République Algérienne Démocratique
et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Thème :

Etude de la peste et de la leptospirose par des méthodes moléculaires chez les chiens et les chats errants de la région d'Alger

Présentée par : Mme Sara ZAIDI épouse SCHIFF

Soutenue le : 29.09.2019

Les membres du jury :

Mme TEMIM S.	Professeur	Présidente	ENSV-Alger
Mr BITAM I.	Professeur	Directeur de thèse	ESSAIA - Alger
Mme AIT-OUDHIA K.	Professeur	Co-directrice	ENSV - Alger
Mme Aissi M.	Professeur	Examinatrice	ENSV - Alger
Mr HAMRIOUI B.	Professeur	Examinateur	CHU- Mustapha Bacha - Alger
Mme ZIANE H.	Maître de Conférences A	Examinatrice	CHU- Mustapha Bacha - Alger

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Tout d'abord, je remercie *le tout puissant de m'avoir donné la force et la volonté pour réaliser ce travail.*

Je tiens à remercier mon Directeur de thèse, Pr BITAM, qui m'a aidé à percer mon chemin dans le savoir, en témoignage de son dynamisme et de son implication dans la recherche, j'exprime par ces quelques mots ma profonde reconnaissance.

Remerciement particulier au Pr DRANCOURT, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a encadré, j'espère avoir été à la hauteur de son attente. Qu'il voit dans cet aboutissement le témoignage de ma grande gratitude. Egalement un grand merci à l'Ecole Vétérinaire d'Alger pour les allocations de stage.

J'adresse aussi mes plus sincères remerciements :

À ma co-promotrice, Pr AIT-OUDHIA, pour son soutien moral, ses *encouragements* et ses précieux conseils*.*

À Madame TEMIM, de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse, Hommages respectueux.

À Madame AISSI, À Madame ZIANE et À Monsieur HAMRIOUI qui m'ont fait l'honneur d'accepter l'évaluation et la critique de ce travail.

Je remercie infiniment Madame Zénia, pour sa contribution dans l'analyse statistique de mes résultats

Ma profonde gratitude s'adresse aussi à l'ensemble du personnel de l'HURBAL et spécialement à Mme Saidi et Mme Zerouk, pour avoir mis à ma disposition les chiens et les chats de la fourrière canine d'Alger.

Un remerciement particulier à ma très chère amie Amina BESSAS, pour son aide et ses encouragements permanents.

Enfin, je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

Au nom de Dieu le tout puissant et le très miséricordieux par la grâce

du quelle j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie À :

Lyès mon très cher Mari,
Pour sa présence permanente à mes côtés, son écoute attentive, ses encouragements, mais surtout sa patience impressionnante.

Mes filles adorées Sara Lyna et Nawel Racha,
pour tout le bonheur et la joie qu'elles m'ont apporté

Mes parents,
Pour leur amour indéfectible et leur soutien pendant mes années d'études,
Que ce travail soit la preuve de toute ma reconnaissance et de mon amour profond.

Ma sœur Lynda
Pour sa présence à mes côtés et ses encouragements,
Qu'elle trouve ici l'expression de mes sincères sentiments.

Mes frères : Lakhdar et Aghiles, pour leur affection

Mes chers beaux-parents,
Pour leur soutien, encouragement et amour indéfectible,
Que cet ouvrage soit le témoignage de ma profonde gratitude.

Mes beaux-frères, leurs femmes et enfants

Toute ma famille

Résumé

Etude de la peste et de la leptospirose par des méthodes moléculaires chez les chiens et les chats errants de la région d'Alger

Généralités : Parmi les maladies infectieuses zoonotiques graves négligées et classées ces dernières années comme maladies émergentes et réémergentes nous citons la peste et la leptospirose, deux maladies sur lesquelles nous avons peu d'informations en Algérie. Les chiens et les chats errants vivant dans des conditions de non salubrité et en étant en contact avec des rongeurs, principaux réservoirs de ces zoonoses assez redoutables, sont à leur tours exposés à ce genres d'agents pathogène et complètent le cycle épidémiologique et ainsi transmettre ces maladies à l'homme et à d'autres animaux.
Nous avons mené une étude moléculaire, afin de mettre en évidence l'agent responsable de la peste et de la leptospirose dans la population errante de l'espèce canine et féline dans la région d'Alger et montrer ainsi le rôle que peuvent jouer ces animaux en tant que réservoirs.

Méthodes et résultats : Des tests de PCR en temps réel ciblant les gènes *rrs* et *hsp* étaient réalisés pour la recherche de la leptospirose. Aucun des 107 échantillons d'urine de chats n'était positif tandis que 5/104 (4,8%) échantillons d'urine canine étaient positifs pour *Leptospira*. La positivité de ces échantillons a été confirmée par le séquençage du gène partiel *rpoB* qui a donné une similarité de 100% avec le fragment de gène homologue à l'espèce *L. interrogans* sérogroupe Icterohaemorrhagiae. La prévalence de *L. interrogans* était significativement plus élevée chez les chiens âgés de moins d'un an (16,46% - 29,41%) que chez les adultes (0%) (P = 0,0001), avec une prévalence globale de (2,68% - 4,8%) (P = 0,0007) chez la population canine.
Afin de rechercher l'agent de la peste chez les carnivores et leurs puces, une PCR en temps réel ciblant le gène *pla* et une PCR nichée ciblant le gène *glpD* ont été utilisées. L'infestation des carnivores par les puces indique une prévalence élevée, elle était de 327 (47,25%) puces chez les chiens et de 365 (52,74%) puces chez les chats. *Ctenocephalides felis* était plus abondante chez les chats, par contre *Ctenocephalides canis* était plus fréquente chez les chiens. La prévalence de *Xenopsylla cheopis* était importante chez les chiens. Malgré que les contrôles interne et externe de la PCR étaient positifs, aucun des 127 échantillons de rates de chiens et 140 rates de chats, ni les 256 puces analysées, n'a été positif à *Yersinia pestis.*

Conclusion : Ces résultats suggèrent que les chiens sont des hôtes d'entretien de la leptospirose à Alger. Pour faire face à cette situation, des stratégies efficaces de vaccination canine et une sensibilisation accrue à la santé publique sont indispensables. Les chats et les chiens errants sont des sources peu probables de peste. Ce rapport montre que l'épidémiologie de la peste n'est pas unique, mais suit des voies différentes selon les régions. D'autres investigations incorporant un plus grand échantillon dans plus de localités doivent êtres entreprises pour documenter l'épidémiologie de ces zoonoses chez les animaux urbains en Algérie dans son ensemble.

Mots-clés: Zoonose, leptospirose, peste, chien, chat, puce, Alger.

Abstract

Study of plague and leptospirosis by molecular methods in stray dogs and cats in the region of Algiers

Background : Among the serious zoonotic infectious diseases neglected and classified in recent years as emerging and re-emerging diseases we quote plague and leptospirosis, two diseases on which there is little information in Algeria. Stray dogs and cats living in unsanitary conditions and in contact with rodents, still the main reservoirs of these fairly dangerous zoonoses, are also exposed to this kind of pathogen and complete the epidemiological cycle and consequently they transmit these diseases to humans and other animals.

We conducted a molecular study, in order to highlight the agent responsible for plague and leptospirosis in the wandering population of the canine and feline species in Algiers‘ region and thus show the role which these animals can play as reservoirs.

Methods and Results : : Real-time PCR tests targeting the *rrs* and *hsp* genes were performed for the research of leptospirosis. None of the 107 urine samples from cats were positive while 5/104 (4.8%) canine urine samples were positive for *Leptospira*. The positivity of these samples was confirmed by sequencing of the *rpoB* partial gene which have a 100% similarity with *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae homologous gene fragment. The prevalence of *L. interrogans* was significantly higher in dogs less than one year old (16.46% - 29.41%) than in adults (0%) (P = 0.0001), with a prevalence overall (2.68% - 4.8%) (P = 0.0007) in the canine population.

In order to identify for the plague agent in carnivores and their fleas, a real-time PCR targeting the *pla* gene and a nested PCR targeting the *glpD* gene were used. Carnivore infestation with fleas indicates a high prevalence, it was 327 (47.25%) fleas in dogs and 365 (52.74%) fleas in cats. *Ctenocephalides felis* was more abundant in cats, whereas *Ctenocephalides canis* was more common in dogs. The prevalence of *Xenopsylla cheopis* was higher in dogs. Although the internal and external controls of the PCR were positive, none of the 127 dog spleen samples and 140 cat spleens, nor the 256 fleas analyzed, were positive for *Yersinia pestis*.

Conclusion : These results suggest that dogs are hosts for the maintenance of leptospirosis in Algiers. To deal with this situation, effective dog vaccination strategies and increased awareness of public health are mandatory. Cats and stray dogs are unlikely sources of plague. This report shows that the epidemiology of the plague is not unique, but follows different routes in different regions. Further investigations incorporating a larger sample in more localities should be undertaken to document the epidemiology of these zoonotic diseases in urban animals in Algeria as a whole.

Keywords : Zoonosis, leptospirosis, plague, dog, cat, flea, Algiers.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale…….. **1**

Chapitre 1: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Première partie : la leptospirose

Introduction…… 2
I. Aspect historique…… 3
II. Etiologie de la leptospirose…….. 4
II.1. Systématique…….. 4
II.2. Classification…….. 4
II.2.1. Classification sérologique…….. 4
II.2.1. Classification génomique…….. 5
II.3. Caractères morphologiques et structurales……... 7
II.4. Caractéristiques bactériologiques……... 8
II.4.1. Métabolisme…… 8
II.4.2. Culture…… 8
II.5. Conditions de survie dans l'environnement…….. 9
II.6. Le génome de *Leptospira spp*…… 9
III. Pathogénie…… 10
III.1. Conditions de l'infection…… 10
III.1.1. Facteurs dépendants du pouvoir pathogène des leptospires …….. 10
III.1.2. Facteurs dépendants de la réceptivité et de la sensibilité de l'hôte…… 12
III.2. Etapes de l'infection…… 12
III.2.1. Phase de contamination…… 13
III.2.2. Phase d'invasion…… 14
III.2.3. Phase de colonisation…… 14
IV. Epidémiologie…….. 15
IV.1. Epidémiologie descriptive…….. 15
IV.1.1 Répartition géographique…….. 16
IV.1.2 Prévalence de la maladie…….. 16
IV.2. Epidémiologie analytique…….. 18
IV.2.1. Source de l'infection…… 18
IV.2.2. Mode de transmission……... 19
IV.2.3. Voies de pénétration…… 20
IV.2.4. Réservoirs de la leptospirose……... 20
V. Manifestations cliniques…….. 23
V.1. Manifestations cliniques chez l'humain…… 23
V.2. Manifestations cliniques chez l'animal…… 23
VI. Diagnostic…… 25
VI.1. Diagnostic direct…….. 25
VI.1.1. Observation bactériologique directe…….. 25
VI.1.2. Culture…… 27
VI.1.3. Techniques moléculaires…….. 27
VI.2. Diagnostic indirect…….. 28
VI.2.1. Test d'agglutination microscopique (*microscopic agglutination test*, MAT) …… 28
VI.2.2. Le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) IgM…….. 30
VII. Traitement……... 30
VIII. Moyen de lutte……... 32

VIII.1. Prophylaxie sanitaire…… 32
VIII.1.1. Prévention de la contamination du chien…… 32
VIII.1.2. Prévention du risque de transmission à l'homme…… 32
VIII.2. Prophylaxie médicale…… 33

Deuxième partie : la peste

Introduction…… 35
I. Aspect historique…… 36
II. Etiologie de la peste…… 38
II.1. Systématique…… 38
II.2. Classification…… 38
II.3. Caractères morphologiques et structurales…… 39
II.4. Caractéristiques bactériologiques…… 39
II.4.1. Métabolisme…… 39
II.4.2. Culture…… 40
II.5. Condition de survie dans l'environnement…… 40
II.6. Le génome de *Yersinia pestis*…… 40
III. Pathogénie…… 40
III.1. Facteurs de virulence…… 40
III.2. Etapes de l'infection…… 41
IV. Epidémiologie…… 43
IV.1. Epidémiologie descriptive…… 43
IV.1.1. Répartition géographique…… 43
IV.1.2 Réémergence récente de la peste…… 44
IV.2. Epidémiologie analytique…… 45
IV.2.1. Source d'infection et mode de transmission…… 45
IV.2.2. Réservoirs de la peste…… 47
IV.2.3. Vecteurs de la peste…… 50
V. Manifestations cliniques…… 52
V.1. Manifestations cliniques chez l'humain…… 52
V.2. Manifestations cliniques chez l'animal…… 53
VI. Diagnostic…… 54
VI.1. Diagnostic direct…… 54
VI.1.1 Examen microscopique…… 54
VI.1.2. Culture…… 55
VI.1.3. Techniques moléculaires…… 56
VI.2. Diagnostic indirect…… 56
VII. Traitement…… 57
VIII. Moyens de lutte…… 58
VIII.1. Prophylaxie sanitaire…… 58
VIII.1.1. Prévention de la contamination des animaux de compagnie…… 58
VIII.1.2. Prévention du risque de transmission à l'homme…… 58
VIII.1.3. Lutte contre les rongeurs et le vecteur…… 59
VIII.2. Prophylaxie médicale…… 59

CHAPITRE 2 : MATERIELS & METHODES

I. Site de l'étude…… 60
I.1. Lieu de l'étude…… 60
I.2. Evaluation éthique et scientifique…… 61
II. Population étudiée…… 62
II.1. Animaux prélevés et période de prélèvement…… 62
II.2. Types de prélèvement et leur conservation…… 62
II.2.1. Prélèvements pour la recherche de *Leptospira*…… 62
II.2.2. Prélèvements pour la recherche de *Yersinia pestis*…… 63
III. Analyses moléculaires…… 64

III.1. Recherche de *Leptospira* (la leptospirose)…….…... 64
III.1.1. Extraction de l'ADN……..... 64
III.1.2. PCR en temps réel (qPCR) ……..... 66
III.1.2.1. Préparation du mix……..... 66
III.1.2.2. Systèmes utilisés lors de la qPCR……..... 67
III.1.2.3. Ajout des ADNs au mix……..... 68
III.1.2.4. Programmation et lancement de la qPCR…….... 68
III.1.3. PCR standard……..... 69
III.1.3.1. Préparation du mix……..... 69
III.1.3.2. Système utilisé lors de la PCR……..... 70
III.1.3.3. Ajout des ADNs aux mix……..... 70
III.1.3.4. Programmation et lancement de la PCR standard…….... 71
III.1.3.5. Électrophorèse……..... 72
III.1.4. Séquençage de l'ADN……..... 75
III.1.4.1. Protocole……..... 75
III.1.4.2. Traitement et analyse des données……. 80
III.2. Recherche de *Yersinia pestis* (la peste) …….... 82
III.2.1. Identification des ectoparasites……..... 82
III.2.2. Extraction de l'ADN……..... 86
III.2.3. PCR en temps réel (qPCR) ……..... 87
III.2.3.1. Préparation du mix……..... 87
III.2.3.2. Systèmes utilisés lors de la qPCR……..... 87
III.2.3.2.1. Système pour la détection de de *Yersinia pestis*…….... 87
III.2.3.2.2. Systèmes de contrôles……..... 88
III.2.3.3. Ajout des ADNs au mix……..... 89
III.2.3.4. Programmation et lancement de la qPCR…….... 89
III.2.4. PCR nichée ……..... 89
III.2.4.1. Préparation du mix et rajout des ADN ……..... 90
III.2.4.2. Système utilisé lors de la PCR ……..... 90
III.2.4.3. Programmation et lancement de la PCR ……..... 91
IV. Analyses statistiques……..... 91

CHAPITRE 3 : RESULTATS

I. La leptospirose ……..... 92
I.1. Description de la population animale étudiée……..... 92
I.1.1 Répartition des animaux prélevés en fonction du sexe……..... 92
I.1.2 Répartition des animaux prélevés en fonction de l'âge……..... 92
I.1.3 Répartition des animaux prélevés en fonction de la race……..... 93
I.1.4 Répartition des animaux prélevés en fonction du statut clinique……..... 94
I.2 Résultats des analyses de laboratoire……..... 94
I.2.1 Echantillons analysés……..... 94
I.2.2 Détection moléculaire par qPCR……..... 94
I.2.2.1 Les résultats obtenus chez les chiens……..... 94
I.2.2.2 Les résultats obtenus chez les chats……..... 96
I.2.3 Détection moléculaire par PCR Standard et séquençage……..... 96
I.3 Interprétation des résultats obtenus……..... 98
I.3.1 Etude de l'effet de quelques paramètres sur le taux de positivité chez l'espèce canine……..... 98
I.3.1.1 Répartition des positifs en fonction du sexe……..... 98
I.3.1.2 Répartition des positifs en fonction de l'âge……..... 99
I.3.1.3 Répartition des positifs en fonction de la race……..... 99
I.3.1.4 Répartition des positifs en fonction du statut clinique……..... 99
II. La peste ……..... 100
II.1. Description de la population animale étudiée……..... 100
II.1.1 Répartition des animaux prélevés en fonction du sexe……..... 100

II.1.2 Répartition des animaux prélevés en fonction de l'âge……..... 100
II.1.3 Répartition des animaux prélevés en fonction de la race……..... 101
II.1.4 Répartition des animaux prélevés en fonction du statut clinique……..... 102
II.1.5 Répartition des animaux prélevés en fonction de l'infestation par les ectoparasites..... 102
II.2 Résultats de l'identification morphologique des ectoparasites ……..... 103
II.3 Résultats des analyses de laboratoire…..……..... 106
II.3.1 Echantillons analysés……...……..... 106
II.3.2 Résultats moléculaires.……..... 107
II.3.2.1 Résultats de la qPCR.……..... 107
II.3.2.2 Résultats de la PCR nichée.……..... 108

CHAPITRE 4 : DISCUSSION **109**

I. La leptospirose ……..... 109
II. La peste ……..... 119

Conclusion et perspectives……..... **126**

Références bibliographiques……..... **127**

Annexes

Liste des tableaux

Tableau 1	:	Classification sérologique : Principaux sérogroupes et quelques sérovars de *Leptospira interrogans* sensu lato…..…...…...…...…...…...…...…...…...…...	4
Tableau 2	:	Classification Génomique de leptospira : Quelques Génomospécies de *Leptospira* et distribution de quelques sérogroupes..…...…...…...…...…...…...…..….....	6
Tableau 3	:	Enquêtes de séroprévalence sur la leptospirose canine dans les pays d'Afrique…...	18
Tableau 4	:	Nombre de cas de peste observés en Algérie depuis 1935..…...…...…...…...…	37
Tableau 5	:	Classement des souches de *Yersinia pestis* en trois biovars..…...…...…...….....	38
Tableau 6	:	Réémergence récente de la peste dans le monde..…...…...…...…...…...…...…	45
Tableau 7	:	Produits du mix de qPCR…...…...…...…...…...…...……..	66
Tableau 8	:	Amorces et sondes utilisées pour l'identification des pathogènes lors de la qPCR..	68
Tableau 9	:	Volumes des produits du mix en utilisant le master mix……...	70
Tableau 10	:	Amorces utilisées pour l'identification des leptospires lors de la PCR standard…..	70
Tableau 11	:	Programme du Thermocycleur de la PCR standard…...…...…...…...…...….....	71
Tableau 12	:	Produits du mix de séquence…...…...…...…...…...…...……...	76
Tableau 13	:	Programme du Thermocycleur pour l'amplification des produits de PCR purifiés…..	77
Tableau 14	:	Produits du mix de qPCR…...…...…...…...…...…...……..	87
Tableau 15	:	Amorces et sondes utilisées pour l'identification de *Yersinia pestis* lors de la qPCR….	88
Tableau 16	:	Amorces et sonde utilisées pour l'identification de l'Actine lors de la qPCR……..	88
Tableau 17	:	Amorces et sonde utilisées pour l'identification du TISS lors de la qPCR……...	89
Tableau 18	:	Le couple d'amorces utilisé pour l'identification de *Yersinia pestis*……	90
Tableau 19	:	Programme du Thermocycleur de la PCR…...…...…...…...…...…...……...	91
Tableau 20	:	Séquences prêtes pour l'analyse et l'alignement sur le BLAST NCBI…….	97
Tableau 21	:	Récapitulatif de l'infection à *Leptospira* chez les chiens selon le sexe……..…	98
Tableau 22	:	Récapitulatif de l'infection à *Leptospira* chez les chiens selon l'âge……	99
Tableau 23	:	Comparaison entre les effectifs des différentes puces récoltés chez les chiens et les chats de la wilaya d'Alger……	104
Tableau 24	:	Effectifs des puces de chiens et les chats destinés aux analyses moléculaires……..	106
Tableau 25	:	Différentes études moléculaires réalisées sur les urines de chiens dans le monde…	113

Liste des figures

Figure 1	**:**	L'observation originale de Stimson de Spirochètes dans le tissu rénal……...….	3
Figure 2	**:**	Observation des leptospires au microscope à fond noir ……..	7
Figure 3	**:**	Observation des leptospires au microscope électronique à balayage ……..	7
Figure 4	**:**	Diagramme schématique d'un spirochète……..	7
Figure 5	**:**	Les différentes étapes de l'infection par des leptospires……..	13
Figure 6	**:**	Exemple de variabilité de réponse immunitaire face à une contamination par des leptospires…….	15
Figure 7	**:**	Distribution géographique de la leptospirose humaine aiguë et de l'infection animale à *Leptospira spp.* confirmée en Afrique……..	17
Figure 8	**:**	Nombre de cas humains touchés par la leptospirose en Algérie…….....	17
Figure 9	**:**	Transmission de la leptospirose entre les espèces réservoirs et les hôtes accidentels……..……..…….	20
Figure 10	**:**	Chronologie d'apparition des leptospires dans les différents liquides biologiques..	25
Figure 11	**:**	Observations microscopiques directes ou après colorations des leptospires…….....	26
Figure 12	**:**	Test d'agglutination microscopique positif……...	29
Figure 13	**:**	Observation sous microscopie électronique à balayage de *Yersinia pestis*……...	39
Figure 14	**:**	Observation sous microscopie électronique à balayage de *Yersinia pestis* au Grossissement 5 000 X……..……..…….	39
Figure 15	**:**	Carte géographique illustrant les pays touchés par la peste……..	43
Figure 16	**:**	Carte géographique illustrant la répartition géographique avec nombre de cas de la peste au cours des 20 dernières années……..……..	44
Figure 17	**:**	Distribution géographique des cas de peste, région d'Oranie, juin-juillet 2003…..	45
Figure 18	**:**	Voies de transmission de la peste dans un foyer épidémique……...	46
Figure 19	**:**	Voies de transmission de la peste illustrant même les cas de transmission sporadique……..……..……	47
Figure 20	**:**	Différentes espèces de puces……..……..……	51
Figure 21	**:**	*Yersinia pestis* dans un frottis sanguin coloré au Gram……	55
Figure 22	**:**	*Yersinia pestis* dans un frottis sanguin coloré à la Wright (coloration bipolaire)….	55
Figure 23	**:**	Clonies de *Yersinia pestis* sur gélose au sang après 72 heures d'incubation……	55
Figure 24	**:**	Colonies de *Yersinia pestis* isolées à partir de puces entières sur une gélose CIN...	55
Figure 25	**:**	Colonies filamenteuses de *Yersinia pestis* dans un bouillon de NaCl……...	55

Figure 26 : Lieu de l'étude : Willaya d'Alger…….……... 60
Figure 27 : Identification des animaux prélevés…… 62
Figure 28 : Prélèvement d'urine par cytosynthèse……..……. 63
Figure 29 : Prélèvement de la rate……..……..... 63
Figure 30 : Recherche des puces sur les animaux……..…… 64
Figure 31 : Centrifugation des urines pour récupérer le culot et ajout du PBS..……..……... 65
Figure 32 : Extracteur automatique EZ1……..……..... 65
Figure 33 : Etapes de la préparation du Mix……..……..... 67
Figure 34 : Équipement de qPCR utilisé à l'URMITE……..…….. 68
Figure 35 : Programme de la PCR en temps réel (protocole Roche) ……..… 69
Figure 36 : Équipement de la PCR standard (Thermocycleur) ……..……. 71
Figure 37 : Schéma illustrant les étapes de la préparation du gel d'Agarose…….. 72
Figure 38 : Préparation du gel d'Agarose et dépôt des échantillons……... 74
Figure 39 : Imageur moléculaire pour la lecture du gel d'électrophorèse…….. 74
Figure 40 : Visualisation du gel……..……..... 74
Figure 41 : Purification des produits de PCR……..……..... 76
Figure 42 : Préparation de la plaque de Sephadex……..……... 78
Figure 43 : Purification de la réaction de séquence……..……... 79
Figure 44 : Equipement du séquençage……..……..... 80
Figure 45 : Analyse des séquences par le BLAST de NCBI……..……. 81
Figure 46 : Préparation et traitement des puces pour l'identification morphologique…… 82
Figure 47 : Equipement de l'identification morphologique des puces…… 83
Figure 48 : Morphologie externe d'une puce femelle « *Ctenocephalides felis* »…… 84
Figure 49 : Principaux critères de diagnose de *Xenopsylla chéopis* et de *Pulex irritans* …...… 84
Figure 50 : Principaux critères de diagnose de *C. felis* et *C. canis*…….……. 85
Figure 51 : Incision des puces sur deux parties……..……. 86
Figure 52 : Incubation des échantillons dans un bain sec à 56°C pendant toute la nuit (over-night) ……..……...……... 86
Figure 53 : Répartition de la population étudiée en fonction du sexe……. 92
Figure 54 : Répartition de la population étudiée en fonction de l'âge……. 93
Figure 55 : Répartition de la population étudiée en fonction de la race…….. 93
Figure 56 : Les courbes d'amplification du gène *16S rRNA* de *Leptospires pathogènes* par qPCR chez les chiens…….……... 95

Figure 57 : Les courbes d'amplification du gène *hsp* de *Leptospira interrogans* chez les chiens par qPCR…… 95

Figure 58 : Gel de PCR montrant les bandes positives après amplification du gène *rpoB* …... 96

Figure 59 : Correction des séquences obtenues par le logiciel Chroma-spro…….. 97

Figure 60 : Répartition des chiens positifs en fonction du sexe…….. 98

Figure 61 : Répartition de la leptospirose en fonction de l'âge……... 99

Figure 62 : Répartition de la population étudiée en fonction du sexe……. 100

Figure 63 : Répartition de la population étudiée en fonction de l'âge……. 101

Figure 64 : Répartition de la population étudiée en fonction de la race…….. 101

Figure 65 : Répartition de la population étudiée en fonction du statut clinique…….. 102

Figure 66 : Répartition de la population étudiée en fonction de la présence ou l'absence de puces…… 103

Figure 67 : Répartition des puces récoltées et identifiées chez les chiens et les chats…… 104

Figure 68 : Puce femelle de *Ctenocephalides canis* observées au Gr. 100x sous stéréomicroscope……. 105

Figure 69 : Puce femelle de *Ctenocephalides canis* observées au Gr. 100x sous stéréomicroscope……. 105

Figure 70 : Puce mâle (à gauche) et puce femelle (à droite) de *Xenopsylla cheopis* observées au Gr. 100x sous stéréomicroscope…….. 105

Figure 71 : Puce avant (à gauche) et après (à droite) la technique d'éclaircissement…… 106

Figure 72 : Résultats de la Qpcr après amplification du gène *pla* de *Yersinia pestis* dans les rates de chiens et de chats……... 107

Figure 73 : Résultats de la Qpcr après amplification du gène *pla* de *Yersinia pestis* dans les puces de chiens et de chats……... 107

Figure 74 : Les courbes d'amplification du système TISS par qPCR……. 108

Figure 75 : Les courbes d'amplification du système B-actine par qPCR……... 108

Figure 76 : Détection moléculaire de l'ADN de *Leptospira* spp. dans les urines de chien dans le monde……... 112

Les figures (27-76) sont originales.

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
C° : degré **C**elsius
C. canis : *Ctenocephalides canis*
C. felis : *Ctenocephalides felis*
Ct : Threshold cycle, seuil de cycle ou seuil de détection
dNTP : 2'-désoxyribose Nucléoside TriPhosphate
Ech : Echantillon
EDS : Eau distillée ultra pure exempte de ADNase et ARNase
EDTA : Ethylène-Diamine-TétraAcétate
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Fig. : figure
g : gramme
Gr. : grossissement
IC : Intervalle de confiance
LPS : lipopolysaccharide
MAT : Test d'agglutination microscopique
MgCl2 : Chlorure de Magnésium
Min : minute
mmol/L : millimole/Litre
NS : non significatif
P : Primer ou amorce
pB: paires de Base
PBS : Tampon phosphate-buffered saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PM : Poids moléculaire
qPCR: Real-time PCR
T+: Témoin positif
T- : Témoin négatif
Tab. : tableau
TBE : Tris Borique acide EDTA
Tm: Température de Melting (hybridation)
tr / min : tour par minute
Sec : seconde
UDG : Uracyl ADN Glycosilase
URMITE : Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Tropicales Emergentes
UV : Ultra-violet
***X. cheopis* :** *Xenopsylla cheopis*
µg : microgramme ; **µl :** microlitre ; **µm:** micromètre
% : pourcentage

INTRODUCTION GENERALE

Les zoonoses représentent un taux important du total des déclarations annuelles des maladies humaines à déclaration obligatoire en Algérie (INSP, Algérie). Les risques de transmission de ces maladies restent élevés en raison de la présence de rongeurs, de chats et de chiens errants mais aussi d'insectes, principaux vecteurs de transmission (Mani et Maguire, 2009). Ces pathologies demeurent présentes, malgré les diverses campagnes d'information, de sensibilisation et de prévention ; ce qui est bien sur inquiétant et considéré comme de véritables problèmes de santé publique. La recrudescence d'animaux errants est remarquée partout dans le pays, particulièrement dans les grandes villes (EPIC-H.U.P.E). Le contact avec ces animaux nocifs dont les antécédents médicaux et comportementaux sont inconnus devient important ces dernières années, parce qu'ils sont de plus en plus récupérés et adoptés par des propriétaires ; qui ignorent malheureusement le danger que peuvent représenter ces animaux en leur transmettant des maladies graves (Mayr, 1993). Parmi les maladies infectieuses zoonotiques graves, négligées et classées ces dernières années comme maladies émergentes et réémergentes nous citons la peste et la leptospirose (Morse, 2014 ; Chikeka et Dumler, 2015), deux maladies sur lesquelles nous avons peu d'informations en Algérie. Les chiens et les chats errants vivant dans des conditions de non salubrité et en étant en contact avec des rongeurs, principaux réservoirs de ces zoonoses assez redoutables, sont à leur tours exposés à ce genres d'agents pathogène et complète le cycle épidémiologique et ainsi transmettre ces maladies à l'homme et d'autres animaux (Steneroden et *al*., 2011 ; Chomel, 2014 ; Rabiee et *al*., 2018).

Nous avons mené une étude, afin de mettre en évidence l'agent responsable de la peste et de la leptospirose dans la population errante de l'espèce canine et féline dans la région d'Alger et montrer ainsi le rôle que peuvent jouer ces animaux autant que réservoirs. La recherche a été réalisée en utilisant des méthodes moléculaires (PCR conventionnelle, PCR en temps réel et séquençage), des techniques rapides, sensibles et spécifiques à la fois (Jaton et Greub, 2007). L'avantage de ces techniques, consiste aussi dans leur capacité à traiter des prélèvements de choix, prenant en compte la notion du tropisme bactérien pour chaque maladie étudiée. Nous avons choisi dans notre étude des tissus animaux, liquide biologie ainsi que des ectoparasites.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1 : La leptospirose

Introduction

La leptospirose est une maladie émergente qui touche de nombreuses espèces animales domestiques et sauvages (Lim, 2001 ; Bharti et *al*., 2003 ; Levett, 2004 ; Guerra et *al*., 2009 ; Adler, 2015). Elle affecte aussi la population humaine et reconnue comme la zoonose la plus répandue dans le monde (Adler, 2015). C'est une maladie qui se produit dans les milieux urbains et ruraux (Vinetz et *al*., 1996 ; Vinetz, 2001 ; Bharadwaj et *al*., 2002). Les personnes affectées sont principalement des agriculteurs, des pêcheurs, des vétérinaires et des personnes travaillant dans les égouts et les abattoirs (Brown et *al*., 2011). Cette zoonose est provoquée par des spirochètes pathogènes du genre *Leptospira* qui colonisent les tubules rénaux où ils se reproduisent avant d'être excrétés par les urines (Levett, 2001). Les urines infectées ou l'eau contaminée sont des sources d'infection par la leptospirose et *Leptospira* peut pénétrer dans le corps des hôtes mammifères par des lacérations de la peau, la muqueuse, la conjonctive et l'inhalation d'aérosols (Baron, 1996 ; Musso et La Scola, 2013). Certains animaux hôtes tels que les chiens peuvent avoir une forme asymptomatique ou peuvent souffrir d'un large éventail de manifestations cliniques, y compris une insuffisance hépatique et rénale et une hémorragie pulmonaire sévère (Ko et *al*., 2009). Les chiens porteurs asymptomatiques et chroniques peuvent être des hôtes d'entretien agissant comme des sources d'infection et posent donc un problème de santé publique (Muñoz-Zanzi et *al*., 2014 ; Llewellyn et *al*., 2016). Auparavant, on pensait que les chats domestiques étaient résistants à la leptospirose et de nombreux praticiens ne pensent pas à la leptospirose féline dans le diagnostic différentiel avec d'autres maladies (Arbour et *al*., 2012). Cependant, des rapports récemment publiés sur la leptospirose féline concluent que les chats sont exposés à *Leptospira* et peuvent jouer un rôle dans l'épidémiologie de cette maladie (Azócar-Aedo et *al*., 2014 ; Rodriguez et *al*., 2014). Le contrôle de la leptospirose est largement tributaire des mesures d'hygiène générale et la lutte contre les animaux réservoirs (Lim, 2001). Les vétérinaires jouent un rôle important dans la santé publique en fournissant des conseils et des informations sur les facteurs de risque et les mesures de prévention et de contrôle (Guerra et *al.*, 2009). En tant que maladie tropicale négligée, la leptospirose est de plus en plus observée dans les établissements urbains, en particulier dans les bidonvilles des pays en développement (Ko et *al*., 2009). La prévalence de la leptospirose animale en Algérie est inconnue. La difficulté de diagnostic de la maladie couplée à son impact sur la santé animale aussi bien que sur la santé humaine nous a pousser à l'étudier. Ainsi, déterminer le rôle des chiens et chats errants dans la transmission de cette pathologie, étant donné la recrudescence de ces animaux en particulier dans les pays en voie de développement.

I. Aspect historique

Dans la langue chinoise, des noms anciens existaient pour désigner la leptospirose, tels que "jaunisse des cultivateurs de riz". Au Japon, les noms traditionnels de la maladie étaient "fièvre des sept jours" ou "fièvre d'automne". Ces fièvres étaient associées avec la saison, la profession, ou avec la région. Plus tard, en Europe, au Japon, en Australie et ailleurs, des associations entre la maladie et la profession ou l'environnement ont été reconnues ("Maladie des coupeurs de canne à sucre", "Maladie des élevages de porcs" ou "Fièvre de la boue"), longtemps avant que l'étiologie de la maladie ne soit connue (Faine et *al*., 1999). Dans ces dénominations empiriques apparaissent déjà des éléments essentiels de l'épidémiologie de la leptospirose.

Sur le plan clinique, les premières individualisations de la maladie datent des années 1880 (Landouzy, 1883). En 1886 à Heidelberg en Allemagne, Adolf Weil décrit pour la première fois la maladie de manière claire et irréfutable dans un article intitulé : « Au sujet d'une maladie infectieuse caractéristique qui provoque splénomégalie, néphrite et ictère». Suite à la description de la forme grave de la leptospirose humaine causée par le sérogroupe Icterohaemorrhagiae, elle a été nommée Maladie de Weil (Faine et *al*., 1999). En 1907, Stimson par observation à la coloration argentique 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).

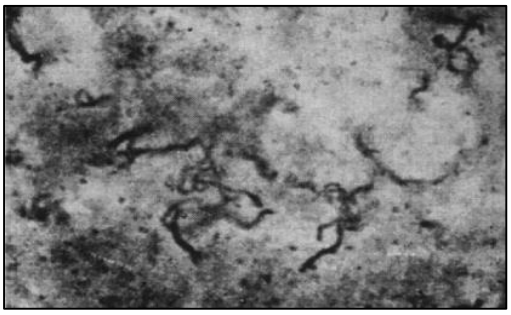


Figure 1 : L'observation originale de Stimson de Spirochètes dans le tissu rénal (Adler, 2015)

Ce sont les Japonais Inada et Ido qui en 1916 ont identifié et cultivé l'agent étiologique sous le nom de *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* à partir de sang de mineurs présentant un ictère infectieux (Inada et *al*., 1916). Dans une remarquable série d'études, le même groupe montrait, entre 1916 et 1918, l'infection expérimentale et la protection passive du cobaye, les modes d'infection, le rôle du rat comme réservoir, la distribution de la bactérie dans les tissus, son excrétion, ainsi que ses caractéristiques morphologiques (Ido et *al*., 1917 ; Kobayashi, 2001). En 1917, Nuguchi a créé le terme *Leptospira* pour remplacer celui plus général de *Spirochaeta*. (Levett, 2001). En 1918, Martin et Pettit démontrent la présence d'anticorps agglutinants dans le

sérum des malades et décrivent la réaction d'agglutination lyse, rebaptisée plus tard "Micro Agglutination Test" ou MAT, toujours méthode de référence pour le diagnostic sérologique de la maladie (Lamrani, 2008). Il faut attendre 1933 et les travaux de Klarenbeek pour mettre en évidence un premier agent de leptospirose chez les animaux domestiques : *Leptospira interrogans* serovar canicola chez le chien (Klarenbeek et Schuffner, 1933). En 1938, l'infection chez le chat et le portage rénal sont finalement décrits pour la première fois (Esseveld et Collier, 1940).

II. Etiologie de la leptospirose

II.1. Systématique

Les leptospires sont des bactéries appartenant au genre *Leptospira.* Ce genre appartient à l'ordre des *Spirochaetales* et à la famille des *Leptospiraceae*, qui est divisée en trois genres : *Leptonema*, *Leptospira* et *Turneria* (Baraton, 1995).

II.2. Classification

II.2.1. Classification sérologique

Avant 1983, la classification était basée uniquement sur des critères sérotypiques selon la réaction de Martin et Pettit (Denis et *al*., 2016). Elle permettait de répartir les souches de leptospires en plusieurs sérovars, eux-mêmes regroupés en deux espèces :

- L'espèce *Leptospira interrogans* comprenant tous les sérovars pathogènes pour l'homme et/ou l'animal.
- L'espèce *Leptospira biflexa* comprenant les sérovars non pathogènes isolées de l'eau, de la boue, et parfois de l'homme ou de l'animal (Perolat et *al*., 1994).
- L'espèce *Leptospira parva*, espèce non pathogène isolée de l'eau, était une troisième espèce qui faisait partie de la classification. En 2005, cette espèce a été classée dans un nouveau genre avec la dénomination de *Turneriella parva* (Levett et *al*., 2005).

Il existe ainsi 250 sérovars regroupés en 25 sérgroupes au sein des leptospires pathogènes (Tab. 1) (Adler et De la Peña, 2010) et 60 sérovars de leptospires saprophytes.

Tableau 1 : Classification sérologique : Principaux sérogroupes et quelques sérovars de *Leptospira interrogans* sensu lato (Levett, 2001)

Sérogroupes	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

II.2.1. Classification génomique

Dans les dernières années, 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). Celle-ci a permis de reconnaître 21 espèces ou « *genomospecies* » (Denis et *al*., 2016). On définit une espèce génomique comme le regroupement de souches ayant entre elle un degrés d'homologie en hybridation ADN-ADN

égal ou supérieur à 70% et un mésappariement inférieur à 5% parmi les hybrides (Kang et *al*., 2007). Actuellement, plus de 300 sérovars de leptospires distincts sont reconnus et regroupés en 21 espèces (Ko, 2009 ; Saito et *al*., 2013). Cette classification peut être source de confusion car un même sérogroupe peut se retrouver dans plusieurs espèces génomiques. Le serougroupe « Icterohaemorrhagiae » est par exemple présent dans les espèces *Leptospia interrgans,* et *Leptospira Kirschneri* (Tab. 2). Néanmoins, le manque de corrélation systématique entre les espèces génomiques et les sérovars fait que la classification sérologique est encore très utilisée dans les études cliniques et épidémiologiques (Bharti et *al.* 2003 ; Denis et *al*., 2016).

Les leptospires sont classés en trois sous-groupes : les espèces pathogènes au nombre de neuf, les espèces saprophytes au nombre de six et sont toutes non pathogènes et les espèces intermédiaires au nombre de six et sont distinctes des souches pathogènes et saprophytes d'après le séquençage de leur ARN ribosomial 16S, et pour les quelles aucune activité pathogène n'a été démontrée expérimentalement (Cerqueira et Picardeau, 2009).

Tableau 2 : Classification Génomique de *Leptospira* : Quelques Génomospécies de *Leptospira* et distribution de quelques sérogroupes (Levett, 2001)

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

II.3. Caractères morphologiques et structurales

Les leptospires ne prennent pas la coloration Gram, en raison de la structure particulière de leur paroi et leur observation se réalise qu'au microscope optique à fond noir (Fig. 2). Comme l'indique leur étymologie : « lepto » = fin ou grêle et « spira » = spire. Les leptospires sont de petites bactéries spirochètes. Elles sont hélicoïdales, flexibles et grêles. Leur diamètre est de 0,1 à 0,2 µm et leur longueur est comprise entre 6 et 20 µm (Hovind-Hougen, 1981 ; Frency et *al.*, 2007). Les leptospires sont des bactéries longues, leur corps est incurvé à ses deux extrémités pour former des crochets (Fig. 3).

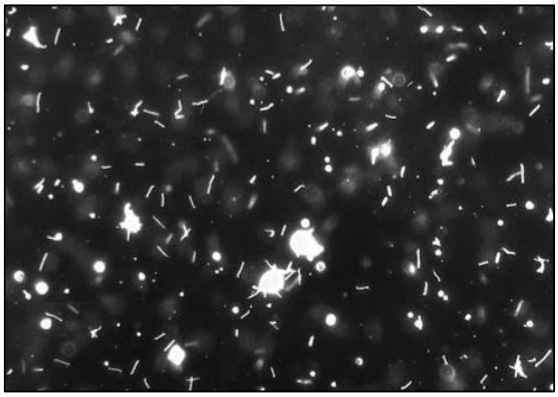


Figure 2 : Observation des leptospires au microscope à fond noir **(**Gillespie et Hawkey, 2006)

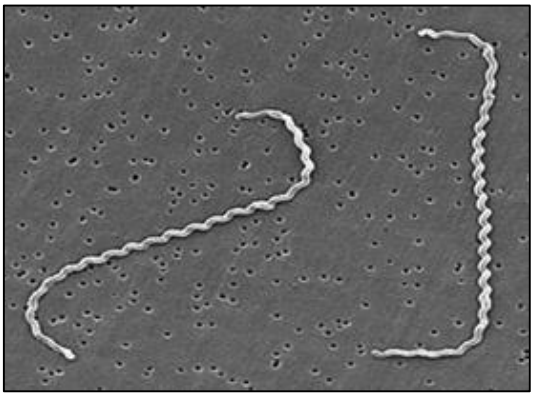


Figure 3 : Observation des leptospires au microscope électronique à balayage (Levett, 2001)

Les leptospires possèdent une double membrane externe lipidique, qui entoure la cellule bactérienne comme une gaine. L'espace entre la membrane cellulaire protoplasmique et cette gaine est appelé périplasme, qui contient les flagelles périplasmiques ou endoflagelles (Fig. 4), permettant la motilité (Charon et Goldstein, 2002). Chez les *Leptospiraceae*, le diamètre des deux flagelles est d'environ 0,1 µm pour 10-20 µm de long (Charon et Goldstein, 2002). Les leptospires peuvent faire trois types de mouvements (une rotation autour de leur grand axe, une translation et une flexion/ondulation), ce qui leur permet des déplacements dans des milieux visqueux et semi-solide (Wolgemuth, 2016).

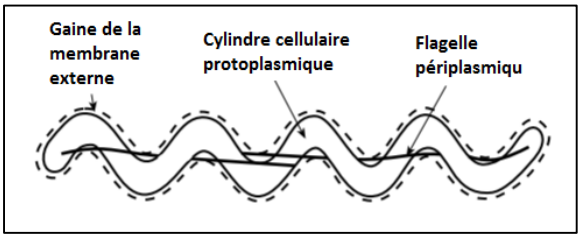


Figure 4 : Diagramme schématique d'un spirochète (Charon et Goldstein, 2002)

Comme chez les bactéries Gram négatif, le lipopolysaccharide (LPS) est le composant lipidique principal de la couche externe de la membrane externe de *Leptospira* (Haake et Matsunaga, 2010). Il constitue son principal antigène (Murray et *al*., 2010), tandis que les lipoprotéines sont les protéines de surface de la membrane externe les plus abondantes et les plus exposées.

Le LPS est l'antigène le plus immunogène de *Leptospira* et est responsable de la spécificité sérovar/sérogroupe. Le LPS est généralement composé d'un lipide A, responsable de l'activité endotoxique et servant d'ancrage dans la membrane bactérienne, d'un core oligosaccharidique conservé, et d'un oligosaccharide ou polysaccharide appelé antigène O (Raetz et Whitfield, 2002). L'absence de gènes codant pour des sphingomyélinases dans le génome de *L. biflexa* (Picardeau et *al*., 2008) et par conséquent l'absence de ces protéines dans la membrane externe de cette bactérie non pathogène (Lee et *al*., 2000) laisse supposer que ces protéines ont un rôle dans la virulence de la bactérie (Adler et *al*., 2011).

II.4. Caractéristiques bactériologiques

II.4.1. Métabolisme

Les leptospires sont des bactéries aérobies strictes (Adler et De la Peña, 2010). Elles produisent à la fois des catalases et des oxydases. Les acides gras insaturés à longue chaîne sont la seule source de carbone et d'énergie pour ces bactéries. Ces acides sont métabolisés par bêta-oxydation (Hübener et Reiter, 1915). Les sources d'azote pour ces bactéries sont l'ammoniac, les sels d'ammonium et l'urée. Des facteurs de croissance sont indispensables tels que la vitamine B1, la vitamine B12, la thiamine, le tryptophane, la proline.. (Levett, 2001).

II.4.2. Culture

Les leptospires sont des bactéries fragiles pour lesquelles la croissance et la survie ne sont possibles que dans des conditions particulières. Leur culture in vitro est très difficile et lente et se réalise principalement sur le milieu EMJH (Ellinghausen-Mc-Cullough-Johnson-Harris), qui 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).

Les souches pathogènes ont un temps de génération d'environ 20 heures, tandis que les souches saprophytes ont une croissance plus rapide avec un temps de génération d'environ 5 heures (Faine, 1999). Ces deux groupes ont aussi des besoins nutritionnels différents et se distinguent sur d'autres caractères phénotypiques. La croissance des souches pathogènes est inhibée par la 8-azaguanine (un analogue de la purine), alors que les souches saprophytes croissent normalement en présence

de ce composé (Johnson et Rogers, 1964). La culture sur milieu solide est très lente (colonies en une vingtaine de jours au minimum), sauf pour les saprophytes (quelques jours) (Cinco, 1981). Les saprophytes peuvent croitre à faible températures (11-13 °C), leur plage de croissance optimale in vitro est de 28 à 30° C. Les leptospires pathogènes présentent également une croissance optimale in vitro à 28-30 ° C, elles peuvent pousser à 37 ° C, mais au contraire elles ne présentent pas une croissance à basse température. La plage de pH optimale pour la croissance est de 7,2 à 7,6 (Adler et De la Peña, 2010).

II.5. Conditions de survie dans l'environnement

Les leptospires survivent dans le milieu extérieur essentiellement dans les sols boueux, marécageux ou dans l'eau à l'abri des UV. Cette survie peut aller de quelques heures à quelques mois, selon la température, le pH, l'humidité, l'ensoleillement, la salinité, la richesse en matière organique ou encore la présence de composés inhibiteurs (Alexander et *al*., 1975 ; Henry et Johnson 1978). L'exposition des leptospires à une température de 40°C est délétère, et devient létale à 56°C. Outre la chaleur, les leptospires sont détruits par la dessiccation et le froid (nocif à 4°C et létal à -20°C). Les leptospires peuvent par contre survivre dans un environnement tempéré avec des températures comprises dans une fourchette de 0 à 25°C et un pH neutre voire légèrement alcalin soit de 6,8 à 7,4 (Levett, 2001).

II.6. Le génome de *Leptospira spp.*

Il y a environ 15 ans, la base moléculaire et cellulaire de la pathogénie de la leptospirose était pratiquement inconnue. La détermination de la première séquence génomique complète fut en 2003 et elle a été suivie ensuite rapidement par d'autres séquences du génome entier (Ren et *al*. 2003). Le génome de *Leptospira spp.* se compose de deux chromosomes circulaires qui ont une longueur cumulée varie de 3,9 à 4,6 Mb, une variation plus grande que celle observée dans d'autres spirochètes. Cette variabilité dans la longueur du génome confère aux bactéries une capacité à vivre dans divers environnements et de s'adapter à une large gamme d'hôtes (Picardeau et *al*., 2008). Grace à la technologie, le séquençage d'ADN de nouvelle génération a été largement utilisé pour effectuer plusieurs analyses comparatives de la diversité génétique entre les leptospires saprophytes et les leptospires pathogènes (Picardeau et *al*., 2008) et entre différentes espèces de leptospires pathogènes (Xu et *al*., 2016). Le séquençage de nouveaux isolats de *Leptospira* de diverses sources mondiales génère des données supplémentaires qui peuvent faciliter une meilleure compréhension de ce pathogène.

III. Pathogénie

III.1. Conditions de l'infection

III.1.1. Facteurs dépendants du pouvoir pathogène des leptospires

- ✓ **Spécificité des sérovars**

Chaque sérovar tend à être associé à un hôte particulier. Par exemple, le sérovar canicola est généralement associé au chien. Les ratons laveurs seraient le réservoir pour le sérovar grippotyphosa. Les rats pour icterohaemorragiae. 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. Cependant, un même sérovar peut se trouver chez plusieurs espèces et un même hôte peut héberger plusieurs sérovars (Levett, 2001).

Chaque sérogroupe possède une virulence particulière pour chaque espèce animale. Les sérovars ayant une action hémolytique varient d'une espèce animale à l'autre. Par exemple, le sérovar Canicola est associé à une phospholipase C et aura une virulence proportionnelle à la concentration en phospholipides de la membrane érythrocytaire de l'hôte. La virulence des sérovars Pomona, Ballum, Hardjo et Tarassovi est associée à une sphingomyélinase (Levett, 2001).

En pratique, on associe les phénomènes hémorragiques et l'ictère à Icterohaemorrhagiae et la néphrite à Canicola. Toutefois, les études cliniques chez le chien n'ont pas identifié d'association directe entre les systèmes affectés et les sérovars impliqués (Goldstein et *al*., 2006). Par contre, il semble que lorsque l'animal est infecté par le sérovar Icterohaemorrhagiae, il finit souvent par développer une hépatonéphrite suraiguë ou aiguë. Si l'infection se fait par Canicola, les chiens développent plutôt une néphrite aiguë (Langston et Heuter, 2003 ; Sessions et Greene, 2004).

- ✓ **Mobilité des leptospires**

La grande mobilité est en partie responsable de la pathogénicité et de l'échappement des leptospires aux défenses immunitaires de l'hôte, elles peuvent ainsi franchir les barrières cutanéo-muqueuses et se mouvoir dans des milieux tels que l'humeur aqueuse ou le corps vitré (Bharti et *al*, 2003). Sur les 4768 gènes identifiés dans la séquence génomique des leptospires, au moins 50 interviennent dans la motilité des leptospires (Bharti et *al*, 2003).

