannspergeri*, 8 *M. natalensis* and 14 *A. niloticus*. In Abeche, rodents were divided into 3 species, i.e., 15 *M. kollmannspergeri*, 29 *M. natalensis* and 33 *A. niloticus*. In Doba, rodents were divided into 3 species, i.e., 14 *R. rattus*, 9 *M. kollmannspergeri*, 3 *M. natalensis*. In Moundou, rodents were distributed according to 2 species, i.e., 31 *R. rattus* and 4 *M. natalensis*. In Biltine, rodents were distributed according to 2 species, i.e., 1 *R. rattus* and 14 *M. kollmannspergeri*. In Sarh, only rodents of one species were captured, i.e., 17 *M. kollmannspergeri*.

3.1 Exposure of rodents to AR molecules in Chad

Exposure to ARs was assessed by LC-MS/MS from liver samples (Figure 2). Exposure to ARs was 15.5% [95% CI: 11.3-20.8] of the total number of rodents with a median concentration of 9.4 ng/g [95% CI: 4.1-18.1] with values ranging from 2.3 ng/g (LOQ) to 1012 ng/g. 3.2% of the rodents were ARs multi-exposed. Among Chadian rodents, *R. rattus* was the most exposed species with a frequency of 36.8% [95% CI: 25.5-49.8] (Figure 2A), significantly higher compared to other species. The median concentration for exposed *R. rattus* was 12.1 ng/g [95% CI: 4.1-19.9] and values ranged from 2.3 ng/g (LOQ) to 185 ng/g (Figure 2B). Exposure of other species was very limited with a frequency of 12.5% [95% CI: 5.9-24.7], 9.1% [95% CI 3.6-21.2] and 4.2% [95% CI 1.2-11.7%] (Figure 2A), for *A. niloticus*, *M. natalensis* and *M. kollmannspergeri*, respectively. Concentrations ranged from 2.7-1012 ng/g for *A. niloticus*, 2.6-3.9 ng/g for *M. natalensis* and 5.6-25.6 ng/g for *M. kollmannspergeri* (Figure 2B).

A city effect on exposure frequencies was noted (Chi-square, $p < 0.0001$) (Figure 2C). Rodent exposure to ARs appeared to be highest in N'Djamena with over 20% of the total population exposed. Very low exposure was observed in the easternmost cities, i.e., Biltine, Abeche and Sarh (Figure 2C).

The AR molecules detected in rodents in Chad were very diverse (Figure 2D). Exposure to a naturally occurring anticoagulant, i.e., ferulol, was observed in *R. rattus* captured in fields and indoors in only the 2 most eastern cities, i.e., Moundou and N'Djamena (Figure 1C). Among the synthetic anticoagulants, two molecules belonging to the first generation anticoagulants were detected, i.e., warfarin in *A. niloticus* and *M. kollmannspergeri* from fields of N'Djaména and Abeche (Figure 1C); and coumatetralyl in *M. natalensis* and *A. niloticus* from fields and warehouses of N'Djaména and Doba (Figure 1C). For second generation anticoagulants, only 2 molecules were found, bromadiolone and brodifacoum. Exposure to bromadiolone was only found in *R. rattus* and *A. niloticus* mostly from N'Djamena and Abéché, captured in the field and indoors (Figure 1C). Exposure to brodifacoum was mostly detected in *R. rattus* in western cities mainly in N'Djamena.

3.2 Identification of *Vkorc1* mutations in *R. rattus* in Chad and consequences on susceptibility to ARs

Vkorc1 sequencing was performed for all *R. rattus* included in the study. Nevertheless, due to the sometimes-degraded state of the extracted genomic DNA related to extreme field conditions with very high temperatures, the sequencing of *Vkorc1* in full or even partially was not always successful. 133 complete or partial sequences were obtained, 87 from *R. rattus* from N'Djaména, 31 from Moundou, 14 from Doba and finally the only *R. rattus* from Biltine. Out of the total number, 6 mutations were detected, 3 silent mutations and 3 missense mutations. A summary of the mutations found is presented in Table 2.

Among the missense mutations, one was located in exon 1, the V29E mutation; one was located in exon 2, the V69E mutation and the last one was located in exon 3. The V29E mutation leading to a replacement of a valine by a glutamate at position 29 was only found in the heterozygous state in 4 rats out of 130 individuals whose exon 1 was sequenced, i.e., an allelic frequency of 1.5%. It was found in rats from N'Djaména, Moundou and Doba.

The V69E mutation leading to the replacement of a valine by a glutamate at position 69 was found in 10 individuals among 77 individuals for which the sequence of exon 2 was exploitable. It was observed in the heterozygous state (9/77) or in the homozygous state (1/77), i.e. an allelic frequency of 7% of the total sample. However, this mutation was only observed in rats captured in N'Djaména, i.e. a local allelic frequency of nearly 17%. In Moundou (29 exons 2 successfully obtained), Doba (14 exons 2 successfully obtained) and Biltine (only 1 rat captured with an exploitable exon 2 sequence), the allelic frequency of this mutation was 0%.

The D127V mutation leading to the replacement of an aspartate in valine was found in 20 individuals out of 69 for which the sequence of exon 3 was exploitable. It was observed either in the homozygous state (4/69) or in the heterozygous state (16/69), with an allelic frequency of 17%. This mutation was

only detected in rats captured in Moundou and Doba. The allelic frequency in Moundou was 35%, in Doba it was 10.7%.

The VKORC1-V29E and D127V proteins were successfully expressed in *pichia pastoris* yeast, while VKORC1-V69E was not. Their sensitivity to ARs was assessed by determining inhibition constants against warfarin, coumatetralyl and bromadiolone. VKORC1-V29E showed resistance factors (KI mutant/Ki wild type) of 10, 11 and 1.5 to warfarin, coumatetralyl and bromadiolone, respectively. The inhibition constants of VKORC1-D127V were similar to those of wild type.

Apart from missense mutations, 3 silent mutations, i.e., A41A, L93L and A141A, were detected (Table 2). They were due to the replacement of nucleotides G123, C1086 and A2082 by an adenine, a thymine and a guanine, respectively. In the sample, the allelic frequency of A123 was 15.8% with local values ranging from 2.3% in Doba to 23.3% in Moundou ; that of T1086 was 46.2% with values ranging from 29.5% in N'Djaména to 58.6% in Moundou ; and finally that of G2082 was 48.5% with a homogeneity of frequencies between the cities of N'Djaména (54.3%), Moundou (45%) and Doba (46.4%). Table 2 shows the different combinations of mutations that could be observed on the same allele, but the existence of other combinations could not be determined from the sampling.

3.3 Detection of two *Vkorc1* haplotypes for *M. natalensis* in Chad

Vkorc1 sequencing was performed for 44 *M. natalensis*, but was successful for only 18 animals, 5 from N'Djaména, 11 from Abeche, 1 from Moundou and 1 from Doba. This sequencing revealed the existence of two genotypes referred to in this study as haplotype A and haplotype B. Haplotype A corresponded to the sequence published in the databases. Haplotype B had 6 nucleotide mutations in exon 2 at positions 1134, 1159, 1168, 1177, 1220 and 1225. Four of these mutations led to amino acid changes at positions 61, 75 and 90 with the replacement of an arginine by a glutamine, an isoleucine by a valine and an isoleucine by a leucine, respectively (Figure 3). Exon 3 corresponded to the previously described haplotype 1 (Genbank no. KP195270)²⁴. Among the 18 *M. natalensis* animals sequenced, 9 carried haplotype A (8/11 in Abeche and 1/5 in N'Djaména) and 9 carried haplotype B (4/5 in N'Djaména, 3/11 in Abeche, 1/1 in Moundou and 1/1 in Doba).

3.4 Sequencing of *Vkorc1* of *M. kollmannspergeri* et *A. niloticus*

Using a sequence homology-based approach, the sequences of *Vkorc1* from *M. kollmannspergeri* and *A. niloticus* were obtained. The sequence identities between the rodent species are reported in Table 3. The nucleotide sequences of exons 1, 2, and 3 of *Vkorc1* from *M. kollmannspergeri* were 100% identical to those of haplotype A from *M. natalensis*. The nucleotide sequences of exons 1, 2 and 3 of *Vkorc1* from *A. niloticus* were 97.1, 100 and 96.5% identical to exons 1, 2 and 3 of haplotype B of *M. natalensis*, respectively. The VKORC1 protein of *A. niloticus* showed only 2 differences, i.e., K152E and V153G, with that of *M. natalensis*-haplotype B.

The sequences of exons 1, 2 and 3 of 46 *A. niloticus* (32 from Abeche and 14 from N'Djaména) and 62 *M. kollmannspergeri* (15 from Abeche, 14 from Biltine, 9 from Doba, 10 from N'Djaména and 14 from Sarh) were obtained. No sequence variation was observed between individuals of the same species.

4. Discussion

Chad is a landlocked country in Africa, at the crossroads of central and northern Africa, bordering many countries : Libya to the north, Sudan to the east, the Central African Republic and Cameroon to the south and Nigeria and Niger to the west. It is a landlocked country that does not receive any maritime transport and only communicates with other countries by land or air. It is subject to a great diversity of climate, Saharan in the North with annual rainfall of less than 50 millimeters, Sahelian in the center with annual rainfall varying between 300 to 600 mm, and Sudanese in the South with annual rainfall exceeding 900 mm. Due to its location and the diversity of its climates, it is representative of both northern and central

African countries. Although it is a predominantly agricultural country, like many African countries, it is experiencing very strong demographic growth, which has led to a rapid expansion of urban areas, with a forecasted doubling or tripling of the urban population by 2050²⁸. Urban rodents could become a major problem very quickly, as in many rapidly growing African cities with favorable conditions for rodent outbreaks^{4,5}.

Although rodents are widespread in many African countries, the use of chemical control is poorly documented. While the use of anticoagulants is widespread in the world, in Africa there is little or no information on their use. Rodent pest management in Africa appears to rely on the use of chemical rodenticides^{29,30}. Nevertheless, in most African countries, unregistered compounds with acute vertebrate toxicity are often preferred to kill rodents³¹. Fast-acting acute rodenticides, for example zinc phosphide, are also widely used by smallholder farmers³². Nevertheless, ARs also appear to be used, at least, in cities as exposures of non-target fauna have been reported³³. Here, we demonstrate their use in Africa, as in the rest of the world, to manage rodent populations via rodent sampling in cities in Chad. This affirmation is directly based on the measurement of residual hepatic concentrations in rodents that may have consumed them. This measurement is relevant because of the tissue persistence of ARs. Indeed, they are characterized by a long persistence of a few days to a few months³⁴, which allows a representative follow-up of an exposure that can date from several days to several weeks. Among the nearly 300 rodents included in the study, 15.5% were exposed to ARs, which demonstrates the use of ARs, but also suggests the use of other management methods. Indeed, this frequency of exposure appears to be limited compared to other studies that have measured the exposure of target populations controlled by the use of ARs. For example, in Martinique, an island of the French West Indies, where ARs are used to control leptospirosis risks, exposure to more than 50% of the rodents captured was measured³⁵. Unfortunately, exposure studies of rodents in urban environments are rare or absent because they tend to show the evidence, so points of comparison are lacking. Measured concentrations obtained in our study also tend to suggest a limited use of ARs in Chad. Indeed, only 0.9% of rodents had concentrations above 100 ng/g ww, the often-cited toxicity threshold³⁶.

Regarding the distribution of exposure within Chadian urban areas, a difference between cities is clearly noticeable. These exposures seem significantly more frequent in the capital of N'Djaména located in the west of Chad. It is clear that the proximity of rodents in a city such as N'Djaména, where the population is growing rapidly, with a population of more than 1.5 million inhabitants, a high population density and often poor housing conditions, is very important. This proximity is related to the observed exposure to ARs. Surprisingly, high exposure was also observed in the cities of Moundou and Doba, which are similar in size to the other urban areas included in the study, namely Sarh, Abeche and Biltine, where exposure is lower. This difference in exposure between cities is related to the difference in exposure between species. Indeed, the *R. rattus* population seems to be exposed more frequently than the other rodent species. At the scale of Chad, more than 35% of *R. rattus* were exposed to ARs, while less than 10% of rodents belonging to other species were exposed. At the smaller scale of the city of N'Djaména, where the different rodent species coexist, the observation was the same, almost 50% of *R. rattus* were exposed while the others were not or only slightly exposed (0% for *M. natalensis* and *M. kollmannspergeri* and 1.3% for *A. niloticus*). In the towns of Sarh, Abeche and Biltine, the rodent sampling did not include *R. rattus* which do not seem to have colonized these towns yet, so it is difficult to strictly identify the factor explaining the low exposure of rodents in these towns, i/ absence of *R. rattus*, ii/ lower chemical treatments which may be due to the absence of *R. rattus* whose damage is perhaps more visible and the perception more negative, or even iii/ a lack of consumption of baits containing ARs by endemic rodents.

