

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE

جامعة ابن خلدون - تيارت

UNIVERSITE IBN KHALDOUN-TIARET



THÈSE

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT en SCIENCES

SPECIALITE

SCIENCES VETERINAIRES

THEME

Séroprévalence de la leptospirose et identification moléculaire des isolats circulants dans quelques élevages algériens

Présentée par :

YAHIAOUI Wafa Ilhem

Devant le jury

M ^{me} GHAZI Kheira	Professeur	Université de Tiaret	Présidente
M ^{me} AIT-LOUDHIA Khatima	Professeur	ENSV d'Alger	Examineur
M ^r HAMMOUDI Abdelhamid	Professeur	Université de Tiaret	Examineur
M ^r BOUZID Riad	M.C.A	Université d'El Tarf	Examineur
M ^r KHELEF Djamel	Professeur	ENSV d'Alger	Directeur de Thèse
M ^r AGGAD Hebib	Professeur	Université de Tiaret	Co- Directeur de Thèse

Année Universitaire 2018-2019

Remerciements

A notre jury de thèse,

A Madame le Professeur GHAZI Kheira, De Université de Tiaret, qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider notre jury. Qu'elle trouve ici l'expression de nos sentiments respectueux.

A Madame le Professeur AIT-LOUDHIA Khatima, De l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger, pour sa présence et de nous avoir fait l'honneur d'examiner notre travail de Thèse.

A Monsieur BOUZID Riad, De l'Institut Vétérinaire de El Tarf, pour sa présence et d'avoir accepté d'examiner notre Thèse.

A Monsieur le Professeur HAMMOUDI Abdelhamid, De l'Institut Vétérinaire de Tiaret, nous avoir fait l'honneur d'examiner notre Thèse.

A Monsieur le Professeur AGGAD Hebib, notre Co-Directeur de Thèse d'avoir assisté cette Thèse et sa présence.

A Monsieur le Professeur KHELEF Djamel, notre Directeur de Thèse pour ses conseils sur le terrain.

Profonde gratitude et sincères remerciements

Je tiens à remercier également

Mes Chers ENSEIGNANTS « qui m'ont marqué et façonné » durant mon Cours Scolaire et Universitaire, aux exemples humains qui m'ont passionné et transmis leurs valeurs et connaissances, éternelle gratitude.

Au personnel de l'IPA et collègues vétérinaires du terrain sincères remerciement.

Au personnel très accueillant du Laboratoire des Leptospires VetagroSup chapotée par Professeur KODJO pour le stage très instructif qui nous a permis de nous familiariser avec les techniques de diagnostic entre autre la sérologie sur buvard , une solution pour acheminer des prélèvements biologiques potentiellement pathogènes d'Afrique.

Au personnel très accueillant du CNR de la Leptospirose de l'Institut Pasteur de Paris à sa tête Monsieur PICARDEAU pour le stage très instructif qui nous a permis de nous familiariser avec les techniques de pointe de diagnostic entre autre la qPCR et l'ELISA Maison , et une initiation à l'expérimentation sur animaux de laboratoire.

Aux enseignants chercheurs et étudiants de la Faculty of Veterinary Medicine, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey, pour leurs accueil et collaboration qui a permis de réaliser la partie de recherche des leptospires par technique de biologie moléculaire et spécialement à Pr Yasar Ergun et mon ami Dr Zafer Cantekin. J'ai aperçu l'esprit de Shams ed Dîn Tabrîzî durant mon inoubliable séjour parmi vous avant de visiter Konya votre ville.

A la fondatrice du site du corbeau qui détient la clef du savoir , un soutien des thésards qui galèrent. Une pensée également et pour tous ceux qui militent pour une science accessible à tous et un transfert de technologie.

Dédicace

A mes chers parents , je vous dédie entièrement cette Thèse

A ma famille et vrai(e)s ami(e)s : votre joie de me voir réussir, me comble

de bonheur.

*A mes étudiants de l'ENV , « la meilleure façon d'apprendre, c'est
d'enseigner ! » , je vous souhaite toute la réussite pour être les Professeurs*

et les leaders de demain.

TABLE DES MATIERES

Glossaire et abréviations.....	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des figures.....	III
Résumé	V
Abstract	VI
ملخص	VII
Introduction générale.....	1

Partie bibliographique

Chapitre I Généralités sur les leptospires.....	4
I .1 Importance et aperçu historique.....	4
I .2 Biologie clinique.....	5
I .2.A Classification.....	5
I .2.B Biologie.....	7
I .2.B.a Caractéristiques morphologiques.....	6
I .2.B.b Physiopathogénie et pathogénicité.....	9
Chapitre II Epidémiologie.....	15
II.1. Epidémiologie descriptive.....	15
II.1.1. Formes épidémiologiques.....	15
II.1.2. Fréquence de la leptospirose.....	15
II.1.2.A Prévalence Humaine.....	15
II.1.2. B Prévalence Animale.....	17
II.2. Epidémiologie analytique.....	22
II.2.1. Schéma épidémiologique.....	22
II.2.1.1. Réservoirs.....	22
II.2.1.1.a. Réservoir animal.....	22
II.2.1.1.b. Réservoir environnemental.....	24
II.2.1.2. Matières virulentes.....	24
II.2.1.3. Modes de contamination.....	26

II.2.2. Facteurs de risque.....	27
II.2.2.a Facteur géographique.....	27
II.2.2.b Facteurs environnementaux.....	27
II.2.2.c Facteur de saisonnalité.....	27
II.2.2.d. Facteurs individuels.....	28
Chapitre III. Diagnostic et prophylaxie.....	29
III.1. éléments de suspicion.....	29
III.1. A Aspect épidémiologiques.....	29
III.1. B Aspect cliniques.....	29
III.1. C Aspect lésionnel.....	32
III.2. Méthodes de diagnostic de laboratoire.....	35
III.2.1. Diagnostic direct.....	35
III.2.1.1. L'observation microscopique directe.....	35
III.2.1.2. Culture.....	36
III.2.1.3. Techniques de biologie moléculaire.....	36
III.2.2. Diagnostic indirect.....	37
III.2.2.1. Test de micro agglutination(MAT).....	37
III.2.2.2. Autres tests de diagnostic indirect.....	37
III.3. Traitement et prophylaxie.....	39
III.3.1. Traitement.....	39
III.3.2. Prophylaxie.....	39
III.3.2.a. Prophylaxie sanitaire.....	40
III.3.2.b. Prophylaxie médicale.....	41

Partie Expérimentale

Etude I : Identification des sérovars circulant dans quelques élevages mixte d'Alger.....	42
I.1 Introduction.....	42
I.2 Matériels et Méthodes.....	43
I.2.A Région et période d'étude.....	43
I.2.B Matériel biologique.....	45
I.2.C Matériel de laboratoire.....	47

I.2.D Technique de laboratoire.....	61
I.2.D.a Etape de préparation des antigènes.....	61
I.2.D.b Etape de Screening.....	61
I.2.D.c Etape de titrage d'anticorps.....	64
I.3 Résultats et discussion.....	68
Etude II: Rechercher des Leptospires par techniques directes.....	73
II.1 Introduction.....	73
II.2 Matériels et Méthodes.....	74
II.2.A Rechercher de Leptospira spp. par culture dans les organes de rongeurs piégés...	74
II.2.A.a Matériel	74
II.2.A.b Méthode.....	74
II.2.B Rechercher de Leptospira spp. par techniques de biologie moléculaire dans l'urine de bovin laitier présentant des troubles de reproduction.....	77
II.2.B. a Matériel.....	77
II.2.B. b Méthode.....	78
II.3 Résultats et discussion.....	83
Conclusion générale.....	85
Article écrit pendant la thèse.....	
Bibliographie.....	
Annexe.....	

Glossaire et abréviations

ADN Acide désoxyribonucléique

ADNr 16S (gène rrs) Acide désoxyribonucléique ribosomique 16S. Correspond au gène codant l'ARNr 16S.

ADNr 23S (gène rrl) Acide désoxyribonucléique ribosomique 23S. Correspond au gène codant l'ARNr 23S ribosomique.

DRO dérivés réactifs de l'oxygène

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay

EMJH Milieu de Ellinghausen Modifié par Johnson Harris

EMJH Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

HO Hème oxygénase

IgG Immunoglobulines agglutinantes de type G

IgM Immunoglobulines agglutinantes de type M

kb Abréviations de pair de base et de kilo base. Les bases étant les bases nucléiques (ATGC) constituants de l'ADN.

LRR protéines contenant une répétition riche en leucine gènes PF13855

MEC matrice extracellulaire

OmpA Outer membrane protéine A Protéines à la membrane externe A

SMase Sphingomyélinases

SOD les superoxydes dismutases

VE-cadhérine cadhérine endothéliale vasculaire

VM protéines modulatrices de la virulence gènes PF07598

Liste des Tableaux

Partie bibliographique

N°	Titre	Page
Tableau 01	Principales caractéristiques de trois génomes de Leptospires (Ristow, 2007)	11
Tableau 02	Synthèse des études rapportant des cas confirmés de Leptospirose animale en Afrique, depuis les années 2000	17
Tableau 03	Hôtes réservoirs typiques des sérovars communs de Leptospira (Bharti et al., 2003)	23
Tableau 04	Contribution journalière de la contamination de l'environnement rural par le bovin l'excrétion urinaire en Manabi (Barragan, et al., 2017)	26
Tableau 05	Forme clinique de la maladie selon la relation hôte-sérovar	30
Tableau 06	Tests de diagnostic indirect des leptospires (autres que le MAT)	38

Partie Expérimentale

Tableau 07	Liste des souches utilisées comme batterie d'antigènes pour le MAT	50
Tableau 08	Illustration d'un titrage d'un sérum selon la microagglutination allant de 1/100 et $\geq 1/12800$.	67
Tableau 09	Résultats de l'étude d'identification des sérovars circulant par la technique de micro-agglutination dans quelques élevages d'Alger	68
Tableau 10	Etapes de culture bactérienne des leptospires à partir d'organes et d'urine	75
Tableau 11	Spécificité de l'amorce utilisée lors de la recherche des leptospires par PCR	80
Tableau 12	Description du mix pour PCR pour recherche de Leptospira spp par amplification du gène rrs	81

Liste des figures

Partie bibliographique

N°	Titre	Page
Figure 01	Arbre phylogénétique du génome de la famille des Leptospiraceae basée sur le séquençage du gène 16S rRNA (Picardeau; 2017)	6
Figure 02	Photo de Microscopie électronique à balayage haute résolution de <i>Leptospira interrogans</i> sérovar <i>copenhageni</i> (Haraji et al., 2011)	7
Figure 03	Structure morphologique et de la double membrane des leptospires (Picardeau, 2017)	8
Figure 04	Distribution des gènes associés à la virulence chez des leptospires pathogènes, intermédiaires et saprophytes (Picardeau2017)	13
Figure 05	Répartition géographique de la leptospirose confirmée humaine et animale en Afrique (Allan et al., 2015)	16
Figure 06	Excrétion urinaires des leptospires selon l'espèces contaminées par ml d'urine (a) et par jour (b) (Barragan, et al., 2017)	25
Figure 07	Coupes histologiques d'organes de cobaye infecté par <i>L. interrogans</i> sérovar <i>Lai</i> (grossissement X 200) (Ristow et al. 2007).	33

Partie Expérimentale

Figure 08	Cartographie de la région d'étude	43
Figure 09	Photo prise au niveau de la ferme 1 de l'étude	44
Figure 10	Site de dépôt d'un piège (photo personnelle 2015)	46
Figure 11	Identification morphologique du rongeur (photo personnelle 2015)	47
Figure 12	Batterie d'antigènes utilisée pour le MAT (photo personnelle 2015)	49
Figure 13	Leptospires observés en microscopie à fond noir; sérovar <i>Australis</i> x100 (photo personnelle 2015)	52
Figure 14	Leptospires observés en microscopie à fond noir; sérovar <i>Panama</i> x100 (photo personnelle 2015)	52
Figure 15	Leptospires sérovar <i>hardjobovis</i> observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	53

Figure 16	Leptospires sérovar pyrogenes observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	53
Figure 17	Leptospires sérovar Grippotyphosa observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	54
Figure 18	Leptospires sérovar cynopteri observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	54
Figure 19	Leptospires sérovar Copenhageni observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	55
Figure 20	Leptospires sérovar iterohaemorrhagiae observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	55
Figure 21	Leptospires sérovar canicola observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	56
Figure 22	Leptospires sérovar autumnalis observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	56
Figure 23	Leptospires sérovar castellonis observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	57
Figure 24	Leptospires sérovar louisiana observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	57
Figure 25	Leptospires sérovar bataviae observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	58
Figure 26	Leptospires observés en microscopie à fond noir; sérovar tarassovi x100 (photo personnelle 2015)	58
Figure 27	Leptospires sérovar Javanica observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	59
Figure 28	Leptospires sérovar Shermani observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	59
Figure 29	Leptospires sérovar Sarmin observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	60
Figure 30	Leptospires sérovar Djasiman observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)	60
Figure 31	Représentation schématique du screening par MAT sur microplaque	62
Figure 32	Représentation schématique du dépôt des sérums et des antigènes sur microplaque lors du titrage	65
Figure 33	Séroprévalences de la Leptospirose par la technique de micro-agglutination selon l'espèce animale	69
Figure 34	Résultats d'une série de PCR par amplification du gène <i>Leptospira</i> 23S rRNA (ARNr 16S 482 bp) dans les prélèvements d'urine de bovine avec troubles de la reproduction	83

Résumé

La leptospirose est une anthroponose cosmopolite due à une bactérie du genre *Leptospira*, comprenant 250 sérovars pathogènes, regroupés en 25 sérogroupes.

L'OMS estime que l'incidence des cas humains est de un millions de cas par an et la maladie serait émergente dans les pays en développement et en Afrique.

La leptospirose a été décrite en Algérie dès les années cinquante, néanmoins on dispose aujourd'hui de peu de données épidémiologiques. Chez l'animal, le tableau clinique varie selon l'adaptation hôte-sérovar. En élevage laitier elle engendre des pertes économiques liées à des troubles de reproduction.

Les études de caractérisation des leptospires circulant chez différentes espèces animales permettent de déterminer la circulation des sérogroupes entre animaux et de comprendre la dynamique de transmission. Le test de micro-agglutination (MAT) reste la référence pour identifier les sérogroupes circulants alors que les techniques de biologie moléculaire permettent de vérifier l'excrétion urinaire des animaux.

Une première étude de 100 animaux répartis sur quatre fermes mixtes d'Alger: bovin (n= 46), moutons (n= 24) ; rats bruns (n= 20), chiens (n= 10), par MAT a révélé une circulation de la maladie chez ces espèces animales. Toutes les fermes ont présenté au moins une vache séropositive, avec séoprévalence animale au sein des fermes variant de 21.42% à 50 % avec prédominance des sérogroupes Sejroe (8/46) et Ballum (4/46) chez le bovin. Une vache était MAT positive contre *L. canicola*, cela suggère que les chiens non vaccinés ou errants, peuvent jouer un rôle dans la transmission de la leptospirose au bétail.

L'étude par amplification du gène ARNr 16S a révélé que les 14 vaches MAT positifs présentant des troubles de reproduction ne seraient pas excrétrices urinaire.

Mots clefs : leptospirose - Test de Micro-agglutination (MAT) – PCR – bovin - Alger

Abstract

Leptospirosis is an anthrozo-zoonotic infection of worldwide significance caused by spirochaete which has 25 serogroups and 250 pathogenic serovars .

WHO estimate that more than 1 million cases occur worldwide each year. The disease is emerging in developing countries and specially in Africa.

Animal leptospirosis has been reported in Algeria since 1950 However, today there is a little epidemiological data. Clinical signs are variable and unspecific. In dairy farming it causes economic losses related to reproductive disorders.

The characterization studies of leptospire circulating in different animal species can determine the circulation of serogroups between animals and understand the dynamics of transmission. The micro-agglutination test (MAT) remains the reference for identifying circulating serogroups while molecular biology techniques can be used to verify the urinary excretion of animals.

A first study of 100 animals (4 mixed farms): black rats (n= 20), dogs (n= 10), sheep (n= 24), and cattle (n= 46) for *Leptospira* infection was conducted in Algiers city (Algeria). Serology survey is obtained by microscopic agglutination test (MAT). Urine, and kidney of black rats were collected and tested by culture. The aim of this study was to assess the proportion of wild and domestic animals with previous or acute leptospirosis and determine the *Leptospira* serovars. Serology survey is obtained by the micro-agglutination reference test (MAT), .positive MAT were observed in (2/20); 14/46 (30,4%) cattle, (2/10) dog & one sheep, were positive by MAT.

All farms had at least one seropositive cow, with seroprevalence in farms ranging from 21.42% to 50% with serogroup Sejroe (8/46) and Ballum (4/46) . One cow was MAT positive against *L. canicola*, suggesting that unvaccinated dogs may play a role in the transmission of leptospirosis to livestock.

The negative PCR of 14 seropositive cattles surfing from reproductive disorders suggest that ; there is no urinary excretion .

Key words: Leptospirosis - Microagglutination test (MAT) - PCR - cattle – Algiers

ملخص

داء اللويبات النحيفة مرض متقل و معددي منتشر عالميا يصيب الانسان والحيوان. تنتسب فيه بكتيريا من نوع البريمة

leptospirosis التي تحوي قرابة 250 سلالة

علنت منظمة الصحة العالمية ان قرابة مليون حالة تصيب البشر سنويا و ان المرض في تزايد في الدول المتخلفة و في افريقيا.

أعلن عن المرض في الجزائر في الخمسينيات، الا ان عدد البيانات الوبائية قليل و غير كافي

غراض المرض عند الحيوان تختلف حسب تكيهه مع نوع البكتيريا. المرض يسبب أعراض تاخر النسل عند الأبقار الحلوب مما يتسبب في خسائر مادية معتبرة.

دراسة انواع البريمية المسببة للمرض عند عدة حيوانات تمكنا من الكشف عن طريقة انتقالها و فهم اليات العدوي.

. الكشف عن طريق MAT هو أحسن طريقة للتعرف عن انواع البريمة، في حين ان تقنيات البيولوجيا الجزيئية تمكنا من التحقق في إفراز البكتيريا في البول.

دراستنا الأولى شملت 4 مزرعات تحوي 100 حيوان، منها 46 بقرة، 24 راس من الغنم، 20 فار و 10 كلاب.

تقنية MAT كشفت ان المرض منتشر عند كل السلالات الحيوانات المدروسة خاصة عند الأبقار بنسبة تتراوح بين

21,42% الي 50% في كل مزرعة مع غالبية Sejroe و Ballum

فيما كشفت دراسة PCR ان كل الأبقار المصابة لا تفرز البكتيريا في بولها، و ان واحدة اصيبت بكتيريا من نوع L.

canicola، هو شائع عند الكلاب مما يدلنا علي إلزامية اللقاح

الكلمات المفتاحية: اللويبية النحيفة- البريمة - اختبار التراكم MAT - PCR - الأبقار - الجزائر

Résumé :

La leptospirose est une anthroponose cosmopolite due à une bactérie du genre *Leptospira*, dont 25 sérogroupes pathogènes.

Le tableau clinique varie selon l'adaptation hôte-sérovar. En élevage laitier elle engendre des pertes économiques liées à des troubles de reproduction.

100 animaux répartis sur quatre fermes mixtes d'Alger: bovin (n= 46), moutons (n= 24) ; rats bruns (n= 20), chiens (n= 10), analysés par MAT a révélé une circulation d'anticorps. Toutes les fermes ont présenté au moins une vache séropositive, avec séoprévalence animale au sein des fermes variant de 21.42% à 50 % avec prédominance des sérogruppe Sejroe (8/46) et Ballum (4/46) chez le bovin. Une vache était MAT positive contre *L. canicola*. Les chiens non vaccinés ou errants, peuvent jouer un rôle dans la transmission de la leptospirose au bétail.

La PCR a révélé que les 14 vaches MAT positifs présentant des troubles de reproduction n'excrétaient pas de leptospires dans leurs urines.

Mots clefs : leptospirose - Test de Micro-agglutination (MAT) – PCR – bovin - Alger

Abstract:

Leptospirosis is an anthropo-zoonotic infection of worldwide significance caused by .spirochaete which has 25 pathogenic serogroups

A survey of 100 animals (4 mixed farms): black rats (n= 20), dogs (n= 10), sheep (n= 24), and cattle (n= 46) from 4 mixed farms of Algiers city (Algeria) by the micro-agglutination reference test (MAT) suggest that; there is a large circulation of antibodies

All farms had at least one seropositive cow, with seroprevalence in farms ranging from 21.42% to 50% with serogroup Sejroe (8/46) and Ballum (4/46) . One cow was MAT positive against *L. canicola*, suggesting that unvaccinated dogs may play a role in the transmission of leptospirosis to livestock. The negative PCR of 14 MAT positives cattles surfing from reproductive disorders suggest that ; there is no urinary excretion .

Key words: Leptospirosis - Microagglutination test (MAT) - PCR - cattle – Algiers

ملخص:

داء اللوبيات النحيفة مرض متنقل و معددي منتشر عالميا يصيب الانسان و الحيوان. تتسبب فيه بكتيريا من نوع البريمة التي تحوي قرابة 250 سلالة

أعلن عن المرض في الجزائر في الخمسينيات، الا ان عدد البيانات الوبائية قليل و غير كافي
غراض المرض عند الحيوان تختلف حسب تكيفه مع نوع البكتيريا. المرض يسبب أعراض تأخر النسل عند الأبقار الحلوب مما يتسبب في خسائر مادية معتبرة. دراسة انواع البريمية المسببة للمرض عند عدة حيوانات تمكنا من الكشف عن طريقة انتقالها و فهم اليات العدوي.

. الكشف عن طريق اختبار التراكم الدقيق هو أحسن طريقة للتعرف عن انواع البريمة، في حين ان تقنيات البيولوجيا الجزيئية تمكنا من التحقق في إفراز البكتيريا في البول.

دراستنا الأولى شملت 4 مزرعات عين منها 100 حيوان، 46 بقرة، 24 راس من الغنم، 20 فار و 10 كلاب.
تقنية اختبار التراكم الدقيق كشفت ان المرض منتشر عند كل السلالات الحيوانات المدروسة خاصة عند الأبقار بنسبة تتراوح بين 21,42 % الي 50% في كل مزرعة مع غالبية (46\6) Ballum و (46\8) Sejroe. اصيبت بقرة ببكتيريا البريمة من نوع L. canicola، و هو شائع عند الكلاب مما يدلنا علي إلزامية اللقاح.
فيما كشفت دراسة تفاعل البلمرة المتسلسل ان الأبقار لا تفرز البكتيريا في بولها.
الكلمات المفتاحية: اللوبية النحيفة- البريمة - اختبار التراكم الدقيق - تفاعل البلمرة المتسلسل-الأبقار - الجزائر

Introduction générale

La leptospirose est une maladie bactérienne zoonotique, retrouvée sur tous les continents à part l'Antarctique, qui peut expérimentalement infecter tous les mammifères (Adler et de la Peña Moctezuma, 2010).

L'infection est due à une bactérie Spirochete du genre *Leptospira interrogans*, comprenant au moins 8 espèces pathogènes : *L. interrogans* *L. kirschneri*, *L. alstonii* *L. alexanderi* *L. santarosai* *L. weilii* *L. borgpetersenii* *L. noguchii* (WHO, 2003, Cerqueira et Picardeau, 2009).

On a recensé 250 sérovars pathogènes, regroupés au sein de 25 sérogroupes de même famille antigénique (Adler et de la Peña Moctezuma, 2009) aussi bien qu'on parle de nos jours de Leptospiroses au pluriel.

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que l'incidence des cas sévères est d'un million de cas par an avec près de 59, 000 décès par an (DHCPP, 2017). La maladie serait émergente dans les pays en développement et en Afrique (de Vries et al., 2014).

La leptospirose animale a été décrite en Algérie dès 1950, par des chercheurs de l'Institut Pasteur d'Alger (Donatien et al., Bernard , 1951), néanmoins on dispose de peu de données épidémiologiques.

En Algérie, un seul laboratoire : Service des Leptospires de l'Institut Pasteur d'Alger, assure le diagnostic humain (par la technique de référence MAT). Néanmoins, beaucoup de médecins envoient les échantillons pour analyse à l'étranger pour des raisons pratiques, d'où le non recensement du nombre de cas humains. Une tendance à l'augmentation des cas humains, est constatée après consultation des relevés de l'Institut Pasteur d'Alger, avec apparition de cas cliniques sévères, suite à des épidémies dans certaines régions rurales du pays. Exemple de l'épidémie de la localité rurale de Tala-Athmane qui a engendré 48 cas humains en deux mois (Afiri et al., 2013).

L'infection représente un problème majeur de santé publique dans le secteur rural en Algérie. Une étude algérienne menée dans une commune rurale de Tizi-Ouzou a révélé que, 82.65% des patients atteints occupaient un habitat en zone rurale (Afiri et al., 2013). Alors que la maladie reste mal prise en compte par les pouvoirs publics.

On note très peu de publications scientifiques concernant la leptospirose humaine ou animale en Algérie (Allan et al., 2015). Cela pourrait résulter de l'inexistence de laboratoire de référence et d'équipe de recherche axée uniquement sur la thématique. Cela est dû essentiellement au manque de moyens et à la priorité accordée à d'autres pathogènes.

Cliniquement, les formes humaines les plus graves sont des atteintes hépatorénales (Baburaj et al., 2006). Chez l'animal, le tableau clinique varie selon l'adaptation hôte-sérovar. Chez le chien on fait face le plus souvent à de : l'ictère, urémie, fièvre, insuffisance rénale (Rentko et al., 1992). Alors que chez le bétail, elle engendre, des pertes économiques avec souvent un tableau sub-clinique ou des troubles de la reproduction comme : des retours en chaleurs, mortalités embryonnaires précoces et avortement (Adugna, 2016, Patel et al., 2015).

Le nombre de cas de leptospirose humaine et animale est sous-estimé dans les pays sous-développés et spécialement en Algérie pour diverses raisons à savoir à titre d'exemples :

- la difficulté du diagnostic différentiel : avec d'autres maladies humaines s'exprimant aussi par un syndrome grippal et la forme sub-clinique fréquente chez le bétail.
- le manque de laboratoires de diagnostic, seul le laboratoire de l'institut pasteur d'Alger est qualifié pour le test de référence, néanmoins il y a un problème de distance à surmonter pour l'acheminement des résultats provenant des Wilayates éloignées d'Alger.
- le peu d'études épidémiologiques à large échelle.

Le cycle de la leptospirose est entretenu par les espèces réservoirs, essentiellement les rongeurs (Cerqueira et Picardeau 2009 , Ayrat et al., 2014), mais également le bétail (Iván Méndez et al., 2014, Dorjee, 2007).

Les études de caractérisation des leptospires circulant chez différentes espèces animales, permettent de déterminer la circulation des sérogroupes entre les animaux et de comprendre la situation épidémiologique du terrain.

Devant la constatation de l'existence d'un manque de matière scientifique on s'est fixé comme objectifs, dans le cadre de notre Thèse : une contribution à l'étude de la situation épidémiologique de la leptospirose animale dans les fermes mixtes suspectées cliniquement de la région d'Alger.

Le test de Micro-agglutination (MAT) reste la référence pour identifier les sérogroupes circulants alors que les techniques de biologie moléculaire permettent de vérifier l'excrétion urinaire des animaux.

Après une brève recherche bibliographique, notre étude expérimentale de Thèse s'est scindée en deux parties :

- La première étude d'identification des sérovars circulant dans quelques élevages mixte d'Alger par la technique de référence MAT.
- La deuxième étude concerne la recherche de *Leptospira spp.* par techniques directes par :
 - observation microscopique et culture bactérienne sur organes des rongeurs piégés
 - technique de biologie moléculaire dans l'urine de bovin laitier présentant des troubles de reproduction pour vérifier l'importance de l'excrétion urinaire entre autre des vaches MAT positives.

Partie bibliographique

Chapitre I Généralités sur les leptospires

I .1 Importance et aperçu historique

La leptospirose est une maladie zoonotique ayant un impact significatif sur la santé humaine et animale avec des répercussions sanitaires et économiques qui peuvent être très importantes.

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que l'incidence des cas sévères est de un million de cas par an avec près de 59, 000 décès chaque année (DHCPP, 2017). La maladie serait émergente dans les pays en développement et en Afrique (de Vries et al., 2014).