- ✓ **Capacité invasive des leptospires**

Un autre facteur qui semble avoir un rôle important dans la pathogénicité des leptospires est leur capacité d'invasion. Une protéine se liant à la fibronectine est spécifiquement exprimée à la surface des souches virulentes de *L. interrogans icterohaemorrhagiae*. Cette protéine a un rôle important

dans l'adhésion initiale des leptospires et dans leur invasion cutanée ou muqueuse (Bharti et *al*., 2003). Les leptospires virulents possèdent une importante capacité à adhérer aux différentes cellules voire de pénétrer à travers les cellules endothéliales et de dissocier les hépatocytes (Miyahara et *al*., 2014). Elles peuvent se fixer à l'aide de certains types d'adhésines bactériennes à des cadhérines endothéliales et induire l'adhésion à des cellules hôtes (Evangelista et *al*., 2014). 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*., 1986). 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

- Substances élaborées :

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 jouent un rôle direct dans le pouvoir pathogène. Des toxines agissent sur les vaisseaux capillaires entraînant des lésions endothéliales qui ont pour conséquence un œdème tissulaire et une diathèse hémorragique et qui peuvent 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, 2013).

Les hémolysines sont des toxines qui ont un rôle important dans la pathogénicité des leptospires (Cullen et *al*., 2003). Elles 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).

- 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).

Barnett et *al*. (1999) ont démontré que 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. 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. D'importantes quantités de complexes immuns circulants sont associées à des symptômes sévères (Tong et *al*., 1971).

III.1.2. Facteurs dépendants de la réceptivité et de la sensibilité de l'hôte

- ✓ **Le statut vaccinal**

La vaccination a un impact sur le développement et les conséquences de l'infection : un chien correctement vacciné présente des anticorps agglutinant la souche infectieuse, ce qui permet sa phagocytose après opsonisation (Fraga, 2011).

- ✓ **Le statut immunitaire et l'âge**

Un individu immunodéprimé est plus sensible à une infection 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).

L'importance de l'infection leptospirosique augmente avec l'âge du chien (Hennebelle et *al*., 2014).

III.2. Etapes de l'infection

L'infection leptospirosique passe par différentes étapes (Fig. 5). Elle débute par une **phase de contamination** au cours de laquelle les germes vont pénétrer dans l'organisme. Puis, par une **phase d'invasion** où les leptospires se multiplient dans le sang. Enfin, une **phase de colonisation** de différents organes, dont les tubules rénaux dans lesquels les leptospires vont se multiplier et être excrétés.

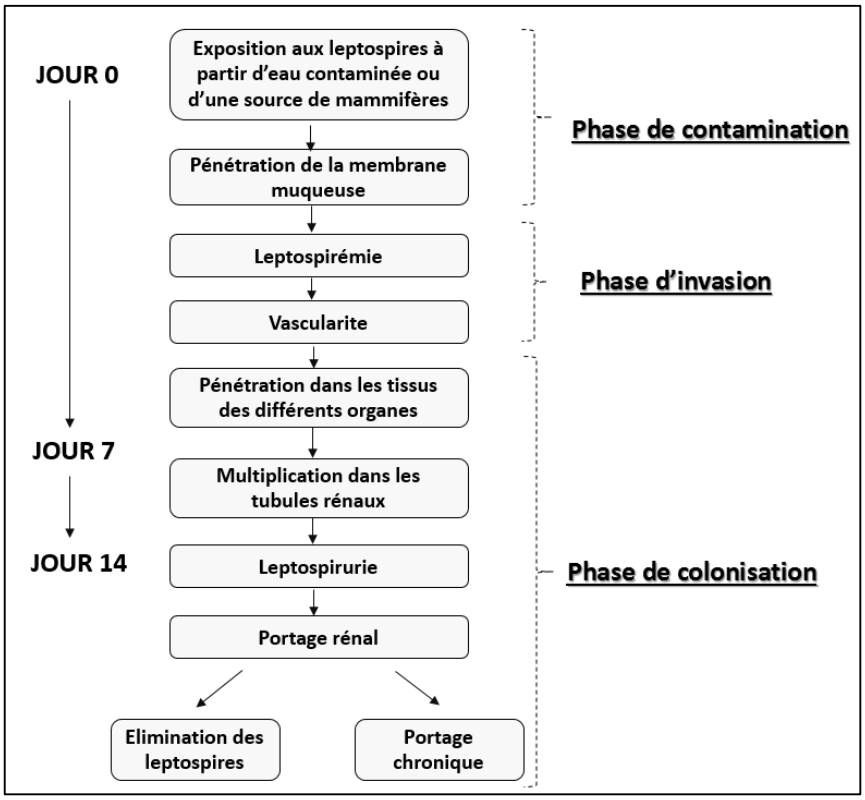


Figure 5 : Les différentes étapes de l'infection par des leptospires (Kososséy Vrain, 2004)

III.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 la peau lésée ou par les muqueuses, telles la conjonctive ou les voies digestives (Greenlee et *al*., 2005). Dans le système digestif, la pénétration se produit probablement au niveau de la muqueuse buccale ou œsophagienne, car les leptospires ne peuvent survivre dans un environnement acide. Les leptospires peuvent aussi traverser la peau saine et leur mobilité contribue à leur diffusion dans les tissus. Il n'y a pas d'afflux de cellules inflammatoires au niveau de la voie d'entrée de la bactérie (Abgueguen et Pichard, 2009). Des cas d'infection ayant une origine vénérienne ou placentaire ont été également rapportés (Ellis, 2015). Après avoir traversé la barrière muco-cutanée, les leptospires gagnent l'espace vasculaire qui constitue un milieu propice à leur multiplication.

III.2.2. Phase d'invasion

Après avoir pénétré dans l'hôte les leptospires pathogènes se propagent rapidement par voie hématogène (Fig. 5). La leptospirémie est variable et perdure de 4 à 12 jours suite à l'exposition initiale (Krishna, 2004).

Des signes cliniques généraux apparaissent tels que l'anorexie, léthargie et la fièvre.

Les toxines bactériennes entraînent des lésions des parois des capillaire sanguins ce qui provoque des saignements, une hyperfibrinolyse et une trombocytopénie pouvant aller jusqu'en une coagulation intravasculaire disséminés (Sessions et Greene, 2004 ; Chierakul et *al*., 2008).

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).

III.2.3. Phase de colonisation

Généralement, les leptospires se répliquent rapidement. La colonisation des organes commencent 24h à peine après le début de la bactériémie (Sykes et *al*., 2011). La leptospirose est une maladie touchant de nombreux organes. Elle affecte en particulier les reins et le foie ; moins fréquemment, la rate, les pommons, les endothéliums, l'uvée, la rétine, le squelette, le myocarde, les méninges, le pancréas et les organes génitaux peuvent aussi être atteints (Millet, 1998 ; Bernard, 1993). L'interaction des leptospires avec les cellules est à l'origine de coagulopathie, d'hypoxie tissulaire, d'agrégation plaquettaire avec activation du système de coagulation et de fibrinolyse (Chierakul et *al*., 2008).

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) (Fig. 6) (Levett, 2001). Cette réaction pourrait 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. 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 les cellules épithéliales des tubules rénaux. L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est fréquente puisque la colonisation rénale survient chez la majorité des animaux infectés (Azócar-Aedo et *al.*, 2014). Même si le chien survit à l'infection et est cliniquement guéri, il peut rester porteur de leptospires pendant plusieurs mois (Fig. 6). 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).

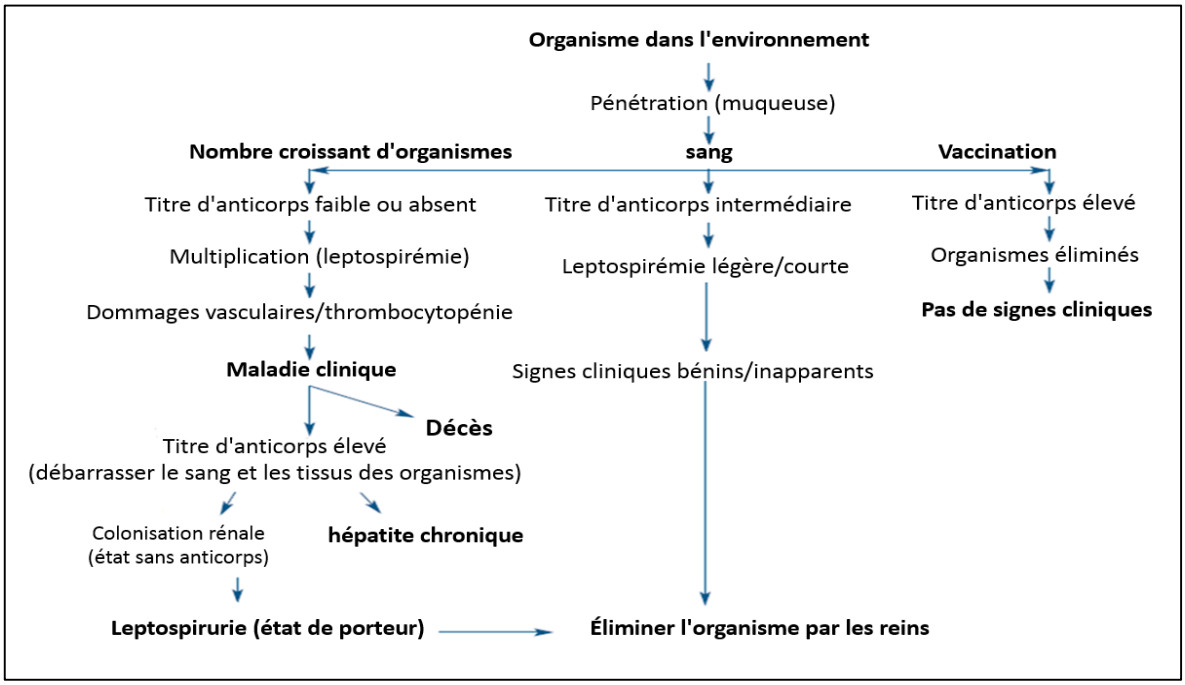


Figure 6 : Exemple de variabilité de réponse immunitaire face à une contamination par des leptospires (Sessions et Greene, 2004)

IV. Epidémiologie

IV.1. Epidémiologie descriptive

La leptospirose est une maladie bactérienne zoonotique. Dans la population humaine, les personnes vulnérables sont les agriculteurs et les habitants des bidonvilles urbains (Costa et *al.*, 2015). La leptospirose est décrite dans certaines professions exposées aux morsures de rats. L'homme se contamine le plus souvent par l'intermédiaire de milieux hydriques (étangs, rivières) lors d'activités de loisirs (baignade, pêche, voile) (Denis et *al.*, 2016). La leptospirose est une maladie saisonnière et les épidémies animales et humaines coïncident avec les périodes de précipitations importantes ou d'inondations (Lee et *al.*, 2014). 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).

IV.1.1 Répartition géographique

La leptospirose a une distribution mondiale et est plus répandue dans les régions tropicales que dans les pays tempérés (Everard et *al*., 1993; Ratnam, 1994). Ceci est attribué principalement à la longue survie des leptospires dans les environnements chauds et humides. La leptospirose n'est pas limitée aux pays en développement. Des examens rétrospectifs de l'épidémiologie de la maladie ont été rapportés en Irlande, au Danemark et en Italie (Pate et *al*., 2000 ; Holk et *al*., 2000 ; Ciceroni et *al*., 2000).

IV.1.2 Prévalence de la maladie

La prévalence de la leptospirose varie en fonction du biotope : le climat, la présence d'eau douce, et l'habitat qui jouent un rôle important dans le cycle épidémiologique de cette maladie (Levett, 2001). Dans le monde entier, on estime que la leptospirose affecte plus d'un million de personnes et entraîne 58 900 décès chaque année (Costa et *al*., 2015). Ces estimations placent la leptospirose en tant que la principale cause zoonotique de morbidité et de mortalité, qui restent plus élevées dans les régions les plus pauvres du monde et dans les zones où la surveillance n'est pas systématique (Costa et *al*., 2015). Pour diverses raisons, la leptospirose est négligée et fait par conséquent l'objet d'une sous-notification dans de nombreuses régions du monde (Ristow, 2007).
Des études montrent une prévalence élevée de la leptospirose chez les animaux et chez l'homme et l'Afrique présente une charge majeure à l'échelle mondiale (Pappas et *al*., 2008). L'incidence annuelle moyenne la plus élevée de la leptospirose se situe en Afrique à 95,5 pour 100 000 personnes, 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).
En Afrique, la leptospirose a été signalée dans presque toutes les zones géographiques (Fig. 7). Malgré sa charge élevée, la leptospirose n'est pas systématiquement diagnostiquée dans les hôpitaux africains. L'un des principaux facteurs limitant le diagnostic est la faible disponibilité d'isolats vivants de *Leptospira* servant au test d'agglutination microscopique (MAT) (Mgode et *al*., 2015). La sensibilisation à cette maladie fait également défaut parmi le personnel médical et le grand public, y compris les populations à haut risque telles que les travailleurs des abattoirs et les éleveurs (Mgode et *al*., 2015).

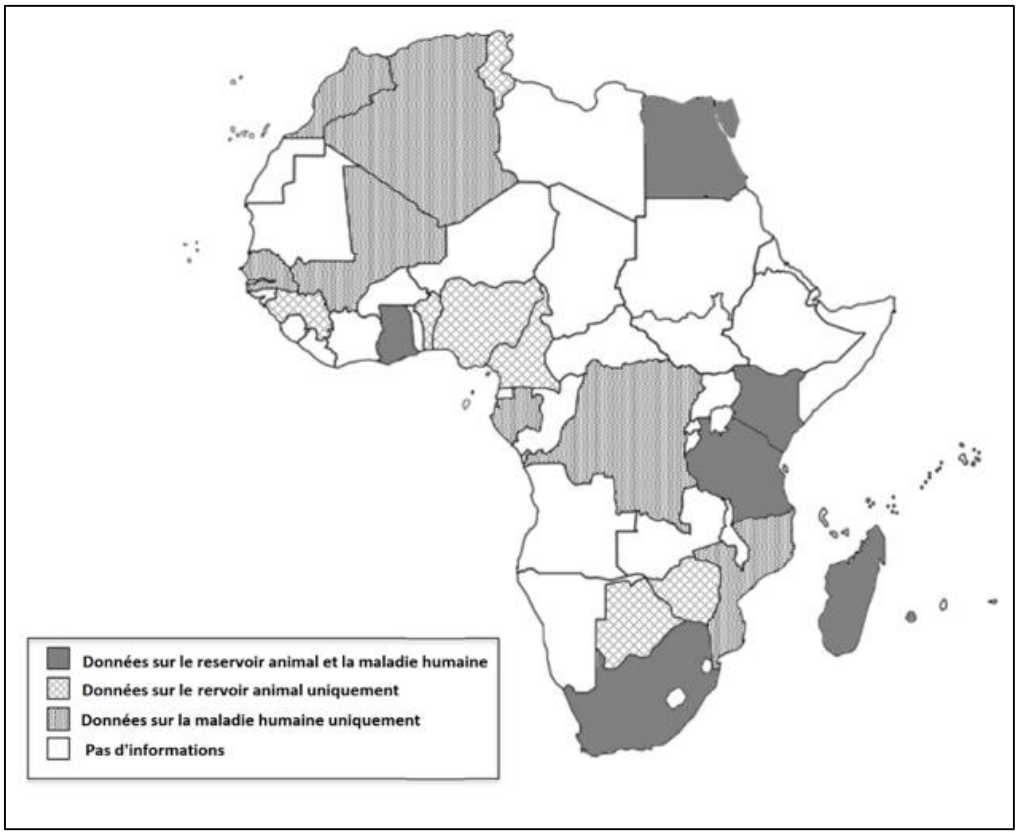


Figure 7 : Distribution géographique de la leptospirose humaine aiguë et de l'infection animale à *Leptospira spp.* confirmée en Afrique (Allan et *al.*, 2015)

En Algérie, la leptospirose humaine est une maladie à déclaration obligatoire selon l'arrêté ministériel du 17 novembre 1990. Le nombre de cas humains rapporté par le ministère de la santé et de la réforme hospitalière est représenté dans la figure ci-dessous (Ministère de la santé) :

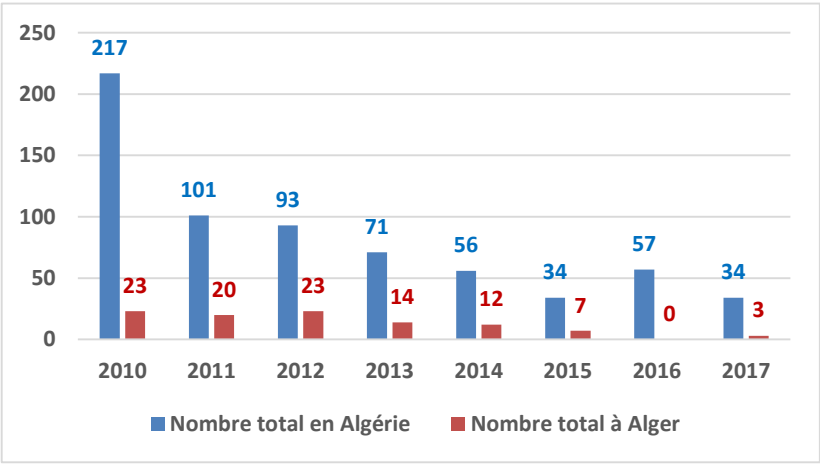


Figure 8 : Nombre de cas humains touchés par la leptospirose en Algérie (INSP Alger : Institut National de Santé publique)

La leptospirose est un problème de santé animale reconnu en Afrique (De Vries et *al*., 2014). Un large éventail d'animaux sylvatiques et domestiques sont des réservoirs de *Leptospira* dans la région (Moch et *al*., 1975 ; Halliday et *al*., 2013 ; Ajayi et *al*., 2017).

Bien que de nombreuses études de prévalence sur des chiens aient été réalisées dans d'autres continents, à ce jour, des données très limitées sur la leptospirose canine sont disponibles en Afrique (Roqueplo et *al*., 2015). Le peu d'études sur la prévalence de la leptospirose canine en Afrique sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Enquêtes de séroprévalence sur la leptospirose canine dans les pays d'Afrique

Région d'étude (pays)	**Année d'étude**	**Echantillons**			**Références**
		Sérums prélevés	**Résultats positifs**	**Prévalence (%)**	
Ethiopie	1975	—	—	**8.3%**	Moch et *al*.,1975
Afrique du Sud	1987	2	**2**	**100%**	De Lange et *al*., 1987
Pretoria (Afrique du Sud)	1992	400	**6**	**1,5%**	Myburgh et *al*., 1993
régions côtières d'Afrique du Sud	2008-2009	530	**25**	**4,7%**	Roach et *al*., 2010
Mahalla (Egypte)	2006-2007	25	**3**	**12%**	Felt et *al*., 2011
Zimbabwe	2012	250	**39**	**15,6%**	Dhliwayo et *al*., 2012
Maroc	2012	90	**24**	**28%**	Benkirane et *al*., 2014
Egypte	2015	168	**98**	**58.3%**	Samir et *al*., 2015

Chez les chats, plusieurs études sérologiques montrent que cette infection est assez répandue et la séroprévalence dans différents pays du monde varie entre 4.9 et 33.3% (Azócar-Aedo et *al*., 2014). En Afrique, les données concernant la prévalence de la leptospirose féline sont très limitées. La seule étude sérologique disponible, a été réalisée en Egypte en 2007, confirmant ainsi la positivité chez un chat parmi les deux examinés (Felt et *al*., 2011).

IV.2. Epidémiologie analytique

IV.2.1. Source de l'infection

La source de contamination est représentée par la population d'animaux infectés par la leptospirose. Ce sont des animaux malades mais surtout des animaux en incubation, porteurs sains qui ont, soit guéris cliniquement de la leptospirose, soit sont porteurs chroniques sans avoir jamais

exprimé de symptômes de la maladie (Ellis, 1981). La persistance des leptospires dans les reins est liée vraisemblablement à leur localisation intracellulaire qui leur assure une protection efficace contre les anticorps produits par la réaction immunitaire humorale de l'hôte et contre des éventuels traitements antibiotiques (Thiermann, 1984). Ainsi, l'urine constitue donc la matière infectante par excellence. D'autres secrétions et excrétions peuvent être source de contamination, ex : le lait, le sperme ou les sécrétions vaginales d'animaux infectés (Heinemann et *al*. 1999 ; Sessions et Greene, 2004).

La leptospirose animale ou humaine est essentiellement liée à l'environnement contaminé qui joue un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie en tant que source d'infection (ex : eaux douces, eaux d'égouts, sols boueux et aliments souillés) (Aviat et *al*., 2004).

IV.2.2. Mode de transmission

La contamination 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-Arthaud, 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 (éleveurs, vétérinaires, animaliers ou personnel d'abattoir…) (Heinemann et *al*. 1999 ; Sessions et Greene, 2004).

Les mêmes modalités de transmission existent chez les animaux. Ils se contaminent entre eux par contact direct avec les urines des congénères excréteurs, mais aussi par les eaux souillées (Faine, 1999). Les chiens par exemple deviennent infectés suite à l'exposition à l'urine contaminée des animaux sauvages (Fig. 9) (Brown et Prescott, 2008 ; Goldstein, 2010). Chez certaines espèces comme le porc ou les bovins, la transmission sexuelle est possible (Faine, 1999 ; Heinemann et *al*. 1999). La transmission verticale chez les bovins a été démontrée par l'isolement de souches du sérovar hardjo (sérogroupe Sejroe) chez des avortons mais aussi chez des fœtus normaux (Levett, 2001). La contamination néonatale voire congénitale a été décrite chez les rongeurs et même chez les animaux de production (Faine, 1987 ; Michel et *al*., 2001).

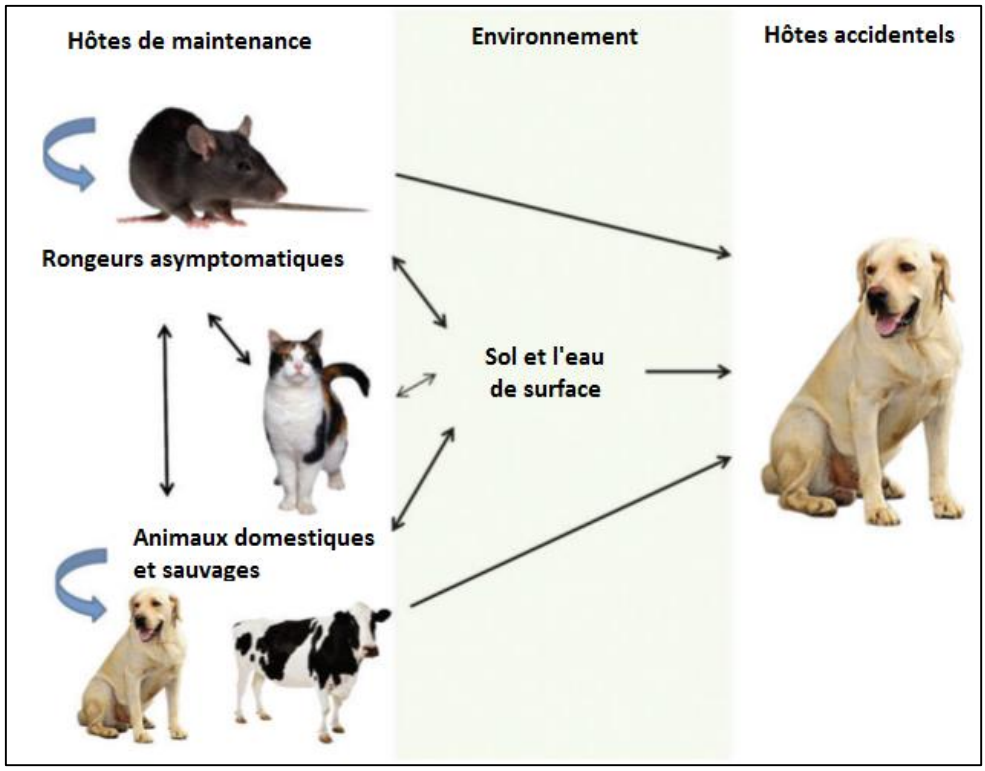


Figure 9 : Transmission de la leptospirose entre les espèces réservoirs et les hôtes accidentels (Schuller et *al*., 2015)

IV.2.3. Voies de pénétration

Les leptospires pénètrent très facilement dans les muqueuses ou dans la peau quand celle-ci est le siège de micro-lésions (Faine et *al*., 1999). Les leptospires développent un chimiotactisme intense pour l'hémoglobine et un chien porteur de lésions cutanées risque une contamination massive par les leptospires (Yuri et *al*., 1993). La zone privilégiée de passage des leptospires est l'espace interdigité dont le tégument est fragile et souvent le siège de ces microlésions (Kososséy Vrain, 2004).

Les muqueuses pituitaire et oculaire sont des portes d'entrée efficaces mais nécessitent un contact étroit de l'animal avec la matière virulente et ne sont donc que très rarement incriminées (Faine et *al*., 1999).

IV.2.4. Réservoirs de la leptospirose

En tout, 160 espèces de mammifères ont été recensées comme pouvant être infectées par les leptospires (Bharti et *al*., 2003 ; Acha et Szyfres, 2005 ; Espinosa-Martínez et *al*., 2015). Pour certaines d'entre elles, cette infection n'entraîne pas de troubles cliniques ce qui rend l'épidémiologie de la leptospirose très complexe (Bharti et *al*., 2003).

Les espèces pouvant être infectées par la leptospirose sont très nombreuses (Marrie, 2001) : mammifères (Dos Santos et *al*., 2017), oiseaux (Jacobs et *al*., 1986), reptiles (Lindtner-Knific et *al*., 2013), amphibiens (Everard et *al*., 1990), poissons (Mgode et *al*., 2014), et invertébrés (Gonzalez-Astudillo et *al*., 2015). Le réservoir varie selon les sérovars. Cette spécificité réservoir-sérovar n'est pas exclusive et de nombreuses espèces animales peuvent être des réservoirs pour différents sérovars (Annexe 1) (Praud, 2009).

Certains auteurs pensent que les études dans le continent Africain restent très limitées et des études sur l'isolement de nouveaux sérovars de *Leptospira* chez l'homme et chez l'animal en Afrique sont nécessaires de manière urgente pour générer un panel de sérovars de *Leptospira* spécifiques du continent africain servant au diagnostic sérologique (Mgode et *al*., 2015). En raison de l'abondance et de la diversité des hôtes réservoirs en Afrique, des études sur un large éventail d'espèces d'animaux terrestres et aquatiques sont aussi nécessaires afin d'améliorer la cartographie de la répartition des sérovars de *Leptospira* et la charge réelle de cette maladie en Afrique (Mgode et *al*., 2015).

- Les principales espèces réservoirs sont les petits mammifères sauvages, surtout les petits rongeurs (rat, souris, campagnol, ragondin..) (Vinetz et *al*., 1996 ; Bharti et *al*., 2003 ; Vanasco et *al*., 2003). *Mus musculus* ou souris domestique est le réservoir habituel de Ballum. *Rattus norvegicus* ou rat brun est en général le réservoir des sérovars Icterohaemorrahgiae et Copenhageni. *Rattus rattus* ou rat noir est le réservoir habituel d'Icterohaemorrhagiae et Ballum.

Les leptospires pénètrent dans l'organisme d'un rat, restent une période dans son système sanguin, puis gagnent le rein. L'infection chez cet animal ne s'accompagne donc d'aucun symptôme et les bactéries sont régulièrement éliminées dans les urines. Un rat peut rester infecté des mois voire toute sa vie (Gomes-Solecki et *al*., 2017). Il constitue ainsi un très bon réservoir et son rôle est donc primordial dans le cycle épidémiologique de la leptospirose (Bonilla-Santiago et Nally, 2011). Nous pouvons dire que l'efficacité d'un réservoir réside dans l'équilibre de celui-ci avec les leptospires. Cet équilibre est lié aux propres facteurs de limitation de l'invasion microbienne de l'hôte qui sont génétiques et/ou immunologiques (Peterson, 1996). Le taux d'infection des rats par les leptospires est variable. Au Canada, par exemple, il est estimé entre 0 et 66,7 %, (Himsworth et *al*., 2013) et au Brésil, à 36 % (Lilenbaum et *al*., 1993). Des études réalisées au Canada et aux États-Unis montrent que les moufettes et les ratons laveurs sont aussi des réservoirs primaires importants (Richardson et Gauthier 2003). Au Québec, une enquête sérologique sur des ratons laveurs et des moufettes a démontré des séroprévalence importantes de 56,1% et 25% respectivement (Rodriguez et *al*., 2014).

- Les animaux de rente (bovins, ovins), le cheval et les cervidés sauvages font partie des espèces très peu sensibles. Ils peuvent être porteurs rénaux et excréter des leptospires dans leurs urines de façon intermittente et sur des périodes plus ou moins courtes (Andreoli et *al*., 2014). Les lagomorphes peuvent aussi être infectés et excrètent les leptospires via les urines (Ayral et *al*., 2016). Une espèce sauvage peut être un hôte naturel pour certains sérovars et un hôte accidentel pour d'autres (Vieira et *al*., 2018).
- Ces dernières années, les mammifères marins (la loutre de mer [Enhydra lutris], l'ours blanc [Ursus maritimus], le phoque gris [Halichoerus grypus], le phoque commun [Phoca vitulina], l'éléphant de mer du nord [Mirounga angustirostris] et l'otarie de Californie [Zalophus californianus]), ont représenté un groupe faunique touché par certaines maladies infectieuses émergentes, telle que la leptospirose, malgré l'importante concentration de l'eau de mer en sel (Roehl et *al*., 2016). Certains mammifères marins transportent et transmettent la maladie en tant qu'hôtes secondaires. D'autres tombent malades et présentent des symptômes comme de la fièvre, les vomissements, l'ictère et l'avortement (Waltzek et *al*., 2012).
- Parmi les espèces sensibles, considérées comme des hôtes accidentels, l'homme et le chien sont les deux espèces qui développent le plus fréquemment des formes cliniques graves (Rojas et *al*., 2010). Cependant, récemment certaines études démontrent que l'homme comme d'autres espèces animales, peut se comporter comme un réservoir d'espèce pathogène de *Leptospira* en excrétant des leptospires dans les urines sans présence de symptômes (Ganoza et *al*., 2010 ; Chow et *al*., 2012).

Chez les chiens, les résultats des études sérologiques ont confirmé la circulation des mêmes sérogroupes de *Leptospira* impliqués dans des cas humains. Même s'ils ne sont pas des réservoirs, les chiens pourraient jouer un rôle important pour la contamination humaine en établissant un lien épidémiologique entre les réservoirs sauvages et les humains. Les chiens pourraient excréter *Leptospira* dans leur urine et augmenter le risque de contamination humaine (Gay et *al*., 2014). Chez les chien, l'infection était principalement associée aux sérovars Canicola et Icterohaemorrhagiae. Depuis quelques années, il a été démontré que les chiens peuvent s'infecter avec d'autres sérovars comme Gripothyphosa, Australis, et Serjoe (Ellis, 2010). D'après Brown et *al.* (1996), la vaccination chez les chiens a fait diminuer l'incidence de la maladie attribuée aux sérovars Canicola et Icterohaemorrhagiae (sérovars utilisés dans la vaccination) alors que l'incidence de la maladie attribuée aux autres sérovars tels que Grippotyphosa, Pomona et Bratislava a augmenté. Le chien vacciné peut donc devenir un porteur excréteur urinaire épidémiologiquement aussi dangereux que d'autres espèces (Brown et *al*., 1996).

- Les chats et autres félins sont peu inclus dans les enquêtes séro-épidémiologiques de la leptospirose et il n'existe effectivement que peu de données de la littérature à ce sujet (Lilenbaum et *al.* 2004). Le fait que le félin soit plus résistant aux leptospires est assez déconcertant, du fait de la cohabitation du chat domestique avec les chiens et les humains. Donc, le rôle des félins comme réservoir possible reste à clarifier (André-Fontaine, 2006). L'incidence de la leptospirose féline est trop faible pour identifier les sérotypes incriminés, mais les données disponibles concluent que les chats peuvent être des hôtes accidentels pour une variété de sérotypes qui sont répandues chez les animaux sauvages ou domestiques dans la région (Larsson et *al*., 1984 ; Dickeson et Love, 1993). Felt et *al*. (2011), dans une étude visant à identifier les animaux réservoirs de la leptospirose en Egypte, détectent la présence de *Leptospira interrogans* sérovar Grippotyphosa chez un chat.

V. Manifestations cliniques

La maladie chez l'hôte primaire est habituellement plus chronique ou asymptomatique avec une faible réponse immunitaire, tandis que chez l'hôte accidentel, la maladie a tendance à être aigue et sévère, avec une production très marquée d'anticorps (Langston et *al*., 2003 ; Levett et *al*., 2004).

V.1. Manifestations cliniques chez l'humain

La phase d'incubation de l'exposition à l'apparition des symptômes est en moyenne de 7 à 12 jours, bien qu'elle puisse être aussi courte que 3 jours ou aussi longue qu'un mois (Morgan et *al*., 2002). Les manifestations cliniques sont très variables, allant de signes non spécifiques (fièvre élevée, frissons, maux de tête, douleurs musculaires et articulaires diffuses) à des atteintes rénales, hépatiques, pulmonaires ou méningées (Bharti et *al*., 2003). Malgré qu'il n'y a pas de signe pathognomonique à la maladie, l'existence d'un ictère conjonctival et de myalgies est particulièrement évocatrice (Levett, 2001). La forme grave est l'ictéro-hémorragique ou maladie de Weil, exprimée par un ictère, une insuffisance rénale aigue et des hémorragies plus ou moins sévères (pulmonaires et digestives) (Seguro et Andrade, 2013). La convalescence est longue, mais généralement sans séquelle. Des complications oculaires (uvéite et kératite) peuvent survenir tardivement (Rathinam, 2005 ; Verma et Stevenson, 2012).

V.2. Manifestations cliniques chez l'animal

- Chez les animaux d'élevage (bovins, porcs, 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). On note une chute importante de la production de lait dans les élevages bovins laitiers (Pearson et *al.* 1980 ; Kingscote, 1985).

- L'infection des chevaux est souvent asymptomatique, cependant les anticorps sont fréquemment détectés chez des animaux sains (Donahue et *al*., 1995). Lorsque l'infection est cliniquement exprimée, elle se traduit par des avortements, la naissance de prématurés (Poonacha et *al*., 1993), des atteintes rénales, des atteintes hépatiques ou par des atteintes générales chez le poulain. Toutefois, la forme clinique la plus fréquente est une uvéite (Hogan et *al*., 1996).
- La première description de la leptospirose canine était en 1899 (McIntyre et Montgomery, 1952). La maladie chez le chien est inapparente dans la majorité des cas (Prescott, 2008). Lorsque la maladie est exprimée cliniquement, elle est de sévérité variable, dépendante de la souche infectante, et de la réponse immunitaire de l'hôte (Van de Maele et *al*., 2008). La clinique ressemble à celle retrouvée chez l'homme (Klopfleisch et *al*., 2010). La leptospirose aigüe est caractérisée chez le chien par une hyperthermie, une anorexie, des douleurs abdominales, des vomissements, une insuffisance rénale et hépatique avec ictère (Van den Broek et *al*., 1991 ; Rentko et *al*., 1992 ; Knöpfler et *al*., 2017). On peut aussi observer une tachycardie, des hémorragies pulmonaires ou digestives (Klopfleisch et *al*., 2010). On peut observer une uvéite ou des troubles de la reproduction comme des avortements par exemple (Schuller et *al*., 2015). Les anomalies pulmonaires sont très fréquentes (dyspnée, radiographie pulmonaire anormale) et la maladie est souvent fatale lorsqu'elle n'est pas traitée rapidement (Knöpfler et *al*., 2017).

Les tableaux de l'annexe 2 et 3 citent les différentes études concernant les signes cliniques et les altérations biochimiques respectivement, constatés chez des chiens atteints de la leptospirose dans différentes régions du monde (Schuller et *al*., 2015).

- Le premier cas de leptospirose féline a été rapporté en Indonésie en 1938 (Shophet, 1979). Bien que les signes sérologiques suite à l'exposition des chats aux leptospires existent (Agunloye et Nash, 1996 ; Mylonakis et *al*., 2005) ; la maladie clinique chez le chat est rarement signalée (Arbour et *al*., 2012 ; Weis et *al*., 2017). L'infection expérimentale des chats entraîne une leptospirémie et une leptospirurie, mais la maladie est généralement bénigne, bien que histopathologiquement des signes d'inflammation rénale et hépatique peuvent être présents (Larsson et *al*., 1985).

Les chats peuvent être exposés aux leptospires par contact avec les rongeurs (Agunloye et Nash, 1996). Le statut épidémiologique du chat envers la leptospirose et la mesure dans laquelle les chats contaminent l'environnement sont inconnus (Sykes et *al*., 2011). Par conséquent, de nombreux praticiens ne considèrent pas la leptospirose féline dans la liste des diagnostics différentiels lors

du traitement d'un chat malade et ne sont souvent pas conscients du risque zoonotique important qu'elle pose, malgré les preuves publiées à l'effet contraire (Arbour et *al*., 2012).

VI. Diagnostic

Le manque de spécificité clinique aboutit fréquemment à une sous-estimation du diagnostic de la leptospirose, le diagnostic clinique est donc insuffisant. La leptospirose étant une zoonose, sa confirmation par des examens diagnostiques de laboratoire est primordiale en terme de santé publique.

Les leptospires se multiplient dans le sang pendant la phase d'invasion. Entre 1-15 jours après la pénétration des leptospires dans l'organisme, une prise de sang sur tube hépariné peut être réalisée pour mettre en évidence une leptospirémie. 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. 10). Cette excrétion est maximale vers la troisième ou la quatrième semaine d'infection (Bolin, 1996). Les urines doivent être ensemencées 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, 1980).

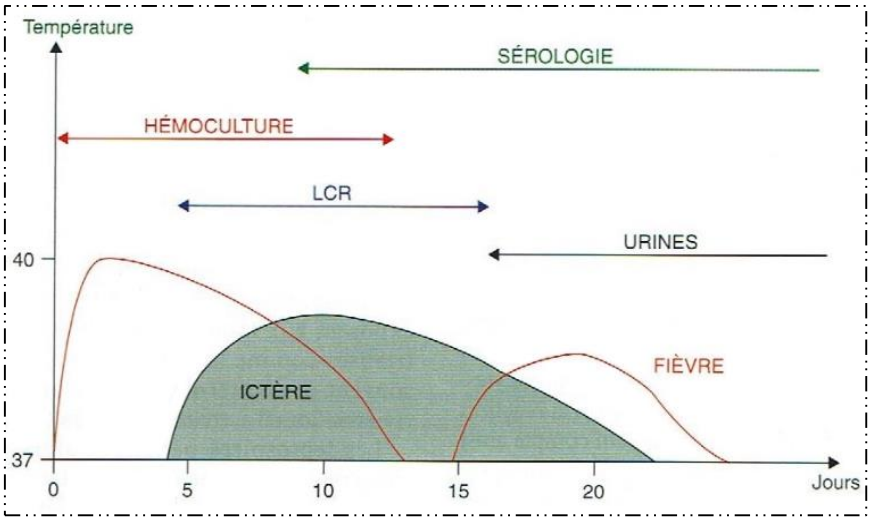


Figure 10 : Chronologie d'apparition des leptospires dans les différents liquides biologiques (Denis et *al*., 2016)

VI.1. Diagnostic direct

VI.1.1. Observation bactériologique directe

La visualisation des leptospires au microscope, du fait de leur faible dimension (moins de deux micromètres) se fera sur un microscope à fond noir (Fig. 11) (Dikken, 1980). Rien ne permet morphologiquement de distinguer les leptospires pathogènes des saprophytes. Cet examen direct

ne doit pas être considéré que comme un examen d'orientation ; qui doit toujours être confirmé par la culture. Les leptospires peuvent être observés dans le sang, ou le liquide cérébrospinal au cours de la première semaine de la maladie, et dans les urines à partir du dixième jour de la maladie (Postic, 2000).

Pour les examens histologiques, on observe généralement les leptospires : 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).

Le diagnostic par observation directe manque de sensibilité et de spécificité (Levett, 2001) et nécessite un observateur entraîné (Sharma et Kalawat, 2008 ; Dassanayake et *al*., 2009).

La technique d'observation au microscopie sur fond noir est déconseillée car son manque de sensibilité et de spécificité la rend peu fiable (Musso et La Scola, 2013). Les techniques immunohistochimiques et d'immunofluorescence peuvent être intéressantes mais manquent de sensibilité et ne sont pas très disponibles en routine (Haake et *al*., 1991).

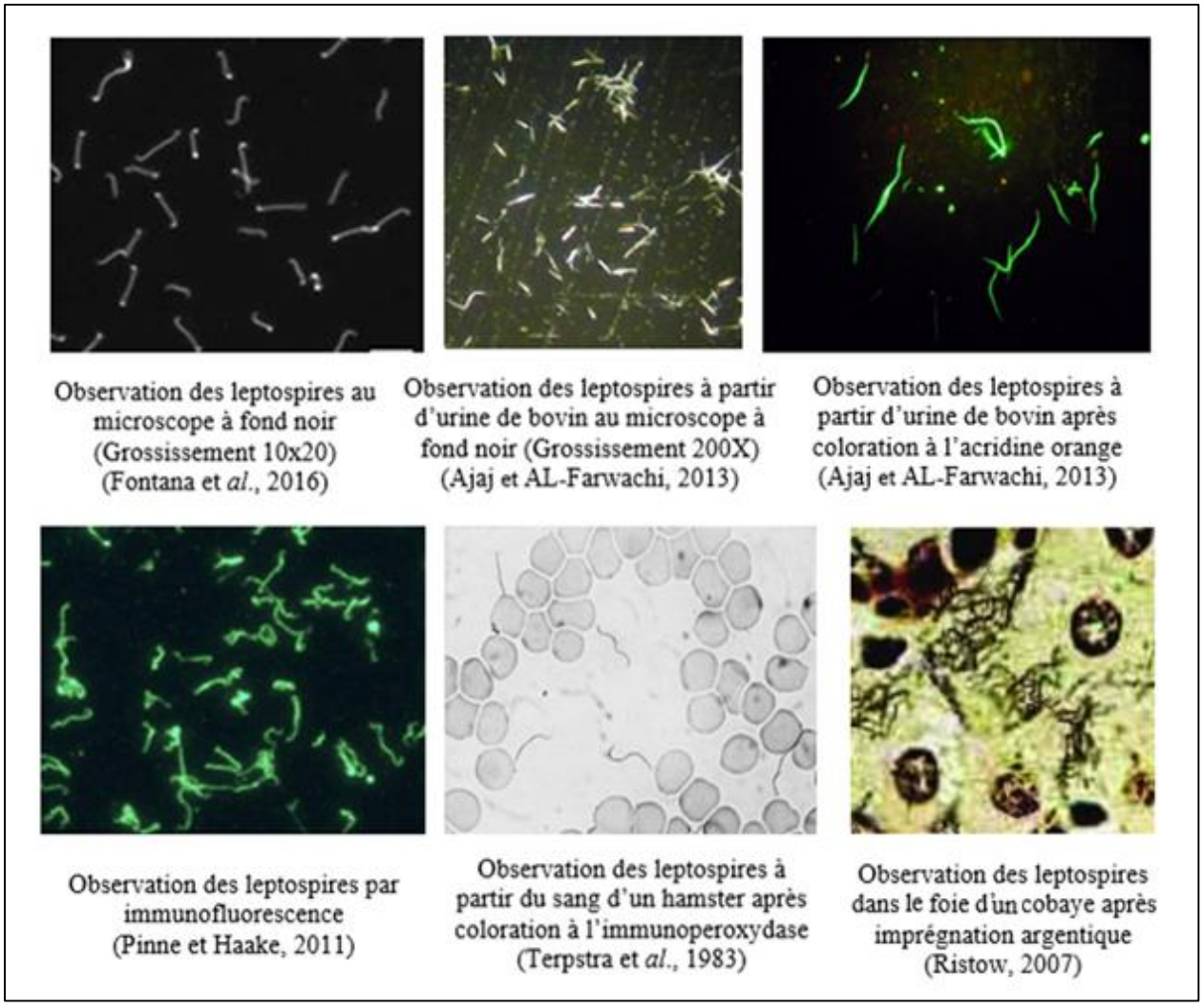


Figure 11 : Observations microscopiques directes ou après colorations des leptospires

VI.1.2. Culture

La mise en culture permet un diagnostic de certitude mais sa réalisation est très délicate. Cette mise en culture doit être réalisée rapidement après le prélèvement (dans les quatre heures suivant le prélèvement et ne peut se faire sur échantillons congelés) (Saengjaruk et *al*., 2002). Les leptospires peuvent être isolés à partir du sang et parfois du liquide cérébrospinal dans la première semaine de la maladie, et à partir des urines lors des deux semaines suivantes (Bharti et *al*., 2003). Plusieurs milieux de culture, à composition chimique complexe, compte-tenu des exigences métaboliques de ces bactéries existent. Le plus connu est le milieu Tween-albumine ou EMJH, un milieu qui permet l'isolement et l'entretien des souches de leptospires (Delarras, 2014).

Il a été rajouté au milieu EMJH des substances qui permettant d'éviter la croissance de contaminants en même temps que les leptospires (Dikken, 1981). La contamination peut être contrôlée par l'addition d'une variété d'agents sélectifs, tel que : 5-fluorouracil (Johnson et Rogers, 1964), fosfomycine (Perolat et *al*., 1993), et un mélange de rifamycine, polymyxine, néomycine, 5-fluorouracil, bacitracine, et actidione (Adler et *al*., 1986).

En général l'incubation des prélèvements se fait à 30°C avec une humidité suffisante et à l'obscurité et en maintenant une agitation régulière pour faciliter leur croissance (Denis, 2007). Chaque semaine ces prélèvements sont observés au microscope à fond noir et un repiquage systématique des tubes de culture primaire est recommandé après une incubation de quinze jours (Denis, 2007).

Finalement, même si la mise en culture donne un diagnostic de certitude, il tend à être moins utilisé pour le diagnostic de routine car il est lourd à mettre en œuvre, puisque l'isolement des leptospires à partir de l'hôte demande plus de deux semaines et souvent une culture est obtenue après plusieurs semaines (4 à 8 semaines) (Cinco, 1981 ; Bharti et *al*., 2003 ; Dassanayake et *al*., 2009).

VI.1.3. Techniques moléculaires

La nécessité d'un diagnostic rapide de la maladie a conduit au développement de nombreux tests PCR. Leur avantage réside dans la possibilité d'obtenir un diagnostic définitif au cours de la phase aiguë de la maladie avant que les anticorps sont détectables, période dans laquelle le traitement doit être administré pour une bonne efficacité (Brown et *al*., 2003 ; Musso et La Scola, 2013). La PCR permet la détection de l'ADN dans le sang dès le 4ème jour après l'apparition des premiers signes cliniques, en l'absence de traitement antibiotique (Katz, 2012). Ces méthodes sont plus rapides et plus sensibles que l'isolement par culture ou l'examen au microscope à fond noir et ne sont pas sujettes aux problèmes de contamination des échantillons (Brown et *al*., 1995). Elles sont de plus en plus utilisées et plus applicables aux échantillons de nature variée (sang, LCR, urine,

humeur aqueuse), prélevés aux différents stades de la maladie (Denis et *al*., 2016). Pour déterminer un risque zoonotique potentiel, les méthodes sérologiques sont à proscrire au profit des méthodes directes telles que la PCR (Harkin et *al*., 2003).

La PCR consiste à amplifier une séquence d'ADN cible à l'aide d'amorces spécifiques. A chaque couple d'amorces correspond un fragment amplifié de taille particulière.

La PCR est basée sur la détection de gènes présents universellement dans les bactéries telles que *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). 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 sensibilité et une spécificité excellentes et un faible risque de contamination (Musso et La Scola, 2013).

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 utilisé, tel que *rpoB* codant pour la sous-unité b de l'ARN polymérase (Renesto et *al*., 2000 ; La Scola et *al*., 2006) ou *gyrB* codant pour la sous-unité b de l'ADN gyrase (Musso et La Scola, 2013).

VI.2. Diagnostic indirect

La plupart des cas de leptospirose sont diagnostiqués par sérologie. Les anticorps sont détectables dans le sang environ 7 jours après l'apparition des symptômes. Les méthodes sérologiques peuvent être divisées en deux groupes: celles qui sont spécifiques au genre (ELISA, immunofluorescence, test de fixation du complément, agglutination sur latex, test de lyse des érythrocytes sensibilisés …) et celles qui sont spécifiques au sérogroupe. Malgré que de nombreuses méthodologies ont été appliquées au diagnostic sérologique, mais l'investigation sérologique définitive sur la leptospirose reste le test d'agglutination microscopique (MAT) (Levett, 2001).

VI.2.1. Test d'agglutination microscopique (*microscopic agglutination test*, MAT)

Le MAT (ancienne réaction d'agglutination-lyse de Martin et Pettit), est actuellement le test sérologique de référence pour le diagnostic de la leptospirose (Sykes et *al*., 2011). Certains auteurs

signalent que la technique permet de déterminer le sérogroupe et le sérovar infectant (Bolin, 1996 ; Muller et *al*., 1999 ; Postic, 2000 ; Acha et Szyfres, 2005), alors que d'autres pensent que le MAT peut déterminer le sérogroupe mais n'est pas suffisamment précis pour identifier les sérovars, car la réactivité croisée se produit fréquemment entre les sérotypes au sein d'un sérogroupe donné (Marquez et *al*., 2017).

Le MAT est une technique qui permet de mettre en évidence les anticorps agglutinants spécifiques (IgM et IgG) présents dans le sérum d'un individu atteint en mettant en contact différentes dilutions de ce sérum avec des leptospires vivants. La présence de l'agglutination reflète une réaction positive (Fig. 12) et la visualisation de cette agglutination ne peut se faire que sous microscope à fond noir (Merien et *al*., 2005).

Figure 12 : Test d'agglutination microscopique positif (Isa et *al*., 2014)

Le MAT est une méthode sensible, spécifique et quantitative mais elle est très lourde dans sa réalisation et son interprétation est délicate (Denis et *al*., 2016). En effet, elle nécessite l'entretien d'un panel de souches vivantes de leptospires en culture (Legrand, 2007). Le panel de sérovars testés devrait idéalement être défini sur la base des données de prévalence d'anticorps pour l'espèce hôte dans l'emplacement géographique considéré (Schuller et *al*., 2015).

Le MAT permet un diagnostic tardif puisque les anticorps apparaissent vers le 7ème voir le 10ème jour de la maladie (Sessions et Greene, 2004).

Chez les animaux, les seuils de positivité considérés sont très variables en fonction des études. Pour un animal non vacciné, le titre seuil de positivité varie de 1:100 à 1:3200 selon les auteurs (Brown et *al*. 1991, Birnbaum et *al*., 1998 ; Scanziani et *al*., 2002 ; Harkin et *al*., 2003 ; Geisen et *al*., 2007 ; Stokes et *al*. 2007).

Malheureusement, cette technique ne fait pas de distinction entre les anticorps dérivés d'une infection et ceux dérivés d'une vaccination. Il est donc important de connaître les antécédents vaccinaux de l'individu, y compris pour le diagnostic vétérinaire de la leptospirose animale car la vaccination est largement répandue, en particulier chez les chiens (Marquez et *al*., 2017).

VI.2.2. Le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) IgM

L'ELISA IgM est un des tests sérologiques de dépistage le plus précocement positif, soit 7 à 8 jours après le début de la maladie (Denis et *al*., 2016). Ces tests donnent un résultat en quelques minutes, mais souffrent des mêmes limitations que celles du MAT en ce qui concerne l'éventuelle absence d'anticorps lors d'une infection précoce ou leur présence due à la vaccination récente (Schuller et *al*., 2015). Cependant, l'utilisation combinée des mesures d'IgM et d'IgG permet de mieux distinguer une infection d'une immunité vaccinale (Bizard, 2009). Cette méthode permet de différencier une infection évolutive d'une maladie antérieure par la mise en évidence des IgM (Brown, 1996). Ce test est avantageux dans le sens où il ne nécessite pas le maintien de souches vivantes en culture. 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 développée au laboratoire par de nombreuses préparations d'antigènes et par des lipoprotéines recombinantes leptospirales, telles que LipL32 ou LigA (Marquez et *al*., 2017).