Concerning the ARs molecules used, they are diverse, belonging to first generation ARs, i.e., warfarin and coumatetralyl; second generation ARs, i.e., bromadiolone and brodifacoum¹⁸, and even to a naturally occurring AR, ferulenol, synthesized by a plant, the giant fennel (*Ferula communis*)³⁷ which is known to be widely present in the countries along the Mediterranean. Rodents exposed to ferulenol

were *R. rattus* trapped either indoors or outdoors in Moundou and N'Djaména. This result suggests the existence of such a plant in the surroundings. This exposure could be due to natural and voluntary consumption of the plant by rodents or to the use of the plant by humans to control rodent populations. It is impossible to address this question at this time and further investigations among the population will be necessary. The efficacy of such a plant in rodent management could correspond to ancestral local practices. First generation ARs are used in Chad for rodent management. These are the ones whose efficacy is generally affected by resistance mechanisms supported by mutations in *Vkorc1*¹⁸. Warfarin was initially used for rodent management in many countries of the world, but it was very quickly replaced by the other more recent molecules. In Chad this molecule still seems to be used as rodenticide. Nevertheless, warfarin is also used in human medicine to prevent thromboembolic events³⁸. The residues found could also be from human drug use for rodent management, as recently described for managing certain nuisances from stray animals³⁹. Coumatetralyl, another first-generation AR, seems also to be used in Chad. The consequences of the use of FGAR will be discussed later. The other AR molecules used are second generation molecules, bromadiolone, which is also a molecule widely confronted with resistance problems due to *Vkorc1* mutations⁴⁰ and brodifacoum, which is less affected by this problem. On the other hand, the latter are very persistent molecules and their use can lead to poisoning of non-target fauna by secondary intoxication^{16,34}.

Since ARs seem to be used in Chad, the selection of resistance alleles is a legitimate question. Studies on this issue are lacking in Africa. While this issue has been widely addressed around the world, Africa is virtually undocumented. One study was conducted in Tanzania in *M. natalensis*²⁴. Only exon 3 was sequenced at that time in the absence of a known full sequence. Here, we report the total sequencing of the *Vkorc1* sequence and its variations in 44 *M. natalensis*, the sequencing of *Vkorc1* for 2 other endemic rodent species, *M. kollmannspergeri* and *A. niloticus*, for which no sequence was available, and finally the silent and missense mutations found in *R. rattus*.

For *M. natalensis* in Tanzania, 10 different haplotypes of *Vkorc1* (labelled 1 to 10) were described based on sequencing of exon 3 of *Vkorc1*. All *M. natalensis* for which the exon 3 sequence was obtained in this study had haplotype 1, which is the most widely observed haplotype in Tanzania. In Tanzania, exons 2 and 3 had not been sequenced. Here they are. The sequencing of exon 2 allows to differentiate *M. natalensis* from Chad into 2 haplotypic groups (named in this study haplotype A and haplotype B) differentiated by 6 nucleotide mutations at positions 1134, 1159, 1168, 1177, 1220 and 1225 and resulting in 3 mutations in the protein at positions 61, 75 and 90 with replacement of an arginine by a glutamine, an isoleucine by a valine and finally an isoleucine by a leucine, respectively. The nature (similar charge and clutter) and positioning of the mutations away from the AR interaction sites of *Vkorc1* should not alter the sensitivity to ARs. Nevertheless, further studies will be needed to characterize the exact sensitivity of *M. natalensis Vkorc1* to different ARs, knowing that second-generation AR treatments are proving effective in the field to manage *M. natalensis* populations⁴¹. Moreover, the low sampling level does not currently allow us to understand the distribution areas of the different haplotypes, even if haplotype A seemed to be more present in Abeche and haplotype B in southwestern Chad.

For *Vkorc1* from *M. kollmannspergeri* and *A. niloticus*, complete or partial sequences were obtained by using the primers used for *M. natalensis* using a sequence homology approach. The sequence of *M. kollmannspergeri* is 100% identical to the haplotype A of *M. natalensis*. *M. kollmannspergeri* has long been considered a subspecies of *M. erythroleucus*^{42,43} which is phylogenetically very close to *M. natalensis*⁴⁴. This identity of *Vkorc1* sequences is therefore not surprising. No mutations were found among the 62 animals included in the study, indicating that *M. kollmannspergeri* are likely to be as sensitive to ARs as *M. natalensis*⁴¹.

More surprising is the proximity of the sequence of *Vkorc1* of *A. niloticus* with the haplotype B of *M. natalensis* with an exon 2, 100% identical to that of haplotype B and exons 1 and 3 showing respectively 97.1 and 96.5% of identity with those of *M. natalensis*. This totally similar exon 2 between the 2 species

is surprising. A sensitivity to ARs similar to that of *M. natalensis*⁴¹ is expected, despite the two mutations present at the end of exon 3. The C-term of the VKORC1 sequence is indeed a highly variable area between species. It does not seem to play a major role in the inhibition by ARs.

Concerning *R. rattus*, 3 silent mutations and 3 missense mutations were detected. All these mutations can be combined with each other, which results in a wide variety of possible genotypes. In terms of missense mutations, the 3 mutations, i.e., V29E, V69E and D127V, have so far never been described in studies dealing with resistance in black rats, either in Europe^{22,23,27}, Asia^{21,45}, New Zealand⁴⁶ or in the USA²⁰. However, the Y25F mutation, which appears to be widespread^{22,23,27,46} among *R. rattus* populations worldwide, has not been detected in Chad. All of this evidence suggests that the mutations detected in *R. rattus* in Chad are the result of selection of local populations and not of transfer of populations via air transport from Europe or other countries outside of Africa.

The three novel *Rattus rattus* VKOR mutations identified in Chad are located on different domains of the protein: V29E is stands on the luminal side of the transmembrane (TM) helix 1, V69E is on the anchor domain of VKOR loop and D127V is located on the luminal side of TM 3 (Figure 4). These three mutations consist in a hydrophobic to charged residue substitution, or vice-versa. They are thus relevant mutations for structure disturbance and, despite none of these three amino acids appears to interact with warfarin, they might be involved in ARs resistance or in VKOR structure (thus activity) disruption. Amino acid V29 is located in a region identified as being involved in warfarin resistance. Indeed, V29 is surrounded by residues Y25, A26 and H28, which induce warfarin resistance by a factor of 50⁴⁷. The enzymatic characterization of the V29E mutant carried out in this study shows that the V29E mutation alters the protein's sensitivity to warfarin but also to coumatetralyl by a factor of around 10. It does not appear to confer resistance to SGARs. Amino acid D127 is also located in a region known to be critical for warfarin susceptibility. Indeed, this residue is spatially close to W59, L124 and L128 amino acids, responsible of strong warfarin resistances – up to an 80 factor. Nevertheless, the functional results do not seem to suggest AR resistance related to the D127V mutation. In opposition, V69 location was not reported as a warfarin resistance inducing region of VKOR. However, it is included into the anchor domain of VKOR, that stabilizes the global conformation of the luminal loop through membrane interactions. This anchoring is crucial for vitamin K and ARs binding so, despite no amino acid spatially close to V69 was described as involved in warfarin resistances, the V69E mutation might also lead to ARs resistances and/or VKOR activity variations. Further studies are needed to assess the functional consequences of this new mutation, as expression has been unsuccessful.

In the context of the presence of these 3 mutations and their possible impact on the effect of ARs, the use of first-generation molecules could be questionable in this context. Their non-reasoned use could lead to a selection of such mutations. Nevertheless, the use of second-generation molecules should not be favored either because of their important ecotoxicity.

5. Conclusion

In conclusion, this study has demonstrated the use of ARs in sub-Saharan Africa. Both generations of ARs seem to be used. Despite this proven use, the frequency of exposure of rodents in cities seems to be limited, raising questions about the effectiveness of the application of these ARs. Such application must be done as part of an integrated program in which the first step is to manage the availability of food resources to ensure bait consumption. Interestingly, it appears that endemic rodents are less exposed than so-called invasive rodents, represented here by *R. rattus*. Other countries in sub-Saharan Africa are facing other invasive rodent species such as *R. norvegicus* and *M. musculus*⁴⁸. This finding is interesting because if it is generalizable, it would eventually control the advance of invasive rodent species. Nevertheless, a reflection must be initiated on the risks of selection of resistance alleles so that the situation does become uncontrollable. Indeed, the intensive use of ARs in Europe has led to the selection of resistant rodent populations with extreme resistance to first generation ARs, but also to some second generation ARs. The choice of management method(s) to be implemented, the use of chemical

control, the use of ARs, and the choice of ARs must therefore be considered in light of the ecosystem, the availability of food resources, the present rodent populations, but also the present non-target species, the risks (health, economic, etc.) associated with the rodents, and finally, the carriage of resistance alleles by the rodents concerned.

6. Acknowledgements

The authors want to thank all the PCO and owners who help for the trapping of rodents.

This work was partially supported by a research grant from ANR (Agence Nationale de la Recherche, project ANR-18-CE20-0025) and by French embassy.

7. Conflict of interest declaration

The authors declare no conflict of interest.

8. References

- 1-Monadjem A, Taylor PJ, Denys C Cotterill FP, Rodents of sub-Saharan Africa: a biogeographic and taxonomic synthesis, Berlin, Germany. Walter de Gruyter GmbH & Co. KG (2015).
- 2-Mwanjabe PS Leirs H, An early warning system for IPM-based rodent control in smallholderfarming systems in Tanzania. *Belgian J Zool* **127**:49-58 (1997).
- 3-Mwanjabe PS, Sirima FB Lusingu J, Crop losses due to outbreaks of *Mastomys natalensis* (Smith, 1834) Muridae, Rodentia, in the Lindi Region of Tanzania. *Int Biodeterior Biodegrad* **49**:133-137 (2002).
- 4-Langton S, The occurrence of commensal rodents in dwellings as revealed by the 1996 English house condition survey. *J Appl Ecol* **38**:669–709 (2001).
- 5-Bonner PC, Schmidt WP, Belmain SR, Oshin B, Baglole D, Borchert M, Poor housing quality increases risk of rodent infestation and Lassa fever in refugee camps of Sierra Leone. *Am J Trop Med Hyg* **77**:169-175 (2007).
- 6-Munyenyiwa A, Zimba M, Nhwatiwa T, Barson M, Plague in Zimbabwe from 1974 to 2018: A review article. *PLoS Negl Trop Dis* **13**:e0007761 (2019). doi: 10.1371/journal.pntd.0007761.
- 7-Karpagam KB, Ganesh B, Leptospirosis: a neglected tropical zoonotic infection of public health importance-an updated review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **39**:835-846 (2020). doi: 10.1007/s10096-019-03797-4.
- 8-Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW, Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* **427**:541-544 (2004). doi: 10.1038/nature02254.
- 9-Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz HJ, Lappegard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EG, Müller CR, Strom TM, Oldenburg J, Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* **427**:537-541 (2004). doi: 10.1038/nature02214.
- 10-Boyle CM, Case of Apparent Resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to Anticoagulant Poisons. *Nature* **188**:517 (1960).
- 11-Dodsworth E, Mice are spreading despite such poisons as warfarin. *Minic Engin Lond* **3746**:1668 (1961).
- 12-Jackson WB, Kaukeinen D, Resistance of wild Norway rats in North Carolina to warfarin rodenticide. *Science* **176**:1343–1344 (1972).
- 13-Saunders GR, Resistance to warfarin in the roof rat in Sydney, NSW. *Search*. 9:39–40 (1978).
- 14-Siddiq Z, Blaine WD, Anticoagulant resistance in house mice in Toronto, Canada. *Environ Health Rev* **2**:49–51 (1982).

- 15-Tanaka KD, Kawai YK, Ikenaka Y, Harunari T, Tanikawa T, Ando S, Min HW, Okajima F, Fujita S, Ishizuka M, The genetic mechanisms of warfarin resistance in *Rattus rattus* found in the wild in Japan. *Pestic Biochem Physiol* **103**:144-151 (2012).
- 16-Moriceau MA, Lefebvre S, Fourel I, Benoit E, Buronfosse-Roque F, Orabi P, Rattner BA, Lattard V, Exposure of predatory and scavenging birds to anticoagulant rodenticides in France: Exploration of data from French surveillance programs. *Sci Total Environ* **810**:151291 (2022). doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.151291.
- 17-Pelz HJ, Rost S, Hünerberg M, Fregin A, Heiberg AC, Baert K, MacNicoll AD, Prescott CV, Walker AS, Oldenburg J, Müller CR, The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* **170**:1839-1847 (2005). doi: 10.1534/genetics.104.040360.
- 18-Lefebvre S, Benoit E, Lattard V, Comparative Biology of the Resistance to Vitamin K Antagonists: An Overview of the Resistance Mechanisms. In: Basaran, O, Biteker, M. , editors. Anticoagulation Therapy. London: IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/51484> doi: 10.5772 (2016).
- 19-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). doi: 10.1002/ece3.2829.
- 20-Díaz JC, Kohn MH, A VKORC1-based SNP survey of anticoagulant rodenticide resistance in the house mouse, Norway rat and roof rat in the USA. *Pest Manag Sci* **77**:234-242 (2021). doi: 10.1002/ps.6012.
- 21-Takeda K, Ikenaka Y, Fourches D, Tanaka KD, Nakayama SMM, Triki D, Li X, Igarashi M, Tanikawa T, Ishizuka M, The VKORC1 ER-luminal loop mutation (Leu76Pro) leads to a significant resistance to warfarin in black rats (*Rattus rattus*). *Pestic Biochem Physiol* **173**:104774 (2021). doi: 10.1016/j.pestbp.2021.104774.
- 22-Bermejo-Nogales A, Rodríguez Martín JA, Coll J, Navas JM, VKORC1 single nucleotide polymorphisms in rodents in Spain. *Chemosphere* **308**:136021 (2022). doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136021.
- 23-Damin-Pernik M, Hammed A, Giraud L, Goulois J, Benoît E, Lattard V, Distribution of non-synonymous *Vkorc1* mutations in roof rats (*Rattus rattus*) in France and in Spain - consequences for management. *Pestic Biochem Physiol* **183**:105052 (2022). doi: 10.1016/j.pestbp.2022.105052.
- 24-Gryseels S, Leirs H, Makundi R, Göüy de Bellocq J, Polymorphism in *vkorc1* Gene of Natal Multimammate Mice, *Mastomys natalensis*, in Tanzania. *J Hered* **106**:637-643 (2015). doi: 10.1093/jhered/esv054.
- 25-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). doi: 10.1016/j.jchromb.2016.12.028.
- 26-Pagès M, Chaval Y, Herbreteau V, Waengsothorn S, Cosson JF, Hugot JP, Morand S, Michaux J, Revisiting the taxonomy of the Rattini tribe: a phylogeny-based delimitation of species boundaries. *BMC Evol Biol* **10**:184 (2010). doi: 10.1186/1471-2148-10-184.
- 27-Goulois J, Chapuzet A, Lambert V, Chatron N, Tchertanov L, Legros L, Benoît E, Lattard V, 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* **72**:544-550 (2016). doi: 10.1002/ps.4020.
- 28-World Bank, Chad Poverty Assessment : Investing in Rural Income Growth, Human Capital, and Resilience to Support Sustainable Poverty Reduction. World Bank, Washington, DC. © World Bank <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/36443> License: CC BY 3.0 IGO (2021).
- 29-Myllymäki A, Control of rodent problems by the use of rodenticides: rationale and constraints. In: Richards, C. G. J. and Ku, T. Y. (eds), Control of Mammal Pests . Taylor & Francis, London, pp. 83–111 (1987).