La maladie est très ancienne néanmoins reste toujours d'actualité. Nous pouvons résumer son aperçu historique comme suite :

- En 1886 à Heidelberg : Adolf Weil, médecin allemand, décrivait le premier les symptômes de la maladie qui prend son nom : « maladie de Weil » ou fièvre jaune. Une maladie foudroyante avec qui s'accompagne d'insuffisance hépatique et rénale (Levett et al, 2001).
- En 1907: Stimson, observe sous microscope des spirochètes dans des dissections de rein de patients atteints du syndrome de fièvre jaune. Stimson suggéra le nom *Spirochaeta interrogans* à la bactérie (Sellards, 1940)
- En 1915: Deux scientifiques japonais, Inada et Ido, observent des spirochètes dans le foie d'un cobaye inoculé avec du sang d'un patient atteint de la maladie de Weil. Ils ont appelé l'organisme *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (Sellaerds, 1940).
- En 1917 : Hidego Noguchi, un bactériologiste japonais travaillant aux USA, créé le genre *Leptospira* (de la Grec : leptos = petit, spira = une bobine).
- En 1918 : furent développés les milieux de culture et l'acquisition de plus de connaissances sur la clinique et l'épidémiologique.
- En 1920 : on décrivait un organisme saprophyte non pathogène pour l'homme connu par la suite sous le nom de *Leptospira biflexa*, (Brightman,2018).

- En 1950 : La leptospirose a été décrite en Algérie par des chercheurs de l'Institut Pasteur d'Alger (Donatien et al., Bernard).
- En 1953 : Wolff et Broom, présentent le premier schéma de classification des leptospires au sixième Congrès Internationale de Microbiologie de Rome (WHO, 1956) .
- En 1962 : un groupe de scientifiques de l'OMS en collaboration avec le Sous-Comite des leptospires de la Commission internationale de Nomenclature Bactériologique, s'est réuni a Genève pour valider une classification taxonomique en deux espèces distinctes *L. biflexa*, regroupant les souches saprophytiques, et *L. interrogans* pour les espèces pathogènes (WHO)
- En 1987: Des études d'hybridation ADN-ADN ont établies une taxonomie génomique et ont permis de reconnaître une douzaine d'espèces potentiellement pathogènes et un nombre indéterminé de non pathogènes. *Leptospira interrogans* et *Leptospira biflexa* sont appelés *Leptospira interrogans sensu stricto* et *Leptospira biflexa sensu stricto* dans la nouvelle description génomique des espèces.

I .2 Biologie clinique

I .2.A Classification

Les Leptospires font partie de

- l'ordre des Spirochaetales.
- la famille des Leptospiraceae.
- du genre *Leptospira*

Le genre *Leptospira* comprend 2 taxons:

- *L. interrogans sensu lato* : pathogène.
- *L. biflexa sensu lato* : d'espèces saprophytes et intermédiaires comprend
 - ✓ 7 espèces génomiques pathogènes par hybridation ADN/ADN
 - ✓ 3 espèces saprophytes,
 - ✓ 2 espèces à rôle inconnu

Les sérovars sont regroupés en sérogroupes en fonction des relations antigéniques entre les sérovars.

- ✓ *L. interrogans* comprend 23 sérogroupes avec 225 sérovars.
- ✓ *L. biflexa* comprend 28 sérogroupes avec 63 sérovars.

La classification antigénique est le support de la technique de microagglutination MAT décrite dans la partie expérimentale de la Thèse.

L'analyse par hybridation ADN/ADN des séquences du gène codant pour l'ARN ribosomal 16 S, a permis une classification phylogénétique en trois groupes ou clades (voir figure 1 ci-dessous) saprophytes, pathogènes et intermédiaires repartis parmi 22 espèces (Cerqueira et Picardeau 2009).

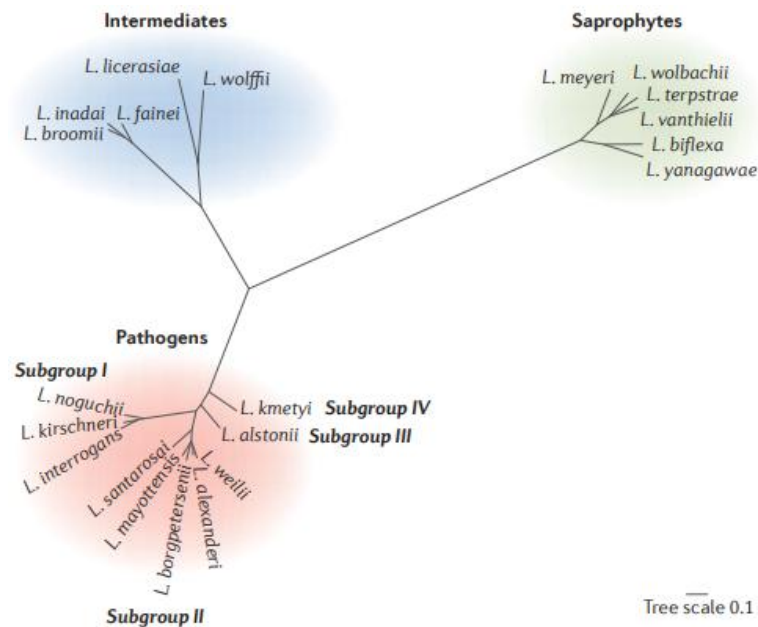


Figure 1 Arbre phylogénétique du génome de la famille des Leptospiraceae basée sur le séquençage du gène 16S rRNA (Picardeau, 2017)

I .2.B Biologie

I .2.B.a Caractéristiques morphologiques

Le mot leptospire vient de grec « leptos » qui veut dire fin, Le terme (spira) signifie spiralé.

Les leptospires sont des bactéries spiralées, qui diffèrent des autres spirochètes par la présence de crochets d'extrémité. De longueur allant de 6 à 20 μm et un diamètre de 0, 1 μm (Haraji et al., 2011) voir figure 2 ci-dessous.

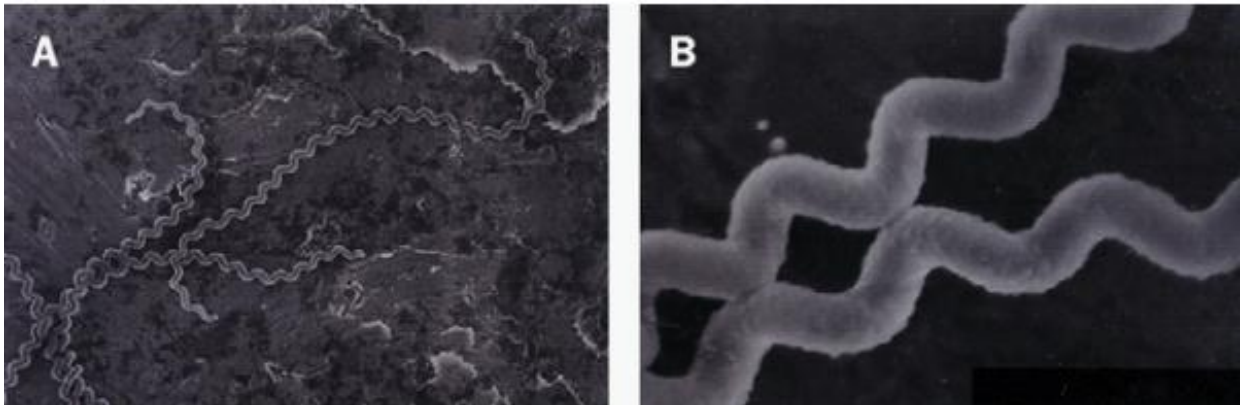


Figure 2 Photo de Microscopie électronique à balayage haute résolution de *Leptospira interrogans* sérovar *copenhageni* (Haraji et al., 2011)

(A) Notez les extrémités crochues caractéristiques. (B) forme spiralée, la surface du spirochète semble hérissée et perlée.

Les leptospires ont une structure à double membrane typique dans laquelle la membrane cytoplasmique et la paroi cellulaire peptidoglycane sont étroitement associées et sont recouvertes par une membrane externe (voir figure 3 ci-dessous en b).

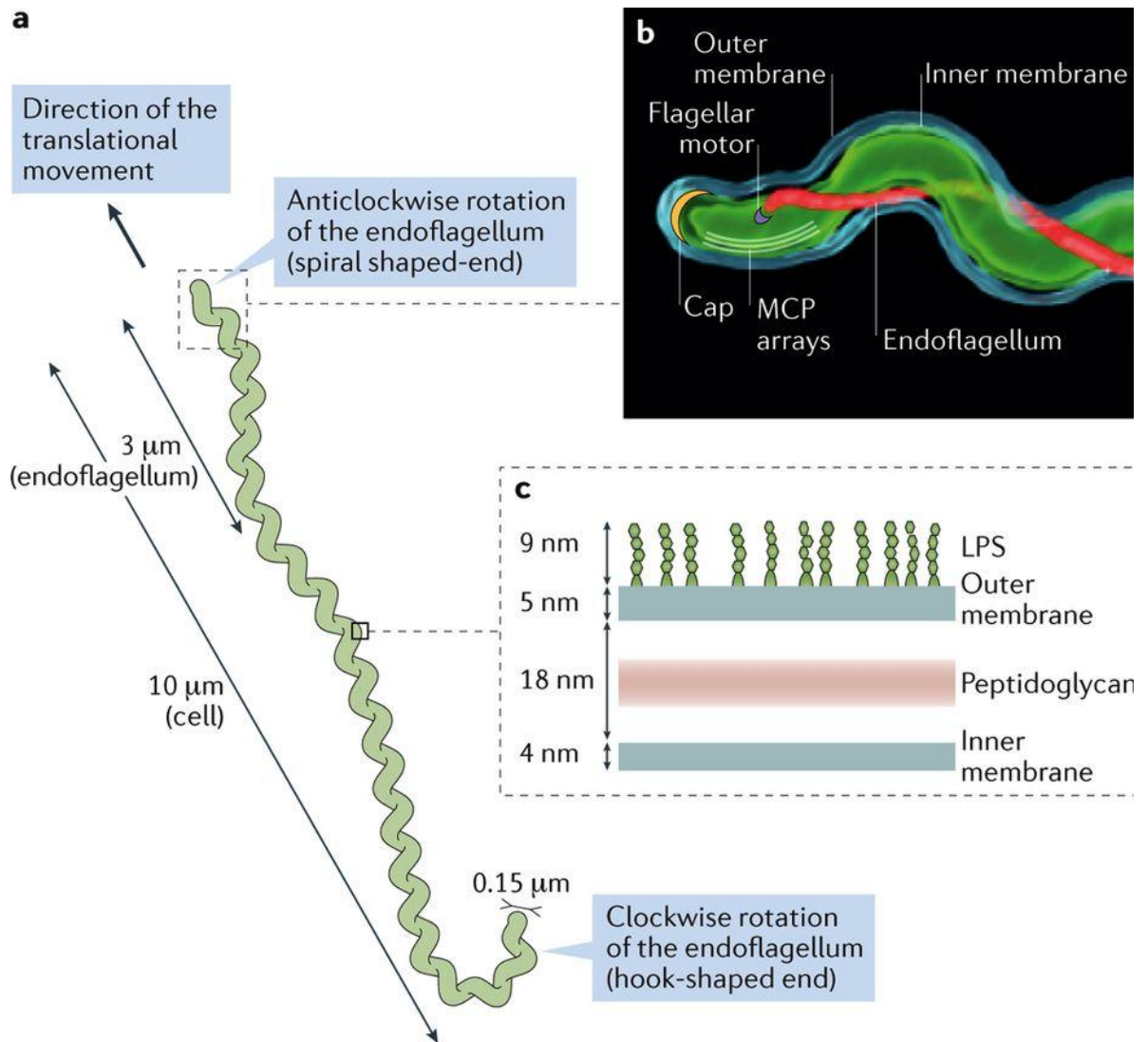


Figure 3 Structure morphologique et de la double membrane des leptospires (Picardeau, 2017)

À l'intérieur de la membrane externe, le lipopolysaccharide constitue l'antigène principal de leptospira (Faine et al., 1999) (Voir illustration Figure 3 en c).

I .2.B.b Physiopathogénie et pathogénicité

Le pouvoir pathogène conditionne le type de maladie et va dépendre de la souche ou sérovar infectant, ainsi le taxons *L. biflexa* est majoritairement saprophytes alors que *L. interrogans* est pathogène.

La pathogénicité des leptospires repose essentiellement sur leur mobilité spontanée par flexion du corps et rotation sur l'axe, sur le fait qu'elles sont capables d'adhérer aux cellules endothéliales et épithéliales et de pénétrer dans les tissus tout en échappant à la réponse immunitaire (Faine et al., 1999).

Les leptospires pathogènes pénètrent dans la peau et migrent à travers le derme, arrivent à l'intérieur des vaisseaux sanguins en traversant la barrière endothéliale et atteignent les organes cibles.

Les leptospires produisent des adhésines pour se lier aux cellules hôtes:

- Matrice extracellulaire (MEC), complexe réseau de protéines et de glucides présents entre et sous les cellules,
- Cadherine endothéliale vasculaire (VE-cadhérine), principalement responsable de l'adhésion des cellules endothéliales
- et d'autres molécules hôtes (y compris protéines du complément, thrombine, fibrinogène et plasminogène) qui facilitent l'évasion immunitaire et la dissémination bactérienne.

Les leptospires peuvent également sécréter des protéases et des hémolysines (sphingomyélinases et phospholipases).

Les leptospires sont capables de survivre, se répliquer et sortir des macrophages et/ou d'induire leur apoptose (Picardeau, 2017).

Les facteurs de virulence dépendent essentiellement du génome et naturellement les caractéristiques du génome varient selon les leptospires et leurs virulence (pathogènes saprophytes et intermédiaires) , voir tableau 1 puis figure 4 ci-dessous.

Le génome des leptospires se distingue de celui d'autres bactéries par ses deux chromosomes circulaires: un grand avec environ 4 millions de paires de bases et un petit d'environ 350 000 paires de bases (Ristow, 2007).

Le génome d'une seconde espèce, *Leptospira borgpetersenii* sérovar Hardjo, a été entièrement séquencé par Bulach et al en 2006 et présente un génome réduit (voir tableau 1).

**Tableau 1 Principales caractéristiques de trois génomes de Leptospires
(Ristow, 2007)**

Caractéristiques	L. biflexa	L. interrogans	L. borgpetersenii
Taille (Kb)	3878	4627	3900
Structure	2 chromosomes, 1 plasmide	2 chromosomes	2 chromosomes
Contenu en GC (%)	38,5	34,9	40,3
Séquences d'insertion	6	26	120
Gènes Nombre total	3787	3728	3190
Fonction définie	2078	1972	1876
Hypothétiques	1709	1756	1053
Proportion de fonction inconnue (%)	45	47	1 33
Proportion gène/Kb	0,97	0,8	0,82
Séquence codante totale (%)	93,7	74,7	74,1
ARN r	2 23S, 2 16S, 2 5S	2 23S, 2 16S, 1 5S	2 23S, 2 16S, 1 5S
ARN t	35	37	37

- la Protéine de la membrane externe A (OmpA), serait le premier facteur de virulence des leptospires. En effet, l'équipe de l'Institut Pasteur de Paris a prouvé qu'inactiver un gène de virulence d'une souche pathogène (*Leptospira interrogans* sérovar Lai séro groupe Icterohaemorrhagiae) n'entraînait aucune virulence in vitro par la suite (Ristow et al. 2007).
- Les grandes familles de gènes présentes dans les agents pathogènes comprennent des membres de la famille des gènes PF07598 : également appelées protéines modulatrices de la virulence (VM) et des gènes PF13855 codant pour des protéines contenant une répétition riche en leucine (LRR). Les gènes codant pour LRR : sont présents dans les agents pathogènes *Leptospira kmetyi* et *Leptospira alexanderi* en 2 et 3 copies, plus de 5 copies de ce genre sont présentes chez les souches pathogènes, leur nombre augmente avec la virulence, il est de 34 copies chez *Leptospira weilii*. Des gènes codant pour des protéines contenant des LRR sont également présents dans les gènes saprophytes, les espèces intermédiaires en ont 1 ou 2 exemplaires (Picardeau, 2017)
- Les gènes codant pour les protéines contenant le domaine WGR (PF05406) et des peptidases (PF03413, PF07504, PF02868 et PF01447), les Sphingomyélinases (SMase) et les enzymes extracellulaires protéolytiques, telles que la collagénase et les thermolysines, sont spécifiques aux leptospires pathogènes.
- Les gènes nécessaires pour la synthèse de la vitamine B12 (y compris le groupe cobI et cobIII) 18 et de l'acide sialique, qui peuvent être utilisés pour la modification de protéines exposées en surface 100, sont présents dans les génomes de certaines espèces pathogènes uniquement.
- LipL32, qui est la lipoprotéine la plus abondante est présente dans les espèces pathogènes et intermédiaires.
- Le gène spécifique pour la Loa22, la seconde lipoprotéine la plus abondante dans la paroi est présente uniquement chez les bactéries virulentes.
- LigB est une multifonction lipoprotéine de surface retrouvée uniquement en cas de virulence.

- Les autres protéines comme LigA et LigC, ne sont pas conservées dans tous les agents pathogènes et intermédiaires.
- L'hème oxygénase (HO), gène retrouvé chez toutes les leptospires qui sert à l'assimilation du fer.
- Les enzymes qui neutralisent les dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) dans les bactéries comprennent les superoxydes dismutases (SOD), la peroxydase et la catalase. Les gènes qui codent pour ces enzymes sont distribués de manière différentielle dans les agents pathogènes, intermédiaires et saprophytes.
- Les agents pathogènes, à l'exception de *L. kmetyi*, et de certains intermédiaires, ont des systèmes CRISPR – Cas 9. Voir figure 4 e ci-dessous

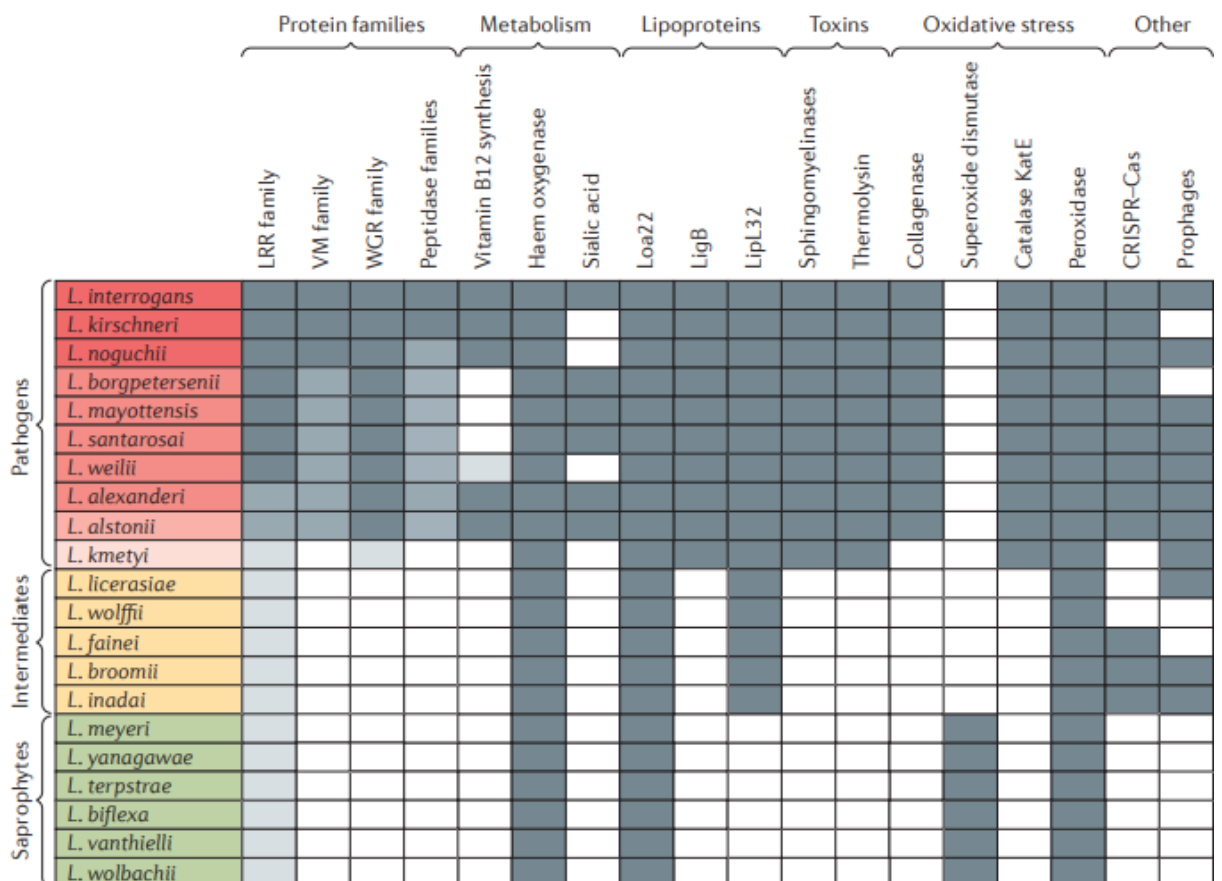


Figure 4 Distribution des gènes associés à la virulence chez des leptospires pathogènes, intermédiaires et saprophytes (Picardeau,2017)

Chaque ligne de la figure 4 représente le génome d'une espèce. Les espèces sont regroupées et colorées pour indiquer leur sous-groupe : agents pathogènes (sous-groupes I – IV), intermédiaires et saprophytes. Les cases

grises indiquent la présence du gène codant respectif ou famille de gènes, plus la nuance de gris est sombre, plus le nombre de copies du gène codant est élevé. Les cases blanches indiquent l'absence d'homologue *Leptospira*.

L'infection par les leptospires se fait en plusieurs étapes et dépend de la relation hôte-sérovar (Picardeau, 2017)

- Phase de contamination : Pénétration de la bactérie dans l'organisme, passage à travers les muqueuses
- Phase de dissémination : migration vers le compartiment sanguin vasculaire phase de leptospirémie ou d'incubation
- Phase de multiplication: les bactéries se multiplient dans les organes cibles (foie, reins) avec vascularite généralisée. Dysfonctionnement des hépatocytes, apparition d'ictère et des manifestations hémorragiques et d'insuffisance rénale (tubulonéphrite interstitielle)
- Phase de localisation : En présence de système immunitaire compétent, l'infection continue à évoluer dans des tissus immunologiquement protégés comme tubules rénaux, lumière utérine, le système nerveux central
- Phase d'excrétion urinaire
- Phase de guérison

Chapitre II Epidémiologie

II.1. Epidémiologie descriptive

II.1.1. Formes épidémiologiques

La leptospirose est une anthroponose causée par plusieurs sérogroupes pathogènes du genre *Leptospira*, endémique avec des épisodes épidémiques en Algérie (Afiri et al., 2004).

II.1.2. Fréquence de la leptospirose

II.1.2.A Prévalence Humaine

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que l'incidence des cas sévères est de un millions de cas par an avec près de 59 000 décès par an (DHCPP, 2017). La maladie serait émergente dans les pays en développement et en Afrique (de Vries et al., 2014).

La synthèse des publications concernant la leptospirose humaine et animale menées en Afrique a été publiée dans un papier récent, qui a recensé 97 publications confondues sur 26 pays africains de Allan et al (2015) , voir figure 5 ci-dessous.

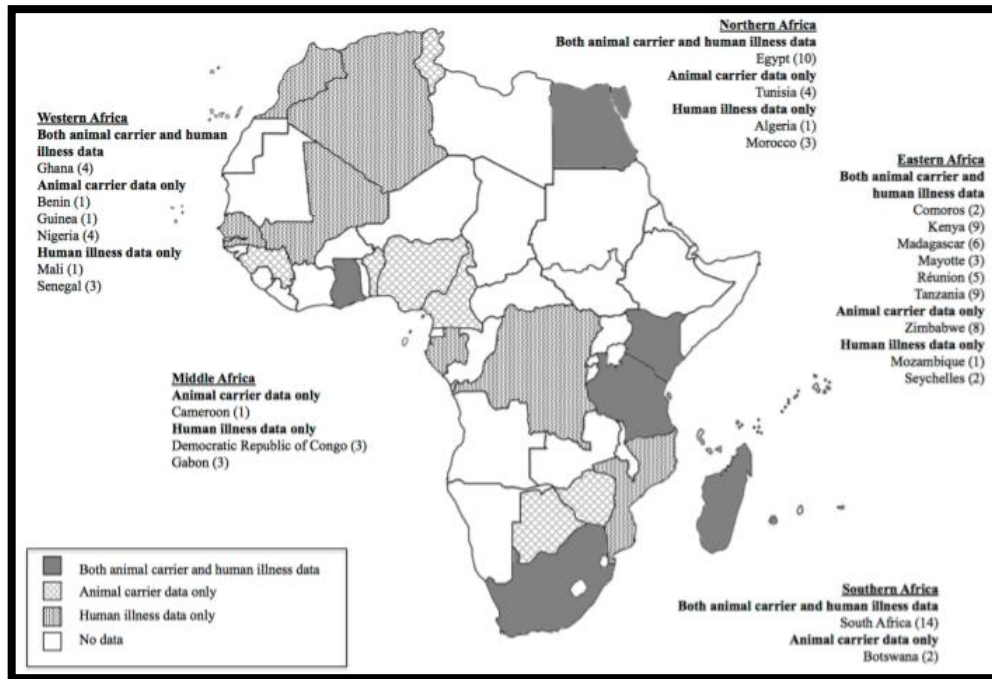


Figure 5 Répartition géographique de la leptospirose confirmée humaine et animale en Afrique (Allan et al., 2015)

Selon le rapport (WHO, 2010) du LERG (Leptospirosis burden Epidemiology Reference Group), groupe de travail international chargé d'évaluer l'impact global de la maladie sous l'égide de l'Organisation Mondiale de la Santé, le taux de mortalité des formes cliniques graves était de près de 10% des cas.