VII. Traitement

Le traitement de la leptospirose revêt deux aspects : d'une part le traitement étiologique qui consiste en une antibiothérapie. Les leptospires sont sensibles à beaucoup d'antibiotiques. Ainsi, jusqu'alors on ne connaît pas de mécanismes de résistances de ces bactéries (Legrand, 2007). D'autre part, un traitement de soutien à visée symptomatique doit être envisagé. Les symptômes sur lesquels on peut agir sont les troubles digestifs, les signes secondaires à l'insuffisance rénale qui sont généralement des signes prédominants, ainsi que les troubles du métabolisme phosphocalcique (Harkin et Gartrell, 1996 ; Langston et Heuter, 2003).

Les études sur le traitement de la leptospirose canine sont peu nombreuses. Schuller et *al*. (2015) recommandent fortement l'utilisation d'antibiotiques adaptés avant même le résultat du diagnostic de laboratoire puisque la précocité du traitement conditionne le pronostic. Cependant, une antibiothérapie commencée au-delà de 4 à 7 jours de la maladie engendre une récupération clinique moindre (Sykes et *al*., 2011). La recommandation d'un traitement le plus précoce possible est justifiée à la fois par le nombre élevé de la forme aiguë sévère et par le potentiel risque zoonotique de la leptospirose.

Des études montrent que malgré le traitement, les chiens peuvent excréter des leptospires dans la phase aigüe de la maladie (Juvet et *al*., 2011 ; Prescott, 2011). La doxycycline par voie orale (5mg/kg, deux fois par jour ou 10 mg/kg une fois, pendant 14jours) est intéressante car elle permet d'éliminer à long termes le portage rénal des animaux infectés (Watt et *al*., 1988). Néanmoins, les

chiens malades présentent généralement des symptômes gastro-intestinaux et ils peuvent donc mal tolérer la doxycycline par voie orale. Raison pour laquelle, le traitement antibiotique doit être initié d'abord par une pénicilline par voie intra-veineuse (pénicilline G, ampicilline ou amoxicilline) (Exemple : 20-30mg/kg d'amoxicilline, trois ou quatre fois par jour). Donc, l'amoxicilline est la molécule de choix pendant les 15 premiers jours, suivie de la doxycycline pendant les 15 jours suivants. Une autre étude a démontré l'efficacité de la streptomycine en cas d'échec de traitement à base de pénicilline-doxycycline (Juvet et *al*., 2011). Par ailleurs, il est recommandé de traiter de façon prophylactique les chiens qui étaient en contact avec le chien atteint de leptospirose par la doxycycline (5 ou 10 mg/kg, une fois par jour), cela n'a pas été recommandé chez les chats (Sculler et *al*., 2015).

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 de ses éventuelles pertes digestives et doit être adaptée à sa diurèse. Elle permet également de traiter les déséquilibres électrolytiques et acido-basiques engendrés par l'insuffisance rénale et les troubles gastro-intestinaux telles l'acidose métabolique et l'hyperkaliémie (Langston et Heuter, 2003).

Dans le cas où, l'insuffisance rénale est oligo-anurique, le rétablissement de la diurèse est primordial. Si la fluidothérapie ne permet pas d'obtenir une diurèse correcte, l'utilisation de diurétiques (furosémide, mannitol) et/ou de dopamine est préconisée (Langston et Heuter, 2003).

En cas d'échec de ces molécules, et si l'azotémie tend à s'aggraver, le recours à une méthode de dialyse est nécessaire mais ne peut s'effectuer que dans des centres spécialisés (Adin et Cowgill, 2000 ; Beckel et *al*., 2005).

Des anti-acides (la famotidine, la ranitidine ou la cimétidine), des anti-émétiques (métoclopramide) et du sucralfate permettent de traiter les troubles gastro-intestinaux (Langston et Heuter, 2003). Enfin, le support nutritionnel de l'animal doit être envisagé le plus rapidement possible (Hand et *al*., 2000).

Les facteurs pronostiques sont aujourd'hui mal connus. Suivant des études réalisées sur les chiens, une survie de 52 à 83% est rapportée suite à l'infection spontanée. Les décès survenant de manière naturelle ou suite à une euthanasie (Brown et *al*., 1996 ; Harkin et Gartrell, 1996 ; Birnbaum et *al*., 1998 ; Adin et Cowgill, 2000 ; Goldstein et *al*., 2006 ; Geisen et *al*., 2007 ; Mastrorilli et *al*., 2007).

VIII. Moyen de lutte

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

VIII.1. Prophylaxie sanitaire

VIII.1.1. Prévention de la contamination du chien

Lutter contre les rongeurs dans les chenils et éviter la baignade ou l'abreuvement du chien dans des eaux stagnantes est considérée comme une approche importante dans la prévention de la contamination (Ward et *al*., 2002). Il est important de surveiller les congénères canins qui ont été en contact avec le chien atteint de leptospirose (Sykes et *al*., 2011).

VIII.1.2. Prévention du risque de transmission à l'homme

- **Propriétaires**

Un aspect important de la maladie est son caractère zoonotique. Les êtres humains sont facilement exposés à cette bactérie assez dangereuse étant donné qu'ils sont en contact étroit avec les animaux domestiques, dont le chien (Brown et Prescott, 2008). Les chiens sont considérés comme un réservoir d'infection important et une source potentielle de contamination pour les humains (Levett, 2001). L'information des propriétaires est primordiale. Ils doivent rester prudents avec les urines de leur chien qui peuvent rester contaminantes pendant plusieurs semaines et le port de gants dans ce cas-là est obligatoire. La consultation chez un médecin est recommandée pour une éventuelle antibiothérapie préventive (Langston et Heuter, 2003).

- **Vétérinaire et personnel du laboratoire**

Les vétérinaires peuvent suivre des pratiques recommandées en matière de réduire les risques de contamination par des maladies zoonotiques en clinique. Ces pratiques incluent l'hygiène des mains comme le port de gants (surtout quand les animaux manipulés présentent des signes de maladie ou avec un historique médical inconnu), la protection du visage et des voies respiratoires et le port de masque ou autre (Elchos et *al*., 2008). L'installation d'un cathéter urinaire relié à un sac est recommandée afin d'éviter d'entrer en contact avec l'urine des animaux infectés. Si l'urine contamine la table de travail, le nettoyage et la désinfection avec de l'hypochlorite de sodium ou de l'ammonium quaternaire est nécessaires (Sykes et *al*., 2010).

Dans les laboratoires bactériologiques, lors d'une manipulation de souches virulentes et de cadavres d'animaux, il est nécessaire de travailler sous une hotte pour assurer une protection en cas de projection (Postic, 2001).

VIII.2. Prophylaxie médicale

La faune sauvage joue le rôle de source d'infection constante pour les animaux domestiques et l'éradication de cette faune est pratiquement impossible. Les animaux domestiques sont la source d'infection la plus probable pour leurs propriétaires (Brown et Prescott, 2008 ; Goldstein, 2010). Ces derniers doivent être convaincus par l'importance de la vaccination du chien contre la leptospirose (Birnbaum et *al*., 1998 ; Ward et *al*., 2002 ; Bengis et *al*., 2004 ; Brown et Prescott, 2008 ; Goldstein, 2010).

La protection des chiens par la vaccination contre la leptospirose et très ancienne et date de plus de 50 ans. Les vaccins dirigés contre la leptospirose chez l'espèce canine ne contenaient que les deux sérovars les plus répandu à savoir les sérovars Icterohaemorrhagiae et Canicola (Ellis, 2010). La vaccination a permis un certain contrôle de la maladie, mais pas une maîtrise complète et il a été constaté par la suite une recrudescence de la maladie suite à une situation épidémiologique modifiée et de nombreux cas de leptospirose canine ont été rapporté malgré une protection avec ce vaccin bivalent (Kalin et *al*., 1999 ; Ellis, 2010). Cependant, l'inclusion d'éventuels nouveaux sérovars s'est avérée nécessaire (Arent et *al*., 2013). C'est pourquoi un vaccin quadrivalent protégeant contre les sérogroupes Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa et Pomona a été développé aux Etats-Unis en 2001. Depuis, plusieurs vaccins quadrivalents (Icterohaemorrhagiae, Canicola, Bratislava et Grippotyphosa) ou trivalcnt (Icterohaemorrhagiae, Canicola et Grippothyphosa) sont disponibles en Europe (Klaasen et *al*., 2013).

La réponse immunitaire contre les souches vaccinales est de courte durée et nécessite des rappels périodiques. Ainsi, le protocole de vaccination chez le chien comprend une primovaccination en bas âge avec un rappel quelques semaines plus tard, puis des rappels annuels (Coyne et *al*., 2001 ; Klaasen et *al*., 2003 ; Minke et *al*., 2009).

En pratique les vaccins employés contre la leptospirose peuvent être associés ou non à d'autres valences (maladie de carré, hépatite de Rubarth, Parvovirose et autres). Ces vaccins contre la leptospirose ont la même efficacité qu'ils soient ou non associés à d'autres valences (Strasser et *al*., 2003).

Certaines auteurs ont révélé une leptospirurie inexistante chez les chiens vaccinés et par conséquent, une protection contre l'excrétion urinaire de la bactérie (Klaasen et *al*., 2003 ; Minke et *al*., 2009 ; Schreiber et *al*., 2005 ; Schreiber et *al*., 2012 ; Grosenbaugh et Pardo, 2018), alors que d'autres ont observé que deux vaccins sur trois testés ne garantissaient pas une totale prévention du portage rénal (André-Fontaine et *al*., 2003). Donc, le risque zoonotique existe avec des animaux vaccinés présentant des infections sub-cliniques et l'incidence n'est pas totalement connue (André-Fontaine et *al*., 2003).

La prévention de la contamination humaine passe essentiellement par une prophylaxie sanitaire. Dans certains pays, un vaccin à usage humain peut être prescrit par le médecin du travail et il est offert aux travailleurs très exposés (vétérinaires, éleveurs, personnel d'abattoirs, égoutiers et éboueurs) (Laurichesse et *al*., 2007). Actuellement, il n'y a que deux vaccins humains inactivés disponibles dans le commerce. Le vaccin cubain (Vax Spiral®) qui contient des bactéries entières des sérovars Canicola, Icterohaemorrhagiae et Mozdok et le vaccin français (Spirolept®) qui contient que des bactéries inactivées du sérovar Icterohaemorrhagiae (Marquez et *al*., 2017).

Une antibioprophylaxie peut être prescrite dans certains cas comme pour les militaires ou les voyageurs parcourant des zones hautement endémiques (Trevejo et *al*., 1998). L'administration orale de doxycycline à faible dose (200 mg par semaine) peut protéger pendant une courte période dans les environnements à haut risque (Edwards et Levett, 2004 ; Brett-Major et Lipnick, 2008).

Schuller et *al*. (2015), indiquent que l'utilisation prophylactique généralisée d'antibiotiques peut sélectionner des souches bactériennes résistantes et n'est pas recommandée pour les chiens. Alors que, Sykes et *al*. (2011) pensent qu'en raison du potentiel risque zoonotique de la leptospirose, le traitement à la doxycycline (5 mg / kg PO q12h pendant 14 jours) est recommandé chez des chiens vivants avec un chien malade.

PARTIE 2 : La peste

Introduction

La peste est une zoonose affectant l'homme, les petits animaux et leurs puces (Dennis et *al*., 1999 ; Gage et Kosoy, 2005 ; Duchemin et *al*., 2006). Chez l'homme, la peste est une maladie très grave avec un taux de létalité atteignant 30 à 60 % en absence de traitement (Carniel, 2002). Cette maladie a donné lieu à de grandes épidémies historiques et est considérée aujourd'hui comme une maladie réémergente dans le monde (Carniel, 2002 ; Khan, 2004). C'est une maladie à déclaration obligatoire soumise au Règlement Sanitaire International (Duchemin et *al*., 2006). Pendant les 18 ans de 1985 à 2003, plus de 43 000 cas humains de peste ont été déclarés à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) par 25 pays. Toutefois, en raison de mauvaises installations de diagnostic et de sous-déclaration, le nombre de cas est presque certainement beaucoup plus élevé (Carniel, 2008). Les spécialistes de la surveillance internationale savent que le danger demeure, à partir de très nombreux foyers qu'elle s'est créé à travers le monde et où elle a su s'enraciner. La peste peut à tout moment s'étendre à la faveur d'une défaillance de la civilisation (Baltazard, 1971). C'est une maladie qui n'a jamais pu être éradiquée (Dennis et *al*., 1999). Au contraire, elle sévit toujours en Asie, en Afrique et en Amérique (Carniel, 2002). Personne ne peut prévoir comment et quand elle pourrait être supprimée (Khan, 2004). En Algérie, la peste est réapparue, dans la région de l'Oranie en 2003, après une période de silence inter épidémique de 50 ans (WHO, 2003). Un autre foyer s'est déclaré dans la région de Laghouat, en 2008 (Bitam et *al*., 2010a). De ce fait, l'étude de cette pathologie, dans notre pays, s'avère plus que jamais nécessaire. Des études antérieures ont révélé que le contact avec les animaux domestiques tels que les chiens et les chats représente un facteur de risque potentiel d'infection pesteuse (Eidson et *al*., 1988 ; Chomel et *al*., 1994 ; Leighton et *al*., 2001 ; Watson et *al*., 2001 ; Gould et *al*., 2008 ; Aragão et *al*., 2009 ; Wang et *al*., 2011). Dans un milieu naturel, non soigné et en étant en contact avec des rongeurs, la population errante de ces carnivores est la plus exposée au risque d'attraper la maladie et de maintenir la propagation du bacille par la suite (Gage et *al*., 2000 ; Nyirenda et *al*., 2017a). Le diagnostic de la peste dans notre pays présente certaines contraintes. La culture qui est un moyen difficile à mettre en œuvre, nécessite un laboratoire d'une sécurité biologique niveau 3 (BL3) (Raoult et *al*., 2013 ; Yang, 2017). La sérologie qui par contre est un moyen de routine, ne peut être utilisée si l'infection est récente (Prentice et Rahalison, 2007). Les méthodes moléculaires semblent être le moyen de diagnostic le plus adéquat par la facilité d'utilisation, par la rapidité d'obtention des résultats et par la spécificité du test. Ces techniques peuvent être réalisée dans un laboratoire standard car l'échantillon peut être facilement décontaminé (Raoult et *al*., 2013).

I. Aspect historique

Le mot «Peste» est un terme général souvent utilisé dans le passé pour décrire des événements catastrophiques (Bramanti et *al*., 2016). Aucune maladie infectieuse n'a causé autant de ravages à la population mondiale que la peste (Schaechter et *al*., 1999). Trois pandémies majeures ont émaillé l'histoire de l'homme (Raoult et *al*., 2013).

La première pandémie décrite est appelée «peste de Justinien». Elle est survenue au 6ème siècle et a tué une population estimée à 100 millions de personnes en une cinquantaine d'années (Schaechter et *al*., 1999). Elle a débuté en Égypte et s'étendit rapidement à l'ensemble du bassin méditerranéen. Aucune description, ni de traitements pour les malades n'ont pu être mis en évidence par les médecins de l'époque (Bramanti et *al*., 2016).

La seconde pandémie majeure «la peste noire», originaire d'Asie. Elle s'est répandue au 14ème siècle dans le Proche Orient et l'Europe. En Europe uniquement, un quart de la population est mort de cette maladie (Schaechter et *al*., 1999).

La troisième pandémie, ou peste orientale, Contrairement aux deux premières pandémies, elle fut mondiale. Elle a débuté en Chine en 1894 et elle a rapidement touché les cinq continents par l'intermédiaire des rats infectés à bord des bateaux (Schaechter et *al*., 1999). Elle a finalement tué plus de 12 millions de personnes en Inde et en Chine. Au cours de cette pandémie, la nature infectieuse de la maladie fut élucidée et en quelques années, la bactérie responsable ainsi que son réservoir, le rat, furent identifiés par Alexandre Yersin ainsi que son vecteur, la puce, par Paul-Louis Simond (Yersin, 1894 ; Simond, 1898).

En 1896, Waldemar Haffkine trouva un vaccin anti-pesteux, qui ne prévenait pas de la peste mais baissait sa mortalité (Haffkine, 1906). En 1933, Jean Robic développa un vaccin vivant atténué permettant une réduction de plus de 65% de la mortalité pour la peste bubonique. Ce vaccin fut utilisé jusqu'à la fin de la deuxième guerre mondiale où les antibiotiques, récemment découverts, prirent le relais pour lutter contre ce fléau (Brisou, 1995).

Les mesures prophylactiques et thérapeutiques ont permis de réduire la mortalité et limiter la contagion. On a constaté une diminution ou une disparition des cas de peste humaine dans de nombreux pays et pendant plusieurs décennies, ce qui a pu faire croire que la maladie avait disparu (Dennis et *al*., 1999).

Le bacille pesteux est utilisable comme arme biologique avec l'utilisation d'aérosol provoquant des cas de peste pulmonaire. En 1348, les Tartares ont utilisé pour la première fois la peste comme arme de guerre biologique lors du siège de Caffa en projetant les cadavres infestés de la peste par-dessus le mur des assiégés (Wheelis, 2002). Dans les années 70 à 90, les soviétiques ont développé

des méthodes permettant d'aérosoliser la bactérie sans altérer sa survie pour la fabrication de bombes biologiques avec des souches résistantes aux antibiotiques (Miller et *al*., 2012).
Vu la présence de la peste dans le monde entier, la capacité de production en masse d'aérosol, le taux de mortalité élevé du à la peste pneumonique et le potentiel de propagation secondaire rapide, l'utilisation potentielle de la peste comme une arme biologique est une grande préoccupation et le bacille de la peste fait partie de la liste des agents pathogènes les plus susceptibles d'être utilisés pour une arme biologique considérée comme une arme de destruction massive (Riedel, 2005).

- **L'histoire de la peste en Algérie**

Les manifestations de la peste en Algérie ont été plus fréquentes depuis 1911. Jusqu'à 1935, on n'a observé que deux épidémies. En 1921, 185 cas ont été déclarés avec 97 décès ont été enregistrés à Sour El Ghouzlane (Aumale). En 1931, 86 cas de peste pulmonaire ont été notifiés dans le département de Constantine (Pollitzer, 1954). Le bilan de la peste depuis 1935 est résumé dans le tableau suivant (Pollitzer, 1954).

Tableau 4 : Nombre de cas de peste observés en Algérie depuis 1935

Année	Nombre total	Observations
1935	11	10 cas à Skikda
1936	10	3 cas à Alger
1937	3	Tous à Alger
1939	2	Tous à Alger
1940	18	Tous à Alger
1944	95	94 cas à Alger
1945	11	Tous à Oran
1946	2	Les deux à Oran
1950	6	Tous à Oran

En juin 2003, la région Ouest du pays (Oran, Mascara et Ain Temouchent) a déclaré la survenue de la peste sur son territoire. Il s'agissait des cas de peste bubonique. Au cours des semaines suivantes, 11 cas de peste confirmés et 7 suspects ont été signalés (WHO, 2003).

En 2008, une épidémie a touché des nomades dans la région de Laghouat, avec 4 cas (peste bubonique) et un décès (peste pulmonaires). La peste a été confirmée par culture de l'agent pathogène après une ponction des bubons (Bitam et *al*., 2010a).

II. Etiologie de la peste

II.1. Systématique

Alexandre Yersin (1863 – 1943) le bactériologiste franco-suisse se rend à Hong-Kong et, pourvu de moyens dérisoires, réussit à identifier et à isoler en trois semaines le responsable du fléau immémorial, qui porte depuis lors le nom de son découvreur : le bacille de Yersin «*Yersinia pestis*» (Hawgood, 2008).

Yersinia pestis appartient à la famille des *Enterobacteriaceæ*. Le genre *Yersinia* comprend 15 espèces dont seulement trois sont pathogènes pour l'homme et les animaux : *Y. pseudotuberculosis, Y. enterocolitica et Y. pestis* (Prentice et Rahalison, 2007).

II.2. Classification

Il est possible de classer les souches de *Yersinia pestis* en trois biovars selon la capacité de réduire le nitrate et la fermentation du glycérol (Tab. 5) (Eyquem et *al.*, 2000).

Tableau 5 : Classement des souches de *Yersinia pestis* en trois biovars

Biovars	Fermentation de Glycérol	Réduction de nitrate en nitrite
Antiqua	+	+
Medievalis	+	-
Orientalis	-	+

On a longtemps considéré comme établi que chacune des trois pandémies était due à des biotypes différents de *Yersinia pestis* : Le biovar Antiqua, toujours en Afrique et en Asie centrale, Medievalis, limité à l'Asie centrale et Orientalis, presque dans le monde entier dans sa distribution (Devignat, 1951). Cependant, Drancourt et al ont récemment montré, en utilisant une méthode de génotypage basée sur le séquençage de plusieurs «spacers» intergéniques, qu'un seul biotype, Orientalis, aurait causé les trois pandémies (Drancourt et *al*., 2004 ; Drancourt et *al*., 2007).

Actuellement, seul le biovar Orientalis est distribué dans le monde entier et est donc le seul biovar pandémique (Raoult et *al*., 2013). Lors de l'épidémie survenue en Algérie en 2003, la sensibilité aux bactériophages a été utilisée pour identifier la souche qui circulait. Toutes les souches identifiées appartenaient au biovar Orientalis (Lounici et *al*., 2005). Lors de l'épidémie survenue en 2009 dans la région de Laghouat, le séquençage a mis en évidence le biovar Orientalis (Bitam et *al*., 2010a).

Cette distinction a une importance épidémiologique mais il n'y a pas de différence dans la pathogénicité des biotypes (Acha et Szyfres, 2005).

II.3. Caractères morphologiques et structurales

Yersinia pestis est un coccobacille (bâtonnets courts aux extrémités arrondies) (Fig. 13 et 14) de 0,5 à 0,8 µm de largeur sur 1 à 3 µm de longueur, Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif, non mobile, ce qui le distingue des autres *Yersinia spp* qui sont mobiles à 25 ° C et non mobiles à 37 ° C. (Prentice et Rahalison, 2007). *Y. pestis* ne produit pas de capsule. Toutefois, lorsque la température dépasse 33°C, cette espèce produit une enveloppe glucidique-protéique appelée pseudocapsule, antigène capsulaire ou fraction F1. Le lipopolysaccharide de la paroi bactérienne est rugueux car dépourvu des chaînes latérales d'antigène O (Perry et Fetherston, 1997).

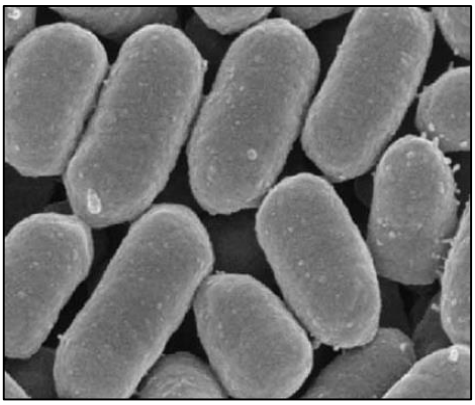


Figure 13 : Observation sous microscopie électronique à balayage de *Yersinia pestis* (Jarrett et *al*., 2004)

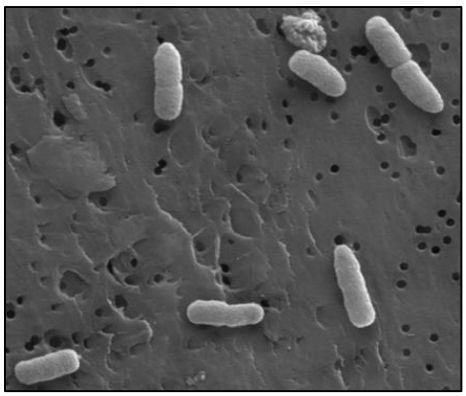


Figure 14 : Observation sous microscopie électronique à balayage de *Yersinia pestis* au Grossissement 5 000 X (Pawlowski et *al*., 2011)

II.4. Caractères bactériologique

II.4.1. Métabolisme

La bactérie croît à partir de 4 °C jusqu'à environ 40 °C, avec un optimum situé entre 28 et 30 °C. Le pH optimal pour la croissance est compris entre 7,2 et 7,6. Cependant elle tolère des pH variant de 5 à 9,6 (Perry et Fetherson, 1997).

Yersinia pestis est positive pour certaines réactions métaboliques (la catalase, l'hydrolyse de l'esculine, l'ONPG (orthonitrophényl-β-galactoside)..) et négative pour d'autres (l'oxydase, l'hydrolyse de l'urée..). *Yersinia pestis* fermente le Glucose, le lactose, le fructose, le galactose, le mannitol, le sorbitol et le tréhalose et ne fermente pas le lactose (Balows et *al*., 2012).

Y. pestis est un pathogène intracellulaire facultatif. Il se multiplierait dans les cellules seulement au début de l'infection ; ensuite la croissance extra-cellulaire dominerait à des stades ultérieures (Straley et *al*., 1993).

II.4.2. Culture

Cette bactérie peut être cultivée facilement sur des milieux usuels utilisés pour les entérobactéries (Raoult et *al*., 2013) (agar peptoné, milieu au sang, agar de MacConey, milieu pour Salmonella-Shigella). Elle nécessite une incubation de 48 heures pour faire croître des colonies de 1 mm entre 25 et 37 ° C (Prentice et Rahalison, 2007). L'isolement de *Yersinia pestis* par culture peut se faire sur gelose au sang 5%, bouillon coeur-cervelle ainsi que sur milieux Cefsulodine-irgasan-novobiocine (CIN) incubés à 28°C pendant 72 heures (Pourcel et *al*., 2004).

I.5. Conditions de survie dans l'environnement

Yersinia pestis est sensible à la chaleur, à la dessiccation et à tous les antiseptiques usuels. Elle possède par contre une grande résistance dans le milieu extérieur. Selon Eisen et al. *Y. pestis* peut survivre pendant au moins 24 jours dans un sol contaminé dans des conditions naturelles (Eisen et *al*., 2008b). Une étude a été menée par Ayyadurai et *al*. (2008) montre que *Y. pestis* peut rester viable et pleinement virulente après 40 semaines dans le sol montrant ainsi que le réservoir tellurique pourrait représenter un mécanisme alternatif pour l'entretien de foyers de peste (Ayyadurai et *al*., 2008).

II.6. Le génome de *Yersinia pestis*

Le séquençage complet du génome de *Yersinia pestis* a été réalisé en 2001 par l'équipe britannique dirigée par Julian Parkhill de l'institut Sanger à Cambridge. Il est constitué de 4 653 728 bp paires de bases d'ADN (Parkhill et *al*., 2001).

III. Pathogénie

III.1. Facteurs de virulence

Yersinia pestis est l'une des bactéries les plus pathogènes connues. Bien qu'il s'agisse d'un pathogène intracellulaire facultatif qui se développe normalement dans les environnements extracellulaires, la virulence dépend en partie de l'invasion et de la multiplication dans les cellules, y compris les phagocytes qui transportent la bactérie dans les phases initiales de l'infection (Hinnebusch, 1997 ; Perry et Fetherston, 1997).

Les produits géniques codés par les chromosomes et les plasmides de la bactérie sont associés à son adaptation à ses différents hôtes et sa virulence (Carniel, 2003 ; Hinnebusch, 1997 ; Hinnebusch et *al*., 2002a ; Perry et Fetherston, 1997). Les gènes chromosomiques de *Yersinia pestis* expriment une endotoxine lipopolysaccharidique puissante qui active le complément et déclenche la libération de kinines et d'autres médiateurs pro-inflammatoires. Un facteur qui

contrôle l'absorption du fer exogène est aussi exprimé par les gènes chromosomiques (Fong et Alibek, 2010).

La majorité des souches de *Y. pestis* quel que soit leur biotype ou leur origine contiennent trois plasmides :

- Un plasmide appelé pPCP1, sa taille est de 9,5 kb, il est propre à *Y. pestis* et code pour un activateur du plasminogène (Pla) qui est une protéase à surface unique qui dégrade la fibrine et d'autres protéines extracellulaires, facilitant ainsi la propagation systémique de *Y. pestis* (Fong et Alibek, 2010). Ce plasmide code aussi pour une coagulase et une pesticine qui est une bactériocine qui interrompe la synthèse de l'ADN et dégrade l'ARN des bactéries voisines, elle échappe à cette lyse à l'aide de la protéine d'immunité à la pesticine (Elgat et Ben-Gurion, 1969). C'est grâce à ces protéines que la bactérie de la peste a un tel pouvoir invasif.
- Un deuxième plasmide appelé pCD1, sa taille est de 70-75 kb, conférant une dépendance au calcium, il code pour les produits qui activent les antigènes V et W dont le rôle est de bloquer la phagocytose de *Y. pestis*, l'antigène V favorise la survie de *Y. pestis* dans les macrophages. Ce plasmide code aussi pour les protéines de la surface externe Yops (Yersinia *outer membrane proteins*), indispensables à l'expression de la virulence, ils inhibent la phagocytose et l'agrégation plaquettaire et bloquent une réponse inflammatoire efficace. Ce plasmide est commun avec les autres espèces pathogènes de *Yersinia* (Chu et *al*., 1998 ; Fong et Alibek, 2010).
- Un troisième plasmide appelé pMT1, sa taille est de 100-110 kb, il code pour la toxine murine (une phospholipase D qui est indispensable à la survie dans le proventricule de la puce et semble protéger *Y. pestis* des facteurs antibactériens produits lorsque la puce digère le plasma sanguin) (Hinnebusch et *al*., 2002b). Ce plasmide code aussi pour l'antigène F1, un antigène capsulaire synthétisé lorsque le bacille est à 37 °C et qui n'est pas présent lorsque le bacille est dans la puce. C'est un antigène protecteur et il permet au bacille de résister à la phagocytose en l'absence d'anticorps opsonisants (Du et *al.*, 2002 ; Fong et Alibek, 2010).

Selon les souches, on peut trouver d'autres plasmides de tailles variables (Perry et Fetherson, 1997).

III.2. Etapes de l'infection

La peau constitue la porte d'entrée habituelle de la peste bubonique. Les bactéries inoculées à travers la peau ou les muqueuses sont généralement transportées dans des vaisseaux lymphatiques vers des nœuds régionaux afférents, où ils se multiplient. Au cours des stades d'infection ultérieurs, les ganglions atteints présentent une congestion vasculaire, un œdème et des infiltrats

inflammatoires (Fong et Alibek, 2010). Toutefois, les ganglions peuvent ultérieurement contenir un nombre considérable de bactéries et présenter des lésions vasculaires, une nécrose hémorragique et une infiltration par des leucocytes neutrophiles. Ces nœuds atteints (bubons) sont généralement entourés d'une collection de liquide séreux, souvent teintée de sang (Fong et Alibek, 2010). Une fois que la bactérie pénètre dans la circulation sanguine, elle migre vers d'autres ganglions lymphatiques. La capacité de *Yersinia pestis* à inhiber la phagocytose permet d'éviter sa destruction par les cellules du système immunitaire comme les macrophages et ainsi proliférer dans les ganglions lymphatiques, provoquant une adénopathie (Adjemian et *al*., 2007).

Lorsque plusieurs ganglions lymphatiques adjacents sont atteints, une masse œdémateuse et pâteuse peut en résulter. Par la suite, une formation d'abcès et une rupture spontanée des bubons peuvent se produire (Fong et Alibek, 2010).

Y. pestis peut envahir et provoquer des maladies dans presque tous les organes, et une infection non traitée entraîne généralement une destruction étendue et massive des tissus. On peut observer la myocardite interstitielle diffuse avec dilatation cardiaque, la nécrose multifocale du foie, la nécrose hémorragique diffuse de la rate et les ganglions lymphatiques, ainsi que les thrombi de fibrine dans les glomérules rénaux qui sont fréquents dans les cas mortels (Finegold et *al*., 1968 ; Butler et *al*., 1974 ; Nelson et Horsburgh, 1998). La pneumonie, la pleurite et la méningite sont moins fréquentes. Les abcès peuvent se former dans les organes affectés. La coagulation intravasculaire disséminée (CID) est associée à la génération de micro-thrombi, de thrombocytopénie, de nécrose et de saignements dans les tissus affectés (Butler, 1974). Pétéchies et ecchymoses apparaissent couramment dans la peau, ainsi que sur les surfaces muqueuses et séreuses. Une ischémie et une gangrène des extrémités, telles que des doigts et des orteils, peuvent survenir aux dernières étapes de ce processus (Pollitzer, 1954 ; Nelson et Horsburgh, 1998).

Dans la peste pulmonaire primaire, la pneumonie primaire résulte de l'inhalation de particules respiratoires infectantes et commence généralement par un processus lobulaire, puis s'étend par confluence pour devenir lobaire puis multilobaire. En règle générale, les bactéries sont nombreuses dans les alvéoles et dans les sécrétions pulmonaires (Fong et Alibek, 2010). La peste pulmonaire secondaire fait suite à une peste bubonique ou une peste septicémique non ou mal soignée. Le bacille envahit les poumons par voie sanguine et infecte directement le parenchyme pulmonaire (Fong et Alibek, 2010). Dans les cas non traités de peste pulmonaire primaire et secondaire, la maladie progresse en congestion pulmonaire diffuse, en nécrose hémorragique du parenchyme pulmonaire et en infiltration par des leucocytes neutrophiles (Fong et Alibek, 2010).

IV. Epidémiologie

IV.1. Epidémiologie descriptive

Quoique la peste ne soit plus de nos jours le fléau qu'elle a été dans le passé, grâce en particulier à la découverte de l'agent causal, du cycle de transmission, et surtout grâce à l'utilisation des traitements antibiotiques efficaces, elle est loin d'avoir été éradiquée. Près de 43 000 cas humains ont été déclarés à l'OMS par 25 pays au cours des vingt dernières années (1985-2003) et le nombre réel des cas est probablement beaucoup plus élevé du fait des difficultés de diagnostic ou de la notification insuffisante par certains pays (Carniel, 2008).

IV.1.1. Répartition géographique

L'Afrique est le continent le plus touché suivie d'Asie puis d'Amérique (Fig. 15 et 16). Aucun cas de peste n'a été signalé récemment en Océanie ou en Europe. L'Afrique venant en première position tant par le nombre total de cas et de décès, que par le nombre de pays touchés. Les pays qui ont connu la peste dans leur histoire sont : Angola, Botswana, Burkina Faso, Egypte, Kenya, Lesotho, Libye, Mauritanie, Maroc, Nigéria, Guinée, Sénégal, Somalie, Afrique du Sud et la Tunisie. Les pays qui sont toujours victimes de la peste (1995-2008) sont : Algérie, République démocratique du Congo, Madagascar, Malawi, Mozambique, Namibie, Tanzanie, Ouganda et Zimbabwe (Neerinckx et *al*., 2010). L'Asie vient en deuxième position. De 1980 à 1997, la peste humaine a été signalée dans sept pays : Chine, Inde, Kazakhstan, Mongolie, Myanmar, Laos et Viet Nam (Dennis et *al*., 1999). En Amérique, la peste humaine a été signalée dans cinq pays : Bolivie, Brésil, Equateur, Etats-Unis d'Amérique et Pérou, dont trois (Brésil, Etats-Unis et Pérou) ont notifié des cas chez l'homme pratiquement chaque année au cours de la période de 18 ans entre 1980 et 1997 (Dennis et *al*., 1999).

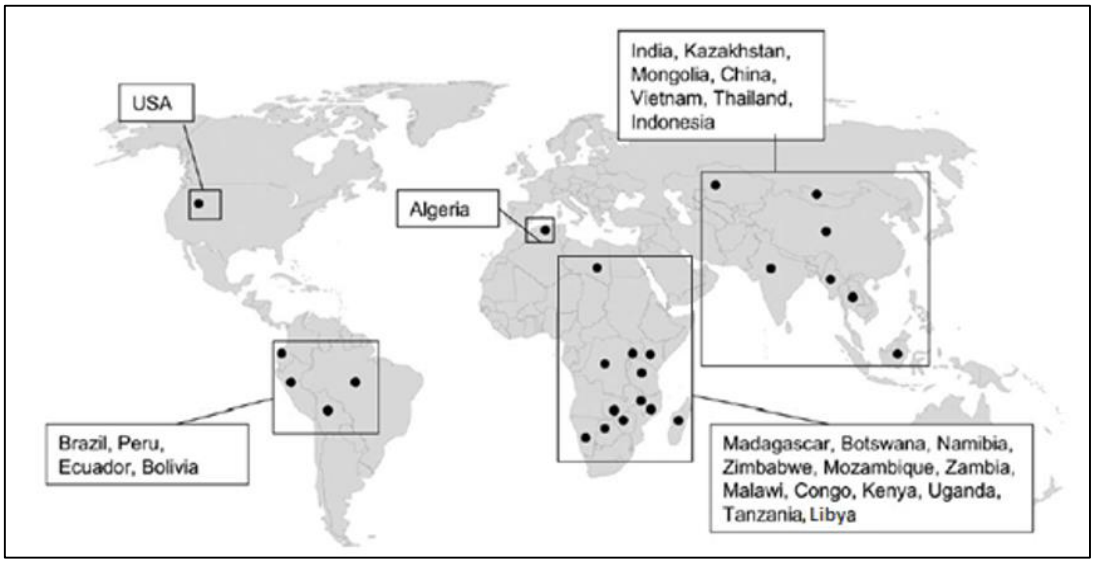


Figure 15 : Carte géographique illustrant les pays touchés par la peste (Bitam et *al*., 2010b)

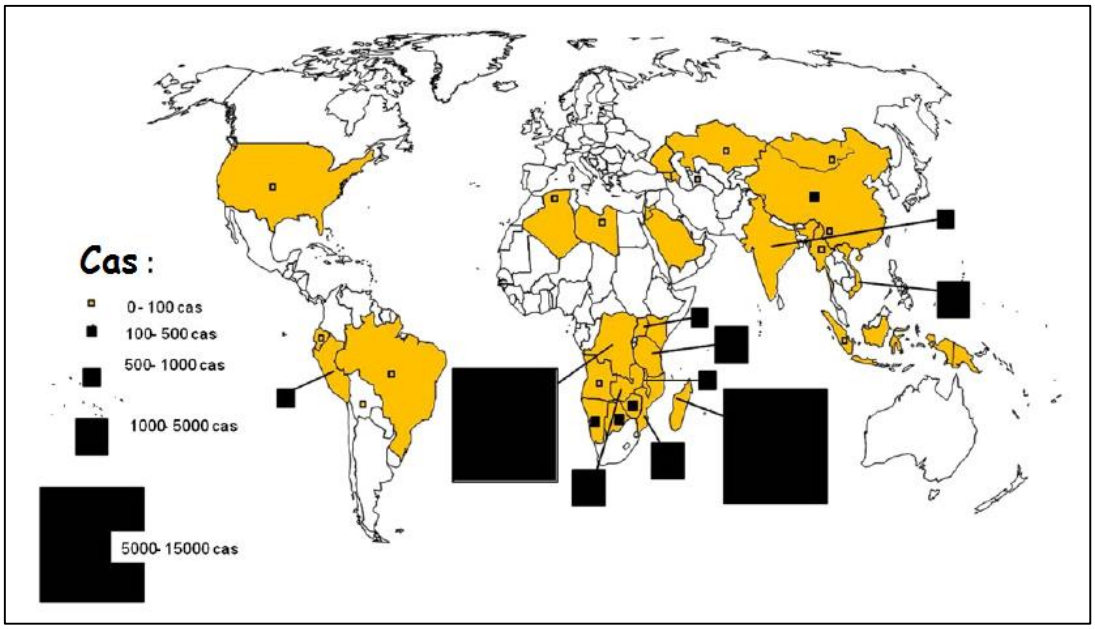


Figure 16 : Carte géographique illustrant la répartition géographique avec nombre de cas de la peste au cours des 20 dernières années (Raoult et *al*., 2013)

IV.1.2 Réémergence récente de la peste

Une recrudescence significative des cas humains est observée depuis les années 1990 avec des foyers de peste silencieux pendant des décennies et que l'on croyait complètement éteints (Tab. 6) (Dennis et *al*., 1999). Cela a été le cas au niveau de la zone côtière de Mahajanga (Madagascar) en 1991, après 60 ans de silence (Boisier et *al*., 1997). En Inde, la peste semblait avoir disparu depuis 1964 mais elle est réapparue en 1994 avec 50 décès, sous la forme d'une épidémie de peste pulmonaire (Ramalingaswami, 1995) qui a paralysé la vie économique du pays pendant plusieurs semaines avec un effondrement à l'échelle nationale dans le tourisme et le commerce (Ganapati, 1995). À partir du Mozambique, où elle est réapparue en 1994 après 16 ans d'absence, la maladie s'est propagée au Zimbabwe et au Malawi (Barreto et *al*., 1995). En Zambie, une épidémie de peste bubonique s'est déclarée fin 1996 alors qu'aucun cas humain n'y avait été signalé depuis plus de 30 ans (Carniel, 2008). Des cas ont été rapportés en 1997 en Jordanie, après plus de 80 ans des cas recensés dans ce pays (Arbaji et *al*., 2005). En 2003, la peste est revenue dans la région d'Oran en Algérie (Fig. 17) (Bertherat et *al*., 2007) puis en 2009 dans la région de Laghouat (Bitam et *al*., 2010a), alors qu'aucun cas n'avait été signalé dans ce pays depuis la célèbre *Peste* d'Albert Camus. Les autorités sanitaires de la Jamahiriya arabe libyenne ont rapporté des cas de peste en 2009 après un silence de 25 ans (Tarantola et *al*., 2009).

Tableau 6 : Réémergence récente de la peste dans le monde (Demeure et Carniel, 2009)

Pays	Derniers cas	Nouvelles épidémie	Durée de silence
Madagascar	1928	1991	63 ans
Inde	1964	1994	30 ans
Mozambique	1978	1994	16 ans
Zambie	1954	1997	43 ans
Jordanie	1915	1997	> 80 ans
Algérie	1946	2003	57 ans
Libye	1984	2009	25 ans

Ces données indiquent que *Yersinia pestis* peut rester viable et pleinement virulente pendant plusieurs années dans le sol. Selon Ayyadurai et *al*. (2008), le réservoir tellurique pourrait représenter un mécanisme alternatif pour l'entretien de foyers de peste (Ayyadurai et *al*., 2008).

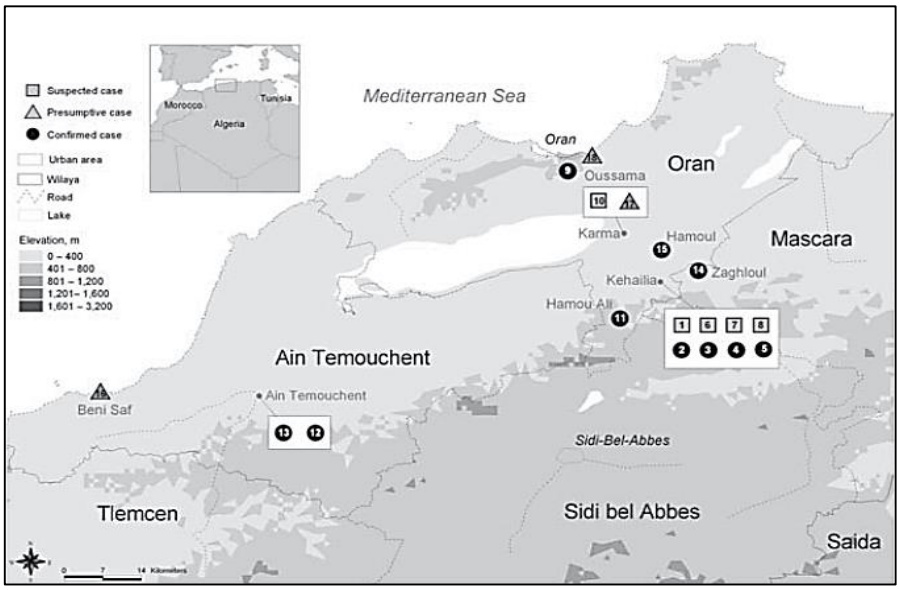


Figure 17 : Distribution géographique des cas de peste, région d'Oranie, juin-juillet 2003 (Bertherat et *al*., 2007)

IV.2. Epidémiologie analytique

IV.2.1. Source d'infection et mode de transmission

La peau constitue la porte d'entrée habituelle de la peste bubonique. L'infection étant produite dans la plus part des cas par piqûre des puces d'animaux infectés, rarement par l'intermédiaire d'autres insectes hématophages, ou directement par contact avec les animaux infectés. La

pénétration par les muqueuses telles que les amygdales et les conjonctives est possible mais rare (Pollitzer, 1954).

La peste humaine peut être contractée dans les cas suivants (Fig.19) :

- Suite à une piqûre de puces de rongeurs qui peuvent être : soit des rongeurs sauvages en milieu rural ; c'est le cas qui a été observé dans le sud-ouest des États-Unis (Gage et *al*., 1995 ; Levy et Gage, 1999), et en Algérie dans la région de Laghouat (Bitam et *al*., 2010a) ; soit des rongeurs commensaux qui se déplacent librement entre les villages et les habitats forestiers, c'est le cas qui a constaté en Tanzanie (Kaoneka et Solberg, 1994).
- Par la manipulation de chats infectés, c'est ce qui a été constaté en Afrique et aux Etats-Unis (Kaufmann et *al*., 1981 ; Gage et *al*., 2000). Les êtres humains peuvent être infectés par l'inhalation des sécrétions respiratoires des chats atteints de peste pneumonique ou par morsure (Tuzio, 2005).
- Après contact avec des chiens malades, c'est ce qui a été la cause de l'épidémie déclenchée en chine (Wang et *al*., 2011). Ou suite à un contact avec d'autres animaux sensibles tels que les cochons d'inde ; c'est l'exemple des épidémies du Pérou et de l'Equateur (Gabastou et *al*., 2000 ; Ruiz, 2001).
- Après consommation de viande d'animaux infectés tels que des chameaux qui ont contracté la maladie par piqûre des puces de rongeurs ; citant dans ce cas l'épidémie qui a été déclarée en Asie centrale et le Moyen-Orient (Bin Saeed et *al*., 2005 ; Stenseth et *al*., 2008).
- La transmission se fait aussi d'homme à homme, directement par des gouttelettes respiratoires (Fig. 18) (Pollitzer, 1954 ; Blanc, 1956).

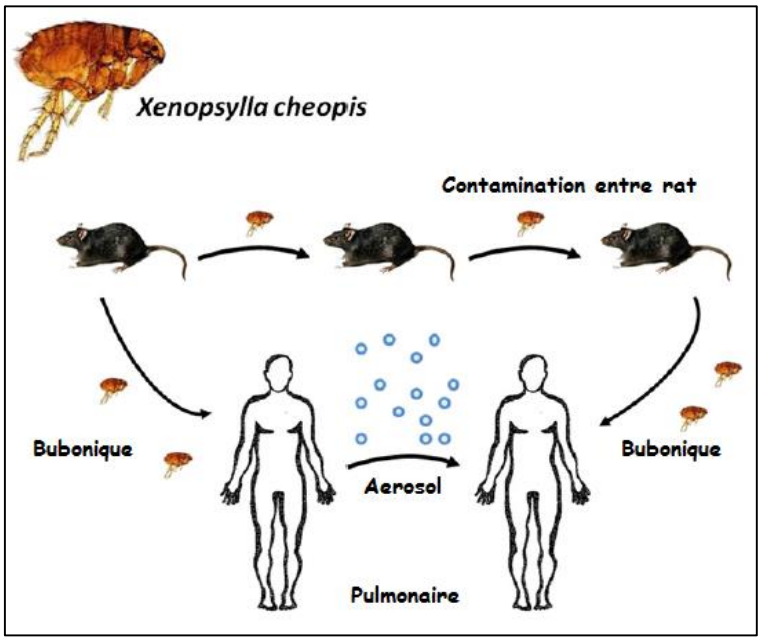


Figure 18 : Voies de transmission de la peste dans un foyer épidémique (Raoult et *al*., 2013)

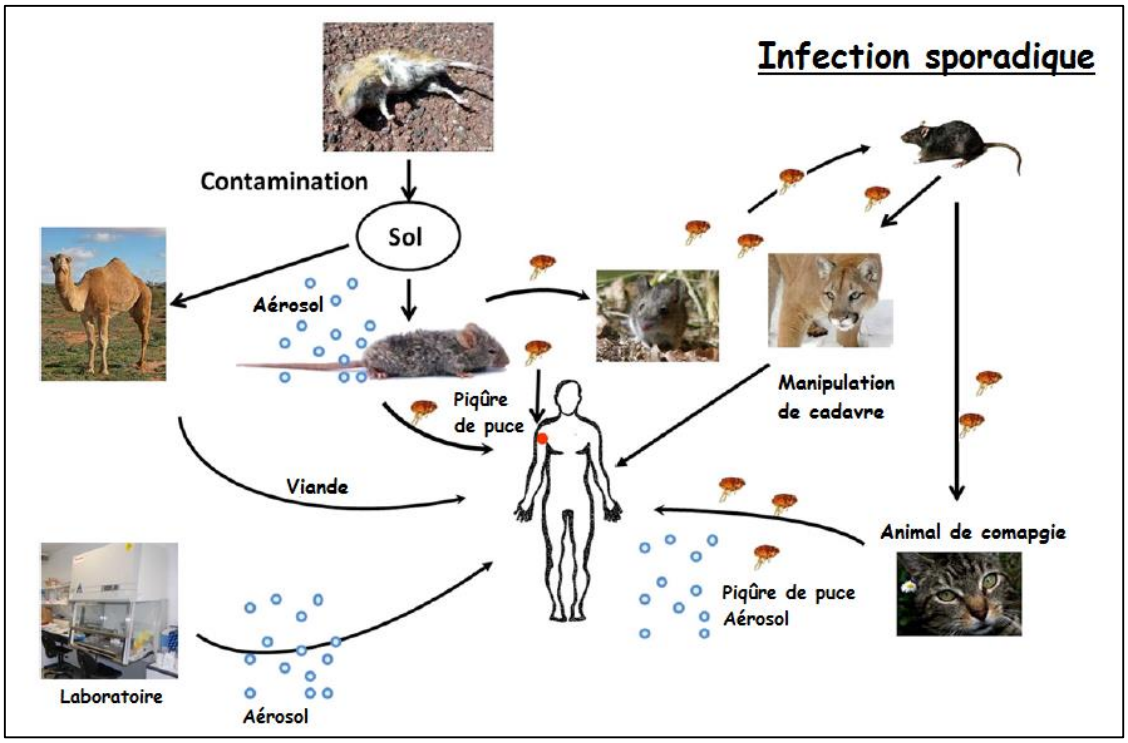


Figure 19 : Voies de transmission de la peste illustrant même les cas de transmission sporadique (Raoult et *al*., 2013)

La source d'infection pour les animaux domestiques est représentée par les rongeurs et leurs puces. Les chats peuvent être contaminés car ils sont naturellement chasseurs de rongeurs, et particulièrement sensibles au bacille pesteux (Ganiere et *al*., 2001). La contamination directe par inhalation de particules infectieuses entre les chats est possible dans le cas de la peste pulmonaire (Eidson et *al*., 1988).

IV.2.2. Réservoirs de la peste

- Les rongeurs et les lagomorphes

Alors que plus de 200 espèces de mammifères en 73 genres ont été signalées à être naturellement infectées par *Yersinia pestis* (comprenant diverses espèces de souris, campagnols, gerbilles, écureuils terrestres, marmottes et chiens de prairie) (Pollitzer, 1954 ; Dennis et *al*., 1999 ; Salkeld et *al*., 2010) ; les rongeurs constituent d'importants hôtes pour la peste, ils sont considérés comme hôtes enzootiques (Beran, 1994).

Dans le but de rechercher les réservoirs responsables de la peste en Algérie, en 2009, des rongeurs de différentes espèces (*Rattus rattus, Mus spretus, Psamommys obesus, Meriones shawii et Atelerix Faciatus*) ont été capturés et après analyse moléculaire de leurs rates, les résultats montrent un taux de positivité de 16% (Bitam et *al*., 2010a).

