

République Algérienne Démocratique
et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire
Rabie BOUCHAMA

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة
ربيع بوشامة



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Agro-Vétérinaires
Option : Microbiologie Médicale Vétérinaire

Thème :

**La leptospirose chez les bovins dans la région de Sétif :
diagnostic, épidémiologie et contrôle**

Présentée par : M^r BENSEGHIR Hassane

Soutenue le : 17/09/2020

Les membres du jury :

M ^{me} HAFSI F.	Professeur	Présidente	ENSV - Alger
M ^{me} GHALMI F.	Professeur	Rapporteure	ENSV - Alger
M ^{me} AZZAG N.	Maître de Conférences A	Co-Rapporteure	ENSV - Alger
M ^{me} BOUSSENA S.	Maître de Conférences A	Examinatrice	ISVK - Constantine
M ^r KERDJADJ M.	Maître de Conférences A	Examinateur	ESSAIA - Alger
M ^{me} AMARA-KORBA A.	Maître assistante A	Invitée	Institut Pasteur - Alger

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Un grand merci au bon Dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la force pour réaliser ce travail

Mes sincères et chaleureux remerciements vont à :

Ma promotrice Dr. GHALMI F malgré vos multiples occupations, vous avez suivi avec rigueur ce travail, cela ne surprend guère quand on connaît vos qualités humaines, intellectuelles et scientifiques. Je suis également très sensible à la sympathie que vous m'avez témoigné tout au long de mes études. Profonde gratitude, respectueuse considération et vive admiration.

Pr. Hafsi F, de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse, Hommages respectueux.

Un remerciement particulier à M^{me} AMARA-KORBA A, qui m'a accueilli dans son laboratoire, j'espère avoir été à la hauteur de son attente. Qu'elle voit dans cet aboutissement le témoignage de ma grande gratitude. Egalement un grand merci Institut Pasteur d'Algérie pour les allocations de stage.

J'adresse aussi mes plus sincères remerciements :

À ma co-promotrice, Mme AZZAG N, pour son soutien moral, ses encouragements et ses précieux conseils.

Dr BOUSSENA S, d'avoir accepté de faire partie de notre jury. Votre rigueur scientifique et votre sens aigu des relations humaines forcent le respect et l'admiration de tous.

Dr. KERDJADJ M, d'avoir accepté de juger ce travail. Vous avez su nous faire profiter de vos connaissances et compétences dans la science.

Un grand merci à tous mes enseignants de l'ENSV pour les connaissances acquises durant ma formation de graduation et post-graduation. Je tiens également à remercier tous les gens qui ont facilité la réalisation des prélèvements : les vétérinaires privés de la wilaya de Sétif et mon cher ami CHIBANE Ismail.

Je remercie également le Centre National de Recherche en Biotechnologie (CRBt) pour son accueil.

Dédicace

A mes parents, ma femme et mon fils « Youba »

*Qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de
m'encourager durant tout mon cursus.*



Maigres récompenses pour l'immense travail accompli

Que Dieu vous bénisse et vous protège.

A mes frères et mes sœurs

*Pour l'amour qui nous unit. Ce travail est également le fruit de vos
nombreux soutiens.*

Merci pour votre présence, votre aide et tous vos encouragements.

*Que notre fraternité nous unisse toujours dans les joies mais aussi
dans les peines*

Que Dieu vous accorde sa grâce.

A tous mes ami(e)s

En particulier : Ismail, Hamza, Abderrahmane, Djamila, Younes...

*Pour les bons et les difficiles moments passés ensemble ; pour votre
soutient.*



A ma chère patrie, l'Algérie, terre de mes aïeux.

*A tous ceux que je ne saurais citer, mais que je
porte dans mon cœur.*

Résumé

La leptospirose est une maladie infectieuse, zoonotique à distribution mondiale. Elle est classée comme maladie émergente et réémergente responsable de lourdes pertes, tant sur le plan économique que sur la santé humaine et animale. À ce jour, peu d'informations sur la leptospirose bovine sont disponibles en Algérie. Le présent travail s'est donné comme objectif principal, d'apporter une contribution originale à la connaissance de l'infection par *Leptospira* chez le bovin dans la région de Sétif ainsi que des facteurs de risque associés.

Pour cela, 406 sérums bovins appartenant à 48 fermes différentes ont été prélevés, d'une façon aléatoire, durant une période allant de 2015 à 2019. Les sérums ont subi des analyses sérologiques, d'une part, par le test MAT, permettant de révéler la prévalence de 8 sérovars de *Leptospira spp.*, en utilisant une agglutination de 50%, à une dilution $\geq 1:100$ comme seuil de positivité. D'autre part, un test ELISA Indirect commercial a été utilisé afin de déterminer la séroprévalence vis-à-vis de *L. interrogans* sérovar Hardjo. Les résultats obtenus ont indiqué qu'un total de 170/408 bovins se sont révélés positifs par le test MAT à un ou plusieurs sérovars de *Leptospira spp.*, soit une séroprévalence de 41,87% (IC 95% 33.07-46.67%). Le taux de positivité au niveau des fermes s'élève à 89.58% (IC 95% 80.94-98.23%) soit 43 fermes +/48. Le sérovar de *Leptospira* le plus prévalent a été Patoc (32.75 %) pour l'espèce *Leptospira biflexa*, suivi des sérovars de *Leptospira interrogans* : Icterohaemorrhagiae (7.14%) et Hardjo (6.89%) et Canicola (4.43 %), enfin, le sérovar le moins présent était Autumnalis (0,74%).

La séroprévalence de *L. interrogans* sérovar Hardjo obtenue par le test ELISA, était de 31,25% (15/48) (IC 95% 19,95-45,33%) au niveau des fermes et de 5,42% (22/406) (IC 95% 3,61-8,07%) au niveau individuel. La comparaison entre les deux méthodes sérologiques, en considérant le MAT comme test de référence, a montré que le kit ELISA PrioCheck présentait une sensibilité de 57.1% (IC 95% 38.8-75.5%), une spécificité de 98.4% (IC 95% 97.2-99.7%) et une exactitude de 95.6% (IC 95% 93.6-97.6%) et le kappa était de 0,62.

Des informations relatives aux caractéristiques individuelles des animaux ainsi qu'aux pratiques d'élevage ont été recueillies pour étudier les facteurs de risque associés aux infections leptospirosiques. L'analyse par régression logistique multivariable a montré que les bovins s'abreuvant des rivières ont un risque d'exposition plus faible à *Leptospira spp.* (OR 0,51 IC 95% 0,32-0,82%), que les animaux dont la tranche d'âge est comprise entre 3 et 6 ans sont les plus exposés (OR = 9,25 IC 95% 1,19-71,47%) et que la taille du troupeau > 20 têtes (OR = 13,65 IC 95% 1,58-117,7%) et le système semi-intensif (OR = 0,21 IC 95% 0,06-0,82%) semblent avoir une association statistiquement significative avec la séropositivité à *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo ($P < 0,05$).

Enfin, l'étude épidémiologique de type cas-témoin n'a montré aucune association significative entre la positivité vis-à-vis de *L. interrogans* sérovar Hardjo et les avortements présents dans les fermes ou encore avec les vaches ayant avorté.

En conclusion, les séroprévalences obtenues vis-à-vis des différents sérovars de *Leptospira* notamment le sérovar Hardjo, indiquent que ces derniers sont largement distribués dans la région de Sétif et sévissent probablement sous forme d'enzootie instable.

Mots-clés: Zoonose, leptospirose, sérovars, bovins, MAT, ELISA, Sétif, facteurs de risque, avortement, séroprévalence

Abstract

Leptospirosis is an infectious, zoonotic disease with worldwide distribution. It is classified as an emerging and re-emerging disease responsible for heavy losses, both economically and to human and animal health. To date, little information on bovine leptospirosis is available in Algeria. The main objective of this work was to make an original contribution to the knowledge of *Leptospira* infection in cattle and its associated risk factors in the Sétif region in Algeria.

Thus, 406 bovine sera belonging to 48 different farms were, randomly, sampled during a period going from 2015 to 2019. The sera underwent serological analyzes, on the one hand, by the MAT test, making it possible to reveal the prevalence of 8 serovars of *Leptospira* spp., using 50% agglutination, at a dilution $\geq 1:100$ as a cut-off point. On the other hand, a commercial Indirect ELISA test was used to determine the seroprevalence against *L. interrogans* serovar Hardjo. The results obtained indicated that a total of 170/408 cattle were positive by the MAT test for one or more *Leptospira* spp. serovars, with a seroprevalence of 41.87% (95% CI 33.07-46.67%). The positivity rate at the farm level was 89.58% (95% CI 80.94-98.23%) or 43 farms $\pm$ 48. The most prevalent *Leptospira* serovar was Patoc (32.75%) for the *Leptospira biflexa* species, followed by the *Leptospira interrogans* serovars: Icterohaemorrhagiae (7.14%) and Hardjo (6.89%) and Canicola (4.43%). finally, the serovar the least present was Autumnalis (0.74%).

The seroprevalence of *L. interrogans* serovar Hardjo obtained by the ELISA test was 31.25% (15/48) (95% CI 19.95-45.33%) at the farm level and 5.42% (22 / 406) (95% CI 3.61-8.07%) at the individual level. The comparison between the two serological methods, considering the MAT as the reference test, showed that the Prio Check ELISA kit had a sensitivity of 57.1% (95% CI 38.8-75.5%), a specificity of 98.4% (95% CI 97.2 -99.7%) and an accuracy of 95.6% (95% CI 93.6-97.6%) and the kappa was 0.62.

Information on individual animal characteristics as well as husbandry practices was collected to study risk factors associated with leptospirosis infections. Multivariable logistic regression analysis showed that cattle drinking from rivers have a lower risk of exposure to *Leptospira* spp. (OR 0.51, 95% CI 0.32-0.82%), whereas, cows between 3 and 6 years old were the most exposed (OR = 9.25 95% CI 1.19-71.47%). The herd size of > 20 heads (OR = 13.65 95% CI 1.58-117.7%) and the semi-intensive system (OR = 0.21 95% CI 0.06-0.82%) appeared to have a statistically significant association with seropositivity to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo ($P < 0.05$).

Finally, the epidemiological case-control study showed no significant association between positivity towards *L. interrogans* serovar Hardjo and the abortions present on the farms or with the cows having aborted.

In conclusion, the seroprevalences obtained with respect to the various *Leptospira* serovars, in particular the serovar Hardjo, indicate that the latter are widely distributed in the Sétif region, probably, in an enzootic unstable form.

Key words: zoonotic, leptospirosis, serovars, cattle, MAT, ELISA, Sétif, risk factors, abortion, seroprevalence.

ملخص

داء البريميات هو مرض حيواني المنشأ معدّي ينتشر في جميع أنحاء العالم. يصنف على أنه مرض ناشئ وعائد للظهور مسؤول عن خسائر فادحة على الصعيدين الاقتصادي وصحة الإنسان والحيوان. حتى الآن، تتوفر معلومات قليلة عن داء البريميات البقري في الجزائر. الهدف الرئيسي من هذا العمل هو تقديم مساهمة أصلية في معرفة عدوى الليتوسبيريا في الماشية في منطقة سطيف بالإضافة إلى عوامل الخطر المرتبطة بها.

لهذا الغرض، تم أخذ عينات عشوائية من 406 مصل بقري تنتمي إلى 48 مزرعة مختلفة خلال الفترة الممتدة من 2015 إلى 2019. وخضع المصل لتحليلات مصلية، من ناحية، بواسطة اختبار MAT، مما يجعل من الممكن الكشف عن انتشار 8 serovars *Leptospira* spp. باستخدام تراس بنسبة 50 %، عند تخفيف $\leq 1:100$ كنقطة فاصلة. من ناحية أخرى، تم استخدام اختبار ELISA التجاري غير المباشر لتحديد الانتشار المصلي ضد *L. interrogans* serovar Hardjo.

أشارت النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن إجمالي 408/170 من الماشية وجد أنها إيجابية من خلال اختبار MAT لواحد أو أكثر من serovars *Leptospira* spp.، أي معدل الانتشار المصلي بنسبة 41.87 % (95 CI 33.07-46.67). معدل الإيجابية على مستوى المزرعة 89.58 % (95 CI 80.94-98.23) أو 43 مزرعة +/ - 48. المصلي الأكثر انتشاراً هو الباتوك (32.75 %) لأنواع *Leptospira biflexa*، تليها *Leptospira interrogans* serovars: Icterohaemorrhagiae (7.14 %) و Hardjo (6.89 %) و Canicola (4.43 %)، أخيراً، المصلي وكان أقلها حضوراً هو Autumnalis (0.74 %).

كان معدل الانتشار المصلي لـ *L. interrogans* serovar Hardjo الذي تم الحصول عليه بواسطة اختبار ELISA 31.25 % (15/48) (95 CI 19.95-45.33) على مستوى المزرعة و 5.42 % (22 / 406) (95 CI 3.61-8.07) على المستوى الفردي. أظهرت المقارنة بين الطريقتين المصليتين، مع الأخذ في الاعتبار اختبار MAT باعتباره الاختبار المرجعي، أن اختبار PrioCHECK ELISA لديه حساسية 57.1 % (95 CI 38.8-75.5)، وخصوصية 98.4 % (95 CI 97.2-99.7) ودقة 95.6 % (95 CI 93.6-97.6) و كان كبا 0.62.

تم جمع معلومات عن خصائص الحيوانات الفردية وكذلك ممارسات التربية لدراسة عوامل الخطر المرتبطة بعدوى داء البريميات. أظهر تحليل الانحدار اللوجستي متعدد المتغيرات أن شرب الماشية من الأنهار لديها مخاطر أقل للتعرض لـ *Leptospira* spp. (OR 0.51) (95 CI 0.32-0.82)، الحيوانات الذين تتراوح أعمارهم بين 3 و 6 سنوات هم الأكثر تعرضاً (OR = 9.25) (95 CI 1.19-71.47) وحجم القطيع < 20 رأساً (OR = 13.65) (95 CI 1.58-117.7) والنظام شبه المكثف (OR = 0.21) (95 CI 0.06-0.82) (يبدو أن لهما علاقة ذات دلالة إحصائية مع الإيجابية المصلية لـ *Leptospira interrogans* serovar Hardjo $P < 0.05$).

أخيراً، أظهرت دراسة الحالة الوبائية عدم وجود علاقة معنوية بين الإيجابية تجاه *L. interrogans* serovar Hardjo والإجهاض الموجود في المزارع أو مع الأبقار التي تم إجهضت.

في الختام، تشير معدلات الانتشار المصلي التي تم الحصول عليها فيما يتعلق بمختلف مصل لبيتوسبيريا، ولا سيما مصل هاردجو، إلى أن هذا الأخير منتشر على نطاق واسع في منطقة سطيف وربما يكون منتشرًا في شكل إنزوتيا غير مستقرة.

الكلمات المفتاحية: أمراض حيوانية المنشأ، داء البريميات، السيروفار، الماشية، MAT، ELISA، Sétif، عوامل الخطر، الإجهاض، الانتشار المصلي

Tables des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....	1
1 ^{ière} partie : Etude bibliographique	
1 Historique :	4
2 Étiologie de la leptospirose	6
2.1 Systématique.....	6
2.2 Classification	7
2.2.1 Classification sérologique	7
2.2.2 Classification génomique	9
2.3 Biologie des leptospires.....	12
2.3.1 Morphologie des leptospires	12
2.4 Caractéristiques bactériologiques	17
2.4.1 Métabolisme	17
2.4.2 Culture.....	18
2.5 Résistance et habitat	19
2.6 Caractères antigéniques, immunologiques et allergiques.....	19
2.6.1 Propriétés antigéniques	19
2.6.2 Propriétés immunologiques.....	21
2.6.3 Propriétés allergiques	22
3 Pathogénie.....	23
3.1 Conditions de l'infection	23
3.1.1 Facteurs dépendants du pouvoir pathogène des leptospires.....	23
3.1.2 Facteurs dépendants de la réceptivité et de la sensibilité de l'hôte.....	26
3.2 Etapes de l'infection	27
3.2.1 Phase de contamination.....	28

3.2.2	Phase d'invasion.....	29
3.2.3	Phase de colonisation	29
4	Epidémiologie	31
4.1	Epidémiologie descriptive	31
4.1.1	Répartition géographique et prévalence	32
4.1.2	Évolution dans le temps	35
4.2	Epidémiologie analytique	36
4.2.1	Source de l'infection	36
4.2.2	Résistance des bactéries	39
4.2.3	Réceptivité et sensibilité des espèces	40
4.2.4	Voies de pénétration.....	42
4.2.5	Mode de transmission.....	43
5	Manifestations cliniques et lésions.....	45
5.1	Manifestations cliniques chez le bovin.....	45
5.1.1	Forme suraiguë.....	45
5.1.2	Forme aiguë.....	46
5.1.3	Formes subaiguës ou chroniques.....	47
5.2	Manifestations cliniques chez l'humain	48
5.3	Manifestations cliniques chez les autres animaux	50
5.4	Tableau lésionnel.....	51
5.4.1	Lésions macroscopiques.....	51
5.4.2	Lésions microscopiques :	54
6	Diagnostic.....	55
6.1	Données cliniques et éléments épidémiologiques	55
6.2	Diagnostic nécropsique.....	56
6.3	Diagnostic différentiel	56
6.4	Diagnostic de laboratoire.....	56

6.4.1	Examen direct :.....	57
6.4.2	Diagnostic indirect	65
7	Traitement	74
7.1	Antibiothérapies.....	74
7.2	Symptomatiques	75
8	Moyens de lutte	76
8.1	Sanitaires	76
8.2	Médicales (vaccins)	77
8.3	Maîtrise des risques et lutte contre les contaminations humaines	78

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1	La région d'étude	82
2	Description du mode d'élevage bovin dans la région de Sétif.....	82
3	Plan d'échantillonnage et prélèvements.....	83
4	Collecte des prélèvements et conservation.....	85
5	Collecte des données	85
6	Analyses sérologiques	85
6.1	Test ELISA	85
6.1.1	Principe.....	86
6.1.2	Le mode opératoire du kit ELISA du laboratoire PrioCHECK L. HARDJO Ab	87
6.2	Test MAT	88
6.2.1	Le principe général du MAT :.....	88
6.2.2	Le mode opératoire du MAT (Microscopic Agglutination Test).....	89
7	Analyses statistiques	93
7.1	Test de la valeur du risque relatif ou de l'odds ratio	95

Résultats

1	La séroprévalence globale des anticorps spécifiques de <i>Leptospira</i> par le test MAT.....	97
2	Séroprévalence de <i>Leptospira</i> chez le bovin par la technique MAT :	97
2.1	Séroprévalence individuelle globale et par sérovar	97
2.2	Séroprévalence globale au sein des fermes et par sérovar.....	99
2.3	Titre en anticorps obtenus par le test MAT pour 8 sérovars de <i>Leptospira</i>	101
2.4	Fréquence des sérums positifs en fonction du sérovar de <i>Leptospira</i>	102
3	Séroprévalence de <i>L. interrogans</i> sérovar Hardjo par différentes méthodes sérologiques.....	103
4	Comparaison entre les différentes méthodes sérologiques appliquées pour la recherche des anticorps spécifiques de <i>L. interrogans</i> sérovar Hardjo	103
5	Étude des facteurs de risque	104
5.1	Etude des facteurs de risque par le test MAT	104
5.2	Analyse de certains facteurs de risque potentiels susceptibles d'influencer la séroprévalence de <i>Leptospira interrogans</i> sérovar Hardjo	106
6	Étude épidémiologique de type cas-témoin.....	108
6.1	Étude cas-témoin en tenant compte du test MAT.....	108
6.1.1	Étude cas-témoin au niveau de l'exploitation	109
6.1.2	Etude cas-témoin au niveau individuel	110
6.2	Étude cas-témoin en tenant compte du test ELISA	111
6.2.1	Au niveau de l'exploitation.....	111
6.2.2	Étude cas-témoin au niveau individuel	112

Discussion

1	Séroprévalence de <i>Leptospira</i> spp. chez les bovins de la région de Sétif par utilisation du test MAT	115
2	La séroprévalence de <i>L. interrogans</i> sérovar Hardjo chez les bovins dans la région de Sétif :.....	117
2.1	Par le test MAT.....	117
2.2	Par la technique ELISA	118

3	Le sérovar le plus prévalent chez le bovin en Algérie.....	120
4	Comparaison entre les différentes méthodes sérologiques pour la recherche des anticorps spécifiques de <i>L. interrogans</i> sérovar Hardjo	124
5	Étude des facteurs de risque	125
5.1	Étude des facteurs de risque susceptible d'influencer la séropositivité vis-à-vis de <i>Leptospira</i> (résultats du test MAT)	126
5.2	Étude des facteurs de risque associés à une infection par <i>Leptospira interrogans</i> sérovar Hardjo utilisant le test ELISA	127
6	Étude épidémiologique de type cas-témoin : Avortements et séropositivité vis-à-vis de <i>L. interrogans</i> sérovar Hardjo	128
	Conclusion et recommandations.....	135
	Références bibliographiques.....	139
	Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 1: Les sérovars de <i>Leptospira</i> isolés chez l'homme et les animaux.....	5
Tableau 2 : Particularité phénotypique des trois espèces de leptospires connus avant 1987.	7
Tableau 3 : Classification sérologique : Principaux sérogroupes et quelques sérovars de <i>Leptospira interrogans</i> sensu lato.....	9
Tableau 4: Correspondance de quelques Génomospécies de <i>Leptospira</i> et sérogroupes ..	12
Tableau 5: Taille des chromosomes de quelques souches de <i>Leptospira</i> spp.....	17
Tableau 6: Prévalence de la leptospirose bovine dans quelques pays du continent africain.	35
Tableau 7: Réservoirs des différents sérovars présents chez les animaux sauvages et les bovins	38
Tableau 8: Principaux avantages et inconvénients des tests diagnostiques de la leptospirose	73
Tableau 9: Concentration minimum d'inhibition ($\mu\text{g/ml}$) de différents antibiotiques contre <i>Leptospira interrogans</i> sérovars Hardjo et Icterohaemorrhagiae.	74
Tableau 10: Tableau récapitulatif des données sur les fermes étudiées.....	84
Tableau 11: Liste des antigènes vivants utilisés au cours du test MAT.	90
Tableau 12: calcul de l'Odds ratio et le risque relatif.....	95
Tableau 13: Résultats des analyses sérologiques obtenus par différents tests pour la mise en évidence des anticorps spécifiques dirigés contre différents sérovars de <i>Leptospira</i>	97
Tableau 14: Séroprévalence individuelle de huit sérovars de <i>Leptospira</i> mis en évidence par le MAT chez le bovin dans la région de Sétif.	98
Tableau 15: Nombre et taux des sérovars testés sur le nombre total des réactions positive.	99
Tableau 16: Séroprévalence au niveau des fermes de huit sérovars de <i>Leptospira</i> identifiés chez le bovin par le test MAT.	100
Tableau 17: Distribution des titres en anticorps en fonction du sérovar de <i>Leptospira</i> ...	102
Tableau 18: Répartition des sérums positifs en fonction des sérovars identifiés par le test MAT (dilution $\geq 1 : 100$).....	102
Tableau 19: Séroprévalence de <i>L. interrogans</i> sérovar Hardjo en fonction de la méthode sérologique utilisée chez les bovins	103

Tableau 20: Comparaison de l'ELISA PrioCheck avec le MAT pris comme test de référence.....	104
Tableau 21: Séroprévalence et analyse univariée des facteurs de risque associés à la séropositivité vis-à-vis de <i>Leptospira</i> chez les vaches analysées par le test MAT dans la région de Sétif, Algérie.	105
Tableau 22: Analyse de régression logistique multivariable des facteurs de risque associés à la séropositivité vis-à-vis de <i>Leptospira</i> testées par le MAT chez des vaches dans la région de Sétif, Algérie	106
Tableau 23: Séroprévalence et analyse univariée des facteurs de risque associés à la séropositivité de <i>Leptospira interrogans</i> sérovar Hardjo chez les vaches testées par ELISA indirect dans la région de Sétif, Algérie.....	107
Tableau 24: Analyse par régression logistique multivariable des facteurs de risque associés à la séropositivité de <i>Leptospira interrogans</i> sérovar Hardjo chez les vaches testées par ELISA indirect dans la région de Sétif, Algérie.....	108
Tableau 25: Prévalence de <i>Leptospira interrogans</i> sérovar Hardjo chez le bovin en fonction du statut de la ferme, en utilisant le test MAT.....	109
Tableau 26: Étude cas-témoin au niveau de l'exploitation.....	110
Tableau 27: Étude cas-témoin au niveau individuel	111
Tableau 28: étude cas-témoin au niveau de l'exploitation.....	112
Tableau 29: Étude cas-témoin au niveau individuel	112

Liste des figures

Figure 1: L'observation originale de Stimson de Spirochètes dans le tissu rénal	4
Figure 2 : La classification des leptospires	7
Figure 3: Arbre phylogénique	11
Figure 4: Observation des leptospires au microscope électronique à balayage	13
Figure 5: Observation des leptospires au microscope à fond noir	13
Figure 6: Morphologie de leptospire.....	14
Figure 7: Ultrastructure de <i>Leptospira spp.</i>	14
Figure 8: Structure de la paroi de <i>Leptospira interrogans</i>	15
Figure 9: constituants du moteur flagellaire des leptospires	16
Figure 10: Représentation schématique de l'architecture et la composition de la paroi des leptospires (non exhaustive).....	21
Figure 11: Les différentes étapes de l'infection par des leptospires	28
Figure 12: Schéma de variabilité de réponse immunitaire face à une infection leptospirosique	31
Figure 13: Incidence annuelle de la leptospirose humaine dans le Monde.....	33
Figure 14: Nombre de cas testés et confirmés par le MAT de la leptospirose humaine en Algérie.....	34
Figure 15: Cycle de transmission des leptospires entre les espèces de maintien (réservoirs) et les hôtes accidentels.	37
Figure 16: Biofilm de <i>L. biflexa</i> au niveau d'une interface eau/air vu au microscope	40
Figure 17: Transmission de la leptospirose entre les espèces réservoirs et les hôtes accidentels et risque associé.....	45
Figure 18: Les symptômes de la leptospirose humaine	50
Figure 19: Des lésions hémorragiques sur la surface des reins d'un animale infecté par le sérovar Canicola.....	52
Figure 20: Lésion en foyer pâle entourée d'hyperémie sur un rein de bovin infecté par le sérovar Hardjo	53
Figure 21: Hémorragie pulmonaire chez un cochon d'inde infecté par une souche de <i>Leptospira interrogans</i> sérovar Copenhageni	53
Figure 22: Coupe histologique de rein d'un hamster infecté par une culture de leptospires dérivée de <i>L. Kirschneri</i>	55

Figure 23: Chronologie d'apparition des leptospires dans les différents liquides biologiques et évolution des possibilités de diagnostic de la leptospirose en fonction du temps	57
Figure 24: Les différentes observations microscopiques directes ou après colorations des leptospires.....	60
Figure 25: Réaction de polymérisation	65
Figure 26: La courbe cinétique des anticorps anti-leptospires.....	66
Figure 27: Image d'une réaction de microagglutination avec des antigènes vivants par microscope sur fond noir.....	67
Figure 28: Test ELISA indirect.....	70
Figure 29: Prophylaxie sanitaire en vue de réduire l'exposition à la leptospirose animale et humaine.	79
Figure 30: Carte géographique de la wilaya de Sétif, Algérie	83
Figure 31: La trousse PrioCHECK™ L. hardjo Ab Strip Kit utilisée dans l'étude	86
Figure 32: Plaque finale d'ELISA après l'additionnement de TNB et la solution d'arrêt. 88	
Figure 33: Paillasse et chambre de lecture du résultat sous le microscope à fond noir réservés pour le test MAT.	89
Figure 34: Exemple d'une réaction d'agglutination positive.....	91
Figure 35: Témoin négatif (réaction négative).....	91
Figure 36: MAT qualitatif.....	92
Figure 37: MAT quantitatif.....	93
Figure 38: Pourcentage des sérovars de <i>Leptospira</i> sur un total des 170 sérums positifs. 98	
Figure 39: Pourcentage des 8 sérovars sur le nombre total des réactions positives	99
Figure 40: Séroprévalence au niveau des exploitations de <i>Leptospira</i> par sérovar chez le bovin dans la région de Sétif.....	101
Figure 41: La distribution des sérovars dominants de <i>Leptospira</i> chez les bovins dans le monde.....	122

INTRODUCTION GENERALE

Introduction :

La leptospirose est une zoonose, représentant un problème de santé publique mondial, avec une morbidité et une mortalité très élevées (Levett, 2001). Il s'agit d'une maladie infectieuse émergente et réémergente qui touche les zones chaudes et humides et sévit sur tous les continents soit de façon endémique, soit sous forme de cas groupés (anadémies) (Houpikian et al., 2002). Cette maladie est causée par une bactérie de forme spiralée, le leptospire, qui appartient au phylum des spirochètes et constitués de bactéries saprophytes et pathogènes. *Leptospira interrogans* est l'espèce pathogène, qui infecte l'homme ainsi que les animaux sauvages et domestiques (Ko et al., 2009).

La dissémination de ce pathogène se produit principalement par les urines, des principaux réservoirs (rongeurs) et d'autres animaux accidentels, directement ou indirectement via l'eau contaminée (Levett, 2001). Les espèces de *Leptospira* renferment environ 300 sérovars regroupés en 28 sérogroupes (Saito et al., 2013). Parmi tous les sérovars, *Leptospira interrogans* sérovars Hardjo et Pomona sont considérés comme les principaux sérovars responsables de la leptospirose chez les bovins (Lilenbaum et Martins, 2014). La leptospirose bovine est une maladie qui évolue le plus souvent sous forme chronique ou subclinique (Sakhaee et al., 2010), elle est caractérisée principalement par des troubles de la reproduction comme les avortements, les mortinatalités ou encore des fausses mises basses. D'autres signes peuvent accompagner ces troubles, il s'agit des pertes de poids, des mammites et des diminutions dans la production laitière (Quinn et al., 1994 ; Faine et al., 2000 ; Bahari et al., 2011). Des avortements sporadiques sont souvent décrits lors des infections par le sérovar Hardjo. Les épisodes épidémiques d'avortement sont plutôt liés aux sérovars Pomona ou Grippotyphosa (Grooms, 2006). Les sérovars Pomona et Hardjo sont les plus fréquents chez le bétail conduisant à un avortement durant le dernier trimestre de la gestation (Guitian et al., 2001).

En dépit de la disponibilité de nombreux tests de laboratoire réservés au diagnostic de la leptospirose, les méthodes sérologiques (MAT) restent actuellement le plus utilisées pour confirmer le diagnostic (Ahmad et al., 2005).

Plusieurs études ont été menées dans de nombreux pays du monde afin de déterminer la prévalence de l'infection par *Leptospira spp.* chez les bovins. Ces dernières ont montré des taux de prévalence individuelle variant de 3% à 50% (Savalia et Pal, 2008 ; Schoonman et Swai, 2010). Selon la littérature, les facteurs de risque le plus fréquemment associés à la

leptospirose chez bovins sont l'âge des vaches, la taille du troupeau, la présence de chiens dans les élevages, les sources d'eau contaminées, l'élevage traditionnel, l'introduction de nouveaux animaux dans l'élevage et enfin, le matériel de trempage insalubre (Chiebao et al., 2015 ; Ryan et al., 2012 ; Miyama et al., 2018). Néanmoins, ces facteurs de risque sont très variables selon les régions (Parvez et al., 2015 ; Favero et al., 2017 ; Ismail et al., 2019).

En Algérie, une seule étude sérologique sur la leptospirose bovine a été menée dans la région d'Alger (Derdour et al., 2017). Ce travail a pour objectif principal de faire un état des lieux de la situation vis-à-vis de cette pathologie dans une autre région du pays située à l'Est plus précisément la région de Sétif.

La première partie de ce travail visait à fournir des informations préliminaires sur la séroprévalence de *L.interrogans* sérovar Hardjo par la technique ELISA dans différentes exploitations bovines de la région de Sétif afin de situer le rôle du bovin comme réservoir potentiel zoonotique et d'estimer le poids réel de cette infection dans la région.

Ensuite, l'objectif était d'estimer la prévalence de huit sérovars de *leptospira spp.* par la technique du MAT, afin d'identifier les sérovars les plus prévalents chez des vaches asymptomatiques dans la région de Sétif, le but était aussi d'identifier les facteurs de risque associés aux sérovars présents.

Un autre objectif important dans ce travail est celui de réaliser une étude épidémiologique de type cas-témoin visant à mettre en évidence un lien causal entre l'existence de bovins séropositifs au sérovar Hardjo et les exploitations présentant de faibles performances de reproduction avec notamment des épisodes d'avortements.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE :

***(Les leptospires et la leptospirose
bovine)***

1 Historique

Les symptômes de jaunisse associés à la leptospirose datent des années 1700 (Faine et al., 1999). En 1886 à Heidelberg en Allemagne, Adolf Weil décrit pour la première fois la maladie de manière claire (La forme aiguë de la leptospirose), caractérisée par une insuffisance rénale accompagnée d'ictère et de néphrite qu'a ensuite été nommée maladie de Weil (Faine et al., 1999). Des rapports cliniques de «jaunisse et fièvre infectieuses» chez les soldats et les travailleurs des égouts ont été documentés mais pendant longtemps il n'y avait aucune connaissance de l'agent causal (Faine et al., 1999). En 1907, par observation à la coloration argentique, Stimson met en évidence pour la première fois dans les reins d'un patient décédé chez lequel on pensait qu'il était atteint de la fièvre jaune, des organismes spiralés (Fig. 1) aux extrémités munies de crochets qu'il nomme *Spirocheta interrogans* (Stimson, 1907 ; Levett, 2001).



Figure 1: L'observation originale de Stimson de Spirochètes dans le tissu rénal (Adler, 2015).

En 1914, Inada et ses collègues ont isolé et cultivé l'agent causal de la leptospirose du sang de mineurs japonais atteints d'un ictère infectieux et l'ont nommé *Spirochaeta Icterohaemorrhagiae* (Inada et al., 1916). Une forme non pathogène a également été trouvée dans l'eau douce et nommée *Spirochaeta biflexa* (Wolbach et Binger, 1914).

Inada et ses collaborateurs ont démontré, entre 1916 et 1918, l'importance du rôle des rats comme réservoirs pour l'infection humaine, l'infection expérimentale, la protection passive du cobaye, les modes d'infection, la distribution de la bactérie dans les tissus et son excrétion ainsi que ses caractéristiques morphologiques (Ido et al., 1917 ; Kobayashi, 2001). En 1917, le terme général de *Spirochaeta* a été remplacé en *Leptospira* par Nuguchi (Levett, 2001). En 1918, Martin et Pettit ont découvert le test de micro-agglutination "Micro Agglutination Test" ou MAT, qu'est toujours la méthode de référence pour le diagnostic sérologique de la maladie (Lamrani, 2008).

Les décennies suivantes ont connu des avancées majeures dans la compréhension de la leptospirose. L'une des plus importantes a sans doute été la reconnaissance de la leptospirose en tant que maladie infectieuse de la majorité des espèces mammifères et l'importance des animaux domestiques comme source d'infection humaine (van Thiel, 1948 ; Alston et Broom, 1958). Des chercheurs hollandais ont rapporté l'isolement d'une première souche canine comme agent de leptospirose chez les animaux domestiques, Hond Utrecht IV (Klarenbeek et Schuffner 1933), qui est la souche type pour le sérovar Canicola. Par la suite, ce n'est qu'en 1938, que la description de l'infection chez le chat et le portage rénale a été décrit pour la première fois (Esseveld et Collier, 1940). En 1940, la maladie a été découverte pour la première fois chez le bovin en Russie, appelée "la fièvre jaune infectieuse des bovins" (Semskov, 1940). Dans les années 1950, la gamme des sérovars et hôtes des animaux se sont considérablement développés (Alston et Broom, 1958) et en 1980 la leptospirose était bien documentée comme une maladie vétérinaire de grande importance économique chez les chiens, les bovins, les porcs, les chevaux et les moutons (Ellis, 1990).

La liste des sérovars de leptospirose s'est allongée au fur et à mesure que les scientifiques ont pris conscience du danger et du potentiel zoonotique de la maladie. Ainsi, les recherches sur la leptospirose se sont multipliées dans la plupart des régions du monde. Un certain nombre de sérovars leptospiraux affectant l'homme et les animaux ont été décrits par ordre chronologique (tableau 1).

Tableau 1: Les sérovars de *Leptospira* isolés chez l'homme et les animaux.

Sérovar	Date	lieu	Hôte
Autumnalis	1918	Japon	Humains
Bataviae	1923	Indonesie	Rongeurs
Grippotyphosa	1928	Russie	Humains
Andaman A	1931	Iles Andaman	Humains
Canicola	1933	Hollande	Chiens
Pomona	1937	Australie	Humains
Australis	1937	Australie	Humains
Hardjo	1958	Les Etats Unies	Bovins

2 Étiologie de la leptospirose

2.1 Systématique

Le terme «Leptospira» vient du grec lepto : fin et spira : torsade.

Les leptospires sont des bactéries appartenant au sous-embranchement des Protozoobacteria, à l'ordre des Spirochètales, cet ordre a longtemps été assimilé aux protozoaires et est désormais considéré comme un ordre à part depuis le milieu du 20^{ème} siècle (Bharti et al., 2003), à la classe des Spirochaetes, au phylum des «Spirochaetes» (fig. 2) (Baraton, 1995).

L'ordre des Spirochaetales est divisé en 4 familles :

- * La famille des Spirochaetaceae comprenant les genres : Spirochaeta, Borrelia (agent de la borréliose de Lyme), Treponema (agent de la syphilis), ainsi qu'un genre issu de Treponema, Serpulina.
- * La famille des Pillotinaeae, comprenant les genres Clevelandina, Cristispira, Diplocalyx, Hollandina, Pillotina, responsables de maladies chez les mollusques et les crustacés (Margulis et Hinkle, 2006).
- * La famille des Brachyspiraceae, comprenant le genre Brachispira.
- * La famille des Leptospiraceae se divise en trois genres (*Leptospira*, *Leptonema* et *Turneria*) (Baraton, 1995).

Historiquement, le genre *Leptospira* était classé en trois espèces :

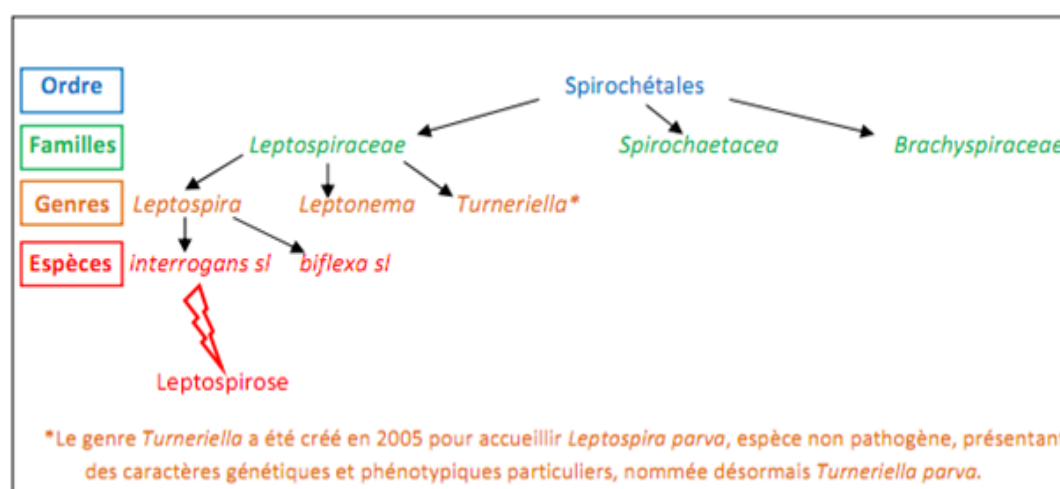
- *Leptospira biflexa* sensu lato, regroupant des souches saprophytes, non pathogènes.
- *Leptospira parva* sensu lato, est une espèce non pathogène, isolée d'un échantillon d'albumine des bovins, de l'utérus de la truie et de l'eau.
- *Leptospira interrogans* sensu lato, regroupant les souches pathogènes pour l'Homme et/ou l'animal, et donc responsables de la leptospirose (Levett, 2001), cette maladie est considérée comme une zoonose plus répandue dans le monde (Ristow, 2007).

Cette distinction se basait sur des critères phénotypiques, et des critères de croissance à 13°C en présence de 8-azaguanine (tableau 2) (Johnson et Faine, 1984).

Tableau 2 : Particularité phénotypique des trois espèces de leptospires connus avant 1987 (d'après Euzeby, 2009).

	<i>L. interrogans</i>	<i>L. parva</i>	<i>L. biflexa</i>
Culture à 13 °C	Non	Non	Oui
Présence de 8-azaguanine	Non	Oui	Oui

La 8-azaguanine est un analogue des bases purines présentant une activité antinéoplasique. Elle fonctionne comme un antimétabolite et est facilement incorporée au sein de l'ADN.

**Figure 2 :** La classification des leptospires (Levett, 2001).

2.2 Classification

Au sein du genre *Leptospira*, deux classifications existent ; la première est basée sur les caractères phénotypiques (antigéniques) et la seconde est fondée sur les critères génotypiques.

2.2.1.1 Classification sérologique

C'est la plus ancienne, datant avant 1987, elle était basée uniquement sur des critères sérotypiques selon la réaction de Martin et Pettit (Denis et al., 2016). Elle reflète l'expression d'épitopes de surface au sein des antigènes du lipopolysaccharide (LPS), élément essentiel de la paroi des bactéries gram-. Elle permet de répartir les souches de leptospires en plusieurs sérovars, qui sont le taxon de base du genre *Leptospira* (Cerquiera et Picardeau, 2009), admis par la communauté scientifique. Il est mis en évidence par des tests d'absorption croisés avec des antigènes homologues (CAAT). En effet, il existe une ou plusieurs souches qui ont un ou plusieurs antigènes à leur surface. Ces antigènes entraînent la production des anticorps agglutinants, non protecteurs qui sont à la base de la

réaction de MAT (microagglutination test) (Hazart et al., 2010). Ce dernier, consiste à l'évaluation de l'agglutination d'une culture de leptospires par un volume égal de sérum hyperimmun de référence (souvent sérum de lapin) (Perolat et Baranton, 1990 ; Gitton, 1992).

Les sérovars possédant des antigènes proches sur leur surface sont classés en sérogroupe. Dans chaque sérogroupe, une ou plusieurs souches de référence permettent la production d'un sérum hyperimmun qui, lors de test par microagglutination (MAT), présente une réactivité élevée avec les autres sérovars du même sérogroupe, et une réactivité croisée faible avec les sérovars de sérogroupe différents (Holzapfel, 2014).

Il existe environ 250 sérovars regroupés en 25 sérogroupe au sein des leptospires pathogènes (*L. interrogans*) (Tableau 3), alors que *L. biflexa* (leptospires saprophytes) n'en rassemble qu'une soixantaine (Levett, 2001).

Tableau 3 : Classification sérologique : Principaux sérogroupes et quelques sérovars de *Leptospira interrogans* sensu lato (Levett, 2001).

Sérogroupe	Sérovars
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni, Lai, Zimbabwe
Hebdomadis	Hebdomadis, Jules, Kremastos
Autumnalis	Autumnalis, Fortbragg, Bim, Weerasinghe
Pyrogens	Pyrogenes
Bataviae	Bataviae
Grippotyphsa	Grippothyphosa, Canalzonae, Ratnapura
Canicola	Canicola
Australis	Australis, Bratislava, Lora
Pomona	Pomona
Javanica	Javanica
Sejroe	Serjoe, Saxkoebing, Hardjo
Panama	Panama, Mangus
Cynopteri	Cynopteri
Djasiman	Djasiman
Sarmin	Sarmin
Mini	Mini, Georgia
Tarasovi	Tarassovi
Ballum	Ballum, Aroborea
Celledoni	Celledoni
Louisiana	Louisiana, Lanka
Ranarum	Ranarum
Manhao	Manhao
Shermani	Shermani
Hursbidge	Hursbidge

2.2.2 Classification génomique

Depuis octobre 1987, la taxinomie des leptospires a totalement changé, une nouvelle classification basée sur la génomique apparaissait suite à l'utilisation de différentes techniques comme l'hybridation ADN-ADN, l'électrophorèse en champ pulsé, l'amplification génétique et la comparaison de séquences partielles des ARN ribosomaux

16S a donné lieu à une nouvelle classification basée sur la génomique (Levett, 2001 ; Morey et al., 2006 ; Picardeau, 2013). A l'aide de ces méthodes, 21 espèces ou « *génomospecies* » ont été identifiées (Denis et al., 2016). Une espèce génomique définit comme le regroupement de souches ayant entre elles un degré d'homologie en hybridation ADN-ADN égal ou supérieur à 70% et un mésappariement inférieur à 5% parmi les hybrides (Kang et al., 2007).

A l'heure actuelle, plus de 300 sérovars distincts du genre *Leptospira* sont reconnus et regroupés en 21 *génomispecies* (Ko et al., 2009 ; Saito et al., 2013). Ces dernières sont classées en trois sous-groupes : Les pathogènes (regroupant neuf espèces génomiques), les saprophytes (six espèces génomiques) et les intermédiaires (six espèces génomiques) (fig. 3) (Cerqueira et Picardeau, 2009).

Même si cette classification génotypique apparaît comme intéressante, elle présente toutefois des confusions avec la classification sérologique. En effet, tous les sérovars d'un même séro groupe n'appartiennent pas à la même espèce ou génotype, chaque espèce est constituée de souches appartenant à plusieurs sérogroupes et les souches d'un même sérovar peuvent être réparties entre différentes espèces (Levett, 2001 ; Euzeby, 2009). Par exemple, le séro groupe « *Icterohaemorrhagiae* » est présent dans les espèces *Leptospira interrogans* et *Leptospira Kirschneri* (Tableau 4). Pour éviter la confusion, il a été proposé l'utilisation de la terminaison sensu lato pour les souches dans la classification sérologique et la terminaison sensu stricto pour les souches de la nouvelle classification (Legrand, 2007). Malgré que la classification sérologique n'a pas un statut taxonomique reconnu, elle a une grande importance dans les études cliniques et épidémiologiques car les sérovars sont généralement associés à un réservoir animal spécifique. Par exemple, les rats et les chiens sont généralement les hôtes respectifs des sérovars *Icterohaemorrhagiae* et *Canicola* (Bharti et al., 2003 ; Denis et al., 2016).

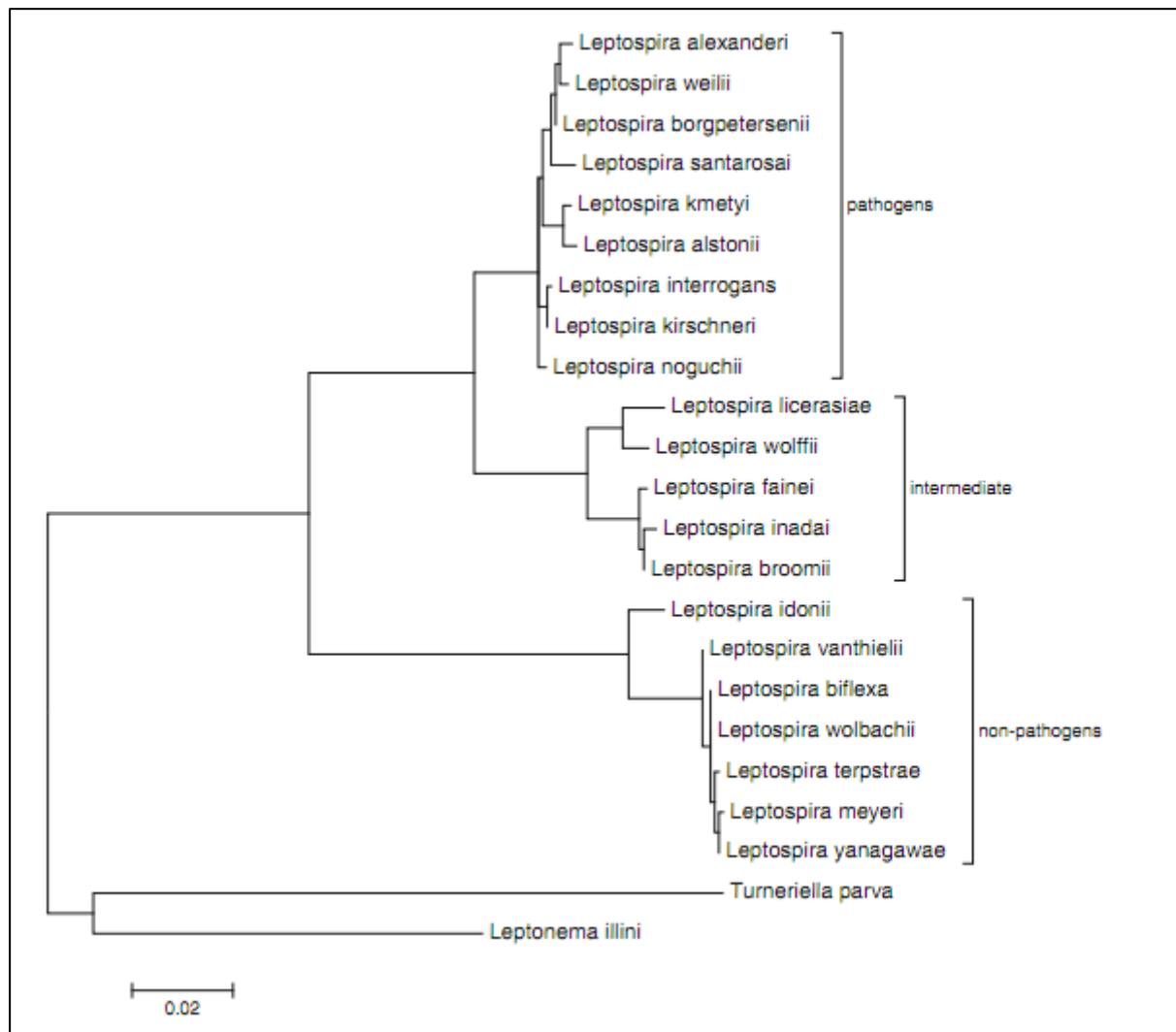


Figure 3: Arbre phylogénique.

Tableau 4: Correspondance de quelques Génomospécies de *Leptospira* et sérogroupes (Levett, 2001).

Génomospécies		Sérogroupe
<i>L. interrogans</i>	Pathogènes	Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Grippotyphosa, Djasiman, Hebdomadis, Sejroe, Bataviae, Ranarum, Louisiana, Mini, Sarmin
<i>L. noguchii</i>		Panama, Autumnalis, Pyrogenes, Louisiana, Bataviae, Tarassovi, Australis, Shermani, Djasiman, Pomona
<i>L. weilii</i>		Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Sarmin, Javanica, Mini, Tarassovi, Hebdomadis, Pyrogenes, Manhao, Sejroe,
<i>L. santarosai</i>		Shermani, Hebdomadis, Tarassovi, Pyrogenes, Autumnalis, Bataviae, Mini, Grippotyphosa, Sejroe, Pomona, Javanica, Sarmin, Cynopteri
<i>L. borgpetersenii</i>		Javanica, Ballum, Hebdomadis, Sejroe, Tarassovi, Mini, Celledoni, Pyrogenes, Bataviae, Australis, Autumnalis
<i>L. alexanderi</i>		Manhao, Hebdomadis, Javanica, Mini
<i>L. kirschneri</i>		Grippotyphosa, Autumnalis, Cynopteri, Hebdomadis, Australis, Pomona, Djasiman, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Bataviae
<i>L. fainei</i>	Intermédiaires	Hursbridge
<i>L. inadai</i>		Shermani, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Manhao, Canicola, Panama, Javanica
<i>L. bifexa</i>	Non Pathogènes	Semarranga, Andamana
<i>L. meyeri</i>		Ranarum, Semarang, Sejroe, Mini, Javanica
<i>L. wolbachii</i>		Codice

2.3 Biologie des leptospires

2.3.1 Morphologie des leptospires

2.3.1.1 Morphologie externe générale

Les leptospires ne prennent pas la coloration Gram, vu la structure particulière de leur paroi. Ainsi, en raison de sa morphologie mince et de sa motilité rapide, l'observation des leptospires est difficile sur microscopie optique normale, la bactérie est mieux visualisée en utilisant un microscope à fond noir ou à contraste de phase (Fig. 4). Les leptospires sont les plus petits spirochètes connus, ce sont en effet des bactéries hélicoïdales, extrêmement fines et flexibles (Ellis, 1981), leur taille est comprise entre 6 à 25 µm de long et ont un diamètre de 0,20 µm (Bharti et al., 2003), la forme est spiralée, constituée de vingt à trente hélices très serrés, dont l'amplitude est varié de 0,1 à 0,15 µm et le pas (longueur d'onde)

est en moyen de 0,5 μm , le corps est incurvé à ses deux extrémités pour former des crochets, ces dernières peuvent temporairement rester droites (Fig. 5, 6) (Faine et Stallman, 1982 ; Levett, 2001).