Les patients malades avec de syndromes fébriles se sont révélés dans 20% des cas atteints de leptospirose selon une étude Thaïlandaise, alors qu'elle varie de 10 % jusqu'à près de 60 % dans l'Afrique sub-Saharienne (de Vries et al., 2014)

II.1.2. B Prévalence Animale

Une synthèse des principales études rapportant des cas confirmés de Leptospirose animale en Afrique, depuis les années 2000 est rapportée dans le Tableau 2 ci-dessous

Tableau 2 Synthèse des études rapportant des cas confirmés de Leptospirose animale en Afrique, depuis les années 2000

Citation	Pays	Test utilisé	Espèce animale	Nombre d'animaux testés	Prevalence %
Machang'u et al., 2002, 2004	Tanzanie	Culture sur urine	rat de Gambie Cricetomys gambianus	83	8 (9.6%)
Taylor et al., 2008	Afrique du sud	PCR (rein), genes (rrs)	rat brun Rattus norvegicus	63	8 (12.7%)
			souris (Mus musculus)	2	1 (50.0%)
			Rat noir (Rattus rattus)	2	1 (50.0%)
Zimmermann et al., 2007	Guinée	PCR (rein)	Rogeurs	330	5 (1.5%)
Mgode et al., 2005	Tanzanie	PCR (rein)	Souris (Mastomys spp.)	18	PCR : 1 (6.3%)
		Culture (rein)	Musaraignes (Crocidura spp.)	7	PCR : 2 (28.6%) Culture : 2 (28.6%)

Felt et al., 2011	Egypte	PCR (rein)	Rat noir (Rattus rattus)	100	PCR : 11 (11%)
		Culture (rein, urine, sang)			Culture : 4 (4.0%)
Desvars et al., 2012	Ile de Mayotte	qPCR (rein)	Rat noir (Rattus rattus)	141	42 (29.8%)
Kessy et al., 2009	Tanzanie	Culture (rein et urine)	Porc (Sus scrofa domesticus)	236	2 (0.8%)
Halliday et al., 2013	Kenya	qPCR (rein)	Souris (Mus musculus)	194	37 (19.1%)
			Rat brun (Rattus norvegicus)	10	1 (10.0%)
			Rat noir (Rattus rattus)	33	3 (9.1%)
Rahelinirina et al., 2010	Madagascar	Culture (rein et urine)	Souris (Mus musculus)	55	PCR : 5 (10.0%) Culture : 0 (0%)
			Rat brun (Rattus norvegicus)	96	PCR : 39 (40.6%) Culture : 6 (6.3%)
		qPCR (rein et urine)	Rat noir (Rattus rattus)	94	PCR : 27 (28.7%) Culture : 3 (3.2%)
			Musaraigne (Suncus)	23	PCR : 10 (43.5%) Culture : 0

			murinus)		
Desvars et al., 2013	Ile de la Réunion	qPCR (rein)	Souris (Mus musculus)	13	11 (84.6%)
			Rat noir (Rattus rattus)	76	50 (65.8%)
			Rat brun (Rattus norvegicus)	6	4 (66.6%)
			Musaraigne (Suncus murinus)	48	15 (31.2%)
			Chiens (Canis lupis familiaris)	24	7 (29.2%)
			Chats (Felis catus)	21	6 (28.6%)
			Bovin (Bos sp.)	77	14 (18.2%)
			Caprin (Capra aegagrus hircus)	49	13 (26.5%)
			Cerf (Rusa timorensis)	32	6 (18.8%)
			Cochon (Sus scrofa domesticus)	83	13 (15.6%)
			Chauve souris (Mormopterus francoismoutoui)	2	2 (100%)
			Houemenou et al., 2013	Bénin	qPCR (rein)
Rat brun (Rattus norvegicus)	11	3 (27.3%)			
Rat noir (Rattus rattus)	60	8 (13.3%)			

			Musaraigne africaine (Crocidura olivierii)	6	1 (16.7%)
			Musaraignes (Crocidura spp.)	1	1 (100%)
Jobbins et al., 2013	Botswana	PCR (rein)	Banded mongoose (Mungos mungo)	41	17 (41.4%)
			Mongouste (Paracynictis selousi)	1	1 (100.0%)
Dietrich et al., 2014	Madagascar	qPCR (organes)	Petit rat à queue touffue (Eliurus minor)	112	32 (28.6%)
			Tangue (Microgale cowani)	72	2 (2.8%)
			Musaraigne (Microgale dobsoni)	54	3 (5.6%)
			le Microgale (Microgale longicaudata)	12	1 (8.3%)
			Microgales (Microgale majori)	10	2 (20.0%)
			Microgale (Microgale principula)	6	2 (33.3%)
			Tenrec zébré (Hemicentetes semispinosus)	4	1 (25.0%)

			Tenrec zébré (Hemicentetes nigriceps)	12	1 (8.3%)
			Chauve souris	NA	6 (NA)
Nimo Paintsil et al., 2013	Ghana	PCR (reins)	Crocidura sp.	NA	1 (NA)
Yahiaoui et al., 2018	Algérie (Alger)	MAT	Bovin Chiens Ovin Rats	46 24 10 10	14 (30, 43%) 1(20%) 2 (4, 16%) 1 (10%)
Derdour et al., 2017	Algérie (Alger)	ELISA L. Hardjo	Bovin	360	14 (3.89% IC 1.89– 5.89)
Zaidi et al., 2018	Algérie (Alger)	PCR (reins)	Chiens errant Chats errant	104 71	5(2.68% - 4.8%) 0
Lucchese et al., 2016	Maroc	MAT	Bovins	88	8 (9.09%)
Benkirane et al., 2014	Maroc	MAT	Chiens Bovins Ovins Caprins Ânes	90 126 28 30 15	19 (21%) 19 (15%) 5 (18%) 6 (20%) 3 (20%)
Khamassi Khou et al.,2010	Tunisie Région d'El Fahs	MAT	Ovins	182	45 (25%)
Khamassi Khou et al.,2017	Tunisie Région de Mateur	MAT	Bovins	119	89(74.8 %±7.8)

II.2. Epidémiologie analytique

II.2.1. Schéma épidémiologique

La Leptospirose est à la fois zoonose et maladie environnementale, son schéma épidémiologique est donc particulièrement complexe.

II.2.1.1. Réservoirs

II.2.1.1.a. Réservoir animal

On distingue généralement deux catégories d'hôtes animaux (homme y compris) dans l'épidémiologie de la leptospirose :

- Les hôtes accidentels sont sensibles à la maladie, avec des signes cliniques allant de bénins à mortels.
- Les hôtes réservoirs sont asymptomatiques et excréteurs chroniques.

Le portage des rongeurs est asymptomatique. En effet, l'étude récente menée par le Laboratoire de Leptospores de VetAgro Sup, d'inoculation de leptospores à des rats : *Rattus norvegicus* par différentes voies (muqueuse, sous-cutanée et intrapéritonéale) n'a engendré aucun symptôme clinique ou perte de poids aux sujets. Le portage rénal varie selon la voie d'inoculation. Les deux voies d'inoculation par voie intra-musculaire et ou sous cutanée correspondant respectivement dans la nature à : la contamination du rat par l'environnement (telle que la consommation d'eau contaminée et les projections d'eau dans les muqueuses) ou par morsure (Zilbere al., 2016).

Les sérovars sont généralement associés à une espèce de maintien donnée (rongeurs, insectivores, chiens, bovins). Certains sérovars sont adaptés à plusieurs hôtes, et un hôte peut être porteur de plusieurs sérovars (voir tableau 3 ci-dessous).

**Tableau 3 Hôtes réservoirs typiques des sérovars communs de
Leptospira (Bharti et al., 2003)**

Hôte réservoir	Sérovar(s)
Porc	Pomona, Tarassovi
Bovin	Hardjo, Pomona
Cheval	Bratislava
Chien	Canicola
Mouton	Hardjo
Cerfs	Hardjo
Raton laveur	Grippotyphosa
Rat	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Souris	Ballum, Arborea, Bim
Marsupial	Grippotyphosa
Chauve-souris	Cynopteri, Wolffi

II.2.1.1.b. Réservoir environnemental

La survie des leptospires est possible à pH très variables mais elle est plus longue dans les milieux alcalins qu'acides.

A des pH inférieurs à 7, la survie varie de 10 à 117 jours. A un pH supérieur, elle peut aller de 21 jusqu'à 152 jours (Gordon et Turner , 1961).

Les leptospires présentent une sensibilité aux agents physico-chimiques : la dessiccation, les rayons ultraviolets et les détergents qui entraînent la destruction de la membrane externe, ainsi la désinfection classique et l'usage d'antiseptiques sont de bons moyens de destruction des bactéries.

Des températures très basses sont tolérées : par exemple lors de cryoconservation (-70°C) dans l'azote liquide, ou de biopsies congelées (-20°C). Les températures de survie maximale sont d'environ 37°C (Holzapfel, 2014).

II.2.1.2. Matières virulentes

L'urine est la principale matière virulente. L'excrétion urinaire est donc la principale source de contamination de l'environnement (Barragan, et al., 2017).

La durée et l'intensité de l'excrétion urinaire de leptospires vont être fonction notamment des sérovars impliqués mais aussi de l'espèce et de l'âge de l'animal impliqué et des traitements ou vaccination éventuelle des animaux.

Une récente étude (Barragan, et al., 2016) a révélé que 35.4% des bovins dans la région de Manabi étaient excréteurs urinaires et que le bovin était la source principale de la contamination de l'environnement dans certaines zones rurales.

L'Excrétion urinaires des leptospires varie selon l'espèce animale infectée (Barragan, et al., 2017) voir figure 6 ci-dessous

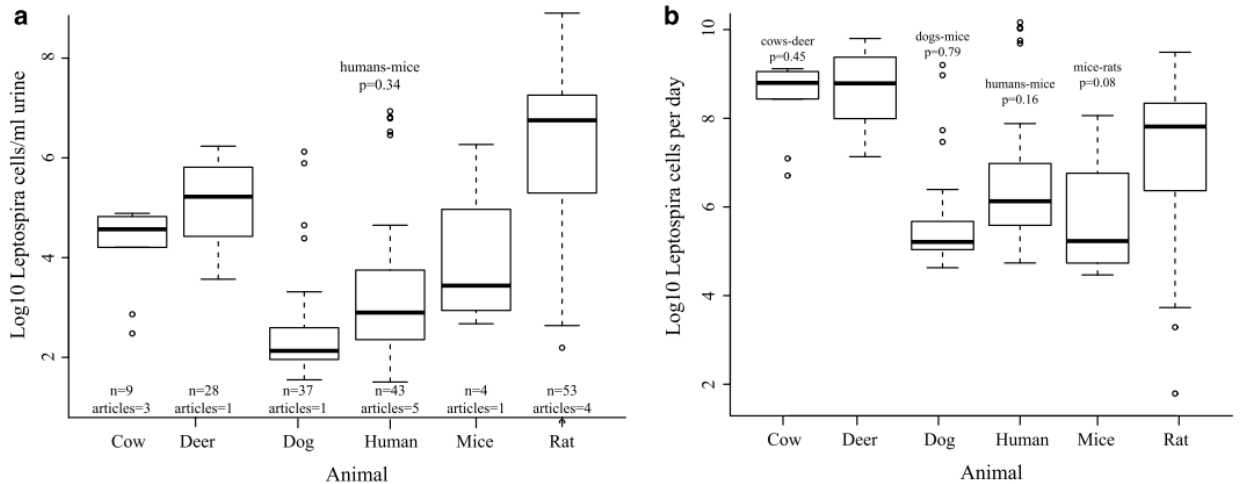


Figure 6 Excrétion urinaires des leptospires selon l'espèce infectée par ml d'urine (a) et par jour (b) (Barragan, et al., 2017)

- La quantité de Leptospires excrétée par millilitre d'urine est significativement différente selon l'espèce animale.
- La quantité journalière excrétée par les bovins et cerfs est significativement plus élevée que celle des chiens, humains, souris, et rongeurs.
- Alors qu'il n'y a pas de différence significative dans la quantité journalière d'excrétion entre bovins et cerfs, chiens et souris, humain et souris et puis rongeurs et souris.

Le bovin excréteur urinaire joue un rôle important dans la contamination de l'environnement rural comme en témoigne les résultats de l'étude (voir le tableau 4 ci-dessous). Cette quantité peut atteindre les 1.96×10^{10} leptospires /jour et par M² en stabulation permanente en hors sol (Barragan, et al., 2017).

Tableau 4 Contribution journalière de la contamination de l'environnement rural par le bovin l'excrétion urinaire en Manabi (Barragan, et al., 2017)

Grazing area	Number of properties	Number of cattle Total (Min–Max)	Quantity of <i>Leptospira</i> shed per m ² Total (Min–Max)
No grazing area	18	91(1–20)	1.96×10^{10} cell/day
0.35 to 1 ha	9	26 (2–5)	4.2×10^4 to 1.5×10^5
>1 to 5 ha	30	219 (1–40)	4.9×10^3 to 4.2×10^5
>5 to 10 ha	10	176 (2–70)	5.9×10^3 to 1.5×10^5
More than 10 ha	10	354 (12–80)	9.2×10^3 to 4×10^4

II.2.1.3. Modes de contamination

La contamination de l'homme ou des animaux par des leptospires peut se faire de deux façons : directe par contact avec un animal excréteur ou indirect par le biais de l'environnement contaminé.

La transmission s'effectue à l'issue de passage de leptospires vivants à travers des muqueuses saines, mais aussi de la peau, généralement à travers les microlésions (excrétion, ou peau macérée dans l'eau) (Barragan et al., 2017).

Les deux transmissions: horizontale ou verticale sont possibles.

La transmission au fœtus est possible in utero ou par le biais d'ingestion de lait (Little et al, 1987, State et al, 2012 , de Vries et al, 2014). Il est cependant à noter que la chute de production laitière limite l'impact de transmission par le lait.

La contamination naturelle peut se faire par l'environnement (exemple projections d'eau contaminée dans les muqueuses) ou par morsure d'un rat (Zilbere al., 2016).

Pour le bétail, la contamination se produit lors de la stabulation ou au pâturage, ou même en salle de traite dans les cas des troupeaux laitiers, ces contacts entre animaux se font par l'intermédiaire d'aérosols, l'urine par exemple, qui vont également à la transmission des leptospires d'un animal infecté à un animal sain (Barragan, et al., 2017).

L'homme se contamine le plus souvent par exposition à un environnement contaminé, lors :

- Activité professionnelle: la leptospirose est considérée comme une maladie professionnelle dans certains pays , qui touche des professions a risque ex: égoutiers, éboueurs, vétérinaires, éleveur , techniciens de laboratoires
- d'activités de loisir en plein air comme les baignades , contact avec les animaux comme chiens ou chevaux malades, avec contamination directe (Forstinus et al, 2016, Aviat et al , 2004, OIE, 2005)
- dans son environnement rural , surtout quand les conditions socioéconomiques sont difficiles

II.2.2. Facteurs de risque

II.2.2.a Facteur géographique

La leptospirose est une maladie, retrouvée sur tous les continents à part l'Antarctique, expérimentalement elle infecte tous les mammifères (Scolamacchia et al,2010 , Adler et al, 2011 , Ayrat et al, 2015).

La prévalence est plus élevée en régions tropicales et tempérées et dans les pays sous-développés (Musso et La Scola, 2013,Picardeau, 2013).

II.2.2.b Facteurs environnementaux

II.2.2.c Facteur de saisonnalité

La majorité des études ont révélé que:

- Dans les zones de climat tempéré: comme le climat méditerranéen , la répartition des cas au cours des saisons était uniforme au printemps, en été et en automne, alors qu'une faible incidence était observée en hiver (Hazart et al 2010).
- Dans les zones de climat tropical: la répartition des cas est essentiellement pendant la saison humide (Picardeau, 2013, Dreyfus et al , 2016).

II.2.2.d. Facteurs individuels

Une étude menée au Sri Lanka en 2007, sur 147 cas humains de leptospirose a révélé que le sexe ratio était de 3 pour 1 pour les hommes et que la tranche d'âge la plus exposée était celle des travailleurs (Dassanayake et al, 2009).

Une enquête épidémiologique menée en 2009 en Nouvelle Calédonie, région tempérée où la leptospirose sévit fortement. L'étude a analysé 143 prélèvements par la technique de MAT issus d'espèces domestiques et sauvages dans le but d'évaluer les facteurs de risque tels que l'âge et le sexe chez différentes espèces animales. Elle a révélé qu'il n'y avait pas de différence significative dans la prévalence de la maladie selon le sexe ou l'âge (chez les espèces animales : bovins, chevaux et chiens) dans la région (Roqueplo et al 2013).

Une étude par MAT, a révélé que le bovin âgé de plus de 4 ans présentait une plus forte prévalence (prévalence 20.00%) que les bovins âgés de moins de 4 ans (prévalence 4.76%) (Patel et al, 2015).

Néanmoins l'étude de Zaidi et al (2018), réalisée sur 104 chiens errants d'Alger par PCR a révélé que les chiens de moins d'un an présentaient une prévalence significativement plus importante (16.46% - 29.41%) que les chiens adultes (16.46% - 29.41%).

Une étude menée en Turquie (Çetinkaya et al 2000) sur 473 prélèvements d'urine de bovin au niveau de trois abattoirs différents pour une recherche par PCR n'a révélé aucune différence significative de prévalence 3.6% (9/250) chez les mâles et 4.5% (10/223) chez les femelles.

Chapitre III. Diagnostic et prophylaxie

III.1. éléments de suspicion

III.1. A Aspect épidémiologiques

(Revoir Facteurs de risque cités précédemment)

III.1. B Aspect cliniques

Clinique de la leptospirose humaine

L'étude de Peric et al (2005) qui a analysé les signes clinique de 270 patients atteints de leptospirose en Croatie entre 1969 et 2003 a révélé que les symptômes les plus fréquents étaient : De la fièvre 100% , vomissements 79%, myalgie 77%, jaunisse 62%, méningite aseptique 60% , hépatomégalie 52% , insuffisance rénale 40%, diarrhée 44%, suffusion conjonctivale 26% , démangeaison de la peau 8% et épistaxis 5%.

L'étude de Saltoglu et al (1997) a révélé que les signes cliniques prédominants étaient l'ictère (91,6%), l'hépatomégalie (41,6%), la dyspnée (25%), la suffusion conjonctivale (33%) et la rigidité nucale (33%).

Clinique de la leptospirose animale

Concernant la maladie nous devons distinguer deux formes cliniques distinctes qui dépendent essentiellement de l'espèce animale et de sa sensibilité ainsi que du sérovar infectant autrement dit de la relation hôte-sérovar.

Le tableau 5 ci-dessous résume la différence entre les deux formes cliniques

Tableau 5 Forme clinique de la maladie selon la relation hôte-sérovar

Forme chronique ou sub-clinique	Forme aiguë
Hôte réservoir typique du sérovars Bonne adaptation hôte-sérovar	Sérovar accidentel de l'animal Forte virulence
Génome bactérien réduit	Génome bactérien imposant
L'espèce animale infectée est le réservoir principal du sérovar	Animal infecté accidentellement
Endémique	Epidémique
Indépendante des facteurs environnementaux	Dépend des facteurs environnementaux
Faible réponse immunitaire titres d'anticorps faibles IgG prédominants	Forte réponse immunitaire: titres d'anticorps élevés IgM prédominants

Les symptômes sont d'intensité différente en fonction de la virulence des souches infectantes vis-à-vis de leur hôte et de la sensibilité individuelle des animaux touchés. Quand l'espèce animale est réservoir du sérovar infectant (hôtes réservoirs typiques des sérovars de *Leptospira*), la forme clinique exprimée est plutôt sub-clinique voir chronique.

Le bovin est principalement infecté par le sérovar hardjobovis , pour lequel il est hôte réservoir typique (Felt et al, 2011 , Tabatabaeizadeh et al , 2011 , Ryan et al, 2012 , Chideroli et al, 2016). Mais en fonction de la région géographique et des spécificités épidémiologiques locales, les bovins peuvent être infectés ou réservoirs d'une grande variété d'autres sérovars type: Pomona en inde (Patel et al, 2015) et Amérique du Nord et Australie (André-Fontaine et Kodjo , 2009), et Grippotyphosa (André-Fontaine et Kodjo , 2009) .

Quand il s'agit de bétail , il faut envisager l'infection par les leptospires à l'échelle du groupe surtout dans le cadre d'un programme de maitrise de la reproduction.

L'infection d'un troupeau peut donc être exogène lié à son environnement infecté ou par une introduction d'un bovin excréteur (André-Fontaine et Kodjo, 2009).

L'étude de Patel et al (2015), a révélé que le bovin atteint présentait les symptômes suivants dans 24.00 % des cas des mammites ou chute brutale de la production de lait 'milk drop syndrome' le lait peut prendre une teinte rosée , des avortements (20 %), de la fièvre (14.81%), ou des retours en chaleur (11.76%) ou de anorexie (5.88%).

III.1. C Aspect lésionnel

Une étude anatomo-pathologiques de l'équipe de Kuzembekova, étalée sur deux ans 2010-2012 portant sur les lésions morphologiques de cas confirmés de leptospirose bovine (Kuzembekova et al,2014), a révélé que, dans la majorité des cas on retrouve :

- des hémorragies et des pétéchies au niveau de la peau, muqueuses, séreuses et sur les parenchymes
- les membranes de tous les organes avaient un aspect huileux, laissant exsuder une sérosité et décoloré en jaune
- sur le plan cutané, on observe une décoloration jaunâtre
- le tissu sous-cutané si on coupe aura un aspect gélatineux toujours ictérique.
- les muscles seront flasques décolorés en jaune
- on retrouvera des lymphadénites et hypertrophies ganglionnaires diverses
- le péritoine, omentum et mésentère auront une couleur ictérique
- le foie paraît normal mais son parenchyme est d'aspect jaune.
- La vésicule biliaire a un aspect caractéristique : elle est distendue par une bile pâteuse de couleur noir brillant
- Les lésions rénales sont importantes avec aspect très hétérogène, de coloration qui varie du brun foncé au noir avec de petites zones nécrotiques plus sombres.
L'aspect flasque et tuméfié, hypertrophié et ou congestionné à hémorragique. La zone corticale est foncée et le calice est ictérique.
- la vessie va être distendue, remplie d'urine sombre ou hémorragique et on va retrouver des pétéchies et lésions hémorragiques sur sa muqueuse

Les lésions fœtales sont généralement non spécifiques et résultent essentiellement de l'autolyse. On peut observer un ictère des tissus sous-cutanés et ou des pétéchies sur la surface des poumons et du cœur suite à l'hypoxie.

L'histologie révèle des lésions de dégénération neuronale et de nécrose au niveau des reins par dystrophie granulaire.

Les coupes histologiques de l'équipe du Laboratoire de Référence des Leptospires de l'Institut Pasteur de Paris, d'organes (foie et reins) de cobaye infecté expérimentalement dans le cadre de l'étude de virulence d'une souche pathogène (*Leptospira interrogans* sérovar Lai séro groupe Icterohaemorrhagiae) se sont révélées ainsi voir figure 7 ci-dessous (Ristow et al. 2007).

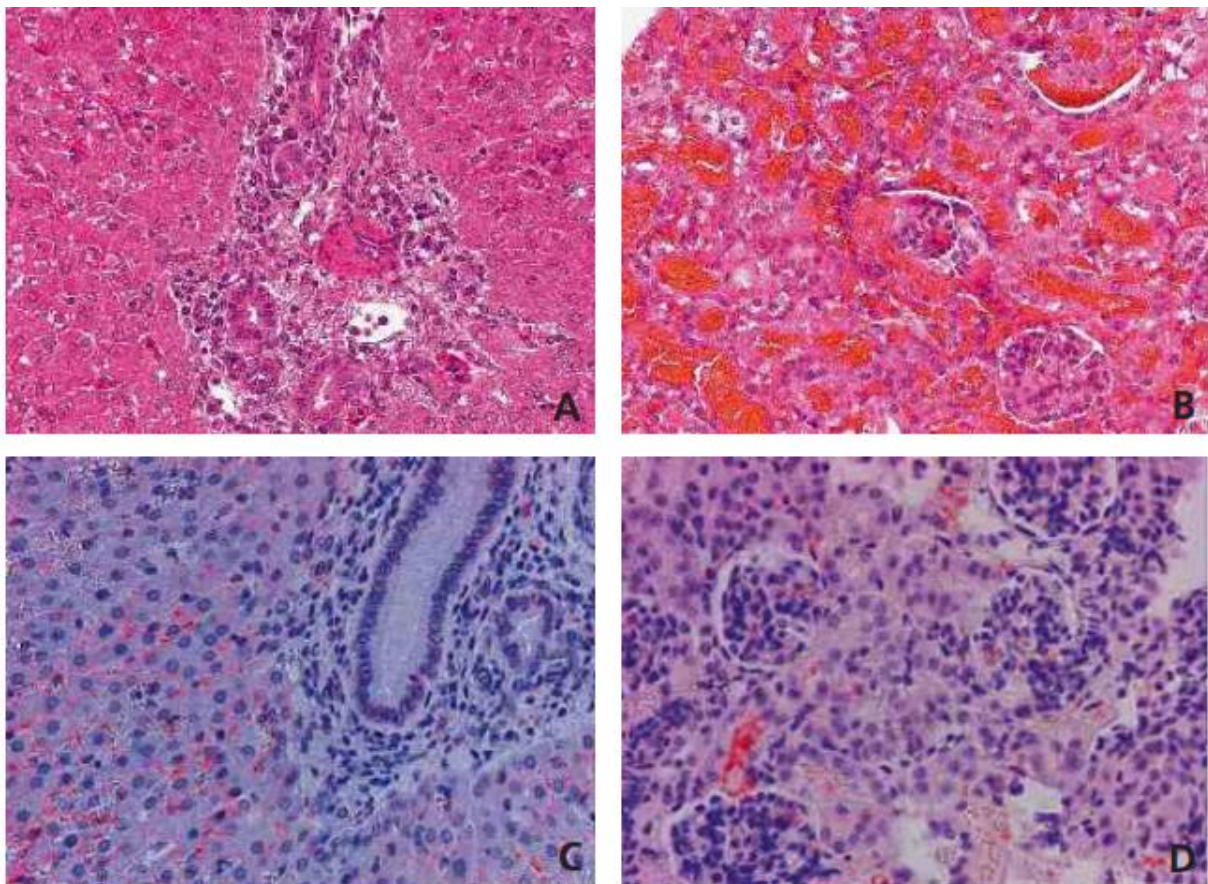


Figure 7 Coupes histologiques d'organes de cobaye infecté par *L. interrogans* sérovar Lai (grossissement X 200) (Ristow et al. 2007).

A, le foie présente une importante inflammation lymphoplasmocytaire périportale, des hépatocytes nécrosés et des cellules de Kupffer dilatées. La perte de l'architecture linéaire des hépatocytes est aussi marquée (hématoxyline éosine). B, les reins présentent des lésions typiques de leptospirose caractérisées par des hémorragies diffuses du cortex, une nécrose tubulaire et des infiltrats lymphoplasmocytaires (hématoxyline éosine).

C, l'immunohistochimie avec des anticorps spécifiques dirigés contre la protéine Loa22 révèle de nombreux leptospires (colorés en rouge) dans les canalicules biliaires. D, elle révèle aussi la distribution diffuse des bactéries (colorées en rouge) dans les glomérules du rein et en plus grand nombre dans les tubules proximaux. L'expression in vivo de la protéine Loa22, essentielle pour la virulence des leptospires, est ainsi démontrée par l'histochimie dans le rein et le foie chez le cobaye (grossissement X 200).

III.2. Méthodes de diagnostic de laboratoire

III.2.1. Diagnostic direct

III.2.1.1. L'observation microscopique directe

Utiliser pour l'observation microscopique des leptospires, un microscope pourvu d'un condenseur à fond noir (Bharti et al., 2003).

Cet examen peut être réalisé durant la première semaine suivant l'apparition des symptômes à partir de sang, puis plus tard sur prélèvement d'urine, des broyats de tissus rénaux, et des produits de culture. Les leptospires apparaissent comme des filaments grêles avec les extrémités très mobiles .

Cette technique présente cependant de nombreuses difficultés :

- Elle nécessite un prélèvement très frais.
- Elle ne permet pas de différencier les leptospires pathogènes des leptospires saprophytes.
- Elle est dépendante de l'excrétion des leptospires.
- Son seuil de détection élevé et sa faible sensibilité.

Une étude de Bhatia et al (2015) , menée sur une centaine de patients hospitalisés pour une leptospirose visant à évaluer plusieurs techniques de diagnostic directs (observation sous microscope à fond noir et culture), et indirects (Kits de sérologie) n'a obtenu aucun examen positif par observation microscopique concluant que c'est un test peu sensible .

Pour l'ensemble de ces raisons, cet examen est plus à considérer comme un examen d'orientation et doit toujours être confirmé par une culture bactériologique et associé à une autre technique plus sensible.

III.2.1.2. Culture

Les leptospires peuvent être isolés à partir du sang de l'animal durant la phase de bactériémie, mais également plus tard à partir de l'urine quand l'animal est excréteur urinaire. La culture est possible à partir d'organe principalement le rein et le foie ou encore avorton, fœtus glande mammaire.

Les prélèvements doivent être réalisés dans des conditions de stérilité strictes et avant toute antibiothérapie. Ils sont placés dans du milieu EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) le plus vite possible (Tableau 10 Etapes de culture bactérienne des leptospires à partir d'organes et d'urine).

III.2.1.3. Techniques de biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire reposent sur la détection du génome bactérien, par PCR classique ou PCR en temps réel.

Ce sont des techniques spécifiques rapides (de 24-48 heures pour la PCR classique jusqu'au moins de 3 heures pour la qPCR) et sensibles avec un seuil de détection intéressant, dès 21.8 pg et 1×10^3 leptospires/ml pour une multiplex PCR selon Ahmed et al (2012).

Différents gènes spécifiques de leptospires pathogènes ont été ciblés pour cette méthode.

Certains correspondent à des gènes non spécifiques aux leptospires comme le gène virulent codant pour l'unité 16S de rARN gène, ou Le gène ribosomal rrl, codant pour l'ARN 23S.

D'autres correspondent à des gènes codant pour des protéines de la famille des immunoglobulines protéines de la membrane externe les leptospires pathogènes (lig 1 et 2), ou pour lipL32/hap1. Le gène codant pour l'Haemolysin Associated Protein (HAP1) spécifiques à l'espèce pathogène *Leptospira interrogans* sl (PCR HAP1).

La différence entre ces techniques réside dans le choix des amorces utilisées (HAS, 2011).

III.2.2.Diagnostic indirect

III.2.2.1. Test de micro agglutination(MAT)

Il s'agit de la méthode de référence utilisée pour le diagnostic de la leptospirose décrite ultérieurement (Etude 1: Identification des sérovars circulant dans quelques élevages mixte d'Alger).

Les antigènes lipopolyosidiques impliqués dans le MAT sont essentiellement les LipL32, LipL41(André-Fontaine et Kodjo , 2009) .

Les anticorps agglutinants sont présents dans le sérum dès 7 à 15jours après l'infection. Cette méthode est donc relativement tardive.

La technique reste subjective dépendante de l'opérateur et de la cinétique d'anticorps (Picardeau et al,2014).

La MAT détermine le titre sérique des anticorps antileptospires sans distinction entre IgM et IgG, en conséquence sans distinction entre anticorps d'origine vaccinale et anticorps postinfectieux. , ou maladie récente ou chronique (Kodjo, 2017).