- 30- Makundi RH, Oguge NO, Mwanjabe PS, Rodent pest management in East Africa – an ecological approach. In: Singleton, G., Hinds, L., Leirs, H. and Zhang, Z. (eds), *Ecologically-based Rodent Management*. ACIAR Monograph No. 59 Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. <http://0-purl.umn.edu.innopac.up.ac.za/114821>. Available at: http://aciarc.gov.au/files/node/323/ecologically_based_rodent_management_part_1_19909.pdf (1999).
- 31- Mulungu LS, Control of rodent pests in maize cultivation: The case of Africa. In D. Watson (Ed.), *Achieving sustainable maize cultivation*. Francis Dodds, Burleigh Dodds Science Publishing 2 :318–337. <https://doi.org/10.19910/3/AS.2016.0002.18> (2017).
- 32-Buckle AP, Rodenticide – their role in rodent pest management in tropical agriculture. In: Singleton, G. R., Hinds, L. A., Leirs, H. and Zhang, Z. (eds), *Ecologically – Based management of Rodent Pests*. Australian Centre for International Agricultural Research Canberra, pp. 163–77 (1999).
- 33-Serieys LEK, Bishop J, Okes N, Broadfield J, Winterton DJ, Poppenga RH, Viljoen S, Wayne RK, O'Riain MJ, Widespread anticoagulant poison exposure in predators in a rapidly growing South African city. *Sci Total Environ* **666**:581-590 (2019). doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.02.122.
- 34-Vandenbroucke V, Bousquet-Melou A, De Backer P, Croubels S, Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration. *J Vet Pharmacol Ther* **31**:437-45 (2008). doi: 10.1111/j.1365-2885.2008.00979.x.
- 35-Marquez A, Khalil RA, Fourel I, Ovarbury T, Pinot A, Rosine A, Thalmensi G, Jaffory G, Kodjo A, Benoit E, Lattard V, Resistance to anticoagulant rodenticides in Martinique could lead to inefficient rodent control in a context of endemic leptospirosis. *Sci Rep* **9**:13491 (2019). doi: 10.1038/s41598-019-49661-5.
- 36-Newton I, Shore RF, Wyllie I, Birks JDS, Dale L, Empirical evidence of side-effects of rodenticides on some predatory birds and mammals, in *Advances in Vertebrate Pest Management* ed. by Cowan DP, Feare CJ, Filander Verlag, Furth, Germany pp 347-367 (1999).
- 37-Louvet MS, Gault G, Lefebvre S, Popowycz F, Boulven M, Besse S, Benoit E, Lattard V, Grancher D, Comparative inhibitory effect of prenylated coumarins, ferulenol and ferprenin, contained in the 'poisonous chemotype' of *Ferula communis* on mammal liver microsomal VKORC1 activity. *Phytochemistry* **118**:124-130 (2015). doi: 10.1016/j.phytochem.2015.08.012.
- 38-Semakula JR, Kisa G, Mouton JP, Cohen K, Blockman M, Pirmohamed M, Sekaggya-Wiltshire C, Waitt C, Anticoagulation in sub-Saharan Africa: Are direct oral anticoagulants the answer? A review of lessons learnt from warfarin. *Br J Clin Pharmacol* **87**:3699-3705 (2021). doi: 10.1111/bcp.14796.
- 39-Mahjoub T, Krafft E, Garnier L, Mignard A, Hugnet C, Lefebvre S, Fourel I, Benoit E, Lattard V, Asymptomatic Anticoagulant Rodenticide Exposure in Dogs and Cats-A French and Belgian Rural and Urban Areas Study. *Front Toxicol* **4**:907892 (2022). doi: 10.3389/ftox.2022.907892.
- 40-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). doi: 10.1016/j.abb.2011.08.010.
- 41-Mari Saez A, Cherif Haidara M, Camara A, Kourouma F, Sage M, Magassouba N, Fichet-Calvet E, Rodent control to fight Lassa fever: Evaluation and lessons learned from a 4-year study in Upper Guinea. *PLoS Negl Trop Dis* **12**:e0006829 (2018). doi: 10.1371/journal.pntd.0006829.
- 42-Volobouev VT, Hoffmann A, Sicard B, Granjon L, Polymorphism and polytypy for pericentric inversions in 38-chromosome *Mastomys* (Rodentia, Murinae) and possible taxonomic implications. *Cytogenet Cell Genet* **92**:237-42 (2001). doi: 10.1159/000056910.
- 43-Lecompte E, Dobigny G, Tatar C, Gauthier P, Bâ K, Denys C, Duplantier JM, Granjon L, An update on the taxonomy and geographic distribution of the cryptic species *Mastomys kollmannspergeri* (Muridae, Murinae) using combined cytogenetic and molecular data. *J Zool* **276**:368-374 (2008).
- 44-Britton-Davidian J, Catalan J, Granjon L, Duplantier JM, Chromosomal phylogeny and evolution in the genus *Mastomys* (Mammalia, Rodentia). *J Mammal* **76** :248-262 (1995).

- 45-Chua C, Humaidi M, Neves ES, Mailepessov D, Ng LC, Aik J, VKORC1 mutations in rodent populations of a tropical city-state as an indicator of anticoagulant rodenticide resistance. *Sci Rep* **12**:4553 (2022). doi: 10.1038/s41598-022-08653-8.
- 46-Cowan PE, Gleeson DM, Howitt RL, Ramón-Laca A, Esther A, Pelz HJ, Vkorc1 sequencing suggests anticoagulant resistance in rats in New Zealand. *Pest Manag Sci* **73**:262-266 (2017). doi: 10.1002/ps.4304.
- 47-Liu S, Li S, Shen G, Sukumar N, Krezel AM, Li W, Structural basis of antagonizing the vitamin K catalytic cycle for anticoagulation. *Science* **371**:eabc5667 (2021). doi: 10.1126/science.abc5667.
- 48-Granjon L, Fossati-Gaschignard O, Artige E, Bâ K, Brouat C, Dalecky A, Diagne C, Diallo M, Gauthier P, Handschumacher P, Kane M, Husse L, Niang Y, Piry S, Sarr N, Sow A, Duplantier JM. Commensal small mammal trapping data in Southern Senegal, 2012-2015: where invasive species meet native ones. *Ecology* **102**:e03470 (2021). doi: 10.1002/ecy.3470.
- 49-Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D, Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**:583-589 (2021). doi: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- 50-Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M, ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods* **19**:679-682 (2022). doi: 10.1038/s41592-022-01488-1.

Primers		Nucleotide sequence 5' → 3'	Fragment Length (base pairs)
<i>Vkorc1 Mastomys natalensis</i>			
Exon 1	Mast Ex1-F	GGT TCT TCC CTC TTG TCC	338
	Mast Ex1-R	GGA CAG TCC GCT CTC A	
Exon 2	Mn Ex2-F	TGT GAT GAC AGG CAG TAAG AG	367
	Mn Ex2-R	CCT GCT AAG TGT TCT CCT	
Exon 3	Mn Ex3-F	GTA CAC CGT GCT CAG	627
	Mast Ex3-R	CCA TGG GAA GTG TTC TCC TT	
<i>Vkorc1 Mastomys kollmannspergeri</i>			
Exon 1	Mast Ex1-F	GGT TCT TCC CTC TTG TCC	336
	Mast Ex1-R	GGA CAG TCC GCT CTC A	
Exon 2	Mv Ex2-F	AGC TCA AGA GGC ACT AAG CTG A	269
	Mv Ex2-R	ACT CAG TAA TTA GCA GCT	
Exon 3	Mv Ex3-F	TCT TAG AGT ACT TTG ACC AGA	461
	Mast Ex3-R	CCA TGG GAA GTG TTC TCC TT	
<i>Vkorc1 Arvicanthis Niloticus</i>			
Exon 1	An Ex1-F	CGT GGC AGG TTC GTC CC	343
	An Ex1-R	GGA CAG TCC ACT CTC AAA GT	
Exon 2	An Ex2-F	TGT GAT GAC AGG CAG TAAG AG	369
	An Ex2-R	GTA ATT AGC TGG GTG TCA	
Exon 3	An Ex3-F	GTA CAC CGT GCT CAG	555
	An Ex3-R	CTT CTA GGG ACC CAC ACA T	

Table 1. Set of primers used to amplify exons 1, 2 and 3 of *Vkorc1* for *M. natalensis*, *M. kollmannspergeri* and *A. niloticus*.

WT, wild-type sequence; Mut, mutated; AA, amino acid.

Detected Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Chadian <i>R. rattus</i>					
	Nucleotide position	Nucleotide WT	Nucleotide Mut	AA WT	AA Mut
Silent Mutation					
A41A	123	G	A	Ala	Ala
L93L	1086	C	T	Leu	Leu
A141A	2082	A	G	Ala	Ala
Missense Mutation					
V29E	86	T	A	Val	Glu
V69E	1012	T	A	Val	Glu
D127V	2033	T	A	Asp	Val
Genotype detected in Chadian <i>R. rattus</i>					
One SNP	Two SNPs	Three SNPs	Four SNPs		
123A	86A /123A	123A/1086T/2082G	123A/1012A/1086T/2082G		
1086T	123A/1012A	1012A/1086T/2082G			
2082G	123A/1086T	1086T/ 2033A /2082G			
2033A	123A/ 2033A				
	123A/2082G				
	1086T/2082G				
	2033A /2082G				

Table 2. Details of *Vkorc1* SNPs found in *R. rattus* in Chad and associations of SNPs on the same allele. In bold, missense mutations.

	<i>M. kollmannspergeri</i>			<i>A. niloticus</i>			<i>R. rattus</i>			<i>M. musculus</i>			
	Ex1	Ex2	Ex3	Ex1	Ex2	Ex3	Ex1	Ex2	Ex3	Ex1	Ex2	Ex3	
<i>M. natalensis</i>	Hapl A	100	100	100	97.1	93.6	96.5	94.8	92.7	93.1	97.1	90.9	94.6
	Hapl B		92.7			100			92.7			93.6	
<i>M. kollmannspergeri</i>					97.1	92.7	96.5	94.8	92.7	93.1	97.1	90.9	94.6
<i>A. niloticus</i>								94.2	92.7	93.1	96.5	93.6	94.6
<i>R. rattus</i>											94.2	93.6	91.1

Table 3 : Nucleotide sequence identity (%) of *Vkorc1* exons 1, 2 and 3 from different rodent species

Figure legends

Figure 1 : Exposure and resistance to AR in urban Chadian rodents. In *A/* study area ; in *B/* sampling of rodents in the different urban areas ; in *C/* exposure to ARs ; and in *D/* *Vkorc1* mutations detected in *R. rattus*.

Figure 2 : Exposure to ARs and AR molecule diversity in Chadian rodents. In *A/* frequency of exposure according to species, in *B/* level of exposure according to species, in *C/* frequency of exposure according to city, in *D/* diversity of AR molecules found in Chad. AN : *A. niloticus*, MN : *M. natalensis*, MK : *M. kollmannspergeri*, RR : *R. rattus*.

Figure 3 : Nucleotide (*A*) and protein alignment (*B*) of exon 2 of haplotype A and haplotype B of *Vkorc1* detected in Chadian *M. natalensis*

Figure 4 : Structural location of the three novel *Rattus rattus* VKOR mutations detected in Chad. Side views of VKOR structure bound to warfarin and embedded into a sliced lipid bilayer, showing **A/** transmembrane helices 1 and 4 in the foreground and **B/** transmembrane helix 3 in the foreground. The structural model of *Rattus rattus* VKOR has been obtained using AlphaFold collab notebook^{49,50} and is shown as light-blue cartoon. The lipid bilayer is presented as black contoured spheres. Warfarin is shown as green sticks. Amino acids corresponding to Chad mutations - V29, V69 and D127 - are identified as orange spheres. Surrounding amino acids described as involved in ARs resistances are depicted as blue sticks. The anchor domain of VKOR loop determined on the human VKOR crystal structure⁴⁷ (Liu *et al.* 2020) is coloured in violet.