Un endoflagelle est ancré dans la membrane interne à chaque extrémité de la cellule et il se prolonge jusqu'au centre de la cellule sans se chevaucher. La rotation de l'endoflagelle est responsable de la mobilité des bactéries en trois mouvements différents : De translation, la rotation et l'allongement (Bharti et al., 2003). Les souches pathogènes (*Leptospira interrogans*) et les souches saprophytes (*Leptospira biflixa*) possèdent une morphologie similaire, même si en générale les souches pathogènes sont légèrement plus courtes que les saprophytes (Cullen et al., 2005).

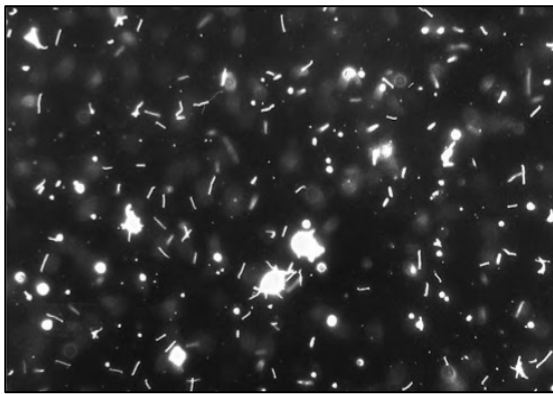


Figure 4: Observation des leptospires au microscope à fond noir (Gillespie et Hawkey, 2006).

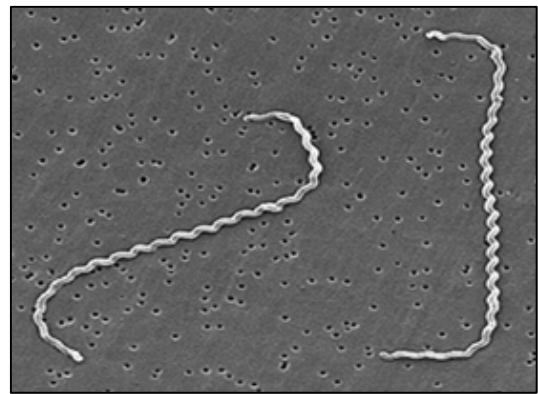


Figure 5: Observation des leptospires au microscope électronique à balayage (Levett, 2001).

2.3.1.2 Ultrastructure microscopique

La microscopie électronique révèle trois composants structuraux essentiels communs aux spirochètes : l'enveloppe externe, les flagelles et le cylindre protoplasmique (fig. 6, 7).

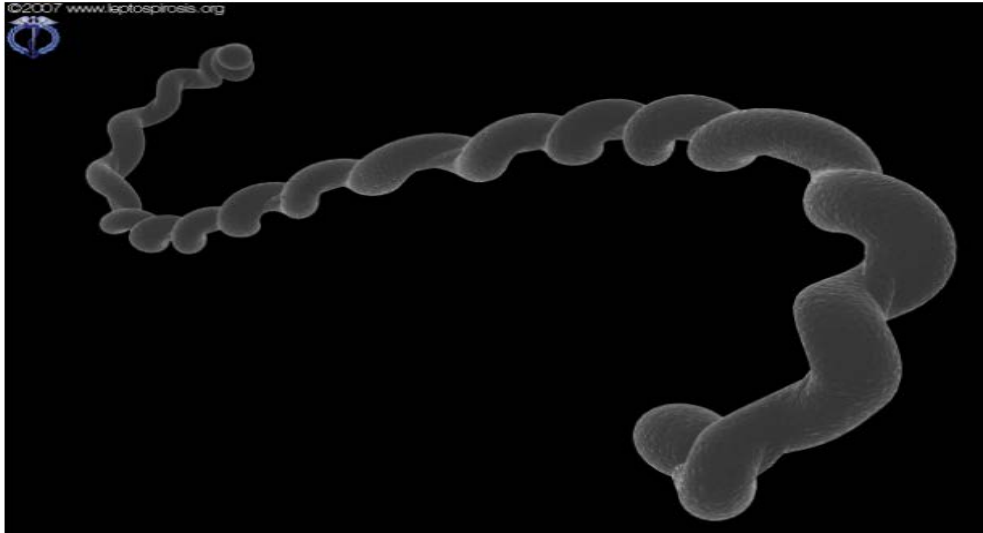


Figure 6: Morphologie de leptospire. Cette image, générée dans le programme de dessin 3DS Max, est basée sur des mesures directes (Source : The Leptospirosis Information Centre).

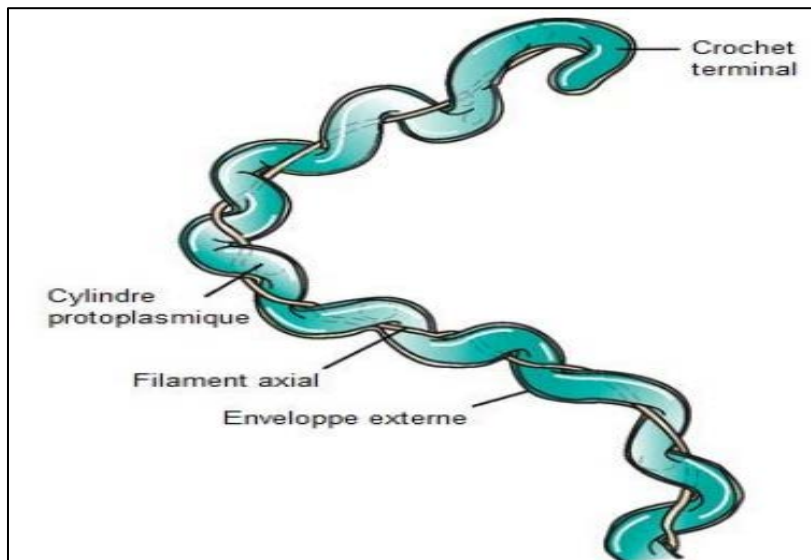


Figure 7: Ultrastructure de *Leptospira* spp. d'après (Greene, 2012).

- **L'enveloppe externe :**

L'enveloppe externe engainant toute la bactérie, avec une structure trilamellaire, élastique, souple mais assez peu résistante, mesurant de 10 à 11 nm d'épaisseur (Auran et al., 1972). Elle est constituée de lipopeptides exposées à la surface (dont LipL32, LigA, LigB, Loa22), mucopéptides antigéniques, de porines transmembranaires (les porine OmpL1 et LipL41 ont un pouvoir antigénique), de Lipopolysaccharides (LPS) (fig. 8) (Haake et al., 2000). Le LPS de la membrane externe se rapproche de celui des bactéries Gram- et constitue l'antigène majeur des leptospires, son lipide A est cependant de plus petite taille et moins endotoxinique, il sert d'ancrage dans la membrane bactérienne, d'un core

oligosaccharidique conservé, et d'un oligosaccharide ou polysaccharide appelé antigène O (Raetz et Whitfield, 2002).

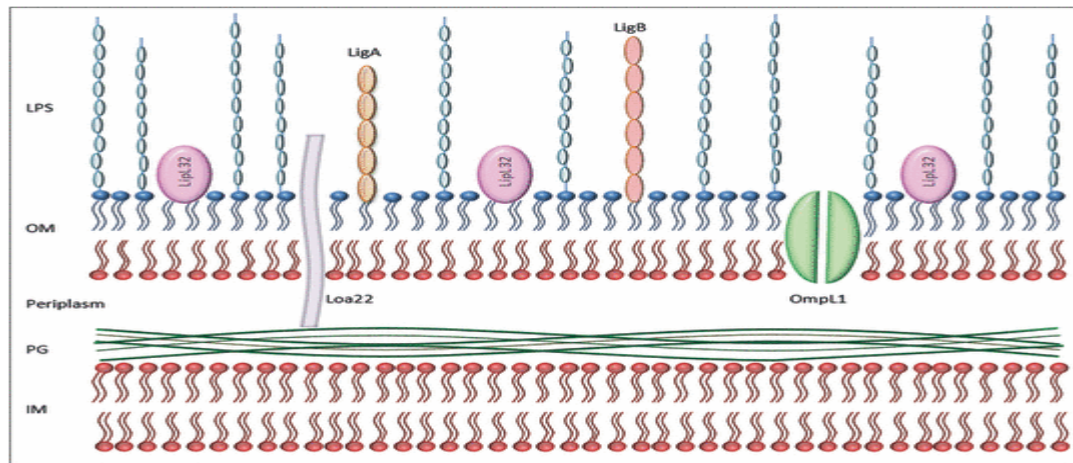


Figure 8: Structure de la paroi de *Leptospira interrogans* (Fraga et al., 2011).

Légende : La membrane externe (OM : outer membrane) qui est recouverte Les protéines de surface (LipL32, LigA, LigB and Loa22), la protéine transmembranaire (OmpL1 : outer membrane porin L1), et le lipopolysaccharide sont les composants principaux de la membrane externe. La membrane interne (IM : inner membrane) est intimement liée au peptidoglycane cellulaire.

- **Les flagelles (filaments axiaux) :**

Les endoflagelles sont situés à chaque extrémité libre du cylindre protoplasmique et se rejoignent dans la partie médiane du leptospire (Levett, 2001 ; Bharti et al., 2003). Ils sont au nombre de deux, mais il arrive que certains leptospires possèdent 3 filaments axiaux, deux étant situés à une même extrémité et le troisième à l'autre bout (Chang et Faine, 1970). Les endoflagelles ont un diamètre de 0,01- 0,02µm et sont fixés par un corps basal et entrelacés avec le cylindre protoplasmique. Ils correspondent à l'appareil locomoteur de la bactérie et permettent aux leptospires la réalisation des mouvements de contraction et de rotation. Cette particularité permet aux leptospires des déplacements dans des milieux visqueux et semi solide.

La cryo-tomographie électronique et la reconstruction tridimensionnelle des données collectées ont montré que le moteur flagellaire se compose : du crochet, de tige, des anneaux L et P associés à la tige, d'anneau MS (membrane et supra-membrane), d'anneau du corps, d'anneau C et d'appareil d'exportation (Fig. 9) (Raddi et al., 2012). Ces deux derniers composants sont plus complexes que tous les moteurs bactériens identifiés à ce jour. Le diamètre d'une partie de l'appareil d'exportation encastrée dans la membrane

cytoplasmique est plus grand que ceux présents chez d'autres bactéries, y compris les spirochètes (Raddi et al., 2012).

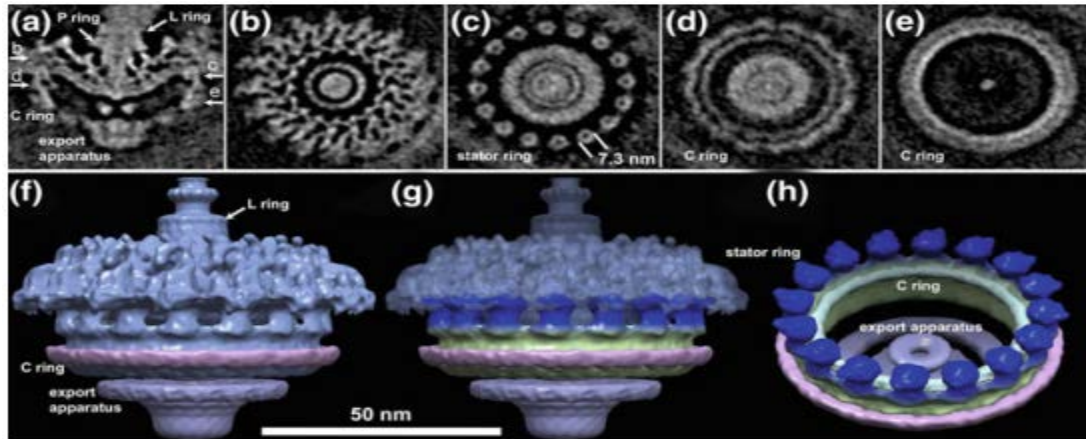


Figure 9: constituants du moteur flagellaire des leptospires : une section centrale parallèle à la direction du filament flagellaire, des coupes horizontales, f – h un dessin de surface du moteur flagellaire (Raddi et al., 2012).

- **Le cylindre protoplasmique :**

C'est le corps cellulaire des leptospires, il est de forme hélicoïdale et entouré par une membrane peptidoglycique trilamellaire avec une couche la plus externe aussi large que la couche interne, le peptidoglycane interviendrait dans la stimulation de la phagocytose, et la production de cytokine par les monocytes (Cinco et al., 1996). Il est d'épaisseur de 7 nm (Legrand, 2007). Le protoplasme est composé d'un cytoplasme sans mitochondries, de ribosomes, un noyau et de matériel nucléaire (deux chromosomes circulaires de taille inégale 4 500 kb et 350 kb) (Andre-Fontaine, 2003).

2.3.1.3 Morphologie des leptospires en division

La division bactérienne est débutée par l'apparition de deux nouveaux courts filaments axiaux insérés l'un près de l'autre dans la partie médiane de la bactérie. Chaque nouveau filament axial est orienté vers les extrémités subterminales de la bactérie et vers celle du flagelle plus âgé correspondant. Ensuite, il y a invagination de la membrane peptidoglycique entre les deux filaments nouvellement formés entraînant la séparation des deux nouvelles cellules à l'intérieur d'une enveloppe commune. Enfin, la séparation aura lieu des deux nouvelles cellules après invagination de l'enveloppe externe (Hovind-Hougen, 1981).

2.3.1.4 Particularité génétique des leptospires

Les premières caractérisations moléculaire du génome de *Leptospira* ont été effectuées par des équipes chinoises qui ont séquencé le génome de *L. interrogans* sérovar Lai, agent de leptospirose rurale en 2003, puis suivi par un autre séquençage du génome de *L. interrogans* sérovar Copenhageni, agent de la leptospirose urbaine épidémique, par une équipe brésilienne en 2004 (Ren, 2003 ; Nascimento, 2004). Les deux équipes ont montré combien les génomes étaient hautement conservés entre les 2 sérovars. Les leptospires pathogènes présentent deux chromosomes circulaires de taille inégale ; le grand chromosome est un plasmide et le petit chromosome n'est pas un plasmide du fait qu'il contient le gène *asd* codant pour l'enzyme aspartate bêta semi-aldéhyde déshydrogénase employée dans la biosynthèse des acides aminés et de la paroi (Euseby, 2009). Le génome possède un Guanine-Cytosine (G+C) qui varie de 35 à 41 (tableau 5). Un plasmide et un bactériophage, deux réplicons circulaires d'une taille de 74 kb ont aussi été décrits chez le saprophyte *L. biflexa* (Saint-Girons, 1990 ; Picardeau, 2008).

Tableau 5: Taille des chromosomes de quelques souches de *Leptospira spp.*(Alder, 2015).

<i>Leptospira spp.</i> (souche)	Source ou Hôte	Taille du génome (Million paires de bases)	Pourcentage du G+C (%)
<i>L. borgpetersenii</i> (I.550)	Humains (Australie)	~ 3.9	40.2
<i>L. borgpetersenii</i> (JB 197)	Bovin (Les états unis)	~ 3.9	40.2
<i>L. interrogans</i> (Lai 56601)	Humains (Chine)	~ 4.7	35.1
<i>L. biflexa</i> (Paris)	L'eau (Italie)	~ 4.0	38.9

2.4 Caractéristiques bactériologiques

2.4.1 Métabolisme

Les leptospires sont des bactéries aérobies strictes, catalase positive et/ou oxydase positive et chimio-organotrophe (Levett, 2001), qui utilisent des acides gras insaturés à longue chaîne (au moins 14 atomes de carbone) comme seule source de carbone et d'énergie et sont apportés par l'hydrolyse des esters de Tween 80, métabolisés ensuite par β oxydation, ces acides gras deviennent toxique lorsqu'ils sont présents en trop grande quantité. Les sources d'azote sont l'ammoniac et les sels d'ammonium, ainsi que l'urée. Ils sont incapables de métaboliser les glucides (Berech, 1989). Les leptospires n'incorporent pas

les bases pyrimidiques et l'adjonction de 5-fluoro-uracile (100 µg/mL) est mise à profit pour rendre partiellement sélectifs les milieux de culture (Euzeby, 1999). Le phosphate, calcium, magnésium, fer ferreux Fe 2+ et parfois apport de sodium (pour les bactéries halophiles), des nutriments (la thiamine, la vitamine B12, le tryptophane, la proline, l'acide aspartique, l'acide glutamique...) sont des facteurs de croissances indispensables (Levett, 2001).

2.4.2 Culture

Les leptospires sont des bactéries fragiles et leur culture *in vitro* est très difficile et lente nécessitant des conditions particulières, ce qui a incité Ellinghausen et McCullough de créer en 1965 un milieu de culture appelé le milieu d'EM (Cinco, 1981). Ce milieu a ensuite été modifié par Johnson et Harris, qui est maintenant connu sous le nom de tween-albumine ou d'Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (milieu EMJH) et est le milieu le plus utilisé actuellement par les laboratoires (Ristow, 2007). Le milieu EMJH présente dans sa composition le Tween 80 comme source d'acides gras et l'albumine sérique bovine comme détoxifiant (Ellinghausen et McCullough, 1965 ; Johnson et Harris, 1967). L'ajout de certaines substances comme la néomycine, du sulfathiazole et de la cycloheximide a permis d'éviter la contamination par d'autres bactéries surtout en médecine vétérinaire où les bactéries contaminantes sont plus abondantes.

Les leptospires ont un temps de génération lent, environ 5 heures, temps de doublement pour les sérovars saprophytes, tandis que 20 heures pour les sérovars pathogènes (Faine, 1999). La croissance des souches pathogènes est inhibée par la 8-azaguanine (un analogue de la purine), alors que la croissance des souches saprophytes n'est pas modifiée en présence de ce composé (Johnson et Rogers, 1964). Par conséquent, la culture est lente et difficile et la durée d'incubation est de 3 à 4 semaines voire plusieurs mois pour les sérovars pathogènes (Evangelista et Coburn, 2010), alors que les sérovars saprophytes est de quelques jours (Cinco, 1981). En pratique, l'isolement du leptospire sérovar Hardjo à partir de l'hôte prend 3 à 4 mois. Les colonies se développent sous la surface du milieu. La croissance optimale s'effectue à une température de 28°C à 30°C (avec des extrêmes de 13°C et 37°C), une plage de pH optimale pour la croissance est de 7,2 à 7 et en semi-obscurité (Adler et De la Peña, 2010).

L'azote liquide permet le stockage des cultures de leptospires à long terme et la conservation de la virulence des souches (Adler et De la Peña, 2010).

2.5 Résistance et habitat

Les agents physico-chimiques suivants ont un effet létal sur les leptospires : la dessiccation, les rayons ultraviolets (UV), les métaux lourds létaux (sauf fer ferreux), et les détergents. Les leptospires présentent une sensibilité à la désinfection classique et l'usage d'antiseptiques. Elles se conservent bien à des températures très basses : 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).

Les leptospires survivent à pH neutre ou alcalin, avec une faible salinité, dans des milieux comme : la boue, les marécages, les marais, les eaux saumâtres, les ruisseaux et rivières, les organes et les tissus d'animaux morts, le lait dilué et l'urine alcaline. Ils vivent quelques semaines dans de l'eau douce à l'abri des UV à pH neutre, dans les tissus d'un hôte mort environ 48h. La présence d'un hôte réservoir semble ainsi nécessaire à la pérennisation de la bactérie (Holzapfel, 2014).

2.6 Caractères antigéniques, immunologiques et allergiques

2.6.1 Propriétés antigéniques

Les différents constituants de la bactérie ont des propriétés antigéniques, principalement les constituants de la paroi (fig. 8 et 10).

En premier lieu, Le lipopolysaccharide (LPS) ou le lipopolyoside-like-Substance « LLS » qui est le composant lipidique principal de la couche externe de la membrane externe des leptospires qu'est l'antigène majeur, sa constitution est proche de celle du LPS « lipopolysaccharide » des bactéries à gram- mais sans même effet endotoxinique (Perolat et Baranton, 2000). Il est composé d'un lipide A (responsable de l'activité endotoxinique et servant d'ancrage dans la membrane bactérienne), d'un core oligosaccharidique conservé, et d'un oligosaccharide appelé antigène O. Ces épitopes ont une répartition qui varie selon les sérovars. L'utilisation d'anticorps monoclonaux vont permettre d'établir des schémas de classification des sérovars par réaction d'agglutination (Guerreiro et al., 2001). Ainsi, les anticorps à action agglutinante produits contre les déterminants antigéniques du LLS sont spécifiques d'un sérovar, au mieux d'un séro groupe. Ces lipopolysaccharides sont les immunogènes majeurs au cours de l'infection humaine et sont de plus en mesure d'induire une protection de courte durée chez le hamster. Le LLS active les macrophages via le récepteur Toll-Like-Receptor 2 (TLR 2) alors que les bactéries GRAM négatif activent le (TLR4) (Bharti et al., 2003), la structure

inhabituelle du lipide A est un des facteurs contribuant à la sensibilité de certains hôtes aux leptospires : il rend impossible la détection des leptospires via les récepteurs Toll-Like 4 (TLR4) (Nahori et al., 2005).

Le LPS possède une activité cytotoxique directe en induisant la libération de médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages (Interleukine 1, Tumor Necrosing Factor alpha, interféron). Ce mécanisme est déclenché lorsque la bactérie se lie à une protéine sérique LBP (lipopolysaccharide bonding protein), qu'elle-même se lie au récepteur CD14 des macrophages (Cinco et al., 1996 ; Greene, 2012). Ces cytokines ont un rôle important dans la réponse inflammatoire contre les leptospires. Le LPS possède aussi une action inhibitrice des pompes Na⁺/K⁺ ATPases du rein (Younes et al., 1995).

Des protéines transmembranaires de la membrane externe sont exprimées lors d'infections par exemple :

_ Les protéines LigA et LigB (protéines immunoglobulin-like) retrouvées exclusivement à la surface des espèces pathogènes. Ce sont des protéines potentiellement immunogènes. Des études récentes ont mis en évidence l'efficacité de vaccins produits à partir de Lig recombinant chez des modèles animaux (Haake et al., 2000 ; Bharti et al., 2003 ; Choy et al., 2007).

_ Les LipL32 et LipL4 sont des lipoprotéines de la couche externe de la paroi, induisant une réponse immunitaire humorale, ils sont la base de techniques de diagnostic immunologique (Harkin et al., 2003). La LipL32 est aussi appelée Hap-1 (haemolysis-associated protein), et représente 75 des lipoprotéines de la membrane externe. Cette lipoprotéine est hautement conservée parmi les leptospires pathogènes, elle a un rôle important lors de la phase aigüe des infections létales (Ko et al., 2009) , elle est potentiellement impliquée dans la colonisation (Murray, 2013).

_ La porine OmpL1 est la première protéine de la membrane externe et transmembranaire décrite, elle est hautement conservée chez les leptospires pathogènes et est capable d'induire une réponse immunitaire protectrice (Adler et Faine, 1977).

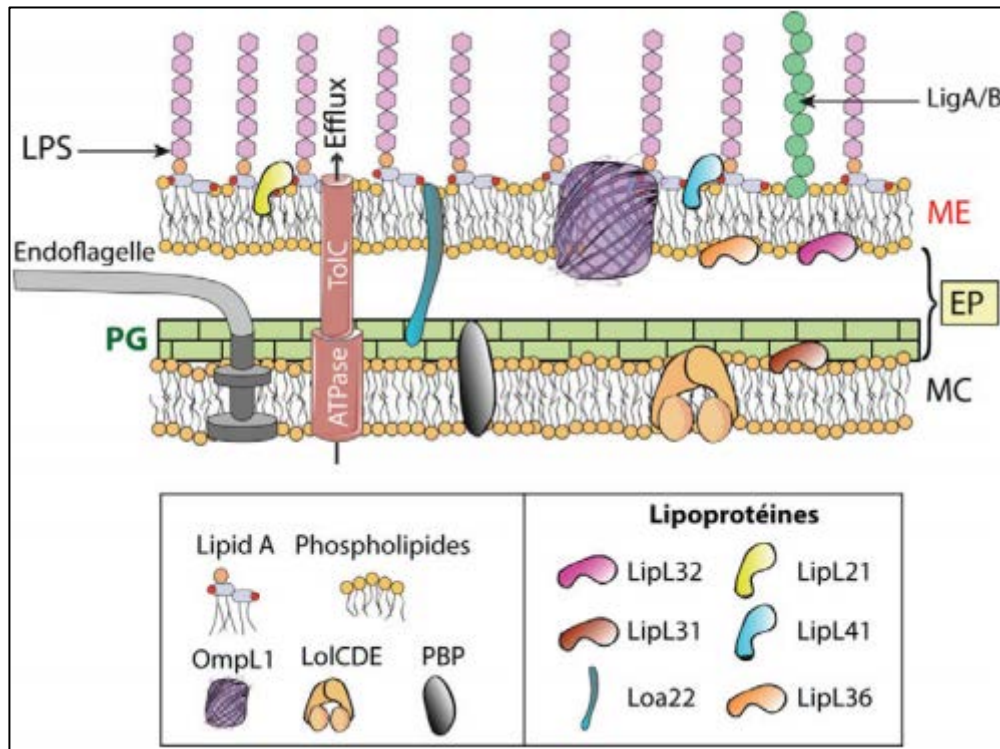


Figure 10: Représentation schématique de l'architecture et la composition de la paroi des leptospires (non exhaustive) (Ratet, 2015).

2.6.2 Propriétés immunologiques

Les auteurs se contredisent sur les propriétés immunologiques des leptospires. Pour certains, l'immunité qui se met en place après un contact avec les leptospires est uniquement humorale, alors que pour d'autres elle est à la fois humorale et cellulaire.

Pour la majorité des associations hôtes-sérovars, l'immunité mise en place est de type humoral et se transmet passivement via le placenta, le colostrum ou le sérum.

En premier abord, d'après (Andre-Fontaine et Ganiere, 1992 ; Naiman et al., 2001), l'immunité contre la leptospirose n'est pas seulement humorale mais également cellulaire, leurs études montrent qu'un animal vacciné et contrôlé sérologiquement par la méthode de référence actuelle (test de microagglutination) peut n'avoir développé qu'un titre modéré alors qu'il résiste à l'épreuve virulente, donc la réponse cellulaire est induite par la vaccination.

La réponse immunitaire humorale se déroule en deux temps par la production de deux types d'anticorps, le premier temps est caractérisé par la production d'une vague d'IgM (Immunoglobulines M), qui sont dirigés contre les antigènes spécifiques et non spécifiques des sérovars présents à la surface externe des spirochètes. Ils arrêtent la prolifération des

leptospires sans cependant détruire les populations bactériennes présentes (Kossey-Vrain, 2004). Dans un second temps, on a la production d'une vague d'IgG issues d'une réponse humorale plus spécifique responsable de la lyse des leptospires présents (Heath et Johnson, 1994). Par la méthode ELISA, ces IgG peuvent être décelées six mois après la vaccination et douze mois après une exposition naturelle. Certains de ces anticorps sont nécessaires à la phagocytose des leptospires par les neutrophiles et les macrophages (Banfi et al., 1982 ; Wang et al., 1984). D'autres agglutinants, activent la voie classique du complément (McGuire et al., 1979).

Une réponse à médiation cellulaire se développe également mais reste encore peu claire. Elle passe par l'activation des lymphocytes gamma-delta et la production d'interféron INF γ (Klimpel et al., 2003). Naiman et al., (2002) ont étudié la réponse des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de bovins exposées in vitro à *L. hardjo*. La réponse cellulaire était plus importante pour des animaux vaccinés contre le sérovar *L. hardjo*, par rapport aux animaux naïfs non vaccinés.

Les leptospires peuvent échapper au système immunitaire quand ils sont localisés dans les tubules rénaux essentiellement ou dans des tissus protégés du système immunitaire comme les yeux ou le cerveau (Heath et Johnson, 1994). Cependant, l'agglutination des titres en anticorps n'est pas proportionnelle à la protection (Coyne et al., 2001).

2.6.3 Propriétés allergiques

L'injection intradermique d'un allergène des leptospires « leptospirine » a permis d'obtenir une réaction d'hypersensibilité retardée et spécifique, elle est présentée sous forme d'un érythème dans les 8h à 24h si les animaux sont positifs (Schonberg, 1981 ; Berech, 1989), cette propriété a été utilisée pour diagnostiquer la leptospirose par allergie cutanée sur des lapins et des porcs.

En effet, le test intradermique n'est pas utilisé pour diagnostiquer une infection par la leptospirose (Hovind-hougen, 1981) pour les raisons suivantes : Obtention d'un résultat positif même en présence des souches de leptospires saprophytes comme *L. biflexa* et l'injection intradermique de l'allergène induit dans un certain temps l'apparition des anticorps dans le sang et ceci jusqu'à 6 à 8 semaines après la réalisation du test intradermique créant donc des problèmes de faux positifs.

3 Pathogénie

3.1 Conditions de l'infection

3.1.1 Facteurs dépendants du pouvoir pathogène des leptospires

- **Spécificité des sérovars (Pouvoir pathogène naturel)**

Chaque espèce tend à être associée à un sérovar particulier. Par exemple les bovins sont généralement associés au *Leptospira hardjo*, les rats laveurs seraient le réservoir pour le sérovar Grippotyphosa, les rats pour Icterohaemorrhagiae. Les cochons pour Bratislava et Pomona et les chevaux pour Bratislava (Sessions et Greene, 2004). Ces hôtes sont donc une source potentielle d'agent pathogène pour d'autres animaux dits hôtes accidentels, dont la réceptivité est faible et la sensibilité est forte. Néanmoins, un même hôte peut être infecté par plusieurs sérovars, le même sérovar peut se trouver chez plusieurs espèces (Levett, 2001). En effet, quand un hôte est infecté accidentellement, les signes cliniques exprimés sont plus sévères et la phase d'invasion est d'une durée plus courte (Wohl, 1996).

- **Notion de dose infectieuse ou l'inoculum :**

Pour tous les agents pathogènes, la dose primaire conditionne l'infection. En effet, le pouvoir pathogène des différents sérovars n'est pas homogène. Cependant, et pour que l'infection se développe, il faut que les leptospires pathogènes pénètrent en quantité suffisante dans l'organisme de l'hôte. Dans le cas contraire, il n'y aura pas d'infection possible (Andre-Fontaine, 2004).

- **La morphologie et la mobilité particulière des leptospires :**

Ces deux caractères confèrent aux leptospires pathogènes la capacité de se mouvoir dans des milieux de viscosité élevée, contribuant à leur pathogénicité et à l'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte (Perolat et Baranton, 2000). Ceux-ci leur permet de franchir les barrières cutanéomuqueuses ou d'envahir des milieux denses comme l'humeur aqueuse ou le corps vitré chez l'homme et le cheval. En effet, la grande mobilité et les mouvements qui sont dits « en tire-bouchon » ont permis aux leptospires de franchir les points d'entrée sans créer de dégâts ou de réaction inflammatoire. Bharti et collaborateurs, 2003, ont montré que sur les 4768 gènes identifiés dans la séquence génomique des leptospires, au moins cinquante interviennent dans la mobilité des leptospires.

- **Capacité invasive des leptospires :**

C'est l'un des facteurs qui semble avoir un rôle important dans la pathogénicité des leptospires. En effet, l'attachement des leptospires à la membrane extracellulaire de l'hôte est considéré comme un caractère de virulence important pour une souche pathogène. Ainsi, plus une souche est virulente, plus son adhésion à cette membrane est importante et l'inverse est correcte (Toshihiro et Ryo, 1987). Thomas et Higbie, en 1990, ont révélé que la température influence sur ce caractère. Cependant, une augmentation de la température s'accompagne d'une augmentation de l'adhésion avec un pic d'attachement sur des cellules rénales à une température de 37°C. Au contraire à 4°C, cette adhésion est réduite de 95 comparée à celle de 30°C.

Les leptospires virulents possèdent une importante capacité d'adhérence aux différentes cellules voire de pénétrer à travers les cellules endothéliales et de dissocier les hépatocytes (Miyahara et al., 2014). Plusieurs éléments interviennent dans l'adhésion. En effet, un certain type d'adhésine, les endostatines, qui font partie des OMPs (les protéines de la membrane externe), exprimées à la surface des souches virulentes de *L. interrogans*, se liant à la fibronectine et la laminine de la matrice extracellulaire de l'hôte d'une part, et dans la liaison avec le facteur H du complément d'autre part. Ces protéines ont un rôle important dans l'adhésion initiale des leptospires et dans leur invasion cutanée ou muqueuse (Bharti et al., 2003). Les endostatines sont présentes spécifiquement chez les souches pathogènes (Stevenson et al., 2007).

Aussi, d'autres composants ont un rôle dans l'adhésion et l'attachement des leptospires, à savoir : les protéines de surfaces immunoglobuline-like (ligA, ligB et ligC), le collagène et l'élastine. La protéine ligB en particulier à l'aptitude de se lier au fibrinogène et de réguler la thrombose et la fibrinolyse, ce qui explique les symptômes observés lors de leptospirose aiguë (hémoptysie, thrombocytopenie) (Lin et al., 2011). Néanmoins, d'après Adler et collaborateurs, 2011, malgré que ces protéines soient présentes uniquement chez les espèces pathogènes, elles ne sont toutefois pas indispensables à la virulence. D'autres éléments interviennent dans l'adhésion comme la lipoprotéine de surface loa22 et la protéine lipL32 (Hoke et al., 2008). Ces protéines bactériennes jouent ainsi un rôle majeur dans la colonisation des tissus hôtes.

Les leptospires sont phagocytés par les macrophages en présence d'anticorps spécifique (Cinco et al., 1981 ; Banfi et al., 1982). L'inhibition de l'activité des macrophages augmente la sensibilité à l'infection (Isogai et al., 1998). Les leptospires virulents

s'associent avec des neutrophiles, mais ne sont pas tués (Wang et al., 1984). La phagocytose se produit uniquement en présence d'anticorps et de complément (McGrath et al., 1984), suggérant que l'enveloppe externe des leptospires possède un composant antiphagocytaire.

- **Substances élaborées et facteurs de virulence :**

Certaines substances produites par les leptospires tels que les toxines et les enzymes contribueraient en partie à la pathogénicité de ces bactéries (Levett, 2001 ; Langston et Heuter, 2003). Par ailleurs, la réponse immunitaire de l'hôte peut participer à l'installation de lésions.

Les toxines des leptospires jouent un rôle direct dans le pouvoir pathogène. Ils se résument à des hémolysines (des phospholipases ainsi que des sphingomyélinases présentes dans la majorité des sérovars pathogènes), une collagénase et des protéases. Ils agissent sur les vaisseaux capillaires entraînant des lésions endothéliales qui ont pour conséquence un œdème tissulaire et une diathèse hémorragique, cette dernière peut jouer un rôle dans l'installation d'une Coagulation Intra Vasculaire Disséminée (CIVD). Celle-ci est à l'origine d'une thrombopénie et d'hémorragies, ce qui engendre des lésions tissulaires ischémiques (Greene, 2012).

Les hémolysines lysent directement les érythrocytes. Deux types d'hémolysines ont été identifiés chez les leptospires pathogènes. La première est une sphingomyélinase C et la seconde une sphingomyélinase H. Elles peuvent créer des pores dans les membranes des cellules cibles (Hirsh et al., 2004). En effet, les sphingomyélinases ont pour cible, les globules rouges et probablement d'autres cellules dont la membrane est constituée de phospholipides (Bernheimer et Bey, 1986). Par la lyse de ces cellules, les sphingomyélinases ont également un rôle dans la libération et l'obtention du fer et des acides gras, nécessaires aux leptospires. Ainsi, les produits de dégradation des sphingomyélinases pourraient avoir un rôle en tant que second messenger (Bernheimer et Bey, 1986 ; Segers et al., 1990).

Une autre catégorie d'hémolysines, des protéines homologues à des protéines animales avec un rôle important dans l'hémostase (acétylhydrolase du facteur PAF « platelet activating factor », facteur VonWillebrand). Elles expliquent les cas sévères d'hémorragie et d'hémoptysie observés lors d'infection par *L. interrogans* (Ren et al., 2003).

- **Lipopolysaccharide (LPS) :**

D'après Srivastava (2002), le LPS (lipopolysaccharide) des leptospires est un déterminant important de la virulence des bactéries et serait un des éléments responsables des lésions tissulaires. Le LPS est fortement immunogène et majore l'activité des macrophages et de l'immunité non spécifique. Il stimule l'adhérence neutrophilique et l'activation des plaquettes (Ettinger et Feldman, 2009) qui sont à l'origine des anomalies inflammatoires et sanguines présentées par le chien atteint (Langston et Heuter, 2003). Il a été démontré que les LPS peuvent induire une apoptose des lymphocytes de la rate (Isogai et al., 1998).

Les composants de la membrane externe des leptospires pathogènes comme le LPS, la porine ompL1 et certaines lipoprotéines dont LipL41 sont toujours présents dans la lumière des tubules rénaux 10 à 28 jours post infection (Barnett et al., 1999). Ils auraient donc un rôle dans l'induction et la persistance des néphrites interstitielles leptospirosiques.

La production de complexes immuns pourrait conduire à une inflammation du système nerveux central. Une importante quantité de complexes immuns circulants sont associées à des symptômes sévères (Tong et al., 1971).

En outre, les leptospires utilisent l'urée comme principale source d'azote, elles présentent ainsi une affinité pour la lumière des tubules rénaux. Les sérovars pathogènes possèdent même une activité uréasique pour maintenir un pH alcalin qui leur est favorable (Bontemps, 2012).

En effet, il existe une possibilité d'une pénétration intracellulaire. Des leptospires ont été observés à l'intérieur de cellules rénales et hépatiques, de manière *in-vivo* mais cela n'a pas été prouvé *in vitro* (Bontemps, 2012).

3.1.2 Facteurs dépendants de la réceptivité et de la sensibilité de l'hôte

Il est important de signaler que, la plupart des espèces animales sont dites réceptives, c'est-à-dire les leptospires peuvent se multiplier une fois entrés dans leur organisme. En revanche, tous les animaux ne sont pas sensibles à présenter la maladie ; c'est le cas de certains rongeurs et des lagomorphes qui peuvent juste héberger le germe. Mais les animaux sensibles souffrent de la maladie à des degrés différents selon l'espèce touchée, par exemple des symptômes de forme aiguë chez l'homme et le chien et souvent chronique chez les ruminants et les porcs (Legrand, 2007).

L'expression des symptômes sera diverse à l'intérieur d'une même espèce. A titre d'exemple, chez le bovin, la réaction de l'hôte envers l'infection est variable selon les facteurs suivants :

- **Le statut vaccinal**

La vaccination peut interférer sur le développement et les conséquences de l'infection. En effet, un animal correctement vacciné est moins susceptible de développer la maladie, car il présente des anticorps agglutinant la souche infectieuse, ce qui permet sa phagocytose après opsonisation (Fraga, 2011). En revanche, il peut exprimer l'infection lors de son exposition à un sérotype autre que vaccinal (Berech, 1981).

- **Le statut immunitaire**

Les individus immunodéprimés à cause d'une maladie intercurrente comme la diarrhée virale bovine (BVD) ou par la rhinotrachéite bovine infectieuse (IBR), de même que les animaux nouvellement introduits ou encore les primipares seront beaucoup plus sensibles à l'infection (Andre-Fontaine, 2003) qu'un individu immunocompétent. Le développement d'une réponse immunitaire peut entraîner une élimination des bactéries et la guérison, mais le germe peut également persister dans des sites comme les tubes rénaux proximaux, d'où la leptospirurie (Fig. 5). L'expression clinique de la maladie dépend à la fois du caractère pathogénique de la souche infectieuse mais aussi des pouvoirs de défense de l'animal infecté (Muller et al., 1999).

3.2 Etapes de l'infection

L'infection leptospirosique passe par différentes étapes (Fig. 11). Elle débute par une phase de contamination au cours de laquelle les germes vont pénétrer dans l'organisme hôte. Puis, par une phase d'invasion où les leptospires se multiplient entament leur migration dans le sang. Enfin, une phase de colonisation de différents organes cibles, dont les tubules rénaux dans lesquels les leptospires vont se multiplier et être excrétés dans le milieu extérieur (Levett, 2001).

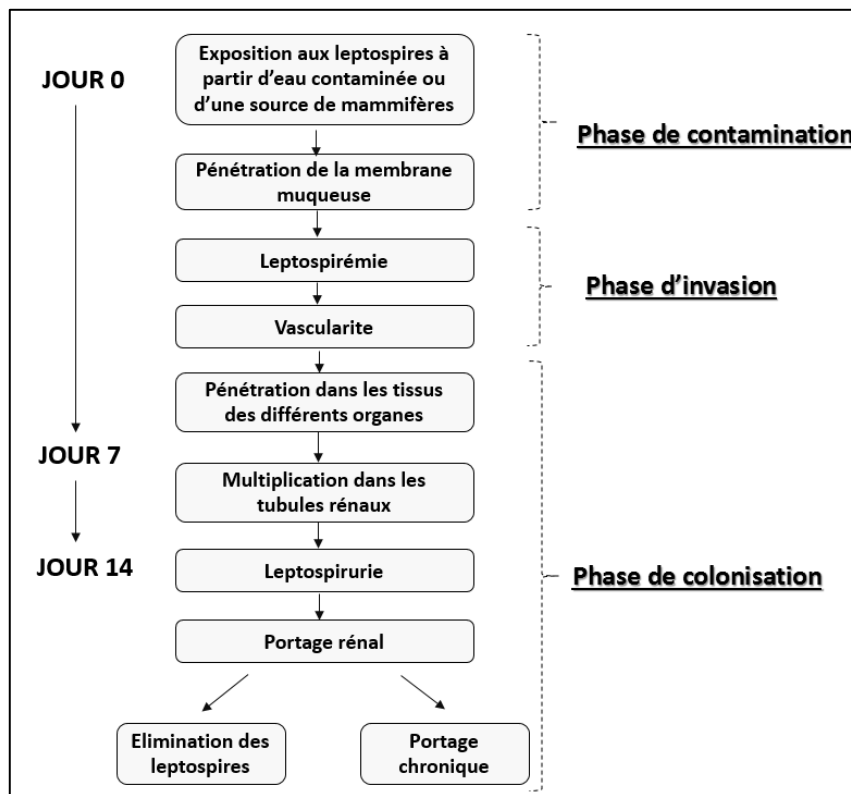


Figure 11: Les différentes étapes de l'infection par des leptospires (Kosossey-Vrain, 2004).

3.2.1 Phase de contamination

Les leptospires sont présents dans l'eau, l'urine, voire dans la carcasse d'animaux infectés. Anderson et al. (1993), relatent le cas particulier de l'isolation de *Leptospira interrogans* sérovar Grippotyphosa à partir de la peau d'un chien.

Les leptospires pénètrent l'organisme, soit suite à un contact direct ou indirect. Les bactéries entrent ainsi dans le corps principalement par voie cutanéomuqueuse (Andre-Fontaine, 2004). En effet, la voie transcutanée regroupe : La peau lésée, présence de plaies, d'égratignures, d'excoriations ou de lésions plus profondes, aussi à partir d'une peau saine si cette dernière est en contact suffisamment longtemps avec l'eau contaminée et leur mobilité contribue à leur diffusion dans les tissus. Les zones de peau fine comme l'oreille ou les espaces interdigités sont considérées également des voies d'entrées. Les muqueuses, même saines regroupent : Buccales, oculaires, nasales et génitales. La transmission vénérienne ou placentaire et le passage des leptospires de la mère au fœtus sont possibles (Coghlan et Bain, 1969 ; Colin, 2000). En outre, des études ont montré une contamination digestive après l'ingestion d'un aliment souillé par les leptospires, mais ces cas de transmission par voie alimentaire sont exceptionnels (Coghlan, 1981 ; Sykes et al., 2011). Il n'y a pas d'afflux de cellules inflammatoires au niveau de la voie d'entrée de la bactérie

(Abgueguen et Pichard, 2009). Généralement, la contamination se fait via des urines, des eaux contaminées et des végétaux souillés et ne se fait pas au contact direct des animaux (Colin, 2000 ; Terpstra, 2004 ; Goldstein, 2010).

3.2.2 Phase d'invasion

Après avoir traversé la barrière muco-cutanée, les leptospires pathogènes gagnent l'espace vasculaire qui constitue un milieu propice à leur multiplication (Fig. 10). La leptospirémie ou bactériémie est variable et perdure de 4 à 12 jours suite à l'exposition initiale (Krishna, 2004). Les premiers signes cliniques généraux apparaissent durant cette phase tels que la fièvre, une léthargie, faiblesse et une anorexie.

Les leptospires et ces toxines provoquent des lésions différentes au niveau de la paroi des capillaires sanguins ce qu'induit des saignements, une hyperfibrinolyse et une thrombocytopénie pouvant aller jusqu'à une coagulation intravasculaire disséminée (Sessions et Greene, 2004 ; Chierakul et al., 2008). Ceci dépend du sérovar impliqué ainsi que de la teneur des cellules érythrocytaires de l'hôte en phospholipide (Andre-Fontaine et Ganiere, 1992).

La phase d'invasion est la seule phase durant laquelle une hémoculture est possible (Sessions et Greene, 2004). Les leptospires non virulents peuvent être lysées par le système anticorps/complément. Par contre, les souches virulentes peuvent échapper au système immunitaire de l'hôte en exprimant des inhibiteurs du système du complément à leur surface et des protéases qui clivent les protéines du système du complément (Meri et al., 2005, Barbosa et al., 2009 ; Fraga et al., 2014).

Après la phase de bactériémie, les leptospires vont ensuite diffuser vers les organes cibles et notamment dans les organes du système réticulo-endothélial (le foie et les reins).

3.2.3 Phase de colonisation

Généralement, la réplication des leptospires est rapide et la colonisation des organes commencent 24h à peine après le début de la bactériémie (Sykes et al., 2011). Les leptospires se concentrent dans le foie et les reins qui sont les organes les plus ciblés, mais il y'a d'autres organes moins fréquemment touchés comme : les organes génitaux, la rate, le cerveau, les poumons, le tube digestif, l'uvée, la rétine, le squelette, le myocarde, et le pancréas (Bernard, 1993 ; Millet, 1998).

L'interaction des leptospires avec les cellules et les tissus hôtes génère des lésions vasculaires (coagulopathie, d'hypoxie tissulaire, d'agrégation plaquettaire avec activation du système de coagulation et de fibrinolyse) à l'origine des phénomènes ischémiques variables selon l'organe (Chierakul et al., 2008); un dysfonctionnement des hépatocytes se manifestant cliniquement par un ictère et des manifestations hémorragiques (défaut de synthèse des facteurs de coagulation d'origine hépatique), de la nécrose des tubules rénaux et dysfonctionnement tubulaire (tubulonéphrite interstitielle), de la myosite, une méningite, des avortements, etc...

Parallèlement à cette infection tissulaire se développe une réaction immunitaire spécifique (apparition d'anticorps de type IgG et IgM détectables après une dizaine de jours d'infection, qui permettraient l'osponisation et la phagocytose des leptospires par les macrophages) (Fig. 12) (Levett, 2001). Cette réaction peut conduire à certains phénomènes immunopathologiques comme l'uvéite couramment décrite chez le cheval, mais rare chez le chien, ou la néphrite interstitielle par lésion glomérulaire. Ainsi, elle peut provoquer une atteinte hépato-rénale sévère associée à des signes cutanés ou encore méningés (Berech, 1989). Dans certains cas, une importante élévation des IgM anti-leptospires peut même provoquer une activation excessive du complément. Celle-ci a pour conséquence un élargissement des réactions inflammatoires, une augmentation de la perméabilité vasculaire, un œdème interstitiel, une leucocytose et dans quelques cas une coagulation intravasculaire disséminée (Hartman et al., 1986 ; Langston et Heuter, 2003).

L'hôte devient excréteur lorsque les leptospires atteignent et accumulent au niveau des cellules épithéliales des tubules rénaux. Cette leptospirurie apparaît vers 10-15 jours après infection (Haddad et al., 2008), il devient alors porteur et éventuellement excréteur, ce qui constitue un risque épidémiologique majeur. Même si l'animal survit à l'infection, il est cliniquement guéri et peut rester porteur de leptospires pendant plusieurs mois (Fig. 12). Une fois dans les tubules rénaux, les bactéries sont protégées des effets bactéricides des anticorps déjà en circulation et elles ne stimulent plus la production d'anticorps. Ce qui explique le fait que les animaux puissent être séronégatifs malgré une excrétion rénale confirmée (Harkin et al., 2003). L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est fréquente puisque la colonisation rénale survient chez la majorité des animaux infectés (Azócar-Aedo et al., 2014).

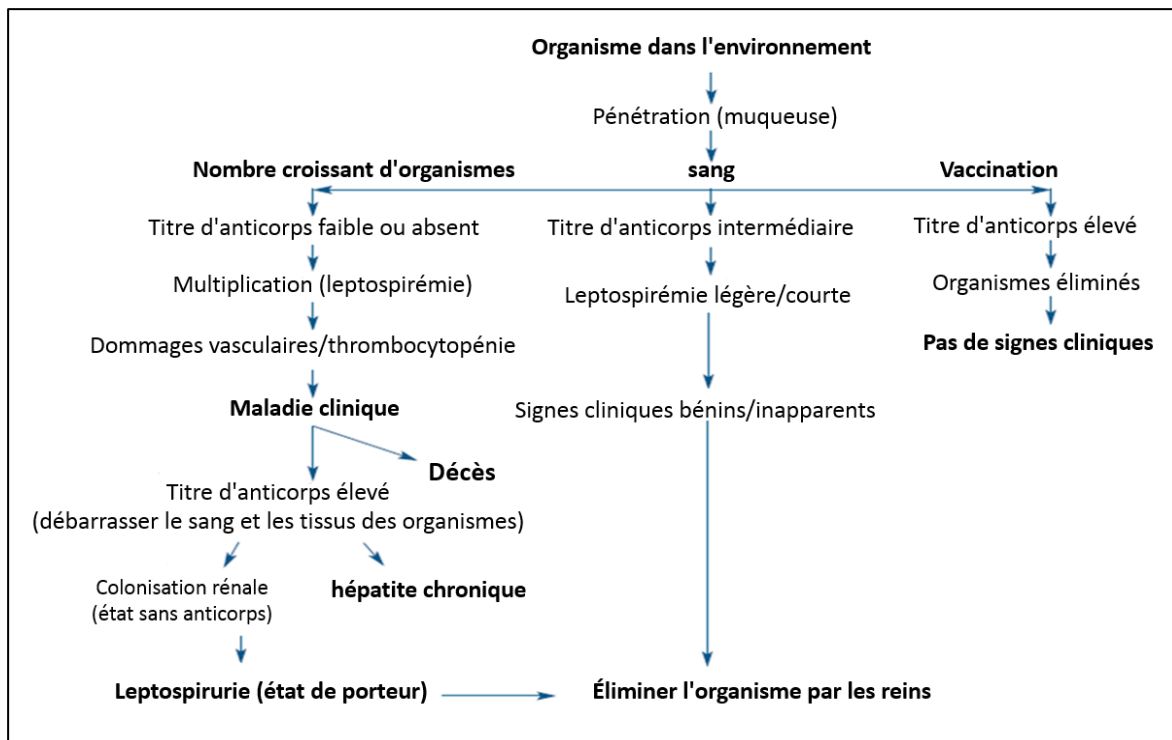


Figure 12: Schéma de variabilité de réponse immunitaire face à une infection leptospirosique (Sessions et Greene, 2004).

4 Épidémiologie

4.1 Épidémiologie descriptive

La leptospirose est une maladie bactérienne transmissible de l'animal à l'homme (zoonose) dans laquelle l'homme est un hôte accidentel dans un cycle impliquant les animaux sauvages et domestiques. Les cas de transmission interhumaine ne se produisent que rarement. La contamination de l'homme se fait principalement par contact indirect avec des eaux souillées (étangs, rivières), lors d'une activité professionnelle, sportive ou récréative (canoë-kayak, pêche, baignades...). La proximité des populations avec les réservoirs est un facteur d'autant plus aggravant. A ce titre l'urbanisation galopante, mal contrôlée et les critères socio-économiques peuvent avoir un impact sur l'incidence de la leptospirose. Plusieurs études réalisées au Brésil ont démontré que les populations ne bénéficiant pas d'un approvisionnement en eau et d'un réseau d'égout étaient beaucoup plus exposées à la leptospirose que dans les zones résidentielles (Soares et al., 2010 ; Reis et al., 2010). De ce fait, les personnes vulnérables sont les agriculteurs et les habitants des bidonvilles urbains (Costa et al., 2015). Ce phénomène est d'autant plus accentué lors des saisons à fortes précipitations ou d'inondations (Lee et al., 2014) où les sols lessivés par les

eaux de pluie entraînent les bactéries vers les cours d'eau, lacs... et donc les zones d'habitation. La contamination est d'autant plus importante que les populations défavorisées ne sont pas équipées de vêtements ou de chaussures adaptés à une bonne protection. Bien que la leptospirose entraîne des manifestations cliniques mettant en danger la vie, tel que le syndrome d'hémorragie pulmonaire, et qu'elle soit répandue dans le monde entier, le principal obstacle à la lutte contre cette maladie négligée est l'insuffisance des données sur la morbidité (Costa et al., 2015).