III.2.2.2. Autres tests de diagnostic indirect

Il existe une multitude de tests sérologiques pour le diagnostic des leptospires à utiliser en fonction de l'espèce animale et des objectifs (Faine et al 1999, Levett 2001).

Le Tableau 6 ci-dessous récapitule la liste des tests de diagnostic indirect des leptospires autres que le MAT.

Les kits commercialisés sont dirigés contre un ou quelques sérovar et sont spécifiques à une espèce animale.

Certains laboratoires de références fabriquent eux même des ELISAs dites maison selon les besoins recherchés, contre certains sérogroupes et spécifiques de l'espèce animale à diagnostiquer.

Chaque test, à son avantage et sa spécificité. L'ELISA IgM anti-leptospires permet lors d'une suspicion d'une forme aigue voir suraiguë une meilleur sensibilité que le MAT les premières heures après l'infection (Dorjee, 2007).En effet, les IgM sont produites par l'organisme dès la période d'incubation de la

maladie et baissent à partir du deuxième mois post-infection, quand les IgG prennent le relais dans la courbe de la cinétique.

Tableau 6 Tests de diagnostic indirect des leptospires (autres que le MAT)

Test	Espèce	Référence
ELISA IgM et IgG, sérum	Chien	Hartman et al 1984
ELISA IgG, sérum	Bovin	El Jalii et al 2008
ELISA IgM	Humain et chien	Slack et al 2007
ELISA urine	Bovin	Suwimonteerabutr et al 2005
ELISA IgM sur salive	Humain	Silva et al 1992
ELISA IgM sur LCR	Humain	Silva et al 1996
Test Macroscopic slide agglutination	Humain	Brandão et al 1998
Test agglutination sur latex	Humain Bovin	Smits et al 2000 Senthilkumar et al 2010
Immunohistochimie	Toutes les espèces	Shearer et al 2014
Immunofluorescence d'anticorps	Toutes les espèces	Wagenaar 2000
Test one-point microcapsule agglutination (MCAT)	Humain	Arimitsu et al, 1994
Technique du Quantitative Buffy Coat (QBC)	Humain	Kramer et al 1994
Hémagglutination indirecte	Humain	Bajani et al 2003
Dipstick	Humain	Smits et al 2000
Test rapide immunochromatographique de détection d'IgM	Chien	Kodjo et al, 2016

III.3. Traitement et prophylaxie

III.3.1.Traitement

L'objectif du traitement antibiotique est d'éviter les lésions graves hépatiques et rénales lors de la forme aiguë.

Le traitement antibiotique sera d'autant plus efficace qu'il sera mis en place rapidement après le début de l'infection. Alors que l'antibiothérapie lors de la forme sub-clinique et chronique d'expression clinique modérée a comme but de limiter l'excrétion urinaire du troupeau. Dans ce cas, il est plus judicieux de traiter l'ensemble des animaux.

Selon Charan et al (2013), les leptospires sont sensibles à divers agents antimicrobiens, notamment la pénicilline, les aminosides, les tétracyclines et les macrolides. Néanmoins il n'y aurait pas d'avantage significatif avec l'utilisation des pénicillines chez les patients humains hospitalisés lors de l'étude.

Chez le bovin, une étude de Alt et al (2001), a prouvé que tous les traitements suivants étaient efficaces pour stopper l'excrétion urinaire chez le bétail infecté expérimentalement par *Leptospira borgpetersenii* sérovar hardjo : une injection unique d'oxytétracycline (20 mg / kg [9 mg / lb] de poids corporel, IM), de tilmicosine (10 mg / kg [4,5 mg / lb], SC), ou une association dihydrostreptomycine-pénicilline G (25 mg / kg [11,4 mg / lb], IM) ou de multiples injections de ceftiofur sodique (2,2 ou 5 mg / kg [1 ou 2,3 mg / lb], IM, une fois par jour pendant 5 jours, ou 20 mg / kg, IM, une fois par jour pendant 3 jours) .

La lutte contre les leptospiroses comprend donc un volet thérapeutique mais, pour diminuer la pression épidémiologique dans l'environnement des animaux infectés, il faut y associer une prophylaxie aussi bien sanitaire que médicale.

III.3.2.Prophylaxie

La prophylaxie comprend à la fois un volet sanitaire et un volet médical qu'il est nécessaire d'associer pour envisager mettre en place une protection efficace contre la leptospirose.

III.3.2.a. Prophylaxie sanitaire

Dans le cas d'élevage infecté, dans un premier temps, il va être nécessaire de mettre en place une lutte active contre les animaux porteurs pour éviter que ces animaux ne transmettent la maladie.

Tout d'abord, il va falloir isoler les animaux porteurs excréteurs (Faine, 1999).

Dans un second temps, la lutte doit se porter sur l'élimination des réservoirs de la maladie représentés par les espèces de la faune sauvage. La lutte contre les petits mammifères va permettre de limiter le risque de contamination des bovins et va aussi faire diminuer la pression infectieuse dans l'environnement et notamment dans l'environnement hydrique. Les voies de lutte contre ces réservoirs sont de façon pratique des campagnes de dératisation ou de désinfection de l'environnement.

Il va être aussi nécessaire de gérer l'environnement, source de persistance des bactéries excrétées dans le milieu extérieur. De plus, il va falloir aussi assainir les pâtures où se trouvent des animaux excréteurs des leptospires. Cet assainissement va comprendre un drainage des pâtures puis l'épandage de substances stérilisantes telles que la chaux.

Lors d'importation de bovin laitier, des dépistages sérologiques doivent être envisagés afin d'étudier la possibilité d'introduction de réservoir par le biais de l'importation.

Un dernier aspect de cette prévention sanitaire correspond à l'information des acteurs qui participent au contrôle de la maladie. Il est nécessaire enfin d'alerter les populations à risque du caractère zoonotique de la maladie.

III.3.2.b. Prophylaxie médicale

Les vaccins contre la leptospirose animale ou humaine sont généralement des suspensions de bactéries tuées. Leur but est de permettre la production d'anticorps agglutinants dirigés contre les antigènes de la membrane externe des leptospires. Les études épidémiologiques sont indispensables afin d'adapter la composition du vaccin aux sérovars circulants dans la région (André-Fontaine et Kodjo , 2009) .

Dans les zones où la pression infectieuse entraînée par les leptospires est trop forte, la prophylaxie médicale s'avère très utile.

Bon nombre de pays du monde tel que : l'Amérique, l'Europe, l'Australie vaccinent le cheptel laitier contre la leptospirose, néanmoins en Algérie on ne dispose pas du vaccin et d'un protocole de prophylaxie adaptée au terrain.

Deux buts vont être recherchés lors de l'élaboration et de l'utilisation d'un vaccin : une lutte contre l'expression clinique de la maladie et une action contre l'excrétion urinaire des leptospires (André-Fontaine et al., 2000).

Les vaccins présents actuellement sur le marché impliquent à la fois une immunité humorale induite et une immunité cellulaire. Ce volet cellulaire est essentiellement apporté par les adjuvants du vaccin qui induisent pendant plusieurs mois après la vaccination une réponse de type Th1 caractérisée par la production d'interféron gamma par les cellules T. Cette réponse serait à l'origine d'une protection croisée entre sérovars (André-Fontaine et al., 2007).

Généralement, le vaccin du bétail concerne en premier lieu le séovar hardjo du sérogroupe Sejroe, en raison de son aspect enzootique, Cependant on trouve beaucoup de vaccins comportant plusieurs valences comportant les sérovars pomona, grippotyphosa, canicola, et icterohaemorrhagiae.

Partie Expérimentale

Etude I : Identification des sérovars circulant dans quelques élevages mixtes d'Alger

I.1 Introduction

Le cycle de la leptospirose est entretenu par les espèces réservoirs, essentiellement les rongeurs (Cerqueira et Picardeau 2009, Ayrat et al., 2014), mais également le bétail (Iván Méndez et al., 2014, Dorjee, 2007).

Les études épidémiologiques ont révélé que le sérotype est en relation étroite avec l'espèce animale considérée (Bharti et al., 2003, Picardeau, 2013). Des associations 'sérovar-espèce animale' dues à des adaptations des sérotypes aux espèces animales réservoirs ont été établies tel que : icterohaemorrhagiae et rats, Ballum et souris, Pomona, Tarassovi ou Bratislava et porcs, Bratislava et chevaux et Canicola et chiens (Adler et al., 2010, Roqueplo et al., 2013, Loureiro et al., 2013). Alors que le bétail est considéré comme réservoir principal de leptospires sérotypes hardjo, pomona et Grippotyphosa, même s'il est sensible aux autres sérotypes pathogènes (Dorjee, 2007).

Les études de caractérisation des leptospires circulant chez différentes espèces animales permettent de déterminer la circulation des sérotypes entre les animaux et de comprendre la dynamique de transmission (Felt et al., 2011).

L'infertilité en élevage bovin laitier est un problème de terrain très récurrent. Bon nombre de vaches laitières se retrouvent avec un motif d'abattage d'infertilité chronique au niveau des abattoirs. Les agents infectieux associés aux syndromes d'infertilité sont nombreux et la leptospirose est décrite par la littérature comme l'un d'entre eux.

Face à ce contexte épidémiologique complexe et le peu de travaux publiés décrivant les sérotypes circulants dans les régions rurales de l'algérois, nous nous sommes fixés comme objectifs la caractérisation des leptospires circulant chez différentes espèces animales des fermes du mixtes présentant des troubles de la reproduction.

La technique sérologique de Micro-agglutination (MAT) reste la technique de référence, elle permet une identification des sérogroupes (Adugna, 2016) et ainsi une caractérisation des leptospires circulants dans les régions à risque.

Une identification des sérogroupes circulant en Algérie permettra au niveau épidémiologique une meilleure compréhension et gestion de la transmission entre réservoir sauvage et bétail ainsi qu'à l'homme. Cette étude est d'autant plus importante au niveau de la prophylaxie, puisqu'il n'y a aucun vaccin commercialisé actuellement en Algérie pour le bovin.

I.2 Matériels et Méthodes

I.2.A Région et période d'étude

La région d'étude se résume à la région d'Alger (36°46'N 3°13'E) (voir figure 8 ci-dessous) Le climat de la région est de type méditerranéen selon la classification de Köppen Csa avec des étés chauds et secs mais avec des hivers doux et pluvieux. Une moyenne de précipitation de 600 millimètres par an, principalement entre Octobre et Avril. Les températures moyennes journalières varient entre 11/12 °C en Janvier, et 25/26 °C en Juillet Aout (Peel et al., 2007).

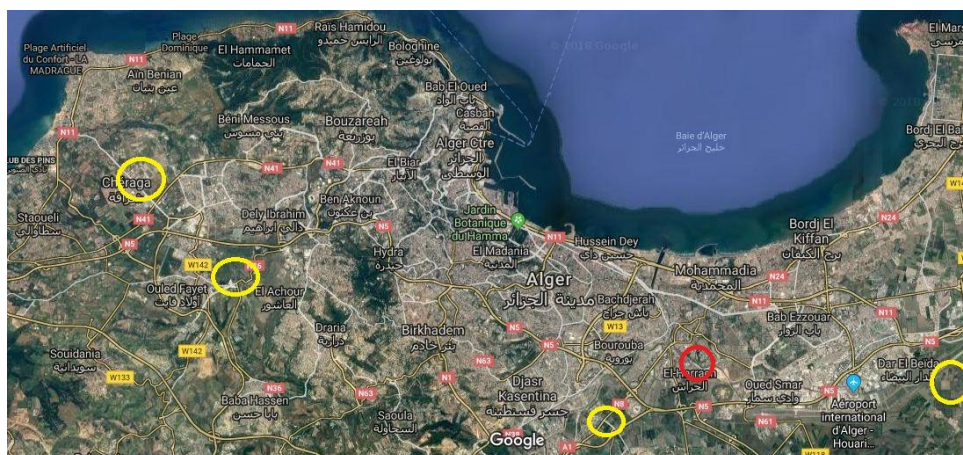


Figure 8 Cartographie de la région d'étude

Les relevés du Laboratoire des Leptospires de l'Institut Pasteur d'Alger montrent que la région d'Alger est classée au troisième rang en termes

d'incidence nationale de leptospirose humaine, après Blida et Tizi-Ouzou (alors que celle-ci est deux fois plus petite que Blida et quatre fois plus petite que Tizi-Ouzou en termes de superficie).

Son environnement rural (sol humide et températures douces), est favorable à la survie des leptospires (voir figure 9).



Figure 9 Photo prise au niveau de la ferme 1 de l'étude

L'étude a été menée entre Janvier et décembre 2015,

- de Janvier jusqu'à fin Mars pour le prélèvement des animaux et le piégeage des rongeurs
- de Mars à Décembre pour les manipulations de sérologie au laboratoire.

Critères de sélection des fermes

Quatre fermes mixtes ont été sélectionnées dans la région d'Alger remplissant les critères suivants :

- Problèmes d'infertilité des bovins laitiers (avortement, infertilité ou muqueuses ictériques).
- Fermes mixtes (présence de bovin laitier, moutons et chiens et éventuellement d'autres espèces) avec promiscuité d'espèces et contact dans les pâturages.
- Aucun programme de vaccination concernant la leptospirose n'est établie dans les fermes d'étude (entre autre pour les chiens de la ferme).
- Effectif de bovin supérieur à 20 têtes.
- Présence de pâturage.

I.2.B Matériel biologique

Nous avons ciblé les fermes mixtes (revoir critères de sélection des fermes de l'étude) afin de travailler sur plusieurs espèces animales.

Un prélèvement sanguin des animaux domestiques (bovins et ovins et chiens de l'exploitation) est réalisé sur tube sec puis centrifugé au laboratoire à 1,800 x g pendant 10 minutes et congelé à -20°C jusqu'au jour d'analyse.

Les sérums ont été congelés pour une conservation jusqu'au jour de la manipulation au laboratoire.

Quatre pièges à ressort placés dans des sites à proximité des fermes, avec des appât de tomates fraîches ou de pain, ont permis d'attraper 20 rongeurs identifiés selon des critères morphologiques comme étant des rats bruns (Rattus norvegicus).

Le choix s'est porté sur les sites avec présence possible de réseaux de galeries ou terriers dans les endroits humides. Nous avons recherché la présence d'empreintes : 5 grands doigts arrière apparents jusqu'à 3 cm, 4 petits doigts avant pouce presque absent (voir figure 10 ci-dessous).



Figure 10 Site de dépôt d'un piège (photo personnelle 2015)

Les rats piégés sont transportés à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger pour l'euthanasie et l'examen nécropsique.

- Un prélèvement sanguin destiné à la sérologie, a été effectué par ponction intracardiaque.

Un prélèvement d'organe (foie) servira de matériel biologique pour une culture bactérienne.

L'identification morphologique du rongeur : *Rattus norvegicus*, s'est fait selon les critères suivants (voir figure 11 ci-dessous) :

- couleur brune.
- longueur tête et corps 25 cm.
- queue mince, plus courte que l'ensemble du corps.
- forme et taille des crottes : noyau d'olive 10 à 15 mm.
- tête fine et pointue, oreilles petites.
- 5 grands doigts arrière jusqu'à 3 cm.



Figure 11 Identification morphologique du rongeur (photo personnelle 2015)

I.2.C Matériel de laboratoire

Le test de micro-agglutination consiste à mettre en contact le sérum du patient à tester avec des cultures de leptospires représentatives des principaux sérogroupes pathogènes appelées plus communément antigènes et qui constituent une batterie d'antigènes, puis à évaluer au microscope à fond noir le degré d'agglutination et/ou de lyse des leptospires. Le matériel de laboratoire et réactifs nécessaires à cette technique sont cités ci-dessous

- Tubes à hémolyse 5 ml non stériles.
- Filtres 0,45 µm
- Seringues 2 ml.
- Microplaques en plastique à 96 puits à fond plat présentant de bonnes qualités optiques
- Pipette et cônes rainin monocanal 20-300 µl
- Pipette 8 canaux 30-300 µl
- Pipette 12 canaux 5-50 µl.
- Microscope inversé à fond noir pour les microplaques
- Microscope à fond noir
- Etuve à +37°C.
- Lames de qualité supérieure lavées, dégraissées.
- Eau physiologique tamponnée pH 7,6.
- Batterie d'antigènes entretenue et contrôlée, obtenue par le biais du Laboratoire de Référence des Leptospires de l'Institut Pasteur de Paris, voir tableau 7 ci-dessous Batterie d'antigènes utilisée pour le MAT, et figure 12 ci-dessous
- Sérums contrôles préparés « pool négatif MAT » et « pool positif MAT ».



Figure 12 Batterie d'antigènes utilisée pour la MAT (photo personnelle 2015)

**Tableau 7 Liste des souches utilisées comme batterie d'antigènes pour le
MAT**

N°	Sérogroupe	Sérovar	Souche	Espèce
1	Australis	Australis	Ballico	L.interrogans
2	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A	L.interrogans
3	Bataviae	Bataviae	Van Tienen	L.interrogans
4	Canicola	Canicola	Hond Utrecht	L.interrogans
5	Ballum	Castellonis	Castellon 3	L.borgpetersenii
6	Cynopteri	Cynopteri	3522 C	L.kirschneri
7	Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V	L.kirschneri
8	Sejroe	Hardjobovis	Sponselee	L.borgpetersenii
9	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis	L.interrogans
10	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Winjberg	L.interrogans
11	Panama	Panama	CZ 214 K	L.noguchii
12*	Semaranga*	Patoc*	Patoc 1*	L.biflexa*
13	Pomona	Pomona	Pomona	L.interrogans
14	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem	L.interrogans
15	Sejroë	Sejroë	M 84	L.borgpetersenii
16	Tarassovi	Tarassovi	Perepelitsin	L.borgpetersenii
17	Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Verdun	L.interrogans
18	Celledoni	ND	2011/01963	L.santarosai
19	Djasiman	Djasiman	Djasiman	L.interrogans
20	Mini	ND	2008/01925	L.kirschneri
21	Sarmin	Sarmin	Sarmin	L.weillii
22	Shermani	Shermani	1342 K	L.santarosai
23	Javanica	Javanica	Poi	L.borgpetersenii
24	Louisiana	Louisiana	LUC 1945	L.noguchii

(* Non pathogène)

Il est à signaler que sous microscope à fond noir, les souches ont une forme et un comportement d'agglutination différent. Comme en témoignent les photos du panel de souches utilisées lors de la MAT (voir figures 13-30 ci-dessous). Ainsi le technicien s'habitue au visuel de chacune d'elles lors du diagnostic et de l'entretien quotidien.

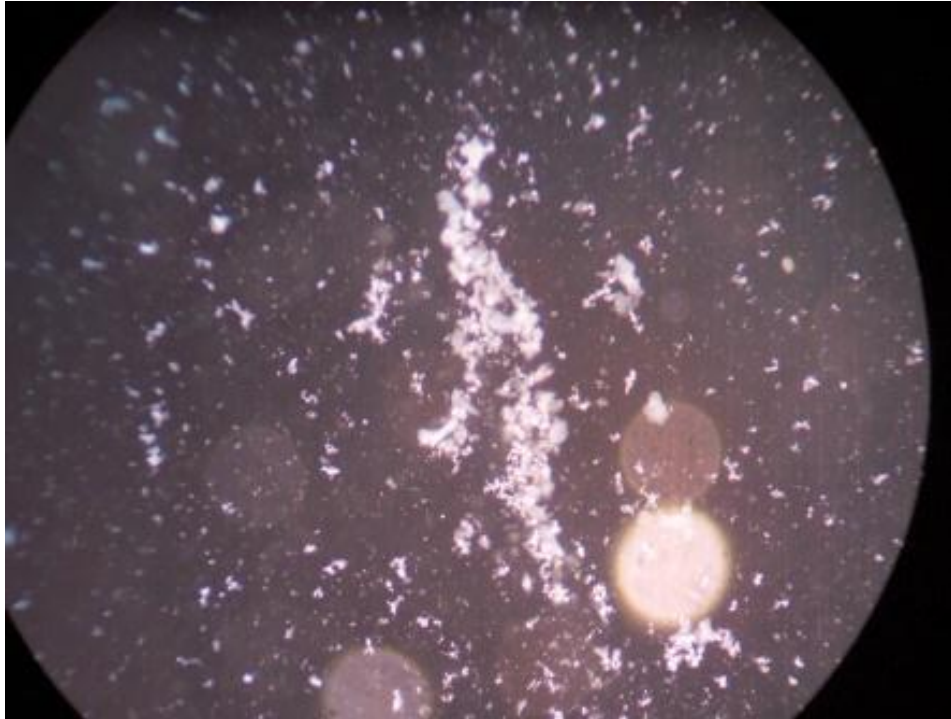


Figure 13 Leptospires observés en microscopie à fond noir, sérovar Australis x100 (photo personnelle 2015)

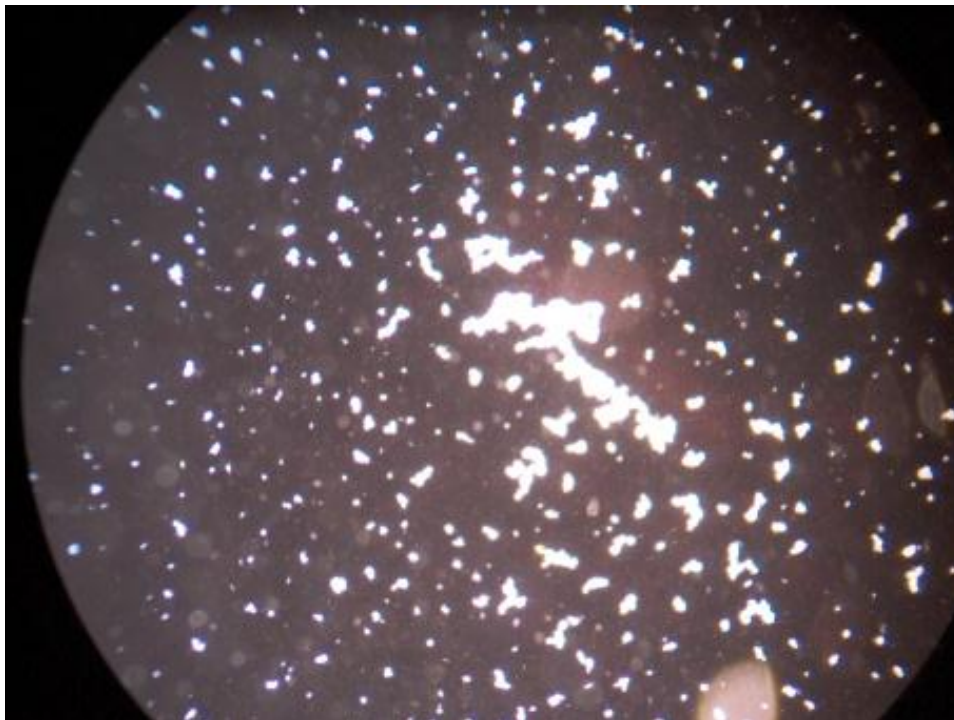


Figure 14 Leptospires observés en microscopie à fond noir, sérovar Panama x100 (photo personnelle 2015)

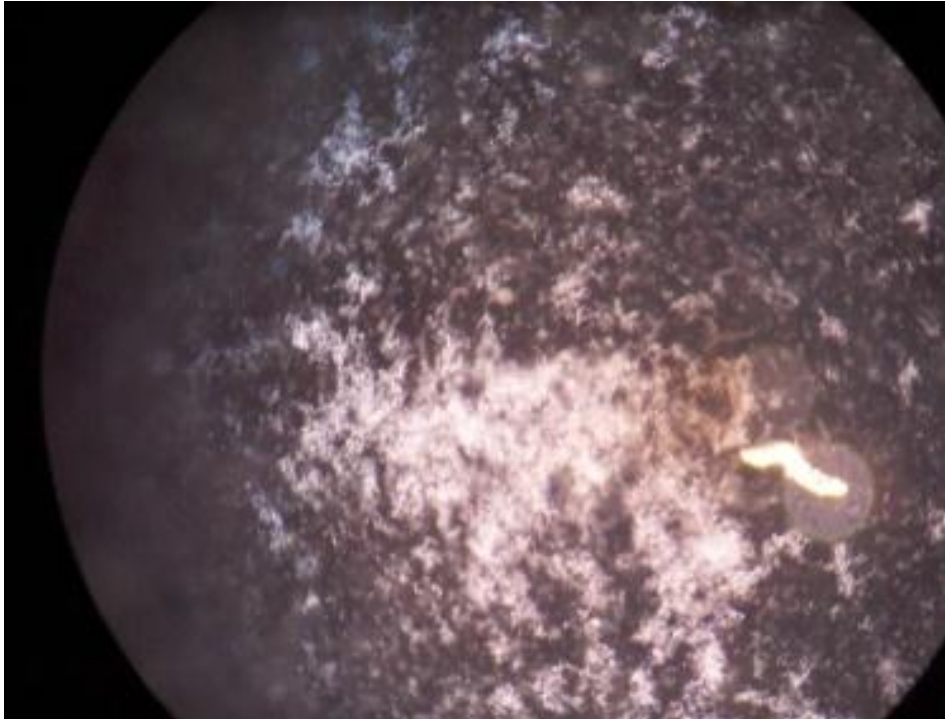


Figure 15 Leptospires sérovar hardjobovis observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)

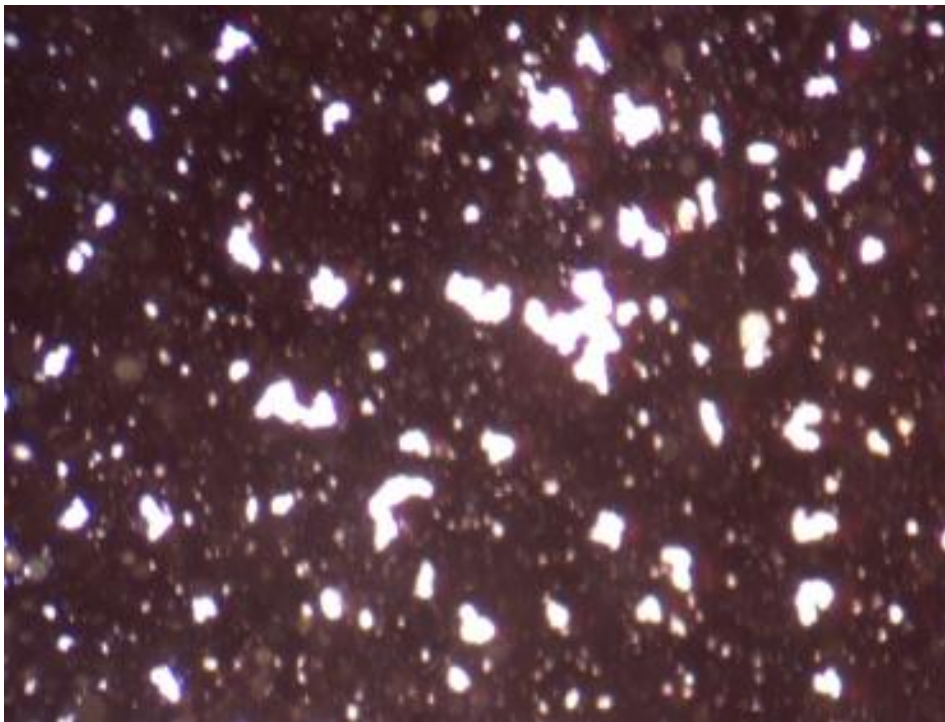


Figure 16 Leptospires sérovar pyrogenes observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)