Les lagomorphes transmettent la maladie aux êtres humains plus probablement par contact direct que par piqûre de puces (Pollitzer, 1954). Aux Etats-Unis, *Yersinia pestis* a été isolée à partir de deux lapins, qui étaient responsables de la transmission de la peste bubonique à une femme après leur dépouillement. Tous les cas signalés de peste associée aux lapins aux États-Unis ont ensuite été examinés. Huit personnes ont contracté la maladie après un contact direct avec des lapins lors de la chasse alors que trois autres cas ont contracté la maladie après un contact indirecte (Von Reyn et *al*., 1976).

- Carnivores domestiques

- Les chats et autres carnivores domestiques peuvent être infectés après ingestion des rongeurs ou lagomorphes infectés par *Yersinia pestis* (Christie et *al*., 1980 ; Tuzio, 2005). Les chiens et les chats domestiques peuvent transmettre *Yersinia pestis* à l'homme par l'intermédiaire de puces infectées provenant de rongeurs (Gould et *al*., 2008 ; McElroy et *al*., 2010). Les chats atteints de peste pulmonaire peuvent être une source d'infection directe, par leurs sécrétions respiratoires. La transmission peut se faire aussi par morsure ou par contamination des muqueuses ou des lésions cutanées avec des sécrétions ou des exsudats d'animaux malades (Tuzio, 2005).

De nombreux cas de transmission humaine par exposition à des animaux domestiques en particulier des chats ont été documentés (Tuzio, 2005). C'est le cas en particulier des États-Unis pendant ces dernières années (Chomel, 2015). Les chats domestiques aux Etats-Unis sont récemment devenus d'importantes sources de peste humaine (Werner et *al*., 1984 ; Gasper et *al*., 1993 ; Doll et *al*., 1994 ; Dryden et Rust, 1994 ; Kassem et *al*., 2016). De 1977 à 1985, 60 cas de peste féline étaient enregistrés au Nouveau-Mexique (Eidson et *al*., 1988) et de 1977 à 1998, 23 cas de peste humaine (7,7% du total des cas) ont été provoqués suite au contact avec des chats infectés aux USA (Gage et *al*., 2000). Les zones de peste peuvent être surveillées au moyen d'enquêtes sérologiques sur les chats, qui, après s'être nourris de rongeurs infectés par la peste, peuvent développer des formes légères à graves de la maladie et produire des anticorps de longue durée (Sousa et *al*., 2017). Des études de surveillance sérologique de la peste chez les chats furent réalisées dans différentes régions du monde, les résultats sont résumés dans le tableau de l'annexe 04.

- Les chiens sont fréquemment exposés à *Yersinia pestis* dans les zones où il y a des épizooties de peste. L'infection à *Yersinia pestis* a été diagnostiquée chez trois chiens, dans le sud des Etats-Unis (Orloski et Eidson, 1995). En Juillet 2009, un foyer de peste a été signalé chez 12 personnes à la province du Qinghai, en Chine, trois d'entre elles sont mortes. L'enquête sur le terrain a révélé que cette épidémie a débuté par un chien décédé. Sept souches de *Y. pestis* ont été

isolées à partir des chiens et des patients (Wang et *al*., 2011). Les chiens peuvent jouer un rôle dans l'infection humaine par le transport des puces de rongeurs dans les maisons (Gould et *al*., 2008). Le chien produit des anticorps qui peuvent être détectés pendant plusieurs mois après l'infection, sans développer des symptômes dans la plus part des cas. Il est considéré donc comme un animal indicateur ou sentinelle pour la surveillance de la peste (Chomel et *al*., 1994 ; Wang et *al*., 2011 ; Nyirenda et *al*., 2017a). Le dépistage sérologique d'une telle infection est particulièrement utile lors d'une suspicion clinique animale ou humaine et pour les enquêtes et programmes de surveillance épidémiologique (Chomel et *al*., 1994 ; Sousa et *al*., 2017). Des études de surveillance sérologique de la peste chez les chiens furent réalisées dans différentes régions du monde, elles sont résumées dans le tableau de l'annexe 05.

- Autres mammifères

La peste naturelle a été confirmée ou soupçonnée chez un certain nombre d'animaux appartenant à divers ordres de mammifères autres que les rongeurs, lagomorphes et carnivores domestiques (Pollitzer, 1954).

Des études montrent que le chameau et la chèvre sont sensibles à l'infection naturelle par la peste et ont un rôle dans la diffusion de la peste aux humains (Christie et *al*., 1980).

- Quelques observateurs dans le sud-est de la Russie ont anciennement soupçonné l'existence de la peste chez les chameaux. Nikanoroff a pensé que le nombre d'épisodes de peste humaine rapporté dans la littérature semblait avoir comme mode de contamination, la consommation de viande de chameaux malades (Pollitzer, 1954). Les enquêteurs russes ont confirmé par la suite dans leur model expérimental que le chameau est une espèce sensible à la peste, et il peut être atteint suite à des piqûres de puces de rongeurs, à des piqûres de tiques ou suite à la consommation d'aliments contaminés par des excréments de rongeurs infectés (Federov et *al*., 1960). La consommation de la viande d'un chameau malade était la source de la contamination de neuf personnes en Libye, en 1976. Les sérums de sept d'entre eux étaient positifs (Christie et *al*., 1980). En 1994, le chameau était incriminé comme la source de la contamination de cinq personnes vivant en Arabie Saoudite. La contamination a été effectuée suite à la consommation du foie de chameau. *Yersinia pestis* a été isolée à partir de la moelle osseuse et les puces (*Xenopsylla cheopis*) prélevées à partir du chameau atteint (Bin Saeed et *al*., 2005). En 1997, une épidémie de peste a été rapportée chez 12 personnes en Jordanie. Ces mêmes personnes ont rapporté qu'ils avaient consommé la viande d'un même chameau quelques jours avant l'apparition des symptômes (Arbaji et *al*., 2005). Des constatations similaires ont été observées sur le territoire du Kazakhstan (Aikimbajev et *al*., 2003) et en Afghanistan (Leslie et *al*., 2011) où le chameau était la source de la contamination humaine soit suite à sa consommation ou à sa manipulation.

- Certaines études ont rapporté que la chèvre peut contracter la peste. En Libye, Six personnes sont tombées malades après avoir tué 2 chèvres, le sérum d'une chèvre contenait des anticorps dirigés contre *Y. pestis* (Christie et *al*., 1980). Une étude sérologique réalisée chez plusieurs espèces animales dans des villages qui ont déjà connu des épidémies de peste en Zambie, montre une positivité de 4,7% chez des chèvres (Nyirenda et *al*., 2017b).
- Une espèce d'hérisson (*Tenrec ecaudatus*) a été révélée séropositive à la peste, suggérant une transmission du bacille pesteux au sein de cette espèce (Migliani et *al*., 2001).
- Les carnivores sauvages sont exposés à la peste suite à des piqûres de puces ou en consommant des proies infectées et jouent le rôle de source potentielle d'infection humaine (Salkeld et *al*., 2006). C'est l'exemple du lynx roux, du puma (Bevins et *al.*, 2009), des coyotes (Brown et *al.*, 2011) du renard (Harrison et *al.*, 2003) et du blaireau (Messick et *al*., 1983). En 2007, un biologiste est décédé aux Etats-Unis par la peste pulmonaire après avoir effectué une autopsie sur un lion mort, les analyses confirment par la suite que le lion était atteint de la peste et était la source de l'infection (Wong et *al*., 2009).

IV.2.3. Vecteurs de la peste

- Les puces (Siphonaptères)

La puce joue un rôle important dans la transmission et la virulence de *Yersinia pestis* (Duchemin et *al*., 2006). Plus de 1500 espèces de puces ont été identifiées, alors que seulement un petit nombre (plus de 31) d'entre elles sont des vecteurs de la peste (Beran, 1994). La majorité des espèces de puces vectrices de la peste sont des ectoparasites des rongeurs commensaux ou péridomestiques. Comme elles vivent à proximité des êtres humains et de leurs habitations, ces puces se trouvent souvent sur le bétail et sur les animaux domestiques (Pollitzer, 1954).

- En raison de son rôle dans les précédentes pandémies, *Xenopsylla cheopis* (la puce du rat d'Orient) (Fig. 20) est considérée comme le vecteur principal pour transmettre l'agent de la peste (Beran, 1994). En Algérie, Beaucournu et Kowalski (1985) et Bitam et *al*. (2006) ont étudié l'agent de la peste sur les puces. Après la réapparition de la peste humaine en Algérie en 2003, 95 *Xenopsylla cheopis* ont été testées pour la recherche de *Yersinia pestis* par la méthode PCR, neuf puces était infectées (Bitam et *al*., 2006).
- La puce de l'homme que l'on appelle (*Pulex irritans*) (Fig. 20) est considérée comme un vecteur très pauvre pour *Yersinia pestis* (Blanc, 1956). L'importance vectorielle de *Pulex irritans* au sein de la population humaine fut d'ailleurs mise en évidence au Maroc dans un environnement proche de celui de l'Europe lors de la 2ème pandémie (Blanc, 1956). Cependant, *Pulex irritans* était

le vecteur idéal pour la peste par sa très grande abondance sur l'homme et dans ses habitations (Beaucournu, 1995).

- La puce du chat (*Ctenocephalides felis*) et celle du chien (*Ctenocephalides canis*) (Fig. 20) peuvent transmettre la peste à l'être humain (Dennis et *al*., 1999 ; Graham et *al*., 2013). Cependant elles sont considérées comme des vecteurs pauvres et ne causent que rarement la maladie humaine (Pollitzer, 1954). Au nord-ouest d'Ouganda, lors des dernières épidémies de peste, en Chine et aux États-Unis, les puces de chat (*Ctenocephalides felis*) ont été signalées comme les puces les plus courantes dans l'environnement familial humain (Eisen et *al*., 2008a ; Yin et *al*., 2011 ; Tam et *al*., 2014). Les études de laboratoires montrent que *Ctenocephalides felis* est un vecteur compétent pour *Yersinia pestis*, mais l'efficacité est faible par rapport aux autres espèces (Bland et Hinnebusch, 2016). Cependant, ces résultats indiquent que les puces de chat ne doivent pas être négligées par les programmes de contrôle car elles peuvent jouer un rôle important comme vecteurs secondaires (Eisen et *al*., 2008a).

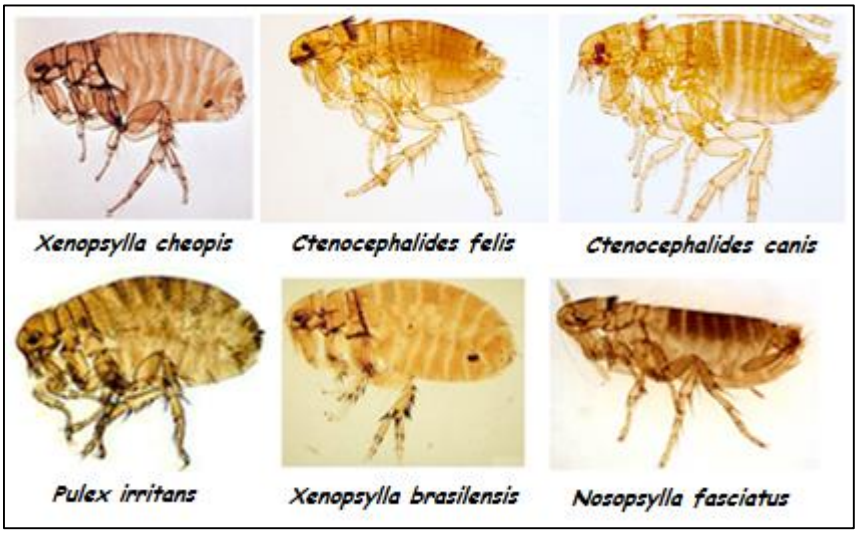


Figure 20 : Différentes espèces de puces (Mathison et Pritt, 2014)

Une étape clé de la transmission de *Yersinia pestis* chez les puces est le blocage proventruclaire démontré en 1914. Le blocage du proventricule ne se produit qu'avec *Yersinia pestis* à l'exclusion de toutes les autres bactéries et n'existe que chez les puces. Après piqûre d'un hôte présentant une septicémie, la puce héberge le bacille de la peste dans son tube digestif, les bactéries se multiplient dans le proventricule (dilatation située entre l'œsophage et l'estomac), formant le bouchon bactérien qui bloque finalement le passage du sang aspiré dans l'estomac (Dryden et Rust, 1994). Ce blocage affame la puce et l'oblige à piquer son hôte plusieurs fois pour se nourrir. Lors d'une nouvelle piqûre, la puce aspire du sang qui arrive dans le proventricule, au contact du bouchon

bactérien obligeant la puce à régurgiter dans la plaie le sang souillé qu'elle ne peut ingérer, inoculant ainsi le bacille de la peste à son hôte (Schotthoefer et *al*., 2011).

- Autres arthropodes

Certains auteurs ont évoqué l'intervention d'autres arthropodes autres que les puces, comme les poux, les punaises, les tiques, les acariens, les mouches et les moustiques, dans l'acquisition de l'agent pesteux mais la possibilité de le transmettre aux animaux sensibles reste à prouver (Pollitzer, 1954). Selon certains auteurs, seuls les poux et les tiques de rongeurs méritent d'être pris sérieusement en considération. Les ectoparasites humains y compris les poux (*Pediculus humanus)* ont pu transmettre la peste. Cela a été observé et confirmé par Baltazard et ses collaborateurs lorsque des cas de peste ont été déclarés au Maroc dans les années 40 (Houhamdi et *al*., 2006). Les tiques aussi ont montré leur rôle comme vecteur de *Yersinia pestis*. Cinq espèces de tiques appartenant au genre Ornithodoros étaient infectées après avoir pris un repas sanguin à partir d'hôtes infectés (Thomas et *al*., 1990).

V. Manifestations cliniques

V.1. Manifestations cliniques chez l'humain

L'inoculation par piqûre de puce peut provoquer une lésion cutanée, pas systématiquement présente. En fonction du site d'inoculation, l'infection du ganglion régional qui draine le site d'inoculation peut être observé (bubon). Inoculation à travers la peau après manipulation un animal infecté par la peste entraîne également la fièvre bubonique (Raoult et *al*., 2013). L'inhalation entraîne principalement une pneumonie. L'ingestion principalement de la viande ou le foie de chameau (Butler, 2009) entraîne une pharyngite avec bubons cervicaux (Raoult et *al*., 2013).
Le tableau clinique de la peste dépend du mode de l'infection et des cas signalés ((Butler et *al*., 1976 ; Crook et Tempest, 1992 ; Butler, 2009).

- Dans la forme bubonique, en plus de la présence du bubon, les patients présentent généralement une forte fièvre, une hypotension artérielle, des frissons et une fatigue (ce qui différent ces bubons à d'autres causes de lymphadénite). Dans certains cas, ils présentent une toux, une douleur thoracique et une dyspnée. Le bubon peut être situé dans l'aine, dans l'aisselle et plus rarement dans le cou ou la tête (Raoult et *al*., 2013). Certains patients présentent une septicémie et une pneumonie graves et peuvent présenter un expectorât sanguinolent (Ratsitorahina et *al*., 2000). En Inde, certains patients ont présenté des symptômes similaires à ceux des infections gastro-intestinales ou des infections des voies urinaires (Campbell et *al*., 1995).

- Dans la forme pulmonaire, la pneumonie peut être primaire ou secondaire à une septicémie et peut survenir avec ou sans bubons. La pneumonie primaire peut résulter d'une contamination via un aérosol de patient atteint de pneumonie ou de matières animales infectées (telles que celles du chat et du chien) (Weniger et *al*., 1984 ; Wang et *al*., 2011) ou bien suite à une manipulation de *Y. pestis* au laboratoire (Frieden et *al*., 2011). Les cas sans bubon sont difficiles à diagnostiquer car les patients présentent une maladie non spécifique qui peut être associée au syndrome de dysfonctionnement de plusieurs organes (Raoult et *al*., 2013). La mortalité après pneumonie non traitée est supérieure à 50%. Elle est trois fois plus élevée que la mort par la peste bubonique. Ce taux élevé de mortalité peut être causé par l'absence de diagnostic, la rapidité de l'évolution et l'absence de traitement précoce (Butler, 2009). Le risque de transmission pulmonaire interhumaine (même très faible) a conduit à la suggestion d'isoler strictement les patients (Inglesby et *al*., 2000).

V.2. Manifestations cliniques chez l'animal

- Les différentes espèces de rongeurs présentent des degrés de sensibilité très différents à la peste. La maladie peut revêtir trois formes : aiguë, chronique ou inapparente. Dans la forme aiguë, les cadavres de rongeurs présentent des bubons hémorragiques et une splénomégalie. Dans les cas subaigus, les bubons sont caséeux et la rate, le foie et les poumons présentent des points de nécrose (Acha et Szyfres, 2005).

Dans les zones endémiques, les chats et les chiens domestiques, peuvent facilement être infectés par *Yersinia pestis* en cas d'exposition à des rongeurs infectés (Gage et *al*., 2000).

- Les chiens sont généralement résistants à la peste. Ils peuvent développer des symptômes tels que : la fièvre, la léthargie, le gonflement des ganglions lymphatiques, des signes d'ordre digestif comme le vomissement et la diarrhée et ils peuvent devenir porteurs asymptomatiques de la bactérie (Orloski et Eidson, 1995 ; Gage et *al*., 2000 ; Nichols et *al*., 2014). Les chiens développent des anticorps contre l'agent pathogène et peuvent jouer le rôle d'animaux sentinelles pour la peste dans les zones endémiques (Chomel et *al*., 1994 ; Wang et *al*., 2011; Nyirenda et *al*., 2017a).

- Les chats sauvages et domestiques peuvent être infectés par la peste (Eidson et *al*., 1988 ; Eidson et *al*., 1991 ; Gage et *al*., 2000). Cependant certains auteurs suggèrent que l'augmentation de chats errants est un facteur de risque pour leur contamination (Eidson et *al*., 1988). Les chats malades peuvent développer les trois formes de la maladie (bubonique, septicémique ou pulmonaire) (Eidson et *al*., 1988 ; Eidson et *al*., 1991 ; Gage et *al*., 2000). La forme bubonique étant la forme la plus souvent décrite avec une lymphadénopathie et une hyperthermie et les nœuds

lymphatiques affectés ou bubons sont hémorragiques, nécrotiques et entourés d'œdème. Suite à l'ingestion de rongeurs contaminés, les bubons sont fréquents au niveau de la tête et du cou (Desachy, 2005 ; Pennisi et *al*., 2013). Environ 50% des chats infectés par *Yersinia pestis* meurent peu de temps après avoir développé la maladie (Gage et *al*., 2000). L'histopathologie chez les chats malades est comparable à celle décrite pour la peste humaine, on observe une inflammation nécro-suppurative dans les ganglions lymphatiques pour la peste bubonique et une pneumonie dans le cas de la peste pulmonaire (Watson et *al*., 2001 ; Orloski et Lathrop, 2003).

La forme pulmonaire des chats malgré qu'elle n'est pas très fréquente, elle est la plus redoutable, puisque c'est une source d'infection importante pour l'être humain (Rust et *al*., 1971b ; Gasper et *al*., 1993 ; Chomel et *al*., 1994 ; Gage et *al*., 2000).

- Les bovins, les chevaux et les moutons ne sont pas connus pour développer la peste (Orloski et Lathrop, 2003). Les chèvres et les chameaux atteints de peste développent une maladie clinique et peuvent être source des épidémies humaines de peste suite à l'ingestion de viande dans plusieurs pays du Moyen-Orient (Christie et *al*., 1980 ; Arbaji et *al*., 2005 ; Bin Saeed et *al*., 2005). En 1999, un lama est mort de peste au Nouveau-Mexique (Orloski et Lathrop, 2003).
- Des preuves d'infection chez des espèces sauvages autres que les rongeurs ont été rapportées, chez des cerfs mulets, des antilopes à cornes et des primates non humains (Orloski et Lathrop, 2003). On pense que la morbidité et le taux de mortalité chez les chats sauvages, comme le puma et le lynx roux, sont similaires à ceux des chats domestiques (Orloski et Lathrop, 2003).

VI. Diagnostic

Le diagnostic de la peste doit être évoqué chez l'être humain quand il présente de la fièvre avec prostration, avec exposition à des rongeurs ou un chat malade (Chanteau et *al*., 2003).

Les prélèvements destinés à la recherche de *Yersinia pestis* doivent être manipulés avec précautions, dans un laboratoire d'une sécurité biologique niveau 3 (Didier, 1998).

VI.1. Diagnostic direct

VI.1.1 Examen microscopique

Le produit de ponction est coloré par la coloration de Gram (Fig. 21) pour mettre en évidence des bacilles Gram négatifs (Pourcel et *al*., 2004). D'autres colorations peuvent être utilisées et mettre en évidence la morphologie bipolaire de *Yersinia pestis* telles que : la coloration de Wreight (Fig. 22), la coloration de Wayson ou la coloration de Giemsa (Perry et Fetherston, 1997 ; Parija, 2009).

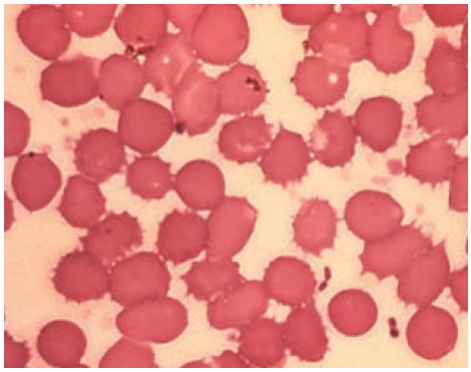


Figure 21 : *Yersinia pestis* dans un frottis sanguin coloré au Gram (Engelkirk et Duben-Engelkirk, 2008)

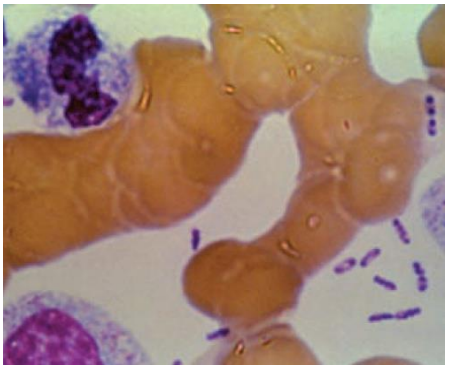


Figure 22 : *Yersinia pestis* dans un frottis sanguin coloré à la Wright (coloration bipolaire) (Engelkirk et Duben-Engelkirk, 2008)

VI.1.2. Culture

Yersinia pestis se développe sur milieux gélosés usuels (Drigalski, Mac Conkey, etc), et dans des milieux liquides classiques (eau peptonée..). Le milieu sélectif CIN (Cefsulodine-irgasan-novobiocine) (Fig. 24) permet d'éliminer les bactéries présentes dans des prélèvements contaminés tels que les expectorations (Rasoamanana et *al*., 1996 ; De Revel et *al*., 2005). *Y. pestis* est facilement envahi par les contaminants en raison de sa croissance lente (Prentice et Rahalison, 2007). La température optimale est de 25-28°C et les colonies apparaissent le plus souvent après 48 heures sur milieu gélosé. Les hémocultures doivent être conservées 4 à 5 jours à 25°C. En milieu liquide (Fig. 25), le trouble est inhomogène avec un voile en surface et un aspect floconneux en profondeur (Denis et Poly, 2007).

Figure 23 : Clonies de *Yersinia pestis* sur gélose au sang après 72 heures d'incubation (Engelkirk et Duben-Engelkirk, 2008)

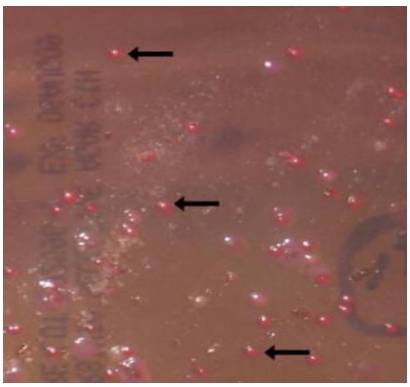


Figure 24 : Colonies de *Yersinia pestis* isolées à partir de puces entières sur gélose CIN (cefsulodin, irgasan, novobiocin) (Sarovich et *al*., 2010)

Figure 25 : Colonies filamenteuses de *Yersinia pestis* dans un bouillon de NaCl (Malek et *al*., 2017)

Un bactériophage spécifique qui ne lyse que *Y. pestis* est disponible. Les cultures pourraient être spécifiquement lysées par le phage à une température de 22 à 25 ° C. Il est utilisé comme test de diagnostic rapide dans les laboratoires de référence (Garcia et *al*., 2003 ; Yang, 2017).

VI.1.3. Techniques moléculaires

La détection moléculaire est un test rapide, sensible et spécifique. C'est une alternative plus sûre pour l'identification de *Yersinia pestis* (Engelthaler et *al*., 1999). Plusieurs tests de PCR ont été développés pour le diagnostic de la peste (Hinnebusch et Schwan, 1993). Ils sont capables de mettre en évidence la présence de différentes cibles sur les plasmides et sur le chromosome bactérien (Tomaso et *al*., 2003). Les gènes ciblés par PCR en temps réel ou conventionnelle ou même en séquençage sont différents selon les études et le type du prélèvement. Les gènes les plus utilisés pour la recherche de *Y. pestis* sont le gène *pla*, gène *glpD*, gène *rpoB*.. (Riehm et *al*., 2011 ; Malek et *al*., 2015). L'application de la PCR sur des échantillons dentaires a permis de confirmer que *Y. pestis* était la cause du décès dans des échantillons archéologiques datant de 400-600 ans après J.C. (Drancourt et *al*., 1998 ; Seifert et *al*., 2013).

Des études récentes montrent que la PCR en temps réel pourrait être recommandée comme un outil de diagnostic lorsque la peste bubonique est cliniquement suspectée (Riehm et *al*., 2011). Dans le domaine de recherche les méthodes moléculaires ont été rapportées pour la détection de *Yersinia pestis* dans des puces lors des enquêtes épidémiologiques (Hinnebusch et Schwan, 1993 ; Bitam et *al*., 2006 ; Griffin et *al*., 2010). La détection de *Yersinia pestis* dans les puces par PCR fournit un moyen rapide et sensible pour surveiller la peste dans la population d'animaux sauvages, permettant aux responsables de santé publique de mieux évaluer le risque potentiel de transmission aux humains (Hinnebusch et Schwan 1993). La recherche par PCR de *Yersinia pestis* peut se faire chez les animaux réservoirs (rongeurs et autres), le prélèvement idéal est la rate ou le foie (Shivaji et *al*., 2000 ; Bitam et *al*., 2010a ; Nyirenda et *al*., 2017b).

Les techniques sérologiques et moléculaires utilisées pour la recherche de *Y. pestis* peuvent être effectuée dans un laboratoire de biosécurité niveau 2 (Yang, 2017).

VI.2. Diagnostic indirect

Il existe un diagnostic sérologique pour la détection d'anticorps destinés contre l'antigène capsulaire F1 spécifique de *Yersinia pestis* (Chanteau et *al*., 2003 ; Bianucci et *al*., 2007).

Chez les animaux réservoirs, la recherche d'anticorps peut être réalisée comme une approche de surveillance dans les zones endémiques (Chomel et *al*., 2004 ; Wang et *al*., 2011). Elle est réalisée sur les animaux domestiques qui peuvent jouer le rôle de sentinelles pour la peste, c'est le cas du chat et du chien (Kilonzo et *al*., 1992 ; Chomel et *al*., 1994 ; Leighton et *al*., 2001 ; Aragão et *al*.,

2009 ; Rajerison et *al*, 2009 ; Wang et *al*., 2009). Elle est réalisée sur le sérum des rongeurs obtenu après décantation du sang recueilli par ponction cardiaque ou sur le sang total (Rajerison et *al*., 2009).

Les méthodes immuno-enzymatiques en phase solide (ELISA) permettent de porter un diagnostic rétrospectif avec la détection des anticorps IgM et IgG. On peut aussi utiliser l'agglutination, la fixation du complément ou l'hemagglutination (Dennis et *al*., 1999 ; Carniel, 2002 ; Acha et Szyfres, 2005).

Un test immunochromatographique rapide a été mis en évidence. C'est une méthode alternative à la méthode ELISA pour la détection des anticorps. Il peut détecter les anticorps dirigés contre l'antigène F1 de *Yersinia pestis* chez plusieurs espèces (homme, réservoirs rongeurs et chien). Il pourrait faciliter le diagnostic de la peste pendant les épidémies, en particulier lorsque seulement un seul échantillon de sérum est disponible (Rajerison et *al*, 2009).

VII. Traitement

- Une antibiothérapie précoce est un élément essentiel pour un bon pronostic chez les patients atteints de peste (Hinnebusch et *al*., 2002a). Depuis son introduction en 1948, la streptomycine a été l'antibiotique de choix pour le traitement de la plupart des formes de la peste chez l'homme (Butler, 1995). Outre la streptomycine, il y a un nombre limité d'antibiotiques dont l'efficacité est démontrée pour le traitement de la peste chez l'homme. Elle peut être remplacée par la gentamicine à raison de 3 mg par kg par jour ou par la doxycycline à raison de 200 mg par jour, avec une première dose de 200 mg suivie de 100 mg toutes les 12 heures (Mwengee et *al*., 2006 ; Prentice et *al*., 2007).

- La gentamicine est le médicament de choix en médecine vétérinaire, en particulier pour les cas graves. La doxycycline est un choix approprié pour les cas moins compliqués (Orloski et *al*., 2003). La tétracycline et le chloramphénicol sont d'autres options de traitement. Les sulfamides peuvent être utilisés, mais seulement si d'autres antimicrobiens ne sont pas disponibles. La durée recommandée du traitement est de 10 à 21 jours (Orloski et *al*., 2003). La streptomycine est réservée à l'homme. La réponse à l'antibiothérapie est généralement bonne. Si le traitement est précoce, il y a seulement 10% d'échec. Lorsque la maladie évolue vers une forme pulmonaire, l'animal doit être euthanasié (Desachy, 2005).

- Résistance aux antibiotiques : Le bacille pesteux qui était habituellement sensible aux antibiotiques classiquement utilisés pour le traitement de la peste commence à montrer des antibio-résistances. Cependant en 1995, à Madagascar, deux souches portant des plasmides de résistance à des antibiotiques de première ligne pour le traitement de la peste ont été isolées (Chanteau et *al*.,

2000 ; Galimand et *al*., 2006). On a démontré par la suite que l'acquisition par *Yersinia pestis* de cette résistance aux antibiotiques avait lieu dans le tube digestif de la puce (Hinnebusch et *al*., 2002a) et que le plasmide de multi-résistance était présent chez des entérobactéries largement répandues dans les produits alimentaires (Welch et *al*., 2007). Ces résultats sont alarmants, cela fait redouter l'émergence et l'expansion de souches de *Yersinia pestis* multi-résistantes, ce qui constituerait une menace majeure en santé publique. Une vigilance redoublée dans les efforts de surveillance sur le terrain et de recherches en laboratoire doit être constamment soutenue (Guinet et Carniel, 2000).

VIII. Moyens de lutte

La prévention de l'infection par la peste est importante car il est souvent difficile de diagnostiquer la maladie en temps voulu pour un traitement efficace (Eidson et *al*., 1988).

VIII.1. Prophylaxie sanitaire

VIII.1.1. Prévention de la contamination des animaux de compagnie

Les mesures à prendre envers les animaux de compagnie sont les suivantes : Traiter les chiens et les chats domestiques par insecticides, les colliers à puces ne sont pas considérés comme très efficaces (Kaufmann et *al*., 1981). Manipuler les chats malades avec précaution et isoler les cas suspects pour empêcher leur contact avec l'être humain ou avec d'autres animaux (Eidson et *al*., 1988). Les locaux et le matériel avec lesquels l'animal malade a été en contact doivent être désinfectés avec des composés iodés ou phénoliques. La litière des animaux doit être incinérée (Desachy, 2005). Les propriétaires qui vivent dans les zones d'endémie de peste devraient empêcher leurs chats de sortir et restreindre l'accès des chiens et des chats aux carcasses de rongeurs ou de lapins morts (Eidson et *al*., 1988 ; Orloski et Lathrop, 2003).

VIII.1.2. Prévention du risque de transmission à l'homme

Les êtres humains atteints de peste pulmonaire doivent être isolés et traités, les personnes ayant été en contact avec ces personnes malades doivent être surveillées (Yang, 2017). Pour le personnel de laboratoire, la manipulation des produits biologiques doit être conduite en laboratoire avec un degré de confinement de niveau 3, tout en respectant les consignes suivantes : manipulation sous hôte et port de masque et de gants (Raoult, 1998 ; Raoult et *al*., 2013).

Les vétérinaires et leurs aides doivent être informés du risque de la peste dans les régions où des cas ont été diagnostiqués (informations appropriées sur les symptômes chez les chats). Ils doivent porter des gants, une blouse et des lunettes de protection lors de la manipulation d'un animal suspect (Gage et *al*., 2000 ; Desachy, 2005).

VIII.1.3. Lutte contre les rongeurs et le vecteur

Pour lutter contre une éventuelle épidémie de peste, une mobilisation doit être mise en place pour éduquer la population en matière d'hygiène de l'environnement (utilisation de rodenticides contre les rats et d'insecticides contre les puces) (Ngulube et *al*., 2006). Certaines chercheures indiquent que l'utilisation de rondenticides sans l'utilisation concomitante des insecticides peut aggraver la situation, puisque les puces vectrices quittent les carcasses de rongeurs morts et cherchent un autre hôte, en propageant la maladie plus largement, cependant ce phénomène n'a pas été confirmé sur le terrain (Butler, 2012).

La sensibilité des puces aux insecticides utilisés doit être mise en œuvre périodiquement puisque plusieurs résistances sont apparues. La résistance chez *Xenopsylla cheopis* au DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane) a été confirmée pour la première fois en Inde (Patel et *al.*, 1960) et sa résistance multiple aux organochlorés, organophosphorés et carbamate pour la première fois au Madagascar (Coulanges et Randrianantoanina, 1985). Par la suite, d'autres études ont évalué la résistance de *Xenopsylla cheopis* aux différentes insecticides et ont révélé la présence de plusieurs résistances (Ratovonjato et *al.*, 2000 ; Shyamal et *al*., 2008 ; Miarinjara et *al*., 2017). Le développement de la résistance peut être dû à l'utilisation intensive d'insecticides dans le secteur agricole où les rongeurs retrouvent leurs habitats naturels (Shyamal et *al*., 2008). Cette découverte est alarmante, sachant que l'efficacité de la lutte contre les puces pourrait être compromise par la résistance aux insecticides. Afin d'établir un contrôle plus précis des puces, les principales recommandations sont basées sur une surveillance continue de la sensibilité des puces aux insecticides et une rotation dans l'utilisation des insecticides (Miarinjara et *al*., 2017).

VIII.2. Prophylaxie médicale

Si on le juge nécessaire, une antibiothérapie prophylactique peut être mise en place aux personnes qui ont été en contact avec des malades (Gage et *al*., 2000 ; Carniel, 2008) ou avec des animaux infectés (Desachy, 2005).

Il existe plusieurs vaccins contre la peste, atténués ou tués qui ont été utilisés dans le passé mais la faible durée de l'immunité et l'importance des effets secondaires ont conduit à l'arrêt de la vaccination (Titball et Williamson, 2001 ; Prentice et Rahalison, 2007 ; Carniel, 2008 ; Butler, 2013). Le vaccin à cellules entières tuées ne protégeait pas contre la peste pneumonique primaire et les vaccins vivants conservaient suffisamment de virulence (Kadlec et *al*., 1997). Les recherches s'orientent vers des vaccins acellulaires ou recombinants mais ils n'ont pas encore été testés dans les conditions naturelles de foyers de peste endémiques et épidémiques (Titball et Williamson, 2001 ; Prentice et Rahalison, 2007 ; Carniel, 2008).

MATERIELS & METHODES

L'objectif de ce travail est de rechercher, par des techniques moléculaires, la présence des agents bactériens responsables de la peste et de la leptospirose chez les chiens et les chats errants provenant de la wilaya d'Alger, prouvant ainsi leur rôle réservoirs de ces animaux et le risque qu'ils peuvent jouer dans l'épidémiologie de ces maladies zoonotiques assez redoutables. La recherche a été réalisée dans des urines de carnivores pour détecter *Leptospira*, et sur des rates et des puces prélevées chez les mêmes espèces animales pour la détection de l'agent pesteux.

I. Site de l'étude

I.1. Lieu de l'étude

L'étude a été menée dans la région d'Alger, la capitale de l'Algérie et la ville la plus peuplée. Située au nord-centre du pays. Elle est constituée de 13 Daïras et de 57 communes, son territoire s'étend sur une superficie de 1190 Km². Alger est limitée par la mer Méditerranée au Nord, la Wilaya de Blida au Sud, la Wilaya de Tipaza à l'Ouest et la Wilaya de Boumerdès à l'Est (Fig. 26). Cette région se caractérise par un climat méditerranéen tempéré. Elle est connue par ses longs étés chauds et secs. Les hivers sont doux et humides. Les pluies sont abondantes et peuvent être diluviennes (Source internet 1).

Figure 26 : Lieu de l'étude : Willaya d'Alger (Source internet 2)

Les prélèvements ont été réalisés au niveau de la fourrière canine, cette dernière est située dans la commune d'EL-Harrach et dépend du bureau d'hygiène communal de la ville d'Alger (EPIC H.U.P.E).

Elle est en activité depuis plus d'un siècle et ayant en charge la lutte contre les zoonoses qui présentent un problème de santé publique.

Au niveau de cet établissement, des médecins vétérinaires sont responsables de veiller sur la bonne santé des animaux capturés, en leur donnant les traitements requis. Leurs assistants sont formés sur les méthodes à utiliser pour attraper soigneusement les animaux errants. Une fois capturés, les chiens et les chats sont logés dans des cages régulièrement nettoyés et désinfectés. Ils sont nourris et inspectés quotidiennement.

La fourrière a pour rôles de :

- Capturer et de prendre en charge les animaux dangereux ou errants ;
- Mettre en observation les animaux suspects de maladies contagieuses telle que la rage ;
- Euthanasier ces animaux en cas de maladies incurables ou sénilité ;
- Restituer les animaux capturés réclamés par leurs propriétaires ;

Les champs d'action de la fourrière canine :

Pour capturer les chiens et les chats errants, les agents interviennent dans les voies publiques au niveau de toutes les communes de la wilaya d'Alger en collaboration avec :

- Les bureaux communaux d'hygiène ;
- Les collectivités (hôpitaux, hôtels, cités universitaires, sociétés privées ou étatiques..).

I.2. Evaluation éthique et scientifique

Tous les animaux introduits dans cette étude ont été capturés dans le contexte du programme national pour la lutte contre la rage. L'étude a été soumise et approuvée par le comité national d'éthique et la décision de l'EPIC- H.U.P.E (EPIC: Entreprise publique à caractère industriel et commercial; H.U.P.E : Hygiène Urbaine et Protection de l'environnement) de la ville d'Alger (Ex : HURBAL). L'EPIC- H.U.P.E est une institution affiliée au Ministère de l'Intérieur et des collectivités locales et au Ministère algérien de l'environnement et des ressources en eau. HURBAL a été créé en 1994 avec un nouveau statut: EPIC-H.U.P.E sous le numéro de registre: 16/00-0013132B00. Selon le décret interministériel du 01/04/1994, l'EPIC H.U.P.E a le droit de capturer les chiens et les chats errants et de les euthanasier quand le délai de mettre en garde s'expire, le travail sur ces animaux adhère à cette loi.

II. Population étudiée

II.1. Animaux prélevés et période de prélèvement

L'essai a concerné la population canine et féline de la région d'Alger. Les prélèvements réalisés étaient soit des urines, des tissus (rates) ou des ectoparasites (puces), selon l'agent pathogène recherché.

Les échantillons de rates et de puces ont été prélevés durant une période s'étalant du mois Février 2015 au mois de Septembre 2016 et les prélèvements d'urine ont été prélevés durant une période s'étalant du mois d'Avril 2017 au mois de Novembre 2017. Les prélèvements étaient réalisés au niveau de la fourrière canine de la wilaya d'Alger. Pour faciliter le travail de terrain, des collaborations ont été établies avec les médecins vétérinaires et leurs assistants travaillant au niveau de la fourrière canine. Les animaux choisis de façon aléatoire ont fait l'objet d'un examen général. Une fiche de renseignement a été établie pour chaque animal, sur laquelle sont notés, notamment l'espèce, la race, le sexe et l'âge de l'animal ainsi que les signes cliniques observés. L'évaluation de l'âge des animaux était basée sur l'usure des dents (Fig. 27) et les animaux étaient classés dans des tranches d'âges [<1an] ou [>1an] (Annexe 6, 7).

Figure 27 : Identification des animaux prélevés

II.2. Types de prélèvement et leur conservation

II.2.1 Prélèvements pour la recherche de *Leptospira*

Le prélèvement choisi pour rechercher l'ADN des leptospires était l'urine. Un total de 104 chiens et de 107 chats ont été prélevés. La collecte d'urine a été effectuée immédiatement après l'euthanasie de ces derniers, le prélèvement d'urine a été effectué par cytosynthèse de façon aseptique (Fig. 28).

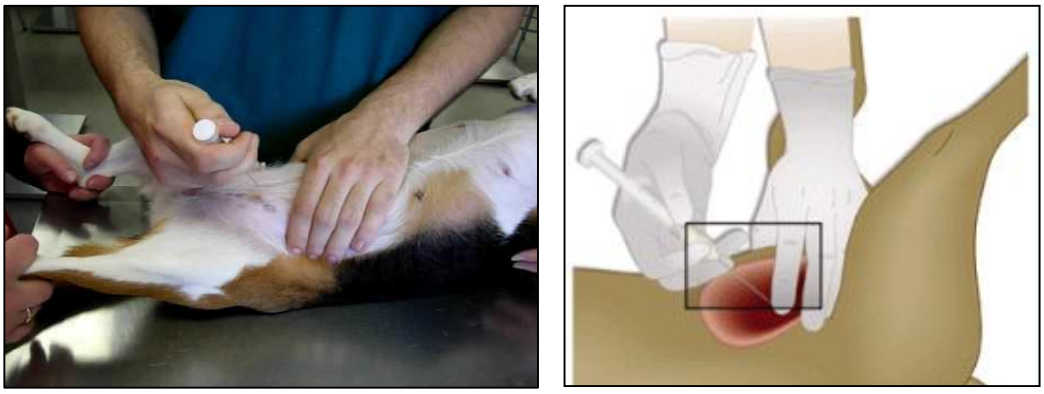


Figure 28 : Prélèvement d'urine par cytosynthèse

Les urines collectées étaient codifiées et conservées dans du tampon phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) sous froid à une température de -20 °C (Sant'anna et *al*., 2017).
Ces derniers ont été acheminés par la suite à l'unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes (URMITE) à Marseille, en vue de les analyser.

II.2.2 Prélèvements pour la recherche de *Yersinia pestis*

Le prélèvement choisi pour rechercher l'ADN de *Yersinia pestis* était des rates de chiens et de chats ainsi que leurs puces. Un total de 140 rates de chats et 127 rates de chiens était prélevé. Un total de 692 puces était prélevé chez ces mêmes animaux. La collecte de rates et de puces a été effectuée immédiatement après l'euthanasie de ces derniers.
L'autopsie a été effectuée après préparation de l'animal (rasage, désinfection et dépôt de champs stériles) et du matériel nécessaire. Des fragments de rate ont été prélevés de manière aseptique à l'aide de scalpels adaptés puis introduits directement dans des tubes stériles (Fig. 29).

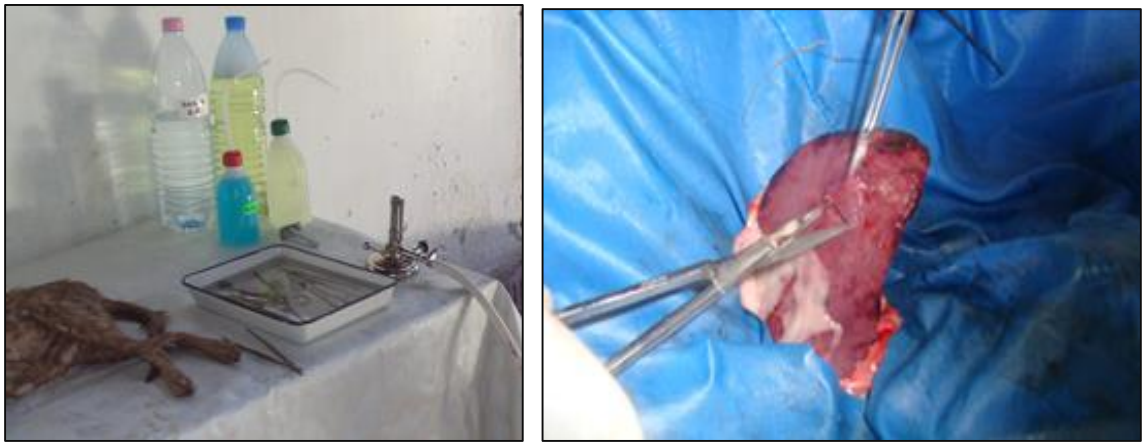


Figure 29 : Prélèvement de la rate

La collecte des ectoparasites a été également pratiquée en ciblant des zones bien précises sur le corps de l'animal (zones de prédilection : la tête, le cou et la croupe). La technique consiste à examiner visuellement en écartant le pelage des chiens et des chats. Le prélèvement a été réalisé à l'aide d'une pine, une loupe et une source de lumière facilitent la tâche (Fig. 30). Le nombre de puces prélevées varie d'un animal à l'autre en fonction du taux d'infestation des animaux (de 1 à 5 puces étaient récoltées de chaque animal). Il faut noter qu'aucune substance chimique n'a été appliquée sur ces parasites avant la collecte.

Figure 30 : Recherche des puces sur les animaux

Les matériaux biologiques collectés étaient codifiés et conservés dans l'éthanol 70 %. Ces derniers ont été acheminés par la suite à l'unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes (URMITE) à Marseille, en vue de les tester.

III. Analyses moléculaires

III.1. Recherche de *Leptospira* (la leptospirose)

III.1.1. Extraction de l'ADN

Avant l'extraction de l'ADN, les urines étaient décongelées puis centrifugées à 15000 tours/min pendant 20 min. 200µL de tampon PBS a été rajouté dans chaque tube contenant le culot d'urine (le surnageant a été jeté). Les échantillons ont été agités au vortex et le contenu a été transféré dans des tubes à extraction (Fig. 31).

Toute la manipulation a été menée dans une hotte de biosécurité à flux laminaire.

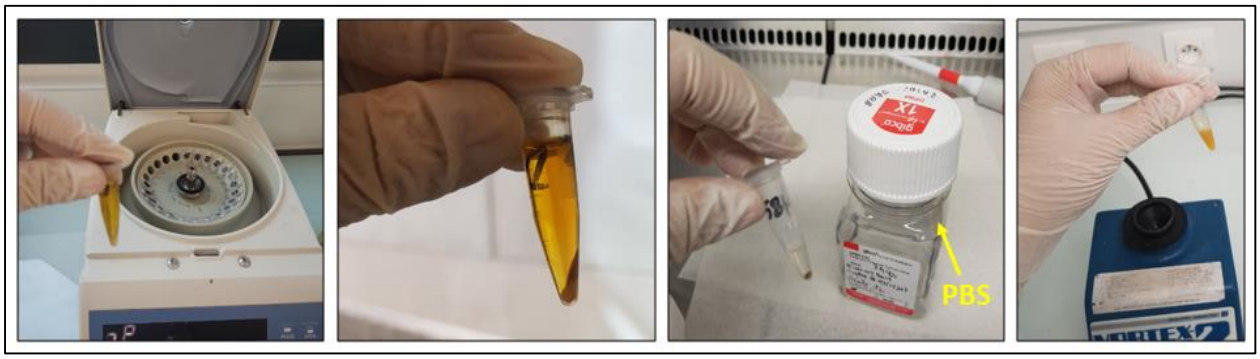


Figure 31 : Centrifugation des urines pour récupérer le culot et ajout du PBS

Un total de 200µL de l'ADN a été extrait à partir des urines par le kit QIAamp Tissue (Qiagen, Hilden, Allemagne). Ce kit contient des réactifs qui permettent la purification d'ADN à partir des tissus en utilisant un robot automatique EZ1 (Fig. 32) (QIAGEN-BioRobot® EZ1, Tokyo, Japon). Les étapes de l'extraction d'ADN ont été suivies selon les instructions du fabricant. L'EZ1 réalise une extraction d'ADN à partir de 14 échantillons durant 15 minutes.

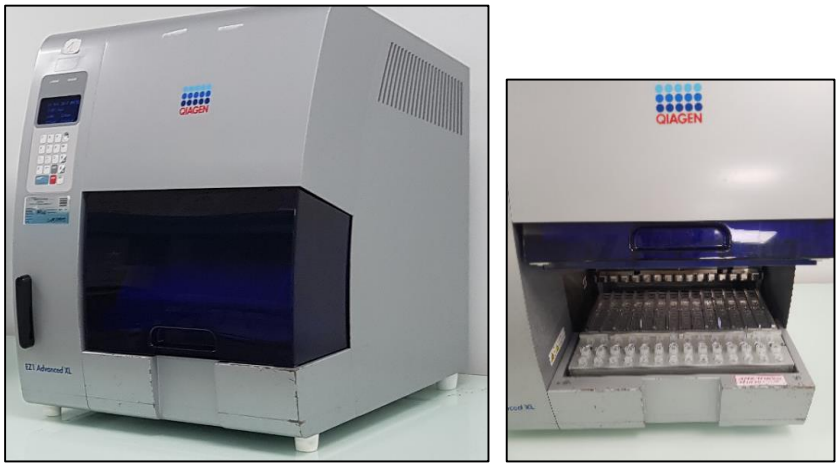


Figure 32 : Extracteur automatique EZ1

L'ADN génomique a été stocké à -20 °C dans des conditions stériles jusqu'à son utilisation dans les plaques de PCR.

Le contrôle de la qualité d'extraction d'ADN a été réalisé à l'aide du spectrophotometre / Nanodrope (Thermo Scientific, Pennsylvania, USA) lié à un microordinateur. Ce dernier permet la quantification des acides nucléiques sous forme de spectre.

III.1.2. PCR en temps réel (qPCR)

Après l'extraction, tous les échantillons d'ADN ont fait l'objet d'une amplification par qPCR.

III.1.2.1. Préparation du mix

Cette opération doit être faite sous des conditions aseptiques dans une pièce isolée et sous une hotte à UV pour éviter la contamination du mix, avec le port de gants stériles. Les réactifs du mix doivent être maintenus sous froid dans une boite contenant de la glace.

Nous avons préparé le mix avec l'addition de Mix Roche (Roche Diagnostics, Meylan, France) contenant la Taq polymérase, des amorces (primers) et de la sonde (Tab. 7).

Tableau 7 : Produits du mix de qPCR

Produits	**Concentration**	**Volume pour un seul échantillon**
Mix Roche (LightCycler® 480 Probes Master)	1 X	10 µl
Eau distillée stérile (exempte de ADNase / ARNase)	----	3 µl
Primer 1	20 µM	0,5 µl
Primer 2	20 µM	0,5 µl
Sonde	2,5 µM	0,5 µl
Uracyl ADN Glycosilase (UDG)	----	0,5 µl
Total du mix	**----**	**15 µl**

Le calcul se fait en multiplier la quantité de chaque composant par le nombre de prélèvements à analyser. Ensuite, mettre une quantité de 15 µl du total préparé (Mix) dans chaque puits dans des plaques PCR à 96 puits (Fig. 33).