4.1.1 Répartition géographique et prévalence

La leptospirose est une maladie infectieuse de répartition mondiale, plus répandue dans les zones tropicales que dans les régions tempérées (Everard et al., 1993 ; Ratnam, 1994) (fig. 13). Ces zones chaudes et humides sont propices à une longue survie des leptospires dans l'environnement. Elle touche à la fois les pays industrialisés et ceux en développement (Bharti et al., 2003) et peut infecter de très nombreuses espèces de mammifères. Les cas sont généralement sporadiques ou anazootiques (Laidebeure, 2004).

Plusieurs facteurs contrôlent la prévalence et la distribution de la leptospirose dans les différents continents à savoir : la présence des ressources hydriques, le climat, les conditions de vies, la densité de population, mais encore les réservoirs et les sérovars qui ont un rôle important dans le cycle épidémiologique de la maladie (Levett, 2001).

Dans le monde, les derniers rapports indiquent que la leptospirose touche un million de personnes et entraîne 58 900 décès chaque année (Costa et al., 2015) avec un taux de mortalité pouvant excéder 10 dans certaines régions (WHO, 2011). L'incidence est d'environ 0,1 à 1/100 000 cas par an pour les climats tempérés et de 10 à 100/100 000, soit une incidence 50 ou 100 fois plus élevée, en régions tropicales. Par conséquent, l'Afrique se classe au sommet avec une incidence annuelle moyenne de 95,5 pour 100 000 habitants, suivie par le Pacifique occidental (66,4), l'Amérique (12,5), l'Asie du Sud-Est (4,8) et l'Europe (0,5) (WHO, 2011).

D'après ces estimations, la leptospirose est considérée comme une principale cause zoonotique, de morbidité et de mortalité très élevée dans les régions les plus pauvres du monde et dans les zones où la surveillance n'est pas systématique (Costa et al., 2015).

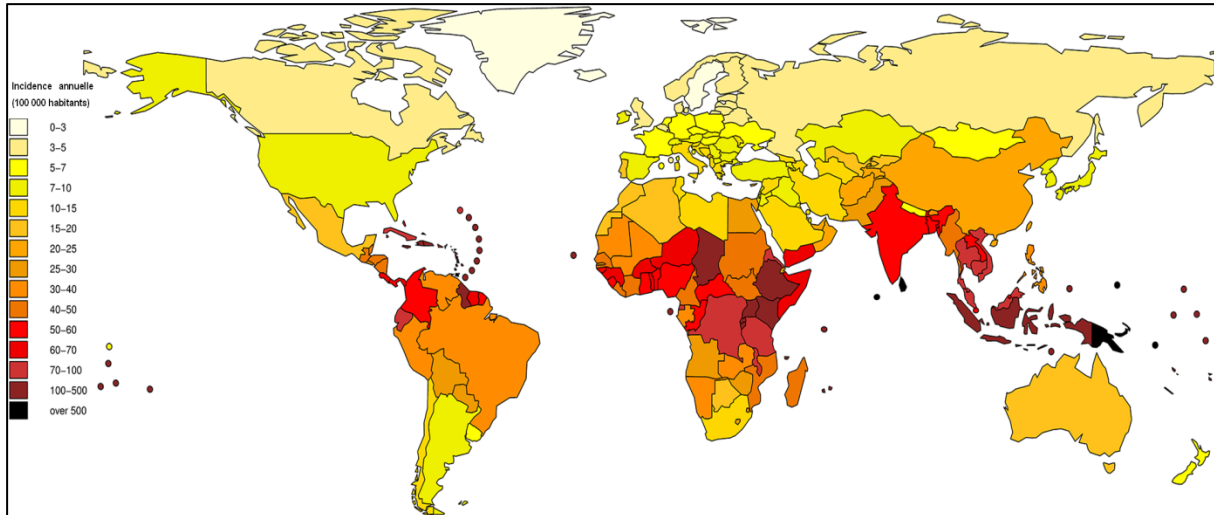


Figure 13: Incidence annuelle de la leptospirose humaine dans le Monde (Torgerson et al., 2015).

En Algérie, selon l'arrêté ministériel du 17 novembre 1990, la leptospirose humaine est considérée comme une maladie à déclaration obligatoire où toute suspicion doit être signalée auprès du ministère de la santé et de la réforme hospitalière. Selon les statistiques rapportées par l'unité des leptospires de l'Institut Pasteur d'Alger (2010- 2019), on remarque que le nombre des cas humains déclarés chaque année (2010-2019) varie de 35 à 194 cas avec un extrême en 2012 (194 cas). Ce rapprochement dans le nombre des cas humains rapportés durant les dix dernières années explique un aspect endémique de cette maladie en Algérie (Fig. 14). En effet, une étude réalisée dans la wilaya de Tizi-ouzou entre 2005 et 2008, a montré 88 cas de leptospirose humaine dont 7.95 dus au séro groupe Sejroe (Afiri et al., 2013). La totalité des patients était des éleveurs de bovins. Le taux de létalité dans cette épidémie était de 2.27. Une autre épidémie a été déclarée dans la wilaya de Sétif en 2010, avec 27 personnes infectées après consommation d'eau des puits contaminés par le passage de rats, 3 personnes sont décédées et le reste guéri après hospitalisation (<http://www.forum-algerie.com/actualite-algerienne>).

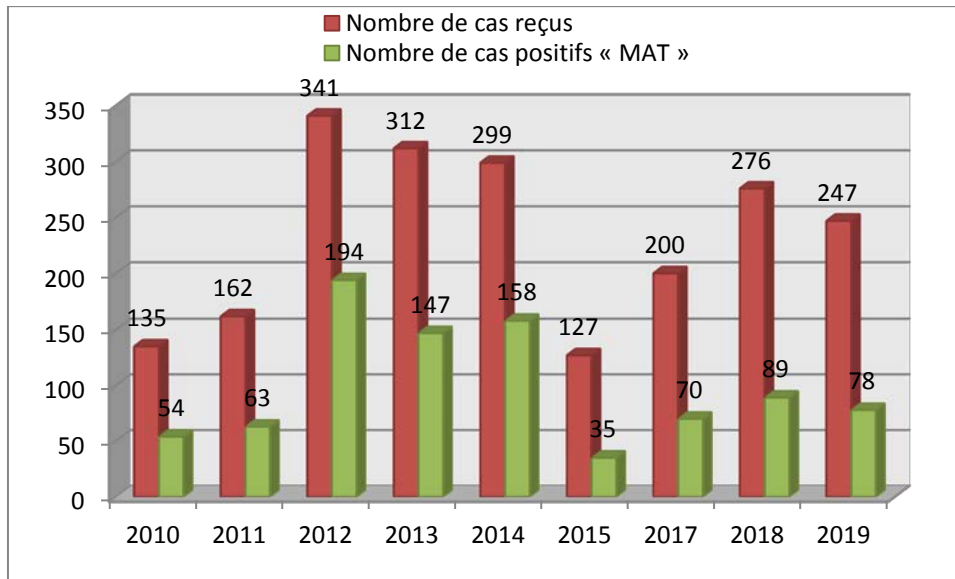


Figure 14: Nombre de cas testés et confirmés par le MAT de la leptospirose humaine en Algérie (Unité des leptospires, Institut Pasteur d'Alger 2020).

En ce qui concerne la leptospirose bovine, de nombreuses études ont été réalisées à travers le monde et des différences considérables ont été rapportées. Les travaux de la littérature indiquent que la leptospirose bovine est très fréquemment le résultat d'infection par le sérovar Hardjo. Toutefois, elle peut resulter aussi de l'infection par une large variété de sérovars dans des lieux spécifiques (Faine et al., 1999). Nous avons remarqué que la prévalence de la leptospirose bovine dans le monde varie de 0 à 90 : en Iran 0 (sur des vaches ayant avorté) (Bahari et al., 2011), en Espagne (1) (Alonso-Andicaberry et al., 2001), en Inde (7,8) (Deneke et al., 2014), au Trinidad (4,1) (Shariane, 2011), au Mexique (2,4) (Leon et al., 2008), en Turquie (2,8) (Kocabiyik et Cetin, 2004), en Mongolie (80,4) (Odontsetseq et al., 2005), en nouvelle Zélande (72,6) (Sanhuezo et al., 2013) et au Brésil, avec des taux de 43,5 , 33,6 et 20,6 obtenus respectivement dans différentes régions du pays (Lilenbaum et Souza, 2003 ; Quaresma Bonfim et al., 2005 ; Martins et al., 2012). En Afrique, la leptospirose est un problème de santé animale (De Vries et al., 2014), néanmoins, peu de données sont publiées sur la leptospirose bovine dans ce continent. Le tableau ci-dessous résume quelques données sur la prévalence de la leptospirose bovine en Afrique révélées par différentes techniques de diagnostic.

Tableau 6: Prévalence de la leptospirose bovine dans quelques pays du continent africain.

Région d'étude (pays)	Technique de surveillance	Echantillon		Références
		Nombre prélevé	Prévalence (%)	
Santo Antão et Santiago (Cap-Vert)	MAT (1 :100)	150	2.0	Sebek et al., 1989
Ibadan et Abeokuta (Nigeria)	Culture des reins	108	82.4	Jagun et al., 2011
Région Kaduna, Zaria (Nigeria)	ELISA	237	8.4	Ngbede et al., 2013
Bamako (Mali)	MAT (1 :100)	642	44.9	Niang et al., 1994
NR (Ethiopia)	MAT (1 :100)	307	70.7	Moch et al., 1975
le district de Nyandarua (Kenya)	MAT (1 :200)	326	34.0	Macharia, 1989
Le district de Melu (Sudan)	MAT (1 :200)	195	54.0	Sebek et al., 1989
Région de Tanga (Tanzania)	MAT (1 :160)	655	30.3	Schoonman et Swai, 2010
Mashonaland et Manicaland (Zimbabwe)	Culture des organes	480	10.4	Feresu, 1992

En Algérie, une seule étude sur l'infection à *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo menée par Derdour et al (2017) a montré une prévalence de 3.89 pour *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo par le test d'ELISA indirect (Derdour et al., 2017).

4.1.2 Évolution dans le temps

La cinétique de l'infection est caractérisée par un épisode aigu qui va ensuite disparaître ou persister sous forme latente. La forme aiguë va toucher quasi exclusivement les animaux jeunes ainsi que les animaux nouvellement introduits.

De façon générale, la leptospirose s'exprime sous forme enzootique, néanmoins des formes épizootiques sont aussi déclarées dans quelques épisodes de mammites et/ou d'avortement (Andre-Fontaine et al., 1985).

Cette maladie présente un caractère saisonnier, il semblerait ainsi que les valeurs de pluviométrie les plus élevées correspondent aux pics d'infection, avec un pic estivo-automnal observé en zones tempérées s'expliquant par les chaleurs et les intempéries de cette période, mais pendant la saison des pluies pour les régions plus chaudes (Levett, 2001). Dans le cas du sérovar Hardjo, il semblerait que ce soit les périodes comprises entre les mois d'octobre et janvier-février qui soient les plus propices à l'infection par la leptospirose.

4.2 Epidémiologie analytique

4.2.1 Source de l'infection

4.2.1.1 Sources de la bactérie

Les sources possible de contamination sont représentées par les animaux infectés de leptospirose, des animaux en incubation, les animaux sauvages et les animaux infectés asymptomatiques (porteurs sains qui sont soit guéris cliniquement, soit porteurs chroniques sans avoir jamais exprimé de symptômes) (Ellis, 1981). Ces derniers sont les plus dangereux sur le plan épidémiologique car l'infection passe inaperçue pourtant il y a excrétion de leptospires dans les urines du fait de l'atteinte rénale chronique. L'excrétion peut être intermittente ou continue et durer quelques mois jusqu'à des années voire toute une vie.

Les espèces pouvant être infectées par la leptospirose sont très nombreuses (Marrie, 2001), tous les mammifères domestiques et sauvages (environ 150 espèces de mammifères) (Sykes et al., 2011), les oiseaux (Jacobs et al., 1986), les reptiles (Lindtner-Knific et al., 2013), les amphibiens (Everard et al., 1990), les poissons (Mgode et al., 2014) et les invertébrés (Gonzalez-Astudillo et al., 2015). Cependant, les acteurs de l'épidémiologie sont répartis en deux grands groupes :

* Les hôtes accidentels, qui présentent une réceptivité faible mais une sensibilité forte. Ils développent des formes de leptospirose plus ou moins grave. Ces espèces peuvent être porteurs rénaux, excréter la bactérie dans leurs urines suite à la localisation intracellulaire des leptospires, assurant ainsi, une protection efficace contre les anticorps produits par la réaction immunitaire de type humorale de l'hôte et contre des éventuels traitements antibiotiques (Thiermann, 1984). L'homme et les animaux domestiques (notamment les bovins et autres animaux d'élevage) sont le plus souvent des hôtes

accidentels. Toutefois, tout individu peut être porteur-excréteur sain et se comporter comme un réservoir de leptospires pathogènes (Fig. 15) (Greene et al., 2012).

* Les hôtes de maintien/principaux sont les animaux infectés qui présentent une phase d'invasion modérée (septicémique), permettant de produire des anticorps et développer des mécanismes antimicrobiens. Les animaux de ce groupe sont représentés par les espèces réceptives qui sont capables d'héberger le leptospire au niveau rénal et d'en assurer la dissémination par l'urine. Les petits mammifères (rongeurs) sont les espèces les plus importantes de cette catégorie (Fig. 15). En outre, les espèces réservoirs sont les animaux avec une leptospirose endémique qui se transmet par un contact direct entre individus (Levett, 2001). Ces individus sont le plus souvent porteurs asymptomatiques de leptospires, les excrétant dans leurs urines, maintenant ainsi la maladie dans l'environnement (Greene et al., 2012).

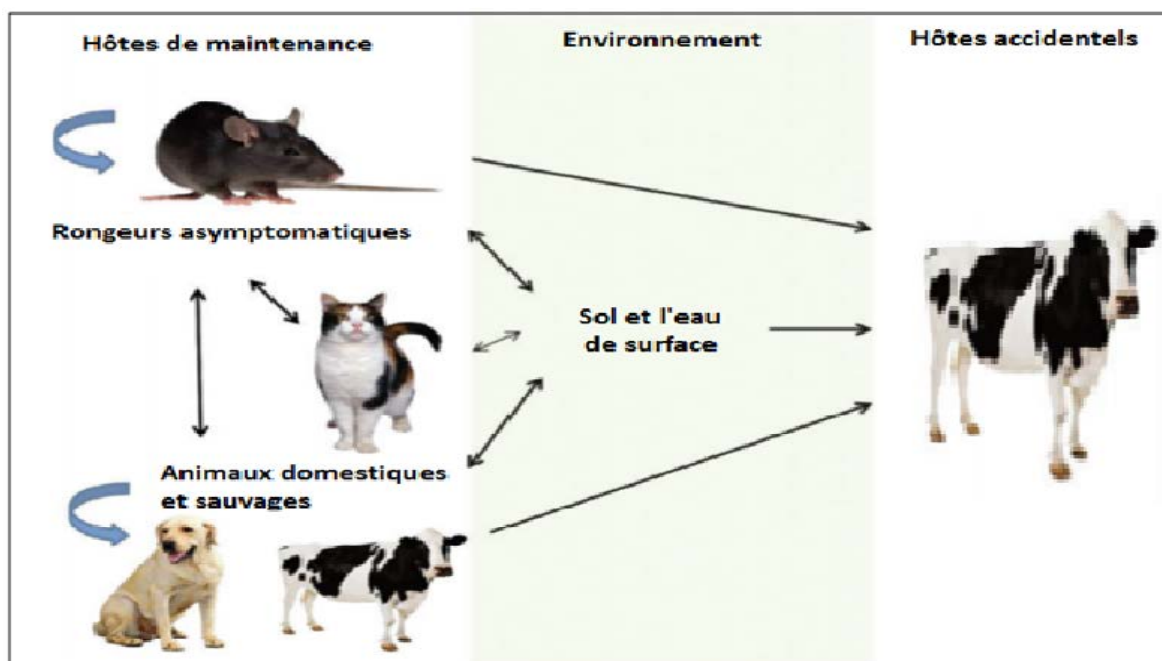


Figure 15: Cycle de transmission des leptospires entre les espèces de maintien (réservoirs) et les hôtes accidentels (Schuller et al., 2015).

Les rongeurs sont le réservoir principal de leptospires et n'ont aucun signe clinique de la maladie. Ils s'infectent en général précocement, par contact entre eux, excrétant les leptospires dans leurs urines durant toute leur vie. La prévalence d'excrétion augmente avec l'âge de l'animal (Levett, 2001). Parmi ces rongeurs, on retrouve en premier plan le rat, d'où le nom de la leptospirose « maladie des égoutiers ». Ainsi la souris, le campagnol

agreste, le mulot, le rat musqué et le ragondin peuvent être contaminants (Michel et al., 2001 ; Aviat et al., 2004). Ils sont capables d'excréter un grand nombre de leptospires dans leurs urines, jusqu'à 10^8 bactéries par millilitre. Les rongeurs constituent ainsi une source majeure d'infection (Adler et Moctezuma, 2010). Les hamsters et les cobayes sont des espèces réceptives à la leptospirose, de plus, elles deviennent cliniquement résistantes à partir de l'âge de 4 à 6 mois. Les lagomorphes quant à eux sont naturellement réceptifs, mais peu sensibles (Andres-Fantaine, 2004).

La plupart des sérovars infectants ont un hôte spécifique et ils ne peuvent pas se répliquer à l'extérieur de cet hôte. Chaque sérovar possède une ou plusieurs espèces réservoirs mais peut également avoir un hôte secondaire occasionnel. Le réservoir varie selon les sérovars. Les principaux sérovars portés par les espèces sauvages et susceptibles de contaminer les bovins sont récapitulés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 7: Réservoirs des différents sérovars présents chez les animaux sauvages et les bovins (Bharti et al., 2003).

Sérovar	Réservoir
Hardjo	Bovins
Hardjo	Cerfs (<i>Cervus elaphus</i>)
Hardjo, Bratislava	Moutons (<i>Ovis aeries</i>)
Icterohaemorrhagiae	Rat noir (<i>Rattus rattus</i>)
Pomona	Porc, Bovins, moufette, opossum
Canicola	Chien
Ballum	Souris, sanglier, renard
Australis	Hérisson

4.2.1.2 Matières virulentes

Le sang et certains liquides biologiques tels le LCR sont des matières virulentes au cours de la phase leptospirémie de la leptospirose qui dure 4 à 10 jours. Toutefois, ces matières virulentes sont situées à l'intérieur de l'organisme et donc difficilement contaminantes pour l'espèce réceptrice d'autant plus que la septicémie ne dure que quelques jours.

Après le 10^{ième} jour de l'infection, Les urines deviennent donc la matière virulente par excellence, pendant quelques jours à plusieurs mois, puisque les leptospires vont coloniser

les différents organes cibles, notamment les reins qui sont à l'origine d'une excrétion massive des bactéries dans les urines.

En effet, la persistance des portages rénaux pendant plusieurs mois assure l'émission prolongée des leptospires dans l'environnement. La durée et l'intensité de l'excrétion urinaire des leptospires dépendent des sérovars impliqués mais aussi de l'espèce et de l'âge de l'animal atteint. Par exemple, l'élimination urinaire de Canicola est de 3 mois, en revanche, les bovins peuvent excréter des leptospires jusqu'à 20 mois post-infection lorsqu'il s'agit du sérovar Hardjo (Andre-Fontaine et al., 1985). Aussi, des urines naturellement basiques comme pour le cas des herbivores, ou des urines de carnivores (normalement acides) alcalinisées par un régime alimentaire particulier ou suite à une affection rénale, présentent un habitat favorable pour la survie des leptospires d'où leur nombre élevé dans les excréments urinaires (Andre-Fontaine et al., 1988).

La transmission verticale de la mère à son petit est possible. Le lait est considéré comme une matière virulente. En revanche, l'acidification lactique et l'action lytique de certains composants du lait vont tuer les leptospires.

Enfin, le sperme et toutes les sécrétions et excréments génitaux sont des matières virulentes potentielles (Kiktenko et al., 1976). Les leptospires peuvent en effet persister jusqu'à cinq mois dans l'utérus gravide et peuvent persister jusqu'à trois mois dans l'utérus non gravide (Thiermann, 1984). L'excrétion des leptospires dans le milieu extérieur se prolonge pendant environ une semaine suite à un vêlage à terme sur une vache infectée mais aussi lors d'avortement causé par la leptospirose (Hathaway et al., 1982). L'avorton constitue ainsi une matière virulente. Selon Bielanski et collaborateurs, en 1998, le transfert d'embryons collectés chez une donneuse infectée expérimentalement n'entraîne pas une contamination de la receveuse.

4.2.2 Résistance des bactéries

Les leptospires sont sensibles à la chaleur ($> 60^{\circ}\text{C}$), des températures proches de zéro sont néfastes et celles de -20°C sont fatales aux leptospires (Andre-Fontaine et al., 1985), à la salinité, aux ultraviolets, aux désinfectants classiques (alcool, ammoniums quaternaires, aldéhydes), à la dessiccation et aux pH acides ou très alcalins (pH d'environ 7,2 à 8) (INRS, 2009). De ce fait, les milieux électifs naturels du genre *Leptospira* varient ainsi de l'eau ou de la boue aux tissus de mammifères hôtes colonisés durant l'infection chronique ou aiguë (Picardeau et al., 2008).

Les leptospires peuvent former des biofilms d'architecture spécifique sur des surfaces abiotiques *in vitro* (fig. 16). Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobées d'une matrice polymérique qu'elles synthétisent et attachées à une surface. La formation de biofilms pourrait être l'un des principaux facteurs essentiels à leur survie à long terme dans un environnement aqueux, il joue également un rôle important dans le portage chronique de *L. interrogans* chez les hôtes réservoirs par la résistance à la réponse immunitaire de l'hôte (Ristow et al., 2008). Ainsi, ce biofilm protège et maintient les leptospires et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles et de résister aux biocides et antibiotiques.

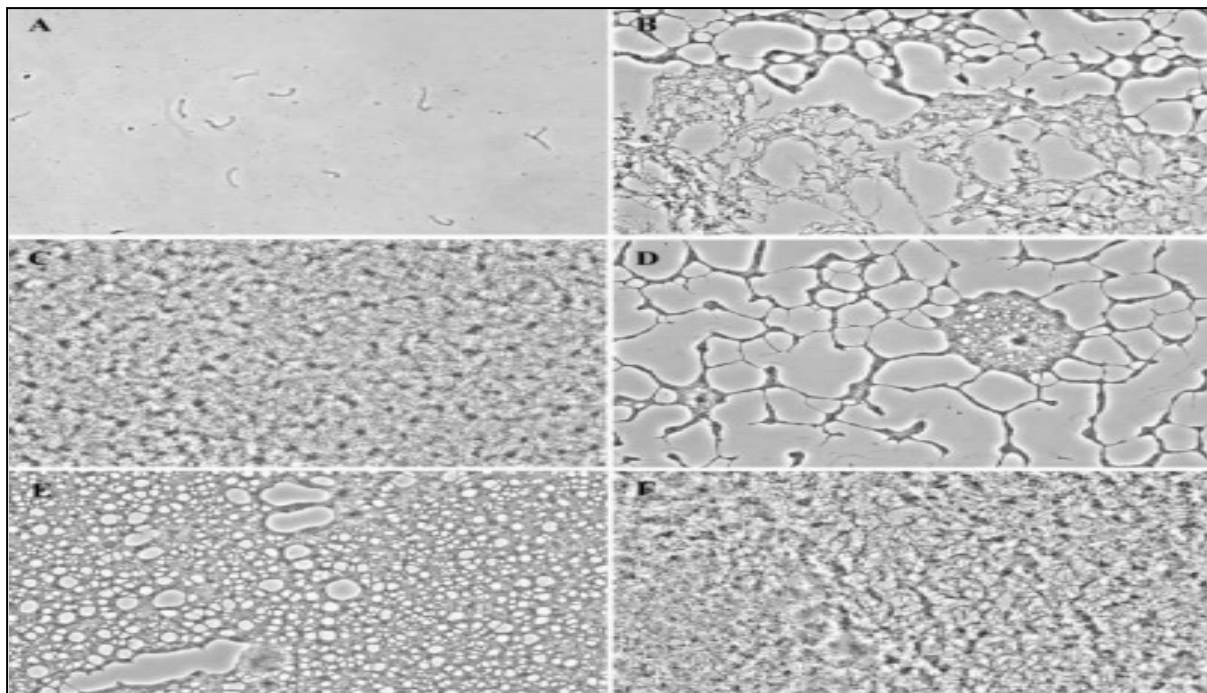


Figure 16: Biofilm de *L. biflexa* au niveau d'une interface eau/air vu au microscope (Ristow et al., 2008).

A : quelques leptospires isolés au bout d'1h, B : structure formée d'agrégats cellulaires à 24h, C : bactéries attachées à une matrice amorphe à 2j, D : structure moins dense sous le biofilm à 2j, E : agrégats cellulaires avec des zones dépourvues de cellules et de matrice à 4j, F : pellicule richement cellulaire à 4j

4.2.3 Réceptivité et sensibilité des espèces

Ces deux paramètres dépendent de la souche infectieuse et de l'animal infecté :

- Facteurs dépendant de la souche infectieuse :

La virulence des leptospires varie d'une souche à une autre. En effet, il y'a des souches très pathogènes pouvant induire une maladie létale à très faible dose de contamination, alors que d'autres sont moins virulentes et provoqueraient la maladie qu'à partir d'une dose très

élevée. En outre, la dose infectieuse est définie comme la quantité minimale de leptospires nécessaires pour entraîner la maladie. Pour envahir l'organisme et déclencher la maladie, la quantité des leptospires doit être au-dessus de cette valeur (Andre-Fontaine et Ganiere, 1992).

- Facteurs de réceptivité et de sensibilité des animaux infectés :

Il existe deux types d'animaux sensibles à la leptospirose, les hôtes réservoirs qui assurent le maintien et la dissémination de la maladie. Ils se caractérisent par de hautes réceptivités et de faibles sensibilités. Ils sont considérés comme la source majeure des leptospires pour d'autres animaux dits hôtes accidentels. Ces derniers ont une réceptivité faible et une sensibilité élevée. En outre, les hôtes accidentels développent généralement des symptômes plus marqués que les réservoirs (Langston et Heuter, 2003). A titre d'exemple, le chien est une espèce très sensible pouvant présenter des formes létales foudroyantes, alors que le rat ne présente aucun symptôme et le bovin est une espèce à sensibilité intermédiaire (Andre-Fontaine, 2001).

La littérature a décrit un certain nombre de facteurs de sensibilité des bovins à la leptospirose :

- Le sexe est considéré comme un facteur de sensibilité plutôt qu'un facteur de réceptivité. La leptospirose touche beaucoup plus les populations d'animaux de sexe femelle que mâle et notamment les femelles gestantes (Legrand, 2007).
- La conduite d'élevage : l'état sanitaire des troupeaux peut influencer sur la sensibilité des animaux vis-à-vis de l'infection par les leptospires. Cependant, il est avéré que les troupeaux soumis à des épisodes infectieux chroniques tels que le BVD ou à l'IBR vont être plus sensibles à une atteinte par la leptospirose, l'expression de la maladie sera souvent plus sévère que dans le cas de cheptels indemnes de pathologies infectieuses récurrentes.
- Les pâturages près des eaux stagnantes, des zones marécageuses et des étangs augmentent le risque d'infection des élevages extensifs par les leptospires vu que les cheptels de ce système seront en contact direct avec la source des leptospires. Ainsi, un autre risque pour ce système d'élevage réside dans la cohabitation prolongée avec les espèces de la faune sauvage qui restent des réservoirs de la leptospirose. Toutefois, l'élevage en stabulation peut aussi favoriser l'infection par la leptospirose. En effet, une litière souillée par des urines d'animaux infectés par les leptospires suite à un manque d'hygiène, va favoriser les risques d'infection

d'animaux sains se trouvant dans le même cheptel. En effet, Ismail et al (2019) ont constaté que le système semi-intensif est 11 fois plus touché par la leptospirose que le système intensive.

- La taille du troupeau influence positivement sur la séroposivité vis-à-vis de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo (Dos-Santos et al., 2012 ; Tabatabaeizadeh et al., 2011 ; Ryan et al., 2012 ; Parvez et al., 2014). Ainsi, les troupeaux avec une taille faible sont moins touchés comparés aux troupeaux de grande taille.
- L'âge est un facteur de risque potentiel vis-à-vis de la séroposivité à *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo où les jeunes sujets sont plus touchés par rapport aux plus vieux (Mazeri et al., 2013 ; Ryan et al., 2012 ; Suepaul et al., 2013).
- La race : une étude a démontré que la circulation importante du sérovar Hardjo est due aux migrations et importations de bovins, notamment du cheptel Prim'holstein (Thiermann, 1984). En outre, Ngbede et collaborateurs (2013), au Nigeria, ont trouvé une différence significative entre la race et la séroposivité vis-à-vis de *L. interrogans* sérovar Hardjo. Cependant, les races autochtones sont apparues significativement plus souvent séropositives que les races exotiques et leurs croisements.
- La saison est aussi décrite comme un facteur de sensibilité. En effet, la séroprévalence de la leptospirose est plus élevée en automne et en hiver. Si ce constat est associé avec les facteurs climatiques, il est à signaler, qu'une pluviométrie élevée ainsi qu'une bonne humidité sont décrites comme étant optimales pour l'infection par des leptospires (Legrand, 2007). En France, ce sont les souches Grippotyphosa et Hardjo qui semblent prédominer en période de fin d'été ou en début d'automne essentiellement (Rautureau, 2003).

4.2.4 Voies de pénétration

Les leptospires pénètrent principalement par voie transcutanée lorsque celle-ci présente des abrasions, des microlésions ou encore des excoriations. Ils peuvent pénétrer aussi à travers une peau fine ou ayant été en contact longtemps avec un milieu aqueux contaminé (Faine et al., 1999). Par ailleurs, les leptospires pénètrent très facilement dans les muqueuses buccales, génitales, oculaires et pituitaires par le biais de gouttes d'urines aérosolisées au sein de la stabulation (Andre-Fontaine et al., 1985). Cependant, la voie oculaires et pituitaires nécessitent un contact étroit de l'animal avec la matière virulente et

ne sont donc que très rarement incriminées (Faine et al., 1999). Les transmissions du germe lors de la gestation, les morsures de sangsues, par ingestion ou même par transfusion sanguine sont toutefois possible (Colin, 2000 ; Sykes et al., 2011). L'espace interdigité est la zone privilégiée de passage des leptospires car son tégument est fragile et souvent le siège de microlésions (Kossey-Vrain, 2004).

4.2.5 Mode de transmission

Les bovins se contaminent par les leptospires soit par contact direct avec l'animal excréteur ou indirectement à partir des matières virulentes présentes dans l'environnement.

- **Transmission directe :** ce mode de transmission se fait avec des urines, du sang ou un autre fluide corporel contenant des leptospires pathogènes. Cette transmission fait intervenir la voie horizontale et verticale. En effet, la transmission verticale a été démontrée par l'isolement de souches du sérovar Hardjo (séro groupe Sejroe) chez des avortons mais aussi chez des fœtus normaux (Levett, 2001), elle se réalise au moment d'une infection transplacentaire pouvant provoquer soit un avortement, soit la naissance d'un veau infecté chroniquement. La transmission verticale peut aussi s'effectuer lors de la tétée d'une mère infectée ou lors d'une mammite leptospirosique en phase septicémique de la maladie (Vijayachari et al., 2008).

La transmission horizontale est la plus répandue et se réalise lors de contacts étroits entre les animaux infectés et les sains. A titre d'exemple, les animaux se contaminent dans les salles de traite ou dans les abreuvoirs via les aérosols d'urine ou encore suite à un contact avec des congénères excréteurs.

La transmission vénérienne est possible entre les animaux malades et les animaux sains (Sleight, 1965 ; Eaglesome et Garcia, 1997). La contamination se réalise également par le biais d'insémination artificielle et de transplantation embryonnaire.

- **Transmission indirecte :** Il s'agit du mode de contamination le plus dominant, correspondant à une infection à partir d'un environnement contaminé par l'urine provenant des animaux réservoirs. Elle se fait par l'intermédiaire des rivières, des lacs, des étangs ou des eaux douces souillées par les sécrétions des vaches ayant avorté, des urines, de la boue ou des égouts des animaux réservoirs ou de la faune sauvage.

Les mêmes modalités de transmission existent chez l'homme (fig. 17). La transmission de l'homme se fait essentiellement de façon indirecte, par contact avec le milieu (eaux

douces, eaux d'égouts.) contaminé par l'urine d'animaux réservoirs (Daoudal et al., 1997 ; Levett, 2001). Une contamination directe est possible (Merien et Berlioz, 2005), elle se fait par contact avec les matières virulentes, à savoir les urines d'animaux porteurs, le lait, le sperme ou les sécrétions vaginales d'animaux infectés. Ce mode de transmission est possible lors de la manipulation des animaux par des professionnels (Heinemann et al. 1999 ; Sessions et Greene, 2004). Ainsi, d'un point de vue professionnel, les éleveurs, les vétérinaires, le personnel des abattoirs, les inspecteurs des viandes, les bouchers... sont plus exposés du fait de leur contact étroit et direct avec un animal potentiellement infecté (Alagninouwa et Becker, 2012). Hardjo dont les bovins constituent l'espèce réservoir est le sérovar le plus souvent contaminant et infectant pour cette catégorie de professionnels. Aux États-Unis, les éleveurs et les vétérinaires constituent la catégorie professionnelle la plus touchée par la leptospirose. En revanche, la transmission d'homme à homme est rare ou inexistante (Vijayachari et al., 2008 ; Adler et Moctezuma, 2010). Le sérovar peut varier en fonction du mode de contamination. Les personnes contaminées à partir de l'environnement présentent quant à elles majoritairement des titres en anticorps élevés pour le sérovar *Ictérohaemorrhagiae* (Waitkins, 1986).

Les professionnels des activités de loisir aquatique sont particulièrement exposés en raison des risques suite au contact animal, comme lors de la chasse, aussi, les risques de l'exposition à des milieux et des endroits contaminés par les réservoirs des leptospires (surtout par la faune sauvage) lors de la pêche, de baignades en eau douce, ou lors de canotage (Nardone et al., 2002).

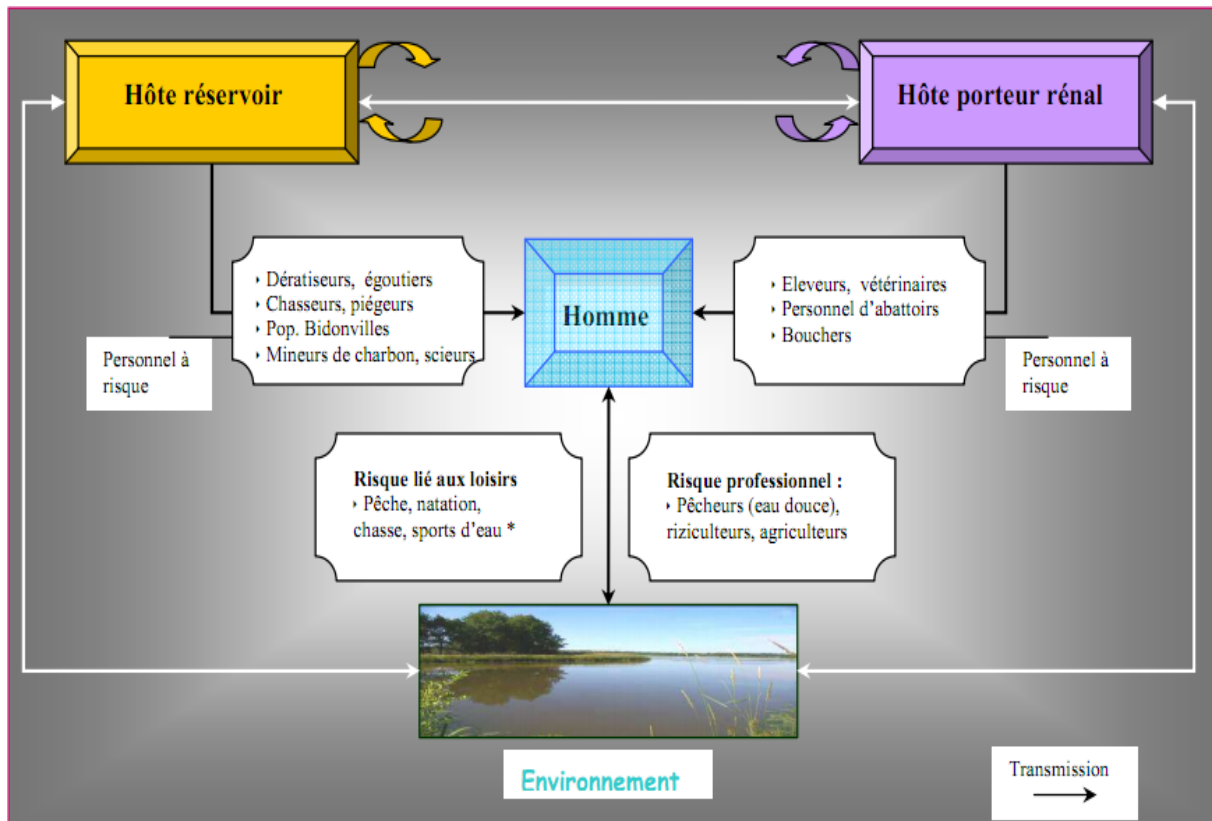


Figure 17: Transmission de la leptospirose entre les espèces réservoirs et les hôtes accidentels et risque associé (Waikins, 1986 ; Michel et al., 2002 ; Haake et al., 2002 ; Morgan et al., 2002).

5 Manifestations cliniques et lésions

5.1 Manifestations cliniques chez le bovin

Les symptômes de la leptospirose sont variés en fonction des caractères de la souche infectante selon le séro groupe mis en cause et la réponse immunitaire de l'animal infecté (Andre-Fontaine et Ganiere, 1992 ; Ellis, 1992). La durée d'incubation est en moyenne d'une à deux semaines (généralement entre deux jours et trois semaines) (Guerra, 2009).

Chez les bovins, la forme clinique habituellement décrite est le plus souvent infra clinique (Ellis, 1981). En effet, les formes subaiguës et chroniques sont dominantes mais les formes suraiguës et aiguës sont aussi présentes.

5.1.1 Forme suraiguë

Dans cette forme, les jeunes sujets sont plus touchés que les sujets âgés (Pages, 2001 ; Andre-Fontaine, 2004). Elle se manifeste par une mort subite en quelques heures avant l'installation des symptômes.

Les souches des sérogroupes Ictérohaemorrhagiæ, Pomona et Grippotyphosa sont souvent non adaptées aux bovins et sont les responsables de la forme suraiguë (Ellis, 1981).

5.1.2 Forme aiguë

Un syndrome fébrile, de l'anorexie, une anémie hémolytique, un ictère, une hémoglobinurie, une congestion pulmonaire et parfois une méningite et de la mortalité, sont les manifestations cliniques majeures de certains cas de cette forme notamment chez les veaux, et le sérovar en cause est Pomona (Faine et al., 1999). Ainsi, les animaux convalescents présentent des retards de croissance et des lésions rénales suffisantes pour induire des saisies à l'abattage.

A l'autopsie, les lésions décrites sont : un cadavre ictérique avec une distension de la vésicule biliaire, une splénomégalie et une glomérulopathie aiguë (Gaumont, 1983 ; Brugere-Picoux, 1994 ; Alagninouwa et Becker, 2012).

Chez la vache laitière, l'infection par le sérovar Hardjo se manifeste par une mammite atypique (Ellis, 1981). Cette forme clinique est appelée le syndrome de la goutte de lait « milk-drop syndrome » et ses caractéristiques sont : (1) une chute soudaine et importante de la production laitière pendant 2 à 10 jours ; (2) un pis mou et flasque avec tous les quartiers de la mamelle atteints ; (3) un lait grumeleux, rosâtre, teinté éventuellement de sang. L'analyse bactériologique du lait ne révèle aucun germe classique responsable de mammites mais on peut isoler des leptospires et l'analyse cytologique montre un nombre très élevé de leucocytes et de cellules somatiques ; (4) le traitement n'a aucune influence sur l'évolution de la maladie et les vaches guérissent relativement vite, avec une production lactée qui retrouve la normale en 10-14 jours (Brown et al., 1995 ; Alagninouwa et Becker, 2012), à l'exception des vaches en fin de gestation qui peuvent se tarir ; (5) le nombre d'animaux affectés peut varier de 1 à 50, selon l'état immunitaire des vaches et les techniques pratiques de gestion des troupeaux (Alder, 2015). Certaines complications vers une forme ictéro-hémoglobinurique peuvent être observées.

En association avec la mammite, des signes généraux vont apparaître, avec augmentation de la température rectale (40 à 41 °C), des muqueuses ictériques ainsi qu'une hémoglobinurie associée à une polyurie.

5.1.3 Formes subaiguës ou chroniques

L'avortement, la mortinatalité, les naissances prématurées, les naissances de veaux faibles et une baisse de la fertilité représentent l'ensemble des manifestations de la forme chronique de la leptospirose bovine. Cependant, cette forme touche surtout les femelles et se manifeste par des troubles de la reproduction (des avortements et une baisse de la fertilité) (Andre-Fontaine, 2003).

Dans les infections accidentelles, l'avortement chez la vache peut se produire dans certains cas après 4 à 6 semaines dans la forme aiguë (Alder, 2015). En revanche, l'infection par *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo entraîne un avortement dans un délai de 4 à 12 semaines (Ellis, 1999). La placentite due à Hardjo entraîne la naissance de fœtus mort-né ou de veaux faibles, infectés et présentant une dégénérescence du foie ou des reins (Bolin et al., 2000). Les veaux survivants deviennent des porteurs chroniques de leptospires (Giles, 1983). Les avortements ont eu lieu au dernier trimestre de la gestation (Tainturier et al., 1997). Les leptospires ont été détectés dans les écoulements vaginaux après l'avortement sur une période de 8 jours (Ellis et al., 1985). Une rétention placentaire peut accompagner les avortements, essentiellement chez les vaches ayant avorté entre octobre et janvier.

L. borgpetersemii sérovar Hardjo présente une adaptation particulière pour survivre dans le tractus génital de la vache. Les leptospires ciblent les cellules trophoblastiques qui sont en regard des villosités cotylédonnaires, ce qui permettait une contamination du placenta. Le fœtus peut alors être contaminé par le biais de la veine ombilicale (Murray, 1999).

L'infection leptospirosique peut être associée à certains germes, à savoir les agents bactériens tels que les campylobacters (Ellis, 1981) ou parasites comme *Neospora caninum* (Otter et Wilson, 1997).

Les avortons causés par la leptospirose ne présentent pas de lésions spécifiques, ces dernières se manifestent par un ictère des tissus sous cutanés de l'avorton. Par ailleurs, des pétéchies sur la surface des poumons, du cœur, de la plèvre pariétale, du thymus, et de la thyroïde sont les lésions dominantes pour les fœtus nés vivants (Berger, 1999).

La leptospirose entraîne aussi chez la vache des endométrites qui sont causées par la naissance à terme de veaux malades avec non délivrance, ces veaux présentent une taille et un poids inférieurs à la norme associant de l'anoxie et des cas de mortalité en per et post-partum avec non délivrance (Tainturier et al., 1997).

Des problèmes de fertilité ont été constatés par l'infection à *L. interrogans* sérovar Hardjo. En effet, Dhaliwal et collaborateurs, en 1996, ont trouvé après avoir analysé des données sur la reproduction du cheptel bovin pendant une durée de quarante ans, que les mauvais bilans enregistrés sur la reproduction sont en rapport avec les années où l'infection leptospirosique a été diagnostiquée. Afin de connaître la cause des troubles de la fertilité, les chercheurs ont mesuré les valeurs de la progestérone sanguine à différentes périodes du cycle sur des vaches séropositives et séronégatives vis-à-vis de *L. interrogans* sérovar Hardjo. Ils ont trouvé que la progestéronémie des vaches séropositives était significativement plus basse que celle des séronégatives, au milieu de la phase lutéale ce qu'est pu expliquer le rôle joué par le sérovar Hardjo dans la baisse des performances de reproduction (des problèmes d'infertilité). Selon Guitian et al, le sérovar Hardjo entraîne un prolongement de la durée vêlage-insémination fécondante et une augmentation du nombre d'insémination par insémination fécondante (Guitian et al., 1999).

D'une manière générale, Le schéma de l'infection des bovins à Hardjo varie en fonction des conditions d'élevage et de la souche de Hardjo présente. Dans les élevages infectés d'une façon endémique, où les jeunes animaux sont exposés à l'infection avant la reproduction, les pertes économiques associées aux troubles de la reproduction sont très faibles (Alder, 2015). En effet, les systèmes de gestion, que l'on trouve en particulier dans les élevages laitiers intensifs, peuvent contribuer à la prévalence de la leptospirose bovine, notamment les pratiques consistant à séparer les veaux à la naissance et ne les mettre en contact avec animaux adultes infectés qu'après la puberté, ce qui garantit un approvisionnement régulier des animaux sensibles (Alder, 2015). Dans certaines régions du monde, les souches de Hardjo sont associées aux troubles de la reproduction, alors que dans d'autres, ces souches ne présentent aucun problème, notamment en Australie et en Nouvelle-Zélande (Sanhueza et al., 2013).

5.2 Manifestations cliniques chez l'humain

Tous les sérovars de *Leptospira interrogans* sensus lato peuvent toucher l'homme et aucun symptôme n'est pathognomonique de tel ou tel sérovar, bien que certains aient tendance à être associés à une sévérité de la maladie. Cette dernière se représente généralement sous deux formes : une forme subaiguë ou pseudo-grippale et une forme ictérique ou pluriviscérale avec une phase d'incubation d'environ 7 à 12 jours, bien qu'elle puisse être aussi courte que 3 jours ou aussi longue qu'un mois (Morgan et al., 2002).

- **Forme anictérique (pseudo-grippale)**

Cette forme peut être due à *L. Icterohaemorrhagiae* qu'est la plus répandue et représente 80% des cas de la leptospirose humaine, elle se manifeste par des symptômes peu spécifiques qualifiés d'un syndrome grippal avec :

- ◆ Des troubles généraux, à savoir : un état fébrile biphasique d'apparition brutale, avec frissons, courbatures et fièvre à 39-40°C. Aussi, des douleurs abdominales, musculaires, articulaires avec des maux de tête.
- ◆ Des suffusions conjonctivales et des pétéchies sont souvent notées associés à un érythème cutané transitoire et une hépato-splénomégalie.

Le taux de létalité de cette forme est quasi nulle et en absence de l'antibiothérapie, les signes cliniques régressent en 5 à 6 jours après la production d'anticorps protecteurs (Levett, 2001 ; Brown et Prescott, 2008 ; Boibieux, 2012).

- **Forme ictérique**

Forme grave, ictéro-hémorragique appelée aussi maladie de Weil, exprimée par un ictère, une insuffisance rénale aiguë et des hémorragies plus ou moins sévères (pulmonaires et digestives) (Seguro et Andrade, 2013). Elle est moins fréquente (5 à 10% des cas), elle est classiquement due à *L. Icterohaemorrhagiae*.

Les manifestations cliniques débutent par un syndrome pseudo-grippal comme précédemment décrit. Dans la deuxième phase, apparaissent des signes d'atteintes divers, à savoir :

- Un ictère de type cholestatique dit «flamboyant» avec une surcoloration jaune des muqueuses (déjà congestionnées) par une bilirubine conjuguée ou mixte. Il est pathognomonique au niveau de la sclère oculaire (fig. 18 (A)).
- Une insuffisance rénale aiguë qui se traduit cliniquement par une oligurie, voire une anurie, une hématurie et une modification des paramètres biochimiques. L'oligurie est le signe d'un pronostic très péjoratif et sombre, nécessitant souvent une dialyse.
- Des hémorragies digestives, épistaxis et purpuras (fig. 18 (B)).
- Des troubles respiratoires de type toux, dyspnée, hémoptysie et détresse respiratoire. Des hémorragies pulmonaires, essentiellement intra-alvéolaires pouvant entraîner la mort du patient.
- Des problèmes cardiaques de type péricardite, myocardite, collapsus et des anomalies sur l'ECG (troubles de la conduction auriculo-ventriculaire).

- une méningite lymphocytaire avec myalgie, maux de tête, raideur de la nuque et des vomissements (Levett, 2001 ; Sertour et al., 2002 ; Bharti et al., 2003 ; Langston et Heuter, 2003).

Le taux de mortalité est relativement élevé entre 2 et 30, ce qui explique la gravité de cette forme par rapport à la précédente car les signes cliniques évoluent rapidement et les patients sont souvent pris en charge trop tard (Levett, 2001 ; Terpstra, 2004 ; Boibieux, 2012). La convalescence est longue, mais généralement sans séquelle. Des complications oculaires (uvéïte et kératite) peuvent survenir tardivement (Rathinam, 2005 ; Verma et Stevenson, 2012).



Figure 18: Les symptômes de la leptospirose humaine; (A) suffusion conjonctivale et (B) purpuras, (Source: Jansen et Schneider, 2011 ; The Leptospirosis Information Centre: Human Clinical Signs).

5.3 Manifestations cliniques chez les autres animaux

Chez les petits ruminants (chèvres et moutons), la leptospirose se manifeste par des troubles de la reproduction : avortements, mortinatalité, infertilité et augmentation de

l'intervalle entre les mises bas (Lilenbaum et Souza, 2003 ; Ramos et al., 2006 ; Suepaul et al., 2011). Chez le mouton, les formes frustres voire asymptomatiques sont les plus fréquentes (Ciceroni et al. 2000). Les infections sont généralement causées par les quatre sérogroupes (Pomona, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae et Australis), elles sont accidentelles et entraînent des cas sporadiques de la forme aiguë caractérisée par une hématurie, de l'hémoglobinurie, de l'ictère et la mort, généralement chez les agneaux. Des avortements occasionnels sont enregistrés chez les brebis (Ellis et al., 1983 ; Leon et al., 1987). Chez la chèvre, les manifestations cliniques sont similaires à ceux rapportées chez les moutons et les bovins avec des taux de mortalité élevés pour le sérovar Grippotyphosa (Torten, 1979). L'infection avec les autres sérovars de *Leptospira* provoque des avortements (Leon et al., 1987; Dehkordi et Taghizadeh, 2012).

L'infection des chevaux par les leptospires demeure souvent inapparente, cependant, des anticorps sont fréquemment détectés chez les animaux sains (Donahue et al., 1995). Des prévalences élevées vis-à-vis du sérovar Kennewicki ont été obtenues chez cette espèce (Alder, 2015). L'infection cliniquement exprimée se traduit par des avortements, par la naissance de prématurés (Poonacha et al., 1993), par des troubles rénaux, hépatiques ou par des atteintes générales chez le poulain. Cependant, l'uvéite est la manifestation clinique la plus fréquente (Hogan et al., 1996).

5.4 Tableau lésionnel

5.4.1 Lésions macroscopiques

- **Lésions générales :**

L'étude des modèles animaux et les séries d'autopsies mettent en évidence la présence de lésions de vascularite, d'une atteinte endothéliale et d'infiltrats inflammatoires au niveau du foie, des reins, du cœur et des poumons.

L'examen nécropsique et les séries d'autopsie mettent en évidence la présence de lésions de vascularite, un ictère généralisé, des hémorragies multiples et des pétéchies ou ecchymoses localisées sur la peau, les muqueuses internes comme externes, les séreuses et les parenchymes (Schoenaers et Kaeckenbeeck, 1971). L'ensemble des viscères, des cavités thoraciques (cœur et poumons) et abdominales (estomac et intestins) ainsi que la graisse, montrent une coloration jaunâtre très nette (Perez bonilla et al., 1983).

En outre, des œdèmes dans le tissu sous-cutané et rétro péritonéal qui laissent exsuder une sérosité qui se dessèche, des lésions nécrotiques des extrémités ou encore des ulcères de la

troisième paupière (Rautureau, 2003). Par ailleurs, dans les muscles cardiaques et squelettiques des lésions de myocardites et des foyers de myosites peuvent être observés, respectivement. Un mécanisme d'autoimmunité semble aussi responsable de l'atteinte ophtalmologique qui peut survenir plusieurs semaines après le début des symptômes (Bharti, 2003). Des ulcères au niveau de la cavité orale et gastrique sont aussi des lésions constatées suite à l'effet de l'urémie (Greenlee, 2005).

- **Lésions rénales et pulmonaires :**

Les reins souvent apparaissent tuméfiés, hypertrophiés et congestionnés. Toutefois, ils peuvent même dans certains cas apparaître hémorragiques (Fig. 19). Ces lésions congestives prédominent dans les formes aiguës (Osborne et al., 1976). La surface des reins est lisse, hétérogène avec différentes taches nécrotiques sombres et sa couleur varie de brun foncé au noir. Il y a aussi la présence d'un œdème péri rénal et des foyers d'hyperhémie sur la surface rénale (Fig. 20) (Greenlee, 2005 ; Pages, 2001). Au niveau des poumons, on observe des œdèmes secondaires à une pneumonie, congestion et pétéchies sur le parenchyme pulmonaire et quelque fois une hémorragie pulmonaire (Fig. 21) (Greenlee, 2005).