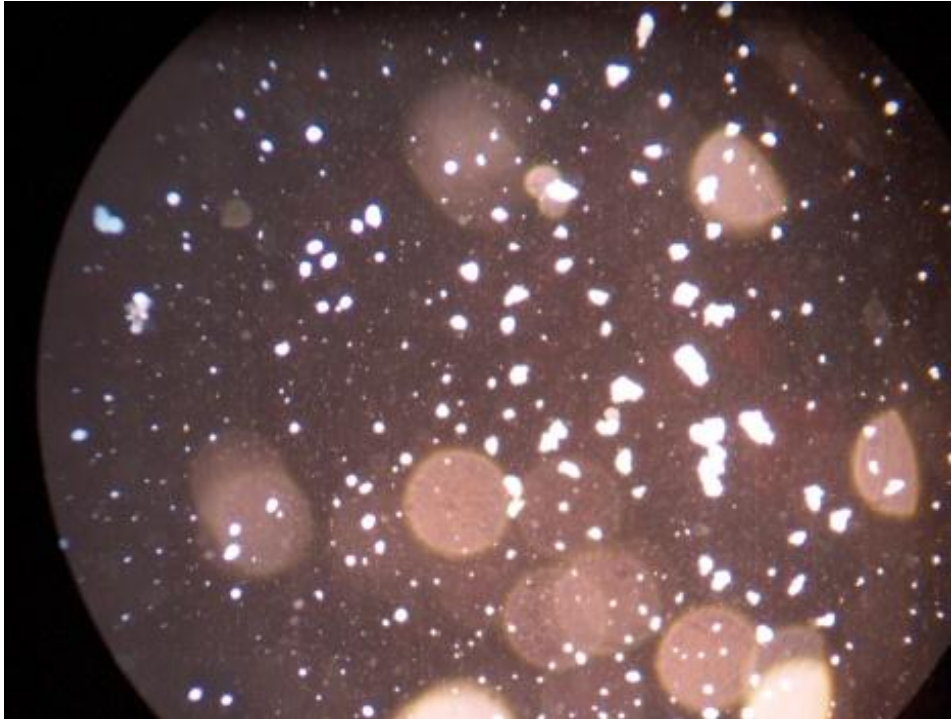


Figure 17 Leptospires sérovar Grippityphosa observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)



Figure 18 Leptospires sérovar cynopteri observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)

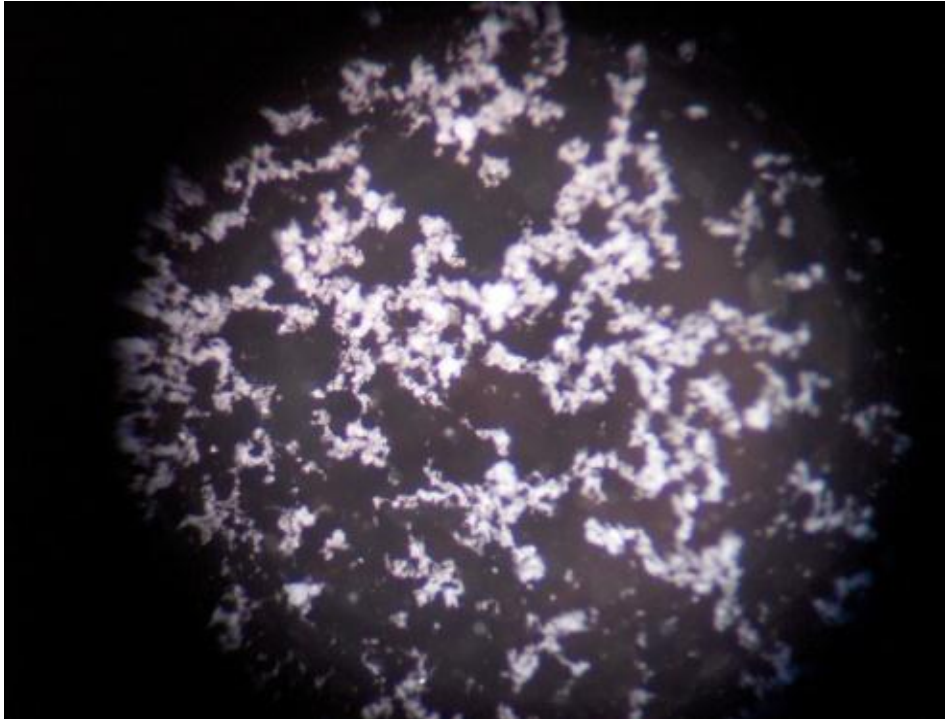


Figure 19 Leptospires sérovar Copenhageni observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)

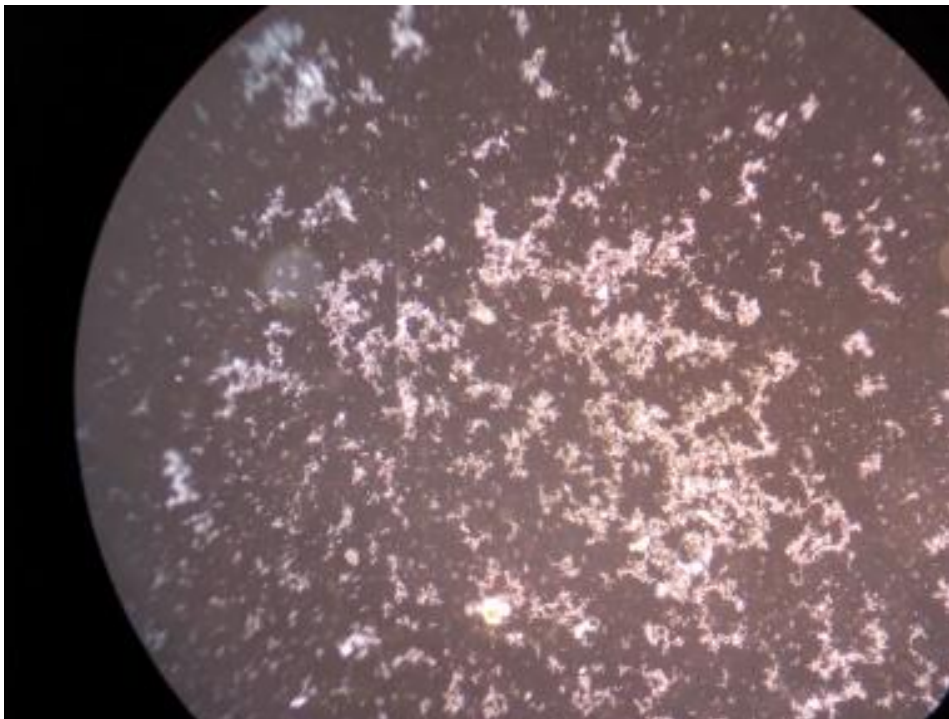


Figure 20 Leptospires sérovar iterohaemorrhagiae observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)



Figure 21 *Leptospires* sérovar *canicola* observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)

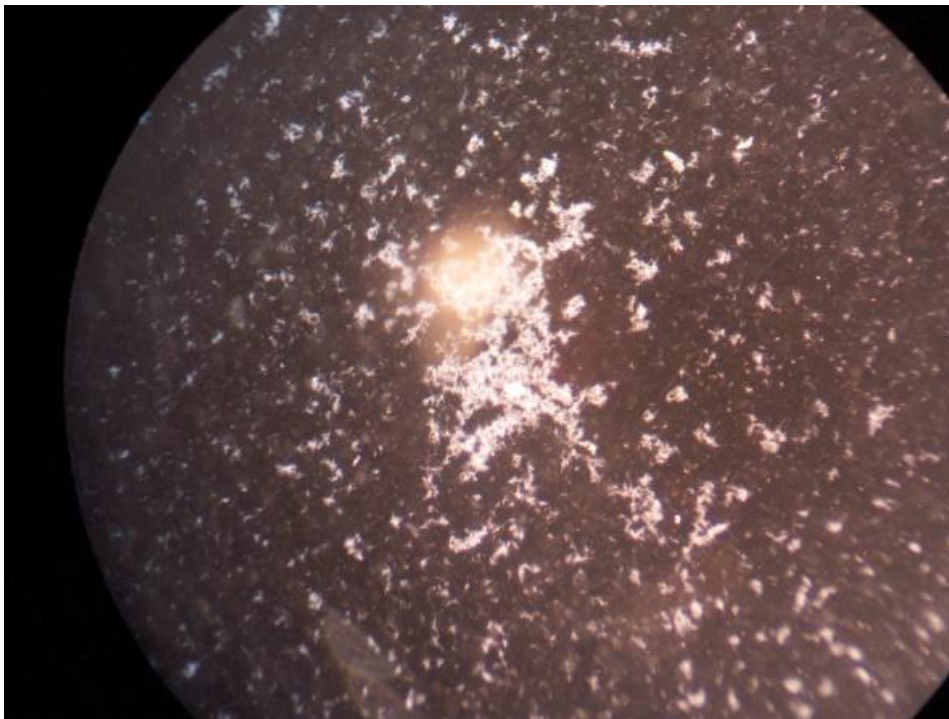


Figure 22 *Leptospires* sérovar *autumnalis* observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)

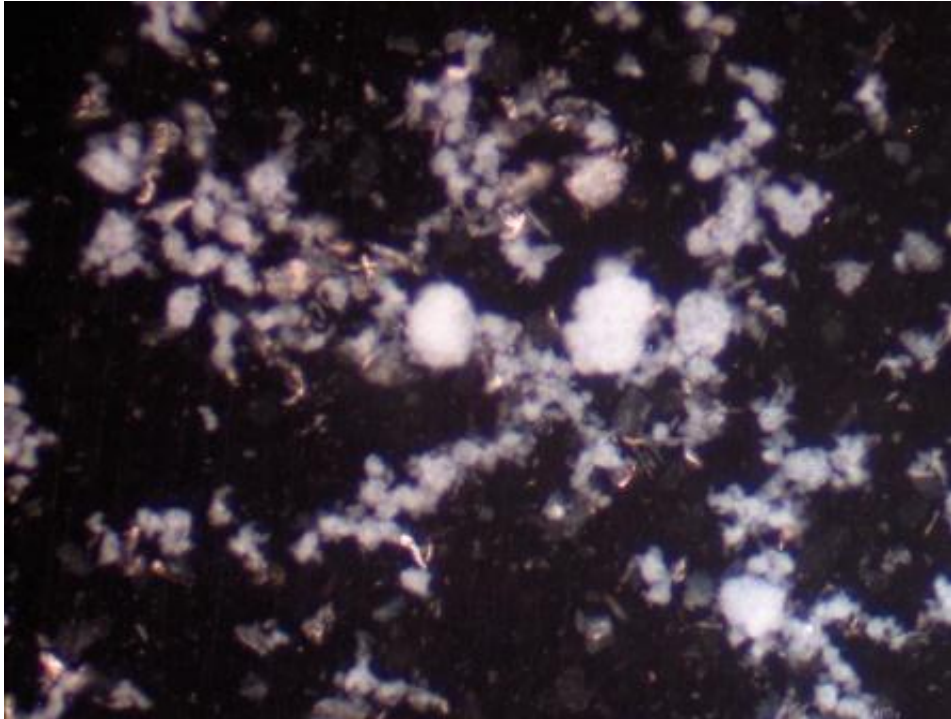


Figure 23 Leptospires sérovar castellanis observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)

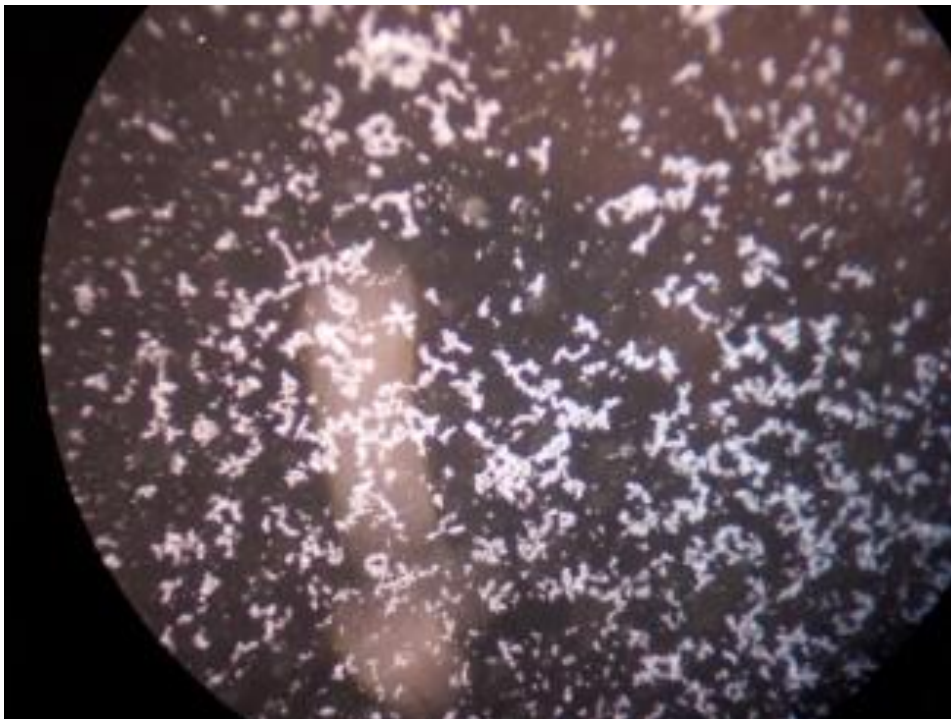


Figure 24 Leptospires sérovar louisiana observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)



Figure 25 Leptospires sérovar bataviae observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)

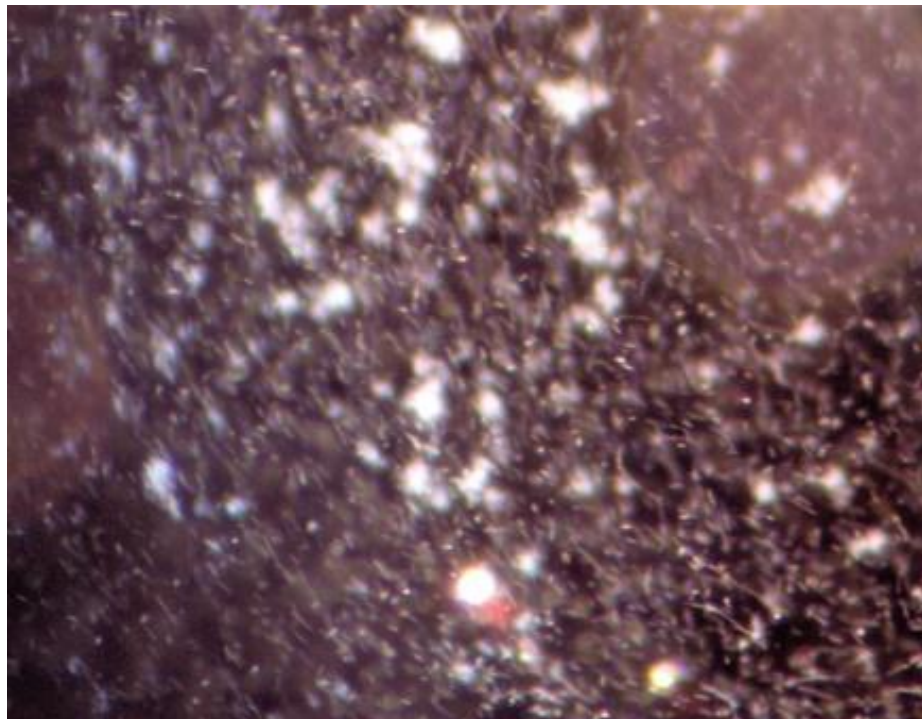


Figure 26 Leptospires observés en microscopie à fond noir, sérovar tarassovi x100 (photo personnelle 2015)

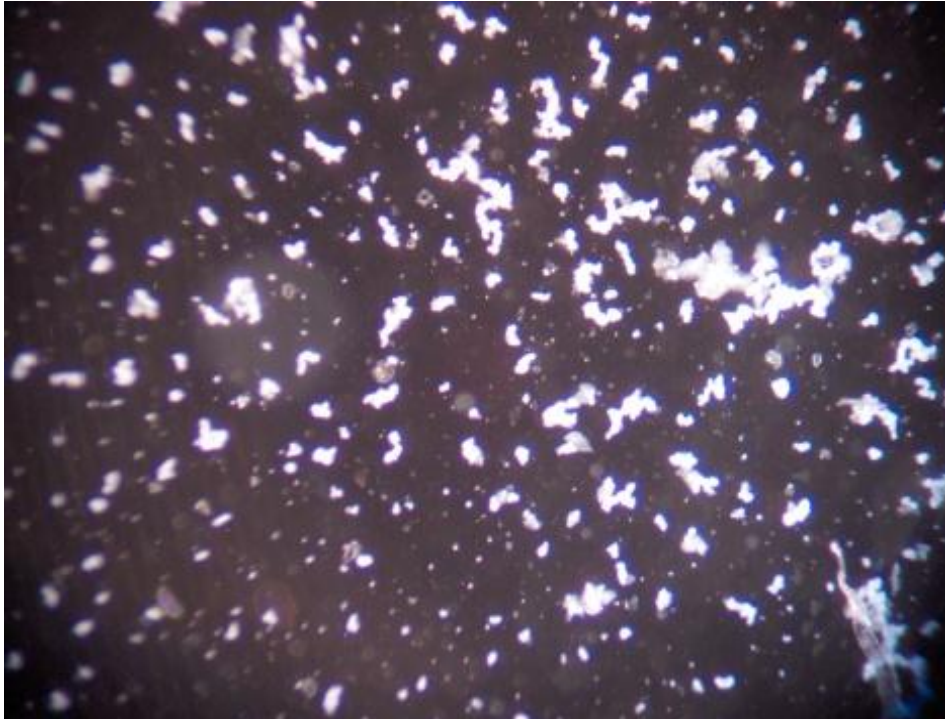


Figure 27 Leptospires sérovar Javanica observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)

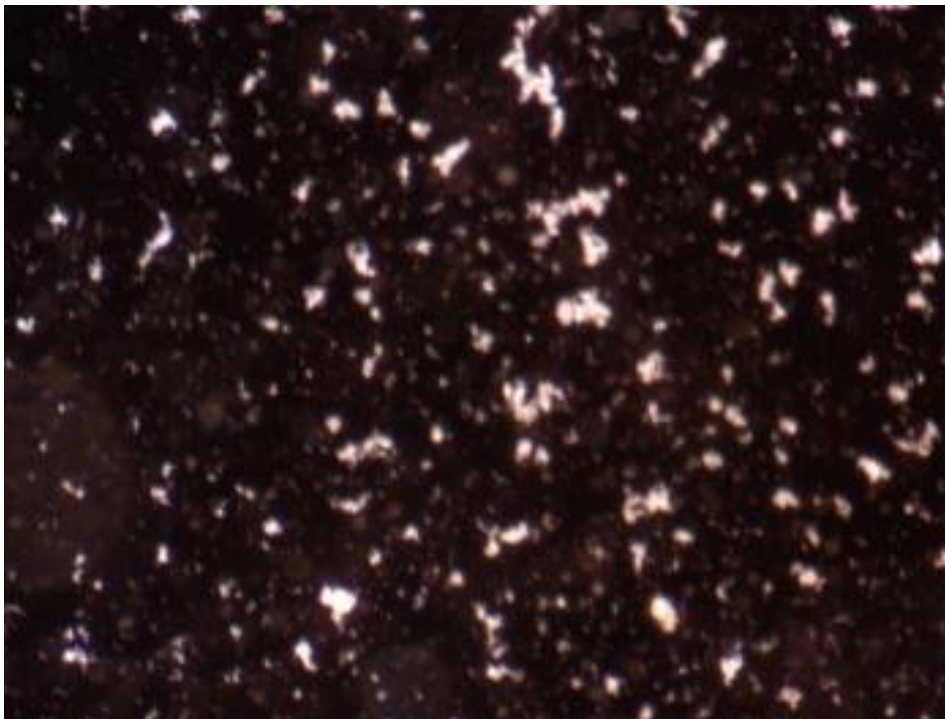


Figure 28 Leptospires sérovar Shermani observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)

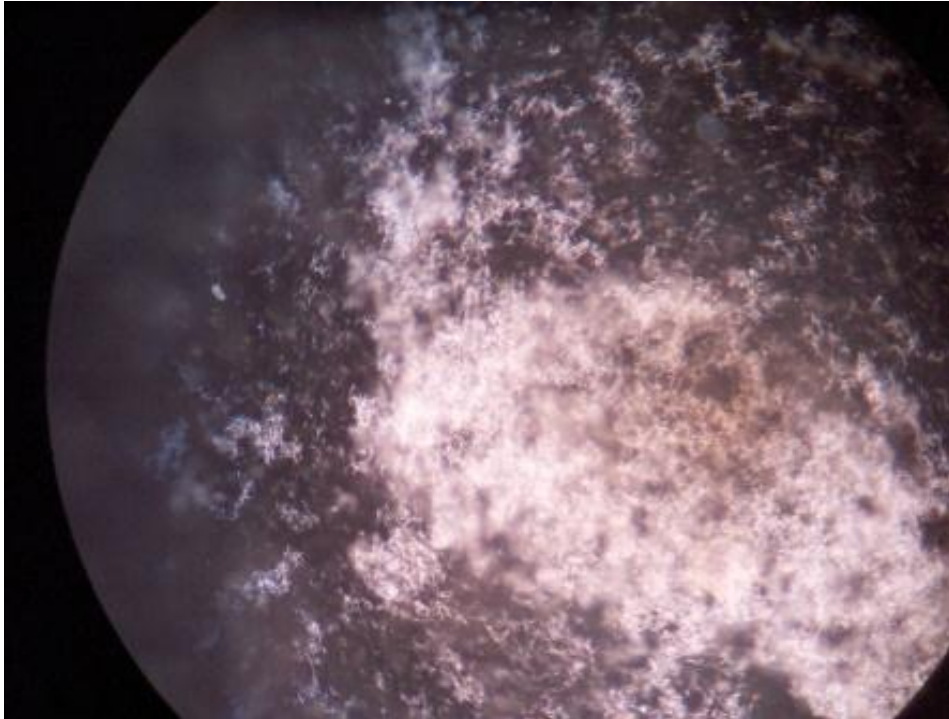


Figure 29 Leptospires sérovar Sarmin observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)

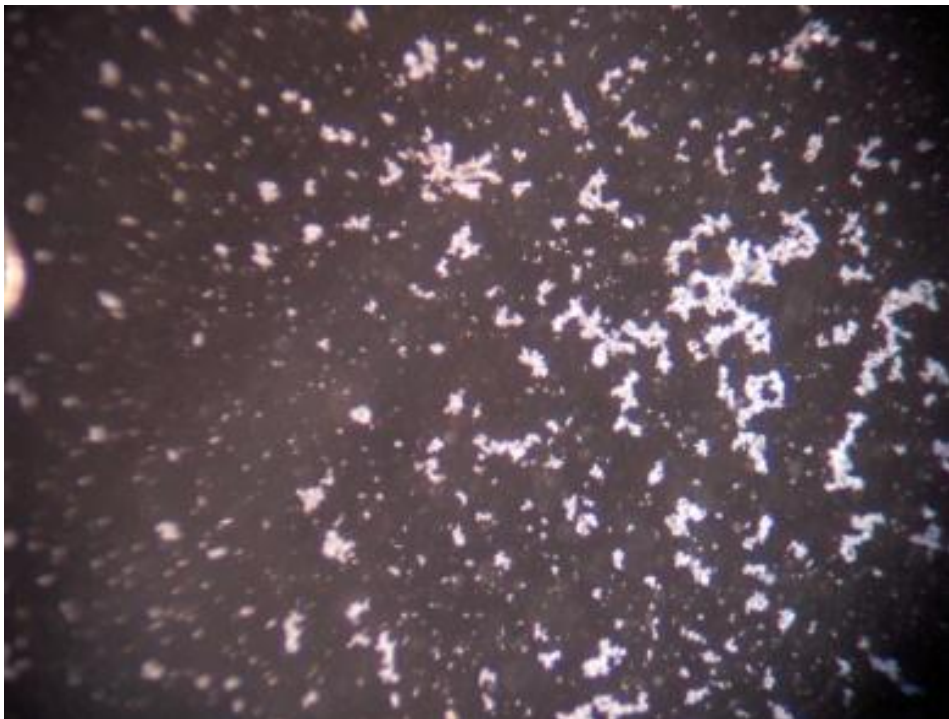


Figure 30 Leptospires sérovar Djasiman observés en microscopie à fond noir (x100) (photo personnelle 2015)

I.2.D Technique de laboratoire

I.2.D.a Etape de préparation des antigènes

La préparation des antigènes a été effectuée selon les étapes suivantes :

Il faut tout d'abord évaluer la croissance des 24 souches de leptospires et l'absence de contaminant au microscope. Les Entreposer sans des tubes à hémolyse énumérés de 1 à 24 et indiquer la date de préparation des dilutions sur les tubes

Diluer dans de l'eau physiologique tamponnée les souches de leptospires en fonction de la richesse relative de chaque souche :

- pour une culture riche ++++ dilution au 2/3 soit environ 2 ml de culture de leptospires pour 1 ml d'eau physiologique tamponnée
- pour une culture +++ utilisation de la culture pure

Homogénéiser et conserver notre batterie d'antigènes à +4°C en les recouvrant de parafilm pendant 48 heures maximum.

I.2.D.b Etape de Screening

Le MAT se déroule en deux étapes. La première étape est qualitative, appelée communément screening, permet d'identifier les sérums positifs selon un seuil de positivité propre à chaque espèce animale.

Le seuil de positivité établis lors de notre étude est le suivant:

- $\geq 1:100$ pour les ovins et bovins non vaccinés
- $\geq 1:80$ pour les chiens non vaccinés
- $\geq 1:40$ pour les rongeurs piégés

Il correspond aux consignes du Laboratoire de référence OIE des Leptospires VetagroSup

Ce n'est qu'après cette première étape qu'on pourra enchaîner les dilutions afin d'établir le titre d'anticorps pour les prélèvements. Les dilutions se feront donc selon l'espèce animale et son seuil de positivité. Nous expliquons ci-dessous les dilutions pour le ruminant non vacciné

Pré-diluer les sérums à tester au 1/50e en eau physiologique tamponnée sous un volume de 20 μ L de sérum et 980 μ L d'eau physiologique tamponnée. Les

sérums contrôles sont traités de la même façon. Il faut vortexer la dilution et vérifier l'absence de lactescence de la dilution ou tout autre phénomène pouvant gêner la lecture au microscope. Si un sérum dilué est lactescent ou trouble, refaire une dilution au 1/50e du sérum afin d'augmenter le volume final de la dilution et filtrer avec un filtre 0,45 µm.

Répartir les sérums et antigènes dans la microplaque selon le schéma expliqué dans la figure 31 ci-dessous pour une dilution finale de 1/100^e. La dilution finale doit toujours correspondre au seuil de positivité établi de l'espèce animale en fonction de son statut vaccinal et du cadre épidémiologique de la région

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													8
B													7
C													6
D													5
E													4
F													3
G													2
H													1
	Sérum 1	Sérum 2	Sérum 3	Sérum 4	Sérum 5	Sérum 6	Sérum X	Témoin antigènes	Témoin antigènes 50%				Antigènes

Figure 31 Représentation schématique du screening par MAT sur microplaque

Disposer 25 µl de sérum dilué à tester dans les rangées A à H dans tous les puits correspondant aux antigènes. Répéter l'opération autant de fois qu'il y a de sérums à tester.

Disposer 25 µl d'eau physiologique tamponnée dans la rangée qui suit le dernier sérum dans tous les puits correspondant aux antigènes. Cette rangée constitue le témoin antigène pur 100% de bactéries.

Disposer 75 µl d'eau physiologique tamponnée dans la rangée qui suit le témoin antigène pur. Cette rangée constitue le témoin antigène 50% de bactéries.

Disposer 25 µl d'antigène dilué dans tous les puits de chaque colonne (1 à 12) correspondant à un antigène spécifique. Répéter l'opération autant de fois qu'il y a d'antigènes à tester.

À chaque série, un contrôle sérum négatif et un contrôle sérum positif sont introduits. Il faut par la suite empiler les microplaques et couvrir la première avec un couvercle et les incuber à +37°C pendant 2h +/- 30 min.

Pour la lecture, il faut lire les microplaques au microscope inversé à fond noir pour microplaque, ou dans chaque puits séparément disposer une goutte entre lame et lamelle sous microscope à fond noir grossissement x10 et ou x40

Evaluer le degré d'agglutination et/ou de lyse des sérums pour chaque antigène en estimant la concentration de bactéries libres par rapport aux deux témoins antigènes.

Le technicien chargé de la lecture devra exprimer l'intensité de l'agglutination sur une fiche de la façon suivante :

≅ 75% à 100% de leptospires libres correspond à une agglutination + ou nulle : la réaction est négative.

≅ 50% de leptospires libres correspond à une agglutination ++ : la réaction est limite.

≅ 25% de leptospires libres correspond à une agglutination +++ : la réaction est positive.

≤ 25% de leptospires libres correspond à une agglutination ++++ : la réaction est positive.

Lorsque l'agglutination est complète, le champ apparaît vide de leptospires libres chose vraiment rare

Lorsque la réaction correspond à 50% (réaction limite), une lecture de confirmation doit être réalisée sur le microscope optique à fond noir à l'aide de l'objectif grossissement x10.