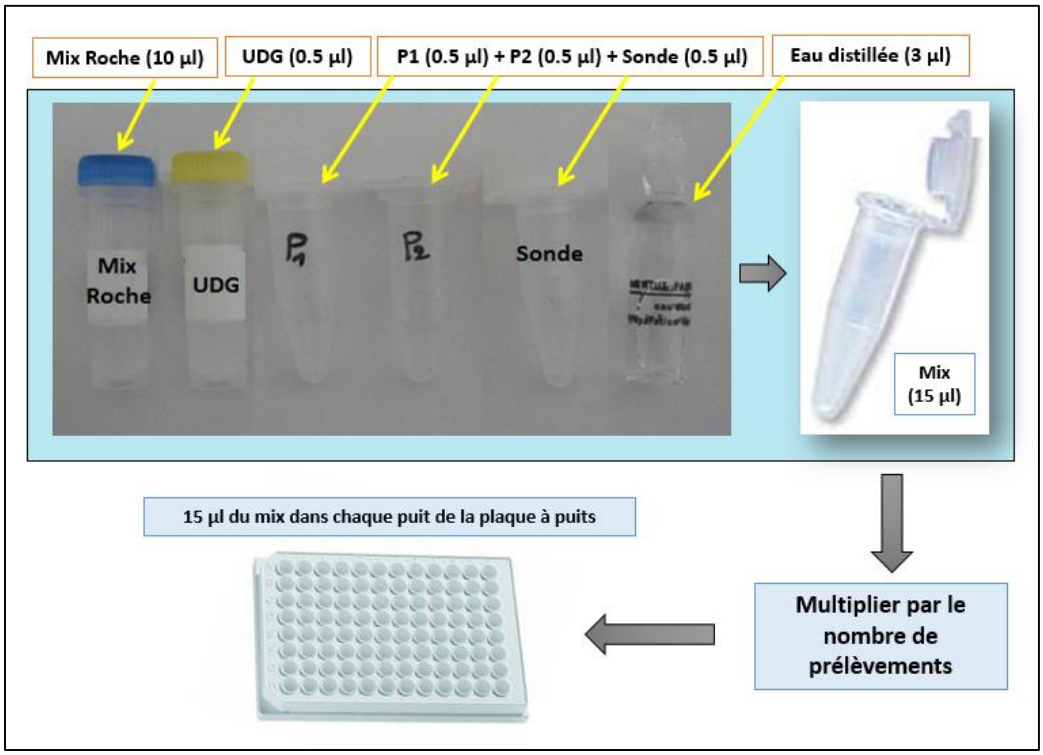


Figure 33 : Etapes de la préparation du Mix

Les systèmes de qPCR (amorces et sondes) spécifiques du genre ou d'espèce bactérienne ciblées dans notre recherche sont présentés dans le tableau 8.

III.1.2.2. Systèmes utilisés lors de la qPCR

a. Détection de *Leptospira* pathogènes (1er système)

En utilisant la qPCR, les échantillons d'ADN ont été testés pour tous les leptospires pathogènes en ciblant la région intergénique du gène *16S rRNA*. Ces amorces permettent d'amplifier un fragment d'environ 88 pb (Smythe et *al*., 2002) (Tab. 8).

b. Détection de *Leptospira interrogans* (2ème système)

La détection moléculaire de *Leptospira interrogans* était basée sur l'amplification de la séquence partielle du gène *Lint_hsp_MB*. Ces amorces permettent d'amplifier un fragment d'environ 103 pb (Appelt et *al*., 2014) (Tab. 8).

Tableau 8 : Amorces et sondes utilisées pour l'identification des pathogènes lors de la qPCR

Bactéries	Gènes ciblés	Primers et sondes	Séquences
Leptospira pathogènes	*rrs gene* (Smythe et *al*., 2002)	16S r RNA _F 16S r RNA _R 16S r RNA _P	5′-CCCGCGTCCGATTAG-3′ 5′-TCCATTGTGGCCGRACAC-3′ 6-FAM-CTCACCAAGGCGACGTCGGTAGC-TAMRA
Leptospira interrogans	*hsp gene* (Appelt et *al*., 2014)	Lint_hsp_MB_F Lint_hsp_MB_R Lint_hsp_MB_P	5′-TTCTCGCTCCCAGAGTAGACA-3′ 5′-TTTTCCAATTGAACTTGAACGTC-3′ 6-FAM-ACTGGCCGACCTTCCAGGTGTAGA-TAMRA

F: Amorce Forward (sens), R: Amorce Reverse (anti sens), P: sonde (probe)

III.1.2.3. Ajout des ADNs au mix

Dans une autre salle, les ADN de nos prélèvements ont été ajoutés au mix en raison de 5 µL d'ADN à partir de chaque échantillon.

Les contrôles négatifs utilisés dans toutes les réactions de qPCR étaient de l'eau distillée stérile. Le mix seul peut être aussi considéré en tant que témoin négatif. Un plasmide fait maison (laboratoire de l'URMITE) contenant des séquences spécifiques de *Leptospira spp*. a été utilisé comme contrôle positif. L'addition des témoins positifs a été effectuée dans un box à part. Un total de 20 µL du mélange réactionnel est contenu dans chaque puis de la plaque PCR.

III.1.2.4. Programmation et lancement de la qPCR

La plaque PCR est d'abord recouverte avec un film adhésif puis mise dans un appareil de PCR quantitative en temps réel (Fig. 34) (qPCR CFX96™, Bio-Rad, California, USA). Ce dernier est piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement.

Figure 34 : Équipement de qPCR utilisé à l'URMITE

Le programme de qPCR (protocole Roche) était le suivant (Fig. 35): les mélanges réactionnels ont été maintenus à 50 °C pendant 2 min, puis 95 °C pendant 5 min et ensuite mis à travers 39 cycles de 95 °C pendant 30 secondes et 60 °C pendant 1min. Les résultats sont considérés comme positifs lorsque le seuil de cycle (Ct) était inférieur à 36. Tous les résultats positifs sont confirmés par un deuxième système qPCR et par la réaction de séquençage.

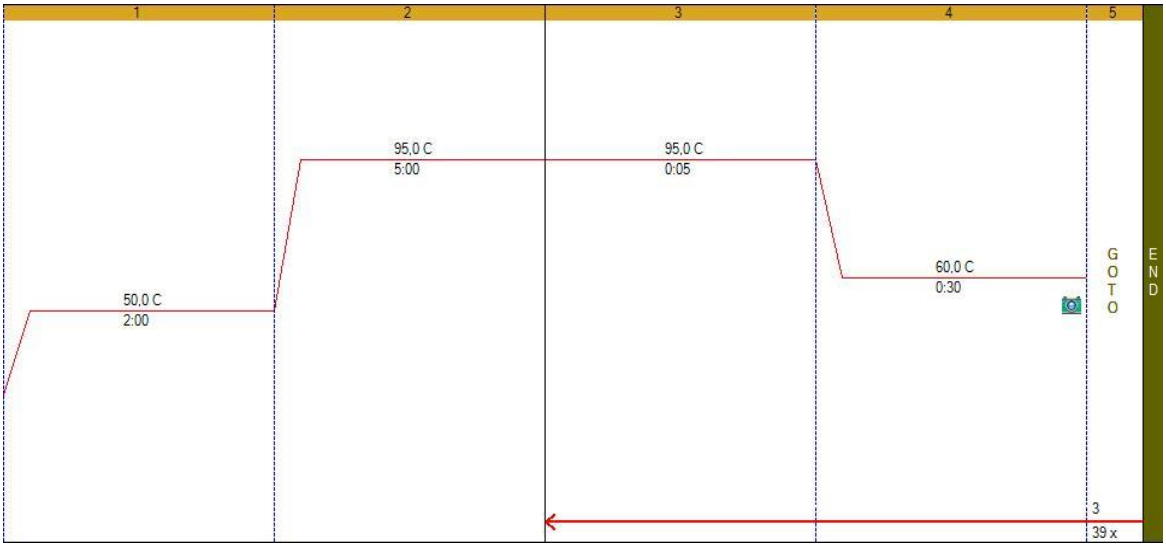


Figure 35 : Programme de la PCR en temps réel (protocole Roche)

III.1.3. PCR standard

III.1.3.1. Préparation du mix

Nous avons préparé le mix avec l'addition de Mix de la de PCR standard (Ampli Taq Master Mix) (qui est constitué de : Tampon (Buffer), désoxynucléotides (dNTPs), $MgCl_2$, Taq Polymérase) (Qiagen, Hilden, Allemagne), de l'eau distillée stérile et des amorces (un reverse et un forword) (Eurogentec, Seraing, Belgium). La quantité de chaque composant est indiquée dans le tableau 9.

Les amorces utilisées lors de la PCR classique sont spécifiques du gène *rpoB* des bactéries de l'espèce *Leptospira interrogans*. Ces amorces permettent d'amplifier un fragment d'environ 592 pb comme a été décrit précédemment par La Scola et *al*. (2016).

Dans cette méthode les volumes nécessaires pour un seul échantillon sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Volumes des produits du mix en utilisant le master mix

Produits	Volume pour un seul échantillon
Ampli Taq Master Mix	12,5 µl
Primer 1	0,75 µl
Primer 2	0,75 µl
Eau distillée stérile	6 µl
Total du mix	**20 µl**

III.1.3.2. Système utilisé lors de la PCR

La détection moléculaire de *Leptospira interrogans* était basée sur l'amplification de la séquence partielle du gène *rpoB*. Ces amorces permettent d'amplifier un fragment d'environ 592 pb (Tab. 10) (Appelt et *al*., 2014).

Tableau 10 : Amorces utilisées pour l'identification des leptospires lors de la PCR standard

Bactérie	Gène ciblé	Primers	Séquences
Leptospira interrogans	*rpoB gene* (La Scola et *al*., 2016)	Lept 1900 _F Lept 2500 _R	5′- CCTCATGGGTTCCAACATGCA-3′ 5′- CGCATCCTCRAAGTTGTAWCCTT-3′

Chaque constituant de ce mix est multiplié par le nombre d'échantillons étudiés. Le témoin positif et le témoin négatif doivent être pris en compte dans les calculs. Tous les constituants sont mélangés dans un seul tube eppendorf pour garantir une distribution homogène de tous les réactifs de la PCR. Par la suite, 20µl de ce mélange est distribué dans chaque microtube de barrettes PCR (barrettes à 8) stériles préalablement numérotées.

III.1.3.3. Ajout des ADNs aux mix

Ajouter les échantillons d'ADN issus de l'extraction ainsi que les Témoins dans les barrettes PCR contenant le mix en raison de 5µl. Donc le volume total dans chaque microtube sera de 25µl.

Les mélanges réactionnels sont introduits dans le thermocycleur. Ce dernier doit être programmé selon l'espèce bactérienne.

III.1.3.4. Programmation et lancement de la PCR standard

Les échantillons subissent une amplification en chaîne par polymérase dans un appareil programmable appelé thermocycleur (Fig. 36) (PCR system 2700, AB Applied biosystems, California, USA).

Figure 36 : Équipement de la PCR standard (Thermocycleur)

Le programme du thermocycleur pour l'amplification du gène *rpoB* est détaillé dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Programme du Thermocycleur de la PCR standard

	Température	**Temps** (minute)	**Étapes**
Premier cycle	95 °C	15 min	**Dénaturation initiale**
35 cycles	95 °C **Tm *** 72 °C	0.5 min 0.5 min 1 min	**Dénaturation** **Hybridation** **Élongation**
Dernier cycle	72 °C	5 min	**Élongation finale**
Conservation des échantillons	**4 °C**	+ ∞	**Fin**

* La température d'hybridation des amorces dépend de celle-ci, La Tm est de **51°C** pour les amorces du gène *rpoB.*

III.1.3.5. Électrophorèse

Cette étape est effectuée dans une salle destinée à l'électrophorèse.

a. Préparation du gel d'Agarose 1,5%

- Peser 3 g d'agarose, la mettre dans un Erlenmeyer de 500 ml de contenance,
- Ajouter ensuite 200 ml du tampon **TBE** 0.5X (Tris, Borate, EDTA).
- Faire chauffer dans un four à Micro-onde à 460 W, pendant 2 à 5 minutes jusqu'à ce que le liquide devient limpide (Fig. 37).
- Laisser le gel se refroidir à température ambiante.

Le TBE est un tampon de migration utilisé en électrophorèse, il est préparé préalablement au laboratoire.

Préparation du tampon d'électrophorèse **TBE 5X** (Tris Borate EDTA), pour 1 litre se fait en suivant les étapes suivantes :

- Peser 54 g de Tris-HCL et 27,5 g d'acide borique dans un bêcher. Les dissoudre dans 800 ml d'eau déminéralisée puis mélanger très bien la solution à l'aide d'un agitateur magnétique
- Ajouter 20 ml d'EDTA (pH 8).
- Ajustez le volume final de 1000 ml avec de l'eau distillée. Mélangez très bien.
- Il n'est pas nécessaire de stériliser la solution, le TBE peut être stocké à température ambiante pendant plusieurs mois.

Pour une électrophorèse sur gel, le TBE 5X doit être dilué avant son utilisation à :

- **0.5X TBE** : 100 ml de TBE 5X + 900 ml d'eau distillée.
- **1X TBE** : 200 ml de TBE 5X + 800 ml d'eau distillée.

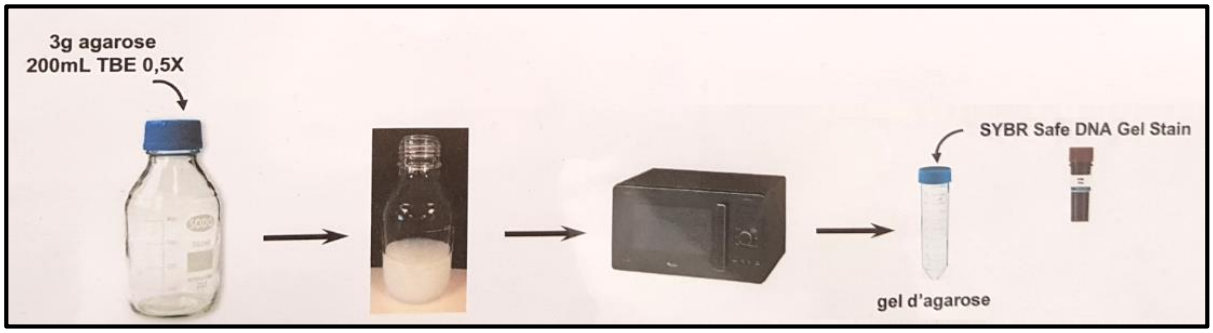


Figure 37 : Schéma illustrant les étapes de la préparation du gel d'Agarose

b. Coulage des gels dans la cuve à électrophorèse horizontale

- Nettoyer la cuve avec son peigne à l'eau courante.
- Après refroidissement du gel, ajouter 2µl de **SYBR Safe** avec précaution (Fig. 37).

Le SYBR Safe est un produit très cancérigène (mutagène) et doit être manipulé avec une extrême prudence sous une hotte et avec des gants de protection chimique.

- Le coulage du gel dans la cuvette se fait après avoir positionner le peigne de façon à former des puits complets (Fig. 38).
- Après polymérisation du gel au bout de 15 à 20 minutes à température ambiante, retirer soigneusement le peigne.
- Immerger le gel et son support dans la cuve de migration contenant au préalable du **TBE** 0,5X.

c. Dépôt des échantillons dans les puits du gel

- Prendre un morceau de parafilm sur lequel est mis pour chaque échantillon à part : 7µl de produit de PCR et 3µl de tampon de charge 10 x (Bleu de Bromophénol) qui assure le maintien du dépôt en immersion dans le puits.
- Mélanger à l'aide d'une micropipette l'échantillon et le tampon de charge puis mettre le mélange dans un micro-puits du gel.
- Déposer de préférence dans le premier et le dernier puits 4µl du marqueur de poids moléculaire (PM) d'une concentration de 0.25µg/µl sans ajout de bleu de charge.
- Un marqueur de PM est une solution de molécules d'ADN, il sert comme référence pour estimer le poids moléculaire des fragments d'ADN amplifiés, dont la taille est inconnue.
- Les deux avant derniers puits du gel sont réservés pour le témoin positif et le témoin négatif.
- Déposer les échantillons dans les autres puits (Fig. 38).

d. Migration et visualisation de l'ADN

- Fermer la cuve. Brancher les cordons de la cuve à l'alimentation de manière à ce que les dépôts soient côté cathode (-).

  La molécule d'ADN est chargée négativement, ce qui lui permet de migrer vers l'anode (+) une fois le champ électrique est appliqué.
- Appliquer une tension de 135 volts pendant environ 30 minutes de migration (Fig. 38).
- Débrancher le générateur de la cuve et récupérer le gel dans son support à l'abri de la lumière.

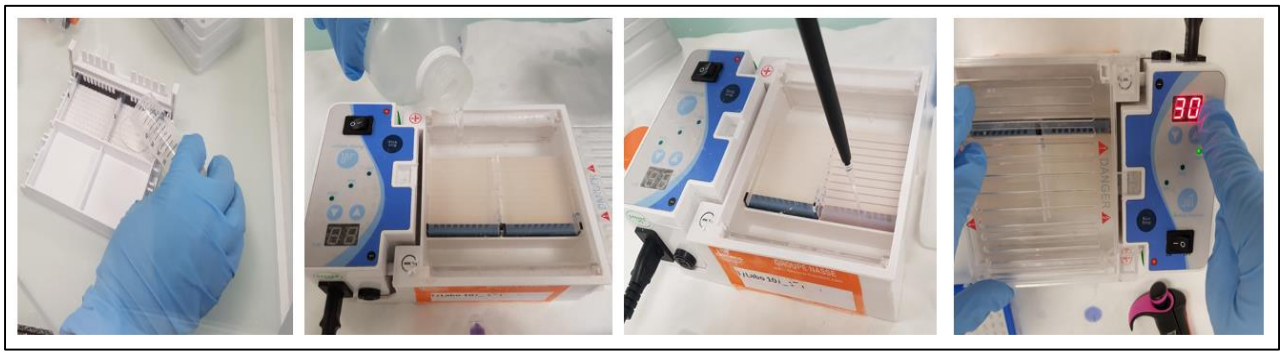


Figure 38 : Préparation du gel d'Agarose et dépôt des échantillons

La révélation du profil électrophorétique a été réalisée à l'aide de l'imageur moléculaire (Fig.39) (Invitrogen Life Technologies E-Gel Imaging System, USA).

Figure 39 : Imageur moléculaire pour la lecture du gel d'électrophorèse

En fonction de la taille des fragments d'ADN recherchés, les bandes visibles et leurs tailles sont repérées respectivement par rapport au témoin positif et au marqueur de PM (Fig. 40).

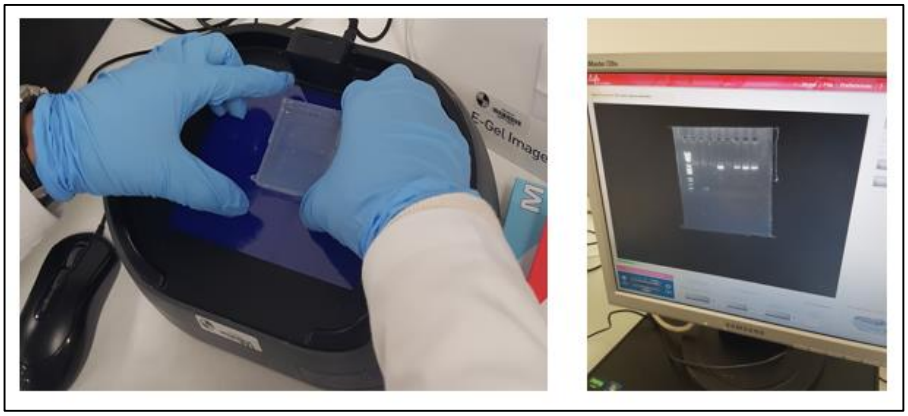


Figure 40 : Visualisation du gel

NB: Il est important de conserver les ADN amplifiés à 4°C en vue de faire le séquençage des échantillons positifs.

III.1.4. Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. Seuls les échantillons positifs au *Leptospira* avec les deux systèmes de qPCR et avec le système de la PCR standard ont fait l'objet d'un séquençage dans le but d'une confirmation.

III.1.4.1. Protocole

Avant de commencer le séquençage proprement dit il faut d'abord réaliser une PCR standard car ce sont les échantillons d'ADN amplifiés (positifs) par PCR qui sont destinés à être séquencer.

1ere étape : Purification des produits de PCR (Fig. 41)

- Ajouter 50 µl d'eau distillée ultra pure exempte d'ADNase et ARNase (EDS) aux produits de PCR à purifier.
- Déposer la totalité du mélange de chaque échantillon dans un puits à part sur une plaque d'ultrafiltration des fragments de PCR (plaque de 96 puits, Macherey-NagelTM Nucleo Fast).
- Mettre la plaque en aspiration sur une pompe à vide (MilliporeTM MultiScreenTM HTS Vacuum Manifold) pendant 10 minutes, nanomètre à 25.
- Récupérer la plaque, la sécher sur du papier filtre puis ajouter encore une fois 50 µl d'EDS à tous les spécimens.
- Mettre la plaque sur un agitateur de microplaques (HeidolphTM Titramax 100) pendant 10 minutes à une vitesse de 600 tr/min.
- Récupérer la plaque et transférer pour chaque échantillon toute la quantité du produit de PCR purifié (50 µl) dans un tube préalablement identifié.

NB : Dans le cas de purification de nombreux produits de PCR, utiliser de préférence les barrettes de 8 microtubes.

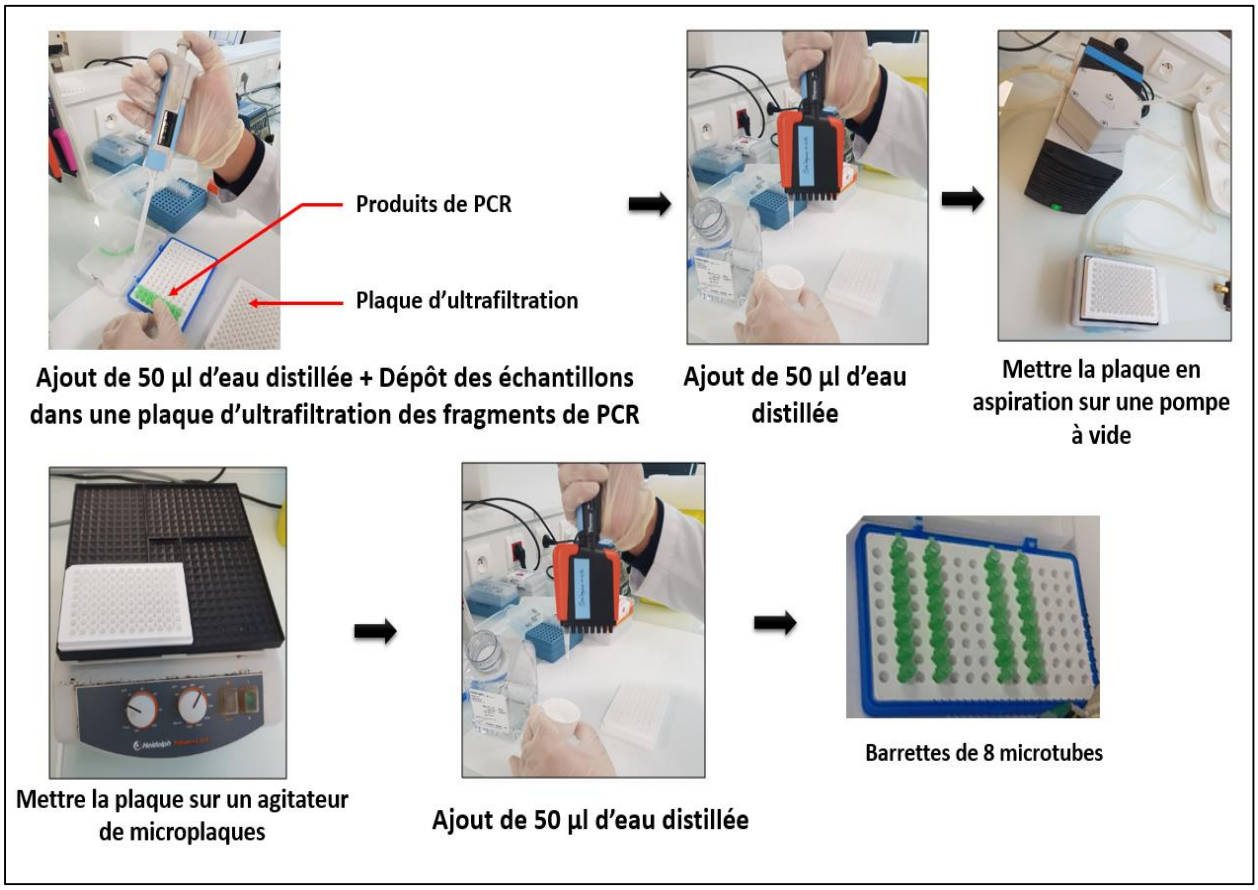


Figure 41 : Purification des produits de PCR

2eme étape : Préparation du mix de séquence

Un mélange réactionnel prêt (BigDye Terminator version 1.1 Sequencing Kit, Californie, USA) est utilisé pour une amplification séparée des brins d'ADN. Pour cela deux mix ont été préparés, un contient l'amorce sens (Forward) et l'autre contient l'amorce anti sens (Reverse).

Sous une hotte PCR, le milieu réactionnel a été préparé comme suit (Tab. 12) :

Tableau 12 : Produits du mix de séquence

Produits	Volume pour un seul échantillon
BigDye	1 µl
Tampon de séquençage	1,5 µl
Amorce F ou R	0,5 µl
Eau distillée stérile (exempte de ADNase / ARNase)	3 µl
Total du mix	**6 µl**

Chaque constituant de ce mix est multiplié par le nombre de produits de PCR purifiés. Tous les composants sont mélangés dans deux tubes un contient l'amorce F et l'autre l'amorce R. Par la suite, 6 µl de chaque tube est distribué séparément dans les microtubes de barrettes PCR stériles préalablement codifiées (deux couleurs différentes pour les deux types de mix).
Dans une autre salle, les produits de PCR purifiés ont été ajoutés en raison de 4 µl dans les deux types de barrettes PCR. Il est important de bien fermer les barrettes avant de les introduire dans le thermocycleur.

3eme étape : Programmation et lancement de la réaction de séquence

La seconde amplification des produits de PCR purifiés doit se faire selon le programme du tableau 13.

Tableau 13 : Programme du Thermocycleur pour l'amplification des produits de PCR purifiés

	Température	**Temps**	**Étapes**
Premier cycle	96 °C	1 min	**Dénaturation initiale**
25 cycles	96 °C **50 °C** 60 °C	10 sec 5 sec 3 min	**Dénaturation** **Hybridation** **Élongation**
Conservation des échantillons	**4 °C**	+ ∞	**Fin**

La température d'hybridation est constante quelle que soit l'amorce utilisée.

4éme étape : Préparation de la plaque de Sephadex (Fig. 42)

Cette étape a pour but de purifier par filtration sur gel sur colonne de Sephadex les produits de réaction de séquence afin d'améliorer la qualité du séquençage.
La résine Sephadex utilisée permet d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces de PCR en excès. La limite d'exclusion de la résine est d'environ 20 bases. La plaque MultiScreen HV est utilisée comme support inerte de la résine.

- Déposer la résine Sephadex (poudre blanche) dans chaque puits (45µl) du chargeur de colonne (plaque noire en aluminium à 96 puits, Multiscreen^{TM} columm loader MACL).
- Retirer l'excès de résine avec la raclette.
- Placer la plaque de Sephadex MultiScreen HV (MAHVN, plaque de filtration à 96 puits) à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble.
- Taper sur le chargeur pour évacuer la résine vers la plaque.

- Ajouter 300 µl d'eau ultra pure (EDS) dans chaque puits contenant de la résine, fermer la plaque avec son couvercle et laisser incuber 3 heures à température ambiante.

Figure 42 : Préparation de la plaque de Sephadex

Une fois que les mini-colonnes sont gonflées dans la plaque de Sephadex, cette dernière peut être directement utilisée ou bien stockée pour une longue durée à 4 °C entourée de parafilm.

NB : Cette opération doit être faite minimum trois heures à l'avance.

5ème étape : Purification de la réaction de séquence (Fig. 43)

- Placer la plaque de Sephadex MultiScreen HV avec son couvercle sur une plaque « poubelle » (Fig. 42).
- Centrifuger l'ensemble pendant 5 minutes à 13000 tr/min (Centrifugeuse, Thermo Fisher Scientific, USA), veiller à l'équilibrage.

- Jeter la plaque poubelle avec le produit précipité.
- Ajouter 10 µl d'eau extra pure (EDS) aux produits de séquence.
- Poser la plaque de Sephadex MultiScreen HV sur une plaque de polypropylène au format standard de 96 puits (MicroAmp Optical 96-Well reaction plate) qui doit être préalablement identifiée.

NB : Veiller à bien faire coïncider les A1 des deux plaques.

- Déposer délicatement les 20 µl de produits de séquence bien au centre des mini colonnes de la plaque MultiScreen HV, sans toucher les parois. Ne laisser aucune cupule vide sur un run de 16 échantillons, mettre de l'eau (EDS) dans la ou les cupules vides en raison de 20 µl.

NB : Une plaque à 96 puits contient 6 runs (12 colonnes), et un run comporte 8 produits de séquence pour le forward et 8 autres pour le Reverse sur deux colonnes.

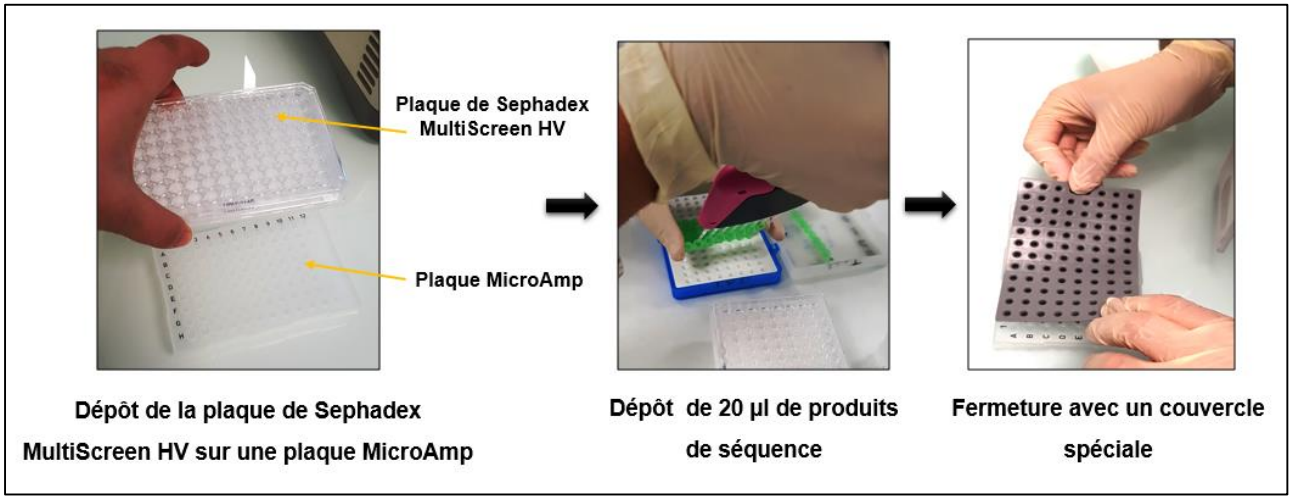


Figure 43 : Purification de la réaction de séquence

- Centrifuger l'ensemble des deux plaques avec couvercle pendant 5 minutes à 13000 tr/min sans oublier de vérifier l'équilibrage.
- Jeter la plaque Sephadex MultiScreen HV.
- Récupérer la plaque MicroAmp contenant les produits de séquence filtrés qui sera destinée au séquençage, la fermer hermétiquement avec un couvercle spéciale (MicroAmp 96-Well Full Plate Cover) pour prévenir l'évaporation et la fixer sur un support (The standard plate adapter for the ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer).

6ème étape : Lancement de l'opération du séquençage d'ADN

L'ensemble (plaque-adaptateur) est placé convenablement sur le séquenceur capillaire (Fig. 44) (Genetic Analyzer, ABI PRISM 3130 XL, Applied Biosystems, USA).

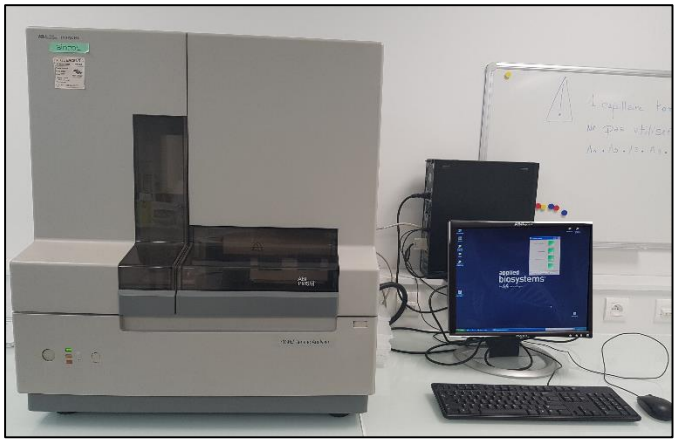


Figure 44 : Equipement du séquençage

Le chargement de la plaque, la création d'un plan de plaque, la programmation et l'identification des runs sont réalisés selon le guide d'utilisation du séquenceur.

III.1.4.2. Traitement et analyse des données

Un séquenceur de gènes sert à déterminer l'ordre des bases nucléiques d'un échantillon d'ADN et à le présenter, après traitement, sous forme d'une suite de lettres, appelée read ou lecture, représentant des nucléotides.

- Toutes les séquences (reads) obtenues ont été récupérées puis assemblées et éditées en utilisant le logiciel Chromas Pro (version 1.7.7) (Technelysium pty. Ltd., Australie).

- Par la suite, les séquences corrigées ont été analysées par le BLAST de NCBI (Fig. 45) (Basic Local Alignment Search Tool) : https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

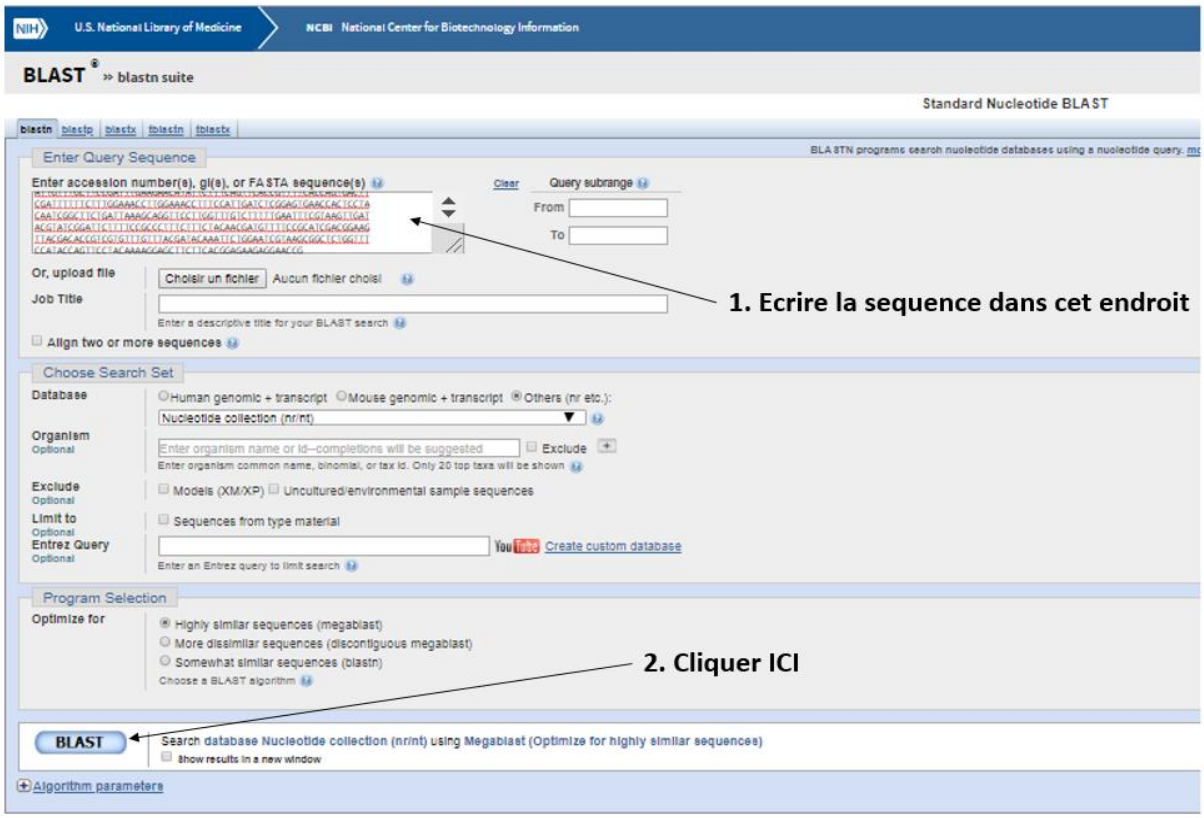


Figure 45 : Analyse des séquences par le BLAST de NCBI

- Comparer avec les séquences disponibles sur la base de données de GenBank.

III.2. Recherche de *Yersinia pestis* (la peste)

Un nombre de 140 rates de chats et 127 rates de chiens et un nombre de 321 puces récupérées à partir de ces carnivores ont été analysé par biologie moléculaire en ciblant les deux gènes *pla* et *glpD* spécifiques de *Yersinia pestis*.

III.2.1. Identification des ectoparasites

L'identification des ectoparasites au niveau du genre et d'espèce était réalisée à l'aide d'un stéréomicroscope (Fig. 47) (ZEISS Axio Zoom V16, Thornwood, USA), en se basant sur des critères morphologiques et des clés taxonomiques normalisées.

Au laboratoire de l'entomologie, la manipulation de ces ectoparasites était effectuée dans une boite de pétri à l'aide d'une pince fine. Pendant l'observation, le corps de l'arthropode est humidifié avec de l'alcool à 70° pour éviter sa dessiccation et enlever les débris qui l'entoure (Fig. 46).

Figure 46 : Préparation et traitement des puces pour l'identification morphologique

L'identification des puces est rendue plus facile grâce à la technique d'éclaircissement et cela en suivant le protocole de l'insectarium à l'URMITE, cela a permis de monter des lames de références, les étapes sont les suivantes :

- Laver la puce avec de l'eau distillée.
- Plonger l'insecte dans un bain de l'hydroxyde de potassium (KOH) à 20% pour l'éclaircissement, pendant 24h à 48h à température ambiante.
- Rincer abondamment avec de l'eau distillée pendant 30 à 40 min.
- Mettre la puce dans une solution d'acide Acétique (CH_3COOH) à 5% pendant 15 à 30 min pour stopper la réaction de macération.

- Le spécimen doit être déshydraté à l'aide de concentrations croissantes d'éthanol (30%, 50% et 90%, à 10-15 minutes d'intervalle) afin de prévenir les distorsions. Ensuite la puce est immergée dans l'éthanol absolu pendant au moins 24 heures.
- En fin pour le montage, fixer la puce sur la lame et ajouter une goutte de liquide d'inclusion rapide (Le baume de Canada) et couvrir d'une lamelle.
- La puce doit être positionnée comme suit: la tête tournée vers la droite et les pattes vers le haut de la lame.
- Bien que le spécimen puisse être observé dès la fin du montage, il est recommandé d'attendre que celui-ci soit complètement sec et solidifié. Juste après le montage, un poids est posé sur la lamelle pour toute une nuit afin que le montage se consolide suffisamment. Ensuite, le séchage est accéléré par le passage au four à 50-55°C. La chaleur va aussi favoriser l'élimination d'éventuelles bulles d'air emprisonnées sous la lamelle.

Figure 47 : Equipement de l'identification morphologique des puces

La reconnaissance du genre et de l'espèce est faite selon les clés d'identification de Beaucournu et Launay (1990) et de Whitaker (2007) en se basant sur plusieurs caractères, les plus importants sont (Fig. 48, 49, 50) :

- La forme de la tête.
- La présence ou l'absence de cténidies génales et pronotales ; le nombre et le caractère des épines.
- La présence, le nombre et l'aspect des soies oculaires et frontales ou des soies sur les autres parties du corps de la puce (sternite, tarses...).

- La présence ou l'absence de baguette verticale sur le mésothorax.
- La forme de spermathèque.
- Le nombre d'encoches sur le tibia des pattes postérieures.

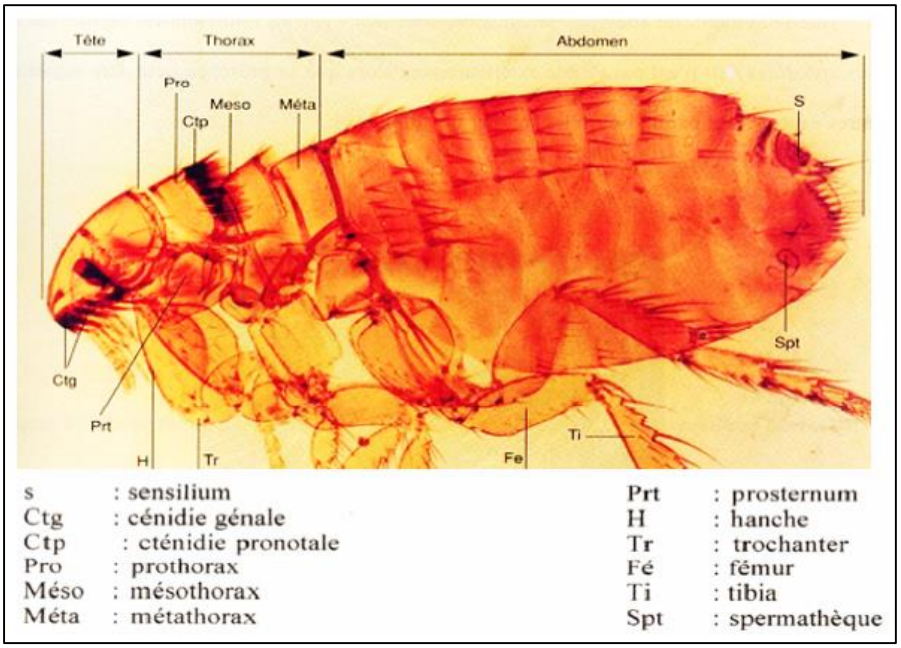


Figure 48 : Morphologie externe d'une puce femelle « *Ctenocephalides felis* » (Franc, 1994)

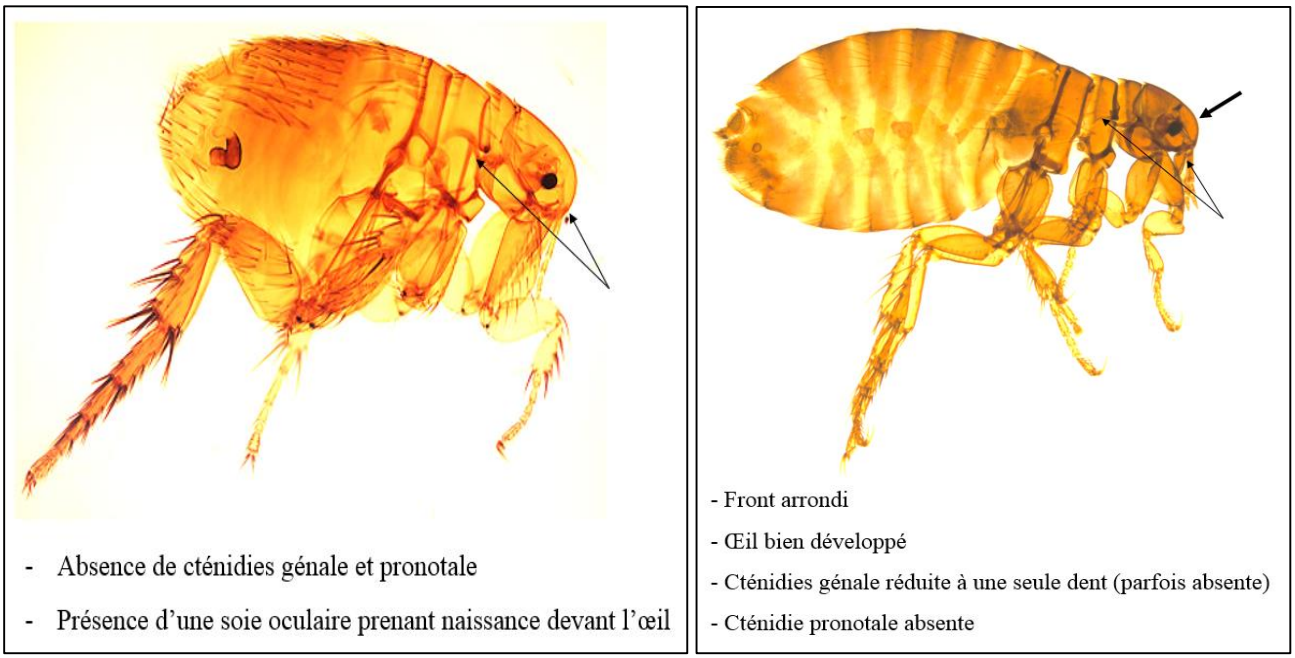


Figure 49 : Principaux critères de diagnose de *Xenopsylla chéopis* (Puce du rat), à gauche ; et de *Pulex irritans* (puce de l'homme) à droite (Critères d'après Beaucournu et Launay, 1990)

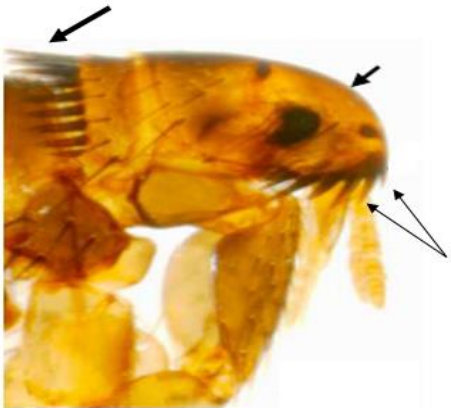
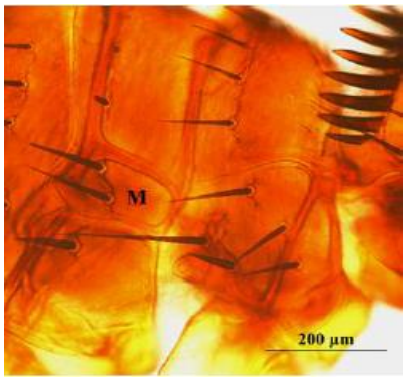
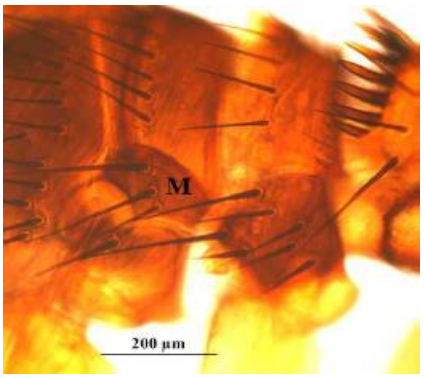
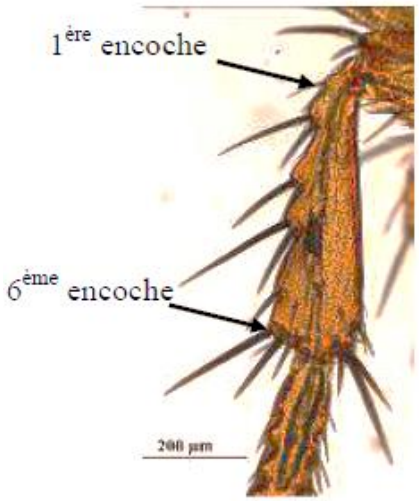
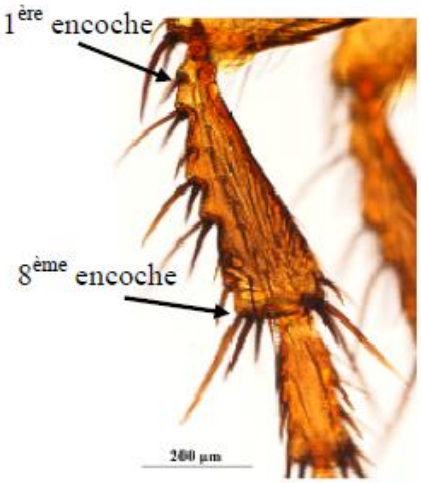
Morphologie	*C. felis*	*C. canis*
Tête, Cténidie génale et pronotale	 -Front long et oblique -Deux premières épines de la cténidie génale de longueur équivalente -Présence de cténidies pronotales	 - Front arrondi - Première épine de la cténidie génale 2 fois plus courte que la 2ème et la 3ème - Présence de cténidies pronotales
Métépisternum	 2 soies	 3 soies
Face externe des tibias	 6 à 7 encoches	 8 encoches

Figure 50 : Principaux critères de diagnose de *C. felis* et *C. canis* (Bouhsira, 2014 ; Critères d'après Beaucournu et Launay, 1990)

III.2.2. Extraction de l'ADN

- Les rates et les puces conservées dans l'éthanol ont été rincées deux fois pendant 5 minutes dans l'eau distillée puis séchées sur un papier filtre stérile.
- Toute la manipulation a été menée dans une hotte de biosécurité à flux laminaire.
- Les spécimens ont été incisés à l'aide d'un scalpel (Fig. 51) et écrasés individuellement dans des tubes stériles.

Figure 51 : Incision des puces sur deux parties

- Les échantillons ont été par la suite immergés dans 180 µL de tampon G2 (30 mM de Tris-Cl; 30 mM d'EDTA, 5% de Tween 20; 0,5% de Triton X-100; 800 mM GuHCl) et 20 µl de protéinase K (activité = 600 mAU / ml de solution ou 40 mAU / mg de protéine),
- Puis ils ont été incubés pendant toute la nuit à 56 °C (Fig. 52).

Figure 52 : Incubation des échantillons dans un bain sec à 56°C pendant toute la nuit (over-night)

- Après cette étape de pré-lyse, un total de 100 µL de l'ADN a été extrait à partir de la moitié de chaque puce et d'un petit fragment de chaque rate à l'aide du kit QIAamp Tissue

(Qiagen, Hilden, Allemagne). Ce kit contient des réactifs qui permettent la purification d'ADN à partir des tissus en utilisant un robot automatique EZ1 (QIAGEN-BioRobot® EZ1, Tokyo, Japon).

- L'ADN extrait a été stocké à -20°C dans des conditions stériles jusqu'à son utilisation dans les tests PCR.

III.2.3. PCR en temps réel (qPCR)

Après l'extraction, tous les échantillons d'ADN ont fait l'objet d'une amplification par qPCR.

III.2.3.1. Préparation du mix

Cette opération a été réalisée sous des conditions aseptiques dans une pièce isolée et sous une hotte à UV pour éviter la contamination du mix.

Nous avons préparé le mix avec l'addition de Master mix contenant la Taq polymérase, des amorces (primers) et de la sonde (kit de qPCR Takyon, Qiagen, Hilden, Allemagne) (Tab. 14). Une quantité de 15 µl Mix a été déposée dans des plaques PCR à 96 puits.

Tableau 14 : Produits du mix de qPCR

Produits	Concentration	Volume pour un seul échantillon
Master mix	1 X	10 µl
Eau distillée stérile (exempte de ADNase / ARNase)	----	3,5 µl
Primer 1	20 µM	0,5 µl
Primer 2	20 µM	0,5 µl
Sonde	2,5 µM	0,5 µl
Total du mix	----	**15 µl**

Les systèmes de qPCR (amorces et sondes) spécifiques de l'espèce bactérienne ciblée dans notre recherche sont présentés dans le tableau 15.

III.2.3.2. Systèmes utilisés lors de la qPCR

III.2.3.2.1. Système pour la détection de de *Yersinia pestis*

En utilisant la qPCR, les échantillons d'ADN ont été testés pour la recherche de *Yersinia pestis* en ciblant le gène activateur du plasminogène (gène *pla*) situé dans le plasmide pPCP1. Ces amorces permettent d'amplifier un fragment d'environ 98 pb (Tab. 15) (Tran et *al*. 2011).

Tableau 15 : Amorces et sondes utilisées pour l'identification de *Yersinia pestis* lors de la qPCR

Bactérie	Gènes ciblés	Primers et sondes	Séquences
Yesinia pestis	*pla gene* (Tran et *al*. 2011)	Yper_Pla _F Yper_Pla _R Yper_Pla _P	5′- ATGGAGCTTATACCGGAAAC -3′ 5′-GCGATACTGGCCTGCAAG-3′ 5'-6FAM-TCCCGAAAGGAGTGCGGGTAATAGG-TAMRA-3′

F: Amorce Forward, R: Amorce Reverse, P: sonde (probe)

III.2.3.2.2. Systèmes de contrôles

Comme l'utilisation d'un témoin positif de *Yersinia pestis* est à proscrire (afin d'éviter toute possibilité de contamination), des qPCR de contrôle, parallèles ont été réalisées sur les ADN extraits pour confirmer le bon déroulement de la PCR.

a. Contrôle interne : Beta-actine

La Béta-actine est une protéine non-musculaire que nous trouvons chez plusieurs espèces. Sa recherche a un but de contrôle interne indiquant la présence d'ADN animal. Un résultat positif de la B-actine nous renseigne sur le bon déroulement de l'extraction et de l'amplification. Nous avons utilisé la Béta-actine humaine, comme elle est homologue à celle du chien et du chat.