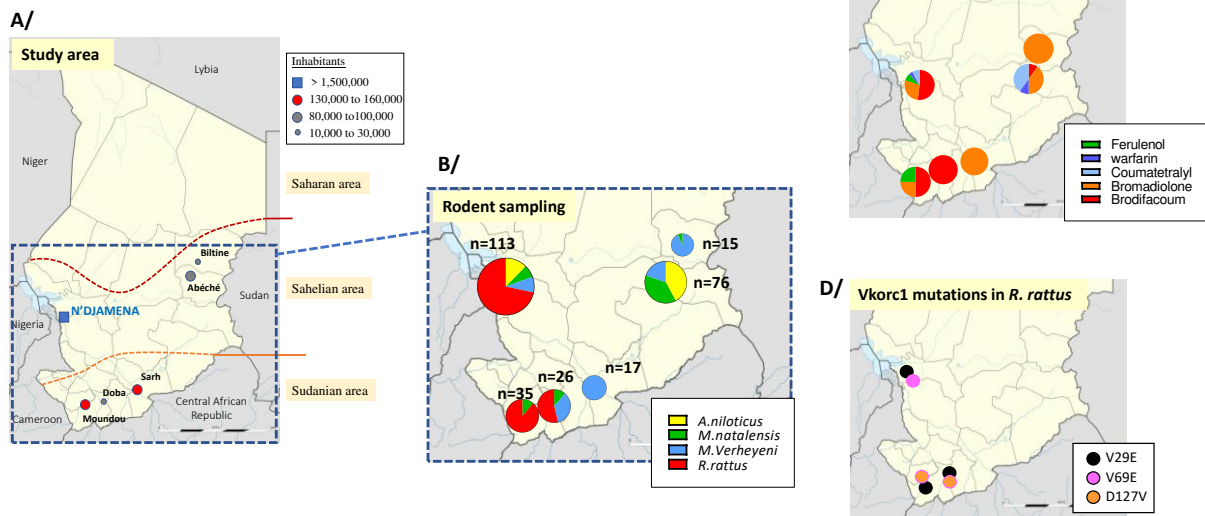


Figure 1 : Exposure and resistance to AR in urban Chadian rodents. In A/ study area ; in B/ sampling of rodents in the different urban areas ; in C/ exposure to ARs ; and in D/ *Vkorc1* mutations detected in *R. rattus*.

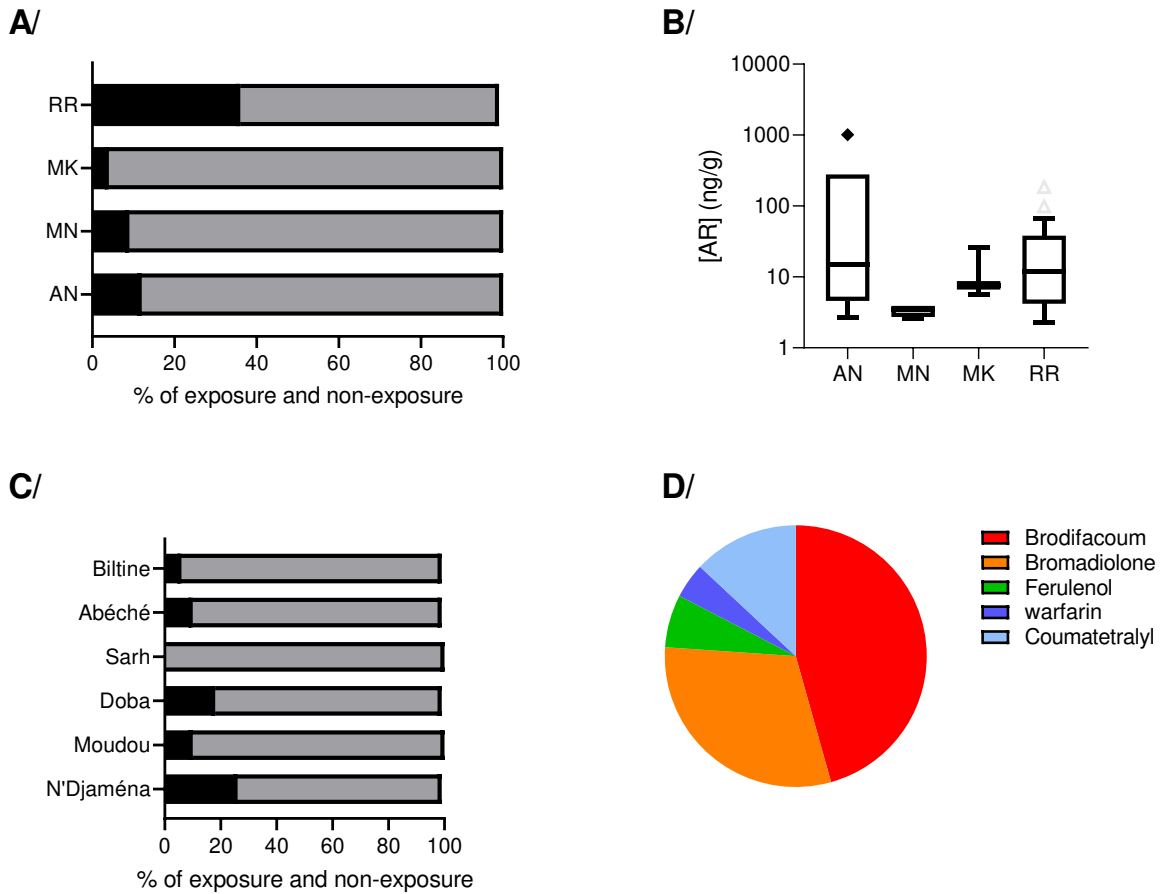
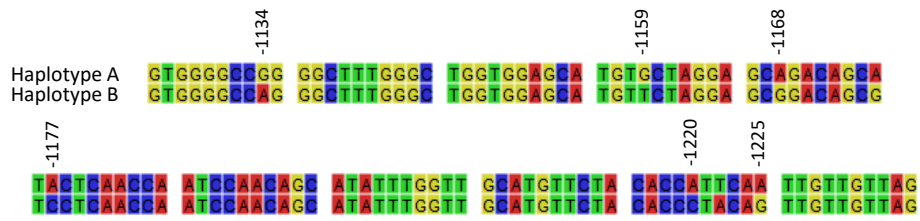


Figure 2 : Exposure to ARs and AR molecule diversity in Chadian rodents. In A/ frequency of exposure according to species, in B/ level of exposure according to species, in C/ frequency of exposure according to city, in D/ diversity of AR molecules found in Chad. AN : *A. niloticus*, MN : *M. natalensis*, MK : *M. kollmannspergeri*, RR : *R. rattus*.

A/ Exon 2 Nucleotide alignment



B/ Exon 2 Protein alignment

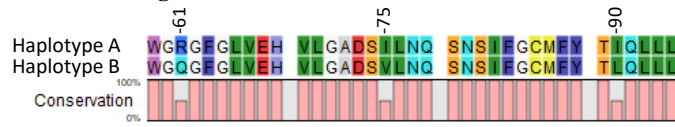


Figure 3 : Nucleotide (A) and protein alignment (B) of exon 2 of haplotype A and haplotype B of *Vkorc1* detected in Chadian *M. natalensis*

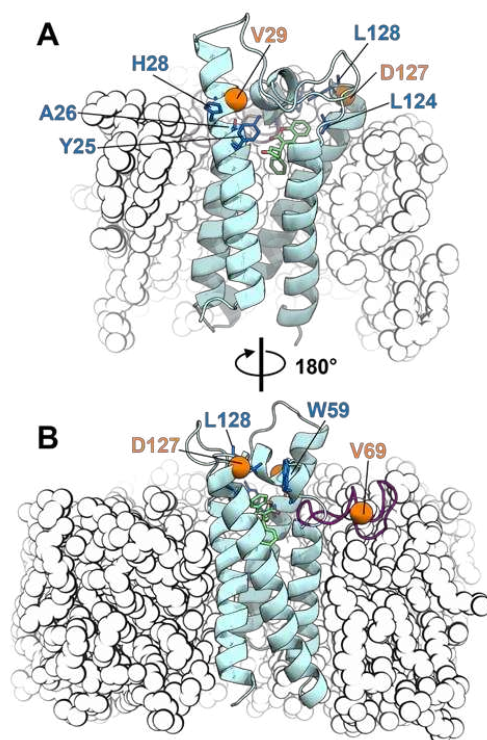


Figure 4 : Structural location of the three novel *Rattus rattus* VKOR mutations detected in Chad. Side views of VKOR structure bound to warfarin and embedded into a sliced lipid bilayer, showing **A/** transmembrane helices 1 and 4 in the foreground and **B/** transmembrane helix 3 in the foreground. The structural model of *Rattus rattus* VKOR has been obtained using AlphaFold collab notebook^{49,50} and is shown as light-blue cartoon. The lipid bilayer is presented as black contoured spheres. Warfarin is shown as green sticks. Amino acids corresponding to Chad mutations - V29, V69 and D127 - are identified as orange spheres. Surrounding amino acids described as involved in ARs resistances are depicted as blue sticks. The anchor domain of VKOR loop determined on the human VKOR crystal structure⁴⁷ (Liu *et al.* 2020) is coloured in violet.

ANNEXE 5

Diversity and distribution of rodent pests in the main urban areas of Chad

1 Ali Barka MAHAMAT^{1,2}, Soudy Imar DJIBRINE^{2,3}, **Sionfoungo Daouda SORO¹**, Abdessalem
2 HAMMED¹, Florence AYRAL¹, Sébastien LEFEBVRE¹, Karine GROUD¹, Virginie LATTARD¹ *

3 ¹USC 1233 RS2GP, VetAgro Sup, INRAE, University of Lyon, Lyon, France

4 ²Département des Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques, Institut National Supérieur des
5 Sciences et Techniques d'Abéché (INSTA), Abéché, Chad

6 ³Centre de Contrôle de Qualité des Denrées Alimentaires (CECOQDA), N'Djamena, Chad

7 * Corresponding Author: virginie.lattard@vetagro-sup.fr

8 **Key-words : Rodent pest¹, Species², Chad³, Distribution⁴, Abundances⁵, Climate⁶**

9 Abstract

10 Through their carriage of zoonotic agents, rodents play a major role in the maintenance, circulation,
11 and transmission of infectious diseases to humans and farm/domestic animals. They cause damage that
12 can have a long-term impact on the food situation of a region. In Africa, a modification of the species
13 present is observed in certain countries due to the proliferation of invasive rodent species. In Chad,
14 such data are scarce while damage and crop losses are regularly observed. The purpose of our study
15 was to determine which rodent pest species were present in the main cities of Chad and whether their
16 distribution and abundance differed by geographic area, city and type of site. To this end, different
17 sampling campaigns were organized in individual houses, warehouses, and fields in cities of the
18 Sahelian (Moundou, Doba and Sarh) and Sudanian areas (N'Djaména, Abéché and Biltine). A total of
19 654 rodents were sampled over a three-year period from 2019 to 2021. Mitochondrial cytochrome b
20 sequencing enabled the identification of 5 species of rodents belonging to the family Muridae that
21 included the Verheyen's multimammate mouse (*Mastomys kollmannspergeri*, 36.3%), the Natal
22 multimammate mouse (*Mastomys natalensis*, 15.4%), the African grass rat (*Arvicanthis niloticus*,
23 19.3%), the Black rat (*Rattus rattus*, 28.7%) and *Praomys sp.* (0.2%). *M. kollmannspergeri* was the
24 dominant species sampled and was widespread in both Sahelian and Sudanian areas, in all Chadian
25 cities and all types of sampling sites. *M. natalensis* appeared to be less abundant in Chad with a more
26 restricted distribution and co-occurrence analyses revealed a spatial segregation of the two *Mastomys*
27 species. The distribution of *A. niloticus* was limited to the urban areas of the Sahelian area. Remarkably,
28 *R. rattus* was only found in the southwestern urban areas with a decreasing abundance gradient between
29 the cities of N'Djaména, Moundou, Doba and Sarh, suggesting a current migration of this species in
30 Chad. Our study demonstrated an influence of the city and the geographical area on the distribution of
31 rodent species in Chad

32

33

34 1 Introduction

Rodent species in Chad, Africa

35 Rodents have been around since the Late Cretaceous and, with more than 2500 species worldwide,
36 constitute the largest mammalian order (Rodentia) (1). They are present on all continents except
37 Antarctica (1). In Africa, more than 290 species of rodents have been recorded (2). Some rodents are
38 herbivores feeding on grasses, leaves, roots, fruits and/or seeds, others are omnivores consuming a
39 wide variety of foods and finally others are insectivores (2). Their ability to adapt has enabled them
40 to colonize different agricultural, urban or inhabited areas (3).

41 Despite their major role in ecosystems through waste management and biodiversity maintenance,
42 certain rodent species are considered as pests because of their ability to their proliferation and the
43 damages they can cause (2). Indeed, rodent pests are responsible for significant damage to crops in
44 many countries, particularly in developing countries (4). Cereals, such as wheat, sorghum, corn and
45 barley, but also vegetables and root crops are widely devastated by rodent pests (2). This problem is
46 best illustrated by the year 1989, which was designated the "Year of the rats" in Niger, because of the
47 massive cereal losses that were recorded (3). In the same year, crop losses due to rodents were estimated
48 at nearly 48% of the tonnage usually produced in Tanzania (5). They are also responsible for the
49 destruction of food stocks and equipment in fields, warehouses, and stores (6). They are also involved
50 in the maintenance, circulation, and transmission of a wide variety of pathogens (7-9) to humans, such
51 as viruses of the families Bunyaviridae and Arenaviridae responsible for viral haemorrhagic fevers
52 (10,11), many bacteria such as *Yersinia pestis* (12), *Leptospira* (13), and *Leishmania* (14).