I.2.D.c Etape de titrage d'anticorps

Cette deuxième étape ne concerne que les prélèvements positifs en screening

On commence par refaire une pré-dilution des sérums positifs en MAT qualitative selon l'espèce. Cependant si la quantité initiale de sérum n'est pas suffisamment positive (cas des rongeurs ou on obtient peu de sang par ponction cardiaque dans certains cas), la première dilution utilisée lors du MAT qualitatif peut être réutilisée.

Répartir les sérums et antigènes dans la microplaque selon le schéma expliqué dans la figure 32 ci-dessous pour le titrage

	Ag1	Ag4	Ag5	Ag10	Ag1	Ag3	Ag10	Ag12	Ag14	AgX	AgX	AgX	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													1/12800
B													1/6400
C													1/3200
D													1/1600
E													1/800
F													1/400
G													1/200
H													1/100
	Sérum 1	Sérum 1	Sérum 1	Sérum 1	Sérum 2	Sérum 2	Sérum 2	Sérum 2	Sérum 2	Sérum X	Sérum X	Sérum X	Dilution finale

Figure 32 Représentation schématique du dépôt des sérums et des antigènes sur microplaque lors du titrage

Déposer 50 µl du sérum dilué positif dans la première cupule de la rangée (cupule H).

Distribuer dans la microplaque 25 µl d'eau physiologique tamponnée uniquement dans les cupules G, F, E, D, C, B et A.

Répéter l'opération autant de fois qu'il y a d'antigènes positifs

Effectuer une série de dilution à raison de 2, allant du 1/50e au 1/6400e du sérum positif sous un volume de 25 µl. jeter les 25 µl restant de la dernière cupule de la rangée.

Distribuer pour chaque dilution 25 µl d'antigène dilué

Empiler les microplaques et couvrir la première avec un couvercle.

Incuber à 37°C pendant 2h +/- 30 min

Pour la lecture : le titre est inversement proportionnel à la dilution finale positive lors de la lecture on transfère avec une anse un aliquot de chaque puits sur une lame rangée par rangée en allant de la dilution la plus forte à la plus faible. Lire la lame au microscope à fond noir (objectif grossissement x10) et déterminer le titre du sérum vis-à-vis de chaque antigène. Ce titre correspond à la plus forte dilution donnant lieu à une agglutination d'au moins 50 % des leptospires, c'est-à-dire laissant au maximum 50 % des leptospires libres par rapport au témoin antigène.

Afin de valider la série, les contrôles négatifs et positifs doivent être conformes. Une tolérance de 2 titres est acceptée et le sérotype majoritaire doit être retrouvé.

Les résultats du MAT qualitatif sont notés sur la fiche paillasse dans les cases correspondant à chacun des antigènes.

Un MAT qualitatif est exprimé de la façon suivante :

Négatif, (rien n'est noté en cas d'absence d'agglutination).

++, réaction seuil correspondant à un titre au 1/100.


+++ ou ++++ correspondant à un titre $\geq 1/100$ déterminé lors du MAT quantitatif.

Les résultats du MAT quantitatif sont notés sur la fiche paillasse et exprimés en dilution.

Un MAT quantitatif de +++ ou ++++ correspond à un titre compris entre 1/100 et $\geq 1/12800$. Le titre du sérum correspond à la dilution la plus élevée donnant lieu à une réaction positive (voir tableau 8 ci-dessous).

Tableau 8 Illustration d'un titrage d'un sérum selon la microagglutination allant de 1/100 et $\geq 1/12800$.

Dilution finale	1/3200	1/1600	1/800	1/400	1/200	1/100
Sérum A	Absence d'agglutination	++++	++++	++++	++++	++++
Sérum B	Absence d'agglutination	Absence d'agglutination	Absence d'agglutination	Absence d'agglutination	Absence d'agglutination	+++
Sérum C	Absence d'agglutination	Absence d'agglutination	++	+++	++++	++++

Sens de lecture 

Le titre retenu pour le sérum A est de 1/1600, pour le sérum B il est de 1/100 et pour le sérum C il est de 1/800.

I.3 Résultats et discussion

L'ensemble des résultats de l'enquête d'identification des sérovars circulant par la technique de micro-agglutination est résumé dans le tableau 9 ci-dessous :

Tableau 9 Résultats de l'étude d'identification des sérovars circulant par la technique de micro-agglutination dans quelques élevages d'Alger

Animaux	Ferme 1	Ferme 2	Ferme 3	Ferme 4
Rat	1/5 Grippotyphosa 1 :40	0/5	¼ Australis1 : 160	0/6
Chien	0/2	1/3Australis 1 : 5120	1/3 Canicola1 : 2560	0/2
Mouton	1/6 Icterohaemorrhag iae 1 :1600	0/7	0/5	0/6
Bovin	6/12 (50%) 3=Sejroe 1 :200/1 :200/1 :400 1=Icterohaemorrh agiae 1 :800 3=Pomona 1 :800 1=Canicola 1 :800 1=Grippotyphosa 1 :800 1=Australis 1 :800	3/12 (25%) 2=Sejroe 1 :400/1 :400 2=Castellonis 1 :400/1 :200 1=Australis 1 :1600	2/8 (25%) 1=Grippotyphosa 1 :1600 1=Patoc 1 :400 1=Castellonis 1 :800	3/14 (21.42%) 3 Sejroe 1 :400/1 :400/1 :200 1=Icterohaem1 :3200 1=Castellonis1 :1600 1=Patoc 1 : 200

La qualité de la mesure de la séroprévalence est conditionnée par la représentativité de l'échantillon. Pour des raisons pratiques d'organisation de l'étude, cette dernière a été constituée à partir de fermes mixtes avec des critères de troubles de la reproduction et de promiscuité d'espèces et surtout avec une collaboration du propriétaire et du personnel travailleur, malheureusement il n'existe pas de base de sondage détaillée et actualisée au niveau de l'inspection vétérinaire d'Alger . Néanmoins la population sondée et les conditions d'élevages des fermes retenues sont assez représentatives de la population globale des fermes du même genre.

Les résultats de séroprévalence selon l'espèce animale sont résumés dans le graphique ci-dessous (figure 33)

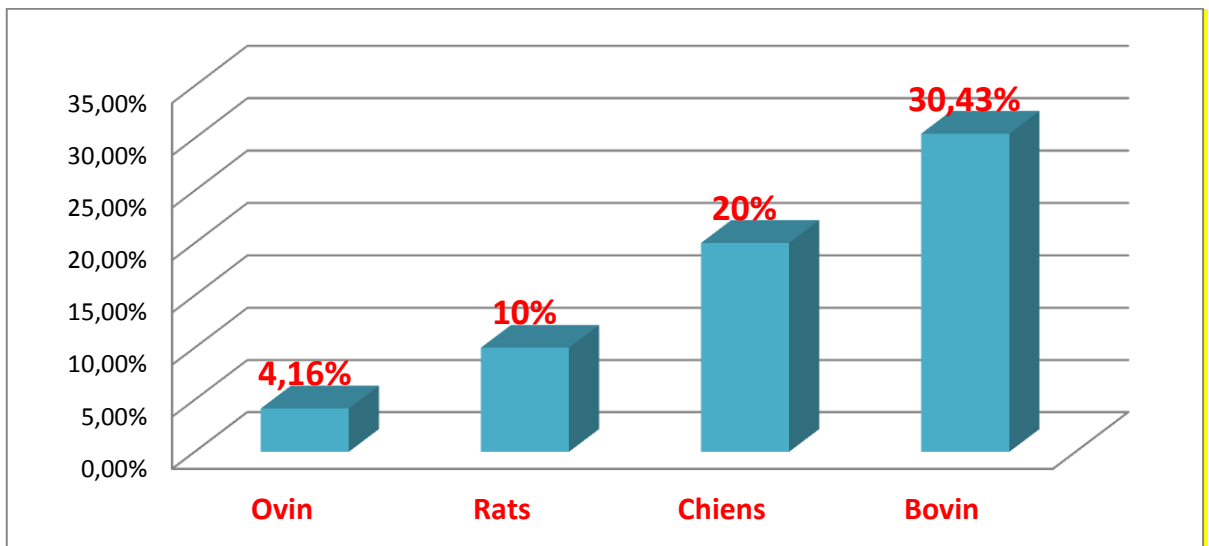


Figure 33 Séroprévalences de la Leptospirose par la technique de micro-agglutination selon l'espèce animale

Rongeurs

Deux rats sur les 20 capturés (10%) se sont révélés positifs : un rongeur vis-à-vis du sérotype Grippotyphosa avec des titres de 1 :40 et le second contre Australis 1 :160.

Chiens

Deux chiens sur les dix testés (20%) se sont révélés positifs, dont un contre le sérotype Australis (titre de 1 :5120) et l'autre contre Canicola (titre de 1 : 2580) d'où l'utilité de vacciner les chiens des fermes contre la leptospirose. Les vaccins disponibles protègent contre ces sérotypes.

Une étude récente de Zaidi et al. (2018) menée sur la leptospirose canine dans la région d'Alger sur urine de chiens errants par PCR a révélé une prévalence entre 2.68% - 4.8% quand les animaux ne sont pas vaccinés.

Ovins

Un mouton sur les 24 sondés a présenté un titre d'anticorps vis à vis d'icterohaemorrhagiae . Une étude tunisienne mais dans une région steppique semi-aride, de recherche d'anticorps par la technique de micro-agglutination (MAT) sur 182 sérums d'ovins issus de 23 élevages de la région d'El Fahs a révélé que 98 % des ovins infectés, étaient positifs au sérotype Icterohaemorrhagiae (Khamassi Khbou et al., 2010).

Une enquête par Sérotypes concernant les cas de leptospirose humaine survenus entre 1985 et 2003 en France a révélé que le sérotype Icterohaemorrhagiae étaient le plus fréquemment responsable de la maladie humaine , suivi du sérotype Grippotyphosa puis Australis et Sejroe (Baranton and Postic , 2006) le rôle zoonotique de ces espèces animales réservoirs doit être donc maîtrisé entre autre par la vaccination des chiens et la dératisation pour interrompre le cycle de transmission de la maladie .

Bovins

Toutes les fermes (100%), ont présenté au moins une vache séropositive, avec une séroprévalence au sein des fermes variant de 21.42% à 50 %.

- Les titres sont situés entre 200 et 3200 (64.28% des titres dépassent les 800).
- Le titre d'anticorps exprimé le plus élevé est vis-à-vis du sérogroupes Icterohaemorrhagiae (1 : 3200).

En effet il y aurait une forte réponse immunitaire avec des titres en anticorps élevés, ces titres sont élevés quand le sérovars est accidentel et non adapté à l'espèce alors que les titres sont bas quand il y a une adaptation entre l'hôte et le sérovar

- 10 sérums de bovins sur les 14 séropositifs obtenus ont présenté une séropositivité contre plusieurs sérogroupes alors que 4 seulement étaient réactifs à un seul séro groupe.
- L'étude de prévalence des Leptospires dans les fermes mixtes de la région d'Alger a révélé que *Leptospira interrogans* serogroup Sejroe est le plus répandu chez les bovins (8/46) 17, 39%. suivi par le séro groupe Ballum (4/46). Le sérovars le plus répandu à travers le monde chez le bétail est le sérovar hardjo (Sakhaee et al., 2007, Lilenbaum et Souza 2003, Ayril et al., 2014, Chideroli et al , 2016).

Une étude au Maroc voisin dans des conditions similaires a révélé que les sérovars Sejroe et Hardjo (séro groupe Sejroe) étaient les plus fréquents avec 4 bovins sur 126 testés et 4 ovins positifs sur 28 testés pour le sérovar Sejroe contre 1 sur 126 vaches positives pour le sérovar Hardjo suivi du séro groupe Ballum (Benkirane et al , 2014).

L'importance de la leptospirose chez le bétail est due principalement aux pertes économiques liées aux manifestations cliniques associées à *Leptospira* spp. serovar Hardjo d'infertilité et de chute de production laitière (Tabatabaeizadeh et al, 2011, Carvajal-de la Fuente and al., 2012, Ngbede, et al 2013).

La leptospirose bovine est répandue mondialement, sa prévalence au sein des troupeaux bovins varie d'un pays à l'autre, elle est de : 22.5% en Iran (Bahari et al., 2011), de 14, 2% en France (André-Fontaine, 2011). Alors que la proportion des troupeaux séropositifs est de 9, 2% en Belgique (Dom et al., 1991), 60 % en Grande-Bretagne (Little et al., 1987)

La leptospirose des ruminants a été décrite en Algérie dès 1951 (Donatien et al., 1951) cependant, peu d'études renseignent sur la circulation de l'infection chez les animaux, ou les sérogroupes circulants dans les zones d'élevage.

Une enquête récente menée dans la région d'Alger par Derdour et al (2017), sur les avortements infectieux chez le bovin laitier a révélé que 3.89% des vaches ayant avorté présentaient des anticorps anti-leptospire sérovar Hardjo avec une ELISA commerciale. L'étude n'a cependant pas évalué la part des autres sérovars sur les avortements du bétail et n'a pas utilisé une technique de référence. Ce chiffre de 3.89% (IC 1.89–5.89) d'avortement due à la maladie serait donc largement plus important si on extrapole à l'ensemble des leptospire.

La vaccination contre la leptospirose n'est pas préconisée en élevage bovin en Algérie et aucun vaccin ne dispose d'une autorisation sur le marché algérien. La circulation d'anticorps anti *Leptospira* témoigne de l'exposition du cheptel à la maladie et la nécessité d'instaurer une prophylaxie vaccinale adaptée.

Le sérovar canicola est associé aux chiens (Adler and de la Pena Moctezuma 2010, Picardeau, 2013, Ayrat et al., 2014), néanmoins une vache s'est révélé séropositive contre *L. canicola*, cela suggère que les chiens non vaccinés ou errants, peuvent jouer un rôle dans la transmission de la leptospirose au bétail. Les fermes mixtes présenteraient un risque de contamination croisée entre les animaux, malgré l'adaptation du sérovar à l'espèce animale et la spécificité hôte-sérovar comme l'adaptation : *icterohaemorrhagiae* et rat, *Ballum* et souris, *Pomona* et porc, *canicola* et chiens, *hardjo* et bovins (Bharti et al., 2003).

Etude II: Rechercher des Leptospires par techniques directes

II.1 Introduction

Dans le but d'enrichir notre travail de Thèse et de toucher aux différentes techniques de détection des leptospires, nous avons entrepris une deuxième étape de notre expérimentation de recherche de *Leptospira* spp. En utilisant des techniques directes de mise en évidence chez deux espèces animales

- Techniques directes de mise en évidence par observation microscopique et de culture bactérienne sur organes des rongeurs piégés
- Techniques directe de biologie moléculaire dans l'urine de bovin laitier présentant des troubles de reproduction

La culture des leptospires et leur isolement est une opération lente et difficile (jusqu'à 9 semaines de culture). Le milieu est onéreux et les risques de contamination du prélèvement et ou de perte des leptospires lors du filtrage est important , néanmoins nous avons tenté la culture sur les organes des rongeurs piégés

La détection des leptospires par l'emploi des techniques de biologie moléculaire a été préconisée dans le cadre de notre travail de Thèse dans le but d'investiguer la piste du rôle épidémiologique du bétail en tant qu'excréteur urinaire de leptospires

Une collaboration Scientifique avec le Laboratoire de Microbiologie, Faculty of Veterinary Medicine, Mustafa Kemal University, Hatay, Turkey, dans le cadre de la Thèse nous a permis de rechercher des leptospires par PCR dans l'urine de bovin laitier présentant des troubles de la reproduction

II.2 Matériels et Méthodes

II.2.A Recherche de *Leptospira* spp. par culture dans les organes de rongeurs piégés

II.2.A.a Matériel

Des prélèvements d'organes (foie et reins) et d'urine , issus de 20 rongeurs piégés lors de l'étude 1 ont servi de matériel biologique à l'étude.

II.2.A.b Méthode

Les Filtres 0, 22 μm , 0, 45 μm et milieu EMJH en tube de 10 ml sont indispensables à cette étape.

Les étapes de l'examen direct et de culture bactérienne des leptospires à partir d'organes et d'urine sont résumées ci-dessous voir tableau 10 ci-dessous.

Tableau 10 Etapes de culture bactérienne des leptospires à partir d'organes et d'urine

Etape	Urine	Organes
Etape préliminaire		Couper stérilement l'organe foie et rein Broyer approximativement 10 mg de morceaux à la seringue. Ensemencer dans un tube EMJH.
Examen direct	Observer au microscope à fond noir une goutte de l'échantillon entre lame et lamelle.	Observer au microscope à fond noir une goutte du premier tube ensemencé entre lame et lamelle.
Ensemencement	Ensemencer trois tubes d'EMJH avec 1 ml de l'urine pur (ou tout le volume à disposition si celui-ci est inférieur à 1 ml), 1 ml de l'urine filtrée 0,45 µm et 1 ml de l'urine filtrée 0,22 µm.	Effectuer deux dilutions successives à raison 10 en tube EMJH.
Incubation	+30°C. laisser les tubes à moitié fermés recouverts de papiers aluminium	

Observation des cultures

On observe au microscope une goutte de chaque tube toutes les semaines jusqu'à 9 semaines.

Plusieurs cas sont envisageables :

- Culture contaminée avec une concentration de leptospires suffisante : s'il y a plusieurs tubes, ne se préoccuper que des tubes non contaminés. Sinon filtrer 2 ml du (ou des) tube(s) le(s) moins contaminé(s) et le(s) plus riche(s) en leptospires sur des filtres 0,22 µm ou 0,45 µm puis ensemencer 1 à 5 ml dans un premier tube contenant entre 5 et 9 ml d'EMJH

- Culture contaminée sans leptospires : Le résultat est rendu négatif
- Culture négative et non contaminée : Observation hebdomadaire pendant 9 semaines et repiquage systématique la troisième semaine lorsque la culture est négative ou faible.
- Culture positive et non contaminée : si la quantité de leptospires est insuffisante on remet en incubation et on repique quelques semaines après

Quand on arrive à obtenir une quantité de leptospires suffisante on peut lancer l'identification de la souche

II.2.B Recherche de *Leptospira* spp. par les techniques de biologie moléculaire dans l'urine de bovin laitier présentant des troubles de reproduction

II.2.B. a Matériel

Matériel biologique

Les prélèvements d'urine sont tous issus de vaches présentant des troubles de la reproduction.

Nous avons prélevé 96 vaches laitières

- 46 vaches au niveau de l'abattoir de El Harrach pour une réforme suite à un motif d'infertilité
- 50 vaches au niveau de fermes mixtes présentant des troubles de reproduction issues de l'étude 1

Technique de prélèvement

Les urines ont été recueillies par

- Miction spontanée ou sondage urinaire, après un nettoyage à l'eau de la vulve. Le sondage a été effectué avec une sonde urinaire métallique courbe stérilisée, réutilisable, de 5 mm de diamètre et 540 mm de long. La désinfection des sondes urinaires a été réalisée après chaque utilisation.
- Ponction aseptique à l'aide d'une seringue stérile, de l'urine après récupération de la vessie post abattage

Une quantité d'urine de 20 ml a été récoltée pour chaque animal à l'aide d'une seringue stérile et mise dans des tubes de 20 ml.

Traitement des prélèvements

Un enrichissement du prélèvement d'urine a été effectué grâce à une double centrifugation et extraction du surnageant.

- Première centrifugation 10 minutes à 12000 rpm afin de récupérer tube à 5 ml dans un tube sec de sédiment après élimination du surnageant.

- Deuxième centrifugation 10 minutes à 12000 rpm du tube à 5 ml de prélèvement biologique d'urine on en récupère dans un tube eppendorf à 1.5 ml.

On congèle les prélèvements identifiés pour la prochaine étape.

II.2.B. b Méthode

Techniques d'extraction d'ADN

L'extraction d'ADN doit être réalisée dans des conditions très rigoureuses en raison du risque de contamination du prélèvement biologique. L'ensemble de la manipulation est réalisé dans des locaux où les leptospires ne sont pas manipulés. Le matériel nécessaire à l'extraction (pipettes, cônes, tubes, portoirs) est également stocké dans une pièce où les leptospires ne sont pas manipulés.

Le matériel et réactifs sont cités à titre indicatif

- Pipettes et cônes rainin à filtre de 1000 μ l, 200 μ l, 10 μ l
- Tube de 1, 5ml et 2ml
- Centrifugeuse pour micro-tube
- Bain sec + 56°C
- Ethanol I (EtOH) : (96-100%)
- PBS 1X
- Phénol-chloroforme

Etapes d'extraction

L'extraction d'ADN s'est faite par la méthode au phénol-chloroforme selon Sambrook et Ressel, (2006), elle se déroule comme suit:

On commence par décongeler les prélèvements, on centrifuge 10 minutes à 12000 rpm .En retirant 1200 μ L de surnageant on récupère le culot. 300 μ L du surnageant sont à nouveau transférés dans un microtube contenant 400 μ L de phénol-chloroforme isoamyl alcool (24 : 24 :1). On vortex pour mélanger suivi d'une centrifugation pendant 5 min à 10000 x g.

La phase aqueuse est transférée dans un microtube contenant 800 μ L d'éthanol 100 % à 4 °C.

L'ADN est précipité à -20 °C pendant 2h suivi par trois lavages par centrifugation 10 min à 10000 x g dans 1 ml d'éthanol 70% à 4 °C.

On termine par éliminer l'alcool et séchage du culot à l'air libre avant de suspendre notre ADN dans 30 à 50 μ L de PBS.

Techniques d'amplification du gène ARNr 16S

Le matériel et réactifs suivant sont indispensables à la technique , nous citons à titre indicatif

- Matrices ADN d'extraction
- Pipettes et cônes à filtre 1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L
- Thermocycleur
- Marqueur de poids moléculaire
- Amorce rrs : (voir tableau 11 ci-dessous)
- Eau PPI Aqua
- dNTPs à 100 μ M.
- Kit rTAQ DNA Polymérase rTaq polymerase à 5U/ μ L, Tampon 10X, Tampon MgCl₂ à 25mM
- 10x PCR buffer contient : 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 15 mM MgCl₂
- Gel d'agarose 2.5%,
- Bromure d'éthidium
- 1kb Smart
- Amorce du gène ARNr 16S

Tableau 11 Spécificité de l'amorce utilisée lors de la recherche des leptospires par PCR

PCR	Séquence de l'amorce	Taille du gène (bp)
ARNr 16S	Lep1 ¼ 50-GGCGGCGCGTCTTAAACATG- 30 Lep2 ¼ 30-TTAGAACGAAGTTACCCCCCTT-50	331

Préparer le mix pour plusieurs échantillons, suivant tableau 12 ci-dessous pour un volume de 25 μ L par tube.

Tableau 12 Description du mix pour PCR pour recherche de *Leptospira* spp par amplification du gène *rrs*

Composant	Volume	Concentration finale
Eau ppi (pH 7.0)	20.7µL	
10x PCR Buffer	2.5µL	1x
dNTPs mix (25 mM par nucléotide)	0.2µL	200 µM (par nucléotide)
amorce (25 pmoles/µL)	0.4µL	0.4 µM
Taq DNA polymérase	0.2µL	1 Unit/25 µL
Matrices ADN d'extraction	1.0µL	100 ng/25 µL

Il est recommandé de pipeter de l'eau en premier, suivi par les autres ingrédients.

Amplification et migration

Le programme est le suivant :

3 minutes 94°C

60 secondes 94°C

90 secondes 63°C *29

120 secondes 72 °C

10 minutes 72°C

Gel d'électrophorèse est préparé comme suit :

- Préparer un gel d'agarose 1% avec du TBE 1X (3g d'agarose et 300 ml de TBE 1X) dans un erlen de 500ml.
- Chauffer au micro-onde 3 minutes jusqu'à ébullition.
- Ajouter 3 gouttes de BET une fois le gel refroidi (environ 56°C)
- Mettre le peigne, couler le gel dans la cuve.

- Déposer 2 μL de loading dye 10X sur un parafilm et ajouter 6 μL de produit de PCR.
- Charger le gel avec 8 μL du mélange par puits et 2, 5 μL de DNA ladder tous les 10 échantillons.
- Faire migrer le gel 1 heure à 120 volts ; puis prendre une photo (voir annexe)

II.3 Résultats et discussion

Notre deuxième étude qui visait la recherche de *Leptospira* spp. par technique directe dans l'urine de bovin laitier présentant des troubles de la reproduction et de culture d'organes de rongeurs piégés s'est avéré infructueuse.

La totalité des prélèvements d'urine des vaches laitières avec troubles de la reproduction se sont avérés négatifs à la PCR par amplification du gène ARNr 16S voir figure 34 ci-dessous

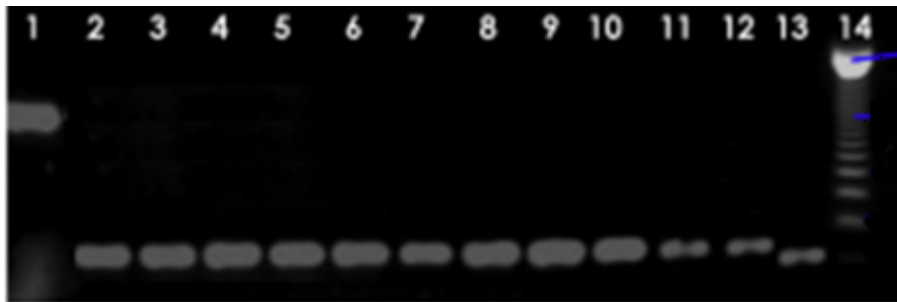


Figure 34 Résultats d'une série de PCR par amplification du gène *Leptospira* ARNr 16S dans les prélèvements d'urine de bovins avec troubles de la reproduction

Électrophorèse sur gel d'agarose 2.5% examiné à la lumière UV.

Ligne 1 : échantillons positifs témoin Lignes : 2 – 12 échantillons négatifs pas de migration, ligne 13 : contrôle négatif. Ligne 14 : marqueur de poids moléculaire.

Toutes les cultures issues de prélèvements d'organes et d'urines de rongeurs piégés se sont avérées négatifs.

La culture est difficile et lente, bon nombre d'auteurs ont obtenu majoritairement des cultures négatives à partir des organes de rongeurs piégés. Une étude brésilienne de recherche d'anticorps et de leptospires par différentes techniques, isolation et PCR chez plusieurs espèces bovine, rongeurs et travailleurs dans 27 fermes laitières de la région rurale de la commune Botucatu, n'a pu isoler aucune souche de leptospires chez 45 rongeur testés.

Dans notre étude, les 14 vaches MAT positives présentant des troubles de reproduction étaient toutes PCR négatives par amplification du gène ARNr 16S dans leurs urines, elles ne seraient donc pas excrétrices urinaire.

Une étude égyptienne menée dans la région du Delta du Nile par les trois techniques MAT , culture et PCR sur 171 animaux dont 21 ruminants , a obtenu également des PCR négatives sur des vaches MAT positives ce qui suggère que les anticorps subsistent longtemps après l'infection alors que les animaux ne sont plus excréteurs (Felt et al, 2011) .

Benkirane et al au Maroc (2014) , ont obtenu également des PCR négatives sur urine de bovins MAT positifs.

Une importante étude sur la leptospirose bovine de l'équipe Wagenaar et al. (2000) ayant comparé et analysé 5 protocoles de PCR publiés reconnus pour la détection des leptospires dans l'urine bovine, a révélé que la sensibilité de la PCR est de 50 leptospires / ml d'urine de bovin .La sensibilité est située entre 82 et 91% selon la même étude .L'étude de Barragan, et al (2017) révèle qu'un bovin excréteur large dans ses urines entre 5.1×10^8 et 1.3×10^9 Leptospires par jour, mais la cinétique de la leptospiurie reste un facteur mal connu , une intermittente avec des quantités variables de leptospires qui peuvent être minimales aux limites de la détection est envisageable par moments .

La possibilité d'avoir obtenu des faux négatifs serait en rapport avec la sensibilité de la PCR sur urine de bovin , même si la spécificité est très élevée. Cela pourrait être due à

- La grande quantité d'urine de bovin et donc la dilution des leptospires
- L'antibiothérapie systématique et anarchique dans nos élevages avant l'instauration d'un diagnostic de laboratoire qui auraient stoppé l'excrétion.

Conclusion générale

La leptospirose est une anthroponose répandue dans le monde et qui reste malheureusement sous-évaluée en Algérie.

L'étude de la leptospirose dans les fermes mixtes d'Alger a révélé une circulation de la maladie chez différentes espèces animales et la présence des anticorps contre différents sérogroupes. La maladie doit donc être plus souvent prise en compte sur le plan clinique et prophylactique par nos praticiens vétérinaires et autorités compétentes.