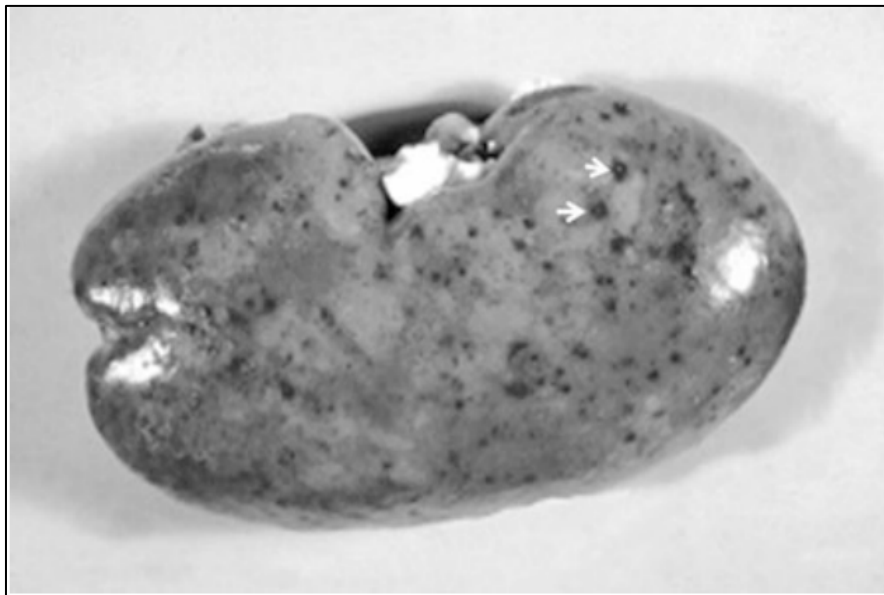


Figure 19: Des lésions hémorragiques sur la surface des reins d'un animale infecté par le sérovar Canicola (Alder, 2015).

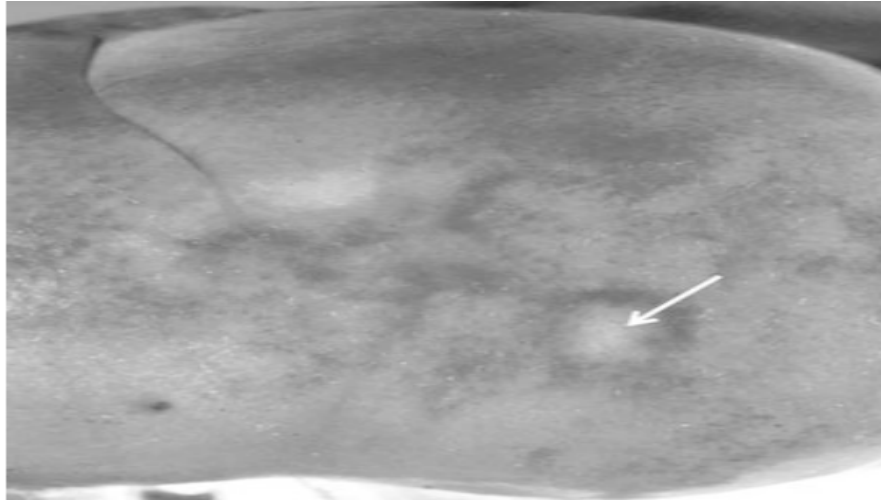


Figure 20: Lésion en foyer pâle entourée d'hyperémie sur un rein de bovin infecté par le sérovar Hardjo (Alder, 2015).

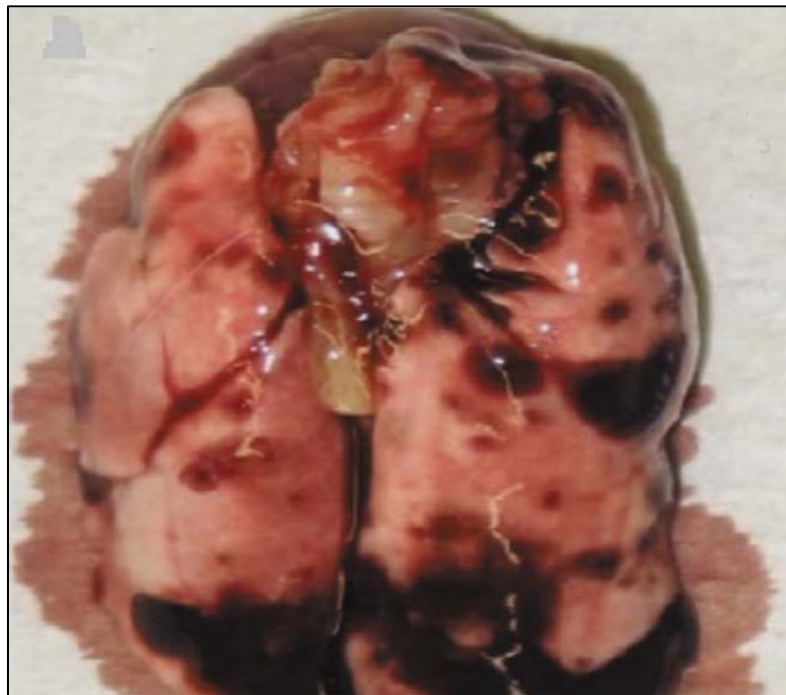


Figure 21: Hémorragie pulmonaire chez un cochon d'inde infecté par une souche de *Leptospira interrogans* sérovar Copenhageni obtenue à partir d'un patient Brésilien atteint de leptospirose avec hémorragie pulmonaire (Bharti, 2003).

- **Lésions hépatiques :**

Le foie apparaît hypertrophié, friable avec accentuation de sa lobulation, ses lobes sont décolorés (jaune, marron) (Bishop, 1979 ; Pages, 2001 ; Greenlee, 2005). La vésicule biliaire est distendue par une bile pâteuse de couleur noir brillant (Perez bonilla et al., 1983). Les lésions hépatiques sont corrélées à l'atteinte des systèmes enzymatiques hépatiques.

- **Lésions fœtales et placentaires :**

Pour les avortons, l'autolyse est la cause des lésions non spécifiques observées, on peut mettre en évidence un ictère des tissus sous-cutanés.

Au contraire, pour les fœtus nés vivants, des lésions comparables à celles produites par l'anoxie sont constatées, avec des pétéchies sur la surface de la thyroïde, de thymus, des poumons, du cœur et de la plèvre pariétale. Dans le cas de fœtus avortés suite à une infection par *L. hardjo* ou par *L. icterohaemorrhagiae*, des cas de lésions vasculaires sévères essentiellement dans le foie mais aussi à un moindre degré, dans les méninges cérébrales et les septa interlobulaires des poumons ont été observées. Il se produit alors une congestion vasculaire, une nécrose et une hémorragie périvasculaire.

Les cotylédons sont aussi touchés dans le cas d'avortement à *L. pomona* jaunâtres et avasculaires de façon uniforme (Berger, 1999).

5.4.2 Lésions microscopiques :

Les reins et le foie sont les organes essentiellement concernés par les lésions histologiques.

a- Histologie rénale :

D'après Yang et collaborateurs, en 2002, il y a une néphrite interstitielle aiguë ou subaiguë accompagnée d'une congestion plus ou moins intense du réseau capillaire du rein et d'une intense infiltration cellulaire (polynucléaires) et d'une nécrose des tubules rénaux (fig. 22). Ces cellules sont principalement des monocytes, des macrophages, des plasmocytes et des lymphocytes. Les cellules de la bordure en brosse des tubules sont absentes ou réduites et les glomérules sont atteints, ce qui expliquerait la protéinurie observée cliniquement en cas de leptospirose (Levett, 2001).

L'épithélium des tubules contournés proximaux et distaux présente également des lésions. Ceux-ci peuvent présenter des cellules dégénérantes, des granulations hyalines ou des cellules nécrosées. Le glomérule ne présente pas réellement des lésions microscopiques (Kossey-Vrain, 2004).

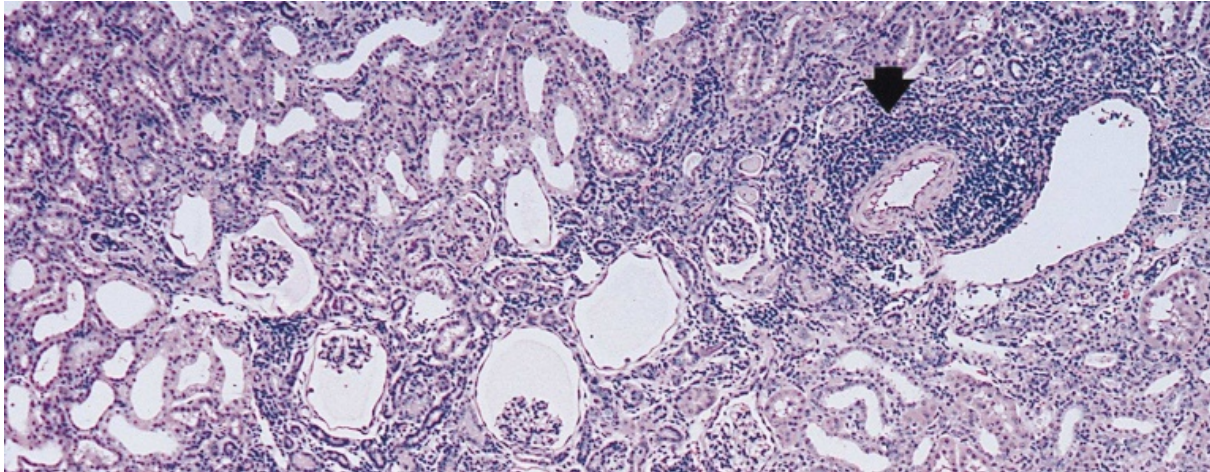


Figure 22: Coupe histologique de rein d'un hamster infecté par une culture de leptospires dérivée de *L. Kirschneri* (Barnett et al., 1999).

b- Histologie hépatique :

Au niveau du foie, les lésions d'ischémie sont responsables d'une nécrose centro-lobulaire et de dégâts cellulaires avec des hépatocytes présentant un aspect dégénéré : le cytoplasme de ces cellules est envahi de granules éosinophiliques. Le noyau est petit, rétracté ou lysé. Il peut arriver que les hépatocytes soient binucléés. Dans certaines coupes des hépatocytes présentent des noyaux pycnotique ou caryolytique et des cytoplasmes irréguliers. S'ajoute à cela, l'occlusion des canalicules biliaires et du canal cholédoque qui aggrave la mise en place de l'ictère. En plus de la simple nécrose, des lésions inflammatoires de type hépatite neutrophilique périportale sont rapportées. L'inflammation du foie est variable, on trouve des hépatites aiguës ou chroniques (Goldstein, 2010). Une hyperplasie avec hypertrophie des cellules de Küpffer a été mise en évidence, ainsi que des images d'erythrophagocytose (Levett, 2001).

6 Diagnostic

6.1 Données cliniques et éléments épidémiologiques

La leptospirose est une maladie difficile à diagnostiquer, dont les manifestations cliniques sont relativement protéiformes. Ce manque de spécificité clinique aboutit fréquemment à une sous-estimation des diagnostics de leptospirose. Néanmoins, il existe des critères et des éléments épidémiologiques de forte suspicion. En effet, la maladie est suspectée cliniquement lors des problèmes d'avortement et de fertilité rencontrés dans des élevages de bovins situés à côté des étangs, des lacs et des rivières sources permanentes des leptospires. Surtout si ses derniers renferment des rongeurs. Ecore lors de contacts entre

les bovins et la faune sauvage dans les pâturages. Une pathologie infectieuse de type leptospirosique peut être suspectée lorsque les animaux touchés sont des animaux jeunes ou nouvellement introduits dans le cheptel (Andre-Fontaine, 2003).

6.2 Diagnostic nécropsique

À l'autopsie, des hémorragies cutanées, conjonctivales ou muqueuses sont fréquemment observées. Le conjonctif sous-cutané, le péritoine, les plèvres, le péricarde et les méninges peuvent être ictériques, avec des pétéchies ou des suffusions. Les nœuds lymphatiques sont hypertrophiés et parfois hémorragiques.

Le foie est de taille normale ou hypertrophié, de couleur pâle ou jaune et présente des suffusions superficielles. Les lésions les plus significatives se situent au niveau rénal, quel que soit l'espèce et le sérovar en cause. Les reins sont hypertrophiés et de couleur jaune-vert quand l'animal est ictérique, avec des hémorragies sous-capsulaire. Mais ces lésions ne seront observables que dans les cas d'épisodes aigus et ne sont pas pathognomoniques, même pour les avortons, les lésions observées ne sont pas caractéristiques ni spécifiques.

6.3 Diagnostic différentiel

Selon la forme de l'infection aiguë ou chronique, les signes cliniques de la leptospirose peuvent être confondus avec plusieurs maladies infectieuses. Pour la forme aiguë ou ictérohémorragique, avec le foie et les reins touchés entraînant un ictère avec des urines foncées, elle doit être différenciée avec d'autres maladies infectieuses telles que la piroplasmose (babesiose, thelériose, anaplasmose). Même les causes toxiques peuvent provoquer des problèmes hépatorénaux identiques à ceux liés aux leptospires, à l'instar de l'intoxication par le cuivre (Andre-Fontaine, 2003).

Concernant la forme chronique de la leptospirose, des avortements ou des troubles de la fertilité ont été décrits. Il faut penser alors à différentes causes d'origine infectieuse ou iatrogène. En effet, en cas d'avortements, on pourra incriminer des maladies infectieuses incluant la leptospirose, mais aussi la brucellose, la salmonellose, la néosporose ou encore la fièvre Q. D'après Tainturier et collaborateurs, 1997b, même si les causes mécaniques sont bien moins fréquentes que les causes infectieuses, il faut prendre en compte les causes mécaniques dans le diagnostic des avortements.

6.4 Diagnostic de laboratoire

Le diagnostic clinique et nécropsique reste insuffisant. Le recours à la confirmation par des examens de laboratoire est primordiale en termes de santé publique.

Pendant la phase d'invasion, les leptospires se multiplient dans le sang, un prélèvement sanguin sur tube hépariné peut être réalisé pour mettre en évidence une leptospirémie 1-15 jours après pénétration des leptospires dans l'organisme. Après deux semaines, les bactéries se répartissent dans différents organes, en particulier dans les reins. A partir de 10 jours post-infection, les leptospires sont excrétés dans les urines (Fig. 23). Cette excrétion est maximale vers la troisième ou la quatrième semaine d'infection (Bolin, 1996). Les urines doivent êtreensemencées dans l'heure suivant le prélèvement ou conservées à + 4°C et à l'obscurité. De plus les urines doivent être alcalinisées pour atteindre un pH compris entre 6,6 et 8 (Thiermann, 1983).

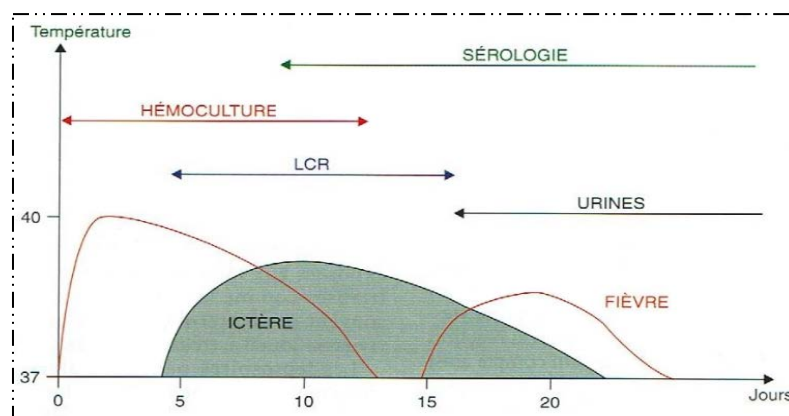


Figure 23: Chronologie d'apparition des leptospires dans les différents liquides biologiques et évolution des possibilités de diagnostic de la leptospirose en fonction du temps (Denis et al., 2016).

Tout un panel de méthodes a été développé au fil des années pour tenter d'améliorer le diagnostic de la leptospirose. Classiquement, on distingue les méthodes de détection de la bactérie, de ses antigènes ou de son matériel génétique et de celles de révélation des anticorps.

6.4.1 Examen direct :

L'examen direct est un diagnostic par mise en évidence de la bactérie. La mise en évidence se fait par visualisation de la bactérie permettant une identification directe ou par des techniques de détection d'ADN spécifique.

6.4.1.1 Observation bactériologique directe

• Prélèvements

D'après, Euzeby, en 2009, la réalisation correcte des prélèvements pour un examen bactériologique direct est indispensable afin d'éviter des résultats faux positifs. Trois

conditions sont impératives à satisfaire pour que le laboratoire reçoive des prélèvements exploitables :

- il faut que les prélèvements soient effectués avant la mise en place de toute antibiothérapie et ne doivent pas être congelés dans toutes les constances (Kososse-Vrain, 2004).
- il faut respecter les délais durant lesquels les leptospires sont présents dans le tissu ou le fluide prélevé, vu que les leptospires migrent dans le corps au cours du temps (fig. 23).
- il faut transporter les prélèvements dans de bonnes conditions pour garder des leptospires vivants jusqu'à l'arrivée au laboratoire.

Les prélèvements concernés pour la recherche des leptospires sont, les fluides corporels (sang, urines, lait, liquide cébrospinal, péritonéal ou thoracique) ou encore les organes internes (reins, foie, poumon, avortons, cerveau, appareil génital etc...) (OIE, 2009). Cependant, leur séquence suit toujours une chronologie précise (fig. 23).

- Le sang, est l'échantillon le plus approprié car il contient des leptospires durant la phase de bactériémie, qui pourront être mis en culture durant les dix premiers jours après le début des symptômes. La collecte du sang se fait de manière aseptique sur tube hépariné pour la culture (tube sec pour une sérologie, tube EDTA pour la PCR. Le tube citraté est à proscrire car le milieu citraté va entraîner une acidification du milieu, néfaste aux leptospires (Perolat et Baranton, 2000).

- Les leptospires peuvent être isolés au cours de la deuxième semaine post-infection à partir du liquide cébrospinal. Leur mise en évidence sera effectuée par microscopie à fond noir (Berech, 1989).

- Plus tardivement, des prélèvements d'urine peuvent être réalisés, la leptospiurie se manifeste à partir du dixième jour suivant les premiers symptômes et devient maximale vers la troisième ou quatrième semaine d'infection (Bharti et al., 2003). Avant le recueil des urines, l'animal devrait recevoir avant le prélèvement, du bicarbonate de sodium afin de réaliser une alcalinisation des urines ou à défaut, il faudrait ajouter à l'urine prélevée une solution tamponnée stérile afin de diluer son acidité qui est néfaste à la survie des leptospires. Les animaux porteurs peuvent excréter des leptospires dans leurs urines pendant plusieurs années de façon intermittente. Ainsi, la présence de leptospires dans les urines reste possible, sans symptômes associés ni sérologie effectuée, ce qui traduit un état de portage et non forcément une infection aiguë. A l'inverse, l'excrétion étant

intermittente, le fait de ne pas trouver de leptospires dans les urines, indique que l'individu n'excrète pas une quantité suffisante de leptospires pour être détectés au moment du test. Dans certains cas, comme par exemple lors du retour d'un étalon ayant été infecté dans son élevage, l'obtention de trois tests sur les urines, successivement négatifs, à sept jours d'intervalle, objective le fait qu'il n'y ait plus d'excrétion de leptospires dans les urines. Les urines devront être conservées entre 2 C° et 4 C° et à l'obscurité.

Des tissus ou organes de fœtus mort-nés ou avortés peuvent être utilisés en post mortem, pour mettre en évidence des leptospires (la mise en culture). La présence de leptospires permet de diagnostiquer une infection aiguë du fœtus résultant d'une leptospirose chronique chez la mère. Ainsi, les prélèvements des organes doivent être réalisés très rapidement après la mort car l'autolyse va entraîner la destruction des leptospires. De plus, la contamination par d'autres germes peut perturber la détection des leptospires. Cependant, l'utilisation de substances inhibitrices (tels que le 5-fluorouracil) permet d'éviter cette contamination (Thiermann, 1984).

- **La visualisation des leptospires au microscope**

Cette observation est réalisée au moyen d'un microscope à fond noir du fait de leur faible dimension (moins de deux micromètres) (Fig. 24) (Dikken, 1981). L'observation se fera entre lame et lamelle avec un grossissement de 250 (Dikken, 1981). L'observateur étudie la morphologie caractéristique des leptospires en filament incurvé ainsi que leur mobilité particulière qui s'effectue par rotation, flexion et translation.

Pour réaliser cet examen, le sang doit subir une double centrifugation : une première centrifugation de 1000 tours par minute pendant 10 minutes puis une deuxième centrifugation à 4000 tours par minute pendant 20 minutes, ce qui va permettre d'éliminer les cellules dans un premier temps puis de concentrer les leptospires ensuite (Perolat et Baranton, 2000). Les urines ou le liquide céphalo-rachidien peuvent être également centrifugés. Le liquide prélevé pour observation doit être le plus proche possible du culot de centrifugation qui est la zone de concentration des leptospires (O'keefej, 2002).

Cette technique est très peu sensible, elle nécessite un prélèvement très frais et sur des individus présentant une leptospirurie ou une leptospirémie supérieure à 10⁴ bactéries/ml (Andre-Fontaine et Ganiere, 1992). De plus, la spécificité est également mauvaise; en effet, les leptospires sont souvent confondus avec des filaments de fibrine,

des débris cellulaires, des spermatozoïdes ou d'autres spirochètes (apparition de faux positifs) (Dikken, 1981 ; Kosossey-Vrain, 2004), d'où la nécessité d'un observateur expérimenté. La morphologie ne permet pas de distinguer les leptospires pathogènes des leptospires saprophytes (Levett, 2001). L'ensemble de ces raisons, ne permet pas à la microscopie d'être considéré que comme un examen d'orientation, elle doit obligatoirement être confirmée par la culture (Johnson, 1976).

Pour les examens histologiques, les leptospires sont généralement observés après coloration argentique (Blenden et Goldberg, 1965), par immunofluorescence (Levett, 2001 ; Bharti et al., 2003), par la coloration à la peroxydase ou à l'acridine orange (Terpstra et al., 1983).

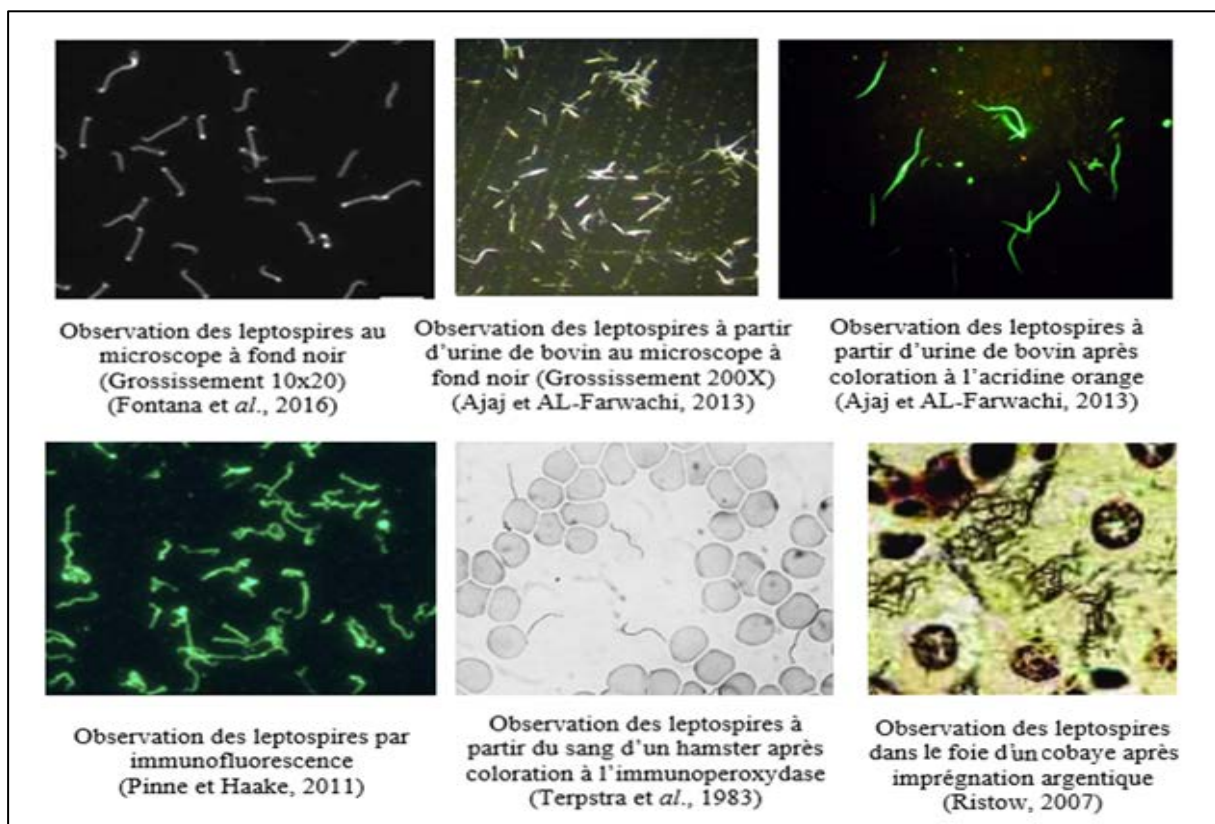


Figure 24: Les différentes observations microscopiques directes ou après colorations des leptospires.

6.4.1.2 Culture :

Cette technique permet d'établir un diagnostic de certitude, cependant, sa réalisation est très délicate et très longue (environ 13 semaines) (Levett, 2001). Le prélèvement une fois effectué doit être mis en culture le plus rapidement possible (dans les quatre heures suivant le prélèvement et ne peut se faire sur échantillons congelés) (Saengjaruk et al., 2002).

La culture se réalise sur le sang, le liquide céphalo-rachidien dans la première semaine de la maladie et les urines lors des deux semaines suivantes (Bharti et al., 2003). Elle se fait dans des milieux spécifiques pour leptospires : le milieu Tween-albumine ou le milieu Ellinghausen et McCullough modifié par Johnson et Harris (EMJH). Ce dernier nécessite une préparation assez complexe et va pouvoir se conserver pendant une durée de 3 à 6 mois à 4°C. Avant ensemencement, le sang ou les urines sont dilués dix fois afin de diminuer le rôle d'éventuels inhibiteurs (Perolat et Baranton, 2000). Afin de contrôler les contaminants, certains laboratoires réalisent systématiquement une filtration des prélèvements (des membranes de porosité 0,45 µm ou de 0,22 µm) et par l'addition d'une variété d'agents sélectifs, tel que : 5-fluorouracil à raison de 100 µg/ml (Johnson et Rogers, 1964), fosfomycine à 400 µg/ml (Perolat et al., 1993), et un mélange de rifamycine, polymyxine, néomycine, 5-fluorouracil, bacitracine, et actidione (Adler et al., 1986).

Les milieux de culture ensemencés sont incubés en étuve à 30°C, à l'obscurité avec une humidité suffisante et en maintenant une agitation régulière pour faciliter leur croissance (Denis, 2007). Les cultures sont observées au microscope à fond noir les jours 1, 2, 3 post incubation puis une fois par semaine pendant 5 semaines minimum. Un repiquage systématique des tubes de culture primaire est recommandé après une incubation de quinze jours (Denis, 2007). Une culture négative ne peut être conclue qu'au bout de deux mois au minimum (Kossey-Vrain, 2004). Ce temps très long est en relation avec le temps de doublement considérable des leptospires qui est de près de vingt heures.

Enfin, même si la mise en culture donne un diagnostic de certitude permettant d'identifier la souche infectante, elle reste très fastidieuse, compliquée, coûteuse, techniquement exigeante, et longue, nécessitant une incubation prolongée (minimum 1 mois avant de déclarer un échantillon négatif) (Ahmad et al., 2005). C'est pourquoi en pratique cet examen tend à être moins utilisé pour le diagnostic de routine (Cinco, 1981 ; Bharti et al., 2003 ; Dassanayake et al., 2009).

6.4.1.3 Inoculation :

Le recours à l'inoculation animale (cobaye ou hamster) se fait lorsque le prélèvement est trop contaminé ou que les leptospires sont présents en faible quantité, ce qui rend l'observation des leptospires au microscope à fond noir ou la mise en culture difficile.

Cette technique est très sensible, elle favorise la multiplication des leptospires et facilite leur identification et la conservation de leur pouvoir pathogène (Perolat et Baranton, 2000).

Le cobaye et le hamster de moins de 150 g (2 à 3 semaines d'âge) sont les animaux de choix. Cependant, la souris, le chinchilla, le chien, la gerbille et le poussin peuvent être utilisés pour cette manipulation (Dikken, 1981). En effet, les signes cliniques et les lésions induits chez ces animaux infectés par des leptospires sont similaires à ceux d'animaux infectés naturellement.

Pour chaque échantillon, plusieurs animaux sont utilisés et inoculés à raison de 0.5 à 1 ml par voie intrapéritonéale de liquide pathologique (lait, sang, urine) (Mathon, 1979). La maladie débutant 3 à 10 jours après l'inoculation et les symptômes sont évidents à partir du 5^{ème} jour (ictère, prostration, amaigrissement). L'observation des animaux se fait tous les jours et tous les symptômes sont relevés quand ils sont présents. Pour déterminer si une phase de leptospiémie se produit, un examen au microscope à fond noir du liquide péritonéal est réalisé régulièrement pendant la phase présumée de la maladie. Si un échantillon se révèle positif en microscopie à fond noir, du sang est prélevé et mis en culture. Si un animal meurt, l'autopsie est pratiquée, le foie et les reins sont mis en culture. Cette technique de diagnostic présente plusieurs inconvénients, à savoir, les leptospires perdent rapidement leur virulence *in vitro* et tous les sérovars ne vont pas présenter de signes cliniques évidents sur les animaux inoculés. De plus, la sensibilité des animaux est variable d'un animal à un autre. En conséquence, ce moyen de diagnostic est peu utilisé sur le terrain.

6.4.1.4 Immunohistochimie :

Les techniques d'immunohistochimie sont des méthodes de localisation d'antigènes bactériens dans les cellules d'une coupe de tissu. Les sections sont exposées à des anticorps marqués dirigés contre l'antigène cible. La liaison anticorps-antigène est ensuite visualisée grâce au marqueur fluorescent (immunofluorescence) ou enzymatique (immunoenzymologie).

Les colorations se font à partir de sang, d'urine et de biopsie rénale ou à partir de prélèvements de rein ou de foie post-mortem.

Les techniques de coloration par imprégnation argentiques sont d'un intérêt limité. On leur préfère la coloration à l'immunoperoxydase. Une fois le prélèvement fixé, on y ajoute des immunoglobulines dirigées contre le type de leptospire étudié puis la préparation est mise en contact successivement avec un antisérum de lapin conjugué à une peroxydase et avec un substrat de l'enzyme. Ce substrat, après action de l'enzyme, produit un précipité

marron. Les leptospires prennent une coloration brun rougeâtre reconnaissable visualisée au microscope simple.

L'avantage de cette technique réside dans l'association de la spécificité sérologique et la reconnaissance morphologique. Ainsi, elle permet de différencier des leptospires des artefacts tels que les résidus de fibrine à condition que leur intégrité antigénique soit conservée (Drugeot, 1988). Par contre, cette méthode présente l'inconvénient de ne donner aucune indication quant à l'identité du sérovar infectant. On l'utilise plutôt pour déterminer la présence du genre *Leptospira*. En plus, Elle est conditionnée par le nombre de bactéries présentes, faible lors d'infection chronique ou sous un traitement à base d'antibiotique (Sessions et Greene, 2004).

L'immunofluorescence est une technique d'immunohistochimie particulière. Cette technique met en jeu des réactions immunologiques révélées par des réactifs colorés. Elles nécessitent l'utilisation d'antisérums spécifiques et qui sont généralement réservés à des laboratoires spécialisés. L'observation de la morphologie des leptospires s'effectue au microscope à fluorescence et l'interprétation est difficile et va nécessiter une technique de laboratoire qualifiée (Bolin, 1996). L'avantage de cette technique réside dans sa rapidité et sa facilité. Ainsi, elle présente une sensibilité pour la détection du sérovar Hardjo dans l'urine de bovin inférieure à celle des méthodes moléculaires, mais comparable, voire supérieure à celle de la culture (Bolin et al., 1989).

6.4.1.5 Techniques moléculaires

En raison des difficultés du diagnostic bactériologique classique et la nécessité d'un diagnostic rapide de la maladie, le développement de nombreuses techniques d'amplification génique par Polymerase Chain Reaction (PCR) s'est montré nécessaire. Ce sont des tests récents, basés sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), qui conduit à l'amplification *in vitro* de plusieurs millions de fois une séquence spécifique d'acide nucléique qui peut être minoritaire voire très rare. Elle exploite le processus de la réplication et fait appel, pour cela, sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Pour initier le processus, des amorces (ou primer) s'hybrident de part et d'autre de la séquence à amplifier. Cette configuration permet à l'ADN polymérase de répliquer les 2 monobrans dans le sens 5' vers 3' et ainsi aboutir à la synthèse de nouveaux ADN doubles brins. Ce sont les données apportées par le séquençage des génomes des leptospires qui ont permis le développement du diagnostic

par PCR. Ainsi, dans un échantillon donné, des fragments génomiques spécifiques de leptospires peuvent être mis en évidence (Andre-Fontaine, 2001). La PCR permet la détection de l'ADN dans le sang dès le 4^{ème} jour après l'apparition des premiers signes cliniques, en l'absence de traitement antibiotique (Katz, 2012). Mais, cela peut éventuellement se faire sur urines, sur liquide cébrospinal, l'humeur aqueuse, le lait ou sur la semence de taureau (Levett, 2001).

En pratique, la PCR est basée sur la détection de certains gènes présents universellement dans les bactéries en utilisant des amorces spécifiques (courtes séquences de nucléotides spécifiques de certains sérovars, visant en général les gènes codant *gyrB* (Slack et al., 2006), *rrs* (gène ARNr 16S) (Merien et al., 1992 ; Smythe et al., 2002) et *secY* (Gravekamp et al., 1993 ; Ahmed et al., 2009) ; ou des gènes limités à *Leptospira spp.* comme *lipL32*, *lfb1* (Merien et al., 2005), *ligA* et *ligB2* (Palaniappan et al., 2005) en présence de nucléotides et d'une enzyme active à haute température (l'ADN polymérase). Après des cycles alternant hautes et basses températures, on obtient un grand nombre de séquences d'ADN leptospirosique (fig. 25).

Plusieurs protocoles de PCR destinés à détecter l'ADN des leptospires ont été développés depuis les années 1990. La différence entre ces protocoles réside dans le choix des amorces utilisées. La PCR classique "conventionnelle", c'est-à-dire suivie d'une migration sur gel d'agarose n'a pas été bien évaluée, laissant sa valeur de diagnostic peu claire (Merien et al., 1992 ; Brown et al., 1995). Elle a été remplacée par la PCR quantitative en temps réel (qPCR), qui combine une amplification et une détection de produit amplifié dans une même étape avec une excellente sensibilité et une spécificité et un faible risque de contamination (Musso et La Scola, 2013).

La PCR est une méthode rapide, permettant un diagnostic précoce et définitif au cours de la phase aiguë de la maladie avant que les anticorps ne soient détectables, période durant laquelle le traitement doit être administré pour une bonne efficacité (Brown et al., 2003 ; Musso et La Scola, 2013). De plus, c'est un outil diagnostique relativement sensible et spécifique. La limite de détection des leptospires par PCR est d'environ 10³ bactéries/ml (Van et al., 1989 ; Djelouadji et al., 2012). La comparaison entre des PCR, des cultures réalisées sur semence et des sérologies a permis de mettre en évidence la plus grande sensibilité de la PCR par rapport aux cultures et aux sérologies (Heinemann et al., 1999). Ainsi, des études menées sur le sérovar Hardjo ont montré une sensibilité plus élevée de la PCR par rapport aux méthodes d'immunofluorescence ou la culture (Masri et al., 1997).

Il faut également noter qu'une PCR positive chez un animal ayant déjà commencé un traitement antibiotique, peut signifier la présence de leptospires dans l'organisme, mais sous une forme morte, les leptospires étant tués mais pas encore totalement éliminés (Sykes et al., 2011). En outre, une PCR positive révèle la présence de leptospires pathogènes dans l'échantillon, mais en aucun cas ne permet l'identification directe du sérovar. Il faut analyser le produit d'amplification par séquençage pour identifier l'espèce et le sérovar ou le génotype (Natarajaseenivasan et al., 2011). Le gène habituellement utilisé pour l'identification basée sur le séquençage de l'espèce de *Leptospira* est le gène *ARNr 16S* (Hookey et al., 1993). D'autres gènes peuvent être utilisés, tel que *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase (Renesto et al., 2000 ; La Scola et al., 2006) ou *gyrB* codant pour la sous-unité β de l'ADN gyrase (Musso et La Scola, 2013).

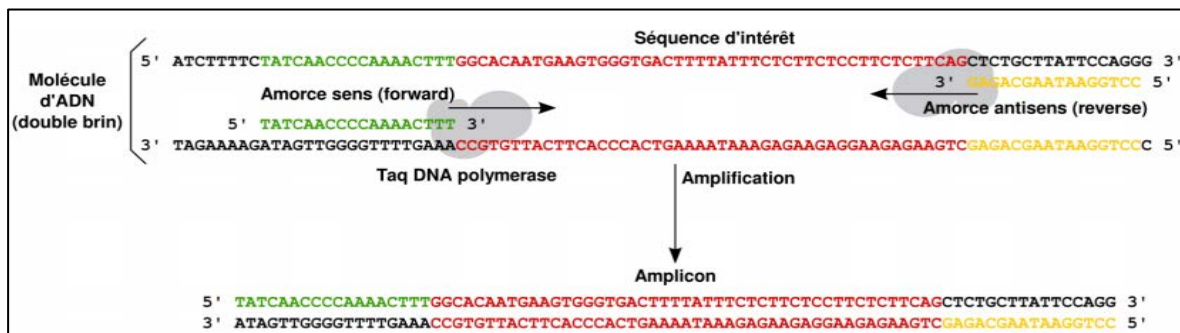


Figure 25: Réaction de polymérisation (lenaturaliste.net).

6.4.2 Diagnostic indirect

6.4.2.1 Non spécifique

➤ Modifications des paramètres de laboratoire

D'après Baldwin et Atkins, 1987, elles sont résumées en trois aspects :

1. Hématologique :

- Leucopénie en phase précoce de la maladie ;
- Leucocytose dans les stades plus avancés avec : Neutrophilie considérable, monocytose, lymphopénie et éosinopénie ;
- Anémie modérée normocytaire et normochrome pouvant être régénérative ;
- Thrombocytopénie ;
- Augmentation du fibrinogène sanguin, des produits de dégradation de la fibrine et du taux de sédimentation des érythrocytes.

2. Biochimie

- ◆ Lors d'atteinte rénale

- Élévation de l'urémie, de la créatinémie et de la phosphorémie ;
- Déséquilibres ioniques : Hyponatrémie, hypochlorémie, hypokaliémie et hypophosphatémie

♦ Lors d'atteinte hépatique

- Augmentation de l'activité sérique des PAL, ALAT, ASAT, LDH et bilirubinémie ;
- Hypoalbuminémie et une augmentation d'amylase.

3. Analyses Urinaires

- Isosthénurie, glycosurie, protéinurie et bilirubinurie ;
- Dans le culot de sédimentation urinaire : Erythrocytes, globules blancs et cylindres.

6.4.2.2 Spécifique : La sérologie

Le diagnostic de la leptospirose est assuré essentiellement par sérologie. Cette dernière ne permet pas une mise en évidence directe des leptospires, mais elle révèle la présence d'anticorps anti-leptospires. Il n'est possible qu'environ 7 jours après l'apparition des symptômes. Il faut préciser qu'un traitement antibiotique retarde l'apparition des anticorps et peut même fausser les résultats sérologiques. Deux prélèvements espacés de 8 à 10 jours sont nécessaires à l'établissement du diagnostic de certitude des formes aiguës.

Deux types d'anticorps sont détectables par la sérologie ; Les IgM apparaissent en moins d'une semaine puis les IgG. Cependant, Les IgM disparaissent rapidement alors que les IgG persistent pendant des mois, voire des années (fig. 26, ci-dessous).

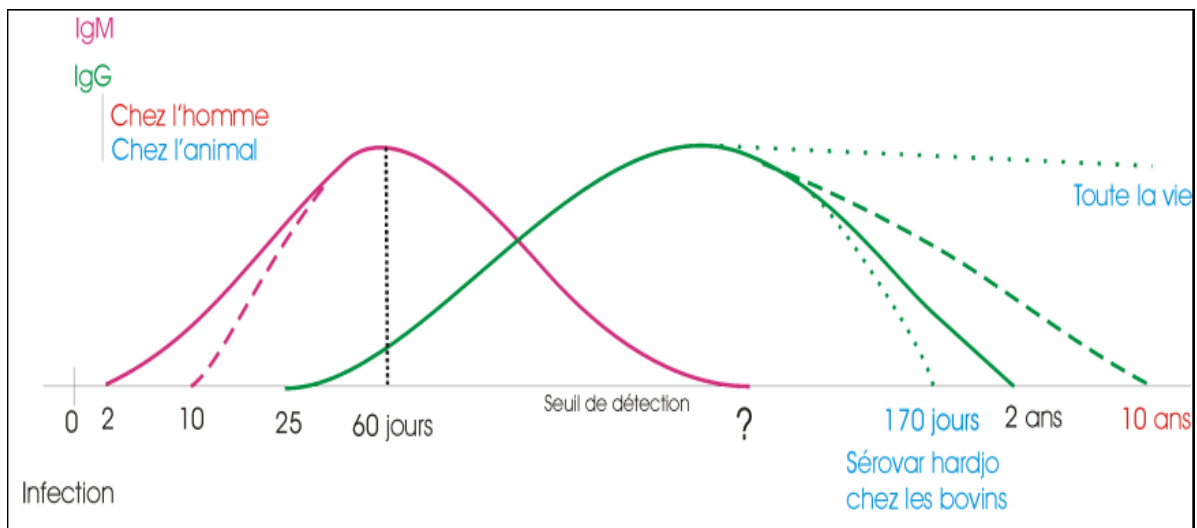


Figure 26: La courbe cinétique des anticorps anti-leptospires ; d'après Palit et Gulasekharan, 1973 ; Blackmore, 1984 ; Bercovich et al., 1990 ; Everard et Bennett, 1990.

Plusieurs techniques sont disponibles qui n'ont pas toutes la même sensibilité et spécificité.

- **Test d'agglutination microscopique (*microscopic agglutination test*, MAT)**

Le MAT (anciennement désignée sous le terme de réaction d'agglutination-lyse de Martin et Pettit mise au point en 1918) est le test standard de référence « gold standard » qui existe actuellement pour le diagnostic sérologique de la leptospirose en raison de sa grande sensibilité et spécificité (Bharti et al., 2003). Il s'agit d'une méthode qualitative et quantitative (Morgane, 2019). Ce test est utilisé pour la mise en évidence des anticorps sériques (IgM et IgG) d'un individu atteint et aussi pour l'identification des souches isolées (Merien et Berlioz, 2005). Il consiste à mettre en présence le sérum suspect à une dilution donnée avec des souches vivantes de leptospires de différents sérovars cultivées au laboratoire, après incubation, le degré d'agglutination est observé au microscope à fond noir (fig. 27) (Ahmad et al., 2005).

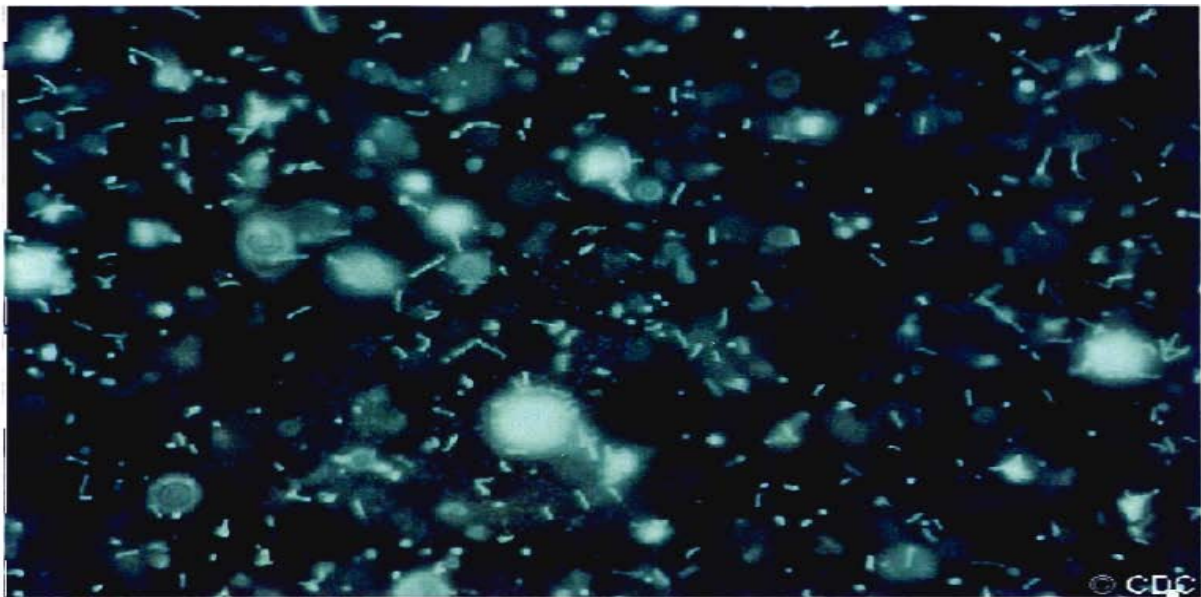


Figure 27: Image d'une réaction de microagglutination avec des antigènes vivants par microscope sur fond noir (Obertin, 2006).

La batterie d'antigènes est composée de souches représentatives des sérogroupes dominants afin de pouvoir se rapprocher au maximum du sérovar recherché (Perolat et Baranton, 2000). Un sérum est positif, à une dilution donnée, pour la souche testée, si au moins 50 des leptospires sont agglutinés par rapport à une souche témoin (Sykes et al., 2011). Cette valeur reste assez subjective car elle est estimée visuellement. Chez les bovins, ce seuil est fixé à 1/100, mais pour les autres animaux, les seuils varient en

fonction du contexte épidémiologique (Hargi et Belahsen, 2011). En effet, une multiplication par quatre du taux d'anticorps est considérée comme significative d'une infection en cours. En outre, le MAT est souvent positif vers le 8^{ème} -10^{ème} jour avec un titre généralement plus élevé pour l'antigène de *L.biflexa* souche Patoc (Hochedez, 2015). La confirmation du diagnostic par le MAT nécessite deux prélèvements à 2 semaines d'intervalle avec une séroconversion ou une augmentation des titres d'anticorps (Hochedez, 2015). L'antibiothérapie précoce peut retarder l'apparition des anticorps, diminuer leurs titres voire rendre la réaction négative (Obertin, 2006).

Il existe une autre méthode qui consiste à réaliser des dilutions successives du sérum en micro plaques, type ELISA, ensuite lire directement l'agglutination dans les cupules où a lieu l'agglutination. Des études ont tenté de comparer le MAT traditionnel et celui en lecture directe. Ces études comparatives n'ont pas pu mettre en évidence une sensibilité ou une spécificité absolue pour chaque méthode (Andre-Fontaine et al., 1988).

Il est possible de rencontrer des réactions croisées entre sérovars. En effet, les anticorps agglutinants produits par un animal en réponse à l'infection par un sérovar réagissent souvent avec d'autres sérovars proches. Par conséquent, le sérum d'un animal infecté par un sérovar unique peut entraîner l'agglutination de plusieurs sérovars (Bolin, 1996). Les réactions croisées vont diminuer avec le temps écoulé depuis l'infection, ainsi seul un sérum tardif va permettre d'identifier certainement une souche (Kossey-Vrain, 2004). Aussi, lors de coagglutination, on considère généralement que le sérovar infectant est celui pour lequel on observe le titre en anticorps le plus élevé dans le sérum du patient. Les titres les plus faibles sont alors attribués aux réactions croisées.

Le diagnostic de troupeau est recommandé lors des troubles chroniques. En effet, dans les cas d'avortements le diagnostic individuel est très difficile (Andre-Fontaine et al., 1988). Cependant, d'après Ellis (1994), pour confirmer une suspicion lors d'avortements, il faudra tester au moins 10 animaux et au mieux 10 du même cheptel (Ellis, 1994).

La technique de microagglutination présente plusieurs avantages, c'est une méthode qualitative (elle permet de connaître contre quel séro groupe les anticorps sont dirigés) et quantitative (le titre sérologique informe sur l'existence d'un contact avec les antigènes des leptospires et s'il s'agit d'une infection récente, en cours, ou résultante d'une vaccination). Il est important de connaître l'historique vaccinal de l'animal, car il pourra présenter des

anticorps dirigés contre les sérovars vaccinaux, sans pour autant avoir été infecté. Souvent les titres issus de la vaccination ont une valeur inférieure à ceux d'une infection naturelle.

Même si le MAT est une méthode sensible, spécifique et quantitative, elle présente tout de même des inconvénients. En effet, elle est d'une réalisation très lourde et son interprétation est délicate, réservée aux laboratoires spécialisés (Denis et al., 2016). Ainsi, la culture hebdomadaire répétée de souches, représente un danger pour le personnel de laboratoire. De plus, il y'a un risque permanent de contamination croisée des cultures d'antigènes, nécessitant la vérification périodique de chaque sérovar (Levett, 2001). Enfin, la technique ne permet pas la distinction entre les anticorps agglutinants de type IgM ou IgG.

En dépit de ces inconvénients, le MAT reste la méthode la plus appropriée dans le cadre d'études épidémiologiques de séroprévalences, puisqu'elle peut être appliquée à n'importe quelle espèce animale. De plus, le panel d'antigènes peut être modifié à volonté (Levett, 2001).

- **Le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)**

L'ELISA est une méthode immunoenzymatique qui se sert d'un marqueur du même nom pour mettre en évidence la liaison anticorps- antigène (Legrand, 2007). Cette technique utilise un antigène non purifié extrait de la souche *L.biflexa* sérovar Patoc par traitement auformaldéhyde et chauffage (Agésilas et al., 2005). Cet antigène présente l'avantage de pouvoir être stocké pendant une longue période à l'état liquide et enduit de polystyrène (Terpstra et al., 1983). Le test ELISA consiste à fixer un anticorps présent dans le sérum testé sur un antigène d'intérêt immobilisé puis à révéler la liaison anticorps-antigène grâce à un second anticorps anti-anticorps sur lequel est fixée une enzyme. Cette enzyme catalyse une réaction colorimétrique mesurable (figure ci-dessous).

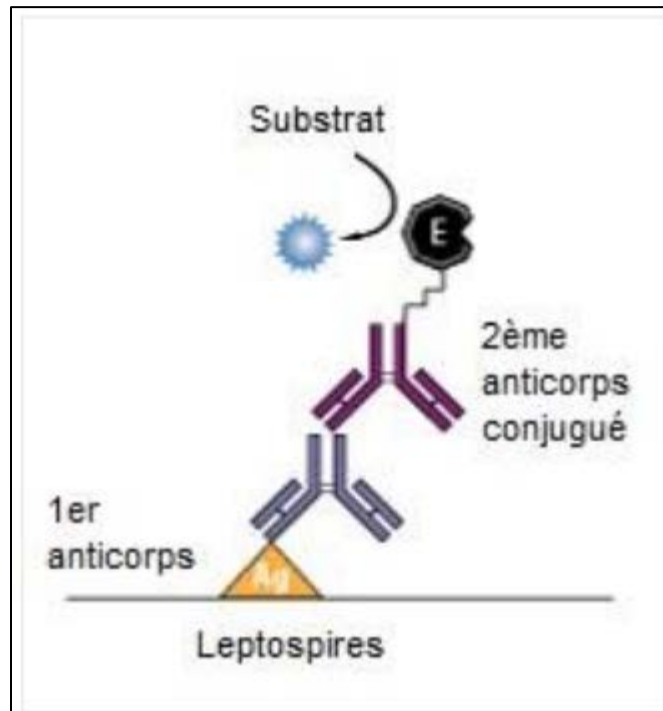


Figure 28: Test ELISA indirect (www.thermofisher.com).

La détection des anticorps (IgM, IgG) se fait avec une anti- immunoglobuline IgM humaine couplée à la peroxydase. Le titre seuil est fixé à 400 (Agésilas et al., 2005). Les IgM anti- leptospires sont détectables une semaine après l'infection avant que les anticorps agglutinants ne soient déjà présents. De plus, les IgG peuvent être décelés six mois après une vaccination et douze mois après une exposition naturelle (Kosossey-Vrain, 2004). De cette façon, il est possible de savoir si l'animal est en phase aiguë de la maladie avec un taux élevé d'IgM ou en phase chronique avec un taux élevé d'IgG (Rodriguez-Forero, 2013).