53 While many studies have focused on rodent in Africa, Chad remains a country where only very scarce
54 partial or old data dealing with rodents are available (15-23). This huge African country is a landlocked
55 country located at the crossroads of North and Central Africa, spreading from the Sahara Desert to the
56 Sudanian region. With 13 inhabitants per km², Chad still appears as a sparsely populated country (24).
57 However, nearly 60% of its territory is desert and the population is growing rapidly and has quadrupled
58 since independence (24). Its population has increased from 3 million inhabitants in 1960 to 17.6 million
59 in 2022 and projections for 2050 estimate the population to increase to between 37 and 48 million. The
60 country is still predominantly rural with 24% of the population living in cities (24). Nevertheless, a
61 constant progression is expected with a two-to-three-fold increase in the projected urban population of
62 2050, and a population reaching 5.7-7.5 million in N'Djaména. Confronted with this expansion, the
63 control of rodent pest populations will become a national issue. To develop appropriate, effective, safe,
64 and environmentally sustainable management programs, knowledge of the rodent species whose
65 populations are to be managed is crucial. Currently, the data for Chad are very scarce with a few studies
66 conducted around Lake Chad and in the Zakouma National Park, that is far from human-populated
67 environments (15-19). This study is intended to address these gaps and describe the diversity
68 abundance of rodent pests in urban areas of Chad in contact with humans and human activities and
69 assess the influence of geographic area and habitat type on this distribution.

70 2 Materials and methods

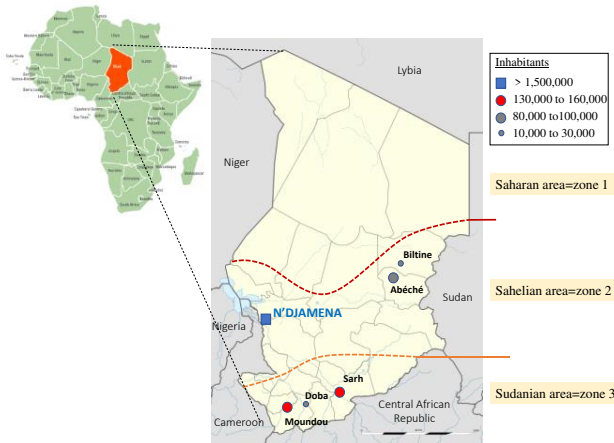
71 2.1 Ethic statement

72 Rodent samples were collected by the national network of pest control operators. This study was thus
73 not considered to be an "experimental procedure" as defined by the French and Chadian legislation
74 (Rural Code, Article R214-89) and was therefore not subject to an ethical committee approval. This
75 study complied with the ethical standards of European regulations governing the care and use of
76 animals in research (Directive 2010/63/EU)

77 All the owners of the sites where the captures were carried out were informed on the project and
78 methods and agreed to it.

79 **2.2 Study area**

80 This study was conducted in Chad. This country is a landlocked country of 1,284,000 km² located at
 81 the crossroads of North and Central Africa. It is bordered by Libya to the north, Sudan to the east, the
 82 Central African Republic to the south, Cameroon to the southwest, Nigeria to the southwest and Niger
 83 to the west (Figure 1) (25).



84 **Figure 1:** Map of Chad and surrounding countries (with an insert of Africa with a shading of Chad in red) indicating the different
 85 geographic areas and study cities and their populations
 86

87 Chad is divided into three distinct geographic zones with variations in rainfall, the Sahara Desert (Zone
 88 1) in the north with annual rainfall of less than 50 mm allowing only a few spontaneous palm groves
 89 to survive, the Sahelian belt (Zone 2) in the center harboring a steppe of thorny bushes composed
 90 mainly of acacias with annual rainfall varying between 300 to 600 mm, and the Sudanian Savanna
 91 (Zone 3) in the south with annual rainfall exceeding 900 mm (Figure 1) (25). A tropical weather system
 92 crossing into Chad from south to north results in an annual wet season that lasts from May to October
 93 in the south, and from June to September in the Sahel.

94 In Chad, the population is unevenly distributed between the capital N'Djaména (10-15% of the national
 95 population) whose population is mostly engaged in commerce, the Sahelian zone with about 40% of
 96 the population and low population densities (less than 10 inhabitants/km²), and the southern zone with
 97 40-45% of the total population on 10% of the national surface area, with much higher densities (about
 98 30 inhabitants/km²) (24,25). Besides the capital, the other major towns are Abéché in the Sahelian zone
 99 and Sarh, Moundou, and Doba in the Sudanian, which are considerably smaller than N'Djaména but
 100 growing rapidly in population and economic activity (Figure 1) (24,25). The Saharan zone of the north
 101 is a sparsely populated area (Figure 1) (24,25).

102 Agriculture and livestock are important economic activities, with 75% of the population employed
 103 (24,25). The main crops are sorghum, millet, and rice, with minor production of cotton, sugarcane, and
 104 peanuts (24,25). The most fertile cropland in the country is found in the Sudanian zone, which accounts
 105 for about 10% of the total land area (24,25).

106 This study was conducted only in the Sahelian and Sudanian areas due to security concerns. In the
 107 Sahelian area sampling was undertaken in the cities of N'Djaména, Abéché and Biltine, while in the
 108 Sudanian area, it was conducted in the cities of Doba, Moundou and Sarh.

109 **2.3 Sampling method**

110 Rodent sampling in Chad were conducted between April and August between 2019 to 2021. The first
111 sampling regime was undertaken in the 6 cities (N'Djaména-from April 2 to 10, Abéché-from April 15
112 to 22, Biltine-from May 2 to 10, Moundou-from July 8 to 18, Doba-from June 12 to 23 and Sarh-from
113 June 1 to 8). For each city, sampling sites included 2 different houses, 1 warehouse and 1 field. Within
114 the same city, the distance between sampling sites was approximately 2 to 5 km. Sampling sites were
115 selected for each city based on evidence of the presence of rodents, such as their damage caused, and
116 traces of their feces and urine. Sampling regimes between 2020 and 2021 were only undertaken in
117 N'Djaména (from July 1 to 30) and Abéché (from June 1 to 30) to refine the sampling process. Unlike
118 during the first campaign, sampling during the second sampling effort was undertaken in 7 different
119 sites per city, 3 individual houses, 2 warehouses and 2 fields,. A total of 38 sampling sites, *i.e.*, 18
120 houses, 10 warehouses and 10 fields were surveyed in Chad. For each site, vegetation cover, presence
121 of water and/or food resources, type of habitat, human population density, presence of livestock and/or
122 domestic animals (*i.e.*, dogs) were documented. Descriptions of the different sites and their geographic
123 coordinates are presented in Table 1.

124

Table 1 : Rodent sampling sites in Chad and their characteristics.

City	ID	Sites	Longitude/Latitude	Culture/Storage	Human density	Water	Type of housing	Domestic animals
N'Djaména	1	House	12°06'40"/15°03'20"	N/A	++	+	concrete	Dog (1)
	2	House	12°06'23"/15°04'53"	N/A	++	-	clay	Pigeon (15)
	3	House	12°07'29"/15°03'30"	N/A	++	-	concrete	Pigeons (25)
	4	House	12°07'28"/15°03'47"	N/A	++	+	concrete	Ducks (13)
	5	House	12°07'39"/15°03'52"	N/A	++	+	concrete	Chickens (5)
	6	Warehouse	12°06'42"/15°03'45"	Corn, Millet, Sesame, Rice	+	+	concrete	Dog (1)
	7	Warehouse	12°08'22"/14°57'10"	Corn, Sesame, Beans	-	+	concrete	-
	8	Warehouse	12°08'28"/14°57'04"	Corn, Sorghum, Beans	-	+	concrete	-
	9	Field	12°07'57"/15°02'37"	Watermelon, cucumber	-	+	N/A	Dog (3)
	10	Field	12°07'49"/15°03'25"	Cucumbers, Eggplant	+	-	N/A	Dog (2)
	11	Field	12°06'28"/15°03'16"	Cucumbers, Potatoes	+	-	N/A	Dog (1)
Abéché	12	House	20°50'20"/13°50'36"	N/A	++	-	clay	Donkey (1), Goat (7)
	13	House	20°50'37"/13°50'32"	N/A	++	-	clay	Pigeon (18)
	14	House	20°49'58"/13°48'40"	N/A	++	-	concrete	Donkey (2)
	15	House	20°50'9"/13°48'49"	N/A	++	-	clay	Pigeon (14)
	16	House	20°49'59"/13°48'55"	N/A	++	-	clay	Donkey (3)
	17	Warehouse	20°49'58"/13°50'00"	Millet, Peanut, Gomba	+	-	clay	-
	18	Warehouse	20°44'17"/13°50'24"	Millet, Peanuts, Rice	-	+	concrete	-
	19	Warehouse	20°46'5/13°18'11"	Millet, Dry meat, Rice	-	+	clay	-
	20	Field	20°44'40"/13°47'58"	Cucumbers, Potatoes	-	+	N/A	Dog (1)
	21	Field	20°50'9"/13°48'26"	Cucumbers, Tomatoes	+	-	N/A	Dog (2)
	22	Field	20°50'6"/13°48'27"	Cucumbers, Potatoes	+	-	N/A	Dog (1)
Biltine	23	House 1	20°55'32,01"/14°31'34,10"	N/A	++	-	clay	Donkey (1), Goat (9)
	24	House 2	20°55'30,10"/14°31'29,13"	N/A	++	-	clay	Pigeons (22)
	25	Warehouse	20°55'49,29"/14°31'12,39"	Corn, Millet, Rice	+	-	clay	Dog (1)
	26	Field	20°55'22,40"/14°33'4,85"	Cucumbers, Peanuts	-	-	N/A	Dog (1)
Sarh	27	House 1	14.52614N/02092556E	N/A	++	+	concrete	Dog (1)
	28	House 2	14.52476N/02092503E	N/A	++	-	clay	Dog (1)
	29	Warehouse	14.52011N/02093036E	Corn, Peanut, Sorghum	+	-	clay	Dog (1)
	30	Field	14.55135N/02092289E	Cucumbers, Potatoes	-	-	N/A	Dog (2)
Doba	31	House 1	16° 50' 32"/8° 40' 49"	N/A	++	-	concrete	Dog (1)
	32	House 2	16° 50' 28"/8° 40' 42"	N/A	++	+	clay	Duck (13)
	33	Warehouse	16° 51' 05"/8° 39' 51"	Corn, Peanut, Sorghum	+	-	clay	Dog (1)
	34	Field	16° 50' 29"/8° 39' 55"	Cucumbers, Potatoes	-	-	N/A	Dog (2)
Moundou	35	House 1	15°55'72"/12° 12' 48"	N/A	++	+	concrete	Duck (15)
	36	House 2	15°58'36"/12° 12' 432"	N/A	++	-	clay	Dog (1)
	37	Warehouse	15°56'10"/12° 11' 123"	Corn, Rice, Sorghum	+	+	clay	Dog (1)
	38	Field	15°84'99"/12° 10' 623"	Cucumbers, Eggplants	-	-	N/A	Dog (2)

127 Rat traps, mouse traps and glue board (PES, Nigeria) were used in the present study. Depending on the
128 size of the sampling sites, 20 to 25 traps (half of the traps for small- to medium-sized rodents and the
129 other half for medium- to large-sized rodents) were set up where signs of rodent movements were
130 recorded particularly against the wall in buildings. These traps were baited with cucumber and peanut
131 butter. Depending on rodent abundance, trapping was conducted on one or two consecutive days. Traps
132 were set at night and inspected in the morning.

133 After sampling, the sampled rodents were stored at 4°C in individual referenced bags, and immediately
134 transported to either the Livestock Research Institute for Development (IRED) in N'Djaména, the
135 National Institute of Sciences and Techniques (INSTA) in Abéché or processed on site. Depending on
136 the sampling site, necropsies were undertaken between 2 and 24 hrs after sampling.

137 **2.4 Morphological measurements and sexing**

138 On arrival at the laboratory or on sampling site, standard morphometric measurements were recorded
139 on the animals to the nearest 0.5 cm o g. These included 1/ total length (measured from snout to tip of
140 tail using a ruler); 2/ tail length (measured from base of trunk to tip of tail using a ruler); and 3/ body
141 mass (using an electronic balance). All these data including sampling date and site were entered into
142 an access database (Microsoft) for further analysis.

143 The sex of the rodent was first determined based on the ano-genital distance and/or the external view
144 of the testes (26). However, in a second step, to collect various biological samples for further studies,
145 the animal was necropsied, and sexing could be confirmed. For each animal, a tail tissue fragment was
146 then collected and stored in ethanol at 70°C until it was used to extract genomic DNA for molecular
147 identification of species

148 **2.5 Species identification**

149 Species of rodents were morphologically identified during necropsy. Species identity was molecularly
150 confirmed by sequencing a portion of the mtDNA *cytochrome b* gene (27). Genomic DNA was
151 extracted from tail tissue fragment using silica columns (Macherey Nagel) according to the
152 manufacturer's recommendations. Two microliters of genomic DNA were amplified by PCR using
153 specific primers of *cytochrome b* (27). The sequence of the sense primer cytb-S and the antisense
154 primer cytb-AS were respectively 5'-TCTCCATTCTGGTTTACAAGAC-3' and 5'-
155 AACAATGACATGAAAAATCATCGTT-3'. *Cytochrome b* amplification was performed using cytb-
156 S and cytb-AS (10 pmol), GoTaq polymerase (1 unit, Promega) in a 25 µl reaction volume containing
157 2 µl DNA, 5 µl 5X GoTaq buffer and 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate. The amplification
158 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,
159 and a final extension step at 72°C for 10 min. The amplified product was sequenced on both strands;
160 the resulting sequence was submitted to blast analysis (28).