L'étude a révélé une large circulation de la leptospirose chez le bétail présentant des troubles de la reproduction, car tous les élevages comprenaient des sujets séropositifs avec un sérotype principal circulant : sérotype Sejroe (8/46), suivi par le sérotype Ballum (4/46). Le sérotype hardjo est le plus répandu mondialement chez le bétail. Des répercussions économiques liées aux conséquences sanitaires éventuelles de la maladie sur le bétail laitier sont à considérer.

Lors de notre étude, les 14 vaches MAT positives étaient toutes PCR négatives par amplification du gène ARNr 16S dans leurs urines. Les vaches de l'étude MAT positives présentant des troubles de la reproduction ne seraient pas excrétrices urinaires.

Le risque de pertes économiques, lié à la circulation de la leptospirose animale, est à prendre en compte. De larges études sur le terrain, s'imposent afin de caractériser d'évaluer l'importance de la leptospirose animale en Algérie et de prévenir le risque zoonotique

A l'issue de nos résultats nous préconisons une série de recommandations à mettre en place pour gérer la situation actuelle à savoir :

Amélioration des conditions d'hygiène, et socio- économiques des régions rurales dans le cadre d'un programme de développement local par des actions comme :

- La sensibilisation des services qui interviennent dans l'hygiène, l'assainissement, l'agriculture, l'élevage... sur la gravité de cette maladie et l'importance d'utiliser les moyens de préventions des changements climatiques futurs.
- . Réduire le contact entre faune sauvage et bétail, en procédant à la dératisation et le contrôle de la population de rongeurs et de chiens errants. Lutter contre le sanglier avec des battues régulières afin de repousser leurs territoires loin des bâtiments et des zones d'habitation.
- Dans les parcours, drainer les zones humides et les terrains marécageux aux abords des pâturages.
- Améliorer les conditions d'hygiène des bâtiments. Appliquer des mesures d'assainissement de l'eau de boisson en ayant recours à un abreuvement automatique des animaux avec de l'eau potable dans les bâtiments, les eaux retenues peuvent contenir des concentrations importantes des leptospires suite aux passages éventuels de rongeurs.
- Contrôler les endroits de stockage des aliments afin de diminuer la pression infectieuse à laquelle sont exposés les animaux. Isoler les vaches suspectes de leptospirose (ictère, avortement, chute de production laitière) avant traitement pour éviter les contaminations au sein du troupeau mais aussi pour le personnel.
- Diminuer le risque de contamination de l'environnement par la vaccination des animaux de la ferme surtout chiens, chevaux et ânes, notamment s'ils partagent le même environnement. On recommande dans ce sens d'introduire des vaccins contre la leptospirose bovine en Algérie
- La maîtrise de la circulation intra-cheptel peut être réalisée avec l'aide d'un traitement antibiotique (malgré ses inconvénients). Une antibiothérapie à base de macrolides et d'oxytétracycline va permettre de

limiter l'excrétion des leptospires dans le milieu extérieur des animaux suspectés cliniquement ou séropositifs. Ce traitement permet aussi la guérison des animaux malades.

- Le recours aux tests rapides de diagnostic de leptospirose chez les chiens afin d'éviter la contamination éventuelle des bovins par les chiens bergers. Ces tests rapides vont être diffusés chez le bovin dans un proche avenir.

Gérer le risque zoonotique

- La vaccination des professions à risque est indispensable. C'est une pratique obligatoire dans bon nombre de pays développés.
- Un vaccin antileptospirose est à proposer dans les meilleurs délais aux travailleurs exposés (égoutiers, éboueurs, vétérinaires, techniciens de laboratoires)
- La multiplication des campagnes de vulgarisation pour expliquer l'intérêt des mesures de prévention des professionnels à risque (port de gants, de bottes, de vêtements protecteurs.. etc.), gants et lunettes sont notamment indispensables lors de sondage urinaire, de manipulation obstétricale ou lors de manipulation de placenta ou d'avorton suite à un épisode d'avortement. Lors de la manipulation de bovins, les plaies cutanées doivent être protégées au moyen de pansements imperméables.

Dans le cadre juridique

- La leptospirose ne fait pas l'objet de contrôles réglementaires lors d'importation d'animaux de rente, néanmoins il serait judicieux de demander des garanties afin d'éviter d'introduire des animaux excréteurs chroniques ou de nouveaux sérovars en Algérie

Développer la recherche scientifique autour de cette maladie. Nous recommandons de diffuser les moyens de diagnostic de laboratoire en Algérie.

ARTICLE ECRIT PENDANT LA THESE

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ VOL. LI(3) 2018. TIMIȘOARA

SEROPREVALENCE OF LEPTOSPIROSIS IN SOME FARMS OF ALGIERS (ALGERIA)

W. I. YAHIAOUI^{1,2}, A. AMARA-KORBA³, H. AGGAD², D. KHELEF³

¹ Institute of Veterinary Science, Laboratory of Hygiene and Animal Pathology, University of Tiaret Algeria

² Higher National Veterinary School of Algiers Algeria

³ Institute Pasteur of Algiers Algeria

Email: h_aggad@yahoo.com

Summary

Although animal leptospirosis is an important zoonotic disease it remains underestimated in Algeria. In order to assess its spread in animals, 140 samples (100 sera, 20 urines and 20 kidneys) were collected from four mixed farms. All serum samples were screened using the standard micro-agglutination test (MAT) while urine and kidneys were tested for presence of bacteria for rats. With MAT, the overall prevalence was 30.43 % (14/46), 4.16 % (1/24), 20 % (2/10) and 10 % (1/10) respectively in cattle, sheep, dogs and rats. The predominant serovar was Hardjo in cattle (8/46). The presence of circulating antibodies in cattle suggests a natural exposure to *Leptospira* spp. implementing appropriate cattle vaccination programs would be a good step forward.

Keywords: Leptospirosis, serology, cattle, sheep, dogs.

Leptospirosis is an emerging zoonosis (4, 9) with a worldwide distribution (25). The pathogenic agents of leptospirosis are bacteria from the genus *Leptospira*; including *Leptospira interrogans* which contains pathogenic serovars (17).

About 250 pathogenic serovars are known and represented in 24 antigenically related serogroups (6, 34).

The World Health Organization (33) estimates incidence of the disease is higher in impoverished populations in developing countries. Animal leptospirosis has been reported in Algeria since 1950 (13). However, there is minimal epidemiological data on farms and so the extent of leptospirosis is unknown. *Leptospira* spp. can persist in wet environment for weeks (5). Some domestic and wild mammals such as rodents act as maintenance hosts by carrying specific *Leptospira* serogroups (7, 26).

Leptospirosis is zoonotic disease, that is why it is real public health threat (23). Furthermore, leptospirosis induces economic losses caused by reproductive disorders in cattle herds (28, 32). Pets can be vaccinated.

In Algeria, very few studies have been undertaken on leptospirosis. The aim of this study was to assess the extent of leptospirosis in cattle, sheep, dogs and rats in farms with a history of presumptive leptospirosis as infertility or sub icteric and to determine which *Leptospira* serovars are present.

Materials and methods

Algeria has a Mediterranean climate with warm summers and mild winters, and rain with an average of 180 millimeters rainfall per year, mostly between October and April (8).

The average temperatures hover around 11°C-12°C in January, while in August (the warmest month) the recorded temperatures are often 25°C-26°C. Summer is sunny, but there is always marked humidity.

From January 2015 to December 2015, four farms containing mixed animal species, and all in the surrounding environs of Algiers were identified for study, based on the following criteria: clinical signs of ruminant leptospirosis (abortion, infertility or marked icterus), multiple animal species in the same pastures (cattle, sheep and dogs) and lack of vaccination against leptospirosis (Table 1). One hundred blood samples from cattle, sheep, dogs and rats were collected aseptically (Table 1). The serum was centrifuged at 800 g for 10 minutes and stored at -20°C until analyzed.

Table 1

Description of blood sample sizes across farm and species

Animal	Farm 1	Farm 2	Farm 3	Farm 4	Total
Cattle	12	12	8	14	46
Sheep	6	7	5	6	24
Dog	2	3	3	2	10
Rat	5	5	4	6	20

In every farm, rat traps were placed in field sites, with fresh tomatoes as bait. Captured 20 rats were transported to the Higher National Veterinary School for euthanasia and necropsy. Rat blood was collected by intracardiac venipuncture and centrifuged as the precedents.

Animals were euthanized, and kidneys and urine aseptically collected and transported under cold to the Institute Pasteur of Algiers. Cultures were performed using Ellinghausen McCullough Johnson Harris (EMJH) broth medium (3-4 tubes/sample) (15). Renal tissue was inoculated into culture media while only 2-3 drops of urine (diluted at 1% in EMJH) were inoculated into the medium. All cultures were incubated at 28-30°C for up to 13 weeks.

Cultures were examined weekly by dark-field microscopy to detect growth of *Leptospira*. The result was recorded as "negative", if there were no visible leptospiras.

All serum samples were examined by the standard micro-agglutination test (MAT) (11) at the Institute Pasteur of Algiers.

The MAT was performed using the following antigens provided by the French National Reference Center for Leptospirosis (Institute Pasteur of Paris):

Australis (strain Australis), Autumnalis (strain Autumnalis), Bataviae (strain Bataviae), Canicola (strain Canicola), Ballum (strain Castellonis), Cynopteri (strain Cynopteri), Grippotyphosa (strain Grippotyphosa), Sejroe (strains Hardjo), Hebdomadis (strain Hebdomadis), Icterohaemorrhagiae (strains Icterohaemorrhagiae and Verdun), Panama (strain Panama), Pomona (strain Pomona), Pyrogenes (strain Pyrogenes), Tarassovi (strain Tarassovi) Celledoni (strain Celledoni), Djasiman (strain Djasiman), Mini (strain Mini), Sarmin (strain Sarmin), Shermani (strain Shermani), Javanica (strain Javanica) and Louisiana (Louisiana). A non-pathogen serogroup Semaranga (strain Patoc) was also used.

Serum samples were screened, and positive serum were titrated to the end-point using standard methods. Serum samples were screened at a dilution of 1/ 100 to 1/ 3200 for sheeps and cattles, 1/ 40 to 1/ 1280 for rats and 1/ 80 to 1/ 2560; for dogs. Positive serums were titrated to the end-point using standard methods

Results were considered positive when 50 % or more leptospiras was agglutinated. Two standard serum controls (positive and negative) were conducted each time. The positive samples were identified and titrated realizing serial dilutions in order to obtain the final antibodies titer. Seropositivity was determined based on the animal species; the sample was considered positive when titers was 1:100 for ruminants and 1:40 for dogs and rodents (27).

Results and discussions

The total seroprevalence in cattle, sheep, dogs and rats, the occurrence was of 30.43 %, 4.16 %, 20 % and 10 % respectively (Table 2).

Table 2
Seroprevalences and highest microscopic agglutination test (MAT) titers against presumptive *Leptospira* serogroups collected in mixed farms of Algiers

Animal	Farm 1	Farm 2	Farm 3	Farm 4	Positive MAT / Total sera
Cattle	6/12 (50%) 3=Hardjo 1:200/1:200/1:400 1=Icterohaemorrhagiae 1:800 3=Pomona 1:800 1=Canicola 1:800 1=Grippotyphosa 1:800 1=Australis 1:800	3/12 (25%) 2=Hardjo 1:400/1:400 2=Castellonis 1:400/1:200 1=Australis 1:1600	2/8 (25%) 1=Grippotyphosa 1:1600 1=Patoc 1:400 1=Castellonis 1:800	3/14 (21.42%) 3 Hardjo 1:400/1:400/1:200 1= Icterohaemorrhagiae 1:3200 1=Castellonis1:1600 1=Patoc 1 :200	14/46 (30.43 %)
Sheep	1/6 Icterohaemorrhagiae 1:1600	0/7	0/5	0/6	1/24 (4.16 %)
Dog	0/2	1/3 Australis 1 :5120	1/3 Canicola1: 2560	0/2	2/10 (20 %)
Rat	1/5 Grippotyphosa 1:40	0/5	1/4 Australis 1: 160	0/6	2/20 (10%)

In cattle, each farm showed at least one animal seropositive then, leptospirosis seroprevalence varied from 10.71 % to 32 %. In positive animals, antibody titers ranged from 1:200 to 1:3200 (higher titer observed with serovar Icterohaemorrhagiae).

Among the 14 positive sera, four reacted to only one serogroup, seven showed cross-reactions in which one serogroup predominated, and three reacted with two or more serogroups at the same degree. Our results showed that *Leptospira interrogans* serogroup Hardjo was the most frequently encountered (8/46) followed by Castellonis (4/46).

In sheep, only one sample of 24 tested was found positive, and it was against Icterohaemorrhagiae (1:1600) while in dogs, two of 10 dogs tested were found seropositive (Australis 1:5120 and Canicola 1:2560).

All captured rodents (24) were identified as *Rattus norvegicus*.

In the rats, MAT-positive was defined by a titer 1:40. Two samples were positive (Grippotyphosa 1:40 and Australis 1:160). However, culture was negative for all of them.

The major tests used in diagnostic of leptospirosis are MAT, molecular tests and culture. These tests have low sensitivity and the latter two can be problematic because of the expense required (molecular tests) and the length of time to gain a result (culture). For this reason, MAT is considered the reference serological test (16; 24).

In this study, which was conducted to estimate the extent of *Leptospira* spp. infection in animal populations belonging to some mixed farms of Algiers, *Leptospira interrogans* serogroup Hardjo was most frequently recorded in cattle (8/46, 17.39%) similar to other works reporting serovar Hardjo as the main cause of leptospirosis infection among cattle (18).

The results presented here, showed the importance of leptospirosis as a possible cause of bovine infertility problems in dairy farms area. Therefore, the clinical manifestation of *Leptospira* spp. serovar Hardjo infection in dairy cattle may be a notable cause of economic losses in the livestock industry because of infertility, agalactiae infections and abortion (1, 20).

As the vaccination of cattle against leptospirosis is not implemented in Algeria, the presence of circulating antibodies in cattle suggests a natural exposure to *Leptospira* spp. serovar Hardjo.

In sheep, the seroprevalence was (4.16 %) close to that reported in Thailand by Suwancharoen et al. (31). On the other hand, higher seroprevalences were recorded in other countries (25, 26) in relation to the animals' water source.

Seroprevalence in dogs (20 %) was similar to that reported by Kikuti et al. (19). Dogs are considered maintenance hosts for serovar Canicola (35;26), and so the one cow reacting positively to this serovar suggests that dogs play a role in cattle infection and therefore cross-infection occurs between cattle and non-vaccinated dogs (35).

In order to control spread of leptospira infection in dairy cattle, it is highly advised to generalize dog vaccination and prevent stray dogs as well as wild carnivorous animals from accessing the farms and cattle pens.

The reasons that serum from an animal reacted with various serovars could be a cross-reaction among various serovars or infection with more than one serovar. However, it was recommended that the serovar providing highest antibody titer could be an infecting serovar (10).

In rats, the seroprevalence was higher than that recorded (16.5 %) in Trinidad (30) depending mainly on risk factors. Leptospira serovars in rats could be a source of infection to humans (22).

The study highlights that the main cause of leptospirosis among cattle was probably Leptospira spp. serovar Hardjo and suggests that serogroups could have been circulating within the animal populations, which highlights the importance of leptospirosis as a possible cause of bovine infertility problems in the Algiers dairy farms area.

Conclusions

Specific host-serovar combinations seem to be widely spread: Rattus species and serovar icterohaemorrhagiae (2), mice and serovar Ballum (29), pigs and serovar Pomona (3) while a cattle was revealed seropositive against L. canicola and one sheep against L. icterohaemorrhagiae.

Only two rats from the 20 tested were seropositives against Grippotyphosa and Australis, however bacteriology was negative.

As the vaccination of cattle against leptospirosis is not implemented in Algeria, the presence of circulating antibodies in cattle suggests a natural exposure to Leptospira spp. serovar Hardjo.

In order to control leptospirosis and to reduce the risk of reproductive loss, enforcing safety measures seems highly recommended. Measures such as preventing cattle from having close contact with other reservoirs like dogs, rodents, pigs and ruminants, and implementing appropriate cattle vaccination programs would be a good step forward.

Acknowledgements

We thank Dr. C. Brown (University of Georgia, U. S. A.) for reviewing the manuscript.

References

1. **Aduana, S. A.**, Review of Bovine Leptospirosis, *Europ J Appl Sc*, 2016, 8, 347-355.
2. **Albuquerque, N. F., Martins, G., Medeiros, L., Lilenbaum, W., Ribeiro, W. M. F.**, The role of capybaras as carriers of leptospire in periurban and rural areas in the western Amazon, *Acta Tropica*, 2017, 169, 57-61.
3. **Arent, Z. J., Gilmore, C., San-Miguel Ayanz, J. M., Quevedo Neyra, L., García-Peña, F. J.**, Molecular Epidemiology of Leptospira Serogroup Pomona Infections Among Wild and Domestic Animals in Spain, *EcoHealth*, 2017, 14, 48.
4. **Ayral, F. C., Bicout, D. J., Pereira, H., Artois, M., Kodjio, A.**, Distribution of Leptospira Serogroups in Cattle Herds and Dogs in France, *Americ J Tropic Med Hyg*, 2014, 91, 756-759.
5. **Barragan V., Olivas S., Keim P., Pearson T.**, Critical knowledge gaps in our understanding of environmental cycling and transmission of Leptospira spp, *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83,19.
6. **Betance, L., Peda, A., Conan, A., Ribeiro, J.**, Seroprevalence of Leptospirosis in the Feral Cat Population of St. Kitt, *J Animal Res Tech*, 2017, 38-42.
7. **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., Gatuzzo, E., Vinetz, J. M.**, Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infec Disea*, 2003, 3, 757-771.
8. **Boudrissa, N., Cheraitia, H., Halimi, L.**, Maximum daily yearly rainfall in northern Algeria using generalized extreme value distributions from 1936 to 2009, *Meteorological Applications*, 2017, 24, 114-119.
9. **Bourhy, P. L., Collet, T., Lernout, F., Zinini, R. A., Hartskeerl, H., van der Linden, J. M., Thiberge Diancourt, S., Brisse, C., Giry, F., Pettinelli Picardeau, M.**, Human leptospira isolates L, circulating in Mayotte (Indian Ocean) have unique serological and molecular features, *J Clinic Microbio*, 2012, 50, 307-311.
10. **Chirathaworn, C., Inwattana, R., Poovorawan, Y., Suwancharoen, D.**, Interpretation of microscopic agglutination test for leptospirosis diagnosis and seroprevalences, *Asian Pac J Tropic Biomed*, 2014, 4, 162-164.
11. **Cole, J. R., Sulzer, C. R., Pursell, A. R.**, Improved microtechnique for the Leptospiral microscopic agglutination test, *Appl Micro*, 1973, 25, 976-780.
12. **de Carvalho, S. M., Mineiro, A. L., Castro, V., Genovez, M. E., Azevedo, S. S., Costa, F. A.**, Leptospirosis seroprevalence and risk factors for sheep in Maranhão state, Brazil, *Trop Anim Health Prod*, 2014, 46, 491-494.
13. **Donatien, A., Gayot, G., Poul, J.**, Leptospirosis of the dog in Algeria, *Archives de l'Institut Pasteur d'Alger*, 1951, 299, 20-24.

14. **Dorjee, S., Heuer, C., Jackson, R., West, D. M., Collins-Emerson, J. M., Midwinter, A. C., Idler, A. L.,** Prevalence of pathogenic *Leptospira* spp. in sheep in a sheep-only abattoir in New Zealand, *New Zealandia Vet J*, 2008, 56, 164-170.
15. **Ellinghausen, H. C., McCullough, W. G.,** Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex (OAC) and a medium of bovine albumin and polysorbate 80, *Am J Vet Research*, 1965, 26, 45-51.
16. **Fischer, R. S. B., Somarriba, B. F.,** Challenges to Diagnosing Leptospirosis in Endemic Regions Require Urgent Attention, *Cur Tropic Med Reps*, 2017, 4, 57-61.
17. **Fontana, C., Lambert, A., Benaroudj, N., Gasparini, D., Gorgette, O., Cachet, N., Bomchil, N. Picardeau, M.,** Analysis of a Spontaneous Non-Motile and Avirulent Mutant Shows That FlIM Is Required for Full Endoflagella Assembly in *Leptospira interrogans*, *PLoS One*, 2016, 11, 4.
18. **Hashimoto, V. Y., Chideroli, R. T., Ribeiro, J., Alfieri, A. A., da Costa, G. M., de Padua Pereira, U., de Freitas, J. C.,** Serological and molecular findings in diagnosis of leptospirosis serovar hardjo in a dairy bovine herd, *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 2017, 38, 3155-3164.
19. **Kikuti, M., Langoni, H., Nobrega, D. N., Corrêa, A. P. F. L., Ullmann, L. S.,** Occurrence and risk factors associated with canine leptospirosis, *J Venom Anim Tox incl Tropic Diseases*, 2012, 18, 124-127.
20. **Krajewska, J., Arent, Z., Więckowski, D., Zolkiewski, M., Kędzierska-Mieszkowska, S.,** Immunoreactivity of the AAA+ chaperone ClpB from *Leptospira interrogans* with sera from *Leptospira*-infected animals. *BMC Microb*, 2016, 16, 151.
21. **Lizer, J., Velineni, S., Weber, A., Krecic, M., Meeus, P.,** Evaluation of 3 Serological Tests for Early Detection of *Leptospira*-specific Antibodies in Experimentally Infected Dogs, *J Vet Intern Med*, 2017, 32, 201-207.
22. **Mohamed-Hassan, S. N., Bahaman, A. R., Mutalib, A. R., Khairani-Bejo, S.,** Serological prevalence of leptospiral infection in wild rats at the National Service Training Centres in Kelantan and Terengganu, *Trop Biomed*, 2010, 27, 30-32.
23. **Momtaz, H., Moshkelani, S.,** Detection and characterization of *Leptospira* Spp. isolated from aborted bovine clinical samples, *Acta Vet Brno*, 2012, 81, 21-25.
24. **Niloofo, R., Fernando, N., Lakshitha de Silva, N., Karunanayake, L., Wickramasinghe, H., Dikmadugoda, N., Premawansa, G., Wickramasinghe, R., Janaka de Silva, H., Premawansa, S., Rajapakse, S., Handunnetti, S.,** Diagnosis of Leptospirosis: comparison between microscopic Agglutination Test, IgM-ELISA and IgM Rapid Immunochromatography Test, *PLoS One*, 2015, 1-12.

25. **Picardeau, M., Bertherat, E., Jancloes, M., Skouloudis, A. N., Durski, K., Hartskeerl, R. A.**, Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies, *Diagn Microb Infect Dis*, 2014, 78, 1-8.
26. **Picardeau, M.**, Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*, 2013, 43, 1-9.
27. **Roqueplo, C., Cabre, O., Davoust, B., Kodjo, A.**, Epidemiological Study of Animal Leptospirosis in New Caledonia, *Vet Med Intern*, 2013, 5-10.
28. **Ryan, E. G., Leonard, N., O'Grady, L., More, S. J., Doherty, M. L.**, Seroprevalence of *Leptospira Hardjo* in the Irish suckler cattle population, *Ir Vet J*, 2012, 65, 8.
29. **Soupé-Gilbert, M. E., Bierque, E., Geroult, S., Teurlai, M., Goarant, C.**, Continuous Excretion of *Leptospira borgpetersenii* Ballum in Mice Assessed by Viability Quantitative Polymerase Chain Reaction, *Am J Trop Med Hyg*, 2017, 97, 1088-1093.
30. **Suepaul, S. M., Carrington, C. V., Campbell, M., Borde, G., Adesiyun, A. A.**, Seroepidemiology of leptospirosis in dogs and rats in Trinidad, *Trop Biomed*, 2014, 31, 853-61.
31. **Suwancharoen, D., Chaisakdanugull, Y., Thanapongtharm, W.**, Serological survey of leptospirosis in livestock in Thailand, *Epid Infec*, 2013, 141, 2269-2277.
32. **Tabatabaeizadeh, E., Gholamreza, H., Tabar, N., Farzaneh, Seifi, H. A.**, Prevalence of *Leptospira hardjo* antibody in bulk tank milk in some dairy herds in Mashhad suburb, *Afric J Microb Res*, 2011, 5, 1768-1772.
33. **World Health Organisation. WHO.**, Report of the First Meeting of the Leptospirosis, Burden Epidemiology Reference Group, Geneva, 2010.
34. **Xu, Y., Zheng, H., Zhang, Y., Wang, Y., Zhang, J., Li, Z., Cui, S., Xin, X., Ye, Q., Chang, Y. F., Wang, J.**, Genomic Analysis of a New Serovar of *Leptospira weilii* Serogroup Manhao. *Front Microbio*, 2017, 78, 149.
35. **Zacarias, F. G., Vasconcellos, S. A., Anzai, E. K., Giraldo, N., de Freitas, J. C., Hartskeerl, R.**, Isolation of leptospira Serovars Canicola and Copenhageni from cattle urine in the state of Paraná, Brazil, *Braz J Microb*, 2008, 39, 744-748.