Cette méthode n'utilise pas des bactéries vivantes, elle a une facilité d'exécution, un faible coût et une sensibilité élevée comparativement au test de microagglutination microscopique (MAT) (Gotti, 2015), mais ne donne pas des bons résultats lorsque l'infection est due à certains sérovars comme Grippotyphosa ou Australis. L'utilisation de plusieurs sérovars comme antigène améliore les résultats mais alourdit la mise en œuvre de la réaction. Sous sa forme actuelle, l'ELISA est considéré comme un test de dépistage (Hargi et Belahsen, 2011). Bien que les tests ELISA détectent les anticorps spécifiques des leptospires, les résultats doivent être confirmés par le MAT (Schuller et al., 2015).

Il existe des kits commercialisés, mais l'ELISA peut aussi être développé au laboratoire par de nombreuses préparations d'antigènes et par des lipoprotéines recombinantes leptospirales, telles que LipL32 ou LigA (Marquez et al., 2017).

En pratique vétérinaire, la technique par fixation du complément peut être également utilisée, mais cela est moins standardisé (Levett, 2001).

- **Autres méthodes**

- **Fixation du complément :**

La réaction de fixation du complément est une méthode qui a surtout été utilisée en médecine humaine (Nicolescu, 1981). Elle est beaucoup moins sensible que le test de microagglutination. En général, l'antigène utilisé provient de la *L. biflexa* Patoc merthiolaté. Cette méthode n'est utilisable que pendant une brève période chez les bovins, car les anticorps intervenant dans la réaction disparaissent après dix jours (Nicolescu, 1981).

- **Test TR de macro- agglutination sur lame**

C'est l'un des premiers tests proposés pour le dépistage sérologique de la leptospirose en utilisant un antigène TR (Thermorésistant) issu de la souche saprophyte *L. biflexa* (Merien et Berlioz, 2005). L'antigène TR se prépare par lavage et concentration d'une culture de *L. biflexa* formolée et chauffée à 100°C. Après avoir ajouté du sérum de lapin et de merthiolate. Il se conserve à 4°C pendant un an. Le test se réalise sur une lame de verre où est mélangé le sérum à tester et l'antigène TR (Picardeau et al., 2008). La lecture se fait par une visionneuse sur fond noir éclairée indirectement (Legkoby et al., 2011). Un TR positif est caractérisé par l'apparition de fins amas cellulaires à la périphérie de la suspension (Picardeau et al., 2008). Les sérovars Grippotyphosa, Australis, Ballum et Panama sont peu détectés par cette méthode (Fasquel, 2014). Ce test est simple, rapide, réalisable à partir de la deuxième semaine de la maladie (Juif, 2011) mais qui nécessite une confirmation par le MAT ou la PCR car il présente une sensibilité et une spécificité faible (Morgane, 2019).

- **Tests unitaires sur bandelette**

Ce test est basé sur le même principe que l'ELISA. C'est une méthode d'immunoabsorption sur membrane (Juif, 2011) permettant de détecter les anticorps anti- leptospires (IgM) en quelques heures à partir d'un prélèvement sanguin (Bourhy et al., 2017). Un antigène de *Leptospira biflexa* est fixé sur une bandelette et sera mis en contact avec le sérum du

patient (Juif, 2011). Lorsque l'antigène est présent à plusieurs concentrations sur la bandelette, une réponse semi- quantitative est possible. Ce test donne des résultats satisfaisants pour un dépistage, mais avec une spécificité et une sensibilité moyenne et un coût élevé (Merien et Berlioz, 2005).

➤ **Le LAT ou latex agglutination test :**

Une méthode simple, économique et a une rapidité d'action spectaculaire en donnant les résultats dans un délai de deux à dix minutes, mais elle est moins sensible que le test d'ELISA. En effet, dans une étude sur une population de 65 animaux testés de manière indifférenciée (bovins et chiens), 63.1% sont testés positivement avec le LAT et 69.2% avec la méthode ELISA (Legrand, 2007).

En conclusion, nous pouvons retenir que sur les différentes techniques de diagnostic ,il n'y a pas une seule technique qui peut être recommandée pour toutes les situations cliniques mais plusieurs. En effet, la technique de microscopie sur fond noir est déconseillée car son manque de sensibilité et de spécificité la rend peu fiable. La culture bactérienne est également déconseillée dans un but de diagnostic car elle est longue et difficile à réaliser. Les techniques immunohistochimiques et d'immunofluorescence directe peuvent être intéressantes mais manquent de sensibilité et sont peu disponibles en routine. Les progrès de la biologie moléculaire présentent un intérêt évident. Le développement de la PCR permet un diagnostic précoce avec une forte sensibilité. Cette méthode est de plus en plus utilisée. La sérologie est la méthode de confirmation. Cependant, le test de référence reste à ce jour le MAT, sa complexité de réalisation a poussé à développer d'autres épreuves sérologiques, c'est le cas du test ELISA.

Tableau 8: Principaux avantages et inconvénients des tests diagnostiques de la leptospirose (Greene, 2012).

Technique		Prélèvement	Caractéristiques	
TESTS INDIRECTS	MAT simple ou idéalement cinétique	Sérum	- Variabilité selon les laboratoires - Interprétation délicate pour une sérologie MAT simple - Faux négatifs les premiers jours d'évolution ou si immunosuppression	- Interférence de la vaccination ou si forte pression infectieuse - Disponible en routine - Méthode de référence
	ELISA	Sérum	- Manque de recul - Pas d'information sur le sérovar/serogroupe	- Standardisable, rapide - Dispense d'une cinétique MAT
	Tests rapides	Sérum, plasma, sang total	- Nouveau, Résultat qualitatif - Pas d'information sur le sérovar/serogroupe	- Rapide, au chevet du patient - Distinction IgM et IgG selon le test
TESTS DIRECTS	Microscopie à fond noir	Urine	- Faible sensibilité et spécificité - Demande un observateur expérimenté	
	Culture	Sang, Urine	- Faible sensibilité - Dépend de la viabilité des bactéries - Faux négatifs si antibiothérapie - Diagnostic tardif : incubation longue et difficile	- Non disponible en routine - Diagnostic de certitude - Identification du sérovar
	Immunohistochimie	Biopsie	- Peu disponible - Peu sensible	- Ne dépend pas de la viabilité des bactéries
	PCR	Sang Urine Biopsie rénale	- Sensibilité et spécificité selon les laboratoires - Faux négatifs sur urine suite à plusieurs jours d'antibiothérapie	- Faux négatifs sur sang si après la phase de leptospirémie - Indépendant du statut vaccinal

7 Traitement

Le traitement de la leptospirose revêt deux aspects : d'une part le traitement étiologique qui consiste en une antibiothérapie ciblée et d'autre part un traitement de soutien à visée symptomatique, dicté par les manifestations cliniques présentes et éventuelles compte tenu de la pathogénie de la maladie (Legrand, 2007 ; Novelli, 2017).

7.1 Antibiothérapies

Quatre objectifs principaux de l'antibiothérapie : réduire la réplication des leptospires, limiter la leptospirémie, raccourcir la phase d'excrétion urinaire et lutter contre la mise en place de lésions hépatiques ou de lésions rénales.

L'antibiothérapie devrait être commencée précocement lors de la maladie aiguë et est pris d'une façon régulière en respectant sa durée de traitement car la précocité du traitement conditionne le pronostic. Cependant, certains auteurs recommandent même l'utilisation d'antibiotiques adaptés avant le résultat du diagnostic (Schuller et al., 2015). Idéalement, celui-ci doit être entrepris dans les 7 à 10 jours succédant l'infection (Legrand, 2007). Ainsi, le consensus européen sur la leptospirose de 2015 recommandait de commencer le plus tôt possible une antibiothérapie (Novelli, 2017).

Les leptospires présentent une sensibilité élevée *in vitro* pour la majorité des antibiotiques. Néanmoins, certains antibiotiques comme : l'ampicilline, l'amoxicilline, la pénicilline G, la streptomycine et l'érythromycine présentent les CMI (concentrations minimales inhibitrices) les plus basses (Prescott, 1991).

Le tableau ci-dessous reprend la CMI des antibiotiques habituellement utilisés lors du traitement de la leptospirose.

Tableau 9: Concentration minimum d'inhibition ($\mu\text{g/ml}$) de différents antibiotiques contre *Leptospira interrogans* sérovars Hardjo et Icterohaemorrhagiae (Prescott, 1991).

Molécules	Sérovar Hardjo	Sérovar Icterohaemorrhagiae
Pénicilline G (unités/ml)	< à 0.8	
Ampicilline	< à 0.8	
Amoxicilline		< à 0.005
Tétracycline	1.6-3.1	0.25
Streptomycine	< à 0.8	
Erythromycine		0.005
Lincomycine		0.25
Sulfamethazine	200	

Ainsi, les leptospires sont sensibles à une large gamme d'antibiotiques. Cependant, cette sensibilité *in vitro* n'est pas corrélée à leur sensibilité *in vivo*. Ceci serait vraisemblablement dû aux propriétés pharmacodynamiques de certains antibiotiques tels que les macrolides par exemple qui ne peuvent pas se concentrer dans les reins, lieu de persistance des leptospires (Alt et Bolin, 1996).

En effet, chez les bovins, l'utilisation d'oxytétracycline (20 mg/kg), une injection unique en intra musculaire (IM)), de tilmicosine (10 mg/kg en sous cutané) ou d'une association pénicilline et dihydrostreptomycine (25 mg/kg IM) peut être efficace ; ce dernier reste cependant l'antibiotique considéré comme le plus efficace, car il permet d'éliminer à long terme le portage rénal des animaux infectés (Watt et al., 1988). Il est possible d'employer le ceftiofur (20mg/kg pendant 3j, ou 5 mg/kg pendant 5j, IM) (Alt et al., 2001). Cette efficacité permet d'envisager une utilisation préventive d'antibiotiques à tout le troupeau et le milieu désinfecté afin de réduire la contamination entre individus (Grooms, 2006).

7.2 Symptomatiques

L'antibiothérapie est souvent accompagnée de fluidothérapie pour rétablir l'équilibre hydro-électrolytique et de traitement symptomatique selon la forme clinique développée. En effet, cette thérapeutique symptomatique comprend des antihémorragiques, des hépatoprotecteurs et éventuellement des corticoïdes.

Une étude menée en Turquie a montré que l'utilisation d'une transfusion sanguine comme traitement adjuvant à l'antibiothérapie et à l'administration de vitamine B améliore le traitement des cas sévères de leptospirose du bétail. Ainsi, l'étude a été menée sur 42 animaux présentant des signes cliniques de la leptospirose avec une confirmation du diagnostic laboratoire (une culture positive). Ensuite, ils ont classé ces animaux en deux groupes ; Le groupe I (n=21) a reçu un traitement associant de la dihydrostreptomycine-pénicilline et de la vitamine B, les animaux du groupe II (n=21) ont reçu le même traitement, plus une transfusion sanguine entière sur des donneurs en bonne santé. Au total, 12 animaux du groupe I (57.1) et 19 du groupe II (90.5) ont survécu (Ozkanlar et al., 2010).

Les autres traitements à mettre en place dépendent des symptômes présentés par l'animal. Dans tous les cas, une fluidothérapie doit être instaurée (Langston et Heuter, 2003). Elle doit tenir compte de l'état d'hydratation de l'animal et doit être adaptée à sa diurèse. Elle

permet également de traiter les déséquilibres électrolytiques et acido-basiques engendrés par l'insuffisance rénale.

8 Moyens de lutte

8.1 Sanitaires

La prophylaxie sanitaire peut diminuer ou limiter le risque d'infection par les leptospires en agissant sur trois volets : l'isolement des malades, la lutte contre les réservoirs et enfin l'assainissement et l'hygiène de l'environnement (Barwick et al., 1997).

Les bovins malades doivent obligatoirement être isolés du cheptel car ils peuvent excréter des leptospires dans leurs urines pendant une longue durée (16 semaines) (Robinson et Sprayberry, 2009). Une stratégie basée sur l'abattage systématique de bovins infectés a été envisagée sur les animaux porteurs excréteurs. Il s'avère cependant que ces animaux sont pour la plupart sérologiquement muets (Vijayachari et al., 2008). Les personnes en contact avec ces bovins malades devront prendre des précautions pour ne pas transmettre la leptospirose aux animaux sains notamment par voie indirecte via le matériel qui doit être systématiquement désinfecté et de veiller à ce que le personnel se protège lui-même (Barwick et al., 1988).

Les mesures sanitaires à suivre en cas d'avortement sont les suivants : nettoyer et désinfecter le lieu d'avortement de l'animal, éviter le contact direct ou indirect de l'animal de l'élevage avec un instrument, un vêtement ou une litière provenant de cet endroit. Ensuite, isoler la femelle ayant avorté de tous les autres animaux de l'élevage. Enfin, effectuer un dépistage sérologique par le MAT de tous les animaux de l'élevage, ou bien tester à minima toutes les femelles gestantes. Tous les animaux ayant un test positif doivent être isolés. Les animaux négatifs doivent être testés après deux ou trois semaines et s'ils deviennent positifs, ils doivent être isolés. Enfin, une femelle gestante infectée, traitée ou non, peut donner naissance à un veau infecté ou non. Si un traitement approprié est institué, ce dernier peut parfois survivre (Legrand, 2007). Il doit alors rester isolé des autres animaux car son urine est fortement infectée (Valon et Chaffaux, 2009).

La lutte contre les réservoirs par leur élimination est difficile. En effet, de nombreux animaux sont des réservoirs potentiels. Cependant, une lutte est tout de même possible : elle consiste à limiter le nombre de rongeurs dans les élevages et de leur contact avec les sources d'eau. Cette lutte peut se traduire par la mise en place de pièges à rongeurs, de

raticides ou encore par des campagnes de dératisation et de désinfection de l'environnement (Legrand, 2007).

L'assainissement de l'environnement est primordial dans les zones où la leptospirose sévit d'une façon endémique. Il consiste à la mise en place d'un écoulement efficace des eaux usées au sein des stabulations contenant des animaux infectés, assainir les pâtures où se trouvent des animaux excréant les leptospires par un drainage puis l'épandage de substances stérilisantes telles que le nitrate de chaux, la cyanamide calcique, assécher les mares et les zones marécageuses afin d'éviter toute stagnation d'eau.

Dans les cas des échanges internationaux et selon le code international sanitaire, un dépistage sérologique est pratiqué par deux tests de microagglutination réalisés à trois semaines d'intervalle avec un titre seuil de positivité supérieur ou égal à 100 (Legrand, 2007). Ce dépistage sérologique est accompagné de deux injections de dihydrostreptomycine à quinze jours d'intervalle (Andre-Fontaine et al., 1985b).

8.2 Médicales (vaccins)

La vaccination des bovins est possible et très ancienne. En effet, elle est très utilisée aux USA, Amérique Latine, Royaume Uni, Italie etc... Pour être efficace, les leptospires tués (sérovary Hardjo) doivent stimuler une réponse immunitaire de type Th1, caractérisée par une synthèse de l'interféron γ , propre aux bovins. La plupart des vaccins dirigés contre la leptospirose chez l'espèce bovine ne contenaient que les deux sérovarys les plus répandus qui sont Hardjo et Pomona. Ces vaccins sont préparés à partir de souches de leptospires cultivées sur un milieu sans albumine. Ces souches sont ensuite inactivées par le phénol ou le formol. Les doses vaccinales seront concentrées à 200 millions de germes par millilitre (Tainturier et al., 1997). Enfin, ces doses vaccinales sont adjuvées à l'aide d'hydroxyde d'aluminium.

La réponse immunitaire contre les souches vaccinales est de courte durée et nécessite des rappels périodiques. Cependant, ce sont des vaccins inactivés dont le protocole vaccinal d'un troupeau sain est à peu près semblable à celui du chien. Il comprend généralement une primo vaccination composée de deux injections sous-cutanées réalisées chez le jeune à un mois d'intervalle puis d'un rappel vaccinal réalisé tous les ans ou tous les 6 mois (Allen et al., 1982). Dans le cas d'un troupeau en milieu infecté, la vaccination va concerner tous les animaux et la primo vaccination concernera les adultes également. Cependant, d'après Bolin en 2005, dans certaines zones aux États-Unis, la vaccination de rappel se fait même

trois fois dans l'année contre les infections par sérovar Hardjo (Bolin, 2005). La vaccination des bovins contre la leptospirose entraîne une baisse dans les troubles de reproduction, une diminution dans le nombre des animaux porteurs et le nombre des animaux sensibles à la maladie. Le portage rénal est ainsi réduit et le risque est diminué pour les individus manipulant les bêtes ou leur viande. Cependant, la durée de protection vaccinale est très limitée et ne permet pas d'enrayer complètement la maladie (Gaumont, 1983 ; Alagninouwa et Becker, 2012).

8.3 Maîtrise des risques et lutte contre les contaminations humaines

Un autre aspect important de la maladie est son caractère zoonotique. Les humains sont facilement exposés à cette bactérie assez dangereuse étant donné qu'ils sont en contact étroit avec les animaux domestiques, dont le bovin (Brown et Prescott, 2008). Les bovins sont considérés comme un réservoir d'infection important et une source potentielle de contamination pour l'homme (Levett, 2001).

La lutte contre la contamination humaine passe d'une part par les préventions sanitaires, à savoir, des mesures d'hygiène, de protections individuelles, information et la formation des personnes exposées ou à risque, mais s'inscrit également dans un dessin global qui intéresse la collectivité toute entière comme l'illustre la figure ci-dessous (fig. 29). D'autre part, la vaccination des personnes à risque et très exposés (le médecin du travail, vétérinaires, éleveurs, personnel d'abattoirs, égoutiers et éboueurs) (Laurichesse et al., 2007).

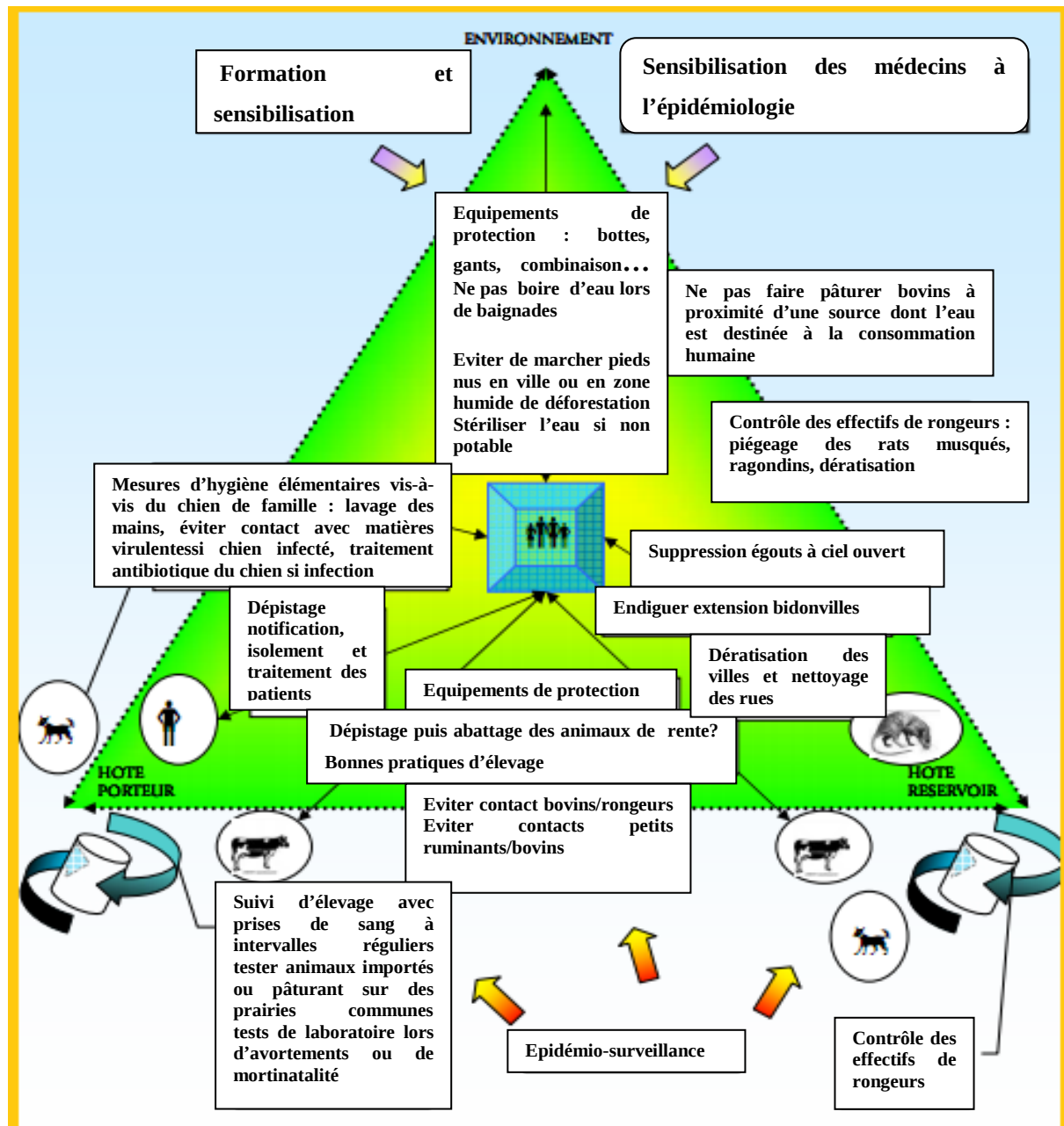


Figure 29: Prophylaxie sanitaire en vue de réduire l'exposition à la leptospirose animale et humaine (Kingscote, 1985 ; Lilenbaum et Souza, 2003 ; Bharti et al., 2003 ; Lilenbaum et al., 2008 ; Vijayachari et al., 2008 ; Adler et Moctezuma, 2010).

PARTIE

EXPERIMENTALE

Matériel et Méthodes

Les objectifs principaux tracés pour ce travail sont de :

- 1) Déterminer la prévalence réelle des huit sérovars de *Leptospira* par la technique de référence MAT et la séroprévalence de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo par la technique ELISA à partir de sérums récoltés chez les bovins dans la région de Sétif, Algérie.
- 2) Déterminer les facteurs de risque potentiels associés à la séropositivité de *Leptospira* et *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo chez les vaches testées par MAT et ELISA.
- 3) Comparer la méthode de référence (MAT) et la méthode ELISA pour la mise en évidence des anticorps spécifiques de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo.
- 4) Réaliser une étude épidémiologique de type cas-témoin afin de trouver un lien statistique entre la présence *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo par les différents tests utilisés (MAT et ELISA) chez les bovins et les avortements.

1 La région d'étude

La présente étude a été effectuée dans les hautes plaines de Sétif, dans le Nord-Est de l'Algérie. La région couvre environ 6550 km², se situe entre les longitudes 4 ° 73' – 6 ° 02 ' et les latitudes nord de 35 ° 61' – 36 ° 59 '. Le climat méditerranéen est semi-aride, caractérisé par des hivers froids et pluvieux et des étés chauds et secs. La pluviométrie annuelle moyenne était de 350 mm de 1984 à 2014. La zone d'étude contient environ 161 952 bovins, dont 79 354 vaches laitières, répartis sur 4465 fermes de vaches laitières (Direction des services agricoles de Sétif 2015) (Fig. 30)

2 Description du mode d'élevage bovin dans la région de Sétif

Trois différentes catégories de populations bovines ont fait l'objet de cette étude, dans la région de Sétif (Direction des services agricoles de Sétif 2015) :

- les bovins laitiers modernes (BLM). Il s'agit d'un cheptel bovin de 50000 à 55000 vaches importées, à haut potentiel génétique afin d'améliorer la production nationale en lait et en viande, soit autour de 30% à 35% de l'effectif de la wilaya.
- les bovins laitiers améliorés (BLA). Il s'agit d'un cheptel issu de multiples croisements entre les populations locales et les races importées. Ils concernent des fermes de taille relativement réduite (1 à 6 vaches). Ce cheptel est estimé à 75 000 têtes, soit d'environ 47% de l'ensemble du troupeau.

- les bovins laitiers locaux (BLL) : la majorité des bovins est localisée dans les régions montagneuses. Le cheptel local est d'environ 30000 vaches qui représente 20% du cheptel de la région de Sétif.

3 Plan d'échantillonnage et prélèvements

Cette étude vise les petites et moyennes exploitations bovines situées dans la région de Sétif. Nous avons calculé la taille d'échantillon en utilisant la formule recommandée par Thrusfield

$$(2007) : n = (1,96)^2 \frac{P_{exp}(1-P_{exp})}{d^2}$$

Avec: n = La taille d'échantillon requise; Pexp = Prévalence attendue; d = précision absolue souhaitée.

En utilisant une prévalence individuelle attendue de 50% (aucune étude précédente dans cette région), une précision absolue de 5% et un niveau de confiance de 95 ; nous avons obtenu une taille d'échantillon minimum de 384 vaches. Cependant, et afin d'augmenter la précision des résultats nous avons effectué un échantillon aléatoire de 406 prélèvements sanguins de vaches âgées entre 3 à 13 ans provenant de 13 communes de la wilaya de Sétif. Au total, 48 exploitations bovines ont été concernées par notre étude (fig. 30 et tableau 10).

Dans chaque ferme, au moins 10 % des vaches ont été sélectionnées au hasard (Cannon et Roe, 1982) (ayant avorté ou non, malades ou non, gestantes ou non, de différents âge et race).

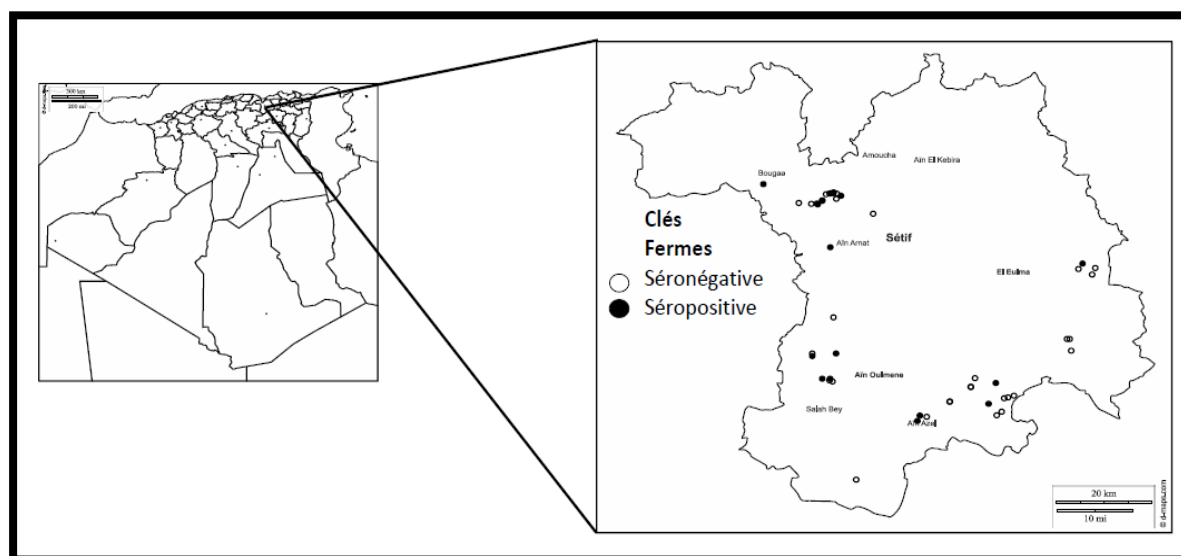


Figure 30: Carte géographique de la wilaya de Sétif, Algérie, montrant les cordonnés des lieux de prélèvements et la distribution spatiale des fermes bovines séropositives et séronégatives pour *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo en utilisant le logiciel Arc Gis.

Tableau 10: Tableau récapitulatif des données sur les fermes étudiées.

Numéro de la ferme	Les communes concernées	Les coordonnées des fermes		Nombre de têtes total	Nombre de vaches prélevées
		x	y		
1	Ain Azel	5°29'44.02"E	35°48'52.32"N	15	10
2	Beida bordj	5°39'17.12"E	35°53'52.57"N	50	13
3	Beida bordj	5°38'24.45"E	35°51'8.24"N	25	5
4	Ain Oulmane	5°19'5.77"E	35°54'26.97"N	30	10
5	Ain Oulmane	5°18'8.78"E	35°54'26.97"N	8	20
6	Ksar Abtal	5°16'55.89"E	35°57'26.80"N	13	30
7	Galal	5°19'49.35"E	35°57'46.62"N	15	6
8	Ain Roua	5°10'58.08"E	36°20'8.58"N	15	5
9	Ain Arnete	5°19'7.48"E	36°11'48.81"N	10	9
10	Ain Abessa	5°18'7.29"E	36°17'56.11"N	15	7
11	Ain Abessa	5°17'35.36"E	36°17'28.83"N	20	10
12	Ain Abessa	5°19'11.30"E	36°18'56.26"N	15	9
13	Ain Abessa	5°20'25.64"E	36°18'36.82"N	10	4
14	Bir elarche	5°49'51.08"E	36° 9'39.26"N	20	10
15	Ain Azel	5°30'2.11"E	35°49'34.46"N	25	9
16	Beida bordj	5°41'29.98"E	35°52'12.40"N	40	9
17	Beida bordj	5°40'46.72"E	35°51'58.69"N	30	6
18	Beida bordj	5°40'18.38"E	35°51'52.09"N	35	9
19	Beida bordj	5°39'23.73"E	35°49'36.99"N	23	10
20	Ain Azel	5°33'41.68"E	35°51'26.15"N	20	9
21	Ain Lahdjar	5°36'14.47"E	35°53'22.88"N	10	8
22	Ain Lahdjar	5°36'14.95"E	35°53'20.96"N	5	4
23	Hamam Soukhna	5°48'28.19"E	35°58'8.92"N	30	10
24	Hamam Soukhna	5°47'57.71"E	35°59'41.53"N	20	4
25	Hamam Soukhna	5°48'17.49"E	35°59'41.67"N	20	6
26	Elhama	5°22'16.59"E	35°41'6.58"N	53	21
27	Beida bordj	5°40'0.18"E	35°50'5.37"N	20	10
28	Ain Lahdjar	5°36'45.06"E	35°54'30.91"N	30	8
29	Ain Oulmane	5°19'23.45"E	35°54'4.72"N	10	6
30	Ain Oulmane	5°19'1.82"E	35°54'13.75"N	25	12
31	Ksar Elabtal	5°16'55.71"E	35°57'46.62"N	15	6
32	Galal	5°19'30.69"E	36° 2'33.24"N	10	5
33	Ain Abessa	5°19'51.38"E	36°18'12.72"N	20	10
34	Ain Abessa	5°19'2.58"E	36°18'54.91"N	20	10
35	Ain Abessa	5°19'55.65"E	36°18'53.20"N	10	7
36	Ain Abessa	5°19'31.91"E	36°19'3.04"N	15	7
37	Ain Abessa	5°15'17.27"E	36°17'39.60"N	20	8
38	Ain Abessa	5°16'48.87"E	36°17'32.69"N	5	5

39	Ain Abessa	5°17'29.85"E	36°17'35.61"N	10	9
40	Ain Abessa	5°18'9.45"E	36°18'0.48"N	10	3
41	Ain Abessa	5°18'36.74"E	36°18'49.02"N	15	10
42	Ain Abessa	5°19'28.39"E	36°18'58.32"N	10	5
43	Ouricia	5°24'20.79"E	36°16'14.22"N	15	10
44	Bir elarche	5°49'21.05"E	36° 8'56.42"N	24	9
45	Bir elarche	5°51'1.18"E	36° 8'12.37"N	20	11
46	Bir elarche	5°51'24.35"E	36° 9'4.59"N	18	10
47	Ain Azel	5°33'39.61"E	35°51'24.11"N	20	13
48	Ain Azel	5°30'52.21"E	35°49'24.56"N	15	8

4 Collecte des prélèvements et conservation

Cette étude a été réalisée sur une période s'étalant de 2015 à 2019. Des prélèvements de sang (5 à 10 ml) ont été effectués dans des tubes secs (système vacutainer sous vide) à partir de la veine caudale. Le sérum a été isolé par centrifugation pendant 5 à 10 minutes à 3000 tours/minute. Le sérum obtenu a été conservé à -20°C jusqu'à ce que les tests sérologiques soient réalisés.

5 Collecte des données

Un questionnaire épidémiologique a été utilisé et adressé à l'éleveur afin d'analyser les facteurs de risque potentiels liés à l'infection par *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo. Le questionnaire comporte des éléments en relation avec les fermes visitées (Type d'élevage, type d'exploitation et taille de troupeau) et les vaches prélevées (Race, âge, gestation, état corporel). Afin notamment de déterminer si la ferme avait connu des épisodes d'avortement et afin d'analyser les facteurs de risque d'avortement.

6 Analyses sérologiques

Les analyses sérologiques des 406 sérums collectés ont eu lieu au Centre National de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBt) pour le test d'ELISA et au niveau de l'unité des leptospires à l'Institut Pasteur d'Algérie pour le test MAT.

6.1 Test ELISA

Pour la mise en évidence des anticorps dirigés contre *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo, nous avons utilisés un test ELISA indirect de La trousse PrioCHECK™ L. hardjo Ab Strip Kit (Thermo Fischer Scientific, la Hollande) selon les recommandations du fabricant (Fig. 31).



Figure 31: La trousse PrioCHECK™ L. hardjo Ab Strip Kit utilisée dans l'étude (copyright Benseghir).

6.1.1 Principe

Le principe général du test ELISA utilisé pour la recherche des anticorps spécifiques de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo est le suivant :

La réaction comporte en général 3 étapes distinctes :

1. Chaque échantillon est déposé dans une cupule sensibilisée par LPS de *Leptospira*. Les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon se lient à l'antigène bactérien.
Il se forme des complexes LPS-anticorps par lesquels les anticorps bovins se trouvent fixés sur les parois du puits.
2. Après lavage, un anticorps conjugué peroxydase est ajouté. Il vient se fixer sur les immunoglobulines préalablement captées, aboutissant à la formation d'un complexe : (Ag LPS) – (Ac anti LPS) – (conjugué peroxydase).
3. Après lavage, l'excès de conjugué est éliminé par lavage. L'enzyme liée au complexe est révélée par addition d'un substrat qu'elle transforme en un produit coloré. Après arrêt de la réaction enzymatique, les densités optiques sont mesurées par spectrophotomètre.

La présence ou l'absence d'anticorps est déterminée à partir de valeurs seuils obtenues en fonction du témoin positif.

6.1.2 Le mode opératoire du kit ELISA du laboratoire PrioCHECK L. HARDJO Ab

Il s'agit d'un ELISA de type indirect dont le mode opératoire est le présent :

Cent microlitres des sérums témoins (contrôle positif, contrôle négatif et contrôle positif faible) et à tester dilués au 1/200 dans le tampon ELISA sont déposés dans les cupules de la plaque.

Après une incubation à 37 °C pendant 60 min, les plaques sont lavées six fois avec la solution de lavage. On dépose dans toutes les cupules 100 µl du conjugué (anti-IgG bovines conjuguées à la peroxydase de raifort) dilué au 1/30 dans le tampon ELISA. Après 60 min d'incubation à 37 °C, les plaques sont lavées six fois avec la solution de lavage. On ajoute à chaque cupule 100 µl de la solution de révélation (substrat chromogénique, 3,3', 5,5'-tétraméthylbenzidine, TMB). Après 15 min d'incubation à 22°C on ajoute à chaque cupule 100 µl de la solution d'arrêt. La lecture des densités optiques (DO) de chaque cupule est faite dans les 15 minutes suivant l'addition de la solution d'arrêt à l'aide d'un spectrophotomètre avec un filtre de 450 nm.

Calculer la DO450 moyenne du blanc (puits A1 et B1).

Calculer la DO450 corrigée de tous les échantillons en soustrayant la DO450 blanc.

Calculer le pourcentage de positivité (PP) des sérums de contrôle 2 et 3 et des échantillons selon la formule ci-dessous.

La DO450 corrigée des échantillons est exprimée en pourcentage de positivité (PP) par rapport à la DO450 moyenne corrigée du sérum de contrôle 1 (puits C1 et D1).

$$PP = \frac{\text{DO450 corrigée échantillon}}{\text{DO450 corrigée sérum de contrôle 1}} \times 100$$

Interprétation du pourcentage de positivité des échantillons de sérum

PP < 20% Négatif

Absence d'anticorps spécifiques de *L. hardjo* dans le prélèvement.

PP = 20% - 45% Douteux

(Le prélèvement peut contenir des anticorps spécifiques de *L. hardjo*)

PP > 45% Positif

Présence d'anticorps spécifiques de *L. hardjo* dans le prélèvement.

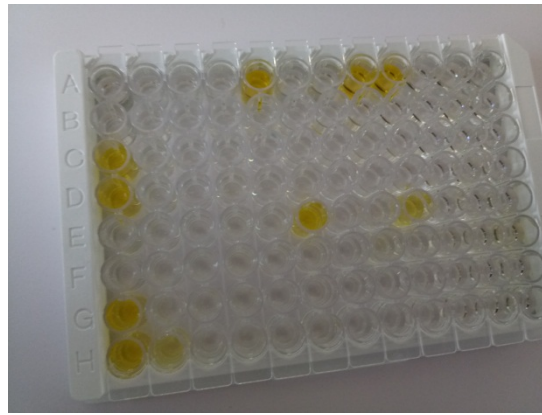


Figure 32: Plaque finale d'ELISA après l'additionnement de TNB et la solution d'arrêt (copyright Benseghir).

6.2 Test MAT

6.2.1 Le principe général du MAT :

Le Test d'agglutination microscopique (MAT) a été utilisé pour tous les échantillons de sérum, tel que décrit précédemment (Wasinski et Pejsak, 2010). Ce test nous a servi non seulement pour confirmer les résultats obtenus par les tests ELISA, mais aussi pour identifier différents sérovars de l'espèce *Leptospira spp.* tels : Patoc, Hardjo, Pomona, Grippotyphosa, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Automnalis, Australis (Tableau 11).

Le test de micro-agglutination (MAT) est la technique sérologique de référence pour la confirmation de la leptospirose. Le principe de cette technique consiste à incuber des dilutions sériées du sérum du patient avec différentes souches de leptospires. L'agglutination est visualisée au microscope à fond noir. Ce test a une spécificité de diagnostic élevée, permet de déterminer le titre des anticorps agglutinants et le sérovar de la souche infectieuse responsable de la formation des anticorps. En revanche, il s'agit d'une technique lourde, qui nécessite l'utilisation d'une vingtaine de souches de référence, maintenues en cultures fraîches. Elle est réalisée par un nombre restreint de laboratoires spécialisés (fig. 33). Dans cette évaluation, le test MAT est considéré comme le test de référence.



Figure 33: Paillasse et chambre de lecture du résultat sous le microscope à fond noir réservés pour le test MAT (copyright Benseghir).

6.2.2 Le mode opératoire du MAT (Microscopic Agglutination Test)

Ce test a été mené selon les normes de l'OIE appliqués aux tests de diagnostic pour les animaux terrestre 2008.

Le test MAT a été réalisé sur des souches vivantes appartenant aux serogroupes *L. interrogans* et *L. biflexa* entretenues et cultivées au laboratoire « unité des leptospires au niveau de l'Institut Pasteur d'Alger (Annexe Hamma) ». Le procédé en est le suivant :

Les souches de référence de *Leptospira* ont été cultivées pendant 7 à 10 jours dans un milieu liquide pur culture pour leptospires à $29 \pm 1^\circ\text{C}$. Les cultures viables avec des densités de l'ordre de 2×10^8 leptospires/ml sont utilisées comme antigènes.

La densité des leptospires a été évaluée en utilisant une chambre de comptage et observée au microscope à fond noir.

Dans cette étude, sept souches de références de *Leptospira interrogans* les plus incriminées chez le bovin ont été utilisées comme antigènes incluant Hardjo, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Canicola, Australis, et Autumnalis (Pinto et al., 2015), ainsi une souche saprophyte de *Leptospira biflexa* qu'est la Patoc I (tableau 11).

Tableau 11: Liste des antigènes vivants utilisés au cours du test MAT.

Sérogroupe	Sérovar	Souche utilisée
Semarang	Patoc	Patoc1
Sejroe	Hardjo	Hardjobovis (M84)
Pomona	Pomona	Pomona
Icterheamorrhagiae	Icterheamorrhagiae	Willinberg (Copenhageni)
Australis	Australis	Ballico
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
Canicola	Canicola	Hond Utrecht

Cette méthode sérologique de référence, est réalisée en deux parties :

MAT qualitatif. (Fig. 36)

MAT quantitatif. (Fig. 37)

- **Le MAT qualitatif:**

Cette partie consiste à rechercher une micro-agglutination entre les sérums à tester et les antigènes vivants.

_ D'abord, tous les sérums (406) ont été dilués dans l'eau physiologique tamponnée en utilisant une plaque de microtitrage et la procédure est comme suivante :

- Sur une microplaque à fond plat, distribuer 25 µl d'eau physiologique tamponnée dans la première ligne constitue un témoin négatif (T-).
- Répartir ensuite 25µl de sérum à tester préalablement décomplémenté au bain à 56°C pendant une demi-heure, et dilué au 1/25 avec l'eau physiologique tamponnée.

_ Ensuite, on ajoute dans les colonnes 25µl de chaque antigène vivant.

_ Puis, on recouvre la microplaque et l'incube à 37°C pendant une heure à l'obscurité.

_ Par la suite, on met le mélange Antigène - sérum de chaque cupule sur les lames séparément à l'aide d'une micropipette à embout jetable.

- Enfin, la lame a été examinée sous microscope à fond noir dans le but de rechercher les agglutinations au niveau de chaque cupule de la microplaque. Les résultats s'expriment par la présence d'agglutination : réaction positive (le nombre de leptospires libres est inférieur à 50%) et l'absence d'agglutination : réaction négatif (le nombre de leptospires libres est supérieur ou égal à 50%).

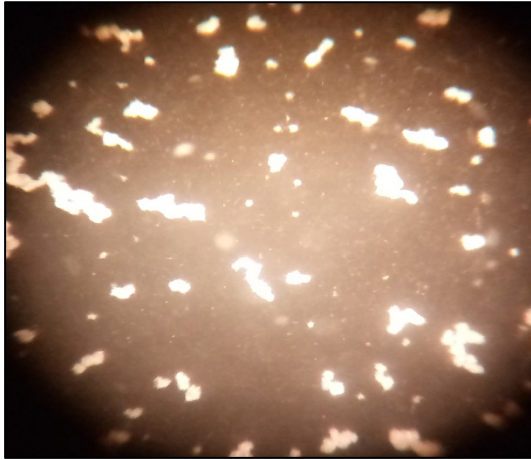


Figure 34: Exemple d'une réaction d'agglutination positive (copyright Benseghir).

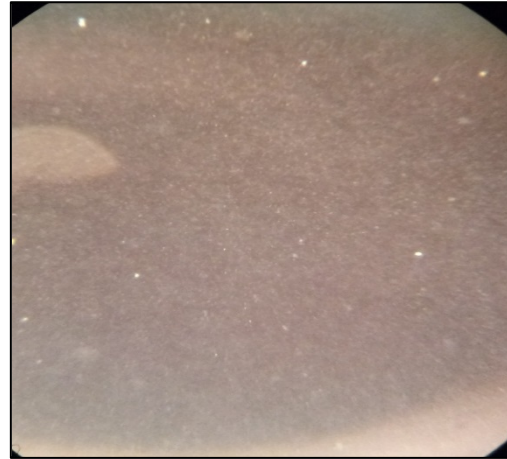


Figure 35: Témoin négatif (réaction négative) (copyright Benseghir).

Lorsque la réaction est positive, on réalise un MAT quantitatif afin de déterminer le titre du sérum vis à vis de chacun des antigènes concernés. Le schéma suivant résume le MAT quantitatif sur une microplaque

Sérogroupe à tester

	1	2	3	4	5	6	7	8
Témoin antigène	25µl AG1 	25µl AG2 	25µl AG3 	25µl AG4 	25µl AG5 	25µl AG6 	25µl AG7 	25µl AG8 
	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT	25µl EPT
Sérum 1	25µl AG1 	25µl AG2 	25µl AG3 	25µl AG4 	25µl AG5 	25µl AG6 	25µl AG7 	25µl AG8 
	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1	25µl S1
Sérum 2	25µl AG1 	25µl AG2 	25µl AG3 	25µl AG4 	25µl AG5 	25µl AG6 	25µl AG7 	25µl AG8 
	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2	25µl S2
Sérum 3	25µl AG1 	25µl AG2 	25µl AG3 	25µl AG4 	25µl AG5 	25µl AG6 	25µl AG7 	25µl AG8 
	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3	25µl S3
Sérum 4	25µl AG1 	25µl AG2 	25µl AG3 	25µl AG4 	25µl AG5 	25µl AG6 	25µl AG7 	25µl AG8 
	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4	25µl S4
Sérum x	25µl AG1 	25µl AG2 	25µl AG3 	25µl AG4 	25µl AG5 	25µl AG6 	25µl AG7 	25µl AG8 
	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx	25µl Sx

Figure 36: MAT qualitatif .

- MAT quantitatif :**

Cette partie permet la détermination du degré d'agglutination (le titre d'anticorps); pour ce faire, nous testons que les sérums positifs au MAT qualitative. Le sérum à tester déjà dilué au 1/25, subit d'autres dilutions, nous avons commencé par une dilution de 1 :50 ensuite, nous avons appliqué une dilution en série de 2 à 2 (1 dans 100, 200, 400, 800, 1600, et 3200) sur la même rangée. Enfin, on ajoute la même quantité d'antigène ayant donné une réaction positive au MAT qualitatif.

Incuber la microplaque à 30°C pendant 1heure de la même manière que le MAT qualitatif : Les titres ≥ 100 ont été considérés comme +. Le titre final a été déterminé comme étant le plus élevé. La dilution finale est définie comme la dilution du sérum qui donne 50 % d'agglutination, laissant 50 % des bactéries libres, en comparaison avec une culture témoin diluée au 1/2 dans du tampon phosphate.

Le degré de réaction est interprété par estimation du pourcentage des leptospires qui ont agglutiné. Si 100 % des leptospires ont agglutiné, la réaction est de 4+ ; 3+ est égal approximativement à 75 % d'agglutination ; 2+ est égal à 50 % ; et 1+ est égal à moins de 50 %.

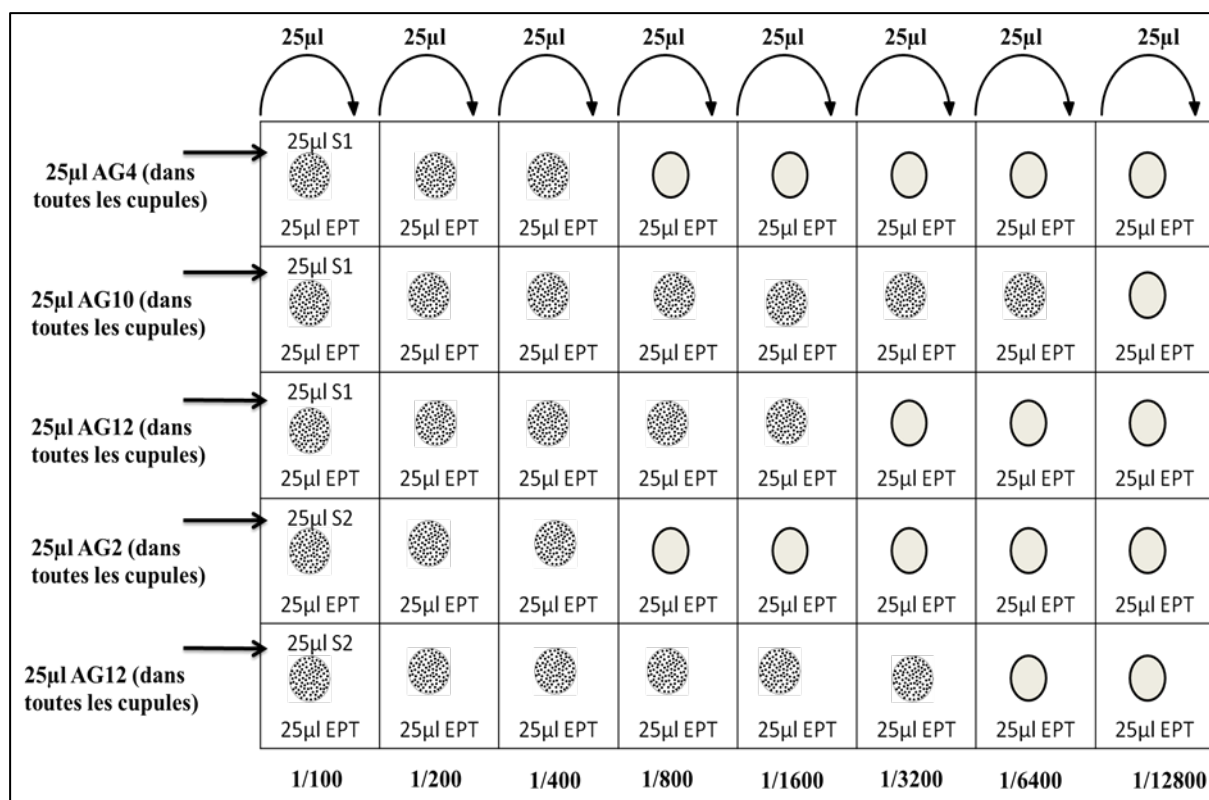


Figure 37: MAT quantitatif.

7 Analyses statistiques

L'association significative entre les facteurs de risque et la séroposivité vis-à-vis de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo a été analysée en deux temps: Analyses univariable et multivariable. Dans l'analyse univariable, les tests Chi-deux ou Fischer (Zar, 1999) ont été utilisés pour vérifier l'indépendance de chaque variable vis-à-vis de la séroposivité à Hardjo par la méthode ELISA et pour les résultats des huit sérovars testés par le MAT. Les variables avec un $P \leq 0,20$ ont été soumises à une analyse de régression logistique multivariable (Hosmer et Lemeshow, 2000). Le modèle de l'analyse multivariable est exprimé par un niveau de signification (P) de 5 %, odds ratio (OR), erreur standard (ES), et intervalle de confiance de 95% (IC). L'analyse statistique a été effectuée en utilisant le logiciel SPSS IDEM 20.0 pour Windows.

Les comparaisons de méthode avec calcul de la spécificité, de la sensibilité, de l'exactitude et du coefficient Kappa de Cohen ont été réalisées grâce à l'utilisation du WinEpiscopo 2.0

(disponible en ligne : <http://www.winepi.net/uk/index.htm>).

Le kappa de cohen (k) est un coefficient destiné à mesurer l'accord entre deux variables qualitatives ayant les mêmes modalités. Classiquement, il est utilisé afin de mesurer le degré de concordance entre les stades attribués par deux juges. Il peut également être appliqué afin de mesurer un accord intra-observateur. Il a été calculé et évalué comme décrit auparavant (Kirkwood et Sterne, 2003).

Le coefficient k est toujours compris entre -1 et 1 (accord maximal). Habituellement, on utilise le « barème » suivant pour interpréter la valeur k obtenue :

< 0 Grand désaccord

0.00 – 0.20 Accord très faible

0.21 – 0.40 Accord faible

0.41 – 0.60 Accord moyen

0.61 – 0.80 Accord satisfaisant

0.81 – 1.00 Accord excellent

Le test de Mc Nemar a été appliqué aux résultats des tests d'analyses et les valeurs P ont été calculées en utilisant le logiciel SPSS.

Le test a été considéré comme significativement différent du test de référence lorsque $P < 0,05$ (Kirkwood et Sterne, 2003).

La puissance d'association entre la séropositivité à *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo et les avortements a été mesurée par l'odds ratio (OR) ou le Risque relatif (RR) avec calcul d'un intervalle de confiance de 95% (IC). Les analyses statistiques ont été menées grâce au Excel 2010 et logiciel SPSS et via le site https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php.

Tableau 12: Calcul de l'Odds ratio et le risque relatif.

	Malade	Sain	total	RR
Exposé	A	B	E=A+B	$\frac{(A/E)}{(C/NE)}$
Non exposé	C	D	NE=C+D	
Total	A+C	B+D	A+B+C+D	
Taux d'exposition	A/(A+C)	B/(B+D)		
Odd d'exposition	A/C	B/D		
Odds ratio	$\frac{(A \times D)}{(B \times C)}$			

Pour calculer l'intervalle de confiance de cette estimation, on se place sur l'échelle logarithmique. La variance du logarithme du risque relatif (RR) ou de l'odds ratio (OR) est approximativement :

$$\text{Var}(\ln RR) = 1/A - 1/E + 1/C - 1/NE$$

$$\text{Var}(\ln OR) = 1/A + 1/B + 1/C + 1/D$$

On calcule alors l'intervalle de confiance à 95 % du RR ou de l'OR en passant à l'exponentielle, selon :

$$IC_{95\%}(RR) = [\exp(\ln \hat{RR} - 1.96 \times \sqrt{\text{Var}(\ln \hat{RR})}); \exp(\ln \hat{RR} + 1.96 \times \sqrt{\text{Var}(\ln \hat{RR})})]$$

Même chose pour l'Odds Ratio

7.1 Test de la valeur du risque relatif ou de l'odds ratio

Généralement, on compare la valeur du Risque Relatif ou de l'Odds Ratio estimé à 1, afin de pouvoir conclure à l'existence d'un risque augmenté (RR ou OR >1) ou diminué (RR ou OR <1). L'hypothèse nulle testée est :

$$H_0 : RR \text{ ou } OR = 1 \quad \text{Contre l'alternative} \quad H_1 : RR \text{ ou } OR \neq 1$$

Résultats

1 La séroprévalence globale des anticorps spécifiques de *Leptospira* par le test MAT

Un total de 406 sérums issus de 48 exploitations bovines différentes de la wilaya de Sétif ont été analysés. Une séroprévalence individuelle de 41.87% (IC 95% 37.07-46.67%) a été obtenue, avec 170 animaux révélés positifs à un ou plusieurs sérovars de *Leptospira* à une dilution $\geq 1:100$ et une agglutination de 50% par le test MAT. Par ailleurs, un nombre de 43/48 fermes (89.58%, IC 95% 80.94-98.23%) se sont montrées positives vis-à-vis de *Leptospira* (tableau ci-dessous).