Les amorces utilisées pour identifier la séquence Béta-actine sont décrites dans le tableau 16. Ces amorces permettent d'amplifier un fragment d'environ 172 pb comme a été décrit précédemment par Mediannikov et *al*., 2010.

Tableau 16 : Amorces et sonde utilisées pour l'identification de l'Actine lors de la qPCR

Organismes cibles	Nom	Séquences	Dilution	Amplicon
Actine	Actine_F	CATGCCATCCTGCGTCTGGA	1nmol/ul puis 1/50ème	172 pb
	Actine_R	CCGTGGCCATCTCTTGCTCG	1nmol/ul puis 1/50ème	
	Actine_P	6FAM-CGGGAAATCGTGCGTGACATTAAG-Tamra	0,1nmol/ul puis 1/40ème	

b. Contrôle externe : TISS

Le Tiss est une séquence d'ADN synthétique qu'on rajout avant l'extraction servant de témoin externe. Sa présence à la fin de la réaction nous indique qu'il y a absence d'inhibiteurs de la PCR et nous renseigne sur un bon déroulement de l'amplification. Les amorces utilisées pour

identifier la séquence TISS sont décrites dans le tableau 17. Ces amorces permettent d'amplifier un fragment d'environ 135 pb comme a été décrit précédemment par Sow et *al*., 2017.

Tableau 17 : Amorces et sonde utilisées pour l'identification du TISS lors de la qPCR

Organismes cibles	**Nom**	**Séquences**	**Dilution**	**Amplicon**
TISS : Témoin d'inhibition synthétique	Tiss_F	CTGAGTCGTACCTAATGCATGACC	1nmol/ul puis 1/50ème	135 pb
	Tiss_R	GTATCGCGATTCGCTAAAGTTC	1nmol/ul puis 1/50ème	
	Tiss_P	6FAM-TCGAGACTCGACGCATGCACG-Tamra	0,1nmol/ul puis 1/40ème	

II.2.3.3. Ajout des ADNs au mix

Dans une autre salle, les ADN de nos prélèvements ont été ajoutés au mix en raison de 5 µL d'ADN à partir de chaque échantillon.

Les contrôles négatifs utilisés dans toutes les réactions de qPCR étaient de l'eau distillée stérile. Cependant, le mix seul peut être aussi considéré comme un témoin négatif. Le contrôle positif n'a pas été utilisé pour éviter toute contamination (Malek et *al*., 2015). Un total de 20 µL du mélange réactionnel est contenu dans chaque puits de la plaque PCR.

III.2.3.4. Programmation et lancement de la qPCR

La plaque PCR est d'abord recouverte avec un film adhésif, centrifugé à 1300 tours/min pendant 3 minutes puis mise dans un appareil de PCR quantitative en temps réel (qPCR CFX96™, Bio-Rad, California, USA).

Le programme de qPCR (protocole Takyon) était le suivant: les mélanges réactionnels ont été maintenus à 50 °C pendant 2 min, puis 95 °C pendant 3 min et ensuite mis à travers 39 cycles de 95 °C pendant 10 secondes et 60 °C pendant 1 min. Les résultats sont considérés comme positifs lorsque le seuil de cycle (Ct) était inférieur à 36.

III.2.4. PCR nichée « nested PCR »

Les prélèvements déjà traités par une qPCR pour la recherche de *Yersinia pestis* étaient confirmés par une PCR nichée.

La PCR nichée est une PCR qui se déroule en deux étapes successives et le produit issu de la première PCR est de nouveau amplifié au cours d'une deuxième PCR. Deux couples d'amorce différents sont successivement utilisés, le second liant des séquences situées à l'intérieur (nichée) du premier amplicon.

Le couple d'amorces externes permet tout d'abord d'obtenir un premier fragment d'ADN amplifié, selon une PCR classique. Les fragments d'ADN obtenus servent alors de matrice pour une seconde PCR. Le couple d'amorces internes donnera des fragments de taille inférieure à ceux obtenus avec la 1ère PCR. Cette technique de « double PCR emboîtée» permet donc à la fois une plus grande sensibilité et une plus grande spécificité.

Cette technique doit cependant être réalisée avec une extrême précaution, le risque de contamination étant encore augmenté du fait de l'existence de deux PCR successives et de la nécessité d'ouvrir le tube à la fin de la première PCR pour ajouter le deuxième couple d'amorces.

III.2.4.1. Préparation du mix et rajout des ADN

Dans cette méthode la quantité du mix était de 50 µL, contenant 10 pmol de chaque amorce, 200 µmol/L de chaque désoxyribonucléotide triphosphate (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), 1,5 U Taq polymérase (Invitrogen) et 2,5 µL d'une solution à 50 mmol/L de MgCl2 diluée dans du tampon Taq 1X.

2 µL d'ADN a été rajouté par la suite pour une éventuelle amplification (1 µL pour la PCR nichée).

Les contrôles négatifs utilisés dans toutes les réactions de qPCR étaient de l'eau distillée stérile. Le contrôle positif n'a pas été utilisé pour éviter toute contamination (Malek et *al*., 2015).

III.2.4.2. Système utilisé lors de la PCR

La deuxième détection moléculaire de *Yersinia pestis* était basée sur l'amplification du gène *glpD* codant pour la glycérol-3-phosphate déshydrogénase. Le couple d'amorces utilisé pour cette PCR est représenté dans le tableau 18 (Drancourt et *al*., 2014).

Tableau 18 : Le couple d'amorces utilisé pour l'identification de *Yersinia pestis*

Bactérie	Gènes ciblés	Primers	Séquences
Yesinia pestis	*glpD gene* (Drancourt et *al*., 2007)	glpD-F1 glpDR2	5′-GGCTAGCCGCCTCAACAAAAACAT-3 5′-GGTGCCAGTTTCAGTAACAC-3 ′
		glpD-F3 glpD-R3	5′-CGCTGTTTCGAACATTCAGA-3 ' 5′-GGCCAAGGCTTCACTTACCA-3 '

III.2.4.3. Programmation et lancement de la PCR

Les PCR ont été effectuées dans un thermocycleur T3 (Biolabo, Archamps, France). Le programme du thermocycleur est mentionné dans le tableau 19.

Tableau 19 : Programme du Thermocycleur de la PCR

	Température	**Temps**	**Étapes**
Premier cycle	95 °C	2 min	**Dénaturation initiale**
38 cycles	94 °C **58 °C** 68 °C	30 sec 30 sec 90 sec	**Dénaturation** **Hybridation** **Élongation**
Dernier cycle	68 °C	7 min	**Élongation finale**
Conservation des échantillons	**4 °C**	+ ∞	**Fin**

IV. Analyses statistiques

Le calcul des proportions et prévalences ainsi que le traitement des résultats sous forme de tableaux et histogrammes ont été effectués à l'aide du logiciel informatique EXCEL 2013.

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel **IBM® SPSS® Statistics version 20** et **MEDCALC® online** software MedCalc's Comparison of proportions calculator par l'application des tests suivant : Tests de χ^2 d'homogénéité, d'indépendance, Test de Fisher exact. L'intervalle de confiance (IC) à 95% a été également calculé. Les valeurs de « p » ont été calculées séparément pour chaque variable, la différence est considérée significative au risque d'erreur de 5 %.

RESULTATS

I. La leptospirose :

Cette enquête a pour objectif principal de déterminer le statut infectieux des populations canine et féline vis-à-vis de la leptospirose dans la région d'Alger. Pour cela nous avons identifié grâce à la PCR en temps réelle, PCR standard-séquençage l'agent pathogène chez les réservoirs animaux.

I.1. Description de la population animale étudiée

Au cours de l'étude, 104 chiens et 107 chats, provenant de la fourrière canine d'Alger, ont été échantillonnés.

I.1.1 Répartition des animaux prélevés en fonction du sexe

Sur les 104 chiens prélevés, 69 (66.34%) étaient des mâles et 35 (33.65%) étaient des femelles. Parmi les 107 chats, 66 (61.68%) étaient des mâles et 41 (38.31%) étaient des femelles (Annexe 6).

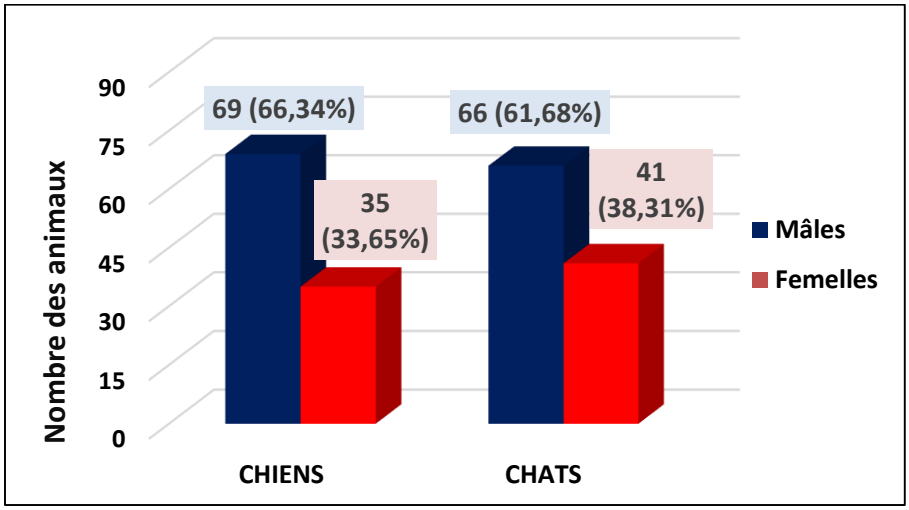


Figure 53 : Répartition de la population étudiée en fonction du sexe

La distribution des chiens par rapport à la variable « sexe » est non homogène en appliquant le test Khi-2 d'homogénéité (p = 0,00085). Le même constat a été noté par rapport à l'espèce féline où la différence est considérée comme significative (p = 0,015).

I.1.2 Répartition des animaux prélevés en fonction de l'âge

L'âge des chiens prélevés variait entre 2 mois et 11 ans, 17 (16,34%) sujets étaient des jeunes (≤ 1 an) 87 (83,65%) étaient des adultes (> 1 an). La majorité de la population féline prélevée a été estimée âgée de moins de 3 ans en fonction de leur aspect physique et leur dentition.

18 (16,82%) chats avaient un âge inferieur à un an et 86 (80,37%) avaient un âge supérieur à un an (Annexe 6).

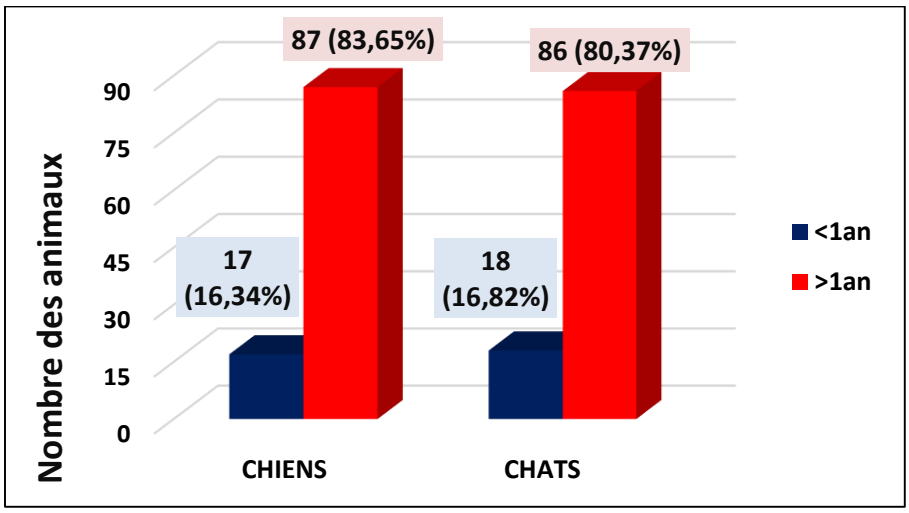


Figure 54 : Répartition de la population étudiée en fonction de l'âge

La distribution des animaux prélevés que ça soit des chiens ou des chats par rapport à la variable « âge » est non homogène en appliquant le test Khi-2 d'homogénéité ($p < 0,00001$). Les animaux âgés de moins d'une année étaient peu nombreux. Ils peuvent mourir à cause des conditions défavorables du milieu extérieur ou bien adoptés par des propriétaires d'animaux.

I.1.3 Répartition des animaux prélevés en fonction de la race

La population canine prélevée était constituée principalement de chiens bâtards avec un nombre de 86 (82,69%) contre 18 (17,30%) pour les autres races (Annexe 6). Les chats appartenaient tous (107) à des races mixtes, les autres races félines étaient absentes.

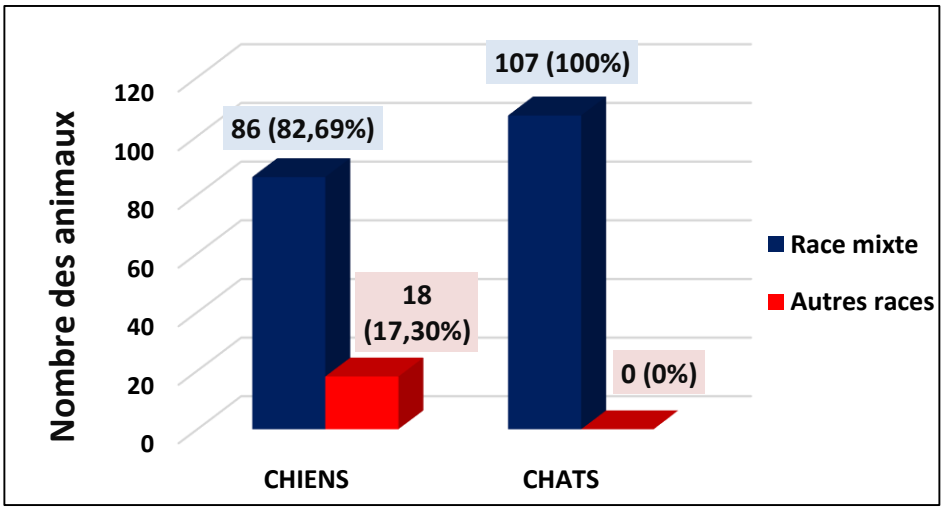


Figure 55 : Répartition de la population étudiée en fonction de la race

La distribution des animaux par rapport au critère « race » n'est pas homogène en appliquant le test Khi-2 d'homogénéité (p < 0,00001). Ces animaux sont errants et n'appartiennent pas à des races pures puisque ils proviennent de plusieurs croisements entre eux (hybrides), donc leur origine reste inconnue.

I.1.4 Répartition des animaux prélevés en fonction du statut clinique

Tous les animaux prélevés apparaissaient sains, aucun symptôme clinique n'a été signalé. Cela peut être lié à leur résistance dans le milieu extérieur.

I.2 Résultats des analyses de laboratoire

I.2.1 Echantillons analysés

Les prélèvements d'urine étaient collectés à partir de 104 chiens et de 107 chats et ont été testés pour la recherche de L'ADN de *Leptospira* pathogènes.

I.2.2 Détection moléculaire par qPCR

Tous les échantillons d'urine ont fait l'objet d'une PCR en temps réel (qPCR) avec deux systèmes (*16S rRNA* et *hsp*). Les résultats positifs ont été par la suite confirmés et identifiés par un système spécifique de PCR standard et de séquençage de l'ADN pour le gène *rpoB*.

Les contrôles positifs ont produit les résultats prévus. Aucun signal n'a été obtenu à partir des témoins négatifs.

I.2.2.1 Les résultats obtenus chez les chiens

Au total 05 sur 104 (4,8%, P = 0.0007, IC : 7,1929 - 48,2975%) chiens étaient positifs aux deux systèmes de Leptospires.

a. Système 16S rRNA :

L'ADN de *Lpetopira sp.* a été détecté par la qPCR dans 05/104 (4,8%) échantillons avec les Ct suivants : (Echantillon 1 : Ct = 26,63 ; Echantillon 2 : Ct = 23,71 ; Echantillon 3 : Ct = 23,47 ; Echantillon 4 : Ct = 25, 26 ; Echantillon 5 : Ct = 17,54) (Fig. 56).

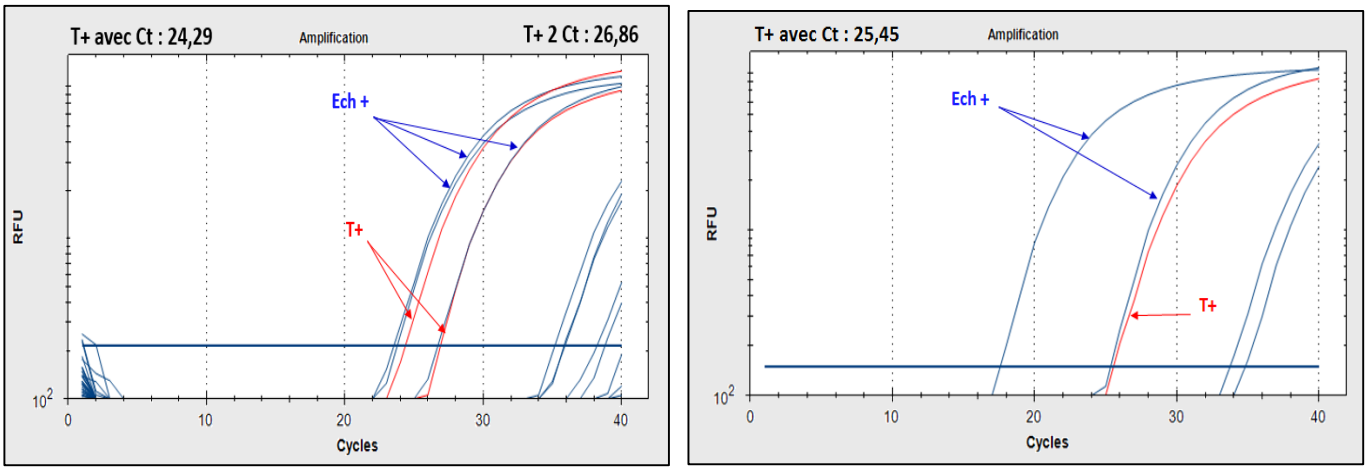


Figure 56 : Les courbes d'amplification du gène *16S rRNA* de *Leptospires pathogènes* par qPCR chez les chiens

b. Système hsp :

L'ADN de *Lpetopira interrogans* a été détecté par la qPCR dans 05/104 (4,8%) échantillons avec les Ct suivants : (Echantillon 1 : Ct = 27,66 ; Echantillon 2 : Ct = 24,58 ; Echantillon 3 : Ct = 24,63 ; Echantillon 4 : Ct = 25,46 ; Echantillon 5 : Ct = 17,67) (Fig. 57).

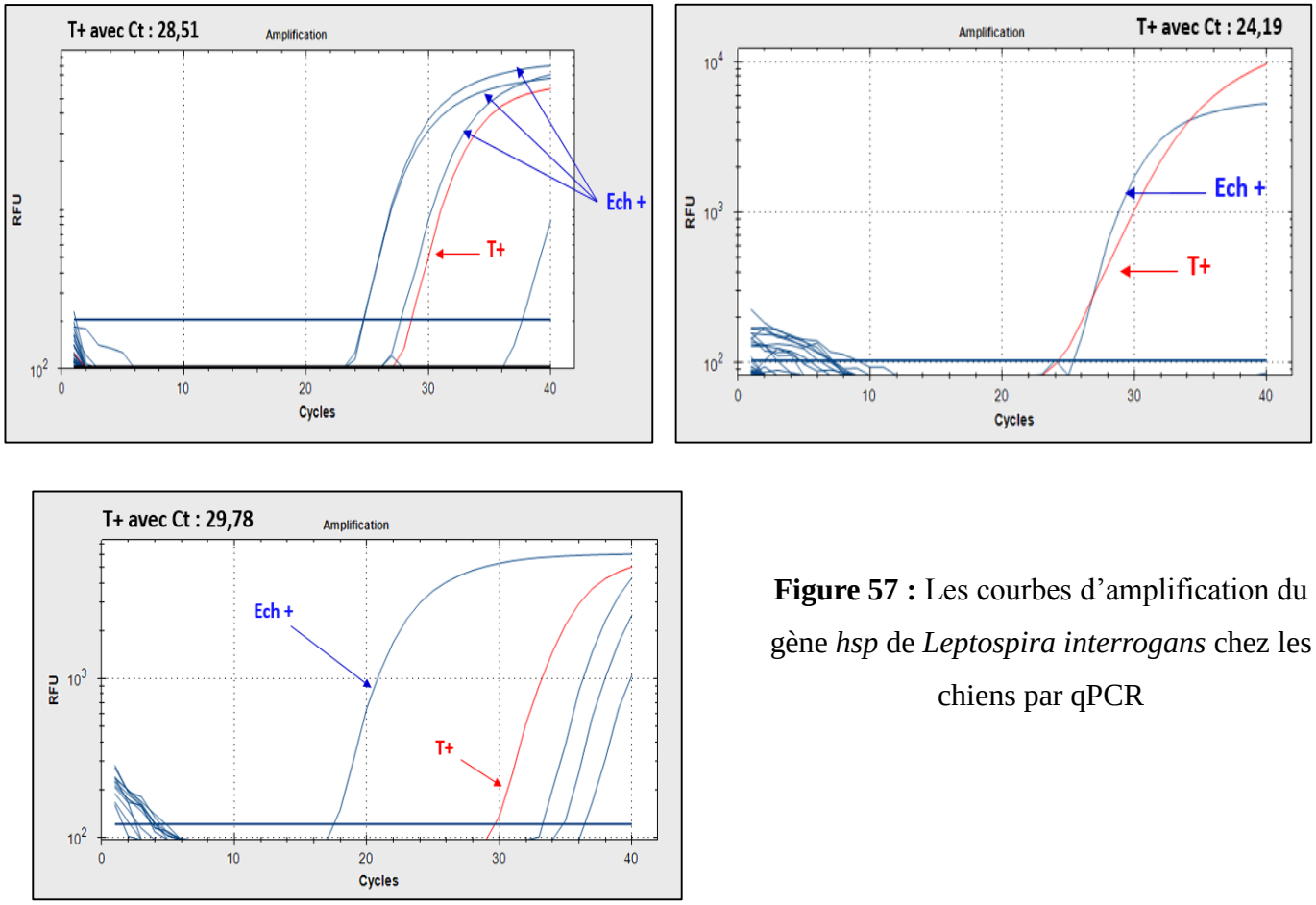


Figure 57 : Les courbes d'amplification du gène *hsp* de *Leptospira interrogans* chez les chiens par qPCR

I.2.2.2 Les résultats obtenus chez les chats

Parmi les 107 chats testés, tous étaient négatifs pour les deux systèmes spécifiques de qPCR.

I.2.3 Détection moléculaire par PCR Standard et séquençage

Les résultats positifs aux deux systèmes de qPCR (16S rRNA et hsp), ont été confirmés avec la PCR standard et le séquençage.

a. PCR standard :

Après visualisation des bandes d'ADN lors de la migration sur gel d'agarose 1,5%, l'analyse par PCR révèle la positivité sur les cinq échantillons déjà positifs à la qPCR (Fig. 58). Cette migration d'ADN amplifié par PCR révèle la présence d'ADN de *Leptospira interrogans*, avec des bandes homogènes, uniformes de même poids moléculaire (592 pb), pour le gène *rpoB*.

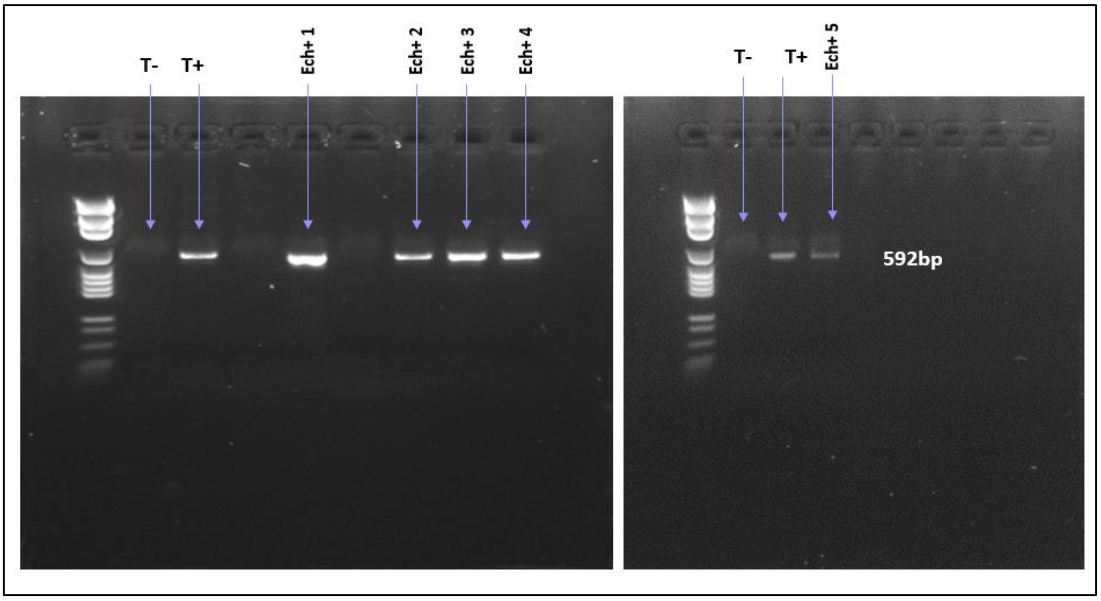


Figure 58 : Gel de PCR montrant les bandes positives après amplification du gène *rpoB*

b. Séquençage

Après la récupération des résultats à partir de l'ordinateur lié au séquenceur, les séquences ont été assemblées, visionnées et corrigées par le logiciel Chroma-spro (Fig. 59), avant de réaliser le BLAST sur NCBI. Les séquences obtenues sont mentionnées dans le tableau 20.

Figure 59 : Correction des séquences obtenues par le logiciel Chroma-spro

Tableau 20 : Séquences prêtes pour l'analyse et l'alignement sur le BLAST NCBI

Nom de la séquence	Séquences corrigées par le logiciel Chroma-spro
Lipto_26	ACGCCGCGAGAACGTTTCTTCCCAGAGCGAGAACTCCGTTGTCGACCGCAGGACCATCAGCAAGAACGGTTCCTTTTACGAGGATATTTCCCATCTCATCCAACTTCTC ACCTACAACAACTTGTCCTGCGAGAGTCGATCCTCTTTTTACTTCTTCGCCTGCAGAGACGATCGGAGAATATTGTTTGCTTCCGATTTGAAGAACATATTCTTTCAGTTC ACCGTTTTCACCAGTGACTTCGATTTTTTCTTTGGAAACCTTGGAAACCTTTCCATTGATCTCGGAGTGAACCACTCCTACAATCGGCTTCTGATTAAAGCAGGTTCCTTG GTTTGTCTTTTTGAATTTCGTAAGTTGATACGTATCGGATTCTTTTCCGCCCTTTCTTTCTACAACGATGTTTTCCGCATCGACGGAAGTTACGACACCGTCGTGTTTGTTT ACGATACAAATTCTGGAATCGTAAGCGGCTCTGGTTTCCATACCAGTTCCTACAAAAGGAGCTTCTTCACGGAGAAGAGGAACCG
Lipto 87	AACGCCGCGAGAACGTTTCTTcCCAGAGCGAGAACTCCGTTGTCGACCGCAGGACCATCAGCAAGAACGGTTCCTTTTACGAGGATATTTCCCATCTCATCCAACTTCTC ACCTACAACAACTTGTCCTGCGAGAGTCGATCCTCTTTTTACTTCTTCGCCTGCAGAGACGATCGGAGAATATTGTTTGCTTCCGATTTGAAGAACATATTCTTTCAGTTC ACCGTTTTCACCAGTGACTTCGATTTTTTCTTTGGAAACCTTGGAAACCTTTCCATTGATCTCGGAGTGAACCACTCCTACAATCGGCTTCTGATTAAAGCAGGTTCCTTG GTTTGTCTTTTTGAATTTCGTAAGTTGATACGTATCGGATTCTTTTCCGCCCTTTCTTTCTACAACGATGTTTTCCGCATCGACGGAAGTTACGACACCGTCGTGTTTGTTT ACGATACAAATTCTGGAATCGTAAGCGGCTCTGGTTTCCATACCAGTTCCTACAAAAGGAGCTTCTTCACGGAGAAGAGGA
Lipto 06	CGTCAGGCGGTTCCTCTTCTCCGTGAAGAAGCTCCTTTTGTAGGAACTGGTATGGAAACCAGAGCCGCTTACGATTCCAGAATTTGTATCGTAAACAAACACGACGGTG TCGTAACTTCCGTCGATGCGGAAAACATCGTTGTAGAAAGAAAGGGCGGAAAAGAATCCGATACGTATCAACTTACGAAATTCAAAAAGACAAACCAAGGAACCTGCT TTAATCAGAAGCCGATTGTAGGAGTGGTTCACTCCGAGATCAATGGAAAGGTTTCCAAGGTTTCCAAAGAAAAAATCGAAGTCACTGGTGAAAACGGTGAACTGAAAG AATATGTTCTTCAAATCGGAAGCAAACAATATTCTCCGATCGTCTCTGCAGGCGAAGAAGTAAAAAGAGGATCGACTCTCGCAGGACAAGTTGTTGTAGGTGAGAAGTT GGATGAGATGGGAAATATCCTCGTAAAAGGAACCGTTCTTGCTGATGGTCCTGCGGTCGACAACGGAGTTCTCGCTCTGGgAAGAAACGTTCTCGCGGCGTTCAWGCC
Lipto 100	CGGTTCCTYTTCTCCGTGAAGAAGCTCCTTTTGTAGGAACTGGTATGGAAACCAGAGCCGCTTACGATTCCAGAATTTGTATCGTAAACAAACACGACGGTGTCGTAAC TTCCGTCGATGCGGAAAACATCGTTGTAGAAAGAAAGGGCGGAAAAGAATCCGATACGTATCAACTTACGAAATTCAAAAAGACAAACCAAGGAACCTGCTTTAATCA CAAGCCGATTGTAGGAGTGGTTCACTCCGAGATCAATGGAAAGGTTTCCAAGGTTTCCAAAGAAAAAATCGAAGTCACTGGTGAAAACGGTGAACTGAAAGAATATGT TCTTCAAATCGGAAGCAAACAATATTCTCCGATCGTCTCTGCAGGCGAAGAAGTAAAAAGAGGATCGACTCTCGCAGGACAAGTTGTTGTAGGTGAGAAGTTGGATGA GATGGGAAATATCCTCGTAAAAGGAACCGTTCTTGCTGATGGTCCTGCGGTCGACAACGGARTTCTCGCTCTGGAAGAAACGTTCTCGCGGCGTT
Lipto 194	GCGGTTCCTCTTCTCCGTGAAGAAGCTCCTTTTGTAGGAACTGGTATGGAAACCAGAGCCGCTTACGATTCCAGAATTTGTATCGTAAACAAACACGACGGTGTCGTAA CTTCCGTCGATGCGGAAAACATCGTTGTAGAAAGAAAGGGCGGAAAAGAATCCGATACGTATCAACTTACGAAATTCAAAAAGACAAACCAAGGAACCTGCTTTAATC AGAAGCCGATTGTAGGAGTGGTTCACTCCGAGATCAATGGAAAGGTTTCCAAGGTTTCCAAAGAAAAAATCGAAGTCACTGGTGAAAACGGTGAACTGAAAGAATATG TTCTTCAAATCGGAAGCAAACAATATTCTCCGATCGTCTCTGCAGGCGAAGAAGTAAAAAGAGGATCGACTCTCGCAGGACAAGTTGTTGTAGGTGAGAAGTTGGATG AGATGGGAAATATCCTCGTAAAAGGAACCGTTCTTGCTGATGGTCCTGCGGTCGACAACGGAATTCTCGCTCTGGgAAGAAACGTTCTCGCGGCGTTCATGCCTTGGG

Après l'analyse des séquences obtenues du gène *rpoB* sur le BLAST NCBI et comparaison aux séquences disponibles dans la base de données GenBank, les résultats positifs par PCR ont été confirmés. L'analyse BLAST a donné une homologie de séquence de 100% avec le fragment de gène homologue à l'espèce *L. interrogans* sérogroupe Icterohaemorrhagiae. L'homologie était de 100% avec trois sérovars : le sérovar Copenhageni souche FDAARGOS_203 (numéro d'accession GenBank CP020414.2), le sérovar Icterohaemorrhagiae (numéro d'accession GenBank DQ296133.1) et le sérovar Copenhageni souche Fiocruz L1-130 (numéro d'accession GenBank AE016823.1). Comme l'homologie était de 100% avec 02 sérovars différents et 03 souches différentes, nous ne pouvons pas préciser le sérovar incriminé mais nous pouvons dire que l'espèce génomique en cause est *L. interrogans* et le sérogroupe est Icterohaemorrhagiae.

I.3 Interprétation des résultats obtenus

I.3.1 Etude de l'effet de quelques paramètres sur le taux de positivité chez l'espèce canine

I.3.1.1 Répartition des positifs en fonction du sexe

Le taux d'infection par les leptospires était supérieur chez les mâles (4,34 % ; IC : 2,43 - 4,34%) par rapport aux femelles (5,71 % ; IC : 3,19 - 5,71%). Statistiquement, cette différence est non significative (P = 0,758).

Tableau 21 : Récapitulatif de l'infection à *Leptospira* chez les chiens selon le sexe

Sexe	N° de cas positifs	N° de cas Négatifs	N° total	Taux de positivité (%)	P
Femelles	**2**	**33**	**35**	**5,71**	p > 0,05
Mâles	**3**	**66**	**69**	**4,34**	

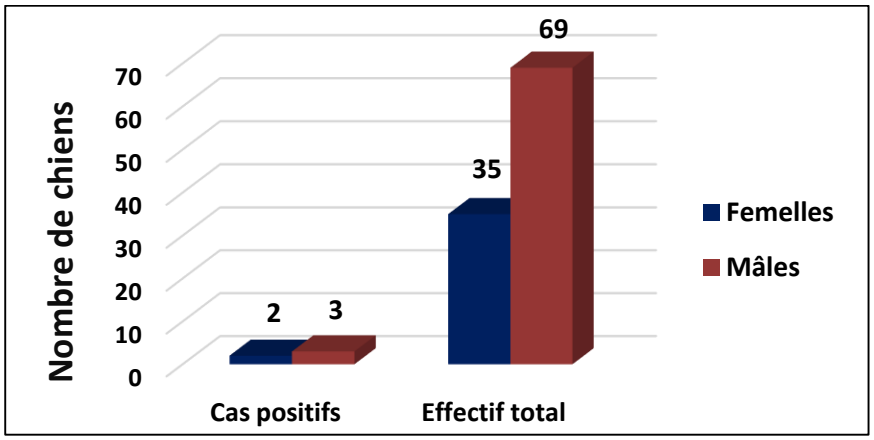


Figure 60 : Répartition des chiens positifs en fonction du sexe

I.3.1.2 Répartition des positifs en fonction de l'âge

La prévalence de la maladie chez les chiens jeunes moins d'une année était de 29,41 % (IC : 12,73 - 53,13%) contre 0% chez les chiens adultes. La différence statistique en fonction de l'âge est significative (P = 0.0007).

Tableau 22 : Récapitulatif de l'infection à *Leptospira* chez les chiens selon l'âge

Age	N° de cas positifs	N° de cas Négatifs	N° total	Taux de positivité (%)	P
≤ 1 an	**5**	**12**	**17**	**29,41**	p < 0,05
> 1 an	**0**	**87**	**87**	**0**	

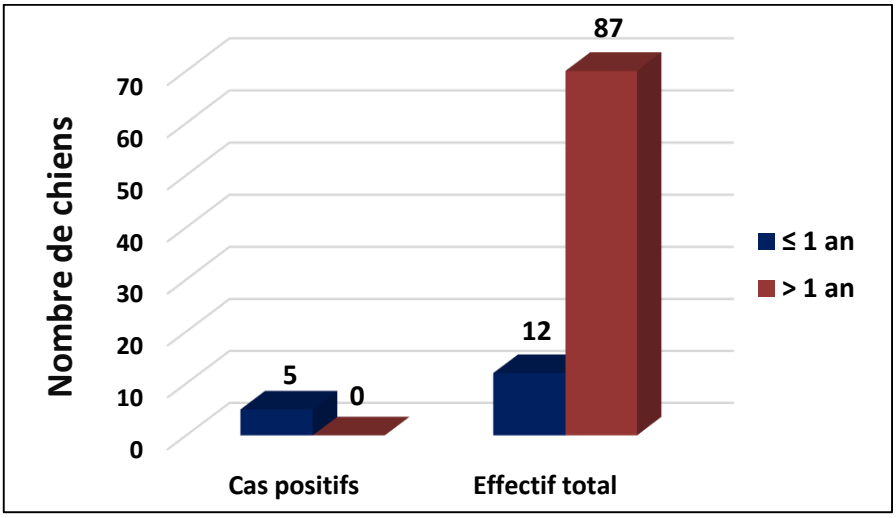


Figure 61 : Répartition de la leptospirose en fonction de l'âge

I.3.1.3 Répartition des positifs en fonction de la race

Les chiens positifs à la leptospirose étaient tous des chiens de race mixte (100 %).

I.3.1.4 Répartition des positifs en fonction du statut clinique

Les chiens positifs à la leptospirose étaient tous en bon état général (100 %).

II. La peste :

Cette enquête a pour objectif principal de déterminer le statut infectieux des populations canine et féline vis-à-vis de la peste dans la région d'Alger. L'étude a été réalisée par une PCR en temps réelle et une PCR nichée.

II.1. Description de la population animale étudiée

Au cours de l'étude, 127 chiens et 140 chats, provenant de la fourrière canine d'Alger, ont été échantillonnés.

II.1.1 Répartition des animaux prélevés en fonction du sexe

Sur les 127 chiens prélevés, 65 (51.58%) étaient des mâles et 62 (48.81%) étaient des femelles. Parmi les 140 chats, 78 (55.71%) étaient des mâles et 62 (44.28%) étaient des femelles (Annexe 7).

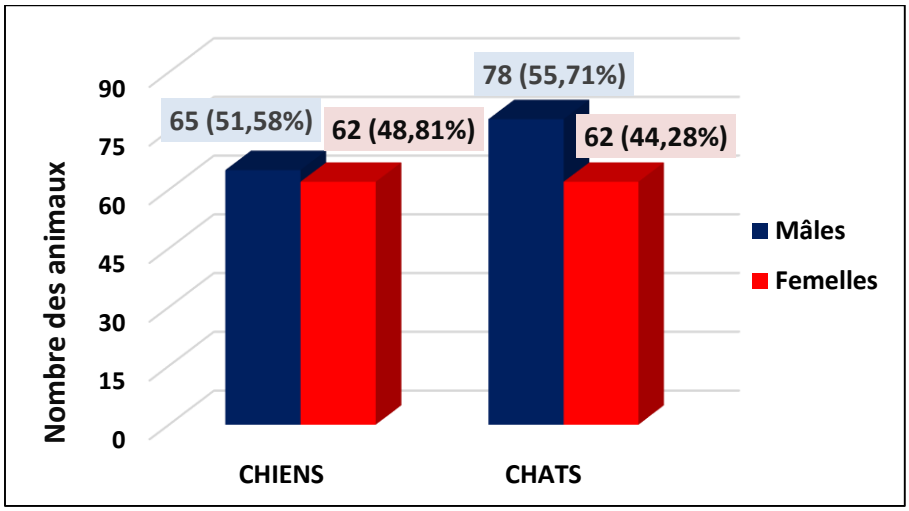


Figure 62 : Répartition de la population étudiée en fonction du sexe

La distribution des animaux que ce soit chiens ou chats par rapport à la variable « sexe » est homogène en appliquant le test Khi-2 d'homogénéité ($p > 0,05$).

II.1.2 Répartition des animaux prélevés en fonction de l'âge

L'âge des chiens prélevés variait entre 2 mois et 11 ans, 48 (37,79%) sujets étaient des jeunes (≤ 1 an) 79 (62,50%) étaient des adultes (> 1 an). La majorité de la population féline prélevée a été estimée âgée de moins de 3 ans en fonction de leur aspect physique et leur dentition. 40 (31,42%) chats avaient un âge inferieur à un an et 96 (68,57%) avaient un âge supérieur à un an (Annexe 7).

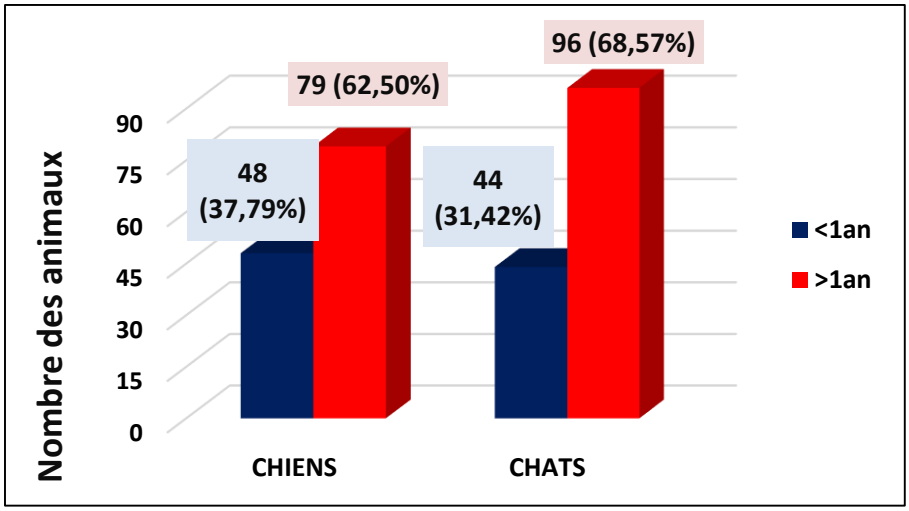


Figure 63 : Répartition de la population étudiée en fonction de l'âge

La distribution des chiens prélevés par rapport à la variable « âge » est non homogène en appliquant le test Khi-2 d'homogénéité (p = 0.0059). Elle est considérée aussi comme non homogène par rapport la population féline (p < 0,00001). Les petits animaux peuvent mourir à cause des conditions défavorables du milieu extérieur ou bien adoptés par des propriétaires d'animaux.

II.1.3 Répartition des animaux prélevés en fonction de la race

La population canine prélevée était constituée principalement de chiens bâtards avec un nombre de 99 (77,95%) contre 28 (22,04%) pour les autres races. 136 (97,14%) chats appartenaient à des races mixtes et seuls 4 (2,85%) appartenaient à d'autres races (Annexe 7).

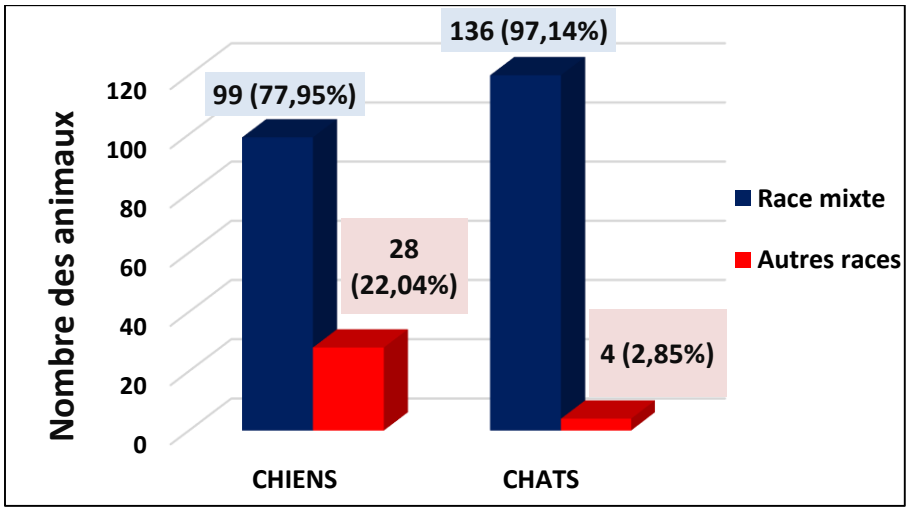


Figure 64 : Répartition de la population étudiée en fonction de la race

L'absence d'homogénéité par rapport au critère « race » a été constaté en appliquant le test Khi-2 d'homogénéité et la différence est considérée comme hautement significative ($p < 0,00001$). Ces animaux sont errants et n'appartiennent pas à des races pures puisque ils proviennent de plusieurs croisements entre eux (hybrides) et leur origine est inconnue.

II.1.4 Répartition des animaux prélevés en fonction du statut clinique

Parmi ces animaux, 22 (17,32%) chiens et 13 (9,28%) chats étaient malades au moment du prélèvement présentant un des symptômes suivants : amaigrissement et abattement, dépilation, démangeaisons ou autres manifestations dermatologiques, pâleur des muqueuses, signes digestifs et respiratoire…ect. 105 chiens (81,67%) et 127 chats (90,71%) étaient en bon état général à l'examen clinique.

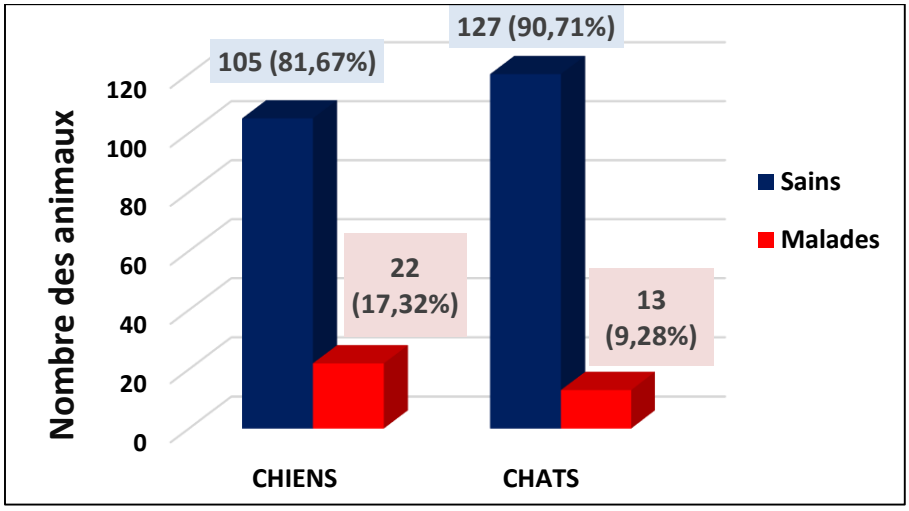


Figure 65 : Répartition de la population étudiée en fonction du statut clinique

La distribution des animaux par rapport au statut clinique n'est pas homogène ($p < 0,00001$). La plupart de ces derniers étaient sains. Cela peut être lié à leur résistance dans le milieu extérieur.

II.1.5. Répartition des animaux en fonction de l'infestation par les ectoparasites

Un total de 102 (80,31% ; IC : 73,4 - 87,2%) chiens et 114 (81,43% ; IC : 74,9 – 87,8%) chats était infesté par des puces contre 25 chiens (19,68% ; IC : 12,7 - 26,6%) et 26 chats (18,57% ; IC : 12,13 - 25,01%) qui n'étaient pas infestés par des puces.

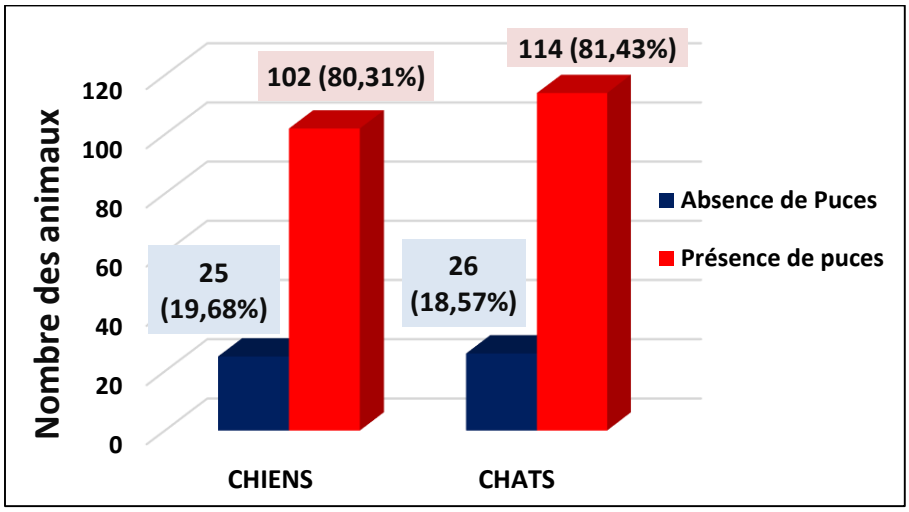


Figure 66 : Répartition de la population étudiée en fonction de la présence ou l'absence de puces

La distribution des chiens et des chats par rapport au facteur « présence ou absence d'infestation parasitaire » n'est pas homogène en appliquant le test Khi-2 d'homogénéité ($p < 0,00001$). Ces animaux qui vivaient dans des zones urbaines et rurales, passaient la plupart de leur temps à l'extérieur et ne recevaient aucun traitement ou prophylaxie médicale, ce qui explique le nombre important d'individus porteurs d'ectoparasites dans notre étude.

II.2. Résultats de l'identification morphologique des ectoparasites

Un total de 692 puces a été récolté à partir de nos animaux. Deux genres et trois espèces ont été identifiés : *Ctenocephalides felis* qui était la plus abondante, suivie *Xenopsylla cheopis* et *Ctenocephalides canis*.

Le nombre de puces identifiées pour chaque espèce est le suivant : 391 (56,50%) *Ctenocephalides felis*, 163 (23,55%) *Xenopsylla cheopis* et 138 (19,94%) *Ctenocephalides canis*.

Le nombre de puces identifiées réparti par chaque espèce animale est représenté dans le tableau 23.

Tableau 23 : Comparaison entre les effectifs des différentes puces récoltées chez les chiens et les chats de la wilaya d'Alger.

Type de puces	Chez les chiens (Nbr,%, IC)	Chez les chats (Nbr,%, IC)	Total	P
Ctenocephalides felis	51 (13,04%) [9,7 - 16,4%]	340 (86,96%) [83,6 - 90,3%]	**391**	**< 0,0001**
Xenopsylla cheopis	151 (92,63%) [88,6 - 96,6%]	12 (7,36%) [3,3 - 11,4%]	**163**	**< 0,0001**
Ctenocephalides canis	125 (90,57%) [85,7 - 95,4%]	13 (9,42%) [4,5 - 14,3%]	**138**	**< 0,0001**
Nombre total de puces	**327 (47,25%) [43,4 - 51,1%]**	**365 (52,74%) [48,9 - 56,5%]**	**692**	**NS P = 0.15**

De 1 à 5 puces étaient récoltées de chaque animal, selon le taux d'infestation. Certains animaux prélevés avaient une infestation mixte (les trois espèces de puces). *Ctenocephalides felis* était la puce la plus abondante chez les chats et la puce du rat *Xenopsylla cheopis* était la puce la plus abondante chez les chiens (Test d'indépendance : p <0.0001).