Références bibliographiques

- Adler, B., et de la Peña Moctezuma, A. (2010). Leptospira and leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 140, 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.012>
- Adler, B., Lo, M., Seemann, T., et Murray, G. L. (2011). Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. *Veterinary Microbiology*, 153(1–2), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.055>
- Adujna, S. (2016). A Review of Bovine Leptospirosis, 8(6), 347–355. <https://doi.org/10.5829/idosi.ejas.2016.347.355>
- Afiri M, Amara Khorba A, Ait Kaid D. Renal manifestations of leptospirosis: 88 cases. *Med Sante Trop*. 2013, 23(2):234–5
- Afiri M. Amara-khorba , A., Ait kaid D. (2004). ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES , CLINIQUES ET EVOLUTIFS DE 173 CAS DE LEPTOSPIROSE. *Bulletin de Pathologie Exotique*, 2004.
- Ahmed SA, D SAndAi , S musa T TAng1 Rapid Diagnosis of Leptospirosis by Multiplex PCR, *Malays J Med Sci*. Jul-Sep 2012, 19(3): 9-16
- Allan, K. J., Biggs, H. M., Halliday, J. E. B., Kazwala, R. R., Maro, V. P., Cleaveland, S., et Crump, J. A. (2015). Epidemiology of Leptospirosis in Africa: A Systematic Review of a Neglected Zoonosis and a Paradigm for ‘One Health’ in Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003899>
- Alt D P. Zuerner RL. Bolin C A. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo, *JAVMA*, Vol 219, No. 5, September 1, 2001
- André-Fontaine G et Kodjo A., Leptospirose et troubles de la reproduction chez les bovins, *bulletin des gtv - n°48 avril 2009* , <http://www.vetagro-sup.fr/wp-content/uploads/2016/11/lepto-et-troubles-de-la-reproduction-bovine-BV-GTV2009.pdf>
- Aviati F , Mansotte F, Blanchard B, Mondot André-Fontaine G. (2004). La leptospirose, zoonose de loisir et zoonose professionnelle: rôle des rongeurs et de l’eau, *Epidémiol. et santé anim.*, 2004, 45, 55-60
- Ayral, F. C., Bicout, D. J., Pereira, H., Artois, M., et Kodjo, A. (2014). Distribution of leptospira serogroups in cattle herds and dogs in france. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 91(4), 756–759. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0416>

- Ayrat, F., Zilber, A., Bicout, D. J., et Kodjo, A. (2015). Distribution of *Leptospira interrogans* by Multispacer Sequence Typing in Urban Norway Rats (*Rattus norvegicus*): A Survey in France in 2011-2013, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139604>
- Baburaj, P., Nandkumar, V. S., et Khanna, L. (2006). Polymerase chain reaction in the diagnosis of leptospiral infection. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 54(April), 339–340.
- Bahari, A., Abdollahpour, G., Sadeghi-Nasab, A.', Sattari Tabrizi, S.2, Yavari, M.' and Dadmehr, B.3 (2011). Short Paper A serological survey on leptospirosis in aborted dairy cattle in industrial farms of Hamedan suburb , Iran, *Iranian Journal of Veterinary Research*, Shiraz University, Vol. 12, No. 4, Ser. No. 37, 2011
- 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* 2006,10:162–70
- Barragan V, Chiriboga J, Miller E, Olivas S, Birdsell D, Hepp C, Hornstra H, Schupp JM, Morales M, Gonzalez M, Reyes S, de la Cruz C, Keim P, Hartskeerl R, Trueba G, Pearson T. High leptospira diversity in animals and humans complicates the search for common reservoirs of human disease in rural Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016,10(9):e0004990. doi:10.1371/journal.pntd.0004990
- Barragan, V., Nieto, N., Keim, P., et Pearson, T. (2017). Meta-analysis to estimate the load of *Leptospira* excreted in urine: Beyond rats as important sources of transmission in low-income rural communities. *BMC Research Notes*, 10(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2384-4>
- Benkirane, A., Noury, S., Hartskeerl, R. A., Goris, M. G. A., Ahmed, A., et Nally, J. E. (2014). Preliminary Investigations on the Distribution of *Leptospira* Serovars in Domestic Animals in North-west Morocco, (1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/tbed.12252>
- Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. a., Diaz, M. M., Lovett, M. a., ... Vinetz, J. M. (2003). Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. *Lancet Infectious Diseases*, 3(December), 757–771. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00830-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2)
- Bhatia, M., Umapathy, B. L., et Navaneeth, B. V. (2015). An evaluation of dark field microscopy , culture and commercial serological kits in the diagnosis of leptospirosis, 33, 416–421. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.158570>

- Brightman, (2018). Leptospirosis : a leisure and occupational hazard, TRENDS IN UROLOGY et MEN'S HEALTH JANUARY/FEBRUARY 2018
- Bulach, D.M., Zuerner, R.L., Wilson, P., Seemann, T., McGrath, A., Cullen, P.A., Davis, J., Johnson, M., Kuczek, E., Alt, D.P. et al. 2006. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14560 – 14565
- Carvajal-de, V., Cecilia, F., Jose, R. L., et Edgar, O. J. (2012.). Seroprevalence and Risk Factors associated with *Leptospira* (*L . interrogans*) in Bovine Cattle in Northeastern Mexico, *Thai J Vet Med.* 2012. 42(1): 7-12.
- Cerqueira, G. M., et 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>
- Çetinkaya, B., Ertaş, H. B., Öngör, H., Muz, A., İdrarlarında, S., Türlerinin, L., ... Pzr, R. (2000). Detection of *Leptospira* Species by Polymerase Chain Reaction (PCR) in Urine, 24, 123–130.
- Charan J, Saxena D, Mulla S, Yadav P. Antibiotics for the treatment of leptospirosis: systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Int J Prev Med.* 2013 May,4(5):501-10.
- Chideroli, R. T., Pereira, U. P., Gonçalves, D. D., Nakamura, A. Y., Alfieri, A. A., Alfieri, A. F., et Freitas, J. C. (2016). Isolation and molecular characterization of *leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo strain Hardjobovis in the urine of naturally infected cattle in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 15(1), 1–7. <https://doi.org/10.4238/gmr.15018473>
- Dassanayake, D. L., Wimalaratna, H., Agampodi, S. B., Liyanapathirana, V. C., Piyarathna, T. A., et Goonapienuwala, B. L. (2009). Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the Microscopic Agglutination Test: a validation study. *BMC Infectious Diseases*, 9(1), 48.
- de Vries, S. G., Visser, B. J., Nagel, I. M., Goris, M. G. A., Hartskeerl, R. A., et Grobusch, M. P. (2014). Leptospirosis in Sub-Saharan Africa: A systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, 28, e47–e64. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.06.013>
- Derdour, S. Y., Hafsi, F., Azzag, N., Tennah, S., Laamari, A., China, B., et Ghalmi, F. (2017). Prevalence of the main infectious causes of abortion in dairy cattle in Algeria. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 61(3), 337–343. <https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0044>

- Desvars A, Naze F, Benneveau A, Cardinale E, Michault A. Endemicity of leptospirosis in domestic and wild animal species from Reunion Island (Indian Ocean). *Epidemiol Infect.* 2013,1(1):1–12.
- Desvars A, Naze F, Vourc'h G, Cardinale E, Picardeau M, Michault A, et al. Similarities in *Leptospira* serogroup and species distribution in animals and humans in the Indian Ocean island of Mayotte. *Am J Trop Med Hyg.* 2012,87(1):134–40. PubMed PMID: CABI:20123277776.
- Dietrich M, Wilkinson DA, Soarimalala V, Goodman SM, Dellagi K, Tortosa P. Diversification of an emerging pathogen in a biodiversity hotspot: *Leptospira* in endemic small mammals of Madagascar. *Mol Ecol.* 2014,23(11):2783–96. PubMed PMID: BIOSIS:PREV201400524773.
- Dom, P. P., Haesebrouck, F., Vandermeersch, R., Descamps, J., et Van Ommeslaeghe, K. (1991). Prevalence of *Leptospira interrogans* serovar hardjo antibodies in milk in Belgian dairy herds. *The Veterinary Quarterly*, 13(2), 118–120. <https://doi.org/10.1080/01652176.1991.9694294>
- Donatien A, Gayot G, Poul J. Leptospirosis of the dog in Algeria. *Arch l'Institut Pasteur d'Algerie Inst Pasteur d'Algerie.* 1951, 29(1):20–4.
- Dorjee, S. (2007). Occupational Exposure to Pathogenic *Leptospira* from Sheep Carcasses in a New Zealand Abattoir, 130.
- Dreyfus, A., Dyal, J. W., Pearson, R., Kankya, C., Kajura, C., Alinaitwe, L., ... Mugisha, L. (2016). *Leptospira* Seroprevalence and Risk Factors in Health Centre Patients in Hoima District, Western Uganda. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(8), e0004858. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004858>
- Faine, S. et al. *Leptospira and leptospirosis*. 2.ed. Melbourne: Medisci, 1999.
- Felt, S. a, Wasfy, M. O., El-Tras, W. F., Samir, A., Rahaman, B. A., Boshra, M., ... Pimentel, G. (2011). Cross-species surveillance of *Leptospira* in domestic and peri-domestic animals in Mahalla City, Gharbeya Governorate, Egypt. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(3), 420–425. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0393>
- Forstinus, N. O., et Ikechukwu, N. E. (2016). *Water and Waterborne Diseases : A Review Water and Waterborne Diseases : A Review*, (December 2015). <https://doi.org/10.9734/IJTDH/2016/21895>
- Gordon S et Turner L. H. (1961). The Effect of pH on the Survival of *Leptospira* in Water *, (R 39090), 35–43.
- Halliday JE, Knobel DL, Allan KJ, de CBBM, Handel I, Agwanda B, et al. Urban leptospirosis in Africa: a cross-sectional survey of *Leptospira* infection in

rodents in the Kibera urban settlement, Nairobi, Kenya. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2013,89(6):1095–102. Epub 2013/10/02. doi: 10.4269/ajtmh.13-0415. PubMed PMID: 24080637, PubMed Central PMCID: PMC3854886.

- Haraji M , Cohen N, Karib H, Fassouane A and Belahsen R, LEPTOSPIRA: Morphology, Classification and Pathogenesis , 2011 ,J Bacteriol Parasitol 2011, 2:6 DOI: 10.4172/2155-9597.100012 <https://www.omicsonline.org/leptospira-morphology-classification-and-pathogenesis-2155-9597.1000120.pdf>
- HAS , Haute Autorité de Santé , Diagnostic biologique de la leptospirose – Rapport d'évaluation , Service évaluation des actes professionnels / 2011, N° ISBN : 978-2-11-128499-9
- Hazart, G., Hugonnard, M., Kodjo, A., Groud, K., et Goy-thollot, I. (2010). La leptospirose canine en France: étude rétrospective de 37 cas & Canine leptospirosis in France: A retrospective study of 37 cases. <https://doi.org/10.1016/j.anicom.2010.05.002>
- Holzapfel M, 2014, ÉTUDE DE LA PRÉVALENCE DE LA LEPTOSPIROSE CHEZ LE CHAT À LA RÉUNION, VETAGRO SUP CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON Année 2014Thèse n°016 <file:///C:/Users/PcService/Downloads/2014lyon016.pdf>
- Houemenou G, Ahmed A, Libois R, Hartskeerl RA. *Leptospira* spp. Prevalence in Small Mammal Populations in Cotonou, Benin. *ISRN Epidemiology*. 2013, <http://dx.doi.org/10.5402/2013/502638>.
- Inada, R., Ido, Y., Hoki, R., Kakeno, R. et Ito, H. The etiology, mode of infection and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaeta icterohaemorrhagiae*). *J. Exp. Med.* 23, 377–403 (1916).
- Iván Méndez , AndreA rodríguez , dIAnA P Achón, L. cAbrerA. (2014). Serological Evidence of *Leptospira* Infection in Veterinary Students ,. *Univ. Méd.*
- Jobbins S, Sanderson C, Alexander K. *Leptospira interrogans* at the Human-Wildlife Interface in Northern Botswana: A Newly Identified Public Health Threat. *Zoonoses Public Health*. 2013;10.1111/zph.12052. Epub 14 May 2013. doi: 10.1111/zph.12052.
- Kessy MJ, Machang'u RS, Swai ES. A microbiological and serological study of leptospirosis among pigs in the Morogoro municipality, Tanzania. *Trop Anim Health Prod*. 2010,42(3):523–30. Epub 2009/09/19. doi: 10.1007/s11250-009-9455-z. PubMed PMID: 19763865.

- Khamassi Khbou , M., Haouala, K., et Benzarti, M. (2017). High frequency of seropositivity of *Leptospira* in cattle in North Tunisia, *Veterinary Medicine and Science* Published by John Wiley et Sons Ltd. *Veterinary Medicine and Science* (2017), 3, pp. 13–21 <https://doi.org/10.1002/vms3.52>
- Khamassi Khbou, M. K., Hammami , S., et Kodjo, A. (2010). Séroprévalence des anticorps anti-leptospire chez les ovins dans la région d'El Fahs, Tunisie. *Revue Méd. Vét.*, 161(4), 185–192. Retrieved from http://www.revmedvet.com/2010/RMV161_185_192.pdf
- KODJO A, Leptospirose canine : méthode de diagnostic indirect mise en œuvre au laboratoire. Synthèse du panel de tests disponibles et recommandations pratiques ,*PratiqueVet* (2017) 52 : 290-293 (290)
- Kuzembekova, G. B., Kirkimbayeva, Z. S., Maulanov, A. Z., Sarsembaeva, N. B., et Paritova, A. E. (2014). Pathological Morphology of Cattle Leptospirosis in Kazakhstan, 12(1), 121–124. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.12.01.1144>
- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Apr,14(2):296-326.
- LEVETT, P. N., BRANCH, S. L., WHITTINGTON,C.U., EDWARDS,C.N.,PAXTON. (2001) Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8:349-351
- Lilenbaum, W., et de Souza, G. N. (2003). Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Research in Veterinary Science*, 75(3), 249–251. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(03\)00114-0](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(03)00114-0)
- Little, T. W., Stevens, a E., et Hathaway, S. C. (1987). Serological studies of British leptospiral isolates of the Sejroe serogroup. III. The distribution of leptospire of the Sejroe serogroup in the British Isles. *Epidemiology and Infection*, 99, 117–126. <https://doi.org/10.1017/S0950268800066929>
- Lucchese, L., Benkirane, A., Hakimi, I., Idrissi, A. El, et Natale, A. (2016). in dairy cattle in Morocco, 13–19. <https://doi.org/10.12834/VetIt.388.1813.1>
- Machang'u R, Mgode G, Asenga J, Mhamphi G, Hartskeerl R, Goris M, et al. Characterisation of *Leptospira* isolates from captive giant African pouched rats, *Cricetomys gambianus*. *ACIAR Monograph Series*. 2002,96:40–2. PubMed PMID: ZOOREC:ZOOR13900051607.
- Machang'u RS, Mgode GF, Assenga J, Mhamphi G, Weetjens B, Cox C, et al. Serological and molecular characterization of leptospira serovar Kenya from captive African giant pouched rats (*Cricetomys gambianus*) from Morogoro Tanzania. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004,41(2):117–21. doi: 10.1016/j.femsim.2004.02.002.

- Mgone GF, Mhamphi G, Katakweba A, Paemelaere E, Willekens N, Leirs H, et al. PCR detection of *Leptospira* DNA in rodents and insectivores from Tanzania. *Belg J Zool.* 2005,135:17–9. PubMed PMID: ZOOREC:ZOOR14501003047
- Musso, D., et 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>
- NCEZID Centers for Disease Control and Prevention National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases Division of High-Consequence Pathogens and Pathology (DHCPP) , Page last reviewed: November 9, 2017 , Page last updated: February 9, 2018 https://www.cdc.gov/leptospirosis/health_care_workers/index.html
- Ngbede, E. O., Raji, M. A., Kwanashie, C. N., et Okolocha, E. C. (2013). Serosurvey of *Leptospira* spp serovar Hardjo in cattle from Zaria , Nigeria. *Revue Méd. Vét.*, 2013, 164, 2, 85-89
- Nimo Paintsil SC, Fichet-Calvet E, Mohareb E, Morales M, Bonney JH, Obiri-Danso K, et al. Rodent species and their correlation with human seropositivity for zoonotic infections in Ghana. *Am J Trop Med Hyg.* 2013,89 (Suppl 1):422. PubMed PMID: 71313222.
- OIE (2005). *Leptospirosis* , World Organization for Animal Health (OIE) <http://www.oie.int/>, Last Updated: May 2005
- Patel, J. M., Vihol, P. D., Raval, J. K., Patel, K. M., Chaudhari, N. F., et Puspa, H. (2015). Seroprevalence of Leptospirosis in Clinically Ailing Bovine Seroprevalence of Leptospirosis in Clinically Ailing Bovine, (January). <https://doi.org/10.5958/2277-940X.2015.00006.6>
- 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., Bertherat, E., Jancloues, M., Skouloudis, A. N., Durski, K., et Hartskeerl, R. a. (2014). Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.012>
- 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>

- Rentko, V. T., Clark, N., Ross, L. A., et Schelling, S. H. (1992). Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases. - Abstract - Europe PubMed Central Vol. 6 . NO. 4
- Ristow P Bull. Acad. Vét. France — 2007 - Tome 160 - N°4 www.academie-veterinaire-defrance.org/
- Ristow, P., Bourhy, P., McBride, FWdC., Figueira, C.P., Huerre, M. Ave, P., Saint Girons, I., Ko, A.I., Picardeau, M. 2007. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. PLOS Pathogens 3 :1 – 10.
- Roqueplo, C., Cabre, O., Davoust, B., et Kodjo, A. (2013). Epidemiological Study of Animal Leptospirosis in New Caledonia, 2013, 5–10.
- Ryan, E. G., Leonard, N., O'Grady, L., More, S. J., et Doherty, M. L. (2012). Seroprevalence of *Leptospira Hardjo* in the Irish suckler cattle population. Irish Veterinary Journal, 65(1), 8. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-65-8>
- Sakhaee, E., Abdollahpour, Gh. R., Bolourchi, M., Hasani Tabatabayi, A. M., Sattari Tabrizi, S. (2007). Serologic and bacteriologic diagnosis of bovine leptospirosis in Tehran suburb dairy farms. Iranian Journal of Veterinary Research, 8(4), 325–332.
- Saltoglu et al.: Leptospirosis: twelve Turkish patients with the Weil syndrome Produced , Acta Med OKAYAMA 1997,51--6:339-342
- Sambrook J, Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. CSH Protoc. 2006 Jun 1,2006(1). pii: pdb.prot4455. doi: 10.1101/pdb.prot4455. PMID: 22485786 DOI:10.1101/pdb.prot4455
- Scolamacchia, F., Handel, I. G., Fèvre, E. M., Morgan, K. L., Tanya, V. N., et Bronsvort, B. M. D. C. (2010). Serological patterns of brucellosis, leptospirosis and Q fever in *Bos indicus* cattle in Cameroon. PloS One, 5(1), e8623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008623>
- SELLARDS A W, THE INTERPRETATION OF SPIROCHAETA INTERROGANS OF STIMSON (1907) IN THE LIGHT OF SUBSEQUENT DEVELOPMENTS. TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE. Vol. XXXIII. No. 5. March, 1940.
- State, K., Ngbede, E. O., Raji, M. A., Kwanashie, C. N., et Zaria, Z. (2012). Serological prevalence of leptospirosis in cattle slaughtered in the Zango abattoir in Zaria , 48(2), 179–184.
- Tabatabaeizadeh, E., Tabar, G. H., Farzaneh, N., et Seifi, H. A. (2011). Prevalence of *Leptospira hardjo* antibody in bulk tank milk in some dairy herds

in Mashhad suburb. *African Journal of Microbiology Research*, 5(14), 1768–1772.

- Taylor PJ, Arntzen L, Hayter M, Iles M, Freaan J, Belmain S. Understanding and managing sanitary risks due to rodent zoonoses in an African city: beyond the Boston Model. *Integr Zool*. 2008,3(1):38–50. Epub 2008/03/01. doi: 10.1111/j.1749-4877.2008.00072.x. PubMed PMID: 21396050.
- Wagenaar J, Zuerner R, Alt D, Bolin CA, 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, *American Journal of Veterinary Research* March 2000, Vol. 61, No. 3, Pages 316-320 <https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.316>
- WHO Study Group on Leptospirosis (1956) *Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser.*, 113.
- WHO Study Group on Leptospirosis (1962). CLASSIFICATION OF LEPTOSPIRES AND RECENT ADVANCES IN LEPTOSPIROSIS
- WHO World Health Organization. Human leptospirosis : guidance for diagnosis, surveillance and control. (2003). (W. L. C.-P. Data, Ed.). Malta: http://books.google.com/books?hl=en&lr=etamp&id=YXinTWtQVIACetamp&oi=fnd&pg=PA1&dq=Human+leptospirosis:+guidance+for+diagnosis,+surveillance+and+controletamp&ots=HrDVanHrJ9etamp&sig=BFMzz7WjppqyF0gc_T8myhZKf0BE ISBN 92 4 154589 5
- WHO World Health Organization. (2010). Report of the First Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, (1), 1–40. https://doi.org/ISBN_978_92_4_1501521
- Yahiaoui, W. I., Amara-Korba, A., Aggad, H., Khelef, D., Seroprevalence of leptospirosis in some farms of Algiers (Algeria). *Lucrari Stiintifice - Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara* 2018 Vol.51 No.3 pp.111-118 ref.35 : <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183367515>
- Zaidi, S., Bouam, A., Bessas, A., Hezil, D., Ghaoui, H., Ait-Oudhia, K., ... Bitam, I. (2018). Urinary shedding of pathogenic leptospira in stray dogs and cats, Algiers: A prospective study. *PLoS ONE*, 13(5), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197068>
- Zilber, A. L., Belli, P., Grezel, D., Artois, M., Kodjo, A., et Djelouadji, Z. (2016). Comparison of Mucosal, Subcutaneous and Intraperitoneal Routes of Rat

Leptospira Infection. PLoS Neglected Tropical Diseases, 10(3), 1–14.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004569>

- Zimmermann S, ter Meulen A, Calvet E, Koivogui L, Sylla O, Goris M, et al. Seroprevalence and reservoirs of leptospirosis in Conakry (Guinea). Int J Antimicrob Agents. 2007,29(Suppl. 2):S49. PubMed PMID: BIOSIS:PREV200800320879.

Annexe : Photographies de l'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose de l'amplification du gène *Leptospira* ARNr 16S de 96 prélèvements d'urine de bovins

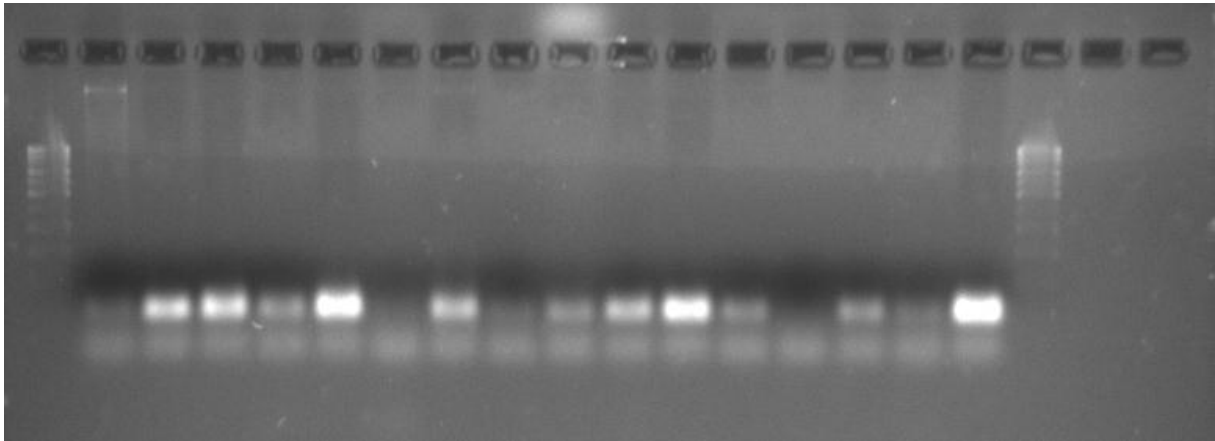


Figure 1 Photographie de l'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose prélèvements de 1-16

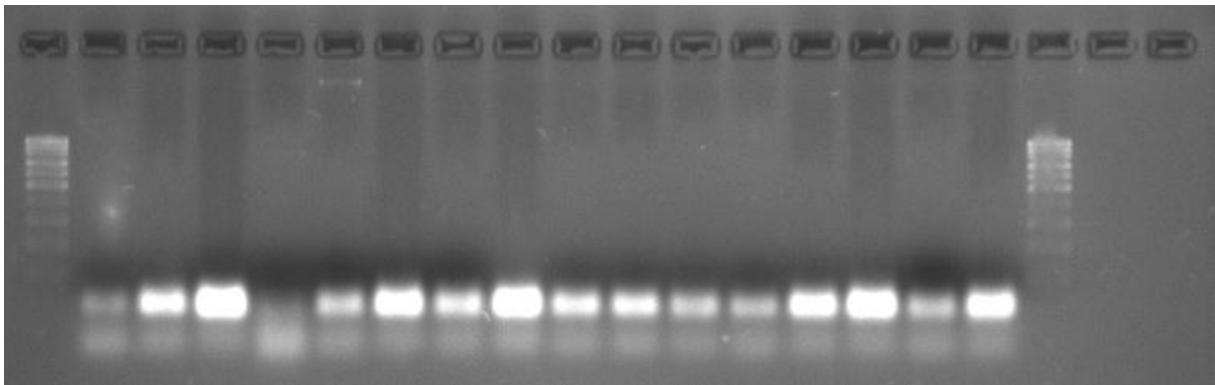


Figure 2 Photographie de l'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose prélèvements de 17-32

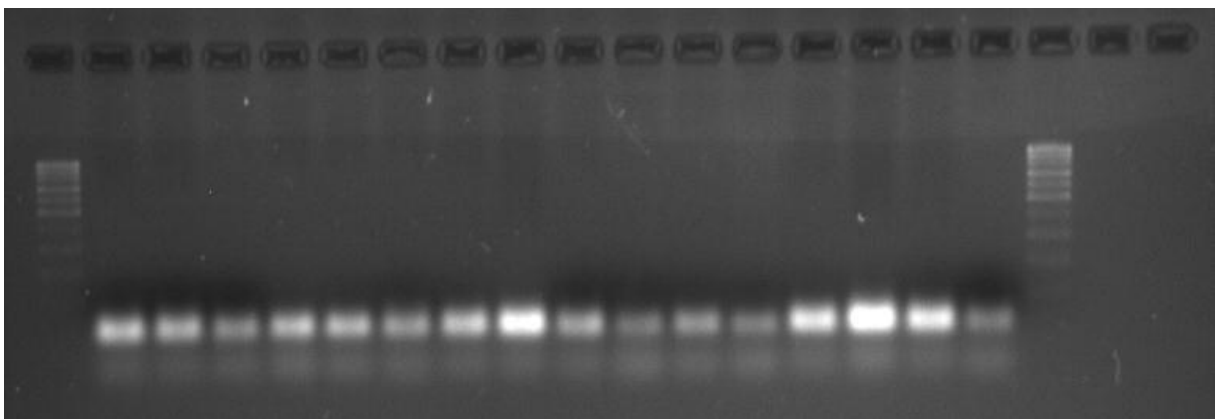


Figure 3 Photographie de l'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose prélèvements de 33-48

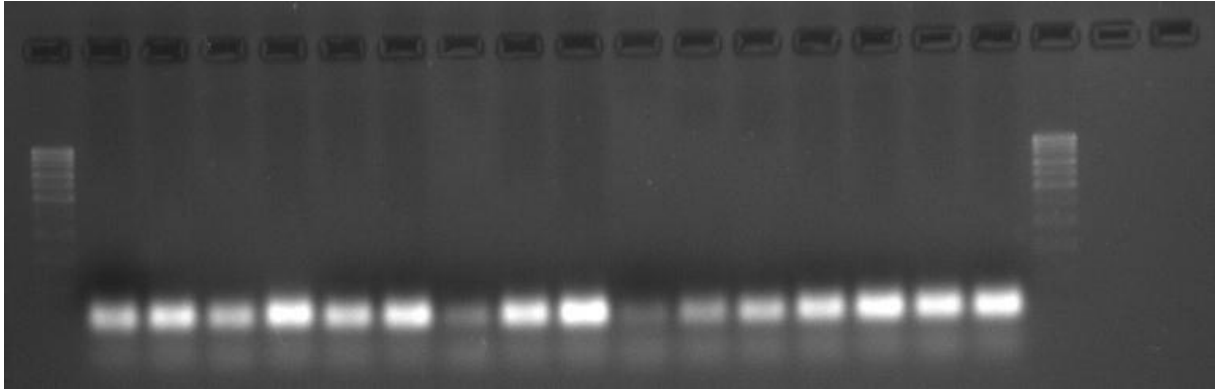


Figure 4 Photographie de l'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose prélèvements de 49-64

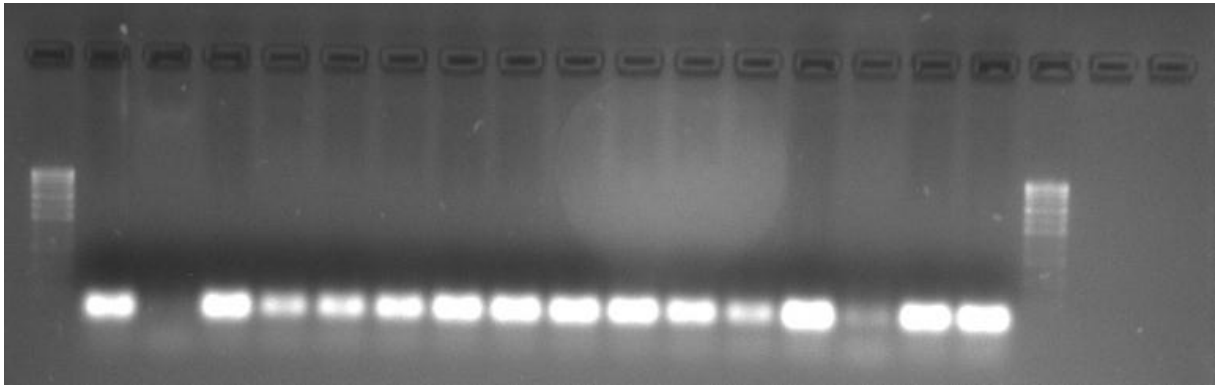


Figure 5 Photographie de l'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose prélèvements de 65-80

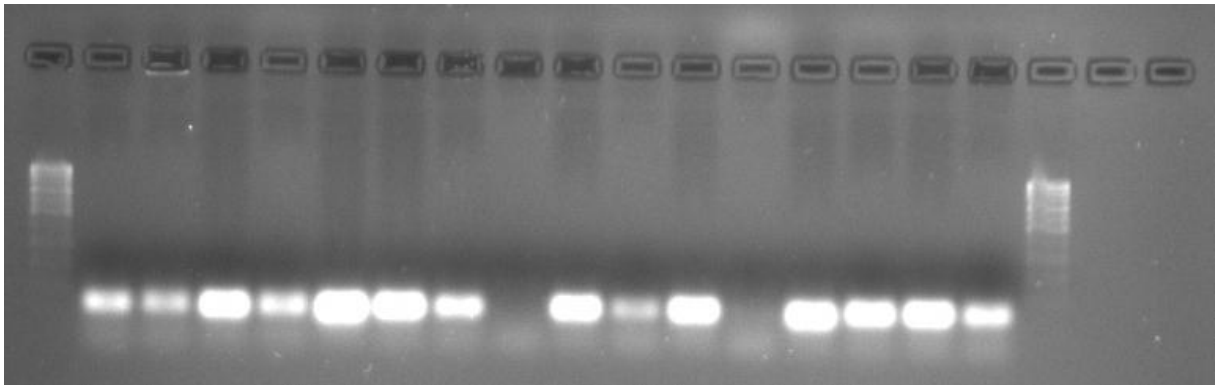


Figure 6 Photographie de l'électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose prélèvements de 81-96