161 **2.6 Data analysis**

162 A night sampling effort (*i.e.*, number of traps used × number of nights of sampling) was calculated for
163 each sampling site. Sample success (*i.e.*, number of trapped rodents/trap effort×100) was calculated to
164 evaluate the relative rodent abundance on each sampling site (28).

165 Generalized Linear Modeling (GLM) based on Poisson distribution was performed to analyse
166 geographical and city trends. Nevertheless, due to the limited number of sampling sites and the limited
167 number of samples within each species, the observed distributions did not follow a Poisson distribution.

Rodent species in Chad, Africa

168 Kruskal Wallis tests (KWT) were performed to analyse city effect (29). Mann-Whitney tests (MWT)
169 were performed to analyse geographical effect (*i.e.*, either Sudanian *versus* Sahelian areas or East
170 *versus* West areas) (30). Dunn's multiple comparison tests (DT) were performed to analyse habitat
171 effect (31).

172 Within the two main cities studied (N'Djaména and Abéché) we studied either the aggregation or the
173 segregation of each pair of species (except for *Praomys sp.*) according to the Null Model Analysis of
174 Species Co-occurrence (32). The input data were the detection/non-detection matrix for each species
175 (row)/site (column) couple (32). Considering the null model, we hypothesized i) the species occur at
176 the same frequency as in the input data (fixed row total constrain) and the probability of a species
177 occurring in a trapping site is proportional to the sampling effort (column total constraint with sampling
178 effort as weight (night-trap number)), 30,000 matrices were randomly built for the null model and
179 compared to the input matrix (32). We used the standardized c-score as an index of co-occurrence (33).
180 A significantly positive c-score indicates segregation while negative score indicated aggregation.

181 3 Results

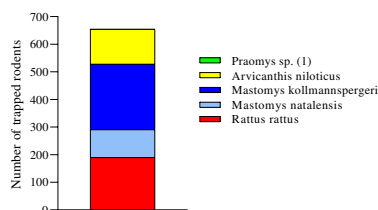
182 A total of 805 traps were set in Chad between 2019 and 2021 that included 230 traps in N'Djaména,
183 255 traps in Abéché, and 80 traps each in Biltine, Moundou, Sarh and Doba. The number of sampling
184 nights was 1170 over the sampling period, *i.e.*, 345 each in Ndjamaena and Abéché, and 120 each in
185 Biltine, Sarh, Doba and Moundou, *i.e.*, 390 in houses, 390 in warehouses and 390 in the fields.

186 For the 38 sampling sites, sanitary problems and/or the presence of food resources were noted. Except
187 for 5 warehouses, the presence of livestock or domestic animals was reported, including 20 sites out of
188 38 with the presence of dogs roaming freely.

189 During the sampling regimes, 654 rodents were sampled, 351 during the first sampling session in
190 N'Djaména, Abéché, Biltine, Sarh, Doba and Moundou and 308 during the subsequent sampling effort
191 in N'Djaména and Abéché.

192 3.1 Rodent diversity in urban areas in Chad

193 Five rodent species were identified, the Verheyen's multimammate mouse (*Mastomys*
194 *kollmannspergeri*) (36% - [95% confidence interval (CI), 32.3-40.6]), the black rat (*Rattus rattus*)
195 (29% - [95% CI, 25.0-32.8]), the African grass rat (*Arvicanthis niloticus*) (19% - [95% CI, 16.1-
196 23.0%]), the Natal multimammate mouse (*Mastomys natalensis*) belonging to lineage A-II (15% -
197 [95% CI, 12.6-18.8]) and one rodent belonging to the genus *Praomys* (0.2% - [95% CI, 0.01-1.10])
198 (Figure 2).



199
200

Figure 2: Cumulated sampled rodents in Chad over the sampling period

Rodent species in Chad, Africa

3.2 Morphological characteristics of rodent pests in urban areas in Chad

For *M. kollmannspergeri*, their median mass was 66 g, their median total length was 19 cm with a tail length (median of 9 cm), shorter than the body length (median 10 cm). The median mass of *M. natalensis* (n=101), 71g was significantly higher (MWT, U=5467, df=1, p=0.0009) than that of *M. kollmannspergeri* (n=237), while their body length (median 5cm) was significantly shorter (MWT, U=401.5, df=1, p<0.0001) than *M. kollmannspergeri* with a tail of the same length (Table 2).

The median mass of *A. niloticus* (n=126) captured in Chad was 127g. Their median total length – from muzzle to tip of tail - was 18cm, with a tail and the body of the same length (9cm) (MWT, U=3590, df=1, p>0.05) (Table 2).

The median mass of *R. rattus* (n=190) captured in Chad was 205g. Their median total length – from muzzle to tip of tail - was 32cm, with the tail being longer (median 16cm) than the body (median 15cm) (MWT, U=8174, df=1, p=0.0052) (Table 2).

Table 2 : Measurements of rodents captured in Chad. Results are expressed as median and its 95% confidence interval

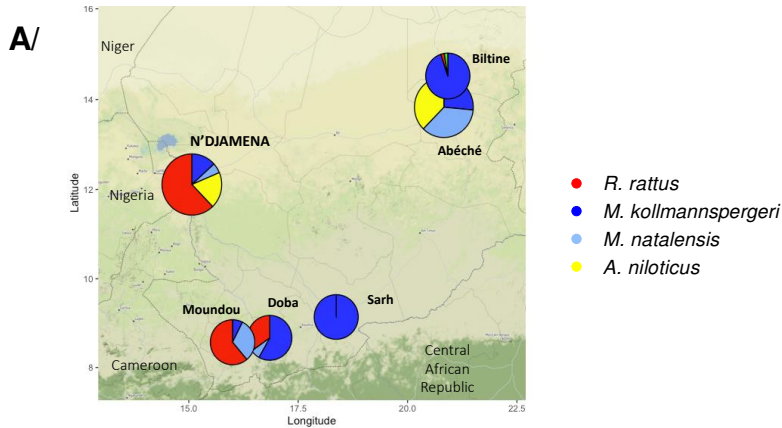
	Mass (g)	Body+Tail (cm)	Tail (cm)
<i>R. rattus</i>	205 [201-210]	32 [30-32]	16 [16-17]
<i>M. kollmannspergeri</i>	66 [61-69]	19 [18-19]	9 [9-9]
<i>M. natalensis</i>	71 [69-73]	14 [13-14]	9 [8-9]
<i>A. niloticus</i>	127 [125-128]	18 [18-19]	9 [9-10]

3.3 Distribution of rodent pests in Chad

A total of 62% of the sampled rodents were sampled in N'Djaména (31%) and Abéché (31%), and the rest were sampled in Sarh (8.3%), Doba (8.3%), Moundou (7.9%) and Biltine (7.2%). *M. kollmannspergeri* was sampled in all sampling sites with a frequency ranging from 7.3% in Moundou to 100% in Sarh (Figure 3). *M. natalensis* was sampled in only 4 cities that included N'Djaména, Moundou, Doba and Abéché, with low frequencies compared to *M. kollmannspergeri*, from 5.9 to 35.9% (Figure 4). *A. niloticus* was only sampled in N'Djaména and Abéché with frequencies of 20.7% and 37.6%, respectively. *R. rattus* was only sampled in N'Djaména, Moundou and Doba with frequencies of 35 to 80%, with a single *R. rattus* sampled in Biltine (Figure 3).

Commenté [VL1]: We removed confidence interval since it is present in the table below

Rodent species in Chad, Africa



B/

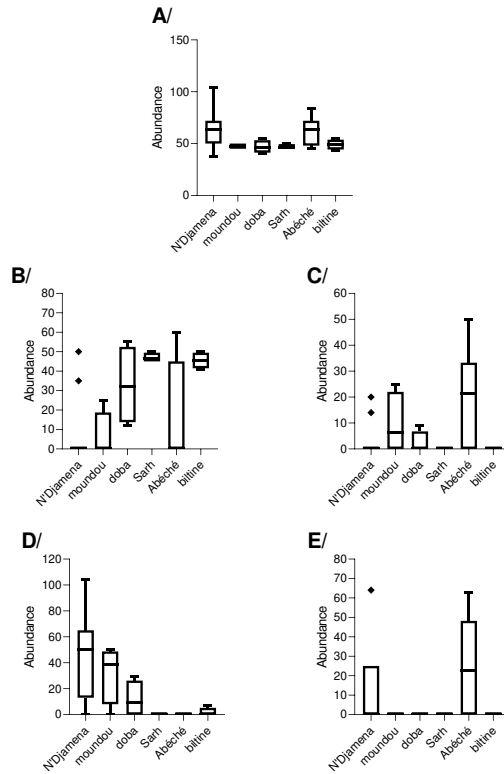
	Abéché	Biltine	Doba	Moundou	N'Djaména
<i>R. rattus</i>	0.0 [0.0-2.2]	2.3 [0.1-11.9]	34.9 [22.4-49.8]	80.5 [66.0-89.8]	58.0 [50.5-65.2]
<i>M. kollmannspergeri</i>	26.5 [20.4-33.6]	95.5 [84.9-99.2]	58.1 [43.3-71.6]	7.3 [2.5-19.4]	15.4 [10.7-21.6]
<i>M. natalensis</i>	35.9 [29.1-43.3]	0.0 [0.0-8.0]	7.0 [2.4-18.6]	12.2 [5.3-25.5]	5.9 [3.2-10.5]
<i>A. niloticus</i>	37.6 [30.7-45.1]	0.0 [0.0-8.0]	0.0 [0.0-8.2]	0.0 [0.0-8.6]	20.7 [15.3-27.4]
<i>Praomys sp.</i>	0.0 [0.0-2.2]	2.3 [0.1-11.9]	0.0 [0.0-8.2]	0.0 [0.0-8.6]	0.0 [0.0-2.2]

224
225 **Figure 3** : The distribution (A) and prevalence with its 95% confidence interval (B) of each rodent species sampled per
226 city.

227 3.4 Abundance of rodent pest species according per city

228 Since the sampling effort was not the same between cities and between sites, species distribution was
229 analysed taking into account this methodological difference and results were expressed in terms of
230 rodent abundance (*i.e.*, the number of rodents/number of sampling nights). A GLM based on a Poisson
231 distribution was undertaken because of the many sites where rodents were not present but was not
232 successful for any of the species sampled because the observed distribution did not follow a Poisson
233 distribution. The results were therefore analysed using non-parametric Kruskal-Wallis tests. No
234 difference in rodent abundance, all species together, was noted between the different cities (Figure 4A).

Rodent species in Chad, Africa



235
 236 **Figure 4** : Abundance of rodent species, according to the city. A/Total rodents, B/*M. kollmannspergeri*, C/*M. natalensis*,
 237 D/*R. rattus* and E/*A. niloticus*.
 238

239 However, when considering each species individually, a significant city effect was observed for the
 240 four species for which the sampling was compatible with such an analysis, (*i.e.*, for *M.*
 241 *kollmannspergeri* (n=237) (Figure 4B) (KWT, H=15.33, df=5, p= 0.091); *M. natalensis* (n=101)
 242 (Figure 4C) (KWT, H=13.27, df=5, p=0.0210); *R. rattus* (n=190) (Figure 4D) (KWT, H=24.94, df=5,
 243 p=0.0001); *A. niloticus* (n=126) (Figure 4E) (KWT, H=13.44, df=5, p=0.0196).

244 For *M. kollmannspergeri*, in an attempt to identify a geographical influence, a comparison was made
 245 between the Sahelian (*i.e.*, Abéché+Biltine+N'Djaména) and the Sudanian (*i.e.*,
 246 Moundou+Doba+Sarh) areas. No significant differences were observed between the two climatic zones
 247 (MWT, U=114.5, df=1, p=0.1265). The same comparison was made between the zones located in the
 248 West (*i.e.*, N'Djaména+Moundou+Doba) and in the East (*i.e.*, Abéché+Biltine+Sarh). A significant
 249 difference was observed (MWT, U=121, df=1, p=0.039) with a trend suggesting a higher abundance
 250 of *M. kollmannspergeri* in the East. For *M. natalensis*, no significant difference was observed between
 251 the Sahelian and Sudanian areas (MWT, U=134.5, df=1, p=0.3198) or between eastern and western
 252 Chad (MWT, U=151, df=1, p=0.1933) (Figure 4C). For *A. niloticus*, while no difference was observed

Rodent species in Chad, Africa

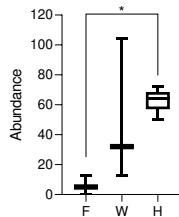
253 between the East and West (MWT, $U=148$, $df=1$, $p=0.1442$), a significant difference in abundance was
254 observed between the Sahelian and Sudanian areas (MWT, $U=96$, $df=1$, $p=0.0154$) with an absence of
255 *Arvicanthis niloticus* in the Sudanian area (Figure 4E). For *R. rattus*, the same analyses were
256 performed. No difference was observed between the Sahelian and Sudanian areas (MWT, $U=219.5$,
257 $df=1$, $p=0.4743$). However, a significant difference was observed between the East and West areas
258 (MWT, $U=63$, $df=1$, $p<0.0001$) with an almost complete absence of *R. rattus* in the East and a
259 significant difference between the cities of N'Djaména and Abéché (DT, $df=5$, $p=0.0002$) (Figure 4D).