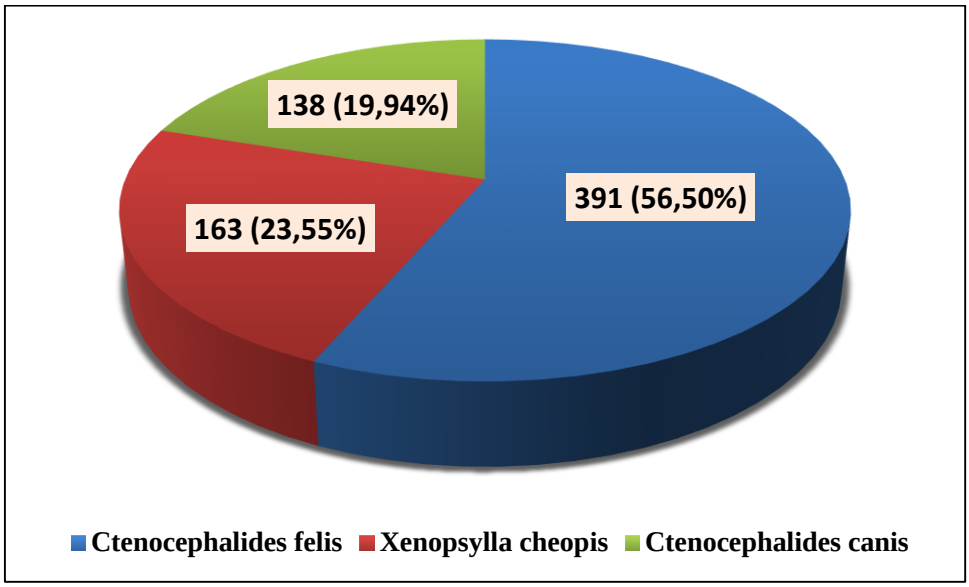


Figure 67 : Répartition des puces récoltées et identifiées chez les chiens et les chats

Figure 68 : Puce femelle de *Ctenocephalides felis* observées au Gr. 100x sous stéréomicroscope

Figure 69 : Puce femelle de *Ctenocephalides canis* observées au Gr. 100x sous stéréomicroscope

Figure 70 : Puce mâle (à gauche) et puce femelle (à droite) de *Xenopsylla cheopis* observées au Gr. 100x sous stéréomicroscope

Figure 71 : Puce avant (à gauche) et après (à droite) la technique d'éclaircissement

II.3. Résultats des analyses de laboratoire

II.3.1 Echantillons analysés

Dans la présente étude un échantillonnage ciblé a été analysé. Sur les 327 puces récoltées à partir des 127 chiens infestés, nous avons analysé 149 (45,57%) et sur les 365 puces récoltées à partir des 140 chats infestés, nous avons analysé 107 (29,32%) (Tab. 24). Sur chaque animal nous avons analysé au minimum une puce. Le nombre de puces analysées était en corrélation positive avec le taux d'infestation.

Tableau 24 : Effectifs des puces de chiens et les chats destinés aux analyses moléculaires

Type de Puces analysés	**Chez les chiens** (Nbr/%)	**Chez les chats** (Nbr/%)	**Total** (Nbr/%)
Ctenocephalides felis	32/51 (62,75%)	92/340 (27,06%)	124/391 (31,71%)
Xenopsylla cheopis	65/151 (43,05%)	7/12 (58,33%)	72/163 (44,17%)
Ctenocephalides canis	52/125 (41,60%)	8/13 (61,54%)	60/138 (43,48%)
Nombre total de puces	**149/327 (45,57%)**	**107/365 (29,32%)**	**256/692 (36,99%)**

II.3.2. Résultats moléculaires

Tous les échantillons de rates ou d'ectoparasites sélectionnés pour les analyses ont fait l'objet d'une PCR en temps réel (qPCR), puis confirmée avec une PCR nichée.

II.3.2.1. Résultats de la qPCR

Les résultats de la PCR en temps réel ciblant le gène *pla* réalisée sur les rates de chiens et de chats errants et les puces collectées à partir de ces animaux étaient tous négatifs. Aucun signal n'a été obtenu à partir des témoins négatifs (Fig. 72, 73).

Les contrôles positifs Tiss et actine étaient bien positifs indiquant ainsi une bonne extraction et le bon déroulement de la PCR (Fig. 74, 75).

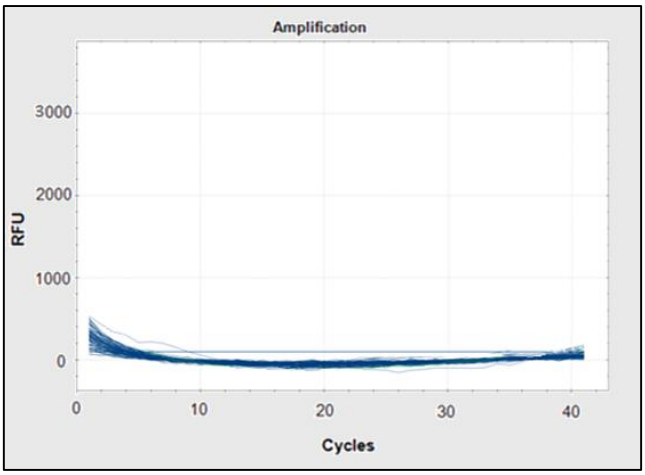


Figure 72 : Résultats de la Qpcr après amplification du gène *pla* de *Yersinia pestis* dans les rates de chiens et de chats

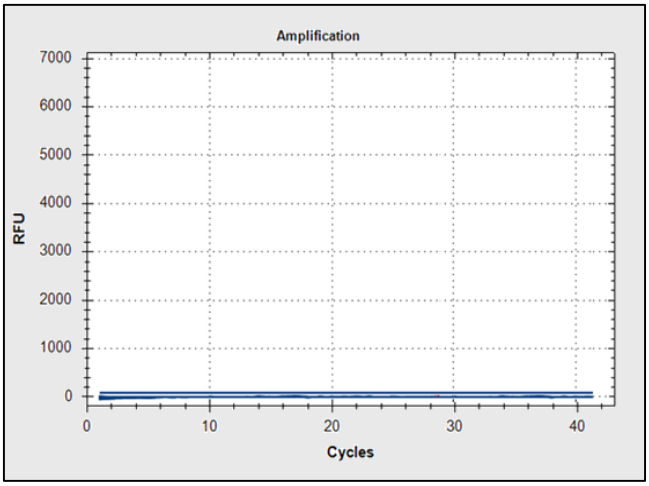


Figure 73 : Résultats de la Qpcr après amplification du gène *pla* de *Yersinia pestis* dans les puces de chiens et de chats

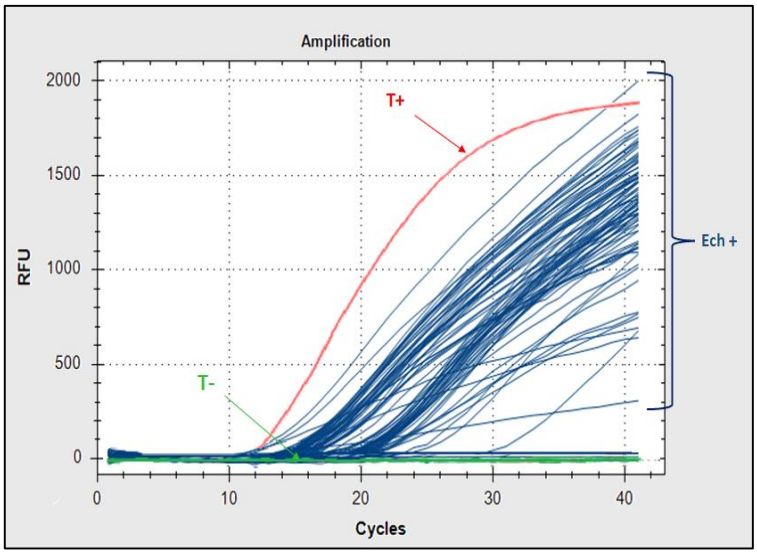


Figure 74 : Les courbes d'amplification du système TISS par qPCR

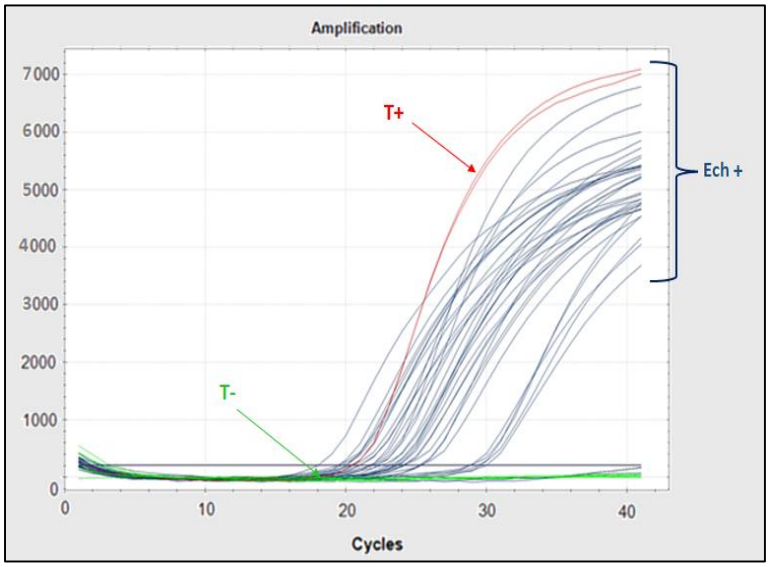


Figure 75 : Les courbes d'amplification du système B-actine par qPCR

II.3.2.2. Résultats de la PCR nichée

Les résultats de la PCR nichée en ciblant le couple d'amorce *glpD* réalisé sur les rates des chiens et chats errants et les puces collectés à partir de ces animaux étaient tous négatifs. Aucun signal n'a été obtenu à partir des témoins négatifs.

DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons réalisé une investigation sur la présence des maladies zoonotiques dangereuses chez l'espèce canine et féline en Algérie en utilisant des techniques moléculaires. Au total, 211 urines de chiens et de chats étaient analysés pour la recherche de l'ADN bactérien de *Leptospira* et un total de 267 rates de chiens et de chats avec 256 puces étaient analysés pour la recherche de l'ADN bactérien de *Yersinia pestis*. Notre investigation était basée sur des méthodes et des techniques rigoureuses avec des équipements sophistiqués utilisés en routine dans le centre de référence URMITE.

I. Leptospirose

En Algérie, il y a très peu d'études réalisées sur la leptospirose humaine. En 1975, une étude basée sur la sérologie a rapporté sept cas dans un groupe militaire dans la banlieue d'Alger (Aubry et *al*., 1975). Deux études plus récentes ont rapporté des cas de leptospirose chez des patients hospitalisés dans la région de Tizi-Ouzou. La première enquête réalisée entre 2006 et 2007 dans la zone rurale de Tala-Athmane a révélé une positivité de plus de 60% (29/48). Les cas ont été confirmés par le test de Microagglutination et le sérogroupe incriminé était Icterohaemorrhagiae. Les patients positifs vivaient en contact étroit avec deux décharges envahies par des rongeurs (Afiri et *al*., 2013a). Dans la même région, une deuxième étude prospective a été menée entre 2005 et 2008 sur des patients hospitalisés et a rapporté 173 cas positifs. Les sérovars prédominants détectés étaient Icterohaemorrhagiae et Grippotyphosa (Afiri et *al*., 2013b).

Comme la leptospirose humaine est une maladie à déclaration obligatoire en Algérie selon l'arrêté ministériel du 17 novembre 1990 ; le nombre annuel de cas humains atteints par la leptospirose confirmés par l'Institut Pasteur d'Algérie est rapporté par le ministère de la santé et de la réforme hospitalière. Par ailleurs, la prévalence réelle de la leptospirose reste sous-estimée puisqu'elle n'est pas systématiquement diagnostiquée dans les hôpitaux. L'un des principaux facteurs limitant le diagnostic de laboratoire est la faible disponibilité d'isolats vivants de *Leptospira* servant au test d'agglutination microscopique (MAT). Les autres méthodes de diagnostic semblent être soit indisponibles soit difficiles à réaliser. La sensibilisation à cette maladie fait également défaut parmi le personnel médical et le grand public, y compris les populations à haut risque telles que les travailleurs des abattoirs et les éleveurs (Mgode et *al*., 2015).

Cependant, la prévalence de cette zoonose chez les réservoirs animaux est totalement inconnue en Algérie. La seule étude publiée date de 1950, dans laquelle des leptospires ont été observés

par microscopie sur des coupes histologiques du foie chez des chiens présentant un ictère sévère, des hémorragies sous-cutanées et une néphrite aiguë (Donatien et *al*., 1951).

Dans le but d'éclaircir l'épidémiologie de leptospirose animale en Algérie, nous avons réalisé une enquête sur la population canine et féline en Algérie. Le type de prélèvement choisi pour une éventuelle analyse moléculaire était l'urine. Plusieurs chercheurs ont choisi dans leurs études l'urine comme prélèvement afin de mettre en évidence l'ADN leptospiral chez les animaux réservoirs comme le chien (Oliveira et *al*., 2012a ; Fraune et *al*., 2013 ; Calderón et *al*., 2014 ; Gay et *al*., 2014 ; Gentilini et *al*., 2015 ; Llewellyn et *al*., 2016 ; Delaude et *al*., 2017 ; Sant'anna et *al*., 2017). Certaines auteurs confirment que l'ADN des leptospires est retrouvé plus longtemps dans les urines que dans le sang (Bal et *al*., 1994 ; Villumsen et *al*., 2012).

L'approche diagnostique de la leptospirose canine est principalement basée sur des études sérologiques, généralement obtenues par le test d'agglutination microscopique (MAT) (Picardeau, 2013). L'utilisation du MAT présente toutefois plusieurs limites et les résultats sérologiques doivent être interprétés avec délicatesse. C'est une méthode qui présente une faible sensibilité au début de la maladie, il est généralement nécessaire de prélever plusieurs échantillons en phase aiguë pour confirmer l'infection (Levett, 2001). De plus, les titres sériques peuvent ne pas différencier entre une exposition des chiens à l'agent pathogène et une immunisation récente (Levett, 2001). L'identification d'individus chroniquement infectés par le MAT peut également poser problème, étant donné que les titres sériques peuvent ne pas nécessairement être associés à un portage rénal asymptomatique des leptospires (André-Fontaine, 2006). Bien que la culture des leptospires soit toujours considérée comme le test permettant de confirmer sans équivoque l'infection à *Leptospira* ; les leptospires viables issus des milieux de culture sont confrontés à des inconvénients, tels qu'une contamination fréquente, une croissance fastidieuse de l'agent pathogène et une faible sensibilité diagnostique, qui rend son utilisation moins fréquente dans les études cliniques et épidémiologiques (Miotto et *al*., 2017). D'autre part, la nécessité d'un diagnostic rapide de la leptospirose a conduit au développement de nombreux tests de PCR. La PCR en temps réel ou qPCR, est une méthode qui révolutionne le diagnostic des maladies infectieuses dans les laboratoires et semble plus applicable dans la détermination des risques zoonotiques (Harkin et *al*., 2003 ; Espy et *al*., 2006). Cette méthode est rapide, sensible, spécifique et robuste à la fois. Les résultats sont souvent disponibles en quelques heures au lieu de jours ou de mois (Smythe et *al*., 2002 ; Espy et *al*., 2006). La sensibilité de la PCR rend le recours à l'isolement ou à la culture non indispensable.

La PCR a été utilisée avec succès pour confirmer l'infection à *Leptospira* et permettre un diagnostic précoce de la leptospirose clinique ou pour l'identification des chiens présentant une excrétion urinaire asymptomatique des leptospires (Zakeri et *al*., 2010 ; Gay et *al*., 2014). De nombreux tests de PCR ont été développés pour détecter des gènes universels de *Leptospira* tels que *gyrB* (le gène codant pour la sous-unité b de l'ADN gyrase), *rrs* (ARNr 16S) et *secY* (Merien et *al*., 2005 ; Smythe et *al*., 2002 ; Slack et *al*., 2006 ; Musso et La Scola, 2013). D'autres essais ciblent des gènes restreints à des espèces pathogènes telles que *lipL32*, *lfb1*, *ligA* et *ligB2* (Palaniappan et *al*., 2005 ; Musso et La Scola, 2013).

Dans la présente étude, nous avons utilisé pour la qPCR deux systèmes, le premier est spécifique à tous les leptospires en ciblant la région intergénique du gène *16S rRNA* d'une taille d'environ 88 pb (Smythe et *al*., 2002). Le second système est spécifique à *Leptospira interrogans* permettent d'amplifier la séquence partielle du gène *Lint_hsp_MB* d'une taille d'environ 103 pb (Appelt et *al*., 2014). Les échantillons positifs étaient confirmés par une PCR standard couplée au séquençage pour la détection de *Leptospira interrogans* en amplifiant la séquence partielle du gène *rpoB* d'une taille d'environ 592 pb (La Scola et *al*., 2016). Le tableau 25 expose les différents systèmes utilisés dans les études moléculaires réalisées sur les urines de chiens dans le monde. Le gène *LipL32* est le système qui a été utilisé dans de nombreuses études. Gentilini et *al*. (2015) concluent dans leur étude que le *lipL32* et le *rrs* (16S rRNA) sont des cibles appropriées pour la qPCR dans la détection de l'ADN des leptospires dans l'urine canine. Néanmoins, dans une étude cas-témoins réalisée par Thaipadungpanit et *al*. (2011), il a été démontré que dans la qPCR le système *rrs* (16S rRNA) avait une plus grande sensibilité et une spécificité similaire, en comparaison directe avec le système *LipL32*.

La présence de *L. interrogans* a été confirmée dans les urines de chiens errants d'Alger en utilisant la qPCR et le séquençage ciblant les gènes universels et pathogènes. Nous avons observé une prévalence globale de 4,8% (5/104). De nombreuses études épidémiologiques sur le portage rénal de la leptospirose canine à l'aide d'outils moléculaires étaient menées dans le monde, indiquant ainsi une prévalence mondiale allant de 0,2% à 22% (Cai et *al*., 2002 ; Harkin et *al*., 2003 ; Vicari et *al*., 2007 ; Rojas et *al*., 2010 ; Zakeri et *al*., 2010 ; Oliveira et *al*., 2012a ; Fraune et *al*., 2013 ; Calderón et *al*., 2014 ; Gay et *al*., 2014 ; Gentilini et *al*., 2015 ; Llewellyn et *al*., 2016 ; Delaude et *al*., 2017 ; Sant'anna et *al*., 2017). Les résultats soulignent l'importance mondiale de la leptospirose canine et son potentiel zoonotique. La Figure 76 illustre les différentes prévalences de la maladie et la région géographique de chaque étude.

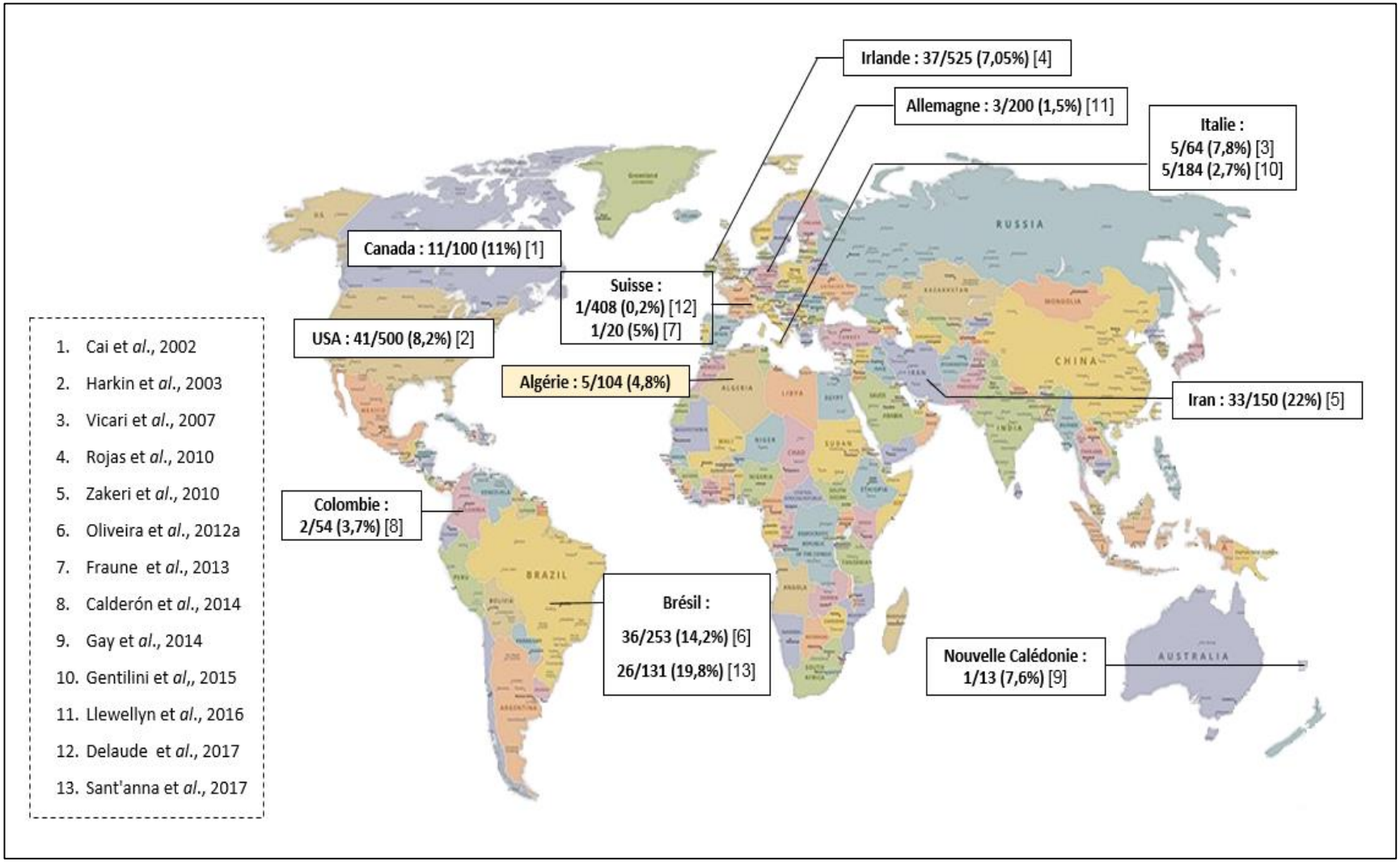


Figure 76 : Détection moléculaire de l'ADN de *Leptospira* spp. dans les urines de chien dans le monde

Tableau 25 : Différentes études moléculaires réalisées sur les urines de chiens dans le monde

Références	**Taux de positivité (%)**	**PCR Standard/séquençage : Gène amplifié**	**Espèce (s) génomique (s) détectée (s)**	**PCR en temps réel : Gène amplifié**
Cai et *al*., 2002	11%	Les multiplexes G1 / G2 et B64-I / B64-II : - *flaB* (542-563pb) - *secY* (264-285pb)	- *L. kirschneri* - *L. borgpeterseni*	
Harkin et *al*., 2003	8.2%	*23S rDNA* (482 bp)	Tous les sérovars possibles	
Vicari et *al*., 2007	7.8%	*rrs* (16S ribosomal RNA) (551pb)	Espèce pathogènes	
Rojas et *al*., 2010	7.05%			*lipL32* (57 bp)
Zakeri et *al*., 2010	22%	PCR nichée : *rrs* (16S ribosomal RNA) (525 pb) (289 pb)	- *L. interrogans* - *L. wolffi*	
Oliveira et *al*., 2012a	14.2%	Les multiplexes G1 / G2 et B64-I / B64-II : - *flaB* (542-563pb) - *secY* (264-285pb)	/	
Calderón et *al*., 2013	3.7%	*lipL32* 423 pb	/	
Fraune et *al*., 2013	5%	PCR nichée : *lipL32* (519 pb) (286 pb)	/	
Gay et *al*., 2014	7.6%			*lipL32* (242 pb) *lfb1* (331pb)
Gentilini et *al*,, 2015	2.7%			*rrs* (16S ribosomal RNA) (88pb) *lipL32*
Llewellyn et *al*., 2016	1.5%			*lipL32*
Delaude et *al*., 2017	0.2%			*lipL32* (87pb)
Sant'anna et *al*., 2017	19.8%	*lipL32* (242pb)	/	

La prévalence de 4,8% obtenue dans notre étude sur le portage rénal chez les chiens est considérée comme une prévalence faible par rapport aux prévalences constatées dans la majorité des autres études (Fig. 76). La différence dans la prévalence de la leptospirose canine dans notre études et celle des autres études pourrait être due à plusieurs raisons, notamment les différences de sensibilité et de spécificité des systèmes utilisés, les variations annuelles de la prévalence de la leptospirose canine, la situation géographique, l'état de santé des chiens prélevés et l'excrétion urinaire des leptospires qui est transitoire et/ou intermittente (Fink et *al*., 2014).

Des prévalences élevées ont été constatées aux Brésil avec un taux de 14,2% (Oliveira et *al*., 2012a) et de 19,8% (Sant'anna et *al*., 2017). Cela peut s'expliquer par le fait que le Brésil est une région tropicale et il convient de noter que les régions tropicales offrent d'excellentes conditions pour la survie et la propagation des leptospires, en raison du climat et en particulier des précipitations. Ces conditions sont souvent associées à de mauvaises pratiques de gestion (zones rurales) ou à de mauvaises conditions sanitaires (cycle urbain) et il a été clairement démontré qu'elles étaient fortement associées à la survenue de l'infection (Lilenbaum et Souza, 2003 ; Oliveira et *al*., 2012b).

Des prévalences plus élevées que la prévalence obtenue dans notre étude ont été notées aussi aux USA avec un taux de 8.2% (Harkin et *al*., 2003) et en Iran avec un taux de 22% (Zakeri et *al*., 2010). Cela peut s'expliquer par le volume important d'urine prélevé et analysé dans ces deux études et qui a atteint un volume de 6-20 ml dans l'étude réalisée par Harkin et *al*. (2003) et un volume de 10 ml dans l'étude menée par Zakeri et *al*. (2010), contre un volume de 3-4 ml utilisé dans notre étude. Selon Rojas et *al*. (2010), un volume d'urine important augmentera la quantité d'ADN de *Leptospira* dans les échantillons d'urine de chiens infectés. Par conséquent, une plate-forme de PCR hautement sensible est nécessaire pour obtenir un diagnostic précis doit être adoptée pour maximiser l'échantillon d'ADN dans la PCR en augmentant le volume d'urine utilisée dans l'extraction de l'ADN. Cela pourrait être réalisé par une sédimentation à grande vitesse d'un volume important d'urine et par l'extraction d'ADN du sédiment complet (Xu et *al*., 2014).

D'autres études n'ont pas pu détecter l'ADN de *Leptospira* dans les urines de chiens, c'est le cas de l'étude effectuée aux Etats-Unis sur 100 chiens et celle réalisée en Egypte sur 25 chiens où la présence des anticorps anti-Leptospira était la seule preuve de l'exposition à la maladie (Fink et *al*., 2014 ; Felt et *al*., 2011). Des prévalences très faibles ont été constatées dans d'autres études, c'est le cas de l'étude réalisée en Suisse par Delaude et *al*. (2017) avec un taux de 0.2%,

montrant que l'excrétion urinaire chez les chiens asymptomatiques est rare dans la région malgré une séroprévalence élevée chez ces mêmes chiens. A cet effet, l'influence de l'excrétion intermittente doit également être prise en compte et pourrait potentiellement conduire à une sous-estimation du niveau réel du portage rénal de *Leptospira* pathogène dans la population canine (Gay et *al*., 2014).

Dans notre étude, l'analyse BLAST a donné une homologie de séquence de 100% avec le fragment de gène homologue à l'espèce *L. interrogans* sérogroupe Icterohaemorrhagiae. L'homologie était de 100% avec trois sérovars : le sérovar Copenhageni souche FDAARGOS_203, le sérovar Icterohaemorrhagiae et le sérovar Copenhageni souche Fiocruz L1-130. Comme l'homologie était de 100% avec 02 sérovars différents et 03 souches différentes, nous ne pouvons pas préciser le sérovar incriminé mais nous pouvons dire que l'espèce génomique en cause est *L. interrogans* et le sérogroupe est Icterohaemorrhagiae. Dans les études moléculaires menées par d'autres chercheurs sur les urines de chiens, il a été remarqué que les espèces génomiques détectées étaient : *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpeterseni* et *L. wolffi* (Tab. 25). La taxonomie moléculaire s'impose difficilement auprès des cliniciens et des spécialistes de la leptospirose malgré plusieurs avantages des méthodes génétiques : reproductibilité, rapidité, faible coût, ces méthodes sont accessibles de plus en plus aux laboratoires car les réactifs sont commercialisés et la nécessité de posséder une collection complète d'antigènes vivants comme fût le cas pour la sérologie est remplacée par la comparaison à des bases de données accessibles sur Internet (La Scola et *al*., 2006).

Nos chiens vivaient exclusivement à l'extérieur, en contact étroit avec d'autres chiens et des rongeurs infectés qui étaient probablement la source d'infection. Scanziani et *al*. (2002), rejoignent notre hypothèse en confirmant que le surpeuplement des animaux errants dans les quartiers insalubres est associé à une forte prévalence de l'infection, car les animaux peuvent contracter la maladie par contact avec des urines de chiens ou de rongeurs infectés.

Les chiens positifs à la leptospirose dans notre étude étaient tous en bonne santé, indiquant ainsi que ces chiens sont des porteurs asymptomatiques. Une leptospirose latente et subclinique chez le chien était régulièrement rapportée et peut également être observée chez les animaux vaccinés (Klopfleisch et *al*., 2010). Plusieurs auteurs ont rapporté dans leurs études que les chiens cliniquement asymptomatiques peuvent être des porteurs chroniques, excrétant *Leptospira* par l'intermédiaire de leurs urines dans l'environnement (Brown et *al*., 1996 ; Harkin et *al*., 2003 ; Vicari et *al*., 2007 ; Oliveira et *al*., 2012a ; Gay et *al*., 2014 ; Llewellyn et *al*., 2016 ; Sant'anna et

al., 2017). Deux études menées au Brésil, ont rapporté une prévalence importante sur l'excrétion urinaire chez des chiens qui apparaissaient en bonne santé, avec un taux de 19,8% (26/131) (Sant'anna et *al*., 2017) et un taux de 20% (13/65) chez des chiens errants récupérés dans un refuge (Oliveira et *al*., 2012a). Dans l'étude moléculaire effectuée par Harkin et *al*. (2003) aux USA sur l'excrétion urinaire des chiens, uniquement 7% (3/41) des chiens positifs étaient malades. Il semble que les chiens ont excrété les leptospires dans leur urine pendant une certaine période après l'infection, même s'ils ne développaient pas de maladie clinique. Il est possible que parmi les autres chiens qui perdaient activement des leptospires aient des signes cliniques transitoires non remarqués par le propriétaire (Harkin et *al*., 2003). Les leptospires excrétés via les urines représentent un risque pour l'homme et les autres animaux. Notre étude ainsi que les autres études citées ci-dessus soulignent l'importance des mesures d'hygiène générales dans la pratique vétérinaire lors de la manipulation de l'urine de tous les chiens (Llewellyn et *al*., 2016).

Les chiens positifs dans la présente étude étaient tous des chiens très jeunes de moins d'une année avec un taux de 29,41% (5 positifs sur 17 chiots prélevés) contre 0% (0 sur 87 chiens adultes prélevés). Cette prévalence chez les très jeunes chiens est considérée comme une prévalence élevée et contredit beaucoup d'études citées dans la littérature (Ward et *al*., 2002 ; Desvars et *al*., 2013 ; Hennebelle et *al*., 2014). Citant par exemple l'étude qui a menée sur 677 chiens aux États-Unis et au Canada pendant une période allant de 1970 à 1998 où le taux de la leptospirose était plus élevé chez les chiens d'âge moyen entre 4 et 10 ans en comparaison avec les chiens de moins d'un an (Ward et *al*., 2002). Au cours d'une autre étude réalisée sur 36 chiens diagnostiqués et traités contre la leptospirose au Collège de médecine vétérinaire de l'Université de Cornell des États-Unis pendant la période allant de 1995 à 1998, l'âge moyen des chiens atteints était de 7,4 ans (Birnbaum et *al*., 1998). Des études similaires réalisées à l'université de Californie (Adin et Cowgill, 2000) et à l'université de Wisconsin aux USA (Forrest et *al*., 1998), ont souligné que l'âge moyen des chiens atteints par la leptospirose était de 5,7 et 6,9 années, respectivement. Au cours d'une autre étude menée à la Réunion, seuls les chiens adultes étaient positifs à la leptospirose (Desvars et *al*., 2013). Sant'anna et *al*. (2017) rapportent dans leur recherche réalisée au Brésil, que les chiens de plus de 5 ans présentent plus de risque d'être porteurs et excréteurs des leptospires via leur urine par rapport aux jeunes chiens de moins d'une année. Contrairement au résultat trouvé dans notre enquête, les études citées ci-dessus montrent que la tranche d'âge de quatre ans et plus est certainement la tranche d'âge la plus touchée. Cela peut s'expliquer par le fait que les chiens d'âge moyen peuvent être plus actifs à l'extérieur et en dehors de leur environnement familial normal que les chiens jeunes ou vieux, ce qui augmente le

risque d'exposition aux différents sérovars pathogènes de *leptospira* (Ward et *al*., 2002). De plus, les chiens d'âge moyen sont moins susceptibles d'être vaccinés contre la leptospirose par rapport aux chiens jeunes ou vieux chez lesquels la vaccination est pratiquée automatiquement puisque ils sont considérés comme une population à risque (Ward et *al*., 2002). D'autre part, les chiens atteints dans les deux études réalisées par Ward et *al*. (2002) et Desvars et *al*. (2013) et qui étaient majoritairement des chiens adultes s'explique par le fait que la population canine étudiée dans ces deux enquêtes était composée de chiens domestiques exposés à des facteurs de risque différents et qui étaient probablement en contact avec d'autres espèces hôtes d'entretien.

Par contre, une étude réalisée en Californie sur 102 chiens a donné des résultats contradictoires, où les animaux positifs étaient soit des jeunes chiens de moins d'une année soit des vieux de plus de 8 ans d'âge (Ghneim et *al*., 2007). Les auteurs ont justifier ce constat par le fait que les animaux jeunes ont un statut immunitaire naïf et les vieux chiens chez les quels la vaccination était interrompue constituent la tranche d'âge la plus sensible à la leptospirose (Ghneim et *al*., 2007).

Par ailleurs, la prévalence élevée de l'excrétion urinaire chez les jeunes chiens notée dans notre enquête peut s'expliquer par le fait que ces animaux sont exposés à un âge précoce aux leptospires pathogènes dans leur environnement avec un statut immunitaire qui est malheureusement encore naïf. De plus, ces chiens sont des animaux errants et ils n'ont reçu aucune immunisation contre cette pathologie. Des observations similaires ont été rapportées dans l'étude réalisée par Vicari et *al*. (2007).

Le taux d'infection de la leptospirose canine dans notre enquête était élevé chez les femelles 5,71% (2/35) par rapport aux mâles 4,34% (3/69), cette différence est statistiquement non significative. Contrairement à ces résultats, plusieurs études ont mis en évidence une prévalence plus élevée chez les mâles que chez les femelles (Rentko et *al*., 1992 ; Scanziani et *al*., 2002 ; Ward et *al*., 2002 ; Ghneim et *al*., 2007 ; Vicari et *al*., 2007).

La race mixte était la race exclusivement citée chez les chiens positifs à la leptospirose dans notre investigation, constatation qui est tout à fait logique puisque les chiens de race mixte étaient prédominants parmi les chiens prélevés 82,7% (86/104) par rapport aux chiens de d'autres races 17,3% (18/104). Dans une étude américaine réalisée sur 677 chiens, les chiens de travail, les chiens de chasse et les chiens croisés sont plus susceptibles d'être atteints par la leptospirose (Ward et *al*., 2002).

Dans le présent travail, tous les prélèvements d'urine des chats analysés par qPCR étaient négatifs à la leptospirose, indiquant ainsi que les chats sont résistants à la maladie et n'excrètent pas des leptospires. Ils ne sont donc pas considérés comme réservoirs et ne jouent pas un rôle dans la transmission de la maladie dans la région d'Alger.

Les études réalisées sur la leptospirose féline étaient beaucoup plus des études sérologiques. Elles étaient menées dans différents pays du monde, indiquant une séroprévalence comprise entre 4% et 30%. C'est le cas de l'étude réalisée en Australie (Dickeson et Love, 1993), en Écosse (Agunloye et Nash, 1996), en Grèce (Mylonakis et *al*., 2005), en Iran (Jamshidi et *al*., 2009), en Espagne (Millaán et *al*., 2009), au Canada (Lapointe et *al*., 2013), au Taiwan (Chan et *al*., 2014), au Chili (Azócar-Aedo et *al*., 2014) et au Brésil (Dos Santos et *al*., 2017).

Contrairement à nos résultats, certaines études ont pu détecter l'ADN de *Leptospira* dans des échantillons d'urine de chats indiquant un portage rénal de la leptospirose chez cette espèce animale. C'est l'exemple de l'étude réalisée au Québec où l'ADN de *Leptospira* pathogène était détecté dans les urines de 3,2% parmi 250 chats échantillonnés (Hartmann et *al*., 2013). L'excrétion urinaire a été confirmée par PCR chez 67,8% (80/118) chats au Taïwan, où 71 chats étaient des chats errants et 9 était des chats domestiques (Chan et *al*., 2014). Au Canada, l'ADN de *Leptospira* était détecté dans les urines de 6 chats parmi 113 chats malades et dans les urines de 2 chats parmi 125 chats sains, ce qui correspond à une prévalence totale de 3,3% (8/238) (Rodriguez et *al*., 2014). Les résultats d'une PCR effectuée sur des urines de chats en Allemagne a donné une positivité de 3,2% (7/215) (Weis et *al*., 2017). L'infection expérimentale réalisée sur des chats par Fessler et Morter (1964) et Larsson et *al*. (1985) a confirmé que les chats peuvent rester porteurs de leptospires pendant plusieurs semaines. Weis et *al*. (2017) ont suivi des échantillons d'urine d'un chat ayant libéré l'ADN de *Leptospira*, la PCR était positifs 8 mois après la première excrétion. Par conséquent, le fait d'excréter les leptospires via les urines, les chats peuvent jouer un rôle important en tant que réservoirs ou en tant qu'hôte accidentel et contribuer ainsi à la contamination continue de l'environnement (Rodriguez et *al*., 2014). Cependant, une réinfection peut également se produire dans la mesure où le chat sort régulièrement à l'extérieur (Weis et *al*., 2017).

D'autres chercheurs, pensent que l'acidité de l'urine du chat diminue la survie des leptospires chez cette espèce par rapport aux autres espèces animales (Fessler et Morter, 1964 ; Everard et *al*., 1979). Le rôle des chats dans la transmission de la leptospirose devrait être réévalué, car il pourrait en fait être sous-estimé (Rodriguez et *al*., 2014).

II. La peste

Le changement climatique (réchauffement planétaire) a favorisé l'apparition de plusieurs maladies vectorielles à l'échelle mondiale. La température élevée joue un rôle important dans le maintien et l'activité des ectoparasites qui transmettent les maladies d'un réservoir à un autre. La réapparition de la peste dans plusieurs pays du monde après plusieurs années de silence, a obligé les spécialistes de l'étudier avec profondeur.

Notre pays a connu la réapparition de la peste en 2003 à Oran (WHO, 2003). En 2008, un nouveau foyer est apparu dans la région de Laghouat où l'épidémie a touché des nomades. Dans le but de rechercher les réservoirs responsables de cette épidémie, des rongeurs de plusieurs espèces ont été capturés en 2009. L'amplification par PCR du gène activateur du plasminogène (*Pla*) était réalisée sur les rates de ces rongeurs, la positivité révélée était de 16% (Bitam et *al*., 2010a). Récemment, au cours d'une étude réalisée sur des rongeurs pour la recherche de de *Yersinia pestis*, le séquençage des gènes *pla*, *glpD* et *rpoB* a révélé une positivité de 8% (18/237) dans douze régions d'Algérie réparties comme suit: Tlemcen (0/5), Aïn Témouchent (0/2), Mascara (4/14). Laghouat (1/6), Djelfa (0/16), M'Sila (7/61), Biskra (2/16), Batna (0/7), Alger (0/2), Boumerdès (0/6) et Cap Djinet (4/102) (Malek et *al*., 2015).

Malgré que l'Algérie soit déclarée parmi les pays à foyers de peste par l'OMS, nous n'avons pas de données épidémiologiques sur cette pathologie sur les espèces animales susceptibles d'être une source de contamination pour les humains. Les seules études réalisées étaient effectuées sur des rongeurs et pendant les foyers de peste déclarés. La peste féline est la source de l'infection humaine dans plusieurs régions du monde et plusieurs cas de chats atteints de cette infection ont été constatés (Gage et *al*., 2000). Le rôle du chien comme source d'infection pesteuse n'a pas été bien élucidé par les scientifiques, malgré que cette espèce animale était incriminée comme source de contagion plusieurs fois (Wang et *al*., 2011).

Dans le but de connaitre si les chiens et les chats errants pourraient véhiculer cet agent pathogène si dangereux dans la région d'Alger ; une région qui a connu des foyers de peste dans le passé et comme ces espèces animales vivent dans des conditions de non salubrité et en étant en contact avec des rongeurs, les principaux réservoirs de la peste ; un total de 267 rates de chiens et de chats avec 256 puces étaient analysés pour la recherche de l'ADN bactérien de *Yersinia pestis.* Notre investigation était basée sur des méthodes moléculaires ciblant deux systèmes, le premier étant le gène *pla* pour une PCR en temps réel et le deuxième est le gène *glpD* pour une PCR nichée. Le choix de la rate comme type de prélèvement dans notre étude se justifie par le fait

qu'elle soit hautement perfusée et agit en tant que filtre pour épurer le sang. Cet organe est également impliqué dans le contrôle immunologique et l'élimination des pathogènes à vecteur (Agar et *al*., 2009 ; Movilla et *al*., 2017).
Les résultats de la PCR en temps réel et de la PCR nichée étaient tous négatifs. Les contrôles interne (B- actine) et externe (Tiss) et étaient bien positifs indiquant ainsi une bonne extraction et le bon déroulement de la PCR.

Nos résultats négatifs sur les chats suggèrent que ces derniers ne constituent pas un danger comme source de peste à Alger, comme fut le cas dans certaines régions du monde.
L'exposition aux chats infectés par *Yersinia pestis* est un risque connu depuis longtemps, le chat peut être une source d'infection pour les êtres humains suite à des griffures ou des morsures ou même un simple contact (Kaufmann et *al*., 1981). La peste pulmonaire primaire contractée chez des chats est devenue de plus en plus fréquente (Doll et *al.*, 1994). Le premier facteur de risque pour la peste féline semble être la chasse et l'ingestion des rongeurs morts dans les zones d'endémie. L'augmentation de chats errants est un facteur de risque pour leur acquisition de la peste (Eidson et *al*., 1988).

La peste féline était la source de l'infection humaine dans plusieurs régions du monde. Des enquêtes ont été réalisées dans la province orientale du Cap d'Afrique du Sud en 1982 où une épidémie de peste humaine a été déclarée. Il semble qu'au moins un cas humain a contracté la peste à partir d'un chat domestique infecté (Shepherd et *al*., 1983). La peste bubonique a été transmise à une fillette âgée de 10 ans aux États-Unis par une griffure d'un chat domestique. Le chat a été probablement infecté par contact avec des rongeurs sauvages infectés ou leurs puces. *Yersinia pestis* a été identifiée par la suite parmi des puces de l'espèce *Diamanus montanus* recueillies dans un terrier abandonné près du domicile de la patiente (Weniger et *al*., 1984). 60 cas de peste féline étaient constatés au Nouveau-Mexique entre 1977 et 1985 (Eidson et *al*., 1988). 297 cas de peste féline étaient déclaré à l'ouest des Etats-Unis dans la période allant de 1977 à 1998 dont 23 (7.7%) étaient associés aux cas humais. Les cas humains étaient causés par des morsures et des griffures dans la plupart des cas. Cinq cas de pneumonie primaire étaient causé par l'inhalation de sécrétions respiratoires des chats (Gage et *al*., 2000 ; Butler, 2009). Une épidémie de peste était signalée chez des chasseurs en Inde, Joshi et *al*. (2009) mentionnent que les rongeurs morts n'ont pas été signalés et la puce du rat responsable de la maladie n'a pas été identifiée ce qui suggère que la cause était probablement liée à l'inhalation de particules infectantes après contact avec des chats sauvages et domestiques.

En 2016, dans la région d'Idaho aux USA, des prélèvements de rate, de foie et de sang chez 12 chats ont été testé par la PCR en temps réel et confirmés par des tests de culture et de lyse sur phage. *Y. pestis* a été isolée chez six chats parmi les 12 chats analysés. Les chats positifs étaient âgés de 10 mois à 14,5 ans ; 67% étaient des mâles et 83% étaient des chats qui habitaient à la fois à l'intérieur et à l'extérieur. La fièvre et les adénopathies étaient les signes de maladie les plus souvent signalés. Les six chats étaient tous en contact avec des écureuils terrestres et d'autres rongeurs sauvages ou des lapins avant de tomber malades (Kassem et *al*., 2016).

L'atteinte des chats par *Yersinia pestis* après ingestion de souris ou de rongeurs infectés a été déjà prouvée expérimentalement par Gasper et *al*. (1993) et par Watson et *al*. (2001). D'après Gasper et *al*. (1993), 38% des chats exposés à *Yersinia pestis*, ont eu un issu fatal, 44% ont développé une forme passagère de la maladie avec récupération et 19% ne présentaient aucun signe de la maladie. Selon Watson et *al*. (2001), la forme bubonique et la forme septicémique étaient les plus fréquentes, ces deux formes étaient observées chez tous les chats inoculés, la forme pulmonaire était observée seulement chez 28% des cas, autrement dit les chats sont les seuls carnivores qui peuvent présenter les trois formes après une exposition à *Yersinia pestis*. Les chats infectés par voie orale présentent les mêmes symptômes que les chats infectés naturellement (ingestion de rongeurs infectés), avec l'apparition de nombreuses lésions dans les ganglions de la tête et du cou (Watson et *al*., 2001).

Lors d'une infection pesteuse, les chats peuvent jouer le rôle de sentinelles et développent des anticorps qui peuvent être détectés pendant plusieurs mois. Le dépistage sérologique d'une telle infection est particulièrement utile pour les enquêtes et programmes de surveillance épidémiologique ou lors d'une suspicion clinique animale ou humaine (Kaufmann et *al*., 1981). Des études sérologiques ont été menées dans plusieurs régions du monde avec des taux de prévalence différents d'une région à une autre (Annexe 4) : 5,4% au Canada (Leighton et *al*., 2001), 3,22% en Californie (Chomel et *al*., 1994), 26,5% en Chine (Li et *al*., 2008). Au Brésil la séroprévalence a touché 170 chats (Aragao et *al*., 2002), elle était de 0,8% dans une autre étude (Aragão et *al*., 2009) et de 0.7% au cours d'une troisième enquête (Sousa et *al*., 2017).

Comparés aux chiens, les chats sont très sensibles à la peste et peuvent transmettre directement la maladie à l'homme par l'exposition à des gouttelettes respiratoires et à des fluides corporels infectieux associés à des morsures ou des griffures. Les chats peuvent également transporter des puces infectées dans les maisons. Ils présentent le plus grand risque pour les propriétaires d'animaux domestiques et les membres du personnel vétérinaire. Pour pouvoir réduire le risque

de la peste chez les animaux domestiques, les auteurs recommandent aux propriétaires de contrôler l'itinérance de leurs animaux, en mettant en œuvre un programme de contrôle des puces et en minimisant les habitats des rongeurs (Kassem et *al*., 2016).

Nos résultats sur les chiens étaient tous négatifs. Nos résultats concordent avec les résultats obtenus par l'étude réalisée par Kassem et *al*. (2016) dans la région d'Idaho aux USA, où des prélèvements de rate, de foie et de sang chez 05 chiens étaient testé par la PCR en temps réel et confirmés par des tests de culture et de lyse sur phage. Les résultats étaient négatifs suggérant ainsi que le chien est une espèce résistante à la peste.

Le rôle du chien comme source d'infection pesteuse n'a pas été bien élucidé par les scientifiques. Dans les régions endémiques le chien peut avoir un rôle important dans l'épidémiologie de cette pathologie (Ge et *al*., 2005). Cela a été constaté au cours de l'épidémie qui a été déclarée en 2009 à la province du Qinghai, en Chine chez 12 personnes, où un chien décédé semblait être la source de l'infection. La première personne touchée était un berger exposé à ce chien malade. Les autres cas étaient des personnes qui ont été en contact avec le berger. *Y. pestis* a été isolée à partir des patients et du chien. La bactérie a été identifiée par coloration de Gram, essais biochimiques, test de lyse sur phage et par PCR ciblant les gènes *caf1* et *pla* (Wang et *al*., 2011). Cette épidémie était remarquable car il s'agissait de la première épidémie de peste pneumonique chez l'espèce canine étant donné que les chiens sont considérés naturellement résistants à la maladie malgré l'ingestion de rongeurs infectés dans des zones d'endémie (Butler, 2013).
Dans une étude menée par Gould et *al*. (2008) dans l'Ouest des États-Unis afin de mieux définir les risques associés aux animaux de compagnie, 79% des personnes atteintes de la peste avaient au moins un chien et 59% avaient au moins un chat. Les résultats suggèrent que les chiens peuvent faciliter le transfert de puces infectées des rats pesteux dans les habitations. De plus, les activités où les contacts étroits et prolongés avec les chiens peuvent augmenter le risque d'infection pesteuse (Henn et *al*., 2007 ; Gould et *al*., 2008 ; Wang et *al*., 2009 ; Raoult et *al*., 2013). Les chiens pourraient constituer une source d'infection humaine pour leurs propriétaires lorsqu'ils sont exposés à des animaux sauvages infectés (Li et *al*., 2009 ; Li et *al*., 2016).

Les chiens domestiques développent une forme relativement bénigne ou asymptomatique à l'infection pesteuse (Li et *al*., 2009 ; Li et *al*., 2016). Au cours d'une étude rétrospective réalisée sur 62 chiens atteints de la peste au Nouveau-Mexique entre 2003 et 2011, les résultats ont montré que les chiens exposés à *Y. pestis* peuvent développer une maladie modérée à sévère voir une mortalité et la source potentielle d'exposition à *Y. pestis* comprenait la chasse, l'exposition à

des rongeurs ou des lapins et la résidence en zone rurale (Nichols et *al*., 2014). Les vétérinaires sont souvent les premiers à reconnaître les signes de la peste parmi les populations sentinelles et ont la possibilité d'intervenir et de prévenir la transmission de la maladie (Nichols et *al*., 2014 ; Runfola et *al*., 2015).

Dans certains pays où la peste sévit de façon endémique tel que l'ouest des États-Unis et où les chiens sont fréquemment exposés à *Yersinia pestis* ; Orloski et Eidson (1995) indiquent dans leurs recommandations que la peste doit être comprise dans le diagnostic différentiel avec d'autres pathologies lorsque l'on examine les chiens avec de la fièvre non spécifique et la léthargie.

Les chiens domestiques semblent être très résistants à la peste, cependant ils peuvent développer des titres d'anticorps élevés détectables après plusieurs mois, sans apparition de symptômes. Donc, le chien est considéré comme un animal indicateur pour la surveillance de la peste et l'étude sérologique peut nous renseigner sur les zones où l'infection est active (Rajerison et *al*., 2009 ; Wang et *al*., 2011). Plusieurs études sérologiques ont été menées dans différentes régions du monde, confirmant ainsi que les chiens sont des sentinelles utiles pour donner une idée sur la prévalence de la peste (Annexe 5). Les résultats différent d'une région à une autre : 21,6% au Nouveau Mexique (USA) (Rust et *al*., 1971), 0,35% en Afrique du Sud (Shepherd et *al*., 1983), 6,3% aux montagnes d'Usambara occidentaux (Tanzanie) (Kilonzo et *al*., 1992), 5,5% au Lushoto (Tanzanie) (Kilonzo et *al*., 1993), 2,09% en Californie (USA) (Chomel et *al*., 1994) ; 35% en Équateur (Gabastou et *al*., 2000), 2,0% à Karatu et Ngorongoro (Tanzanie) (Kilonzo et *al*., 2006), 2,7% en Californie (Henn et *al*., 2007), 23,5% en Chine (Li et *al*., 2008), 2,3% à l'Etat du Ceará (Brésil) (Aragão et *al*., 2009), 23,8% en Madagascar (Rajerison et *al*., 2009), 3.42% en Iran (Esamaeili et *al*., 2013), 21,68% en Chine (Wang et *al*., 2014), 3% en Zambie (Nyirenda et *al*., 2017a) et 1.5% au Brésil (Sousa et *al*., 2017). L'étude sérologique menée par Saavedra et *al*. (2011) chez les chiens à l'Etat de Bahia au Brésil a été révélée négative, mais d'après les auteurs, ces résultats ne peuvent pas confirmer l'éradication de la maladie dans l'État, puisque la nature cyclique de la peste indique que la maladie peut rester sous forme silencieuse pendant de longues périodes et ensuite ressurgit à nouveau, touchant un grand nombre d'animaux et de personnes. Ainsi, la détection précoce et le développement de mesures de contrôle adéquates s'avèrent nécessaires (Saavedra et *al*., 2011).