Tableau 13: Résultats des analyses sérologiques obtenus par différents tests pour la mise en évidence des anticorps spécifiques dirigés contre différents sérovars de *Leptospira*.

Vache/ferme	Nombre d'échantillon	Nombre d'échantillons positifs	séroprévalence	Intervalle de confiance 95%	
				inférieure	supérieure
Vaches	406	170	41.87	37.07	46.67
Fermes	48	43	89.58	80.94	98.23

2 Séroprévalence de *Leptospira* chez le bovin par la technique MAT :

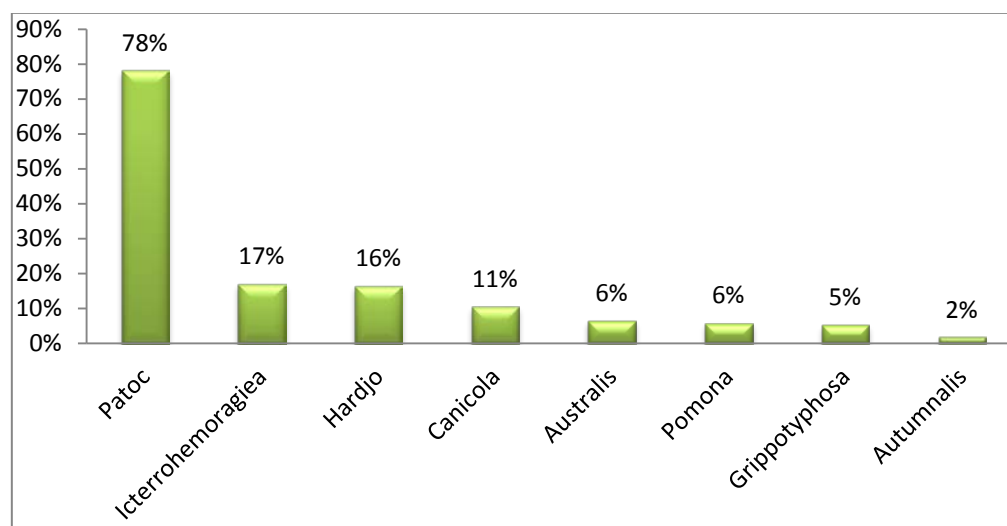
2.1 Séroprévalence individuelle globale et par sérovar

Le sérovar de *Leptospira* le plus prévalent a été Patoc avec 133 échantillons positifs (32.75 %), suivi par les sérovars Icterohaemorrhagiae et Hardjo avec un nombre de 29 (7.14%) et 28 (6.89%) positifs respectivement, vient ensuite le sérovar Canicola avec 18 positifs (4.43%). Nous avons obtenu des valeurs de 11 (2.71%), 12 (2.46%) et 9 (2.21%) échantillons positifs pour les sérovars Australis, Pomona et Grippotyphosa respectivement. Enfin, le sérovar le moins prévalent a été Autumnalis avec 3 échantillons positifs (0,74%) (Voir tableau et figure ci-dessous).

Tableau 14: Séroprévalence individuelle de huit sérovars de *Leptospira* mis en évidence par le MAT chez le bovin dans la région de Sétif.

Sérovars	Nombre de positif	Pourcentage % (IC 95%)
Patoc	133	32.75 (28.19-37.32%)
Icterohaemorrhagiae	29	7.14 (4.64-9.65%)
Hardjo	28	6.89 (4.43-9.36%)
Canicola	18	4.43 (2.43-6.44%)
Australis	11	2.71 (1.13-4.29%)
Pomona	10	2.46 (0.96-3.97%)
Grippotyphosa	9	2.21 (0.78-3.65%)
Autumnalis	3	0.74 (0.00-1.57%)

Sur un total de 170 sérums positifs à un ou plusieurs sérovars de *Leptospira*, nous avons constaté que le sérovar Patoc prédomine avec un pourcentage de 78%, suivi par les sérovars Icterohaemorrhagiae et Hardjo avec un pourcentage de 17% et 16% respectivement. Le sérovar le moins présent est Autumnalis (2%) (Fig. 38).

**Figure 38:** Pourcentage des sérovars de *Leptospira* sur un total des 170 sérums positifs.

Sur un total de 241 réactions positives à plus d'un sérovar, le sérovar Patoc s'est retrouvé prédominant sur l'ensemble des sérovars testés, avec un pourcentage de 55.19%. Les sérovars Icterohaemorrhagiae et Hardjo présentaient des taux très proches avec 12.03% et 11.62%

respectivement. Enfin, Autumnalis s'est montré être le sérovar le moins prévalent avec 1.42% (voir fig. 39 et tableau 15).

Tableau 15: Nombre et taux des sérovars testés sur le nombre total des réactions positives (241).

Sérovars de leptospira	Nombre de réactions positives	Taux
Patoc	133	55,19%
Icterohaemorrhagiae	29	12,03%
Hardjo	28	11,62%
Canicola	18	7,47%
Australis	11	4,56%
Pomona	10	4,15%
Grippotyphosa	9	3,73%
Autumnalis	3	1,24%
Total	241	100%

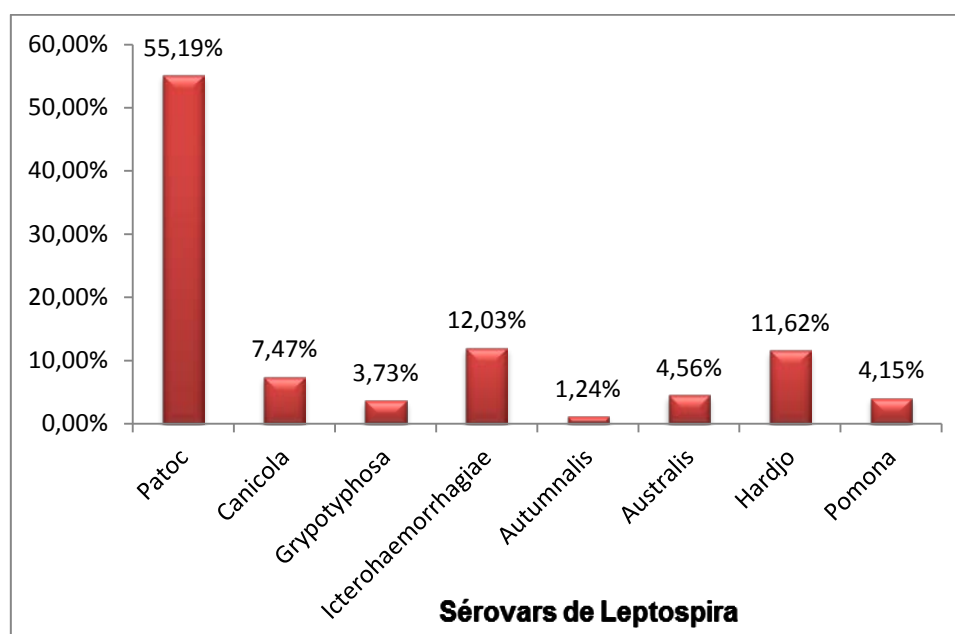


Figure 39: Pourcentage des 8 sérovars sur le nombre total des réactions positives (241).

2.2 Séroprévalence globale au sein des fermes et par sérovar

Si on considère la séroprévalence de *Leptospira* dans les fermes, on constate que le sérovar Patoc se montre le plus prévalent, avec 40 fermes positives sur 48 exploitations examinées. Le sérovar Icterohaemorrhagiae vient en deuxième lieu avec 19 fermes révélées positives, suivi du sérovar Hardjo, avec 16 élevages positifs, ensuite vient le sérovar Canicola avec 12

fermes atteintes. Les sérovars Canicola, Australis et Pomona sont présents d'une manière assez proche avec 9 fermes positives vis-à-vis de Canicola contre 8 fermes pour Australis et Pomona. Enfin, le sérovar Autumnalis s'est montré le moins prévalent avec uniquement trois fermes positives.

Tableau 16: Séroprévalence au niveau des fermes de huit sérovars de *Leptospira* identifiés chez le bovin par le test MAT.

Sérovars	Fermes positives	Séroprévalence % (IC 95%)
Patoc	40	83,33% (72.79-93.88%)
Icterohaemorrhagiae	19	39,58% (25.75-53.42%)
Hardjo	16	33,33% (20.00-46.67%)
Canicola	12	25,00% (12.75-37.25%)
Australis	9	18,75% (7.71-29.79%)
Pomona	8	16,67% (6.12-27.21%)
Grippotyphosa	8	16,67% (6.12-27.21%)
Autumnalis	3	6,25% (0.00-13.10%)

Pour les sérovars de *Leptospira interrogans*, les résultats ont révélé que le sérovar Icterohaemorrhagiae prédominait avec un taux de 39,58%, suivi par Hardjo (33,33%), ensuite venaient les autres sérovars (Canicola 25%, Australis 18.75%, Pomona et Grippotyphosa 16,67%). Enfin, le sérovar le moins présent était Autumnalis (6,25%) (Figure ci-dessous).

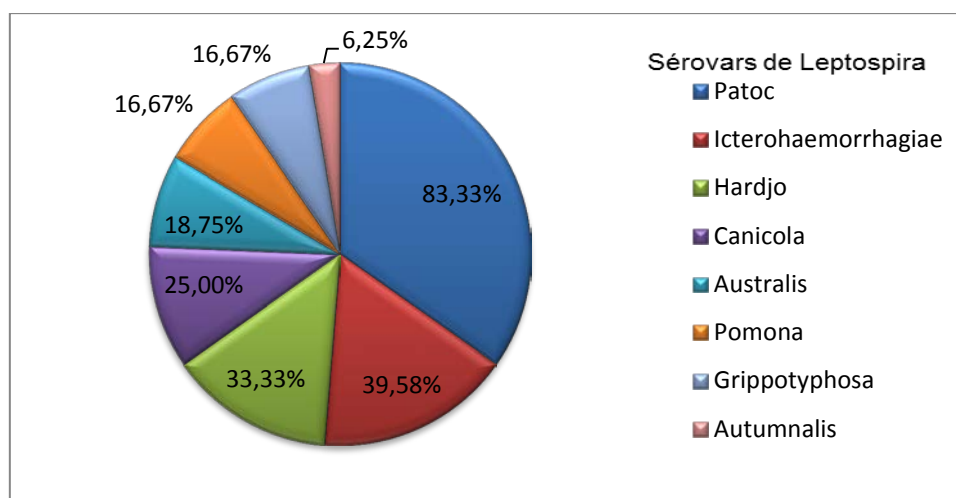


Figure 40: Séroprévalence au niveau des exploitations de *Leptospira* par sérovar chez le bovin dans la région de Sétif.

2.3 Titre en anticorps obtenus par le test MAT pour 8 sérovars de *Leptospira*

Les titres positifs en anticorps enregistrés pour les sérovars Patoc (133), Icterohaemorrhagiae (29), Hardjo (28), Canicola (18), Australis (11), Pomona (10), Grippotyphosa (9), et Autumnalis (3) sont repris dans le tableau ci-dessous.

Nous constatons que le titre en anticorps le plus fréquent est 1 :100 (60.17%), suivi de la dilution de 1 :200 (23.24%) et enfin, du titre de 1:3200 (0.41%). Pour le sérovar Icterohaemorrhagiae, la dilution de 1:3200 a pu tout de même le mettre en évidence chez un animal (tableau 17).

Tableau 17: Distribution des titres en anticorps en fonction du sérovar de *Leptospira*.

Sérovar	Titre en anticorps (n,%)						Total
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	
Patoc	93 (69)	27 (20)	7 (5)	5 (4)	2 (2)	0 (0)	133 (55,19)
Icterohaemorrhagiae	11 (38)	3 (10)	7 (24)	4 (14)	3 (10)	1 (10)	29 (12,03)
Hardjo	9 (32)	15 (54)	3 (11)	1 (4)	0 (0)	0 (0)	28 (11,62)
Canicola	12 (67)	6 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	18 (7,47)
Australis	7 (64)	1 (9)	3 (27)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	11 (4,56)
Pomona	5 (50)	2 (20)	2 (20)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (4,15)
Grippotyphosa	5 (56)	2 (22)	0 (0)	1 (11)	1 (11)	0 (0)	9 (3,73)
Autumnalis	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (1,24)
Total	144 (60.17)	56 (23.24)	22 (9.13)	11 (4.56)	6 (2.49)	1 (0.41)	241 (100)

2.4 Fréquence des sérums positifs en fonction du sérovar de *Leptospira*

Les résultats ont montré 120 sérums positifs pour un seul sérovar et 50 positifs vis-à-vis de plus d'un sérovar. Nous avons mis en évidence 40 sérums positifs pour 2 sérovars, 5 sérums pour 3 sérovars, 3 sérums pour 4 sérovars et enfin nous avons obtenu un sérum positif pour 5 et 7 sérovars chacun (tableau 18).

Tableau 18: Répartition des sérums positifs en fonction des sérovars identifiés par le test MAT (dilution $\geq 1 : 100$).

Nombre de sérovars	Nombre de sérums positifs	Fréquence (%) N=406
1	120	29.56
2	40	9.85
3	5	1.23
4	3	0.73
5	1	0.25
7	1	0.25
Total	170	41.87

3 Séroprévalence de *L. interrogans* sérovar Hardjo par différentes méthodes sérologiques

Un total de 406 sérums a été analysé par une méthode sérologique de type ELISA indirect (PrioCheck) et par le test MAT. Le but est de rechercher des anticorps spécifiques de *L.interrogans* sérovar Hardjo.

Sur le plan individuel, le test MAT a détecté 28 (6.89%, IC 95% 4.43-9.36%) vaches positives vis-à-vis de *L. interrogans* sérovar Hardjo et au niveau des exploitations, 16/48 des fermes testées se sont montrées positives à la bactérie ce qui correspond à un taux de positivité de 33.33 % (IC 95%, 20.00-46.67%).

Le test ELISA Indirect quant à lui a révélé 22 (5.42%, IC 95% 3.22-7.62%) vaches positives pour Hardjo et un total de 15 (31.25%, IC 95% 18.14-44.36%) fermes positives (tableau 18). Si on considère, la séroprévalence chez les vaches séropositives par ferme, on constate que celle-ci varie de 7 à 33,33%, avec un CI 95% $\pm 4,63$ (moyenne 17,90%, Q1 10%; médiane 20%, Q3 25%).

Tableau 19: Séroprévalence de *L interrogans* sérovar Hardjo en fonction de la méthode sérologique utilisée chez les bovins.

Test sérologique	Échantillons positifs	Échantillons négatifs	Séroprévalence (%)
MAT	28	378	6.89%
ELISA PrioCheck	22	384	5.42%

4 Comparaison entre les différentes méthodes sérologiques appliquées pour la recherche des anticorps spécifiques de *L. interrogans* sérovar Hardjo

Les performances du kit ELISA pour la mise en évidence des anticorps dirigés contre *L. interrogans* sérovar Hardjo ont été évaluées en prenant comme test de référence le MAT (tableau 20).

Tableau 20: Comparaison de l'ELISA PrioCheck avec le MAT pris comme test de référence.

Tests	MAT (test de référence)		Total
	<i>Positifs</i>	<i>Négatifs</i>	
<i>Positifs</i> ELISA PrioCheck	16	6	22
<i>Négatifs</i>	12	372	384
Total	28	378	406

Pour évaluer les performances du test ELISA PrioCheck dans la mise en évidence des anticorps dirigés contre *L. interrogans* sérovar Hardjo, nous avons calculé la sensibilité, la spécificité, l'exactitude du test, ainsi que le coefficient kappa de Cohen et le test de Mc Nemar en prenant le test MAT comme test de référence.

Les résultats ont montré que pour la technique ELISA, la sensibilité est de 57.1% (IC 95% 38.8-75.5%), la spécificité de 98.4% (IC 95% 97.2-99.7%) et l'exactitude de 95.6% (IC 95% 93.6-97.6%)

Le calcul de la concordance entre les deux méthodes par le calcul du coefficient Kappa de Cohen a donné une valeur $k=0,62$ correspondant à un accord satisfaisant de concordance entre les deux méthodes. Le résultat du test Mc Nemar a montré un $p = 0.23$ ($P>0.05$) ce que signifie que les deux méthodes donnaient des valeurs significativement non différentes.

5 Étude des facteurs de risque

Cette étude, basée sur les résultats de l'étude de la séroprévalence, nous a permis dans un premier temps d'identifier les facteurs de risque qui semblent augmenter le risque de la séropositivité vis-à-vis de *Leptospira* par le test MAT. Dans un deuxième temps, l'étude de la séroprévalence par la technique ELISA indirect, nous a permis d'analyser les facteurs de risque potentiels susceptibles d'influencer la séropositivité vis-à-vis de *L. interrogans* sérovar Hardjo.

5.1 Etude des facteurs de risque par le test MAT

Nous avons analysé deux types de facteurs, ceux liés aux fermes (type d'élevage, type d'exploitation, taille de troupeau, contact étroit avec les autres animaux, présence des chiens,

et la source d'eau) et ceux liés aux animaux prélevés (gestation, âge des vaches, la parité, race et historique des avortements).

Le tableau (21) reprend les données de l'analyse des facteurs de risque potentiels pouvant être liés à l'infection par *Leptospira*.

L'étude statistique univariable par le test Chi deux a montré une association significative ($P < 0.05$) selon le type d'exploitation, le contact avec les autres animaux ou encore la source d'eau (les bovins s'abreuvent des rivières, puits ou mares).

Tous les facteurs présentant un $P < 0,2$ ont été retestés par l'analyse multivariable avec la régression logistique binaire (tableau 22).

Tableau 21: Séroprévalence et analyse univariée des facteurs de risque associés à la séropositivité vis-à-vis de *Leptospira* chez les vaches analysées par le test MAT dans la région de Sétif, Algérie.

variables Independants	Catégories	Nombre des animaux prélevés	Nombre des animaux positifs	Prévalence %	Valeur de P
Gestation	Oui	244	96	39,34	0.20
	Non	162	74	45,68	
Age des vaches	(3-6 ans)	286	125	43,71	0.24
	>6 ans	120	45	37,50	
Type d'exploitation	laitiere	335	205	61,19	0.007
	Mixte	71	31	43,66	
	Intensif	33	18	54,55	
Type d'élevage	Semi-intensif	344	139	40,41	0.27
	Extensif	29	13	44,83	
	(5-10)	74	30	40,54	
La taille de troupeau	(10-20)	196	77	39,29	0.42
	>20	136	63	46,32	
	Croisée	74	28	37,84	
La race	Importée	318	133	41,82	0.18
	Locale	14	9	64,29	
Histoire d'avortement dans les années précédentes	Oui	31	15	48,39	0.45
	Non	375	155	41,44	
La parité	Multipare	314	128	40,76	0.40
	Primipare	92	42	45,65	
Contact avec les autres animaux	Oui	374	147	39,30	0.001
	Non	32	23	71,88	
Présence des chiens	Oui	254	103	40,55	0.48
	Non	152	67	44,08	
	Puits	194	95	48,97	
Source d'eau	Rivières	203	70	34,48	0.01
	mares	9	5	55,56	

Nous avons constaté par l'étude multivariable qu'il y avait une association significativement positive entre la source d'eau et la séropositivité à *Leptospira*. En effet, les bovins s'abreuvant des rivières ont de faible risque d'être infecté par *Leptospira* comparativement à la source d'eau issue des puits et des mares (OR 0,21) (tableau 22).

Tableau 22: Analyse de régression logistique multivariable des facteurs de risque associés à la séropositivité vis-à-vis de *Leptospira* testées par le MAT chez des vaches dans la région de Sétif, Algérie.

Facteurs de risque	Erreur standard (SE)	Odds ratio (OR)	Valeur de P	Intervalle de confiance 95%	
				inférieure	supérieure
Eau des rivières	0,23	0,51	0,005	0,32	0,82

5.2 Analyse de certains facteurs de risque potentiels susceptibles d'influencer la séoprévalence de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo

Cette étude, basée sur les résultats du test ELISA indirect, nous a permis d'identifier les facteurs de risque qui semblent augmenter le risque de la séropositivité vis-à-vis de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo

Le tableau (23) résume tous les résultats obtenus de l'analyse des facteurs de risque présumés liés à l'infection par *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo

L'étude statistique univariable par le test du Chi deux a montré une association significative selon la taille de troupeau et la catégorie d'âge des animaux ($P < 0,001$) (tableau 23). Tous les facteurs présentant un $P < 0,2$ ont subi une analyse par la régression logistique multivariable (tableau 24)

Tableau 23: Séroprévalence et analyse univariée des facteurs de risque associés à la séropositivité de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo chez les vaches testées par ELISA indirect dans la région de Sétif, Algérie.

Variables indépendants	Catégories	Nombre des animaux prélevés	Nombre des animaux positifs	Prévalence %	Valeur de <i>P</i>
Gestation	Oui	244	13	5,33	0,929
	Non	162	9	5,65	
Age des vaches	(3-6)	286	21	7,34	0,008
	>6	120	1	0,83	
Etat corporel	Bien	156	11	7,05	0,244
	Moyen	250	11	4,40	
Type d'exploitation	Laitière	335	17	5,07	0,51
	Mixte	71	5	7,05	
Type d'élevage	Intensif	33	4	12,12	0,129
	Semi-intensif	353	18	5,10	
	Extensif	20	0	0,00	
	(5-10)	74	1	1,35	
La taille de troupeau	(10-20)	196	4	2,04	0,001
	>20	136	17	12,40	
La race	Croisée	74	4	5,41	0,959
	Importée	318	17	5,35	
	Locale	14	1	7,14	
Histoire d'avortement	Oui	231	3	9,98	0,28
	Non	375	19	5,07	

L'étude statistique multivariable a montré que la séroprévalence vis-à-vis de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo a varié de façon significative en fonction de la taille du troupeau. En effet, les troupeaux avec une taille > 20 ont 13 fois plus de risque de contracter la leptospirose que les autres tailles de troupeau (10-20 et 5-10). Ainsi, il semblerait que la séropositivité augmente avec la taille du troupeau.

Aussi, une variation significative a été observée selon la catégorie d'âge des animaux ($p < 0,01$). Les vaches de moins de 6 ans plus exposées (OR : 9) comparées à celles âgées de plus de 6 ans. Enfin, le système semi-intensif présente un risque faible vis-à-vis de la séropositivité à *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo comparé avec au système intensif (OR 0,21) (tableau 24).

Tableau 24: Analyse par régression logistique multivariable des facteurs de risque associés à la séropositivité de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo chez les vaches testées par ELISA indirect dans la région de Sétif, Algérie.

Facteurs de risque	Erreur standard (SE)	Odds ratio (OR)	Valeur de P	Intervalle de confiance 95%	
				Inférieure	Supérieure
Systeme semi-intensif	0,68	0,21	0,02	0,06	0,82
Age des vaches (3-6 ans)	1,04	9,25	0,03	1,19	71,47
Taille du troupeau >20	1,02	13,65	0,02	1,58	117,7

6 Étude épidémiologique de type cas-témoin

Dans le but de vérifier si *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo était une cause d'avortement chez la vache dans la région de Sétif, nous avons effectué une étude de type cas-témoin avec comme facteur d'exposition la séropositivité à *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo.

Sur un total de 48 fermes bovines étudiées, sur la base d'un questionnaire épidémiologique, les exploitations étaient séparées en fermes témoins et fermes cas. Les fermes qui ont connu des épisodes d'avortement durant les cinq dernières années sont considérées comme des fermes cas et les autres comme des fermes témoins. Ainsi, 25 fermes cas et 23 fermes témoins ont été définies.

Les sérums d'un total de 406 vaches (232 dans les fermes cas et 174 dans les fermes témoins) ont été prélevés et analysés pour la détection d'anticorps spécifiques de *Leptospira*. Une ferme était considérée comme positive si au moins un animal était séropositif.

L'étude cas-témoin a été réalisée grâce aux résultats sérologiques obtenus par le test MAT et par la technique ELISA Indirect.

6.1 Étude cas-témoin en tenant compte du test MAT

Les détails relatifs au nombre de fermes prélevées séparées en cas et témoins et les données sérologiques obtenues pour *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo par le test MAT ont été repris dans le tableau ci-dessous.

Parmi les 25 fermes cas, 10 se sont révélées positives vis à vis de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo en utilisant le test MAT, soit une prévalence de 40%. Pour les 23 fermes témoins, 6 fermes étaient positives à *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo (26.08%)

(Tableau 25). La séroprévalence globale de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo obtenue au niveau des fermes était de 33.33%.

Tableau 25: Prévalence de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo chez le bovin en fonction du statut de la ferme, en utilisant le test MAT.

Statut de la ferme	Nombre (%)	Fermes +	Fermes -	Prévalence dans fermes	Nbre de bovins prélevés (%)	+	Prévalence (%) IC 95%
Cas	25 (52.08)	10	15	40%	232 (57.14)	14	6.03 (2.97-9.10)
Témoin	23 (47.92)	6	17	26.08 %	174 (42.86)	14	8.04 (4.00-12.09)
Total	48	16	32	33.33%	406	28	6.89 (4.43-9.36)

Parmi les 406 sérums analysés, 28 se sont montrés positifs au test MAT, correspondant à une séroprévalence globale de 6.89 (IC 95% 4.43-9.36%). Parmi les 28 positifs, 14 soit 6.03 (IC 95% 2.97-9.10%) appartenaient à des fermes cas et 8.04 (IC 95% 4.00-12.09%) provenaient des fermes témoins (Tableau 25).

6.1.1 Étude cas-témoin au niveau de l'exploitation

Au moins un animal séropositif a été trouvé dans 16 fermes (6.89%) ; plus particulièrement 10/25 fermes cas (40%) et 6/23 fermes témoins (26%).

L'étude cas-témoin montre un taux d'exposition de 40% pour les fermes cas comparativement à 26.08% pour les fermes témoins. Cette différence est non significative ($p > 0,05$). L'Odds Ratio était de 1.89 (IC 95% 0.83- 5.41%) et le risque relatif de RR 1.33. Il n'y a pas d'association statistique évidente entre la présence d'avortements dans les exploitations bovines et la présence de bovins séropositifs à *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo (tableau 26).

Tableau 26: Étude cas-témoin au niveau de l'exploitation.

	Type de ferme		
	MAT	Cas	Témoins
Total			
Exposé	10	6	16
Non exposé	15	17	32
Total	25	23	48
Taux d'exposition	40%	26%	RR= 1,33 (IC 95% 0.55-3.25)
Odds d'exposition	0.67	0.26	
OR (IC 95%)	1.89 (IC 95% 0.83- 5.41)	P= 0.3	

6.1.2 Etude cas-témoin au niveau individuel

Sur le plan individuel, l'analyse de la situation vis-à-vis de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo, montre un taux d'exposition de 6.03% pour les animaux des fermes cas contre un taux de 8.05% pour les animaux en provenance des fermes témoins.

Les valeurs de l'OR et du RR étaient de 0,73 (IC 95% 0.34- 1.85) et de 0,87 (IC 95% 0.48- 1.99) respectivement (tableau 27). Ceci est, encore une fois en faveur d'une non association significative entre l'exposition des bovins à *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo et les avortements observés dans les fermes ($P>0,05$).

Tableau 27: Étude cas-témoin au niveau individuel.

MAT	Animaux		Total
	Animaux des fermes Cas	Animaux des fermes Témoins	
Exposé	14	14	28
Non exposé	218	160	378
Total	232	174	406
Taux d'exposition	6.03%	8.05%	RR : 0,87 (IC 95% 0.48-1.99)
(Odd d'exposition	0,06	0,09	
OR (IC 95%)	0,73 (IC 95% 0.34- 1.85) $P= 0.43$		

6.2 Étude cas-témoin en tenant compte du test ELISA

6.2.1 Au niveau de l'exploitation

Si on considère la situation sur le plan des fermes, on constate que parmi les 25 fermes cas, 10 se sont montrées positives vis-à-vis de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo par le test ELISA contre 5 fermes positives parmi les témoins (tableau 28). Bien que le taux d'exposition à la bactérie dans les fermes cas (40%) soit plus important que celui obtenu dans les fermes témoins (22%) (tableau 28), l'étude cas-témoin ne montre pas d'association significative ($P>0,05$) entre la présence de *Leptospira interrogans* de sérovar Hardjo et les avortements observés dans les fermes. En effet, les valeurs de l'OR et du RR obtenues étaient de 2.4 (IC 95% 0.67-8.57) et de 1.47 (IC 95% 0.26-7.64) respectivement.

Tableau 28: étude cas-témoin au niveau de l'exploitation.

ELISA	Type de ferme		
	Cas	Témoins	Total
Exposé	10	5	15
Non exposé	15	18	33
Total	25	23	48
Taux d'exposition	40%	22%	RR : 1.47 (IC 95% 0.26-7.64)
Odds d'exposition	0.67	0.28	
OR (IC 95%)	2.4 (0.67-8.57) P= 0.18		

6.2.2 Étude cas-témoin au niveau individuel

L'étude cas-témoin au niveau individuel, n'a pu mettre aucune relation significative entre les animaux séropositifs à L. interrogans sérovar Hardjo et le fait d'avorter. En effet, les valeurs de l'OR et du RR obtenues 1.33 (IC 95% 0.55- 3.25) et 3,09 (IC 95% 2.31-5.01) respectivement ne sont pas en faveur de cette association ($P>0,05$) (tableau 29).

Tableau 29: Étude cas-témoin au niveau individuel.

Test ELISA	Animaux		Total
	Animaux des fermes	Animaux des fermes	
	Cas	Témoins	
Exposé	14	8	22
Non exposé	218	166	384
Total	232	174	406
Taux d'exposition	6,03%	4,60%	RR : 3,09 (IC 95% 2.31-5.01)
Odd d'exposition	0,06	0,05	
OR (IC 95%)	1.33 (0.55- 3.25) P= 0.53		

Discussion

Discussion :

La leptospirose est une maladie zoonotique cosmopolite touchant plusieurs espèces animales, causée par différents sérovars pathogènes appartenant au genre *Leptospira* (Adler et Moctezuma, 2010). Elle sévit sur tous les continents soit de façon endémique, soit sous forme de cas groupés (anadémies) (Houpikian et al., 2002). Elle peut causer des pertes économiques considérables et des problèmes de santé graves allant jusqu'à la mort.

Chez le bovin, les pertes économiques sont remarquables et très lourdes. En effet, la leptospirose peut être responsable de troubles de l'infertilité notamment les avortements, mais aussi des chutes dans la production laitière accompagnées d'épisodes de mammites (Sakhaee et al., 2010).

La maladie présente un important polymorphisme de symptômes et la diversité des organes atteints rend le diagnostic clinique très difficile. Cependant, son diagnostic est souvent complexe et délicat puisque hormis l'avortement, l'infection par *Leptospira* chez la vache est souvent asymptomatique passant généralement inaperçue (Ellis, 1981). D'où la nécessité des tests sérologiques dans le diagnostic par la mise en évidence des anticorps spécifiques à *Leptospira*. Pour le diagnostic sérologique, plusieurs tests peuvent être utilisés notamment le test d'agglutination microscopique (MAT) et l'ELISA. D'autres méthodes de diagnostic peuvent être utilisées comme les tests moléculaires et la mise en culture. Ces derniers sont peu utilisés en raison des dépenses requises (test moléculaire) et du temps nécessaire pour obtenir des résultats (Culture). Ainsi, le recours aux techniques sérologiques constitue souvent la seule alternative pour dépister et révéler les animaux infectés *in vivo*. Le test MAT est considéré comme le test sérologique de référence (Fisher et Somarriba, 2017).

Dans le cadre de la présente étude, l'utilisation de la technique ELISA a permis de réaliser un dépistage rapide de l'ensemble de l'effectif testé. Le MAT a permis la confirmation des résultats obtenus sur des sérums testés positifs et de lever l'ambiguïté des prélèvements jugés douteux par l'ELISA au cours de la première opération de dépistage (Bourhy et Picardeau, 2012). Le seuil de 1/100 a été retenu comme seuil de positivité signant l'infection par *L. interrogans* chez les bovins (OIE, 2009 ; Cedric, 2012).

1 Séroprévalence de *Leptospira* spp. chez les bovins de la région de Sétif par utilisation du test MAT

Ce travail constitue la première étude d'envergure sur la séroprévalence vis-à-vis de *Leptospira* spp. dans des populations bovines en Algérie. L'étude a porté essentiellement sur la Wilaya de Sétif. Sur un total de 406 sérums issus de 48 exploitations bovines, 170 animaux se sont révélés positifs à un ou plusieurs sérovars de *Leptospira*, à une dilution $\geq 1 : 100$ à 50% d'agglutination, soit une séroprévalence de 41.87% (IC 95% 37.07-46.67%). Par ailleurs, si on considère la séroprévalence au niveau des fermes, celle-ci était de 89.58% (IC 95% 80.94-98.23%), puisque 43/48 des fermes se sont révélées positives à *Leptospira* spp.

De nombreuses études de séroprévalence vis-à-vis de *Leptospira* ont été réalisées chez le bovin dans le monde. Selon les différents travaux publiés, la séroprévalence peut varier en fonction du pays, de la région, du type de test sérologique et de la valeur utilisée comme seuil (Parvez et al., 2015 ; Ismail et al., 2019). Par conséquent, la comparaison directe des résultats doit se faire avec prudence car les études évoquées ont adopté des procédures différentes : des techniques différentes, des valeurs seuils différentes, des échantillons de taille différente ou encore des populations animales différentes.

Si on se réfère aux travaux publiés sur la séroprévalence de la leptospirose chez le bovin en utilisant le MAT comme test de référence, la séroprévalence vis-à-vis de *Leptospira* obtenue dans cette étude (41.87%) est assez similaire à celles citées dans certaines régions à travers le monde : le Brésil (46.9%) (Lilenbaum et Souza, 2003), l'Inde (42.15%) (Sunder et al., 2016), la Colombie (40,5%) (Hernández-Rodríguez, 2011), la Turquie (32,26%) (Kenar et Ozdemir, 2013), la Tanzanie (30,3%) (Schoonman et Swai, 2010) ou encore la nouvelle Zélande 45.6% (Dreyfus et al., 2018). La séroprévalence assez importante obtenue vis-à-vis de *Leptospira* pourrait s'expliquer par le fait que les vaches testées étaient en contact étroit avec les réservoirs des sérovars testés (les rongeurs, les sangliers, les chiens, ect...). En plus, la réponse immunitaire induite par ces sérovars est plus longue accompagnée par la fréquence plus élevée de nouvelles infections (Quinn et al., 2000). En outre, la région de Sétif est caractérisée par une pluviométrie annuelle élevée et un climat chaud, avec une abondance des eaux de surface qui sont des facteurs favorables à la transmission des leptospires. En effet, certains micro-environnements tels que les points d'eau et les enclos pour les bovins peuvent fournir un environnement favorable à la transmission de *Leptospira* (Guitian et al., 2001; Bharti et al., 2003 ; Kuriakose et al., 2008).

Des séroprévalences de *Leptospira* très importantes ont été obtenues dans d'autres régions du monde, 83,3% au Brésil (Quaresma Bomfim et al., 2005), 81.7% en Malaisie, 70.4% au Mexique (Carvajal-de la Fuente et al., 2012), et 70.51% en Inde (Balamurugan et al., 2018). Cela peut s'expliquer par le fait que ces pays se situent dans les régions tropicales du globe, ce qui offre d'excellentes conditions pour la survie et la propagation des leptospires, en raison du climat et en particulier des précipitations élevées le long de l'année. Ces conditions sont souvent associées à de mauvaises pratiques de gestion (zones rurales) ou à de mauvaises conditions sanitaires (cycle urbain), il a été clairement démontré qu'elles étaient fortement associées à la survenue de l'infection (Lilenbaum et Souza, 2003 ; Oliveira et al., 2012).

En revanche, des séroprévalences moins importantes vis-à-vis de *Leptospira* ont été rapportées dans d'autres régions du monde, au Maroc 15% (Benkirane et al., 2014), en France (entre 13% et 23%) (Andre-Fontaine et Ruvoen, 1999; Andre-Fontaine et al., 2000 ; 2001 ; 2002 ; 2003 ; 2004 ; 2005 ; 2006), en Iran 15,79% et 17.36% (Sakhaee et Abdollah pour, 2011 ; Khalili et al., 2014), en Inde (21,18%) (Mariya et al., 2006), au Trinidad (21,5%) (Suepaul et al., 2011), en Afrique du Sud (19,4%) (Hesterberg et al., 2009), en Malaisie (27,7%) (El Jalii, 2008) et enfin, au Mexique (28,4%) et (10,33%) (Segura-Correa et al., 2010 ; Leon et al., 2008).

Des séroprévalences très faibles enregistrées pour *Leptospira* chez la vache ont aussi été rapportées, 8% en Espagne (Alonso-Andicoberry et al., 2001), au Québec (4,64%) en 2005 et (7,6%) en 2006 (Vincent et al., 2007), en Turquie (3,4%) (Kocabiyik et Cetin, 2004), en Suède (1%) (Lindahl, 2014) et 6.44% dans la région de Santa Catarina au Brésil (Favero et al., 2017).

Pour la séroprévalence de *Leptospira* au sein des exploitations, notre étude a montré un taux de 89.58%. Des variations considérables ont été constatées dans d'autres travaux dans le monde, au Chili (75%) (Salgado et al., 2014), en Espagne (34%) (Alonson-andecoberry et al., 2001), en Tanzanie (58.5%) (Schoonman et Swai, en 2010). La différence relevée dans la séroprévalence au sein des exploitations comparée à celle obtenue dans ce travail, est probablement aux différences dans la sensibilité et la spécificité des tests et des méthodes utilisés, aux variations annuelles de la prévalence de la leptospirose bovine, à la situation géographique, à l'état de santé des vaches au moment du prélèvement ou encore aux conditions d'élevages.

2 La séroprévalence de *L. interrogans* sérovar Hardjo chez les bovins dans la région de Sétif :

2.1 Par le test MAT

Le test de microagglutination (MAT) est considéré comme le procédé le plus couramment utilisé pour le diagnostic d'une infection à leptospire chez les animaux et les humains, par la détection d'anticorps spécifiques dans le sérum. L'isolement par culture montre une meilleure sensibilité pour détecter les leptospires chez les bovins, mais il reste difficile à réaliser et est souvent infructueux (Thiermann, 1983).

Sur les 406 bovins testés, 28 se sont montrés positifs à *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo en utilisant le test MAT, à un titre de 1/100 et à 50% d'agglutination, ce qui correspond à une séroprévalence de 6.89%. Le titre de 1/100 en MAT est considéré comme la dilution la plus appropriée pour la sérologie de *Leptospira interrogans* chez le bovin (Legrand, 2007). En comparant la prévalence sérologique obtenue à celles rapportées dans d'autres études publiées et utilisant le MAT comme test sérologique, il ressort que la séroprévalence chez le bovin dans la région de Sétif est bien plus élevée qu'en Espagne (1%) (Alonso-Andicaberry et al., 2001) et en Iran (0% sur des vaches ayant avorté) (Bahari et al., 2011), 1.19% (Khalili et al., 2014). En revanche, elle est du même ordre de grandeur que dans d'autres régions en Iran (5,61%) (Sakhaee et Abdollahpour, 2011), en Inde (7,8%), (4,7%) (Deneke et al., 2014 ; Sunder et al., 2016), au Trinidad (4,1%) (Suepaul et al., 2011), au Mexique (2,4%) (Leon et al., 2008) et en Turquie (2,8%) (Kocabiyik et Cetin, 2004).

La séroprévalence obtenue dans cette étude est moins importante comparée à celles rapportées en Mongolie et en nouvelle Zélande où presque tous les individus étaient séropositifs (80,4%) et (72,6%) respectivement (Odontsetseq et al., 2005 ; Sanhueza et al., 2013). Une autre étude menée en nouvelle Zélande a donné une prévalence de 45.6% (Dreyfus et al., 2018). Au Brésil, des taux de 43,5%, 33,6% et 20,6% ont été obtenus respectivement dans des régions différentes du pays (Lilenbaum et Souza, 2003 ; Quaresma Bonfim et al., 2005 ; Martins et al., 2012). En Afrique précisément en Tanzanie, la prévalence obtenue était de 14,76% (Shoonman et Swai, 2010). En Turquie, une étude réalisée sur la séroprévalence dans d'autres régions du pays ont montré un taux d'exposition de 22,22% (Kenar et Ozdemir, 2013), en Malaisie, la prévalence rapportée était de 23,5% (El jalii, 2008) et enfin, dans une région en Inde, la séroprévalence obtenue était de 27.76% (Balamurugan et al., 2018).

2.2 Par la technique ELISA

La technique ELISA est une méthode de laboratoire couramment utilisée dans le dépistage sérologique initial pour la détection des anticorps dirigés contre *Leptospira interrogans* (Ahmad et al., 2005). Elle est pratique et rapide (OIE, 2018). En comparant avec le test de micro-agglutination (MAT), qui est la méthode de référence, la technique ELISA possède une sensibilité et une spécificité élevées (Ahmad et al., 2005). Elle a été utilisée précédemment pour la détection des anticorps contre les leptospires chez les bovins (Bercovich, 1990 ; Vongxay et al., 2012 ; Ngbede et al., 2013). Par conséquent, dans cette étude, le test ELISA indirect a été utilisé pour déterminer la séroprévalence d'une infection naturelle par *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo chez des vaches saines et non vaccinées (Aucune vaccination contre la leptospirose n'est pratiquée en Algérie à ce jour).

Sur un total de 406 sérums analysés par la technique ELISA, 22 animaux se sont révélés positifs à *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo, soit une séroprévalence de 5,42%. En effet, cette séroprévalence est très proche à celle obtenue par le test MAT pour la recherche des anticorps dirigés contre Hardjo qui est de 6.89%.

De nombreuses études sur la séroprévalence (utilisant la même technique et recherchant les anticorps dirigés contre même sérovar de *Leptospira*) ont été réalisées dans le monde chez le bovin, des différences considérables parmi les pays ont été rapportées. La séroprévalence vis-à-vis de *Lepstospira interrogans* sérovar Hardjo obtenue dans cette partie de notre étude (5,42%), est assez proche de celle retrouvée dans la région d'Alger (3.89%) (Derdour et al., 2017). D'autres pays à travers le monde ont obtenu des taux assez variés avec le test ELISA, en Malaisie (2.4%) (Daud et al., 2012), au Nigéria (8,44%) (Ngbede et al., 2013) et au Laos (3%) (Vongxay et al., 2012), au Pakistan (23.12%) (Ijaz et al., 2018), en Malaisie (autre région) (56,5%) (El jalii, 2008), en Jordanie (26.25%) (Ismail et al., 2019), au Bangladesh (26.25%) (Parvez et al., 2015), en Colombie (26.25%) (Léon et al., 2009), en Irlande (41,75%) (Ryan et al., 2012), en Inde (49%) (Sankar et al., 2010), au Cameroun (30%) (Scolamacchia et al., 210), en Ouganda (29,35%) (Atherstone et al., 2014), au Brésil (83,3%) (Prescott et al., 1988), en Inde (autre région) 60.62% (Lata et al., 2019), au Maroc (0,8%) (Benkirane et al., 2014) et en Espagne (1%) (Alonso-Andicoberry et al., 2001).

Si on considère la situation au niveau des exploitations, notre étude a montré une séroprévalence de 31,25% qui varie de 7 à 33,33% (moyenne 17,90%, Q1 10%, médiane 20%, Q3 25%). Si on compare nos données à celles obtenues dans d'autres études similaires,

on remarque que les prévalences au niveau des fermes varient d'un pays à un autre avec un taux de (100%) au Brésil (Campos et al., 2017), de (92,3%) en Jordanie (Ismail et al., 2019), de (82.29%) en Irlande (Ryan et al., 2012) et de (11%) en Espagne (Alonso-Andicoberry et al., 2001). Les différences observées dans la séroprévalence peuvent être dues à plusieurs facteurs tels la localisation géographiques (la présence des ressources hydrauliques, le degré de pluviométrie), la conduite des élevages (hygiène, nettoyage, niveau des éleveurs, et ...), les races des animaux et les niveaux d'immunité naturelle (Parvez et al., 2015).

En Algérie, très peu d'études ont été menées sur la leptospirose bovine ou autres. Quelques données sont à évoquer comme l'étude dirigée par Afiri et collaborateurs (2013) entre 2005 et 2008, qui a rapporté 88 cas de leptospirose humaine dans la wilaya de Tizi Ouzou, dont 7.95 % dus au séro groupe Sejroe. Nous citons aussi, l'épidémie déclarée dans la wilaya de Sétif en 2010 avec 27 personnes infectées, parmi eux, 3 décès enregistrés (<http://www.forum-algerie.com/actualite-algerienne>). Il a été mentionné dans le rapport d'activités de l'Institut Pasteur d'Algérie en 2009 que sur 280 sérums humains testés, 101 ont été positifs à cette bactérie et 8 douteux. Le test utilisé était la Macro-agglutination à l'antigène TR (IPA, 2009). Ces résultats montrent que la leptospirose a circulé depuis longtemps en Algérie et persiste à ce jour. Il est à souligner que la leptospirose est actuellement reconnue en France comme une maladie professionnelle. Les activités à risque comprennent notamment des activités qui exposent à un contact direct avec les animaux réservoirs. C'est le cas pour les éleveurs, les vétérinaires ou encore les personnels d'abattoir (Legrand, 2007). Ces derniers sont plus susceptibles d'être infectés par les mêmes sérovars du bovin.

D'après nos résultats et ceux obtenus dans d'autres pays du monde, on peut extraire la relation entre les leptospires et les ressources hydriques (eau des rivières, lacs, étangs...). En effet, les pays riches en ressources hydriques et les pays tropicaux ont présenté les valeurs de séroprévalence les plus élevées, citons l'exemple du Brésil, de la nouvelle Zélande, de l'Inde, du Nigeria, du Cameroun...etc. En parallèle, les pays ayant une pluviométrie faible avec des ressources hydriques rares ont rapporté des valeurs assez faibles comme l'Algérie, l'Iran, la Turquie et la France. Ces ressources naturelles sont susceptibles de favoriser l'entretien de la leptospirose animale, dont l'agent étiologique semble inféodé aux rongeurs et/ou aux eaux stagnantes (étangs et lacs) contaminées par les urines de rongeurs infectés (Bharti et al., 2003 ; Levett, 2004).

Le lien entre l'eau des rivières et la leptospirose n'est pas une découverte récente. Après de fortes pluies ou des inondations, les sols sont lessivés et les leptospires pathogènes se trouvant sur ces sols sont transportés jusque dans les rivières situées en contrebas (Levett, 2001).

3 Le sérovar le plus prévalent chez le bovin en Algérie

Si on considère les 406 sérums testés, les sérovars de *Leptospira* les plus prévalents sont Patoc avec un taux de 32.75 %, suivi par les sérovars Icterohaemorrhagiae et Hardjo avec des taux de 7.14% et 6.89% respectivement. Le sérovar le moins prévalent a été Autumnalis avec uniquement 3 échantillons positifs (0,74%). Si on tient compte des 170 sérums positifs, à un ou plusieurs sérovars de *Leptospira*, le sérovar Patoc de l'espèce *Leptospira biflexa* reste toujours prédominant sur les huit sérovars testés, avec un taux de 78%. Les sérovars Icterohaemorrhagiae et Hardjo de *Leptospira interrogans* sont les plus dominants avec un pourcentage de 17% et 16% respectivement.

Selon la littérature, la leptospirose bovine est le plus souvent le résultat d'infection par le sérovar Hardjo. Cependant, l'infection peut être causée par une large variété de sérovars dans différentes régions dans le monde (Faine et al., 1999). Dans la présente étude, le sérovar Patoc était le plus répandu chez les bovins dans la région de Sétif. Ceci n'est étonnant, puisque ce sérovar a été déjà signalé précédemment dans plusieurs études réalisées au Brésil et en Thaïlande (Negrão et al., 1999 ; Aguiar et al., 2006 ; Yatbantoong et Chaiyarat, 2019). En effet, le sérovar Patoc appartient à l'espèce de *Leptospira biflexa* et est fréquemment utilisé dans les investigations sérologiques comme antigène spécifique au genre, en raison de ses réactions croisées avec des sérovars pathogènes qui pourraient être détectées plus tôt au cours de l'infection par un sérovar pathogène d'où son incidence élevée dans les études (Mauermann et al., 1993).

Nos résultats montrent aussi que les sérovars Icterohaemorrhagiae et Hardjo de l'espèce pathogène *Leptospira interrogans* sont les plus prévalents. La séroprévalence élevée de Hardjo chez les bovins pourrait être expliquée par le fait que les bovins soient les réservoirs de ce sérovar (Favero et al., 2017). En outre, la présence du sérovar Icterohaemorrhagiae est liée au contact des bovins avec différentes espèces animales, qui sont leurs réservoirs (Suepaul et al., 2011). Des études ont rapporté que le rat brun (*Rattus norvegicus*) agit comme un réservoir pour le sérovar Icterohaemorrhagiae (Hartskeert et Terpstra, 1996). En effet, notre enquête a montré que les élevages qui ont fait l'objet de notre étude étaient infestés massivement par des rongeurs. Il existe d'autres études qui ont obtenu le même résultat, à

savoir que le sérovar *Icterohaemorrhagiae* soit le plus prévalent chez les bovins (Suepaul et al., 2011).

Plusieurs études dans le monde ont été réalisées afin de déterminer le sérovar dominant responsable de la leptospirose bovine (fig. 41 ci-dessous). Les résultats ont montré que le sérovar Hardjo est rencontré principalement dans certains pays en Europe comme l'Irlande (Egan, 1986), le Royaume-Uni (Pritchard, 1986), le Portugal (Rocha, 1998), mais aussi en Afrique, comme le Nigéria (Ezeh et al., 1989), le Zimbabwe (Feresu, 1987), la Tanzanie (Machang'u et al., 1997) et en Asie, comme la Malaisie (Bahaman et al., 1997). Le sérovar *Icterohaemorrhagiae* a été signalé en Hollande (Hill et Weenink, 1976) et en Trinité-et-Tobago (Suepaul et al., 2011), le sérovar Pomona au Nord d'Espagne (Espí et al., 2000) et le Canada (Prescott et al., 1988), le sérovar *Grippotyphosa* au Nord de la Jordanie (El-Sukhon et al., 1992). Aux États-Unis, Hardjo est le sérovar le plus généralement isolé et sérologiquement détecté chez les bovins (Ellis et Thiermann, 1986 ; Miller et al., 1991).

Une étude effectuée au Maroc a montré que les sérovars Ballum, Hardjo ou encore Australis prédominaient par rapport aux autres (Benkirane et al., 2014). Récemment, une étude menée en Inde sur un total de 373 bovins issus de 45 fermes différentes, a montré que le sérovar Hardjo est le plus dominant avec une prévalence de 27.76% comparé à Canicola avec un taux de 17.49% et aux sérovars *Grippotyphosa* et Pomona avec un taux de 15.97% chacun. Enfin, vient ensuite avec des taux plus faibles, le sérovar *Icterohaemorrhagiae* (15.59%) et Australis (13.69%) (Balamurugan et al., 2018). Dans une autre étude réalisée au Texas, des sérums bovins se sont montrés séropositifs pour le sérovar Pomona (22%) et Hardjo (15%) (Talpada et al., 2003). Au Mexique, 54.1% de bovins étaient séropositifs pour le sérovar Hardjo, représentant 62.8% de tous les animaux séropositifs (Segura-Correa et al., 2003). Au Brésil, des anticorps leptospiraux contre le sérovar Hardjo ont été mis en évidence chez 46.9% de vaches adultes présentant une baisse de fertilité (Lilenbaum et Souza, 2003). En Australie, les deux sérovars Hardjo et Pomona ont été incriminés dans des avortements bovins, avec une incidence beaucoup plus élevée pour Hardjo (Slee et al., 1983 ; Jerrett et al., 1984 ; Elder et al., 1985). Hardjo a été le sérovar le plus fréquemment détecté (15.8%) dans des troupeaux de bovin du Queensland central (Black et al., 2001).