260

261 3.5 Abundance of rodent pest species per habitat in Chad

262 Rodent abundance was compared according to the type of capture site, i.e., field, warehouse, or
263 individual house (data not shown). At the country level, including all cities sampled, no significant
264 differences were observed between the three types of sampling sites, either when considering all rodent
265 species together or species individually (if present at the site). However, when this analysis was
266 performed at the city scale of N'Djaména for which a sufficient number of sites of different types were
267 sampled and in which all species were present, a significant difference was observed between fields
268 and individual houses for *R. rattus* (KWT, $H=5.948$, $df=2$, $p=0.0338$) with a higher presence of *R.*
269 *rattus* in individual houses compared to fields (DT, $df=1$, $p=0.0466$) (Figure 5). There was no
270 difference observed for *M. natalensis* (KWT, $H=0.1556$, $df=2$, $p=0.9463$), *M. kollmannspergeri* (KWT,
271 $H=1.867$, $df=2$, $p=0.4545$) and *A. niloticus* (KWT, $H=4.099$, $df=2$, $p=0.1455$).

272



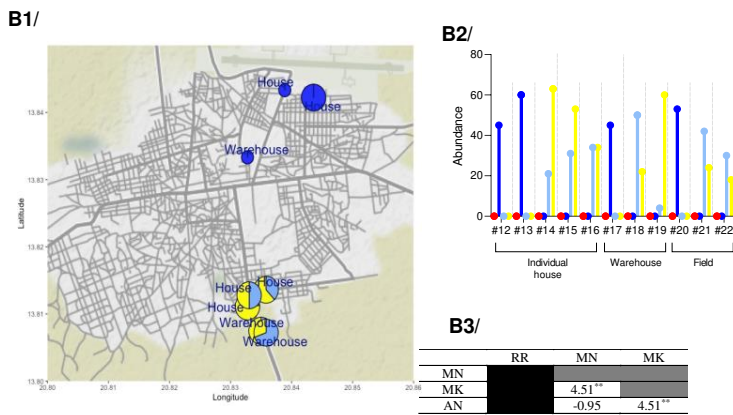
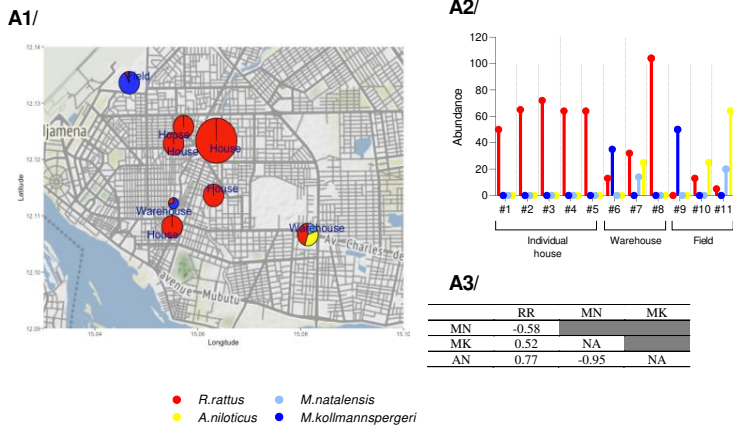
273

274 **Figure 5** : Abundance of *R. rattus*, according to the type of site in N'Djaména. F=field, W=warehouse, H=Individual house

275 3.6 Distribution and abundance of rodent pest species per sampling site

276 The distribution of species was analysed in more detail at the scale of the cities of N'Djaména and
277 Abéché, because the number of samples and the number of sites in each city were compatible with the
278 analysis (Figure 6).

Rodent species in Chad, Africa



279
 280 **Figure 6:** Distribution (A1&B1) and abundance (A2&B2) of each species per sampling site in A/ N'Djaména and B/
 281 Abéché. In Tables A3 and B3: Standardized C-Score for the co-occurrence of each species couple in N'Djaména (A3) and
 282 Abéché (B3). **p-value<0.01

283
 284 In N'Djaména, rodents were captured in the 11 sampling sites. Figure 6A1 shows an overview of
 285 N'Djaména, with sites #8 corresponding to a warehouse, #10 and #11 corresponding to fields, being
 286 outside the figure. Only *R. rattus* was sampled in all houses (Figure 6A2); in the fields and warehouses,
 287 all 4 species were sampled but with different representations depending on the sampling site. Among
 288 the 3 fields, one (#11) sampled 3 species (i.e., *R. rattus*, *M. natalensis* and *A. niloticus*, while another
 289 (#10) sampled 2 species (i.e., *R. rattus* and *A. niloticus*) and the last one (#9) sampled only one species
 290 (i.e., *M. kollmannspergeri*). This same variability was observed in warehouses, one (#7) housing 3
 291 species (i.e., *R. rattus*, *M. natalensis* and *A. niloticus*), the other one (#6), 2 species (i.e., *R. rattus* and
 292 *M. kollmannspergeri*) and the last one (#8), only *R. rattus*. To investigate whether pairwise species
 293 were aggregated, segregated, or randomly associated, a co-occurrence analysis was performed as

Rodent species in Chad, Africa

294 described previously (22). The results for N'Djaména are presented in Table 6A3, a significant negative
295 and positive Standardized C-Score indicating aggregation and segregation, respectively. The analysis
296 did not reveal any significant segregation or aggregation between the different species when
297 considering all sampling sites. This co-occurrence analysis could not be undertaken considering only
298 the houses in N'Djaména from other species except *R. rattus* were absent.

299 In Abéché, rodents were also sampled in all 11 capture sites. Figure 6B1 shows an overview of Abéché,
300 with the fields located outside of Abéché. Whether in the fields, warehouses, or houses, 3 species were
301 found (i.e., *M. kollmannspergeri*, *M. natalensis* and *A. niloticus*). Noteworthy, *M. kollmannspergeri*
302 was never present at a site where *M. natalensis* and/or *A. niloticus* were present (Figure 6B2).
303 Moreover, these strongly exclusive distribution patterns were also retrieved through the co-occurrence
304 analyses where both *M. kollmannspergeri* and *M. natalensis* (all SP trapping sites: SCS = 4.51), and
305 *M. kollmannspergeri* and *A. niloticus* (all SP trapping sites: SCS= 4.51) were found to segregate highly
306 (Table 6B3). Surprisingly, *M. kollmannspergeri* was found only in the sites located in the North of
307 Abéché, while *M. natalensis* and *A. niloticus* were trapped only in sites located in the South of Abéché.

308 Discussion

309 The aim of this study was to provide insight into the rodent pest species occurring in Chad's cities. This
310 study was limited to the southern part of Chad due to several considerations: the northern third of the
311 country is part of the Sahara Desert, it rarely rains with an average rainfall of less than 200 mm per
312 year, so this harsh climate is not very suitable for agriculture and the human population density in this
313 area is very low, about one person per km². Consequently, knowledge on the impact of rodents is
314 limited. Finally, the unstable geopolitical situation in the North of the country makes access to this
315 region unteachable. Since Chad is a vast country (the 5th largest in Africa), we have restricted the study
316 to the cities of Chad, which are undergoing significant expansion with increasingly high human
317 population. Rodents, by carrying zoonotic agents and causing damage to buildings and significant food
318 losses, represent an immediate threat to these cities, where human populations often live under poor
319 sanitary conditions in direct contact with rodents and where poverty is very prevalent, with 73% of the
320 Chadian population being extremely food insecure (34).
321

322 Rodents were sampled in all the 38 trapping sites, (composed of 3 types of sites, individual houses,
323 warehouses, and fields), suggesting that rodents are very abundant and widespread in the cities of Chad.
324 However, since the aim of this study was to improve knowledge of the rodents present, the sites were
325 selected according to an opportunistic approach based on rodent traces and/or hygiene problems and/or
326 the presence of food products. A less oriented sampling method would be necessary to comprehend
327 without bias the abundance of rodents. Nevertheless, our results are relatively consistent with those
328 obtained in the city of Niamey in Niger, which described the capture of rodents in 100% of the sites
329 selected according to the same criteria applied in our study.

330 This study revealed the presence of only 5 species of rodents belonging to the family Muridae, namely
331 *M. natalensis*, *M. kollmannspergeri*, *A. niloticus*, *R. rattus* and a single *Praomys sp.* in the cities of
332 Chad. In addition, 4 *Crocidura olivieri* belonging to the family Soricidae, not considered as pests,
333 were sampled during the campaigns conducted in Chadian cities, 2 in Doba, 1 in N'Djaména and 1 in
334 Moundou. Species identification was performed by mitochondrial cytochrome b sequencing, a
335 technique that results in the robust data acquisition (27,35). Among the species detected, five species,
336 i. e. *M. natalensis*, *M. kollmannspergeri*, *A. niloticus*, *C. olivieri* and *Praomys sp.* are considered
337 endemic to Africa, *Rattus rattus* being an invasive species originating from Asia (36). The presence of
338 *M. natalensis* and *A. niloticus* in Chad has already been reported by the few studies that have been

Rodent species in Chad, Africa

339 conducted locally (*i.e.*, in the immediate vicinity of Lake Chad (15-17,19) and in the Zokou National
340 Park (18). These previous studies also reported the presence of *M. erythroleucus* in Chad, which was
341 not found in Chadian cities in this study. *M. kollmannspergeri* was originally considered a subspecies
342 of *M. erythroleucus* (37-39).

343 *M. kollmannspergeri* is widespread throughout Chad and is the predominant species in urban areas
344 along with *R. rattus*. It is present, in the Sahelian and Sudanian areas, in all Chadian cities included in
345 the study and in all urban ecosystems, fields, warehouses and houses. There is currently very limited
346 information available on the distribution, ecology, impact on crops, and carriage of zoonotic agents of
347 this species. This is likely due to the long-standing assimilation of this species with *M. erythroleucus*,
348 the latter being a known carrier of the Lassa virus. The role that *M. kollmannspergeri* could play in the
349 transmission of Lassa virus would be interesting to elucidate considering the prevalence of this species
350 in Chad. The distribution of *M. natalensis*, which is known to carry *Lassa virus* (40), appears to be
351 more subject to variation, with no sampling of this species in the towns of Biltine and Sarh.
352 Nevertheless, trapping efforts in these two cities were lower, so these results may be underestimated.
353 However, compared to *M. kollmannspergeri*, the prevalence of this species appears to be lower in
354 Chad, even though it is widely distributed and prominent throughout Sub-Saharan Africa (41). The
355 climatic conditions in Chad, with decreasing rainfall in the north, may limit its expansion. It would be
356 interesting to continue the monitoring to follow the evolution of the population dynamics of *M.*
357 *natalensis* in Chad. It is also possible that *M. natalensis* and *M. kollmannspergeri* are in direct
358 competition within the different ecosystems. Indeed, co-occurrence analyses carried out in the city of
359 Abéché indicate a spatial segregation of these two species and their distribution in Abéché illustrates
360 this hypothesis with *M. kollmannspergeri* located in the north of the city while *M. natalensis* were only
361 found in sites located in the south of the city.

362
363 The presence of *A. niloticus* was only recorded in the cities of N'Djaména and Abéché. This distribution
364 limited to the Sahelian zone is not surprising and corresponds to the distribution area described for this
365 species (41). More surprising is the fact that *Arvicanthis niloticus* was abundantly captured, of course,
366 in fields, but also in warehouses and houses in Abéché. They were even dominant compared to other
367 species in houses #14, 15 and 16 and warehouse #19. This herbivorous species normally resides in
368 grassland nesting in burrows under bushes, trees, rocks, and garbage heaps, feeding on grasses and
369 seeds (42). It may also live near dwellings (42). Our study shows that it does not limit its space to the
370 outdoors, but enters habitats, which leads it to be in contact with humans that can transmit various
371 zoonotic pathogens directly or indirectly (*e.g.*, *Leptospira*, *Leishmania*, *Borrelia*) (43,44).

372
373 In addition to these Africa-native rodent species that are typically Sahelian, *R. rattus* accounts for a
374 significant proportion of the rodent population in Chad's cities. *R. rattus* is a commensal species and is
375 a major invader. Along with the house mouse (*Mus musculus*), it appears on the list of the 100 worst
376 invasive alien species in the world (45). Originating from Southeast Asia, it would have been
377 introduced in Africa in two separate movements, the first one through South Africa in the 6th century,
378 and the second one later from Europe through the ports of West Africa (36). Since, its presence has
379 been reported in many West African cities including Niger (21,22), Nigeria (46), but also in the Central
380 African Republic (47), and apparently in Cameroon with a *R. rattus* sampled during a surveillance
381 study (19). All these countries are bordering Chad to the east and south. In Chad, the distribution of
382 the black rat seems to be limited to the southwestern part of the country, with observations of this
383 species in the cities of N'Djaména, Moundou and Doba, and a near-absence of this species in the other
384 cities of the study (apart from one single *R. rattus* sampled in Biltine). These results seem to suggest a
385 migratory front of *R. rattus* from West to East and from South to North with a decreasing gradient of
386 abundance between the cities of N'Djaména, Moundou, Doba and Sarh. Close monitoring between the

Rodent species in Chad, Africa

387 towns of N'Djaména and Abéché would undoubtedly provide a clearer picture of this migration flow.
388 In the cities where its presence was recorded, in particular in N'Djaména, our results clearly indicate a
389 preferential location of *R. rattus* inside buildings, especially inside individual houses, close to human.
390 It is worth noting the absence of any other species in the houses of N'Djaména. Its aggressiveness
391 towards other rodent species is most likely the cause of this spatial segregation, as previously observed
392 in Niamey, Niger (22). Contrary to individual houses, *R. rattus* seems to co-exist with other rodent
393 species in warehouses (#6 and #7). However, it is possible that they do not share the same micro space
394 inside the buildings or even that the other rodent species have been introduced into the warehouses via
395 the transport trucks.

396
397 Surprisingly, in our study, no *M. musculus* have been detected in Chad. The latter is also listed among
398 the widely invasive species that have colonized a large number of African countries. Its presence has
399 been shown in Niger (21). It would be relevant to follow this colonization in the future. Less surprising
400 is the absence of *Rattus norvegicus*. The latter seems less suitable to colonize African countries,
401 certainly due to climatic conditions, and its presence remains concentrated in port areas.