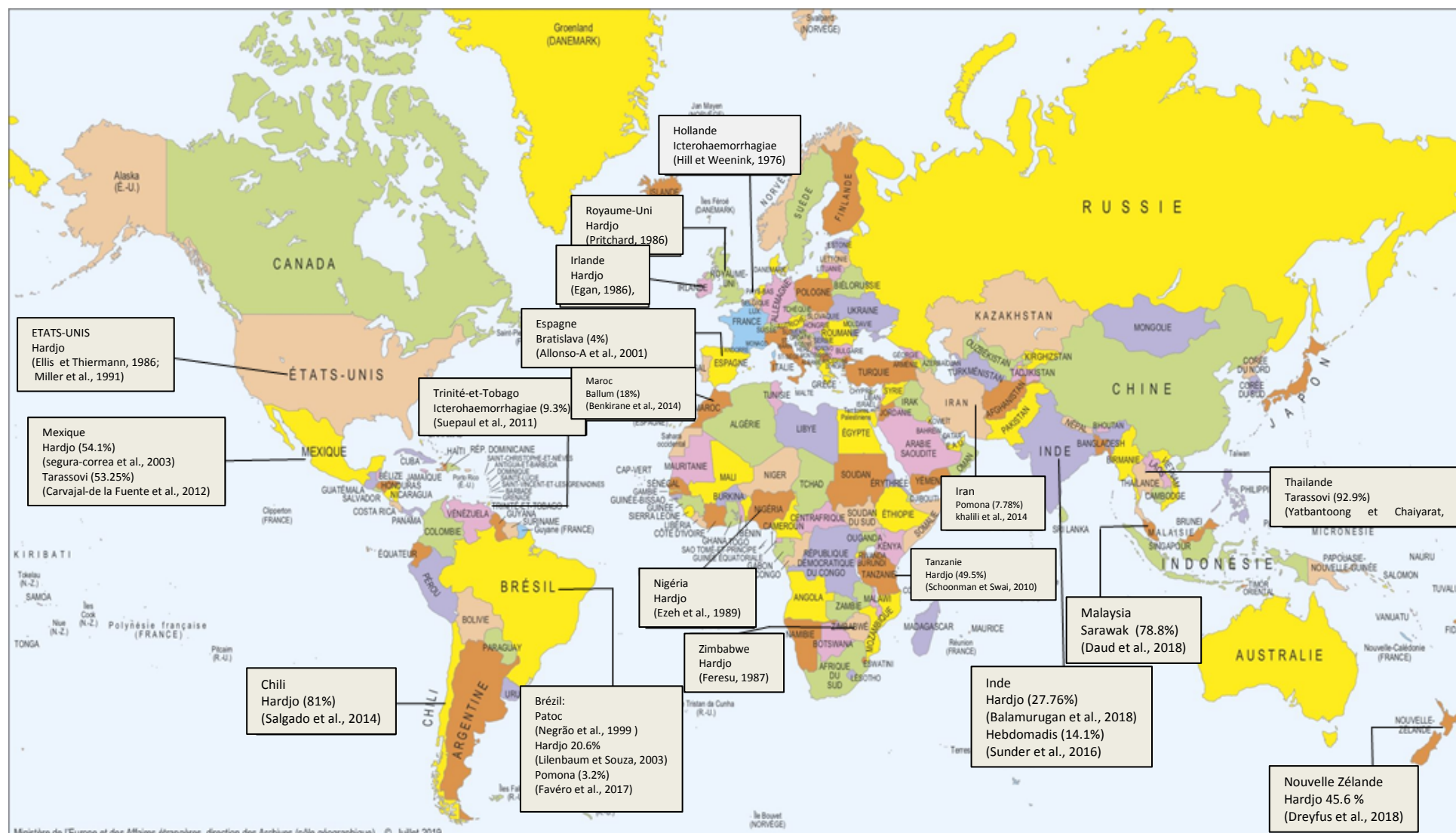


Figure 41: La distribution des sérovars dominants de *Leptospira* chez les bovins dans le monde.

Les résultats montrent d'une part, qu'un sérovar est souvent associé à une localisation géographique précise pouvant être expliqué par les conséquences des facteurs environnementaux. En général, le développement de l'infection leptospirale chez l'animal et la survie des leptospires pathogènes en dehors des hôtes exigent un environnement chaud et humide avec un pH proche du neutre (Miller et al., 1991). D'autre part, la résistance des leptospires dans le milieu extérieur peut être différente d'un sérovar à un autre (Legrand, 2007). En outre, le sérovar *Icterohaemorrhagiae* possède plusieurs espèces animales réservoirs principaux (Bharti et al., 2003). Dans les régions où le bovin cohabite avec les animaux réservoirs, le risque d'isoler le sérovar *Icterohaemorrhagiae* est plus élevé. Dans le même ordre d'idée, les rongeurs sont reconnus comme les réservoirs principaux pour le sérovar *Icterohaemorrhagiae* et par conséquent, une séroprévalence élevée de ce sérovar chez les bovins signifie une forte infestation de la région par les rongeurs (les bovins sont des hôtes accidentels).

Le titre en anticorps le plus fréquent était 1 :100 (60.17%), suivi par 1 :200 (23.24%) et le moins prévalent était 1:3200 (0.41%). Le sérovar *Icterohaemorrhagiae* a montré des titres en anticorps très élevés (1:3200) comparé aux autres sérovats.

Selon la littérature, lorsqu'on est en présence d'un sérovar réservoir, les titres en anticorps se montrent faibles mais persistent dans le temps. Le sérovar Hardjo présente des titres en anticorps les plus bas avec une dilution de 1 : 100 jusqu'à 58 à 60 jours post-infection (Ellis et Michna, 1977 ; Ellis et al., 1982). En revanche, lorsque les sérovats accidentels sont impliqués, des titres en anticorps très élevés sont obtenus jusqu'à des dilutions de 1 : 3200 (Faine, 1991; Ellis, 1994 ; Smith et al., 1994). Ce qui va dans le même sens que nos résultats avec des titres en anticorps très élevés (1:3200) pour le sérovar *Icterohaemorrhagiae*.

Les résultats de cette étude, sont en faveur d'une infection leptospirale à caractère endémique chez le bovin dans la région de Sétif. L'infection se manifeste généralement sous forme inapparente ou subclinique pour le sérovar Hardjo et aigue pour les sérovats accidentels comme *Icterohaemorrhagiae*.

Nos résultats ont montré 120 sérums positifs pour un seul sérovar et 50 sérums positifs pour plus d'un sérovar. En outre, 241 réactions positives contre différents sérovats de *Leptospira* ont été mises en évidence. Ce nombre important de vaches présentant une réaction positive pour un ou plusieurs sérovats, pourrait être expliqué par, soit la présence d'animaux infectés

par des sérovars mixtes, soit à une réaction sérologique croisée entre les sérovars et les sérogroupes de *Leptospira*. Ces réactions sont bien documentées, en particulier lorsqu'une réponse immunitaire précoce existe, car il est possible d'avoir des anticorps contre le sérovar infectant qui réagissent de manière croisée avec d'autres sérovars, bien qu'à un niveau bas (Scanziani et al., 2002 ; Levett, 2003). En plus, nous avons effectué des analyses sérologiques avec le sérovar Patoc, qui provoque des réactions croisées fréquentes avec les sérovars pathogènes de *Leptospira interrogans*. Ce qui explique en partie, le nombre élevé des sérums positifs contre plus d'un sérovar.

Des travaux similaires réalisés dans d'autres pays, rapportent des données différentes. En effet, en Iran, une étude menée par Abdollahpour et collaborateurs (2009), sur un échantillon de 205 sérums montre une séroprévalence de 25,8 % pour le sérovar Canicola (11,7 %), suivie du sérovar Pomona (9,45%), les sérovars les moins prévalents étaient Hardjo (1 %) et Icterohaemorrhagiae (0.5 %). Le titre en anticorps le plus fréquent était 1/100 et le plus élevé était de 1/400. L'étude a montré 14 sérums positifs pour plus d'un sérovar et 71 réactions positives vis-à-vis de différents sérovars de *L. interrogans* (Abdollahpour et al., 2009). Au Pakistan, Khurshaid et collaborateurs (2013), ont obtenu le taux le plus élevé avec le sérovar Pomona (25 %), suivi par Grippotyphosa (10 %), viennent ensuite les sérovars Canicola, Ballum et Icterohaemorrhagiae avec (8,33 %) chacun et enfin, le sérovar Hardjo a montré le taux le plus faible (3,33 %). Leur étude a aussi montré que la dilution de 1/100 était le titre en anticorps le plus fréquent et aucun sérum n'était positif pour plus d'un sérovar (Khurshaid et al., 2013).

4 Comparaison entre les différentes méthodes sérologiques pour la recherche des anticorps spécifiques de *L. interrogans* sérovar Hardjo

Dans ce travail, les performances des kits ELISA ont été évaluées en prenant comme test de référence le MAT pour la mise en évidence des anticorps spécifiques de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo.

Nous avons d'abord calculé pour le test ELISA, la sensibilité, la spécificité, l'exactitude, le coefficient kappa de Cohen, et le test de Mc Nemar par rapport au test MAT pris comme test de référence. Nous avons constaté que pour l'ELISA, la sensibilité était de 57.1%, la spécificité était de 98.4% et l'exactitude de 95.6%. Le calcul de la concordance entre les deux méthodes par l'utilisation du test de Kappa de Cohen a donné un coefficient $k=0,62$ ce qui correspond à un Accord satisfaisant de concordance entre les deux méthodes. Le résultat du

test Mc Nemar a montré un $p = 0.23$ ($p > 0.05$) ce que signifie que les deux méthodes donnaient des valeurs significativement non différentes. Au vue de cette concordance satisfaisante entre les deux tests on en conclu que l'ELISA peut se comporter comme le MAT et reste un bon moyen de dépistage de la leptospirose bovine causée par le sérovar Hardjo en absence du test MAT. Le manque de sensibilité est peut-être dû au fait que l'ELISA utilisé est basé sur un sonicat de leptospires pouvant entraîner la perte de certains épitopes, ou bien, il est basé sur uniquement du LPS purifié, alors que le MAT permet de détecter les anticorps dirigés aussi bien contre le LPS que contre d'autres antigènes de surface (le MAT utilise des leptospires entiers). Dans la même optique, le test MAT permet de détecter des anticorps de type IgM et IgG alors que le test ELISA ne détecte que les IgG d'où sa faible sensibilité comparé au test MAT.

Des travaux antérieurs ont comparé la technique ELISA avec le test MAT pris comme référence. Les résultats obtenus étaient assez similaires aux nôtres. Ainsi, en Inde Subathra et collaborateurs (2011) ont évalué et comparé le test ELISA avec le MAT sur des sérums de chiens et ont rapporté une sensibilité de 75,46% et une spécificité de 93,29%. Toujours en Inde, des évaluations et comparaisons entre les deux tests mais sur des sérums de bovins ont montré une sensibilité de 100% et une spécificité de 85,3% (Mariya et al., 2006), une sensibilité de 100% et une spécificité de 97,1% ont été obtenu dans une autre région d'Inde (Deneke et al., 2014). Sur des sérums de bovins, des travaux réalisés en Malaisie et au Brésil ont obtenu une sensibilité et une spécificité de 100% (El jalii, 2008 ; Bomfirm, 2005). En Iran, une sensibilité de 100% et une spécificité de 97,1% ont été obtenues (Sankar et al., 2010). Il est à signaler que plusieurs facteurs influencent sur les résultats de comparaison entre la technique ELISA et le test MAT, comme la taille d'échantillon, le kit ELISA utilisé (même laboratoire ou non, le type d'antigène utilisé...), le conditionnement du kit, le mode opératoire, l'opérateur, marque du lecteur d'ELISA...etc.

5 Étude des facteurs de risque

La connaissance des facteurs de risques susceptibles d'influencer positivement ou négativement la prévalence d'une maladie est nécessaire pour une bonne compréhension de son épidémiologie, ainsi que leurs implications en termes de stratégies de contrôle adaptées aux conditions locales.

Dans cette étude, nous avons donc analysé des facteurs de risque influençant la séropositivité vis-à-vis de *Leptospira* et *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo. Pour cela, une enquête

séroépidémiologique a été réalisée sur la base d'un questionnaire épidémiologique (annexe) rempli dans les 48 fermes étudiées de la région de Sétif et sur chaque individu prélevé.

5.1 Étude des facteurs de risque susceptible d'influencer la séropositivité vis-à-vis de *Leptospira* (résultats du test MAT)

Nous avons vérifié deux types de facteurs, ceux liés aux fermes (type d'élevage, type d'exploitation, taille de troupeau, contact avec les autres animaux, présence des chiens et la source d'eau) et ceux liés aux vaches prélevées (gestation, âge des vaches, la parité, race, et historique des avortements). L'étude statistique univariable par le test du Chi deux ou le test a montré une association significative entre le type d'exploitation ($P=0.007$), le contact avec les autres animaux ($P=0.00$) et la source d'eau ($P=0.01$) et la séropositivité vis-à-vis de *Leptospira*. Par ailleurs, nous avons révélé par la régression logistique multivariable que l'eau des rivières est moins incriminée dans la contamination des bovins par les leptospires que celle issue des puits et les mares (odds 0,51).

Si on tient compte du type d'exploitation, on a relevé durant notre enquête, le non respect des bonnes pratiques dans les salles de traites, lors du nettoyage de la litière, ce qui augmente le risque de transmission de la bactérie. Le contact avec les autres animaux de la ferme s'est révélé un facteur de risque très important pour les leptospires, vu la présence des sérovars accidentels non adaptés à une seule espèce animale, ce qui favorise la contamination croisée entre espèces animales sensibles. A titre d'exemple, bien que le chien constitue le réservoir principal du sérovar Canicola, le bovin pourrait aussi s'infecter lors d'un contact avec le chien.

La source d'eau s'est également révélée comme un facteur de risque en faveur d'une infection par *Leptospira*. En effet, les leptospires sont des bactéries hydro-telluriques (levett, 2001), l'eau contaminée est considérée comme voie principale de contamination par cette bactérie. Nous avons constaté que les bovins s'abreuvant des rivières est un facteur protecteur en comparant avec l'eau issue des puits et des mares. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les eaux stagnantes sont plus favorables à la survie du leptospire que les eaux non stagnantes d'où la prévalence élevée dans les fermes utilisant les puits et les mares comme source d'eau.

Des travaux antérieurs ont aussi prouvé statistiquement que la cohabitation des bovins avec d'autres espèces animales sauvages ou domestiques augmenterait le risque d'une infection par

Leptospira (Lilenbaum et Souza, 2003 ; Carvajal-de la Fuente et al., 2012 ; Schoonman et Swai, 2010 ; Favero et al., 2017).

En revanche, dans d'autres études évoquées dans la littérature, les facteurs tels la taille du troupeau, la race bovine ou encore l'âge de l'animal, se sont montrés statistiquement associés d'une façon significative à une infection par *Leptospira* (Schoonman et Swai, 2010 ; Suepaul et al., 201 ; Carvajal-de la Fuente et al., 2012 ; Salgado et al., 2014 ; Dreyfus et al., en 2018)

5.2 Étude des facteurs de risque associés à une infection par *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo utilisant le test ELISA

Cette étude, basée sur les résultats de l'étude de la séroprévalence par la technique ELISA Indirect, nous a permis d'identifier les facteurs de risque qui semblent augmenter le risque de la séropositivité vis-à-vis vis-à-vis de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo.

L'analyse statistique univariable et multivariable sur l'ensemble des facteurs testés liés à la vache prélevée (la gestation, l'âge, l'état corporel, la race et l'historique des avortements) ou bien à l'exploitation bovine (le type d'exploitation, le type d'élevage et la taille du troupeau) a fait ressortir que la taille du troupeau, l'âge des vaches et le type d'élevage étaient globalement favorables significativement à une infection par *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo.

La séropositivité vis-à-vis du sérovar Hardjo augmentait significativement avec la taille du troupeau (OR de 13 pour une taille >20). Une grande partie des travaux de la littérature indiquent que la taille de troupeau influence positivement la séropositivité vis-à-vis de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo (Tabatabaeizadeh et al., 2011 ; Dos Santos et al., 2012 ; Ryan et al., 2012 ; Parvez et al., 2014). Cela pourrait s'expliquer par une grande difficulté dans le contrôle des mesures d'hygiène au niveau des fermes de grande taille comparées aux petites, mais aussi à l'infection qui se propage très vite dans les exploitations surpeuplées (Parvez et al., 2014).

Cette étude a montré que les vaches avec la catégorie d'âge située entre 3 à 6 ans sont les plus touchées par Hardjo (OR de 9). Ce constat corrobore ceux d'autres recherches qui trouvent que l'âge des animaux constitue un facteur de risque potentiel influençant la séropositivité vis-à-vis de *Leptospira interrogans* sérovars Hardjo, montrant que les jeunes animaux semblent plus infectés par la bactérie que les plus âgés (Ryan et al., 2012 ; Mazeri et al., 2013 ; et Suepaul et al., 2013 ; Ijaz et al., 2018). D'autre part, l'analyse de régression logistique

multivariable a montré que le système semi-intensif est moins exposé à l'infection par *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo (OR de 0,2) comparé au système intensif. Ceci peut être expliqué par l'infestation massive des fermes appartenant au système intensif par les rongeurs (réservoirs majeurs de la leptospirose) ainsi que d'un mauvais stockage des aliments (accès des rongeurs à la nourriture du bétail). Récemment, une étude menée par Ismail et al (2019) a montré au contraire, que le système semi-intensif était 11 fois plus exposé à la leptospirose que le système intensif. Ceci a été interprété par une possible infection dans l'environnement, puisque l'étude a concerné les facteurs favorisant l'apparition d'une infection par les sérovars Hardjo et Pomona de *Leptospira*. Or, il est connu que le réservoir principal du sérovar Pomona est le sanglier, d'où le risque est plus élevé d'une contamination dans l'environnement de l'animal.

Contrairement à nos résultats, des études ont montré que d'autres facteurs semblaient influencer significativement la séroprévalence vis-à-vis de *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo. A titre d'exemple, la séropositivité a varié de façon statistiquement significative en fonction de la race (Thiermann, 1984 ; Ngbede et al., 2013), de la saison (Rautureau, 2003 ; Legrand, 2007) ou encore de la gestation et du stade de lactation (Parvez et al., 2015). Récemment, une étude menée en Inde a montré que les vaches présentant des antécédents d'avortement et d'infertilité constituaient un risque associé à la leptospirose bovine (Lata et al., 2019).

6 Étude épidémiologique de type cas-témoin : Avortements et séropositivité vis-à-vis de *L. interrogans* sérovar Hardjo

Afin de vérifier si *L. interrogans* sérovar Hardjo était une cause d'avortement chez la vache, nous avons réalisé une étude cas-témoin avec comme facteur d'exposition la séroprévalence vis-à-vis de *L. interrogans* sérovar Hardjo.

Un total de 48 fermes de la région de Sétif a été étudié. Sur la base d'un questionnaire épidémiologique les fermes étaient séparées en fermes témoins et en fermes cas. Les fermes cas sont celles où des épisodes d'avortements étaient survenus dans les 5 dernières années, phénomène non constaté dans les fermes témoins.

Utilisant ce critère, 25 fermes cas et 23 fermes témoins ont été définies. Les sérums d'un total de 406 bovins (232 des fermes cas et 174 des fermes témoins) ont été prélevés et analysés

pour la détection d'anticorps spécifiques de *L. interrogans* sérovar Hardjo. Une ferme était considérée comme positive si au moins une vache était séropositive.

L'étude cas-témoin a été évaluée en tenant compte des résultats du test MAT et du test ELISA. Nous avons analysé la situation sur le plan exploitation et au niveau individuel.

Si on tient compte des résultats obtenus par les deux tests sérologiques, on constate que, sur le plan exploitation, l'étude cas témoin a fait ressortir des OR de 1.89 (IC 95% 0.83- 5.41) et de 2.4 (IC 95% 0.67-8.57) par les tests du MAT et ELISA respectivement, ce qui signifie qu'il n'y a pas d'association significative ($p>0,05$) entre la séropositivité à *L. interrogans* sérovar Hardjo et la présence d'avortements dans les fermes dans la région de Sétif. Ce résultat peut être interprété d'une part, par le faible échantillon de fermes participant à cette étude (pour une prévalence de 10% et un RR de 4, un échantillon de 86 fermes est recommandé) et d'autre part, par le fait que le rapport correspondant à 1 ferme cas/3 fermes témoins ne soit pas respecté (Toma et al., 2001)

Au niveau individuel, parmi les 406 sérums analysés, 28 se sont montrés positifs en MAT soit une séroprévalence globale de 6.89 %. Parmi les 28 positifs, 14 (6.03%) appartenaient à des fermes cas et 14 (8,05%) provenaient des fermes témoins. Le calcul de l'odds ratio a montré une valeur de 0,73 (IC 95% 0.34-1.85) avec un taux d'exposition de 6.03% pour les fermes cas et de 8,05% dans les fermes témoins. Cette différence n'est pas significative ($P= 0.43$). Ce qui signifie que nous n'avons pas relevé d'association entre la séroprévalence à *L. interrogans* sérovar Hardjo et les vaches ayant avorté dans la région de Sétif. Le même constat a été obtenu en tenant compte des résultats du test ELISA. En effet, parmi les 22 positifs obtenus pour *L. interrogans* sérovar Hardjo, 14 (6.03%) appartenaient à des fermes cas et 8 (4,60%) provenaient des fermes témoins. L'odds ratio était de 1.33 (IC 95% 0.55-3.25) avec un taux d'exposition de 6.03% pour les fermes cas et de 4,60% dans les fermes témoins. Cette différence ne s'est pas montrée significative sur le plan statistique ($P= 0.53$). Ce constat est en défaveur encore une fois d'une relation étroite entre la séropositivité vis-à-vis de *L. interrogans* sérovar Hardjo et les vaches ayant avorté dans la région de Sétif.

Ce type de conclusion rejoint celui d'autres études, suggérant l'absence de relation entre *L. interrogans* sérovar Hardjo et les avortements (Carter et al., 1982 ; Bartels et al., 1999 ; Davison et al., 1999 ; Guitian et al., 1999).

En revanche, récemment, une étude menée dans la région d'Alger portant sur les principales causes d'avortement d'origine infectieuse chez la vache a plutôt montré l'existence d'une relation étroite entre la séropositivité vis-à-vis de *L. interrogans* sérovar Hardjo et la présence d'avortements dans des exploitations bovines avec un odds ratio de 9.44, un taux d'exposition de 12.2% pour les fermes cas et de 1.4% pour les fermes témoins (Derdour et al., 2017). Aussi, Sanhueza et collaborateurs (2013) ont montré un effet direct de *L. interrogans* sérovar Hardjo sur les avortements mettant en évidence ainsi, une étroite relation entre les avortements et *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo (Ellis et Michna, 1977 ; Thiermann, 1983).

Conclusion

et

Recommandatoins

Conclusion et recommandations :

Ce document a fourni de nouvelles informations intéressantes sur la leptospirose, une zoonose émergente, négligée chez les bovins en Algérie. Ce travail constitue la première étude d'envergure sur la séroprévalence et l'étude des facteurs de risque vis-à-vis de *Leptospira spp.* chez le bovin en Algérie. L'étude a porté essentiellement sur la Wilaya de Sétif.

L'étude de la séroprévalence chez le bovin a montré un taux global de 41.87% pour *Leptospira. Spp.* tout sérovar confondu (8 sérovars testés), 89.58% des fermes visitées sont positives. Les sérovars les plus prévalents étaient Patoc (32.75 %) pour l'espèce *Leptospira biflexa* suivi des autres sérovars de *Leptospira interrogans* : Icterohaemorrhagiae (7.14%) et Hardjo (6.89%). Le sérovar le moins prévalent était Autumnalis avec seulement 3 échantillons positifs (0,74%).

Notre étude a montré que le kit ELISA PrioCheck présente une sensibilité de 57.1%, une spécificité de 98.4% et une exactitude de 95.6%. Ainsi, le test MAT reste l'outil sérologique de référence dans le diagnostic d'une infection par *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo.

L'analyse des facteurs de risque a montré que les bovins qui s'abreuvent des rivières ont un risque d'exposition plus faible à *Leptospira spp.* que ceux qui s'abreuvent des puits et des mares (OR 0,51 IC 95% 0,32-0,82%), les animaux dont la tranche d'âge comprise entre 3 et 6 ans sont les plus exposés (OR = 9,25 IC 95% 1,19-71,47%), et enfin, la taille du troupeau > 20 têtes (OR = 13,65 IC 95% 1,58-117,7%) et le système semi-intensif (OR = 0,21 IC 95% 0,06-0,82%) semblent avoir une association statistiquement significative avec la séropositivité à *Leptospira interrogans* sérovar Hardjo ($P < 0,05$).

L'étude cas-témoin a montré l'absence de lien significatif entre la séropositivité à *L. interrogans* sérovar Hardjo et les avortements présents dans les exploitations étudiées. Par ailleurs, nous n'avons pu démontrer une relation significative entre les vaches ayant avorté et leur séropositivité vis-à-vis de *L. interrogans* sérovar Hardjo.

Au terme de ce travail, il est important de souligner que les séroprévalences obtenues vis-à-vis des différents sérovars de *Leptospira* notamment le sérovar Hardjo, indiquent que ces derniers sont largement distribués dans la région de Sétif et sévissent probablement sous forme d'enzootie instable. Par conséquent, un programme de sensibilisation des éleveurs notamment aux différents facteurs de risque et aux mesures de préventions est indispensable.

Il est important aussi d'entrevoir une série d'études en perspectives visant à améliorer davantage les connaissances et les moyens de contrôle de la leptospirose bovine en Algérie.

Dans l'attente, il est primordial de recommander des mesures préventives pour la détection des individus positifs, réduire leur nombre, éviter la contamination des sujets sains et empêcher la contamination de l'homme en contact avec les animaux malades. A cet effet, nous proposons les mesures suivantes :

- Un dépistage très large doit être réalisé dans toutes les wilayas pour évaluer la prévalence réelle de la leptospirose bovine en Algérie. L'isolement serait d'un grand intérêt pour classer et répertorier les sérovars les plus fréquents en Algérie et identifier leurs caractéristiques génomiques et moléculaires.
- Établir des études plus approfondies pour déterminer la distribution de la bactérie chez toutes les espèces animales jouant le rôle de réservoirs et des enquêtes de séroprévalence doivent être entreprises pour estimer l'étendue et la distribution de l'infection et confirmer son impact sur le bétail.
- renforcer et développer son diagnostic dans les laboratoires humains et vétérinaires, ainsi qu'à travers l'introduction des méthodes de diagnostic rapides et faciles à mettre en œuvre telles que les techniques moléculaires, restent plus que jamais nécessaires, afin d'établir un diagnostic approprié et fournir un traitement efficace et précoce.
- Doter de moyens nécessaires de tous les acteurs qui interviennent dans la prophylaxie, en commençant par les services vétérinaires.
- Lors d'échanges internationaux, un dépistage sérologique est pratiqué par deux tests de microagglutination réalisés à trois semaines d'écart avec un titre seuil de positivité supérieur à 100.
- Il faut absolument isoler les malades (16 semaines) et procéder à l'abattage systématique de bovins infectés en l'absence d'alternatives (les animaux porteurs excréteurs).
- L'hygiène personnelle qui regroupe le port de gants et de bottes pour éviter le contact de la peau avec la boue et l'eau douce des lacs, l'utilisation de gants par les vétérinaires lors de sondage urinaire et enfin, elle consiste à limiter l'entrée de rongeurs par la construction de bâtiments, par la protection des aliments et l'élimination rationnelle des ordures.
- La décontamination du milieu extérieur. Elle comprend le nettoyage des sols souillés par les urines des rongeurs à l'aide d'un désinfectant iodé, le drainage des terrains

marécageux, des puits et des mares aux abords des locaux d'élevage et la lutte contre les rongeurs sauvages (dératisation et d'élimination des animaux nocifs).

- Le contrôle de l'infection chez les bovins. La vaccination des bovins se fait selon le protocole présenté dans la partie prophylaxie médicale de cette thèse.
- Le praticien devra penser à inclure dans son diagnostic différentiel les formes chroniques de leptospirose lors de troubles multifactoriels tels que les baisses de performances de reproduction (infertilité, avortement, naissance de fœtus mort-né...).

Cette étude limitée à la région de Sétif, se doit d'être étendue à l'avenir par d'autres travaux consacrés aux autres régions du pays afin de broser une image épidémiologique plus précise de la leptospirose bovine en Algérie et de mieux en mesurer le préjudice économique.

Références

Bibliographiques

Les références bibliographiques :

Abdollahpour G., Shafighi1T., Sattari Tabrizi1 S. Serodiagnosis of Leptospirosis in cattle in North of Iran, Gilan. *Int J Vet Res.* 2009. 3 (1), 7-10.

Abgueguen P et Pichard E. Leptospirosis. *Rev Prat.* 2009. 20, 59 (5), 665-73.

Adler B et Faine S. Host immunological mechanisms in the resistance of mice to leptospiral infections. *Infect Immun.* 1977. 17: 67–72.

Adler B. Leptospira and Leptospirosis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015. Vol 387, 239p.

Adler B., De La Pena Moctezuma A. Leptospira and Leptospirosis. *Veterinary Microbiology.* 2010. 140, (3-4), 287-296.

Adler B., Faine S., Christopher W.L. Chappel R.J. Development of an improved selective medium for isolation of leptospires from clinical material. *Vet. Microbiol.* 1986. 12(4), 377-381.

Adler B., Lo M., Seemann T., Murray G.L. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. *Veterinary Microbiology.* 2011. volume 153, 73-81.

Afiri M., Amara Khorba A., Ait Kaid D. Renal manifestations of leptospirosis: 88 cases. *Med Sante Trop.* 2013. 23(2), 234-235.

Agésilas, F., Monbrunt, A.,Combes, J.C., Llanas, B., Schlossmacher, P., Gauzère, B.A. Leptospiroses de l'enfant à l'île-de-la-Réunion: à propos de 16 cas. *Archives de pédiatrie.* 2005. 12, 1344-1348.

Aguiar D.M., Gennari S.M., Cavalcante G.T., Labruna M.B., Vasconcellos S.A., et al. Seroprevalence of Seroprevalence of *Leptospira* spp. in cattle from Monte Negro municipality, western Amazon. *Pesq. Vet. Bras.* 2006.26(2):102-104.

Ahmad, S. N., Shah, S., and Ahmad, F. M. H. Laboratory diagnosis of leptospirosis. *J Post Grad Med.* 2005. 51: 195-200.

Ahmed A., Engelberts M.F., Boer K.R., Ahmed N., Hartskeerl R.A. Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials. *PLoS ONE.* 2009. 4(9), e7093.

Ajaj E.A et AL-Farwachi M.I. Detection of Bovine Leptospirosis Using Different Conventional Laboratory Tests in Nineveh Province, Iraq. *Journal of Animal Health and Production.* 2013. 1(3): 32-35.

Alagninouwa T. et Becker C. Animaux de rente : La leptospirose ici et ailleurs. Communication lors du symposium sur la leptospirose au Campus vétérinaire de Vet Agro Sup à Marcy l'Etoile, le 5 avril 2012. 21-22.

Allen J.D., Meney C.L., Wilks C.R. Evaluation of hardjo-pomona vaccine to prevent leptospira in cattle exposed to a natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar hardjo Aust. *Vet. J.* 1982. 58, 93-96.

Alonso-Andicoberry C., Garcia-Pena F.G., Pereira-Bueno J., Costas E., Ortega-Mora L.M. Herd-level risk factors associated with leptospira spp. Seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain. *Preventive veterinary medicine*. 2001. 52, 109-117.

Alston J.M et Broom J.C. Leptospirosis in man and animals. E. S. 1958. Livingstone, Edinburgh.

Alt D.P et Bolin C. Preliminary evaluation of antimicrobial agents for treatment of *Leptospira interrogans* serovar infection in hamsters and swine. *Am. J. Vet. Res.* 1996. 57, 59-62.

Alt D.P., Zuerner R.L., Bolin C.A. Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2001. 219, (5), 636-639.

Anderson J.F., Miller D.A., Post J.E., Johnson R.C., Magnarelli L.A., Andreadis T.G. Isolation of *Leptospira interrogans* serovar grippotyphosa from the skin of a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1993. 203(11) 1550-1551.

Andre-Fontaine G et Ganiere J.P. Leptospirose canine. *Encycl. Vét. Médecine Générale*. ed Technique. 1992. Paris.1-7.

Andre-Fontaine G. Connaître les risques de transmission de la leptospirose à l'homme par les animaux de compagnie. *Le nouveau praticien vétérinaire, canine féline*, 2004, (18), 37-40.

Andre-Fontaine G. Leptospirose, in Principales maladies infectieuses et parasitisme du bétail, Europe et régions chaudes. *Maladies bactériennes, mycoses*, Lefevre P.C., Blancon J., Chermette R., Editors. 2003, édition Paris : TEC et DOC, 993-1005.

Andre-Fontaine G. Rapport d'activité diagnostique leptospirose 2001. ENV Nantes Unité de Bactériologie Médicale et Moléculaire des Leptospires. 2001. 8 p.

Andre-Fontaine G., Ganiere J.P., Boukerrou A. Données actuelles sur la leptospirose des animaux d'élevage : 1- étiologie, symptômes, épidémiologie. *Rev. Méd. Vét.* 1985. 136, 627-637.

Andre-Fontaine G., Ganiere J.P., Boukerrou A. Données actuelles sur la leptospirose des animaux d'élevage: 2- lutte, diagnostic, dépistage, prophylaxie. *Rev. Méd. Vét.* 1985b. 136, 693-700.

Andre-Fontaine G., Ganiere J.P., Quiniou M.A. Prévalence des anticorps antileptospirosiques chez les bovins en Loire-Atlantique: 1- Etude comparative dans des cheptels avec et sans antécédent abortif. *Rec. Méd. Vét.*, 1988, 164, 391-395.

Andre-Fontaine G., Lefur C., Bellin J., Robast C. Rapport d'activité diagnostique leptospirose 2005. ENV Nantes Unité de Bactériologie Médicale et Moléculaire des Leptospires, 2005, 11p.

Andre-Fontaine G., Lefur C., Bellin J., Rochereau S., Aviat F., Raveloarisoa S. Rapport d'activité diagnostique leptospirose 2006. ENV Nantes Unité de Bactériologie Médicale et Moléculaire des Leptospires, 2006, 11p.

Andre-Fontaine G., Ruvoen Clouet N. Rapport d'activité diagnostique leptospirose 1999.

ENV Nantes Unité de Bactériologie Médicale et Moléculaire des Leptospires, 1999, 7p.

Andre-Fontaine G., Ruvoen Clouet N., Suard I., Fillonneau C. Rapport d'activité diagnostique leptospirose 2000. ENV Nantes Unité de Bactériologie Médicale et Moléculaire des Leptospires, 2000, 8p.

Andre-Fontaine G., Suard I., Fillonneau C., Cherruau L. Rapport d'activité diagnostique leptospirose 2002. ENV Nantes Unité de Bactériologie Médicale et Moléculaire des Leptospires, 2002, 10p.

Andre-Fontaine G., Suard I., Lefur C. Rapport d'activité diagnostique leptospirose 2003. ENV Nantes Unité de Bactériologie Médicale et Moléculaire des Leptospires, 2003, 10p.

antibodies among dairy-cattle kept in communal corrals in periurban areas of Bamako, Mali, West Africa. *Prev Vet Med.* 1994. 18:259–65

Atherstone Christine., Kim Picazzi., Gladys Kalemay-Zikuzoka. Seroprevalence of leptospira Hardjo in cattle and African buffalos in southwestern Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 2014. 90 (2), 288-290.

Auran N.E., Johnson R.C., Ritzi D.M. Isolation of the outer sheath of *Leptospira* and its immunogenic properties in hamster. *Infect. Immun.*, 1972, 5(6), 968-975.

Aviat F., Man Sotte F., Blanchard B., Mondot P., Bolut P., Andre-Fontaine G. La leptospirose, zoonose de loisir et zoonose professionnelle: rôle des rongeurs et de l'eau. *Epidemiologic et Santé Animale.* 2004. 45, 55-60.

Bahaman A.R., Ibrahim A.L., Adam H. Serological prevalence of leptospiral infection in domestic animals in West Malaysia. *Epid. Infect.* 1987. 99, 379-392.

Bahari, A., Abdollahpour, G., Sadeghi-Nasab, A., et al. A serological survey on leptospirosis in aborted dairy cattle in industrial farms of Hamedan suburb, Iran. *Iranian J Vet Res.* 2011. 12: 337-339.

Balamurugan. V., Anusha, A., Patil, B. K., et al. Prevalence of *Leptospira* serogroup specific antibodies in cattle associated with reproductive problems in endemic states of India. *Trop Anim Hlth Prod.* 2018. 50 (5): 1131-1138.

Baldwin C.J et Atkins C.E. Leptospirosis in dogs. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.* 19879 (5), 499-507.

Banfi E., Cinco M., Bellini M., Soranzo M.R. The role of antibodies and serum complement in the interaction between macrophages and leptospires. *J. Gen. Microbiol.* 1982. 128:813-816.

Barbosa A.S., Abreu P.A., Vasconcellos S.A., Morais Z.M., Gonçalves A.P., Silva A.S., Daha M.R., Isaac L. Immune evasion of *Leptospira* species by acquisition of human complement regulator C4BP. *Infection and Immunity.* 2009. 77, 1137-1143.

Barnett J.K., Barnett D., Bolin C.A., Summers T.A., Wagar E.A., Cheville N.F. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect. Immun.* 1999. 67 (2), 853-861.

- Bartels C.J.M., Wouda W., Schukken Y.H.** Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology*. 1999. 52, 247-257.
- Barwick R.S., Mohammed H.O., Mc Donough P.L., White M.E.** Epidemiologic features of equine *Leptospira interrogans* of human significance. *Prev. Vet. Med.* 1998. 36, 153-165.
- Barwick R.S., Mohammed H.O., Mc Donough P.L., White M.E.** Risk factors associated with the likelihood of *Leptospira* séropositivity in horses in the state of New York. *Am. J. Vet. Res.* 1997. 58, 1097-1103.
- Benkirane, A., Noury, S., Hartskeerl, R. A., et al.** Preliminary Investigations on the Distribution of *Leptospira* Serovars in Domestic Animals in North-west Morocco. *Transbound Emerg Dis.* 2014. 63: 178-184.
- Bercovich Z., Taaijke R., Bokhout B.A.** Evaluation of an ELISA for the diagnosis of experimentally induced and naturally occurring *Leptospira Hardjo* infections in cattle. *Vet. Microbiol.* 1990. 21, 255-262.
- Berech P.** leptospires. Bactériologie médicale, 2eme ed., flammariion médecine sciences, 1989, chap49, 722-729.
- Berger E.** Contribution à l'étude des avortements d'origine infectieuse non brucellique chez les bovins: étude rétrospective dans les Groupements de Défense Sanitaire des Côtes d'Armor, de la Côte d'Or, de la Loire-Atlantique et de la Manche. (Thèse Méd. Vét), ENVA, 1999. N°46, 117 p.
- Bernard W.V.** Leptospirosis. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice. 1993. 9(2), 435-444
- Bernheimer A.W., Bey R.F.** Copurification of *Leptospira interrogans* serovar pomona hemolysin and sphingomyelinase C. *Infect Immun., American Society for Microbiology*. 1986. 54, (1), 262-264.
- Bharti A.R., Nally J.E., Ricaldi J.N., Matthias M.A., Diaz M.M., Lovett M.A., Levett P.N., Gilman R.H., Willig M.R., Gotuzzo E., Vinetz J.M.** Peru-united states leptospirosis consortium. Leptospirosis : a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 2003. 3(12), 757-771.
- Bielanski A., Surujballi O., Golsteyn Thomas E., Tanaka E.** Sanitary status of oocytes and embryos collected from heifers experimentally exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjobovis. *Anim. Reprod. Sci.* 1998. 54(2), 65-73.
- Bishop L., Strandberg J.d., Adams R.j., Brownstein D.g., Patterson R.** Chronic active hepatitis in dogs associated with leptospires. *Am. J. Vet. Res.* 1979. 40 (1), 839-844.
- Black P.F., Corney B.G., Smythe L.D., Dohnt M.F., Norris M.A., Symonds M.L.** Prevalence of antibodies of *Leptospira* serovars in beef cattle in central Queensland. *Aust. Vet. J.* 2001. 79, 344-348.
- Blackmore.** The magnitude and duration of titres of leptospiral agglutinins in human sera. *N Z Med J.* 1984. 97, 83-86.

- Blendon D.C et Goldberg H.S.** Silver impregnation stain for *Leptospira* and flagella. *J Bacteriol.* 1965. 89: 899-900.
- Boibieux A.** La leptospirose en pathologie humaine. Communication lors du symposium sur la leptospirose au Campus vétérinaire de VetAgro Sup à Marcy l'Etoile, le 5 avril 2012. 13.
- Bolin C. A.** Vaccination for leptospirosis: does it pay?. *Cattle Practice.* 2005. 4-5.
- Bolin C.A.** Diagnosis of leptospirosis: a re-emerging disease of companion animals. *Semin. Vet. Med. Surg.* 1996. 11, 166-171.
- Bolin C.A., Alt D.P., Zuerner R.L.** Protection of cattle from renal and genital tract colonization with *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. In: Proceedings of the 21st world buiatrics congress. 2000. Punte del Este, Uruguay.
- Bolin C.A., Zuerner R.L., Trueba G.** Comparison of three techniques to detect *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis in bovine urine. *Am. J. Vet. Res.* 1989, 50, 1001–1003.
- Bomfim Q.M.R., Albert Ko., Matilde Cota Koury.** Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Veterinary Microbiology.* 2005. 109, 89–94.
- Bontemps Marion.** La leptospirose humaine en exercice vétérinaire ; point actuel du risque. (Thèse Med Vét) ENVL. 2012. 122 p.
- Bourhy P. et Picardeau M.** Apport du laboratoire de référence dans le diagnostic de la leptospirose, communication lors du symposium sur la leptospirose au Campus vétérinaire de VetAgro Sup à Marcy l'Etoile, le 5 avril 2012, p 37.
- Bourhy P., Septfons A., Picardeau M.** Diagnostic, Surveillance et épidémiologie de la leptospirose en France. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire.* 2017. 8-9, 131-136.
- Brown K et Prescott J.** Leptospirosis in family dog: a public health perspective. *CMAJ.* 2008. 178 (4), 399-401.
- Brown P.D, Gravekamp C, Carrington D.G, Van De Kemp H, Hartskeerl R.A, Edwards C.N, Everard C.O.R, Terpstra W.J, Levett P.N.** Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis". *J Med Microbiol.* The Pathological Society of Great Britain and Ireland. 1995. volume 43, (2), 110-114.
- Brown P.D., Carrington D.G., Gravekamp C., van de Kemp H., Edwards C.N., Jones S.R., Prussia P.R., Garriques S., Terpastra W.J. Levett P.N.** Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. *Res. Microbiol.* 2003. 154(8), 581-586.
- Brugere-Picoux J.** La leptospirose. *Bull. Group. Tech. Vet.* 1994. (94-3-OV-158), 189-191.
- Campos, A. P., Miranda, D. F. H., Rodrigues, H. W. S., et al.** Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in cattle, sheep, and goats at consorted rearing from the State of Piauí, northeastern Brazil. *Trop Anim Hlth Prod.* 2017. 49: 899–907.
- Cannon, R. M. et Roe, R. T.** *Livestock Diseases Surveys, A Field Manual for Veterinarians,* Canberra: Australian Bureau of Animal Health, 1982.

Carter M.E., Cordes D.O., Holland J.T.S., Lewis S.F., Lake D.E. Leptospirosis II. Investigation of clinical disease in dairy cattle in the Waikato district of New Zealand. *NZ. Vet. J.* 1982. 30, 136–140.

Carvajal-de la Fuente V., Zapata-Campos C., Loredó-Osti J., López-Zavala R., Jasso-Obregón J.O., Martínez-Bautista E. Seroprevalence and Risk Factors associated with Leptospirosis (*L. interrogans*) in Bovine Cattle in Northeastern Mexico. *Thai J Vet Med.* 2012. 42(1): 7-12.

Cedric F. L'uveite equine leptospirosique: réalisation d'un de la prise en charge vétérinaire. Elaboration d'une étude sur la ponction d'humeur vitrée et la comparaison des diagnostics de laboratoire. (thèse Med Vét) ENVL, 2012. 147 p.

Cerqueira G.M., Picardeau M. A century of leptospira strain typing. *Infection Genetics and Evolution.* 2009. 9, 760-768.

Chang A., Faine S. Electron-microscopic evidence for reactions of axial filaments of *Leptospira* with IgM and IgG antibodies. *Bull. W. H. O.*, 1970, 43, 571-577.

Chiebao, D. P., Valadas, S. Y. O. B., Minervino, A. H. H., et al. Variables associated with infections of cattle by *Brucella abortus*, *Leptospira* spp. and *Neospora* spp. in Amazon region in Brazil. *Transbound Emerg Dis.* 2015. 62: 30-36.

Chierakul W., Tientadakul P., Suputtamongkol Y., Wuthiekanun V., Phimda K., Limpai boon R., Opartkiattikul N., White N.J., Peacock S.J., Day N.P. Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 2008. 46(2), 254-60.

Choy H A., Kelley M.M., Chen T.L., Moller A.K., Matsunaga J., Haake D.A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infect Immun, American Society for Microbiology.* 2007. 75, (5), 2441-2450.

Ciceroni L., Lombardo D., Pinto A., Ciarrocchi S., Simeoni J. Prevalence of antibodies to *Leptospira* serovars in sheep and goats in Alto Adige - South Tyrol. *J Vet Med B.* 2000. 47(3): 217-223.

Cinco M. Culture des leptospires. *Med. Mai. Inf.* 1981. 11(2), 57-59.

Cinco M., Vecile E., Murgia R., Dobrina P., Dobrina A. *Leptospira interrogans* and *Leptospira peptidoglycans* induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes. *FEMS Microbiol. Lett.* 1996. 138, 211-214.

Coghlan J.D et Bain A.D. Leptospirosis in Human Pregnancy followed by Death Foetus. *British Medical Journal.* 1969. (1), 228-230.

Coghlan J.D. Aspects cliniques et traitement des Leptospiroses. *Médecine et Maladies Infectieuses.* 1981. 11, (2), 114-118.

Colin M. La leptospirose du chien. *Action vet. ASV mag.* 2000. (36), 7-9.

Costa F., Hagan J.E., Calcagno J., Kane M., Torgerson P., Martinez-Silveira M.S., Stein C., Abela-Ridder B., Ko AI. Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015. 9 (9):e0003898.

- Coyne M.J., Burr J.H.H., Yule T.D., Harding M.J., Tresnan D.B., Mcgavin D.** Duration of immunity in dogs after vaccination or naturally acquired infection. *Vet. Rec.* 2001. 149 (17), 509-515.
- Cullen PA, Xu X, Matsunaga J, Sanchez Y, Ko AI, Haake DA, Adler B.** Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infect Immun.* 2005.73:4853–4863.
- Daoudal P., Langrenon C., Tiberghien E., Elcadit T., Delacour JL., Floriot C. Wagschal G.** Les leptospiroses : maladies d'actualités. *Sem. Hop.* 1997. 73(33,34), 1087-1092.
- Dassanayake D., Wimalaratna H., Agampodi S., Liyanapathirana V., Piyarathna T., Goonapienuwala B.L.** Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the Microscopic Agglutination Test: a validation study. *BMC Infect Dis.* 2009. 22, 9: 48.
- Daud A., Yaacob N.R., Azwany N et al.** Leptospirosis in Northeastern Malaysia: Misdiagnosed or Coinfection?. *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine and Public Health.* 2012. 4(7):1419-1427.
- Davison H.C., Otter A., Trees A.J.** Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. *Int. J. Parasitol.* 1999. 29, 1189–1194.
- De Vries S.G., Visser B.J., Nagel I.M., Goris M.G., Hartskeerl R.A., Grobusch M.P.** Leptospirosis in Sub-Saharan Africa : a systematic review. *Int J Infect Dis.* 2014. 28: e47201e64.
- Dehkordi F.S. et Taghizadeh F.** Prevalence and some risk factors associated with brucellosis and leptospirosis in aborted fetuses of ruminant species. *Res Opin Anim Vet Sci.* 2012. 2:275–281.
- Deneke Yosef., Sabarinath T., Neha Gogia., Lalsiamthara Jonathan., Viswas K.N., Chaudhur Pallab.** Evaluation of recombinant LigB antigen-based indirect ELISA and latex agglutination test for the serodiagnosis of bovine leptospirosis in India. *Molecular and Cellular Probes.* 2014. 1e 6.
- Denis F.** Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Masson, 2007. 573 p.
- Denis F., Ploy M.C., Martin C., Cattoir V.** Bactériologie médicales, techniques usuelles, 3ème édition, Elsevier masson. 2016. 600p.
- Derdour, S. Y., Hafsi, F., Azzag, N., et al.** Prevalence of the main infectious causes of abortion in dairy cattle in Algeria. *J Vet Res.* 2017. 61: 337–343.
- Dhaliwal G.S., Murray R.D., Ellis W.A.** Reproductive performance of dairy herds infected with *Leptospira interrogans* serovar hardjo relative to the year of diagnosis. *Vet. Rec.* 1996. 138 (12), 272-276.
- Dikken H.** diagnostic direct des leptospires humaines. *Médecine maladies infectieuses.* 1981. 11 (2), 95-99.
- Djelouadji Z., Roux V., Raoult D., Kodjo A., Drancourt M.** le diagnostic moléculaire des infections leptospirosiques. Communication lors du symposium sur la leptospirose au Campus

vétérinaire de VetAgro Sup à Marcy l'Etoile, le 5 avril 2012, 39.

Donahue J.M., Smith B.J., Poonacha K.B., Donahoe J.K., Rigsby C.L. Prevalence and serovars of leptospira involved in equine abortions in central Kentucky during the 1991-1993 foaling seasons. *J Vet Diagn Invest.* 1995. 7(1): 87-91

Dos-Santos, J. P., Lima-Ribeiro, A. M., Oliveira, P. R., et al. Seroprevalence and risk factors for leptospirosis in goats in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Trop Anim Hlth Prod.* 2012. 44: 101-106.

Dreyfus, A., Wilson, P. Benschop, J., et al. Seroprevalence and herd-level risk factors for seroprevalence of *Leptospira* spp. in sheep, beef cattle and deer in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal.* 2018. 66 (6): 1-27.

Drugeot T. Diagnostic sérologique de la leptospirose bovine: étude expérimentale d'une microagglutination simple à l'aide d'une souche vivante de *Leptospira biflexa*. (Thèse Méd. Vét) ENVN. 1988. N°74, 51 p.

Eaglesome M.D et Garcia M.M. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Rev. Sci. Tech.* 1997. 16 (1), 215-25.

Egan J. *Leptospira interrogans* serovar hardjo in the Republic of Ireland. In : Ellis W.A. et Little T.W.A (ed.) : Present state of leptospirosis diagnosis and control. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands. 1986. 211.

El Jalii I.M. Comparison between ELISA and the Microscopic Agglutination Test for the Diagnosis of Bovine Leptospirosis. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.* 2008. 61 (2) 73-75.

Elder J.K., Pepper P.M., Hill M.W.M., Ward W.H. The significance of leptospiral titers associated with bovine abortion. *Aust. Vet. J.* 1985. 62, 258-262.

Ellinghausen H.C. McCullough W.G. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes : fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am. J. Vet. Res.* 1965. 26, 45-51.

Ellis W.A. et Michna S.W. Bovine leptospirosis: experimental infection of pregnant heifers with a strain belonging to hebdomadis serogroup. *Res. Vet. Sci.* 1977. 22, 229–236.

Ellis W.A. et Thiermann A.B. Isolation of leptospire from the genital tracts of Iowa cows. *Am. J. Vet. Res.* 1986. 47, 1694-1696.

Ellis W.A. Leptospirosis as a cause of reproductive failure. *Vet. Clinic North Am: food animal practice.* 1994. 10, 463-478.

Ellis W.A. Leptospirosis. In: OIE, manual of standards, ed. OIE, Paris. 1992. 186-196.

Ellis W.A. Leptospirosis; a review of veterinary aspects. *Ir Vet News.* 1990. 12:6–12.

Ellis W.A., Bryson D.G., Neill S.D., McParland P.J., Malone F.E. Possible involvement of leptospire in abortion, stillbirths and neonatal deaths in sheep. *Vet Rec.* 1983. 112:291–293.

Ellis W.A., O'Brien J.J., Cassells J.A., Neill S.D., Hanna J. Excretion of *Leptospira interrogans* serovar hardjo following calving or abortion. *Res Vet Sci.* 1985. 39:296–298.