402 **Conclusion**

403 This study has provided a broad view of rodent biodiversity in Chadian cities. Detailed views focused
404 on each city will be necessary to accurately assess the climatic, geographic, and architectural factors
405 that influence the dynamics of each species. These data will be essential for the implementation of
406 appropriate management programs. In addition, knowledge of the risks (sanitary, economic) associated
407 with their outbreak in Chadian cities will be essential to adapt management to these risks. As this large-
408 scale management is very frequently undertaken using rodenticides, the sensitivity of these rodents to
409 these rodenticides will have to be characterized to exclude any resistance phenomenon to avoid
410 selecting possible resistant populations.

411 **Conflict of Interest**

412 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial
413 relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

414 **Author Contributions**

415 Conceptualization: VL, SID; methodology: ABM, SID, SL, VL; data curation: ABM, VL; formal
416 analysis and investigation: ABM, SID, SDS, AH, FA, SL, KG, VL; writing—original draft preparation:
417 ABM, SDS, SL, VL; writing—review and editing: ABM, SID, SDS, FA, SL, KG, VL; funding
418 acquisition: VL, SID; resources: VL; supervision: VL, SID.

419 **Funding**

420 Part of the funds was obtained from the French Embassy/Campus France

421 **References**

- 422 1- Burgin CJ, Colella JP, Kahn PL, Upham NS. How many species of mammals are there? *J Mammal.*
423 (2018) 99:1–14. doi.org/10.1093/jmammal/gyx147.
- 424 2-Fiedler, L.A. (1994). *Rodent Pest Management in East Africa*. Plant Production and Protection Paper
425 No. 123, Food and Agriculture Organization (FAO), Rome.

Rodent species in Chad, Africa

- 426 3-Dobigny G (2000). Inventaire et biogéographie des rongeurs du Niger : nuisances aux cultures
427 implications dans certains problèmes de santé publique et vétérinaires : rapport de coopération pour le
428 Service National, septembre 1999-décembre 2000. Niamey : IRD, 71 p. multigr.
- 429 4-Meerburg BG, Singleton GR, Leirs H. The Year of the Rat ends - time to fight hunger! *Pest Manag*
430 *Sci.* (2009a) 65:351-352. doi: 10.1002/ps.1718
- 431 5-Mwanjabe PS, Sirima FB, Lusingu J. Crop losses due to outbreaks of *Mastomys natalensis* (Smith,
432 1834) Muridae, Rodentia, in the Lindi Region of Tanzania. *Int Biodeterior Biodegradation.* (2002)
433 49:133-137. doi: 10.1016/S0964-8305(01)00113-5
- 434 6-BUCKLE, A.P. and SMITH, R.H., 2015. *Rodent pests and their control*. Wallingford: CAB
435 International. 422 p. <http://dx.doi.org/10.1079/9781845938178.0000>
- 436 7-Meerburg BG, Singleton GR, Kijlstra A. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit*
437 *Rev Microbiol.* (2009b) 35:221-270. doi: 10.1080/10408410902989837
- 438 8-Diaz JH. Recognition and management of rodent-borne infectious disease outbreaks after heavy
439 rainfall and flooding. *J La State Med Soc.* (2014) 166:186-92.
- 440 9-Roberts L. Nigeria hit by unprecedented Lassa fever outbreak. *Science.* (2018) 359:1201-1202. doi:
441 10.1126/science.359.6381.1201.
- 442 10-Fichet-Calvet E, Rogers DJ. Risk maps of Lassa fever in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* (2009)
443 3:e388. doi: 10.1371/journal.pntd.0000388
- 444 11-World Health Organization. [http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/WHO-list-of-top-](http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/WHO-list-of-top-emerging-diseases/en/)
445 [emerging-diseases/en/](http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/WHO-list-of-top-emerging-diseases/en/) (accessed April 18, 2018).
- 446 12-Andrianaivoarimanana V, Rajerison M, Jambou R. Exposure to *Yersinia pestis* increases resistance
447 to plague in black rats and modulates transmission in Madagascar. *BMC Res Notes.* (2018) 11:898.
448 doi: 10.1186/s13104-018-3984-3.
- 449 13-Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* (2001) 14:296-326. doi: 10.1128/CMR.14.2.296-
450 326.2001.
- 451 14-Shender LA, De Los Santos M, Montgomery JM, Conrad PA, Ghersi BM, Razuri H, Lescano AG,
452 Mazet JA. Native rodent species are unlikely sources of infection for *Leishmania (Viannia) braziliensis*
453 along the Transoceanic Highway in Madre de Dios, Peru. *PLoS One.* (2014) 25;9:e103358. doi:
454 10.1371/journal.pone.0103358.
- 455 15-Petter F. Répartition géographique et écologie des Rongeurs désertiques (du Sahara occidental à
456 l'Iran oriental). *Mammalia.* (1961) 25:1-222.
- 457 16-Brooks J. Chad rodent control research project. Final Report. *USDA/APHIS/ADC, Denver Wildlife*
458 *Research Center* (1993) p. 28.
- 459 17-Granjon L and Dobigny G. The importance of cytotoxicity in understanding the biogeography of
460 African rodents: Lake Chad murids as an example. *Mammal Rev.* (2003) 33 :77-91.
461 <https://doi.org/10.1046/j.1365-2907.2003.00007.x>
- 462 18-Granjon L, Houssin C, Lecompte E, Angaya M, César J, Cornette R, Dobigny G, Denys C.
463 Community ecology of the terrestrial small mammals of Zakouma National Park, Chad. *Acta Theriol.*
464 (2004) 49 :215-234. <https://doi.org/10.1007/BF03192522>
- 465 19-Dobigny G, Tatar C, Kane M, Gauthier P, Brouat C, Ba K, Duplantier JM. A cytotoxicity and
466 DNA-based survey of rodents from Northern Cameroon and Western Chad. *Mammal Biol.* (2011)
467 76 :417-427. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2010.10.002>

Rodent species in Chad, Africa

- 468 20-Granjon L, Duplantier JM, Catalan J, Britton-Davidian J. Karyotypic data on rodents from Senegal,
469 mainly Muridae and Gerbillidae. *Israel J Zool*. (1992) 38 :263-276.
- 470 21-Dobigny G, Nomao A, Gautun JC. A cytotoxic survey of rodents from Niger : implications
471 for systematics, biodiversity and biogeography. *Mammalia*. (2002) 66 :495 -523.
- 472 22-Garba M, Dalecky A, Kadaoure I, Kane M, Hima K, Veran S, Gagare S, Gauthier P, Tatar C,
473 Rossi JP, Dobigny G. Spatial segregation between invasive and native commensal rodents in an urban
474 environment: a case study in Niamey, Niger. *PLoS One*. (2014) 9:e110666. doi:
475 10.1371/journal.pone.0110666
- 476 23-Crespin L, Papillon, Y, Doukary A, Granjon L, Sicard B. Annual flooding, survival and recruitment
477 in a rodent population from the Niger River plain in Mali. *Journal of Tropical Ecology*. (2008) 24 :375-
478 386.
- 479 24-World Bank. Chad Poverty Assessment : Investing in Rural Income Growth, Human Capital, and
480 Resilience to Support Sustainable Poverty Reduction. World Bank, Washington, DC. © World Bank
481 (2021) <https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/36443> License: CC BY 3.0 IGO
- 482 25-Dumont GF. Géopolitique et populations au Tchad. *Oltre-terre. Revue européenne de géopolitique*,
483 2008, 20, pp.263-288. halshs-00768368.
- 484 26-McIntyre BS, Barlow NJ, Foster PM. Androgen-mediated development in male rat offspring
485 exposed to flutamide in utero: permanence and correlation of early postnatal changes in anogenital
486 distance and nipple retention with malformations in androgen-dependent tissues. *Toxicol Sci*. (2001)
487 62:236-249. doi: 10.1093/toxsci/62.2.236.
488
- 489 27-Pagès M, Chaval Y, Herbreteau V, Waengsothorn S, Cosson JF, Hugot JP, Morand S, Michaux J.
490 Revisiting the taxonomy of the Rattini tribe: a phylogeny-based delimitation of species boundaries.
491 *BMC Evol Biol*. (2010) 10:184. doi: 10.1186/1471-2148-10-184.
- 492 28-Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol*
493 *Biol*. (1990) 215:403-410. doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- 494 29-Theuerkauf J, Rouys S, Jourdan H, Gula R. Efficiency of a New Reverse-Bait Trigger Snap Trap
495 for Invasive Rats and a New Standardised Abundance Index. *Ann Zool Fenn*. (2001) 48:308–318.
- 496 30-Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. (1952) *JASA*, 47: 583-
497 621. doi: 10.1080/01621459.1952.10483441.
- 498 31-Mann HB, Whitney DR. On a Test of Whether One of Two Random Variables Is Stochastically
499 Larger than the Other. *Ann Math Stat.*, (1947) 18, 50-60. doi.org/10.1214/aoms/1177730491.
- 500 32-Dunn OJ. Multiple comparisons among means. (1961) *JASA*, 56: 54-64.
501 doi.org/10.1080/01621459.1961.10482090.
- 502 33-Gotelli NJ, Entsminger GL. Swap and fill algorithms in null model analysis: rethinking the knight's
503 tour. *Oecologia*. (2001) 129:281-291. doi: 10.1007/s004420100717.
- 504 34- Stone L, Roberts A. The checkerboard score and species distributions. *Oecologia*. (1990) 85:74-
505 79. doi: 10.1007/BF00317345.
- 506 35-Dobigny G, Lecompte E, Tatar C, Gauthier P, Bâ K, Denys C, Duplantier JM, Granjon JM. An
507 update on the taxonomy and geographic distribution of the cryptic species *Mastomys kollmannspergeri*
508 (Muridae, Murinae) using combined cytogenetic and molecular data. *J Zool* (2008) 276: 368–37.
509 doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00500.x

Rodent species in Chad, Africa

- 510 36-Etougbéché J, Houémènou G, Dossou HJ, Badou S, Gauthier P, Karim IYA, Nicolas V, Dobigny
511 G. (2020) Genetic diversity and origins of invasive black rats (*Rattus rattus*) in Benin, West Africa. *J*
512 *Vert Biol.* (2020) 69, 20014.1-11. <https://doi.org/10.25225/jvb.20014>
- 513 37-Petter F. Remarques sur la systématique des *Rattus* africains et description d'une forme nouvelle
514 de l'Aïr. *Mammalia.* (1957) 21:125-132.
- 515 38-Lecompte E, Dobigny G, Tatarid C, Gauthier P, Bâ K, Denys C, Duplantier JM, Granjon L. An
516 update on the taxonomy and geographic distribution of the cryptic species *Mastomys kollmannspergeri*
517 (Muridae, Murinae) using combined cytogenetic and molecular data. *J Zool* (2008) 276 :368-374.
- 518 39-Volobouev VT, Hoffmann A, Sicard B, Granjon L. Polymorphism and polytypy for pericentric
519 inversions in 38-chromosome *Mastomys* (Rodentia, Murinae) and possible taxonomic implications.
520 *Cytogenet Cell Genet.* (2001) 92:237-42. doi: 10.1159/000056910
- 521 40-Calvignac-Spencer S, Kouadio L, Couacy-Hymann E, Sogoba N, Rosenke K, Davison AJ,
522 Leendertz F, Jarvis MA, Feldmann H, Ehlers B. Multiple DNA viruses identified in multimammate
523 mouse (*Mastomys natalensis*) populations from across regions of sub-Saharan Africa. *Arch Virol.*
524 (2020) 165:2291-2299. doi: 10.1007/s00705-020-04738-9.
- 525 41-Granjon L. Duplantier JM. Les rongeurs de l'Afrique sahélo-soudanienne. Muséum national
526 d'Histoire naturelle, Paris, *Faune et Flore tropicales.* (2010) 43:1-210.
- 527 42-Musser G.G., Carleton M.D. 2005. Arvicanthus. In: *Mammals of the World: a taxonomic and*
528 *geographic reference* (Eds. D.E. Wilson, D.M. Reeder). Vol. 2. 3rd ed. The Johns Hopkins University
529 Press, Baltimore, USA: 1285-1292.
- 530 43-Diatta G, Duplantier JM, Granjon L, Bâ K, Chauvancy G, Ndiaye M, Trape JF. *Borrelia* infection
531 in small mammals in West Africa and its relationship with tick occurrence inside burrows. *Acta Trop.*
532 (2015) 152:131-140. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.08.016.
- 533 44-Echchakery M, Chicharro C, Boussaa S, Nieto J, Carrillo E, Sheila O, Moreno J, Boumezzough A.
534 Molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania tropica* in rodent species from endemic
535 cutaneous leishmaniasis areas in Morocco. *Parasit Vectors.* (2017) 10(1):454. doi: 10.1186/s13071-
536 017-2398-8.
- 537 45-Global Invasive Species Database (2013) IUCN, Invasive Species Specialist Group. Available:
538 <http://issg.org/database/welcome/>.
- 539 46-Omudu EA, Ati TT. A survey of rats trapped in residential apartments and their ectoparasites in
540 Makurdi, Nigeria. *Res J Biol Sci.* (2010) 6:144-149.
- 541 47-Gonzalez JP, Mathiot CC, Bouquety JC, Diemer JM, Guerre L, Lesbordes JL, Madelon MC,
542 Georges AJ. Status of Hantavirus in the Central African Republic. *Ann Inst Pasteur Virol.* (1988)
543 139:301-304. doi: 10.1016/s0769-2617(88)80044-3.
- 544
- 545