- Ellis, W. A.** Manifestations cliniques des leptospiroses chez le bétail. *Méd Mal Infect.* 1981. 11: 84-85.
- El-Sukhon S.N., Abo-Shehada M.N., Abuharfiel N., Atmeh R.F.** Prevalence of leptospiral antibodies in cattle in Northern Jordan. *Trop. Anim. Health Prod.* 1992. 24, 127-128.
- Espi A., Prieto J.M., Fernandez M., Alvarez M.** Serological prevalence to six leptospiral serovars in cattle in Asturias (Northern Spain). *Epid. Infect.* 2000. 124, 599-602.
- Esseveld H et Collier W.A.** Leptospirosis of cats in Java. *Veterinary Bulletin.* 1940. 9, 462.
- Ettinger S.J et Feldman E.C.** Textbook of veterinary internal medicine 6th edition. 2009. 616-618.
- Evangelista K.V et Coburn J.** Leptospira as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 2010. 5:1413–1425.
- Everard C.O., Bennett S.** Persistence of leptospiral agglutinins in Trinidadian survey subjects. *Eur J Epidemiol.* 1990. 6, 40-44.
- Everard C.O., Carrington D.G., Korver H., Burke R., Everard J.D., Gravekamp C.** Leptospire in the whistling frog (*Eleutherodactylus johnstonei*) on Barbados. *J Trop Med Hyg.* 1990. 93(2), 140-5.
- Everard J.D., Everard C.O.R.** Leptospirosis in the Caribbean. Reviews in Medical Microbiology. 1993. 4, 114-122.
- Ezeh A.O., Addo P.B., Adesiyun A.A., Bello C.S.S., Makinde A.A.** Serological prevalence of bovine leptospirosis in Plateau State, Nigeria. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 1989. 42, 505-508.
- Faine S. et Stallman N.D.** Amended descriptions of the genus *Leptospira* Noguchi 1917 and the Species *L. interrogans* (Stimson 1907) Wenyon 1926 and *L. biflexa* (Wolbach and Binger 1914) Noguchi 1918. International Journal of Systematic Bacteriology, 1982, 32 (4), 461-463.
- Faine S., Adler B., Bolin C., Perolat P.** *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne, Australia: MediSci, 1999, 296.
- Faine S., Adler. B., Bolin C., Pérolat P.** *Leptospira* and leptospirosis, Melbourne, Australia. MedScience. 1999. 272 p.
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C., et al.** *Leptospira* and Leptospirosis, Med Sci, Melbourne, Australia, 2nd ed, 2000.
- Fasquel, J.** Étude rétrospective des leptospiroses diagnostiquées au CHU de Rouen entre 1995 et 2012. (Thèse de doctorat). Université de Rouen UFR de Médecine et de Pharmacie, Rouen, 2014. 130p.
- Favero, J., de Araújo, H. L., Lilenbaum, W., et al.** Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. *Microbial. Pathogenesis.* 2017. 107: 149 -154.
- Feresu S.B.** Serological survey of leptospiral antibodies in cattle in Zimbabwe. *Trop. Anim. Health Prod.* 1987. 19, 209-214.

Fisher R.S.B et Somarriba, B.F. Challenge to diagnosing leptospirosis in endemic regions require urgent attention. *Cur Trop Med Repts.* 2017. 4, 57-61.

Fraga T.R., Barbosa A.S., Isaac L. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement SystemScand. *J Immunol.* 2011. 73(5), 408-19.

Fraga T.R., Courrol Ddos S., Castiblanco-Valencia M.M., Hirata I.Y., Vasconcellos S.A., Juliano L., Barbosa A.S., Isaac L. Immune Evasion by Pathogenic Leptospira Strains: The Secretion of Proteases That Directly Cleave Complement Proteins. *The Journal of Infectious Diseases.* 2014. 209 (6), 876-886.

Gaumont R. La leptospirose chez le bétail en Europe. *Rev. sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1983. 2 (1), 57-63.

Gillespie S., Hawkey P.M. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. John Wiley et Sons. 2006. 620 p.

Gitton X., André-Fantaine G., Andre F., Ganiere J.P. Immunoblotting study of the antigenic relationships among eight serogroups of leptospira. *Vet Microbial.* 1992. 32(34), 293-303.

Goldstein R.E. Canine Leptospirosis. *Vet Clin Small Anim.* 2010. (40), 1091-1101.

Gonzalez-Astudillo V., Bustamante-Rengifo J.A., Bonilla Á., Lehmicke A.J.J., Castillo A., Astudillo-Hernández M. Synanthropic Cockroaches (Blattidae: Periplaneta spp.) Harbor Pathogenic Leptospira in Colombia. *J Med Entomol.* 2015. tjbv172.

Gotti T.B. Desenvolvimento de um teste dipstick para o diagnóstico de leptospirose animal. (Thèse de doctorat). Université de São Paulo, 2015. 38p.

Gravekamp C., Van de Kemp H., Franzen M., Carrington D., Schoone G.J., Van Eys G.J., Everard C.O., Hartskeerl R.A., Terpstra W.J. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.* 1993. 139(8), 1691-1700.

Greene C.E. Leptospirosis In : Infectious diseases of dog and cat, GREENE CE Editor, Fourth Edition, Elsevier Saunders, St Louis, Missouri, 2012. 431-447.

Greenlee J.J., Alt D.P., Bolin C.A., Zuerner R.L., Andreasen C.B. Experimental canine leptospirosis caused by Leptospira interrogans serovars pomona and bratislava. *Am J Vet Res.* 2005. 66 (10). 1816-1822.

Grooms D.L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. *Theriogenology*, 2006, 66, 624-628.

Guerra M.A. Leptospirosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 2009. 234, 472-478.

Guerreiro H., Croda J., Flannery B., Mazel M., Matsunaga J., Reis Mg. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infect. Immun.* 2000. 69 (8), 4958-4968.

Guitian F.J., García-Peña F.J., Oliveira J., Sanjuán M.L., Yus E. Serological study of the frequency of leptospiral infections among dairy cows in farms with suboptimal reproductive efficiency in Galicia, Spain. *Vet Microbiol.* 2001, 80 (3), 275-84.

Guitian J., Thurmond M.C., Hietala S.K. Infertility and abortion among first lactation dairy cows seropositive or seronegative for *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1999. 215, 515-518.

Haake Da., Chao G., Zuerner R.L., Barnett J.K., Barnett D., Mazel M. et al. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infect. Immun.* 2000. 68 (4), 2276-2285.

Haddad N., Toma B., et al. Leptospirose. Les zoonoses infectieuses, Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises, Merial (Lyon). 2008. 55-59.

Hargi M et Belahsen R. Diagnostic de la leptospirose humaine: Méthodes de détection de la maladie. *Les Technologies de laboratoire.* 2011. 6, N°24, 75-81.

Harkin K.R., Roshto Y.M., Sullivan J.T., Purvis T.J. Chengappa M.M. Comparison of polymerase chain reaction assay, bacteriologic culture, and serologic testing in assessment of prevalence of urinary shedding of leptospires in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2003. 222(9), 1230-1233.

Hartman, E. G., Van den Ingh T. S., Rothuizen J. Clinical, Pathological and Serological Features of Spontaneous Canine Leptospirosis. An Evaluation of the IgM and IgG-Specific ELISA. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 1986. 13(3), 261-271.

Hartskeert R.A. et Terpstra W.J. Leptospirosis in wild animals. Supplement 3 of *Vet. Q.* 1996. 18/S3, S159-S160.

Hathaway S.C., Little T.W.A., Stevens A.E. Serological survey of leptospiral antibodies in sheep from England and Wales. *Vet. Rec.* 1982. 110, 99-101.

Hazart G, Hugonnard M, Kodjo A, Groud K, Goy-Thollot I. La leptospirose canine en France: étude rétrospective de 37 cas. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie.* 2010. 45, (2), 59-64.

Heath S.E. et Johnson R. Leptospirosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1994. 205 (11), 1518-1523.

Heath Se. et Johnson R. Leptospirosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1994. 205 (11), 1518-1523.

Heinemann M.B., Garcia J.F., Nunes C.M., Morais Z.M., Gregori F., Cortez A. Detection of leptospires in bovine semen by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.* 1999. 77(1), 32-34.

Hernández-Rodríguez P., César A. D., Ernesto A. D., Gladys M.Q.A. comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines. *Journal of Microbiological Methods.* 2011. 84, 1-7.

Hesterberg U.W., Bagnall R., Bosch B., Perrett K., Horner R., Gummow B. A serological survey of leptospirosis in cattle of rural communities in the province of KwaZulu-Natal, South Africa. *J S Afr Vet Assoc.* 2009. 80, 45-9.

- Hill W.K. et Weenink C.D.** Review of the incidence of antibodies to various serological groups of the species *Leptospira interrogans* in a number of farm animals in the Netherlands. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 1976. 101, 835-848.
- Hirsh D.C., MacLachlan N.J., Walker R.L.** Veterinary Microbiology. Paperback. 2004. 536p.
- Hochedez P.** Epidémiologie de la leptospirose aux Antilles Françaises: apports du diagnostic par biologie moléculaire dans l'étude des facteurs de risques, des facteurs pronostique et de l'incidence. (Thèse de doctorat). Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, 2015. 128p.
- Hogan P.M., Bernard W.V., Kazakevicius P.A., Fitzgerald M.R.** Acute renal disease due to *Leptospira interrogans* in a weaning. *Equine Vet J.* 1996. 28(4), 331-333.
- Hoke D.E., Egan S., Gullen P.A., Adler B.** LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infect Immun.* 2008. 76(5), 2063-9.
- Holzapfel M.** Étude de la prévalence de la leptospirose chez le Chat à la réunion. (Thèse Méd. Vét) ENVL, 2014, 106p.
- Hookey J.V., Bryden J., Gatehouse L.** The use of 16S rDNA sequence analysis to investigate the phylogeny of Leptospiraceae and related spirochaetes. *J Gen Microbiol.* 1993. 139(11), 2585e90.
- Hosmer, D. W. et Lemeshow, S.** Applied logistic regression, John Wiley and Sons, 2nd ed, New York, 2000.
- Houpikian P., Perolat P., Baranton G., Brouqui P.** Leptospiroses. *Encycl Med Chir* (Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris). Maladies infectieuses, 2002, 8-039-Q-10, 14 p.
- Hovind-Hougen K.** Morphologie des leptospire. *Méd. Mal. Infect.*, 1981, 11(2), 60-70.
- Ido Y., Hoki R., Ito H., Wani H.** The rat as a carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent of Weil's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). *J Exp Med.* 1917. 26, 341-353.
- Ijaz. M., Farooqi, S. H., Aqib, A. I., et al.** Seroepidemiology of Bovine Leptospirosis and associated risk factors in a Flood Affected Zone of Pakistan. *Pak Vet J.* 2018. 38 (2): 179-183.
- Inada R., Ido Y., Hoki R., Kaneko R. et Ito H.** The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (*Spirochaetosis icterohaemorrhagica*). *J. Exp. Med.* 1916. 23(3), p: 377-402.
- IPA.** Rapport d'activités de l'Institut Pasteur D'Algerie, 2009.
- Ismail, Z. B., Abutarbush, S. M., Almajali, A., et al.** Seroprevalence and risk factors of *Leptospira* serovar Pomona and *Leptospira* serovar Hardjo infection in dairy cows in Jordan. *J Infect Dev Ctries.* 2019. 13 (6): 473-479.

- Isogai E., Isogai H., Kubota T., Fujii N., Hayashi S., Indoh T., Takagi S., Miura H., Kimura K.** Apoptosis of lymphocytes in mice administered lipopolysaccharide from *Leptospira interrogans*. *Vet. Med.* 1998. 45, 529-537.
- Jacobs J.W., Korver H., Terpstra W.J.** Leptospirosis in a poultry slaughterhouse. *Ned Tijdschr Geneesk.* 1986. 130(30), 1367-9.
- Jagun A.T, Ajayi O.L, Ilugbo M.O, Olugasa B.O, Kafer J, Schobesberger H.** Isolation and prevalence of pathogenic *Leptospira interrogans* in slaughtered cattle in two abattoirs in southwestern Nigeria. *Tribun EU.* 2011. (1):235-7.
- Jansen A et Schneider T.** Weil's disease in a rat owner. *The Lancet Infectious Diseases.* 2011. 11: 152.
- Jerrett I.V., Mcorist S., Waddington J., Browning J.W., Malecki J.C., Mccausland I.P.** Diagnostic studies of the fetus, placenta and maternal blood from 265 bovine abortions. *Cornell Vet.* 1984. 74, 8-20.
- Johnson R.C et Rogers P.** 5-Fluorouracil as a selective agent for growth of *Leptospirae*. *J. Bacteriol.* 1964. 87, 422-426.
- Johnson R.C. et Faine S.** *Leptospira*. In Krieg NR. and Holt J.G. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams et Wilkins. 1984. pp. 62-67.
- Johnson R.C. Harris V.G.** Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospirae. *J. Bacteriol.* 1967. 94(1), 27-31.
- Johnson R.C.** The biology of parasitic spirochetes. *Academic Press, New York.* 1976. 19, 209-210.
- Juif M.** Les zoonoses transmissibles du rat à l'homme: Conseils en officine. (Thèse de doctorat). Université Henri Poincaré- Nancy 1, 2011. 133p.
- Kang C.H., Nam Y.D., Chung W.H., Quan Z.X., Park Y.H., Park S.J., Desmone R., Wan X.F., Rhee S.K.** Relationship between genome similarity and DNA-DNA hybridization among closely related bacteria. *J Microbiol Biotechnol.* 2007. 17(6), 945-51.
- Katz A.R.** Quantitative Polymerase Chain Reaction: Filling the gap for Early Leptospirosis Diagnosis. *Clin Infect dis.* 2012. 54 (9), 1256-1258.
- Kenar B. et Ozdemir V.** The seroprevalence of leptospirosis in Anatolian buffaloes in Turkey. *Revue Méd. Vét.* 2013. 164, 6, 331-335.
- Khalili M., Sakhaee E, Aflatoonian M.R., Abdollahpour G., Tabrizi S.S., Damaneh E.M., Hossini-nasab S.** Seroprevalence of bovine leptospiral antibodies by microscopic agglutination test in Southeast of Iran. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014. 4(5): 354-357.
- Khurshaid Anwar., Naveed Khan., Muhammad Mujtaba.** Seroprevalence of leptospirosis in aborted dairy cattle in Peshawar district suburb, Khyber Pakhtunkhwa Pakistan. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 2013. 2(8), 73-78.
- Kiktenko V.S., Balashov N.G., Rodina V.N.** Leptospirosis infection through insemination of animal. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. and Immunol.* 1976. 20.

Kingscote B. Leptospirosis in Sheep in Western Canada. *Canadian Veterinary Journal*. 1985. 26, 164-168.

Kirkwood B. R. et Sterne J.A.C. Matched studies. In: *Essential medical statistics*, 2nd ed., pp. 214–223. Blackwell Science, Malden, MA.2003.

Klarenbeek A et Schuffner W.A.P. Het voorkomen van een afwijkend leptospira-ras in Nederland. *Ned. Tijdschr.Geneeskd.* 1933. 77, 4271-4276.

Klimpel G.R., Matthias M.A, Vinetz J.M. Leptospira interrogans Activation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Preferential Expansion of TCR $\gamma\delta$ + T Cells vs TCR $\alpha\beta$ + T Cells. *J. Immunol.* 2003.171, 1447–1455.

Ko A.I., Goarant C, Picardeau M. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009. 7(10), 736-747.

Kobayashi Y. Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. *Journal of infection and chemotherapy.* 2001.7(1), 10-15.

Kocabiyik A.L et Cetin C. Bovine leptospirosis in south Marmara region of Turkey: A serological survey. *Revue Méd. Vét.* 2004. 155, 12, 606-608.

Kososse-Vrain C. La leptospirose canine: revue bibliographique (Thèse Méd. Vét). ENVA. 2004. N°135, 150p 296-326.

Krishna V. Textbook of Pathology. Orient Blackswan. 2004. 1351 p.

Kuriakose M, Regi P, Joseph MR, Sugathan S, Sudha TN. Leptospirosis in a midland rural area of Kerala state. *Indian J Med Res.* 2008. 128: 307-312.

La Scola B., Bui L.T., Baranton G., Khamis A., Raoult D. Partial rpoB gene sequencing for identification of Leptospira species. *FEMS Microbiol Lett.* 2006. 263(2), 142-147.

Laidebeure Sylvie. Etude du role de la faune sauvage exogene (rongeurs, carnivores, oiseaux) dans la transmission de la leptospirose, la pseudotuberculose et la toxoplasmose aux animaux du parc zoologique de la palmyre (charente-maritime). (Thèse Méd. Vét) ENVA, 2004, 103 p.

Lamrani Alaoui G. La leptospirose ictero-hémorragique (a propos de 69 cas). These, Université sidi mohammed Ben Abdellah, faculte de medecine et de pharmacie Fes, 2008.156p.

Langston C. E et Heuter K. J. Leptospirosis A re-emerging zoonotic disease. *Vet Clin Small Anim.* 2003. 33, 791-807.

Lata J., Vinay K., Sameer C., Goutam R., Sukhadeo B.B. eroprevalence of leptospirosis in bovines of Chhattisgarh, India. *Res. J. Biotech.* 2019. Vol 14 (7) July.

Laurichesse, H., Gourdon F., Smits H.L., Abdoe T.H., Estavoyer J.M., Rebika H., Pouliquen P., Catalina P., Dubray C., Beytout J. Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae in healthy volunteers. *Clin Microbiol Infect.* 2007. 13(4), 395-403.

Lee H.S., Levine M., Guptill-Yoran C., Johnson A.J., von Kamecke P., Moore G.E. Regional and temporal variations of *Leptospira* seropositivity in dogs in the United States, 2000-2010. *J Vet Intern Med.* 2014. 28(3), 779-788.

Legkobyt T., David D.J., Lee-Robin S.H. Diagnostic biologique de la leptospirose – Texte court du Rapport d'évaluation technologique. HAS (Haute Autorité de Santé), Service évaluation des actes professionnels. 2011. 1-15.

Legrand E. La leptospirose bovine. (Thèse Méd. Vét) ENVA. 2007. 103p.

Leon L. L., Garcia R. C., Diaz C. O., Valdez R. B., Carmona C.C. A., Velazquez B. L. G. Prevalence of Leptospirosis in Dairy Cattle from Small Rural Production Units in Toluca Valley, State of Mexico. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2008. 1149, 292–295.

Leon V.L., Hermoso D.M.M, Garrido F. Incidence of abortions caused by leptospirosis in sheep and goats in Spain. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1987. 10:149–153.

Levett P.N. leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, 14, 2, 296-326.

Levett P.N. Leptospirosis : A forgotten zoonosis. *Clinical and Applied Immunology Reviews.* 2004. 4, 435-448.

Levett, P.N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. *Clin Infect Dis.* 2003. 36 : 447-452.

Lilenbaum W. et Souza G.N. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Research in Veterinary Science.* 2003. 75 (3), 249-251.

Lilenbaum W., Vargas R., Medeiros L., Cordeiro A.G., Cavalcanti A., Souza G.N., Richt Zenhain L., Vasconcellos S.A. Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil. *Research in Veterinary Science.* 2008. 84, 14-17.

Lilenbaum, W., Martins, G. Leptospirosis in cattle: a challenging scenario for the understanding of the epidemiology. *Transbound Emerg Dis.* 2014. 61: 63-68.

Lin Y.P., Mcdonough S.P., Sharma Y.,Chang Y.F. *Leptospira* immunoglobulin-like protein B (LigB) binding to the C-terminal fibrinogen a C domain inhibits fibrin clot formation, platelet adhesion and aggregation. *Mol Microbiol.* 2011. 79 (4), 1063-76.

Lindahl Elisabeth., Sofia Boqvist., Karin Artursson., Ulf Magnusson. A field-study on *Leptospira* seroprevalence in dairy cows in four geographical areas in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 2011. 53, 53.

Lindtner-Knific R., Vergles-Rataj A., Vlahović K., Zrimšek P., Dovč A. Prevalence of antibodies against *Leptospira* sp. in snakes, lizards and turtles in Slovenia. *Acta Vet Scand.* 2013. 55:65.

Machang'u R.S., Mgode G., Mpanduji D. Leptospirosis in animals and humans in selected areas of Tanzania. *Belg. J. Zool.* 1997. 127, 97-104.

MADR. Statistique agricole. 2015.

Margulis L. et Hinkle G. Large Symbiotic Spirochetes : Clevelandina, Cristispira, Diplocalyx, Hollandina and Pillotina. In Dworkin M., Falkow E., Rosenberg E, Schleifer K.H. Stackbrandt E. editors. The Prokaryotes, 7, Springer, New York, 2006. pp 971-982.

Mariya R., Pallab Chaudhary., Kumar A.A., Thangapandian E., Amutha R., Srivastava S.K. Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in ELISA for serodiagnosis of bovine Leptospirosis. *Comparative Immunology, Microbiology et Infectious Diseases*. 2006. 29, 269–277.

Marquez A., Djelouadji Z., Lattard V., Kodjo A. Overview of laboratory methods to diagnose Leptospirosis and to identify and to type leptospires. *Int Microbiol*. 2017. 20(4), 184-193.

Marrie T.J. Community-acquired Pneumonia. Springer Science and Business Media. 2001. 925 p.

Martins Gabriel., Bruno Penna., Walter Lilenbaum. Differences between seroreactivity to leptospirosis in dairy and beef cattle from the same herd in Rio de Janeiro, Brazil. *Trop Anim Health Prod*. 2012. 44, 377–378.

Masri S.A., Nguyen P.T., Gale S.P., Howard C.J., Jung S.C. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. *Can J. Vet. Res*. 1997. 61(1), 15-20.

Mathon F. Les avortements à leptospire chez les bovins. (Thèse Méd Vét) ENVT, 1979. N°64, 55 p.

Mauermann U., Wiegand D., Manz D. Use of nonpathogenic *Leptospira* strains as diagnostic antigens for detection of *Leptospira* infection in cattle. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr*. 1993. 106:296-299.

Mazeri, S., Scolamacchia, F., Handel, I. G., et al. Risk factor analysis for antibodies to Brucella, *Leptospira* and *C. burnetii* among cattle in the Adamawa Region of Cameroon: a cross-sectional study. *Trop Anim Hlth Prod*. 2013. 45 (2): 617-623.

McGrath H., Adler B., Vinh T., Faine S. Phagocytosis of virulent and avirulent leptospires by guinea-pig and human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Pathology*. 1984. 16:243-249.

Mcguire TC, Musoke AJ, Kurtti T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology*. 1979. 38, 249–256.

Meri T., Murgia R., Stefanel P., Meri S., Cinco M. Regulation of complement activation at the C3-level by serum resistant leptospires. *Microbial Pathogenesis*. 2005. 39, 139-147.

Merien F et Berlioz-Arthaud A. La leptospirose: une zoonose sous surveillance en nouvelle-caledonie et dans le pacifique. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2005. (374), 45-50.

Merien F., Amouriaux P., Perolat P., Baranton G., Saint Girons I. Polymerase Chain Reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol*. 1992. 30(9), 2219-2224.

Mgode G.F., Mhamphi G.G., Katkweba A.S., Thomas M. *Leptospira* infections in

freshwater fish in Morogoro Tanzania: a hidden public health threat. *Tanzan J Health Res.* 2014. 16(2), 112-7.

Michel V., Ruvoen-Clouet N., Menard A., Scarier C., Fillonneau C., Rakotovao F., Gan 1ere Jp., Andre-Fontaine G. Role of the coypu (*Myocastor coypus*) in the epidemiology of leptospirosis in domestic animals and humans in France. *Eur J Epidemiol.* 2001. 17(2), 111-21.

Miller D.A., Wilson M.A., Beran G.W. Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States. *Am. J. Vet. Res.* 1991. 52, 1761-1765.

Millet A.S. La leptospirose du chien. *Pratique Médicale and Chirurgicale de l'Animal de Compagnie.* 1998. 33, 19-23.

Miyahara S., Saito M., Kanemaru T., Villanueva S.Y., Gloriani N.G., Yoshida S. Destruction of the hepatocyte junction by intercellular invasion of *Leptospira* causes jaundice in a hamster model of Weil's disease. *Int J Exp Pathol.* 2014. 95(4), 271-81.

Miyama, T., Watanabe, E., Ogata, Y., et al. Herd- level risk factors associated with *Leptospira* Hardjo infection in dairy herds in the southern Tohoku, Japan. *Prev Vet Med.* 2018. 149:15–20.

Moch R.W., Ebner E.E., Barsoum L.S., Botros B.A. Leptospirosis in Ethiopia: a serological survey in domestic and wild animals. *J Trop Med Hyg.* 1975. 78:38–42.

Morey R.E., Galloway R.L., Bragg S.L., Steigerwalt A.G., Mayer L.W., Levett PN. Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol.* 2006. 44(10), 3510-6.

Morgan J, Bornstein S.L., Karpati AM, Bruce M, Bolin C.A, Austin C.C, Woods C.W, et al. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis.* 2002. 34:1593–1599.

Morgane M. La leptospirose, étude comparative de la pathologie et des méthodes de diagnostic chez l'homme et l'animal. (Thèse de doctorat). Université Claude- Bernard- Lyon I. 2019. n°105, 126p.

Muller A., Gau C., Chetboul V., André-Fontaine G. A case of cholangio-hepatitis associated with leptospirosis in a dog. *Rec. Méd. Vét.* 1999. 175 (1/2), 63-68.

Murray R.D. Update on leptospira infections in farm animals. *Cattle Practice.* 1999. 7 (1), 55-57.

Musso D et La Scola B. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013. 46(4), 245-252.

Nahori M.A., Fournie-Amazouz E., Que-Gewirth N.S., Balloy V., Chignard M., Raetz C.R., Saint Girons I., Werts C. Differential TLR Recognition of *Leptospiral* Lipid A and Lipopolysaccharide in Murine and Human Cells. *The Journal of Immunology.* 2005. 175, 6022 -6031.

Naiman B.M., Alt D., Bolin C.A., Zuerner R., Baldwin C.L. Protective Killed *Leptospira borgpetersenii* Vaccine Induces Potent Th1 Immunity Comprising Responses by CD4 and

Gamma Delta T Lymphocytes. *Infect. Immun.* 2001. 69 (12), 7550-7558.

Nardone A., Campese C., Capek I. Les facteurs de risques de leptospirose en France métropolitaine. Une étude cas-témoin, juillet 1999- février 2000, Institut de veille sanitaire - Département des maladies infectieuses. 2002. 1-54.

Nascimento A, Verjovski-Almeida S, Van Sluys M, Monteiro-Vitorell C et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. *Braz J Med Biol Res.* 2004. 37:459–477.

Negrão A.M.G., Molnár E. & Molnár L. Dados sorológicos da leptospirose bovina em algumas regiões do estado do Pará. *Revta Bras. Reprod. Anim.* 1999. 23:406-407.

NgbedeE. O., Raji M A., Kwanashie C. N., Okolocha E.C., Maurice N.A., Akange E.N., Odeh L. E. Leptospirosis among zebu cattle in farms in Kaduna State, Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.* 2012. 367-369.

NgbedeE.O., Raji M A., Kwanashie C.N., Okolocha E.C. Serosurvey of *Leptospira* spp. serovar Hardjo in cattle from Zaria, Nigeria. *Rev. Méd. Vét.* 2013. 164, 2, 85-89.

Niang M, Will L.A, Kane M, Diallo A.A, Hussain M. Seroprevalence of leptospiral

Nicolescu M. La réaction d'agglutination macroscopique: réaction de dépistage des Leptospiroses humaines. *Méd. Mal. Infect.* 1981. 11 (2), 105-108.

Novelli S.M. la leptospirose canine : étude rétrospective de 39 cas présentés à l'ENVA. (Thèse doc vét). La Faculté De Médecine De Créteil. 2017. 184p.

O'keefej S. A brief review on the laboratory diagnosis of leptospirosis. *New Zealand Veterinary Journal.* 2002. 50, 9-13.

Obertin S. Étude clinique et microbiologique à propos de Onze cas de leptospirose observés au C.H.U de Nancy entre 1996 et 2003. (Thèse de doctorat). Université Henri Poincaré, Nancy 1, 2006. 112p.

Odontsetseq N., Sakada., Kida H. Serological evidence of the persistence of infection with *leptospira interrogans* serovar Hardjo in cattle in Mongolia. *Microbiol immunol.* 2005. 49 (9), 865-9.

OIE. Leptospirose. Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres, Manuel Terrestre de l'OIE, 2009, volume 1, chapitre 2.1.9, 275-289.

Oliveira T.V., Marinho D.P., Costa Neto C., Kligerman D.C. Climate variables, living conditions and the health of the population: leptospirosis in the city of Rio de Janeiro from 1996 to 2009. *Ciênc Saúde Colet.* 2012. 17(6), 1569-1576.

OMS. Organisation mondiale de la santé, 1987.

Osborne C.A., Low D.G., Finco D.R. La leptospirose. Urologie du chien et du chat, ed. Vigot. Maladies rénales liées aux maladies polysystémiques. 1976. 28, 317-321.

Otter A et Wilson B.W. Bovine abortion outbreaks associated with *Neospora* and other infectious agents. *Vet. Rec.* 1997. 141 (25), 659-660.

Ozkanlar Y., Aktas M.S., Kaynar O., Ozkanlar. S., Celebi F. Efficacy of blood transfusion accompanied by antibiotics and B vitamins for the treatment of naturally occurring Leptospirosis in cattle. *Revue Méd. Vét.* 2010. 161, 7, 336-341.

Pages J.P. Leptospirose canine: actualités cliniques. *Prat. Méd. Chir. Anim. Comp.* 2001. 36, 573-579.

Palaniappan R.U., Chang Y.F., Chang C.F., Pan M.J., Yang C.W., Harpending P., McDonough S.P., Dubovi E., Divers T., Qu J., Roe B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Mol Cell Probes.* 2005. 19(2), 111-117.

Palit A et Gulasekharam J. Genus-specific leprospirial antigen and its possible use in laboratory diagnosis. *J Clin Pathol.* 1973. 26, 7-16.

Parvez, M. A., Prodhan, M. A. M., Rahman, M. A., et al. Seroprevalence and associated risk factors of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in dairy cattle of Chittagong, Bangladesh. *Pak Vet J.* 2015. 35 (3): 350-354.

Perez Bonilla Q., Dorado Sanchez E., Borrallo Mira J. Une enzootie de leptospirose bovine. *Point Vét.* 1983. 15 (71), 51-54.

Perolat P et Baranton G. *leptospira interrogans* et la leptospirose. *Bull inst Past.* 1990. 88, 315-333.

Perolat P et Baranton G. *Leptospira*. Précis de bactériologie clinique. ESKA. 2000. 91, 1533- 1542.

Perolat P., Lecuyer I., Postic D., Baranton G. Diversity of ribosomal DNA fingerprints of *Leptospira* serovars provides a database for subtyping and species assignation. *Res. Microbiol.* 1993. 144(1), 5-15.

Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect.* 2013. 43(1), 1-9.

Picardeau M., Bulach D.M., Bouchier C., Zuerner R.L., Zidane N., Wilson P.J., et al. Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. *PLoS ONE.* 2008. 3 (2), e1607, 1-9.

Pinne M.1 et Haake D. Immuno-fluorescence assay of leptospiral surface-exposed proteins. *J Vis Exp.* 2011. (53). pii: 2805.

Pinto, P.S., Loureiro, A.P., Penna, B., Lilenbaum, W. Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Acta Trop.* 2015. 149, 163–167.

polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* 1984. 44:459-464.

Poonacha K.B., Donahue J.M., Giles R.C., Hong C.B., Petrites-Murphy M.B. Smith BJ, Swerczek T.W., Tramontin R.R., Tuttle P.A. Leptospirosis in equine fetuses, stillborn foals, and placentas. *Vet Pathol.* 1993. 30(4), 362-369.

Prescott J.F. Treatment of leptospirosis. *Cornell. Vet.* 1991. 81 (1), 7-12.

Prescott J.F., Miller R.B., Nicholson V.M., Martin S.W., Lesnick T. Seroprevalence and

association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontario. *Can. Vet. J.* 1988. 52, 210-215.

Pritchard D.G. The present state of leptospirosis diagnosis and control. ed. Martinus Nijhoff: Dordrecht, Netherlands. 1986. 123-148.

Quaresma Bomfim M.R., Ko A., Koury M.C. Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Veterinary Microbiology.* 2005. 109, 89-94.

Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey B., et al. Clinical veterinary microbiology, Wolfe Publication Ltd, Spain, 1994.

Raddi G, Morado DR, Yan J, Haake DA, Yang XF, Liu J. Three-dimensional structures of pathogenic and saprophytic *Leptospira* species revealed by cryo-electron tomography. *J Bacteriol.* 2012. 194:1299–1306.

Raetz C.R.H. et Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002. 71, 635-700.

Ramos A.C., Souza G.N., Lilenbaum W. Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil. *Theriogenology.* 2006. 66(4), 1021-1025.

Ratet G. Contributions à l'étude de l'échappement des leptospires au système immunitaire : mise en évidence chez la souris de la colonisation rénale chronique à l'aide de leptospires bioluminescents, et rôle de la lipoprotéine LipL21 dans l'échappement du peptidoglycane à la reconnaissance par les récepteurs Nods. Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français.

Rathinam S.R. Ocular manifestations of leptospirosis. *J. Postgrad. Med.* 2005. 51(3), 189-194.

Ratnam S. Leptospirosis : an Indian perspective. *Indian Journal of Medical Microbiology.* 1994. 12, 228-239.

Rautureau S. Bilan du statut sanitaire des bovins et des porcs vis à vis de la leptospirose dans l'union européenne. (Thèse Med Vét) ENVN. 2003. N° 29, 75 p.

Ren S.X., Fu G., Jiang X.G., Zeng R., Miao Y.G., Xu H., Zhang Y.X., Xiong H., Lu G et al.. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature.* 2003. 422(6934), 888-93.

Renesto P., Lorvellec-Guillon K., Drancourt M., Raoult D. rpoB gene analysis as a novel strategy for identification of spirochetes from the genera *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira*. *J Clin Microbiol.* 2000. 38(6), 2200e3.

Ristow P. la leptospirose : les défis actuels d'une ancienne maladie, Bull. Acad. Fr., 2007, 160 (4), 267-278.

Ristow P., Bourhy P., Kerneis S., Schmitt C., Prevost M.C., Lilenbaumw., Picardeau M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology.* 2008. 154 (5), 1309-1317.

Robinson E.N et Sprayberry K.A. Current therapy in equine medicine. sixth edition, saunders Elsevier. 2009. 145-147.

Rocha T. A review of leptospirosis in farm animals in Portugal. *Rev. Sci. Tech.* 1998. 17, 699-712.

Rodriguez-Forero, J. La leptospirose féline: sondage sérologique et de PCR urinaire chez des chats sains et des chats atteints de maladie rénale. (mémoire de maitre en sciences (M. Sc), Université de Montréal- Faculté de médecine vétérinaire, 2013. 122p.

Ryan, E. G., Leonard, N., O'Grady, L., et al. Herd level risk factors associated with *Leptospira* Hardjo seroprevalence in beef/suckler herds in the Republic of Ireland. *Ir Vet J.* 2012. 65: 6.

Saengjaruk P., Chaicumpa W., Watt G., Bunyaraksyotin G., Wuthiekanun V., Tapchaisri P. et al. Diagnosis of Human Leptospirosis by Monoclonal Antibody-Based Antigen Detection in Urine. *J. Clin. Microbiol.* 2002. 40(2), 480-489.

Saint Girons I, Margarita D, Amouriaux P, Baranton G. First isolation of bacteriophages for a spirochaete: potential genetic tools for *Leptospira*. *Res Microbiol.* 1990. 141:1131–1138.

Saito, M., Villanueva, S. Y., Kawamura, Y., et al. *Leptospira idonii* sp. nov., isolated from environmental water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013. 63: 2457-2462.

Sakhaee Ehsanollah., Abdollah pour Gholam Reza. Detection of leptospiral antibodies by microscopic agglutination test in north-east of Iran. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2011. 227-229.

Sakhaee Ehsanollah., Gholamreza Abdollahpour., Mahmoud Bolourchi., Saeed Sattari Tabrizi. Comparison between microscopic agglutination test (MAT) and enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) for detection of leptospiral antibodies in cattle. *Comp Clin Pathol*, 2010, 19, 271–274.

Sakhaee, E., Abdollahpour, G. R., Bolourchi, M., et al. Comparison between microscopic agglutination test (MAT) and enzyme-linked immuno- sorbent assay (ELISA) for detection of leptospiral antibodies in cattle. *Comp Clin Pathol.* 2010. 19:271–274.

Salgado M., Otto B., Sandoval E., Reinhardt G., Boqvist S. A cross sectional observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira* spp. Serovars in small holder dairy cattle farms in southern Chile. *BMC Veterinary Research.* 2014. 10:126.

Sanhueza J.M., Heuera C., West D. Contribution of *Leptospira*, *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus to fetal loss of beef cattle in New Zealand. *Preventive Veterinary Medicine.* 2013. 112, 90–98.

Sankar S., Hiron M. Harshan., Somarajan S.R., Srivastav S.K. Evaluation of a recombinant LigB protein of *Leptospira interrogans* serovar Canicola in an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis. *Research in Veterinary Science.* 2010. 88, 375–378.

Savalia, C. V. et Pal, M. Studies on the reservoir status of leptospirosis in Gujara. *Indian J Field Vet.* 2008. 4: 7 – 9.

Scanziani, E., Origgi, F., Giusti A., Iacchia G., Vasino A., Pirovano, G., Scarpa, P., Tagliabue, S. Serological survey of leptospiral infection in kennelled dogs in Italy. *J Small Anim Pract.* 2002. 43: 154-157

- Schoenaers F et Kaeckenbeeck A.** Leptospiroses. Maladies infectieuses des animaux, tome 1, ed. Derouaux: Liège. 1971. 267-274.
- Schonberg A.** Tests cutanés et Leptospiroses. *Med. Mai. Inf.* 1981. 11(2), 100-101.
- Schoonman, L. et Swai, E. S.** Herd- and animal level risk factors for bovine leptospirosis in Tanga region of Tanzania. *Trop Anim Hlth Prod.* 2010. 42: 1565–1572.
- Schuller S., Francey T., Hartmann K., Hugonnard M., Kohn B., Nally J.E., Sykes J.** “European Consensus Statement on Leptospirosis in Dogs and Cats.” *The Journal of Small Animal Practice.* 2015. 56(3), 159-179.
- Scolamacchia F., Ian G. Handel., EricM.Fe `vre., Kenton L. Morgan., Vincent N. Tanya., Barend M. de C. Bronsvort.** Serological Patterns of Brucellosis, Leptospirosis and Q Fever in Bos indicus Cattle in Cameroon. *Cameroon Cattle Zoonoses.* 2010. 5 (1), e8623.
- Sebek Z, Miorini I, Brosch R, Buchrieser C, Buchrieser V, Sixl W, Valova M.** A survey of leptospirological studies carried out on the Cape Verde Islands. *Geogr Med Suppl.* 1989. 5:153–60.
- Sebek Z, Sixl W, Reinthaler F, Valova M, Schneeweiss W, Stunzner D, Mascher F.** Results of serological examination for leptospirosis of domestic and wild animals in the Upper Nile province (Sudan). *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1989. 33:337–45.
- Segers R.P., Van Der Drift A., De Nijs A., Corcione P., Van Der Zeijst B.A., Gaastra W.** Molecular analysis of a sphingomyelinase C gene from *Leptospira interrogans* serovar hardjo. *Infect Immun., American Society for Microbiology.* 1990. 58 (7), 2177-2185.
- Segura-Correa V.M., Solis-Calderon J.J., Segura-Correa J.C.** Seroprevalence of and risk factors for leptospiral antibodies among cattle in the state of Yucatan, Mexico. *Trop. Anim.Health Prod.* 2003. 35, 293-299.
- Segura-Correaa J.C., Domínguez-Díazb D., Avalos-Ramírezb R., Argaez-Sosa J.** Intraherd correlation coefficients and design effects for bovine viral diarrhoea, infectious bovine rhinotracheitis, leptospirosis and neosporosis in cow–calf system herds in North-eastern Mexico. *Preventive Veterinary Medicine.* 2010. 96, 272–275.
- Seguro, A.C., Andrade L.** Pathophysiology of Leptospirosis. *Shock.* 2013. 39(1), 17-23.
- Semskov M.V.** To the materials on etiology of infectious yellow fever of cattle. *Sovet Vet.* 1940. 6, 22–23.
- Sertour N., Menouard M., Poveda J.D., Perra A., Baranton G., Postic D.** Cluster of leptospirosis cases among children in France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002. 21(7), 560-2.
- Sessions J.K., Greene C.E.** Canine Leptospirosis: Epidemiology, pathogenesis, and diagnosis. *Compendium.* 2004. 606-617.
- Shariane M., Suepaul Christine V., Carrington Mervyn., Campbell Cristove Borde., Abiodun Adewarde Adesuyum.** Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. *Trop anim health prod.* 2011. 43, 367-375.

- Slack A.T., Symonds M.L., Dohnt M.F., Smythe L.D.** Identification of pathogenic *Leptospira* species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol.* 2006. 6:95.
- Slee K.J., Mcorist S., Skilbeck N.W.** Bovine abortion associated with *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection. *Aust. Vet. J.* 1983. 60, 204-206.
- Sleight S.D.** The role of penicillin and streptomycin in the prevention of transmission of bovine leptospirosis by artificial insemination. *Am. J. Vet. Res.* 1965. 26.
- Smythe L.D., Smith I.L., Smith G.A., Dohnt M.F., Symonds M.L., Barnett L.J., McKay D.B.** A quantitative PCR (Taq- Man) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infect Dis. BioMed Central.* 2002. 2:13.
- Soares T.S.M., Latorre M.D., Laporta G.Z.B., Márcia R.** Análise espacial e sazonal da leptospirose no município de São Paulo, SP, 1998 a 2006. *Rev. Saúde Pública.* 2010. vol.44, n.2.
- Srivastava SK.** Properties of lipopolysaccharide antigen of *Leptospira interrogans* serovar pyrogenes. *Ind. Vet. J.* 2002. 79(11), 1201-1202.
- Stevenson B., Choy H.A., Pinne M., Rotondi M.L., Miller M.C., Demoll E., et al.** *Leptospira interrogans* Endostalin-Like Outer Membrane Proteins Bind Host Fibronectin, Laminin and Regulators of Complement. *PLoS ONE* .2007. e1, 188.
- Stimson A.** Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Public Health Reports.* 1907. 22, 541.
- Subathra M., Senthilkumar T.M.A., Ramadass P., Dhinakar Raj G.** Development of rapid flow-through-based dot-immunoassay for serodiagnosis of leptospirosis in dogs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 2011. 34, 17–22.
- Suepaul, S. M., Carrington, C. V., Campbell, M., et al.** Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad, *Trop Anim Hlth Prod.* 2011. 43: 367–375.
- Sunder J., Sujatha T, Kundu A., Kundu M.S.** Carrier status and seroprevalence of leptospirosis in cattle of South Andaman. *Indian J. Anim. Res.* 2016. B- 3186.
- Sykes Je, Hartmann K, Lunn Kf, Moore Ge, Stoddard Ra, Goldstein Re.** 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med.* 2011. 25, 1-13.
- Tabatabaeizadeh, E., Tabar, G. H., Farzaneh N. et al.** Prevalence of *Leptospira* Hardjo antibody in bulk tank milk in some dairy herds in Mashhad suburb. *Afr J Microbiol Res.* 2011. 5: 1768-1772.
- Tainturier D., Fieni F., Bruyas J.F., Battut I.** Conduite à tenir devant un avortement dans un élevage bovin. *Point vét.* 1997. 28 (183), 1239-1243.
- Tainturier D., Fieni F., Bruyas J.F., Battut I.** Etiologie des avortements chez la vache. *Point Vét.* 1997b. 28(183), 1231-1238.
- Talpada M.D., Garvey N., Sprowls R., Eugster A.K., Vinetz J.M.** Prevalence of leptospiral infection in Texas cattle: implications for transmission to humans. *Vector Borne Zoonotic*

Dis. 2003. 3, 141-147.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011. 28:2731–2739.

Terpstra W.J. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. the World Health Organisation. 2004. 1-109.

Terpstra W.J., Jabboury-Postema J., Korver H. Immunoperoxidase staining of leptospires in blood and urine. *Zentralbl. Bakteriell. Mikrobiol. Hyg. A.* 1983. 254(4), 534-539.

Thiermann A.B. Experimental leptospiral infections in pregnant cattle with organisms of the hebdomadis serogroup. *Am. J. Vet. Res.* 1983. 43, 780–784.

Thiermann A.B. Leptospirosis currents, developments and trends. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1984. 184, 722-725.

Thomas D.D et Higbie L.M. In vitro association of leptospires with host cells. *Infect. Immun.*, 1990, 58 (3), 581-585.

Thrusfield, M. Veterinary Epidemiology, Blackwell Science Ltd, 3rd edn, Oxford, UK, 2007.

Toma B., Dufour B., Sanaa M., Beneet J.J., Shaw A., Moutou F., Louza A. Epidémiologie appliquée à la lutte contre les maladies animales transmissibles majeures. AEEMA, 2001, Maison-Alfort, France, 696p.

Tong M.J., Rosenberg E.B., Votteri B.A., Tsai C.C. Immunological Response in Leptospirosis. Report of Three Cases. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1971. 20 (4), 625–30.

Torgerson P.R., Hagan J.E., Costa F., Calcagno J., Kane M., Martinez-Silveira M.S. et al Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015. 9(10): e0004122.

Torten, M. Leptospirosis. In: Stoenner H, Kaplan W, Torten M (eds) A.C.R.C. Handbook series in Zoonoses, 1979. vol 1. C.R.C. Press, Boca Rato.

Toshihiro I. et Ryo Y. Leptospiral attachment to extracellular matrix of mouse fibroblast (L929) cells. *Vet. Microbiol.* 1987. 15, 89-96.

Van Eys G.J., Gravekamp C., Gerritsen M.J., Quint W., Cornelissen M.T., Schegget J.T., Terpstra W.J. Detection of leptospires in urine by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol., American Society for Microbiology.* 1989. 27(10), 2258-2262.

Van Thiel P.H. The leptospires. Universitaire Pers Leiden, 1948. Leiden.

Verma A et Stevenson B. Leptospiral uveitis - there is more to it than meets the eye. *Zoonoses Public Health.* 2012. 59 (2), 132-141.

Vijayachari P., Sugunan A.P., Shriram A.N. Leptospirosis : an emerging global public health problem. *Journal of Biosciences.* 2008. 33 (4), 557-569.

Vincent C.T., Munger C., Sylvestre F., Levesque I.J. la leptospirose dans le cheptel québécois en 2006. Réseau d'Alerte et d'information Zoosanitaire, bulletin zoosanitaire N° 52, mai 2007.

Vongxay, K., Conlan, J. V., Khounsy, S., et al. Seroprevalence of Major Bovine Associated Zoonotic Infectious Diseases in the Lao People's Democratic Republic. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 2012. 12: 10.

Waitkins S.A. Leptospirosis as an occupational disease. *British Journal of Industrial Medicine*. 1986. 43, 721-725.

Wang B., Sullivan J., Sullivan G.W., Mandell G.L. Interaction of leptospires with human

Watt G., Padre L.P., Tuazon M.L., Calubaquib C., Santiago E., Ranoa C.P., Laughlin L.W. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *The Lancet*. 1998. 1(8583), 433-5.

WHO (World Health Organisation) (OMS) 2011. Report of the second meeting of leptospirosis burden epidemiology reference group. Geneva, Switzerland: World Health Organization.http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44588/9789241501521_eng.pdf;jsessionid=99803CCB9A6D8A25D8C04A2538607AF7?sequence=1.

Wohl Js. Canine leptospirosis. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.* 1996. 18 (11), 1215-1225.

Wolbach S.C., et Binger C.A.L. Notes on a filterable spirochete from fresh water. *Spirochaeta biflexa* (new species). *J Med Res.* 1914. 30, 23-25.

World Organization for Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, OIE, Paris. 2018. Chapter 2.1.16.

Yang C.W., Wu M.S., Pan M.J., Hsieh W.J., Vandewalle A., Huang C.C. The Leptospira Outer Membrane Protein LipL32 Induces Tubulointerstitial Nephritis-Mediated Gene Expression in Mouse Proximal Tubule Cells. *J Am Soc Nephrol.* 2002. 13, 2037 -2045.

Yatbantoong, N. et Chaiyarat, R. Factors Associated with Leptospirosis in Domestic Cattle in Salakphra Wildlife Sanctuary, Thailand. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019. 16, 1042.

Younes-Ibrahim M., Burth P., Faria M.V., Buffin-Meyer B., Marsy S., Barlet-Bas C., Cheval L., Doucet A. Inhibition of Na, K-ATPase by an endotoxin extracted from *Leptospira interrogans*: a possible mechanism for the physiopathology of leptospirosis. *C R Acad Sci III*. 1995. 318(5), 619-25.

Zar, J. H. Biostatistical analysis, Upper Saddle River: 5th ed, Prentice Hall, 1999.

REFERENCES PROVENANT DE PAGES EN LIGNE :

Anonyme (2008) (Page consultée le 14 mars 2020)

Adresse URL : <http://www.forum-algerie.com/actualite-algerienne/37749-epidemiologie-leptospirose-fait-des-ravages-3-morts-et-24-personnes-hospitalisees-setif.html>).

Université-De-Rennes, (Page consultée le 18 mars 2020)

Adresse URL : www.med.univ-rennes1.fr.

Euzeby J.P. (2009) dictionnaire de bactériologie vétérinaire, (Page consultée le 18 avril 2013).

Adresse URL : <http://www.bacterio.cict.fr/II/leptospira.html>.

Euzeby J.P. (1999) Dictionnaire de bactériologie vétérinaire (Page consultée le 23 avril 2013). Adresse URL : <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/II/leptospira.html>.

Valon F et Chaffaux S. (2009) Leptospirose et avortement chez la jument, (Page consultée le 24 août 2019).

Adresse URL : <http://www.respe.net/articlebulletin/leptospirose-et-avortements-chez-la-jument/>.

Macharia S.M. A comparative sero-epidemiological survey for the prevalence of Leptospira antibodies in domestic animals and man in Nyandarua and Turkana districts of Kenya. Thesis University of Nairobi. 1989. Available at :

Adresse URL : <http://erepository.uonbi.ac.ke/handle/11295/14490>.

Adresse URL : <http://www.clive.ed.ac.uk/winepiscope> (consulté le 15 avril 2019)

Adresse URL : http://www.alyabbara.com/utilitaires/statistiques/khi_carre.html (consulté le 15 avril 2019).

Adresse URL : <http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/?module=tests/macnemar> (consulté le 15 avril 2019).

Adresse URL : <http://easycalculation.com/statistics/odds-ratio.php> (consulté le 15 avril 2019)

Adresse URL : https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php. (consulté le 15 avril 2019).

ANNEXES

Questionnaire épidémiologique destiné aux éleveurs bovins

(Recherche de *Leptospira spp.*)

Nom et prénom de l'éleveur :

Adresse de l'exploitation :

Commune :

Nom du vétérinaire traitant de l'exploitation :

L'exploitation a-t-elle déjà connu des problèmes d'avortement ?.....

Si oui, précisez la fréquence :

☐ Beaucoup

☐ Moyen

☐ Très peu

Exploitation présente-t-elle une baisse dans les performances de reproduction (baisse de fertilité) ?

☐ Oui

☐ Non

Type d'exploitation :

☐ Viandeuse

☐ Laitière

☐ Mixte

☐ Allaitant

Type d'élevage :

☐ Extensif

☐ Semi-extensif

☐ Intensif

Nombre d'effectif bovin :

Composition du cheptel

☐ Veaux

☐ Génisses

☐ Vaches laitières

☐ Taureaux

Présence d'autres espèces animales dans l'exploitation :

☐ Oui

☐ Non

Si oui lesquels
:.....
.....

Saison de mise en pâture

☐ Automne

☐ Hiver

☐ Printemps

☐ Été

Type d'alimentation :

Conditions de stockage des aliments :

Les autres animaux de la ferme sont-ils en contact avec les aliments ?

☐ Oui

☐ Non

État des abreuvoirs :.....

Les autres animaux présents dans la ferme sont-ils en contact avec les abreuvoirs ?

☐ Oui

☐ Non

Animaux vermifugés :

☐ Oui

☐ Non

Animaux vaccinés :

☐ Oui

☐ Non

État d'hygiène général de l'exploitation

☐ Bon

☐ Moyen

☐ Mauvais

Qualité de la litière :.....

Présence de rivière, mares, étangs, et zones marécageuses dans l'exploitation ou bien tout prêt ?

☐ Oui

☐ Non

Informations sur l'animal prélevé

Numéro de l'animal prélevé s'il existe :.....

Race :.....

Age :.....

Origine :.....

Gestante ?

☐ Oui

☐ Non

Si gestante :

☐ Primipare

☐ Multipare

Avortement :

☐ A déjà avorté

☐ Jamais avorté

Stade de gestation où a eu l'avortement :

☐ Entre 1-3mois

☐ Entre 3-6mois

☐ Entre 6-9mois

À l'avortement y'a eu rétention placentaire :

☐ Oui

☐ Non

A la mise bas :

☐ Vêlage normal

☐ Dystocie

☐ Métrite

Le poids du veau à la naissance (approximativement).....

État général de l'animal :

☐ Bon

☐ Moyen

☐ Mauvais

Animal vacciné ?si oui contre quelle pathologie ?.....

Animal vermifugé ?.....

Signes cliniques observés chez l'animal au moment du prélèvement :

☐ Anémie

☐ Ictère

☐ Pétéchies vulvaire et/ou conjonctivales

☐ Hémoglobinurie

☐ Fièvre

☐ Abattement

☐ Baisse de la production laitière avec un lait rose (les quatre quartiers des mamelles sont atteints et deviennent flasques)

☐ Aucun

L'animal a-t-il eu des antécédents pathologiques ?

☐ Oui

☐ Non

Lesquels ?.....