L'infestation par les puces des carnivores étudiés dans notre enquête indique une prévalence élevée. Elle était de 327 (47,25%) puces chez les chiens et de 365 (52,74%) puces chez les chats. Ce résultat suggère que les conditions écologiques et climatiques, l'habitat extérieur, le contact

avec d'autres animaux et la non-utilisation des antiparasitaires préventifs ou thérapeutiques sont des facteurs associés à une grande exposition des chiens et chats errants d'Alger aux vecteurs arthropodes.

Les trois espèces de puces identifiées parmi les puces prélevées à partir des chiens et des chats étudiés étaient : *Ctenocephalides felis, Ctenocephalides canis* et *Xenopsylla cheopis. Ctenocephalides felis* était plus abondante chez les chats, par contre *Ctenocephalides canis* était plus fréquente chez les chiens. Ces résultats peuvent être légèrement modifiés par le déplacement des puces d'un individu à un autre puisque les animaux sont en promiscuité comme ils sont regroupés dans une cage unique avant l'euthanasie. Concernant les différentes espèces de puces qui parasitent les carnivores domestiques, Farkas et *al*. (2009) ont constaté que la prévalence de *Ctenocephalides canis* était plus élevée chez les chiens par rapport aux chats, par contre le taux d'infestation par la puce *Ctenocephalides felis* était nettement supérieur chez les chats. Ce constat concorde avec nos résultats. La prévalence de *Xenopsylla cheopis* était importante chez nos chiens. Cette espèce de puce est spécifique aux rongeurs mais peut affecter les chiens surtout si ces derniers sont errants (Koutinas et *al*., 1995 ; Cañón-Franco et Pérez-Bedoya, 2010).

Les résultats de la PCR pour la recherche de *Y. pestis* dans les puces étaient tous négatifs. Ces résultats concordent avec les résultats obtenus par Nyirenda et *al*. (2017b), où 82 puces collectées sur des chiens (*C. canis*) et des rongeurs (*X. cheopis*) en Zambie et analysées par PCR ciblant le gène *pla*, étaient toutes négatives (Nyirenda et *al*., 2017b).
Par ailleurs, une étude moléculaire était réalisée sur des populations de puces domestiques prélevées à partir d'animaux des pays d'Afrique tropicale et subtropicale (le Bénin, la Tanzanie et le Congo) où les échantillons d'ADN étaient analysés par qPCR ciblant le gène *Pla* puis confirmés par une PCR nichée et séquençage ciblant le gène *glpD*. L'ADN de *Y. pestis* a été détecté dans 3.25% (4/126) des puces collectées au Congo (Leulmi et *al*., 2014). Au cours de la réapparition de la peste humaine en Algérie en 2003, 95 *Xenopsylla cheopis* ont été testées par PCR pour la recherche de *Yersinia pestis*, neuf puces était infectées (Bitam et *al*., 2006).

Malgré que de nombreuses espèces de puces peuvent transmettre *Y. pestis*, le vecteur de la peste le plus commun et efficace est la puce du rat oriental *Xenopsylla cheopis*. Cette dernière est plus susceptible de transmettre la maladie que d'autres puces grâce à sa capacité de bloquer un repas sanguin contenant *Y. pestis* dans son proventricule, le régurgitant ainsi lors d'un nouveau repas (Butler, 2009).

La puce du chat (*Ctenocephalides felis*) et celle du chien (*Ctenocephalides canis*) peuvent transmettre la peste à l'être humain (Dennis et *al*., 1999 ; Graham et *al*., 2013). Cependant elles sont considérées comme des vecteurs pauvres et ne causent que rarement la maladie humaine (Pollitzer, 1954). *C. felis* est une puce domestique et péri-domestique commune dans certaines régions d'Afrique et de Chine où la peste est endémique. Au nord-ouest d'Ouganda, en Chine et aux États-Unis, cette puce a été signalée comme la puces les plus courante dans l'environnement familial humain (Eisen et *al*., 2008a ; Yin et *al*., 2011 ; Tam et *al*., 2014). *C. felis* se nourrit d'une variété d'hôtes, y compris l'homme, elle se nourrit aussi des rongeurs sauvages ; réservoirs principaux de *Y. pestis* et peut jouer donc un rôle dans la transmission de la peste à l'homme (Yin et *al*., 2011 ; Graham et *al*., 2013). *C. felis* devient infectieuse après que son hôte meurt de peste septicémique, ce qui donnera un potentiel de transmission tardif de plusieurs jours (Bland et Hinnebusch, 2016). Les études de laboratoires montrent que *C. felis* est un vecteur compétent pour *Yersinia pestis*, mais l'efficacité est faible par rapport aux autres espèces (Bland et Hinnebusch, 2016). Ces résultats indiquent que les puces de chat ne doivent pas être négligées par les programmes de contrôle car elles peuvent jouer un rôle important comme vecteurs secondaires (Eisen et *al*., 2008a).

CONCLUSION
ET PERSPECTIVES

Ce document a fourni de nouvelles informations intéressantes sur la leptospirose et la peste, des zoonoses émergentes et négligées chez les animaux de compagnie en Algérie. Les résultats de l'enquête indiquent ainsi un nombre élevé de porteurs asymptomatiques des leptospires chez les jeunes chiens excrétant ainsi la bactérie via leurs urines dans l'environnement, avec absence de la maladie chez les chats. La recherche concernant la peste a indiqué l'absence de l'agent pesteux chez les chiens et chats errants et leurs puces.

La détection urinaire des leptospires chez l'espèce canine est une première description en Algérie. La mise en place d'un système de surveillance de la leptospirose canine, en appliquant des mesures prophylactiques, vaccination et chimio-prophylaxie doivent être entreprises en Algérie pour un meilleur contrôle de la maladie.

La réapparition récente de plusieurs foyers de la peste restés silencieux pendant plusieurs décennies, indique que l'éradication d'un foyer de peste établi ne peut jamais être tenue pour acquise. Dans cette étude, nous n'avons pas confirmé le rôle réservoir des chats et chiens errants dans la région d'Alger par rapport à la peste. Ce rapport montre que l'épidémiologie de la peste n'est pas unique, mais suit des voies différentes selon les régions.

Des données épidémiologiques supplémentaires en examinant un nombre plus important d'animaux domestiques à partir de plusieurs localités sont nécessaires afin de déterminer la prévalence et la distribution réelle de ces maladies en Algérie. L'introduction des méthodes de diagnostic rapides et faciles à mettre en œuvres telles que les techniques moléculaires, restent plus que jamais nécessaires, afin d'établir un diagnostic approprié et fournir un traitement efficace et précoce.

Les opérations de désinsectisation, de dératisatisation et d'élimination des animaux nocifs tels que les chats et les chiens errants doivent se faire à travers toute l'Algérie et de façon permanente afin de limiter la propagation de certaines maladies zoonotiques. La création de plusieurs fourrières canines s'avère nécessaire. Une attention toute particulière doit être accordée aux zones défavorisées de l'Algérie profonde, là où il y a un manque flagrant d'hygiène.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abgueguen P., Pichard E. 2009. Leptospirosis. *Rev Prat*. 59(5), 665-673.

Acha P.N., Szyfres B. 2005. Zoonoses et maladies transmissibles communes a l'Homme et aux Animaux, 3e edition, Vol. I Bacterioses et mycoses. *Off. Int. Des Epizooties*, Paris, 382p.

Adesiyun A.A., Hull-Jackson C., Mootoo N., Halsall S., Bennett R., Clarke N.R., Whittington C.U. Seepersadsingh N. 2006. Sero-epidemiology of canine leptospirosis in Trinidad: serovars, implication for vaccine and public health. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, 53(2), 91-99.

Adin C.A. Cowgill L.D. 2000. Treatment and outcome of dogs with leptospirosis : 36 cases (1990-1998). *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 216(3), 371- 375.

Adjemian J.C., Foley, P., Gage K.L., Foley J.E. 2007. Initiation and spread of traveling waves of plague, *Yersinia pestis*, in the western United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg*., 76(2), 365-375.

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

Adler B., De la Peña Moctezuma A. 2010. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol*. 140(3-4), 287-296.

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

Adler B. 2015. History of leptospirosis and leptospira. *Curr Top Microbiol Immunol*. 387, 1-9.

Afiri M., Toudeft F., Ait K.D. 2013a. Leptospirosis epidemic: 48 cases. *Med Sante Trop*. 23(2), 234.

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

Agar S.L., Sha J., Foltz S.M., Erova T.E., Walberg K.G., Baze W.B., Suarez G., Peterson J.W., Chopra A.K. 2009. Characterization of the rat pneumonic plague model: infection kinetics following aerosolization of Yersinia pestis CO92. *Microbes Infect*. 11(2), 205-214.

Agunloye C.A. et Nash A.S. 1996. Investigation of possible leptospiral infection in cats in Scotland. J. Small. Anim. Prac. 37(3), 126-129.

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

Aikimbajev A., Meka-Mechenko T., Temiralieva G., Bekenov J., Sagiyev Z., Kaljan K., Mukhambetova A.K. 2003. Plague in Kazakhstan at the present time. *Przegl Epidemiol*. 57(4), 593-598.

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

Ajayi O.L., Antia R.E., Ojo O.E., Awoyomi O.J., Oyinlola L.A., Ojebiyi O.G. 2017. Prevalence and renal pathology of pathogenic Leptospira spp. in wildlife in Abeokuta, Ogun State, Nigeria. *Onderstepoort J Vet Res*. 84(1), e1-e9.

Alexander A. D., Evans L. B., Baker M. F., Baker H. J., Ellison D. et Marriapan M. 1975. Pathogenic leptospiras isolated from Malaysian surface waters. *Appl. Microbiol*. 29(1), 30-33.

Allan KJ., Biggs H.M., Halliday J.E., Kazwala R.R., Maro V.P., Cleaveland S., Crump J.A. 2015. Epidemiology of Leptospirosis in Africa: A Systematic Review of a Neglected Zoonosis and a Paradigm for 'One Health' in Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 14, 9(9):e0003899.

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

André-Fontaine G., Branger C., Gray A.W., Klaasen H.L. 2003. Comparison of the efficacy of three commercial bacterins in preventing canine leptospirosis. *Vet Rec*. 153(6), 165-9.

André-Fontaine G. 2006. Canine leptospirosis - Do we have a problem? *Vet. Microbiol.* 117(1), 19-24.

Andreoli E., Radaelli E., Bertoletti I., Bianchi A., stoE, Tagliabue S., Mattiello S. 2014. *Leptospira spp.* infection in wild ruminants: a survey in Central Italian Alps. *Vet Ital*. 50(4), 285-91.

Appelt S., Armougom F., Le Bailly M., Robert C., Drancourt M. 2014. Polyphasic analysis of a middle ages coprolite microbiota, Belgium. PLoS One. *Public Library of Science*. 9(2), e88376.

Aragão A.I., Seoane A.C., Leal T.C., Leal N.C., Almeida A.M. 2002. Surveillance of plague in the State of Ceará: 1990-1999. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 35(2), 143-148.

Aragão A.I., Pinheiro K.M., Seoane A.C., Tavares C., Almeida AM. 2009. Prevalence of antibodies against *Yersinia pestis* in domestic carnivores, in plague foci in the State of Ceará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* , 42(6), 711.

Arbaji A., Kharabsheh S., Al-Azab S., Al-Kayed M., Amr Z.S., Abu Baker M., Chu M.C.A. 2005. 12-case outbreak of pharyngeal plague following the consumption of camel meat, in north-eastern Jordan. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* , 99(8), 789-793.

Arbour J., Blais M.C., Carioto L., Sylvestre D. 2012. Clinical leptospirosis in three cats (2001-2009). *J Am Anim Hosp Assoc*. 48(4), 256–60.

Arent Z.J., Andrews S., Adamama-Moraitou K., Gilmore C., Pardali D., Ellis W.A. 2013. Emergence of novel Leptospira serovars: a need for adjusting vaccination policies for dogs? *Epidemiol Infect*. 141(6), 1148-1153.

Aubry P., Bordahandy R., Ferah T., Mailloux M., Thomas J. 1975. An anademy of ictero-hemorrhagic leptospirosis in a military group in Algeria. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 68(4), 370-376.

Aviat F., Mansotte F., Blanchard B., Mondot P., Bolut P. André-Fontaine G. 2004. Leptospirose, zoonose de loisir et zoonose professionnelle : role des rongeurs et de l'eau. *Epidemiol. et sante anim.* 45, 55-60.

Ayral F., Djelouadji Z., Raton V., Zilber A.L., Gasqui P., Faure E., Baurier F., Vourc'h G., Kodjo A., Combes B. 2016. Hedgehogs and Mustelid Species: Major Carriers of Pathogenic Leptospira, a Survey in 28 Animal Species in France (20122015). *PLoS One*. 11(9), e0162549.

Ayyadurai S., Houhamdi L., Lepidi H., Nappez C., Raoult D., Drancourt M. 2008. Long-term persistence of virulent Yersinia pestis in soil. *Microbiology*. 154(9), 2865-2871.

Azócar-Aedo L., Monti G., Jara R. 2014. Leptospira spp. in Domestic Cats from Different Environments: Prevalence of Antibodies and Risk Factors Associated with the Seropositivity. *Anim an open access J from MDPI*. 4(4), 612-626.

Bal A.E., Gravekamp C., Hartskeerl R.A., De Meza-Brewster J., Korver H., Terpstra W.J. 1994. Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J Clin Microbiol*. 32(8), 1894-1898.

Balows A., Hausler W.J., Ohashi M., Turano A. 2012. Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Principles and Practice. *Springer Science & Business Media*. 1101 p.

Baltazard M. 1971. Evolution de la recherche sur l'épidémiologie de la peste. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 1(4), 203-218.

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

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

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

Baron S. 1996. Medical microbiology. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1273 p.

Barreto A., Aragon M., Epstein P.R. 1995. Bubonic plague outbreak in Mozambique, 1994. *Lancet*, 345(8955), 983-984.

Beaucournu J.C., Kowalski K. 1985. New data on fleas (Inscta-Siphonaptera) of Algeria. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filial*., 78(3), 378-392.

Beaucournu J.C. et Launay H. 1990. Les puces (Siphonaptera) de France et du bassin méditerranéen occidental. *Paris : Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles*. 548 p.

Beaucournu JC. 1995. A propos du vecteur de la peste en Europe occidentale au cours de la deuxième pandémie. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, 13(2), 233-252.

Beckel N.F., O'Toole T.E., Rozanski E.A., Labato M.A. 2005. Peritoneal dialysis in the management of acute renal failure in 5 dogs with leptospirosis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 15(3), 201-205.

Benkirane A., Noury S., Hartskeerl R.A., Goris M.G., Ahmed A., Nally J.E. 2016. Preliminary Investigations on the Distribution of Leptospira Serovars in Domestic Animals in North-west Morocco. *Transbound Emerg Dis.* 63(2), e178-84.

Beran G.W. 1994. Handbook of Zoonoses, Second Edition: Bacterial, Rickettsial, Chlamydial, and Mycotic Zoonoses. *CRC Press*. 560p.

Bernard W.V. 1993. Leptospirosis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 9(2), 435-444.

Bertherat E., Bekhoucha S., Chougrani S., Razik F., Duchemin J.B., Houti L., Deharib L., Fayolle C., Makrerougrass B., Dali-Yahia R., Bellal R, Belhabri L., Chaieb A., Tikhomirov E. et Carniel E., 2007. Plague Reappearance in Algeria after 50 Years, 2003. *Emerging Infectious Diseases*. 13(10), 1459-1462.

Bevins S.N., Tracey J.A., Franklin S.P., Schmit V.L., Macmillan M.L., Gage K.L., Schriefer M.E., Logan K.A., Sweanor L.L., Alldredge M.W., Krumm C., Boyce W.M., Vickers W., Riley S.P., Lyren L.M., Boydston E.E., Fisher R.N., Roelke M.E., Salman M., Crooks K.R., Vandewoude S. 2009. Wild felids as hosts for human plague, Western United States. *Emerg. Infect. Dis.* 15(12), 2021-2024.

Bharadwaj R., Bal A.M., Joshi S.A., Kagal A., Pol S.S., Garad G., Arjunwadkar V. Katti R. 2002. An urban outbreak of leptospirosis in Mumbai, India. *J. Infect. Dis.* 55(6), 194-196.

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. 2003. Leptospirosis : a zoonotic disease of global importance. *Lancet. Infect. Dis*. 3(12), 757-771.

Bianucci R., Rahalison L., Ferroglio E., Massa ER., SignoliM. 2007. Détection de l'antigène F1 de *Yersinia pestis* dans les restes humains anciens à l'aide d'un test de diagnostic rapid. *C. R. Biologies.* 330(10), 747-754.

Bin Saeed A.A., Al-Hamdan N.A., Fontaine R.E. 2005. Plague from eating raw camel liver. *Emerg. Infect. Dis.* 11(9), 1456-1457.

Birnbaum N., Barr S.C., Center S.A., Schermerhorn T., Randolph J.F. Simpson K.W. 1998. Naturally acquired leptospirosis in 36 dogs; serological and clinicopathological features. *J. Small. Anim. Pract.* 39(5), 231-236.

Bitam I., Baziz B., Rolain J.M., Belkaid M., Raoult D., 2006. Zoonotic Focus of Plague, Algeria. *Emerg. Infect. Dis.* 12(12), 1975-1977.

Bitam I., Ayyadurai S., Kernif T., Chetta M., Boulaghman N., Raoult D., Drancourt M. 2010a : New rural focus of plague, Algeria. *Emerg. Infect. Dis.* 16(10), 1639-1640.

Bitam I., Dittmar K., Parola P., Whiting M-F., Raoult D. 2010b. Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases*. 14(8):e667-76.

Bizard F. 2009. Epidémiologie sur 10 ans de trois zoonoses majeures chez les rongeurs commensaux en France. Thèse Pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire. Ecole Nationale Veterinaire de Lyon. 209p.

Blanc G. 1956. Une opinion non conformiste sur le mode de transmission de la peste. *Revue d'Hygiéne et de Médecine Sociale*. 4(6), 532-562.

Bland D.M., Hinnebusch B.J. 2016. Feeding Behavior Modulates Biofilm-Mediated Transmission of Yersinia pestis by the Cat Flea, Ctenocephalides felis. *PLoS Negl Trop Dis*. 10(2):e0004413.

Blenden D.C., Goldberg H.S. 1965. Silver impregnation stain for Leptospira and flagella. *J Bacteriol*. 89: 899-900.

Boisier P., Rasolomaharo M., Ranaivoson G., Rasoamanana B., Rakoto L., Andrianirina Z., Andriamahefazafy B., Chanteau S. 1997. Urban epidemic of bubonic plague in Majunga, Madagascar: epidemiological aspects. *Trop. Med. Int. Health*. 2(5), 422-427.

Bolin C.A. Koellner P. 1988. Human-to-human transmission of Leptospira interrogans by milk. *J. Infect. Dis*. 158(1), 246-247.

Bolin C.A. 1996. Diagnosis of Leptospirosis: a reemerging disease of companion animals. *Semin. Vet. Med. Surg. Small Anim.* 11(3), 166-171.

Bonilla-Santiago R., Nally J.E. 2011. Rat model of chronic leptospirosis. *Curr Protoc Microbiol*. Chapter 12:Unit 12E.3.

Bouhsira. E. 2014. Rôle de Ctenocephalides felis dans la transmission de Bartonella spp. et moyens de contrôle. *Thèse en vue de l'obtention du Doctorat De L'université de Toulouse*. 221p.

Bramanti B., Stenseth N.C., Walløe L., Lei X. 2016. Plague: A Disease Which Changed the Path of Human Civilization. *Adv Exp Med Biol.* 918,1-26.

Brett-Major D.M., Lipnick R.J. 2009. Antibiotic prophylaxis for leptospirosis. *Cochrane Database Syst Rev*. (3), CD007342.

Brisou B. 1995. Pioneers of the plague, colonial and pasteurian doctors: Yersin, Simond, Girard et Robic. *Hist Sci Med.* 29(4), 327-336.

Brown J.A., LeFebvre R.B., Pan M.J. 1991. Protein and antigen profiles of prevalent serovars of Leptospira interrogans. *Infect Immun*. 59(5), 1772-1777.

Brown P.D., Gravekamp C., Carrington D.G., van de Kemp H., Hartskeerl R.A., Edwards C.N., Everard C.O., Terpstra W.J. Levett P.N. 1995. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J. Med. Microbiol*. 43(2), 110-114.

Brown C.A., Wayne R.A., Miller M.A., Davis D.A., Brown S.A., Bolin C.A., Jarecki-Black J., Greene C.E. Miller-Liebl D. 1996. Leptospira interrogans serovar grippotyphosa infection in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 209(7), 1265-1267.

Brown P.D., Carrington D.G., Gravekamp C., van de Kemp H., Edwards C.N., Jones S.R., Prussia P.R., Garriques S., Terpstra W.J. Levett P.N. 2003. Direct detection of leptospiral material in human postmortem samples. *Res. Microbiol*., 154(8), 581-586.

Brown K. Prescott J. 2008. Leptospirosis in the family dog: a public health perspective. *CMAJ*. 178(4), 399-401.

Brown H.E., Levy C.E., Enscore R.E., Schriefer M.E., Deliberto T.J., Gage K.L., Eisen RJ. 2011. Annual Seroprevalence of *Yersinia pestis* in Coyotes as Predictors of Interannual Variation in Reports of Human Plague Cases in Arizona, United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(11), 1439-1446.

Brown PD, McKenzie M, Pinnock M, McGrowder D. 2011. Environmental risk factors associated with leptospirosis among butchers and their associates in Jamaica. *Int J Occup Environ Med*. 2(1), 47-57.

Butler T., Bell W.R., Nguyen-Ngoc-Linh, Nguyen-Dinh-Tiep, Arnold K. 1974. Yersinia pestis infection in Vietnam. I. Clinical and hematologic aspects. *J Infect Dis*. 129, S78-84.

Butler T., Levin J., Linh N.N., Chau D.M, Adickman M., Arnold K. 1976. *Yersinia pestis* infection in Vietnam. II. Quantitative blood cultures and detection of endotoxin in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *J. Infec.t Dis*. 133(5), 493-499.

Butler T. 2009. Plague into the 21st century. *Clin Infect Dis*. 49(5), 736-742.

Butler T. 2012. Plague and Other Yersinia Infections. *Springer Science & Business Media*. 220 p.

Butler T. 2013. Plague gives surprises in the first decade of the 21st century in the United States and worldwide. *Am J Trop Med Hyg*. 89(4), 788-793.

Cai H.Y., Hornby G., Key D.W., Osuch M.R., Maxie MG. 2002. Preliminary study on differentiation of Leptospira grippotyphosa and Leptospira sejroe from other common pathogenic leptospiral serovars in canine urine by polymerase chain reaction assay. *J Vet Diagn Invest*. 14(2), 164-168.

Calderón A., Rodríguez V., Máttar S., Arrieta G. 2014. Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics. *Trop Anim Health Prod*. 46(2), 427-432.

Campbell G.L., Hughes J.M. 1995. Plague in India: a new warning from an old nemesis. *Ann Intern Med.* 122(2), 151-153.

Cañón-Franco W.A., Pérez-Bedoya J.L. 2010. Siphonaptera (Pulicidae) in dogs and cats of Colombia: Clinical and epidemiological aspects. *Vet. Parasitol.* 173 (3-4), 353-357.

Carniel E. 2002. La peste. Academie des sciences/Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS, *Comptes Rendus Biologies*. 325(8), 851-853.

Carniel E. 2003. Evolution of pathogenic Yersinia, some lights in the dark. *Adv Exp Med Biol*. 529, 3-12.

Carniel E. 2008. Plague today. *Med. Hist. Suppl.* (27), 115-122.

Cerqueira G.M., Picardeau M. 2009. A century of Leptospira strain typing. *Infect Genet Evol*. 9(5):760-8.

Chan K.W., Hsu Y.H., Hu W.L., Pan M.J., Lai J.M., Huang K.C., Chou S.J. 2014. Serological and PCR detection of feline leptospira in southern Taiwan. Vector Borne Zoonotic Dis. 4(2), 118-23.

Chanteau S., Ratsitorahina M., Rahalison L., Rasoamanana B., Chan F., Boisier P., Rabeson D. et Roux J. 2000. Current epidemiology of human plague in Madagascar. Microbes and Infection. *Science direct*. 2(1), 25-31.

Chanteau S., Rahalison L., Ralafiarisoa L., Foulon J., Ratsitorahina M., Ratsifasoamanana L., Carniel E., Nato F. 2003. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet*, 361(9353), 211-216.

Charon N.W., Goldstein S.F. 2002. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The Spirochetes. *Annu Rev Genet.* 36, 47-73.

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

Chikeka I., Dumler J.S. 2015. Neglected bacterial zoonoses. *Clin Microbiol Infect*. 21(5), 404-415.

Chomel B.B., Jay M.T., Smith C.R., Kass P.H., Ryan C.P., Barrett L.R. 1994. Serological surveillance of plague in dogs and cats, California, 1979–1991, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 17 (2), 111-123.

Chomel B.B. 2014. Emerging and Re-Emerging Zoonoses of Dogs and Cats. *Animals (Basel)*. 4(3), 434-445.

Chomel B.B. 2015. Diseases Transmitted by Less Common House Pets. *Microbiol Spectr*. 3(6).

Chow E., Deville J., Nally J., Lovett M., Nielsen-Saines K. 2012. Prolonged Leptospira urinary shedding in a 10-year-old girl. *Case Rep Pediatr*. 2012 : 169013.

Christie A.B., Chen T.H., Elberg S.S. 1980. Plague in camels and goats: their role in human epidemics. *J Infect Dis*., 141(6), 724-726.

Chu M.C., Dong X.Q., Zhou X., Garon C.F. 1998. A cryptic 19-kilobase plasmid associated with U.S. isolates of Yersinia pestis: a dimer of the 9.5-kilobase plasmid. *Am J Trop Med Hyg*. 59(5), 679-686.

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

Ciceroni L., Stepan E., Pinto A., Pizzocaro P., Detton G., Frazin L., Lupidi R., Mansueto S., Manera A., Ioli A., Marcuccio L., Grillo R., Ciarrocchi S., Cinco M. 2000. Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. European Journal of Epidemiology. 16, 79-86.

Cinco M. 1981. Culture des leptospires. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 11(2), 57-59.

Cinco M., Banfi E., Soranzo M. R. 1981. Studies on the interaction between macrophages and leptospires. *J. Gen. Microbiol.* 124:409-413.

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

Coulanges P., Randrianantoanina E. 1985. Resistance des puces pestigènes malgaches aux insecticides organochlorés, organophosphorés et aux carbamates. *Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar*. 51(1), 253-260.

Coyne M.J., Burr J.H., Yule T.D., Harding M.J., Tresnan D.B., McGavin D. 2001. Duration of immunity in dogs after vaccination or naturally acquired infection. *Vet Rec*. 149(17), 509-515.

Croda J., Figueira C.P., Wunder E.A. Jr., Santos C.S., Reis M.G., Ko A.I. Picardeau M. 2008. Targeted mutagenesis in pathogenic Leptospira species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. *Infect. Immun.* 76(12), 5826-5833.

Crook L.D., Tempest B. 1992. Plague: a clinical review of 27 cases. *Arch. Intern. Med*. 152(6), 1253-1256.

Cullen P.A., Haake D.A., Adler B. 2003. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *Microbiology Reviews*, 67, 1-28.

Daoudal P., Langrenon C., Tiberghien E., Elcadit T., Delacour JL., Floriot C. Wagschal G. 1997. Les leptospiroses : maladies d'actualités, *Sem. Hop.* 73(33,34), 1087-1092.

Dassanayake D., Wimalaratna H., Agampodi S., Liyanapathirana V., Piyarathna T., Goonapienuwala B.L. 2009. Evaluation of surveillance case definition in the diagnosis of leptospirosis, using the Microscopic Agglutination Test: a validation study. *BMC Infect Dis*. 22, 9: 48.

De Lange J.F., Gummow B., Turner G.V., Redman A.R. 1987. The isolation of Leptospira interrogans serovar pomona and related serological findings associated with a mixed farming unit in the Transvaal. *Onderstepoort J Vet Res*. 54(2), 119–21.

De Revel M.C., Gourmelon M.C.S., Vidal P.C. 2005. Menace terroriste nucléaire : approche médicale. *John Libbey Eurotext*. 440 p.

De Vries S.G., Visser B.J., Nagel I.M., Goris M.G., Hartskeerl R.A., Grobusch M.P. 2014. Leptospirosis in Sub-Saharan Africa : a systematic review. *Int J Infect Dis*. 28: e47201e64.

Delarras C. 2014. Pratique en microbiologie de laboratoire ? Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier, 772 p.

Delaude A., Rodriguez-Campos S., Dreyfus A., Counotte M.J., Francey T., Schweighauser A., Lettry S., Schuller S. 2017. Canine leptospirosis in Switzerland-A prospective cross-sectional study examiningseroprevalence, risk factors and urinary shedding of pathogenic leptospires. *Prev Vet Med*. 141, 48-60.

Demeure C., Carniel E. 2009. *Yersinia pestis*. *Revue Francophone des Laboratoires*. 415, 33-39.

Denis F. 2007. Bactériologie médicale: techniques usuelles. *Elsevier Masson*, 573 p.

Denis F., Ploy M.C., Martin C., Cattoir V. 2016. Bactériologie médicales, techniques usuelles, *3ème edition, Elsevier masson*, 600p.

Dennis D.T., Gage K.L., Gratz N.G., Poland J.D., Thikhomirov E. 1999. Plague manual: epidemiology, distribution, surveillance and control, Chapter 4, Pub No WHO/CDS/CSR/EDC/992. Geneva: World Health Organization. 63-96.

Desachy F. 2005. Les zoonoses: transmission des maladies des animaux à l'homme. De Vecchi. 180 p.

Desvars A., Naze F., Vourc'h G., Cardinale E., Picardeau M., Michault A., Bourhy P., 2012. Similarities in Leptospira serogroups and species distribution in animals and humans in the Indian Ocean island of Mayotte. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 87, 134-140.

Devignat R. 1951. Variétés de l'espèce *Pasteurella pestis* : nouvelle hypothèse. *Bull. OMS.* 4(2), 247-263.

Dhliwayo S., Matope G., Marabini L., Dutlow K., Pfukenyi D.M. 2012. Seroprevalence of leptospirosis in dogs in urban Harare and selected rural communities in Zimbabwe. *Onderstepoort J Vet Res*. 79(1), 1-6.

Dickeson D. Love D.N. 1993. A serologic survey of dogs, cats and horses in south-eastern Australia for leptospiral antibodies. *Aust. Vet. Jour.* 70(10), 389-390.

Dikken H., Timmer V.E., Njenga R. 1981. Three new leptospiral serovars from Kenya. *Trop Geogr Med.* 33(4), 343-346.

Doll J.M., Zeitz P.S., Ettsetad P., Bucholtz A.L., Davis T., Gage K. 1994. Cat-transmitted fatal pneumonic plague in a person who traveled from Colorado to Arizona. *Am. J. Trop. Med. Hyg*., 51(1), 109-114.

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

Donatien A., Gayot G., Poul J. 1951. Leptospirosis of the dog in Algeria. *Arch l'Institut Pasteur d'Algerie Inst Pasteur d'Algerie*. 29(1), 20-24.

Dos Santos L.F., Guimarães M.F., de Souza G.O., da Silva I.W.G., Santos J.R., Azevedo S.S., Labruna M.B., Heinemann M.B., Horta M.C. 2017. Seroepidemiological survey on Leptospira spp. infection in wild and domestic mammalsin two distinct areas of the semi-arid region of northeastern Brazil. *Trop Anim Health Prod.* 49(8), 1715-1722.

Drancourt M., Aboudharam G., Signoli M., Dutour O., Raoult D. 1998. Detection of 400-year-old Yersinia pestis DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 12637-12640.

Drancourt A.M., Roux V., Dang H.L. et Tran-Hung L., Castex D., Chenal-Francisque V., Ogata H., Fournier PE., Crubezy E., Raoult D. 2004. Genotyping, Orientalis- like *Yersinia pestis*, and plague pandemics. *Emerg Infect Dis*. 10(9), 1585-1592.

Drancourt M., Signoli M., Dang L.V., Bizot B., Roux V., Tzortzis S., Raoult D. 2007. Yersinia pestis Orientalis in remains of ancient plague patients. *Emerg Infect Dis*. 13(2), 332-323.

Dryden M.W., Rust M.K. 1994. The cat flea: biology, ecology, and control. *Vet. parasitol*. 52(1-2), 1-19.

Du Y.D., Rosqvist R., Forsberg A. 2002. Role of fraction 1 antigen of Yersinia pestis in inhibition of phagocytosis. *Infection and Immunity*. 70(3), 1453-1460.

Duchemin J-B., Fournier P.E., Parola P. 2006. Les puces et les maladies transmises à l'homme. *Med. Trop.* 66(1), 21-29.

Duplantier J.M., Duchemin J.B., Chanteau S. Carniel E. 2005. From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence. *Veterinary Research.* 36(3), 437-453.

Edwards C.N., Levett P.N. 2004. Prevention and treatment of leptospirosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2(2), 293-298.

Eidson M., Tierney L.A., Rollag O.J., Becker T., Brown T., Hull H.F. 1988. Feline plague in New Mexico: risk factors and transmission to humans. *Am. J. Public. Health*. 78(10), 1333-1335.

Eidson M., Thilsted J.P., Rollag O.J. 1991. Clinical, clinicopathologic, and pathologic features of plague in cats: 119 cases (1977-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 199(9), 1191-1197.

Eisen R.J., Borchert J.N., Holmes J.L., Amatre G., Van Wyk K., Enscore R.E. 2008a. Early phase transmission of Yersinia pestis by cat fleas (Ctenocephalides felis) and their potential role as vectors in a plague-endemic region of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 78(6), 949-956.

Eisen R.J., Petersen J.M., Higgins C.L., Wong D., Levy C.E., Mead P.S., Schriefer M.E., Griffith K.S., Gage K.L., Beard C.B. 2008b. Persistence of Yersinia pestis in soil under natural conditions. *Emerg Infect Dis*. 14(6), 941-943.

Elchos B.L., Scheftel J.M., Cherry B., DeBess E.E., Hopkins S.G., Levine J.F., Williams C.J. 2008. Compendium of veterinary standard precautions for zoonotic disease prevention in veterinary personnel. *J Am Vet Med Assoc.* 233(3):415-32.

Elgat M. Ben-Gurion R. 1969. Mode of action of pesticin. *Journal of Bacteriology*. 98(2), 359-367.

Ellinghausen H.C. Mccullough W.G. 1965. 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.*, 26, 45-51.

Ellis W.A. 1981. Manifestations cliniques des leptospiroses chez le bétail. *Méd. Mal. Infect.* 11(2), 84-85.

Ellis W.A. 2010. Control of canine leptospirosis in Europe: Time for a change? *Vet. Rec*. 167(16), 602-605.

Ellis W. A. 2015. Animal Leptospirosis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 387, 99–137.

Engelkirk P.G., Duben-Engelkirk J.L. 2008. Laboratory diagnosis of infectious diseases: essentials of diagnostic. *Lippincott wiliams et wilkins*. 754p.

Engelthaler, D.M., Gage, K.L., Montenieri, J.A., Chu, M., Carter, L.G. 1999. PCR Detection of *Yersinia pestis* in fleas: Comparison with mouse inoculation. *J. Clin. Microbiol*. 37(6), 1980-1984.

Ensuncho-Hoyos C., Rodríguez-Rodríguez V., Pérez-Doria A., Vergara O., Calderón-Rangel A.. 2017. Epidemiology behavior of leptospirosis in Ciénaga de Oro, Córdoba (Colombia). *Trop Anim Health Prod*. 49(7), 1345-1351.

EPIC-H.U.P.E : Hygiène Urbaine et Protection de l'environnement de la ville d'Alger (Ex : HURBAL).

Esamaeili S., Azadmanesh K., Naddaf S.R., Rajerison M., Carniel E., Mostafavi E. 2013. Serologic survey of plague in animals, Western Iran. *Emerg Infect Dis*. 19(9).

Esamaeili S., Azadmanesh K., Naddaf S.R., Rajerison M., Carniel E., Mostafavi E. 2013. Serologic survey of plague in animals, Western Iran. *Emerg Infect Dis*. 19(9).

Espinosa-Martínez D.V., Sánchez-Montes D.S., León-Paniagua L., Ríos-Muñoz C.A., Berzunza-Cruz M., Becker I.. 2015. NEW WILDLIFE HOSTS OF Leptospira interrogans IN CAMPECHE, MEXICO. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 57(2), 181-3.

Espy M.J., Uhl J.R., Sloan L.M., Buckwalter S.P., Jones M.F., Vetter E.A., Yao J.D., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R., Smith T.F. 2006. Realtime PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*. 19:165-256.

Esseveld H., Collier W.A. Leptospirosis of cats in Java. *Veterinary Bulletin*, 1940. 9, 462.

Etienne J. 2000. Biochimie, génétique et biologie moléculaire. 6ème édition MASSON, Paris, 505p.

Ettinger S.J., Feldman E.C. 2009. Textbook of veterinary internal medicine 6th édition 616-618.

Evangelista K., Franco R., Schwab A., Coburn J. 2014. Leptospira Interrogans Binds to Cadherins. *PLoS Neglected Tropical* Diseases 8 (1), e2672.

Everard C.O., Cazabon E.P., Dreesen D.W., Sulzer C.R. 1979. Leptospirosis in dogs and cats on the Island of Trinidad: West Indies. *Int J Zoonoses*. 6(1), 33-40.

Everard C.O., Carrington D.G., Korver H., Burke R., Everard J.D., Gravekamp C. 1990. Leptospires in the whistling frog (Eleutherodactylus johnstonei) on Barbados. *J Trop Med Hyg*. 93(2), 140-5.

Everard J.D., Everard C.O.R. 1993. Leptospirosis in the Caribbean. Reviews in Medical Microbiology. 4, 114-122.

Eyquem A., Alouf J., Montanier L. 2000. Traité de microbiologie clinique, *Piccin.* p : 228.

Faine S., Adler. B., Bolin C., Pérolat P. 1999. Leptospira and leptospirosis, Melbourne, Australia. *MedScience*. 272 p.

Farkas R., Gyurkovszky M., Solymosi N., Beugnet F. 2009. Prevalence of flea infestation in dogs and cats in Hungary combined with a survey of owner awareness. *Med. Vet. Entomol.* 23(3), 187-194.

Fedorow V.N. 1960. Plague in camels and its prevention in the USSR. *Bull. OMS*. 23(2,3), 275-281.

Felt S.A., Wasfy M.O., El-Tras W.F., Samir A., Rahaman B.A., Boshra M., Parker T.M., Hatem M.E., El-Bassiouny A.A., Murray C.K. Pimentel G. 2011. Cross-species surveillance of Leptospira in domestic and peri-domestic animals in Mahalla City, Gharbeya Governorate, Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 84(3), 420-425.

Fessler J.F., Morter R.L. 1964. Experimental feline leptospirosis. *Cornell Vet*. 54, 176-190.

Finegold M.J., Petery J.J., Berendt R.F., Adams H.R. 1968. Studies on the pathogenesis of plague. Blood coagulation and tissue responses of Macaca mulatta following exposure to aerosols of Pasteurella pestis. *Am J Pathol*. 53(1), 99-114.

Fink J.M., Moore G.E., Landau R., Vemulapalli R. 2015. Evaluation of three 5' exonuclease-based real-time polymerase chain reaction assays for detection of pathogenic Leptospira species in canine urine. *J Vet Diagn Invest*. 27(2),159-166.

Fong I.W., Alibek K. 2010. Bioterrorism and Infectious Agents: A New Dilemma for the 21st Century. *Springer Science & Business Media*. 273 p.

Forrest L.J., O'brien R.T., Tremelling M.S., Steinberg H., Cooley A.J., Kerlin R.L. 1998. Sonographic renal findings in 20 dogs with leptospirosis. *Vet.Radiol. ultrasound*. 39 (41), 337-340.

Fraga T.R., Barbosa A.S., Isaac L. 2011. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement System*Scand J Immunol*. 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. 2014. Immune Evasion by Pathogenic Leptospira Strains: The Secretion of Proteases That Directly Cleave Complement Proteins. *The Journal of Infectious Diseases.* 209 (6), 876-886.

Franc M. 1994. Puces et méthodes de lutte. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. 13(4), 1019-1037.

Fraune C.K., Schweighauser A., Francey T. 2013. Evaluation of the diagnostic value of serologic microagglutination testing and a polymerase chain reaction assay for diagnosis of acute leptospirosis in dogs in a referral center. *J Am Vet Med Assoc*. 242(10), 1373-1380.

Frency J., Renaud F., Leclercq R. Rieggel P. 2007. Précis de bactériologie Clinique. 2e edition. ESKA. 1764p.

Frieden T.R., Jaffe H.W., Stephens J.W., Thacker S.B., Zaza S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2011. Fatal laboratory-acquired infection with an attenuated Yersinia pestis Strain e Chicago, Illinois. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 60(7), 201-205.

Gabastou J.M., Proano J., Vimos A., Jaramillo G., Hayes E., Gage K., Chu M., Guarner J., Zaki S., Bowers J., Guillemard C., Tamayo H., Ruiz A. 2000. An outbreak of plague including cases with pneumonic infection, Ecuador, 1998. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94(4), 387-391.

Gage K.L., Ostfeld R.S., Olson J.G. 1995. Nonviral vector-borne zoonoses associate with mammals in the United States. *J. Mammal.*, 76(3): 695-715.

Gage K.L., Dennis D.T., Orloski K.A., Ettestad P.J., Brown T.L., Reynolds P.J., Pape W.J., Fritz C.L., Carter L.G. et Stein J.D. 2000. Cases of cat-associated human plague in the Western US, 1977-1998. *Clin. Infect. Dis.* 30(6), 893-900.

Gage K.L., Kosoy M.Y. 2005. Natural history of plague: perspectives from more than a century of research. *Annu Rev Entomol*. 50, 505-528.

Galimand M., Carniel E., Courvalin P. 2006. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(10), 3233-3236.

Ganapati M. 1995. India's pneumonic plague outbreak continues to baffle. *BMJ*. 311(7007), 706.

Ganiere J.P., Ruvoen N., Andre-Fontaine G. 2001. Zoonoses infectieuses d'origine canine et féline. *Méd. Mal. Infect.* 31(2), 109-125.

Ganoza C.A., Matthias M.A., Saito M., Cespedes M., Gotuzzo E., Vinetz J.M. 2014. Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian Amazon by Leptospira. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(2), e612.

Garcia E., Elliott J.M., Ramanculov E., Chain P.S., Chu M.C., Molineux I.J. 2003. The genome sequence of Yersinia pestis bacteriophage phiA1122 reveals an intimate history with the coliphage T3 and T7 genomes. *J Bacteriol*. 185(17), 5248-5262.

Gasper P.W., Barnes A.M., Quan T.J., Benziger J.P., Carter L.G., Beard M.L., Maupin G.O. 1993. Plague (*Yersinia pestis*) in cats: description of experimentally induced disease. *J. Med. Entomol*. 30(1), 20-26.

Gay N., Soupé-Gilbert M.E., Goarant C. 2014. Though not Reservoirs, Dogs might Transmit Leptospira in New Caledonia. *Int J Environ Res Public Health*. 11(4), 4316-4325.

Ge P., Xi J., Ding J., Jin F., Zhang H., Guo L., Zhang J., Li J., Gan Z., Wu B., Liang J., Wang X., Wang X. 2015. Primary case of human pneumonic plague occurring in a Himalayan marmot natural focus area Gansu Province, China. *Int J Infect Dis*. 33, 67-70.

Geisen V., Stengel C., Brem S., Müller W., Greene C., Hartmann K. 2007. Canine leptospirosis infections - clinical signs and outcome with different suspected Leptospiraserogroups (42 cases). *J Small Anim Pract.* 48(6), 324-328.

Gentilini F., Zanoni R.G., Zambon E., Turba M.E. 2015. A comparison of two real-time polymerase chain reaction assays using hybridizationprobes targeting either 16S ribosomal RNA or a subsurface lipoprotein gene for detecting leptospires in canine urine. *J Vet Diagn Invest*. (6):696-703.

Ghneim G.S., Viers J.H., Chomel B.B., Kass P.H., Descollonges D.A., Johnson M.L. 2007. Use of a case-control study and geographic information systems to determine environmental and demographic risk factors for canine leptospirosis. *Vet Res*. 38(1), 37-50.

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

Goldstein R.E., Lin R.C., Langston C.E., Scrivani P.V., Erb H.N., Barr S.C. 2006. Influence of Infecting Serogroup on Clinical Features of Leptospirosis in Dogs. J. Vet. Intern. Med. 20(3), 489-494.

Goldstein R.E. 2010. Canine leptospirosis. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract*., 40(6), 1091-1101.

Gomes-Solecki M., Santecchia I., Werts C. 2017. Animal Models of Leptospirosis : Of Mice and Hamsters. *Front Immunol.* 8:58.

Gonzalez-Astudillo V., Bustamante-Rengifo J.A., Bonilla Á., Lehmicke A.J.J., Castillo A., Astudillo-Hernández M. 2015. Synanthropic Cockroaches (Blattidae: Periplaneta spp.) Harbor Pathogenic Leptospira in Colombia. *J Med Entomol*. tjv172.

Gould L.H., Pape J., Ettestad P., Griffith K.S., Mead P.S. 2008. Dog-associated risk factors for human plague. *Zoonoses Public Health*. 55(8-10), 448-454.

Graham C.B., Borchert J.N., Black W.C., Atiku L.A., Mpanga J.T., Boegler K.A., Moore S.M., Gage K.L., Eisen RJ. 2013. Blood meal identification in off-host cat fleas (Ctenocephalides felis) from a plague-endemicregion of Uganda. *Am J Trop Med Hyg*. 88(2), 381-389.

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. 1993. Detection of seven species of pathogenic lepotspires by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol*., 139(8), 1691-1700.

Greene C.E. 2013. Infectious Diseases of the Dog and Cat. *E-Book. Elsevier Health Sciences*. 1376 p.

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

Griffin K.A., Martin D.J., Rosen L.E., Sirochman M.A., Walsh D.P., Wolfe L.L., Miller M.W. 2010. Detection of *Yersinia pestis* DNA in prairie dog-associated fleas by polymerase chain reaction assay of purified DNA. *J. Wildl. Dis.* 46(2), 636-643.

Grosenbaugh D.A., Pardo M.C. 2018. Fifteen-month duration of immunity for the serovar Grippotyphosa fraction of a tetravalent canine leptospirosis vaccine. *Vet Rec.* 182(23), 665.

Guerra MA. 2009. Leptospirosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234(4), 472-478.

Guinet F., Carniel E., 2000. Situation actuelle de la peste : Epidémiologie et problèmes de résistance aux antibiotiques. *Refdoc.*, 2(2), 110-114.

Haake D.A., Walker E.M., Blanco D.R., Bolin C.A., Miller M.N., Lovett M.A. 1991. Changes in the surface of Leptospira interrogans serovar grippotyphosa during in vitro cultivation. *Infect. Immun*. 59(3), 1131-1140.

Haake DA, Matsunaga J. 2010. Leptospira: a spirochaete with a hybrid outer membrane. *Mol Microbiol*. 77(4), 805-14.

Haffkine W.M. 1906. The preventive inovulations angainst plague in the Khoja community of bombay, during the epidemic of 1897-1898. *Bulletin de l'Institut Pasteur.* 4**,** 1-16.

Halliday J.E., Knobel D.L., Allan K.J., de CBBM, Handel I., Agwanda B., Cutler S.J., Olack B., Ahmed A., Hartskeerl R.A., Njenga M.K., Cleaveland S., Breiman R.F. 2013. Urban leptospirosis in Africa: a cross-sectional survey of Leptospira infection in rodents in the Kibera urban settlement, Nairobi, Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 89: 1095-1102.

Hand M.S., Thatcher C.D., Remillard R.L. Roudebush P., Lewis L.D. 2000. Small animal clinical nutrition. 5th edition, Hardcover. 1192p.

Harkin K.R., Gartrell C.L. 1996. Canine leptospirosis in New Jersey and Michigan: 17 cases (1990-1995). *J Am Anim Hosp Assoc*. 32(6), 495-501.

Harkin K.R., Roshto Y.M., Sullivan J.T., Purvis T.J. Chengappa M.M. 2003. 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.* 222(9), 1230-1233.

Harrison R.L., Patrick M.J., Schmitt C.G. 2003. foxes, fleas, and plague in new mexico. *the southwestern Association of naturalist*. 48(4), 720-728.

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

Hartmann K., Egberink H., Pennisi M.G., Lloret A., Addie D., Belák S., Boucraut-Baralon C., Frymus T., Gruffydd-Jones T., Hosie M.J., Lutz H., Marsilio F., Möstl K., Radford A.D., Thiry E., Truyen U., Horzinek M.C. 2013. Leptospira species infection in cats : ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*. 576-581.

Hawgood B.J. 2008. Alexandre Yersin (1863-1943): discoverer of the plague bacillus, explorer and agronomist. *J Med Biogr*. 16(3), 167-172.

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

Henn J.B., Gabriel M.W., Kasten R.W., Brown R.N., Theis J.H., Foley J.E., Chomel B.B. 2007. Gray foxes (Urocyon cinereoargenteus) as a potential reservoir of a Bartonella clarridgeiae-like bacterium and domestic dogs as part of a sentinel system for surveillance of zoonotic arthropod-borne pathogens in northern California. *J. Clin. Microbiol.* 45(8), 2411-8.

Hennebelle J.H., Sykes J.E., Foley J. 2014. Risk factors associated with leptospirosis in dogs from Northern California: 2001-2010. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 14(10), 733-9.

Henry R.A., Johnson R.C. 1978. Distribution of the genus Leptospira in soil and water. *Appl. Environ. Microbiol.* 35(3), 492-499.

Himsworth, C., Bidulka J., Parsons K.L., Feng A.Y., Tang P., Jardine C.M., Kerr T., Mak S., Robinson J., Patrick D.M. 2013. Ecology of Leptospira interrogans in Norway Rats (Rattus norvegicus) in an Inner-City Neighborhood of Vancouver, Canada. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(6), 1-9.

Hinnebusch J., Schwan T.G. 1993. New method for plague surveillance using polymerase chain reaction to detect *Yersinia pestis* in fleas. *J. Clin. Microbiol.* 31(6), 1511-1514.

Hinnebusch B.J. 1997. Bubonic plague: a molecular genetic case history of the emergence of an infectious disease. *J Mol Med (Berl)*. 75(9), 645-652.

Hinnebusch B. J., Rosso M.L., Schwan T. G., Carniel E. 2002a. High-frequency conjugative transfer of antibiotic resistance genes to *Yersinia pestis* in the flea midgut. *Molecular Microbiol*ogy. 46(2), 349-354.

Hinnebusch B.J., Rudolph A.E., Cherepanov P., Dixon J.E., Schwan T.G., Forsberg A. 2002b. Role of Yersinia murine toxin in survival of Yersinia pestis in the midgut of the flea vector. *Science*. 296(5568):733-5.

Hirsh D.C., MacLachlan N.J., Walker R.L. 2004. Veterinary Microbiology. *Paperback*. 536p.

Hogan P.M., Bernard W.V., Kazakevicius P.A., Fitzgerald M.R. 1996. Acute renal disease due to Leptospira interrogans in a weaning. *Equine Vet J.* 28(4), 331-333.

Holk K., Nielsen S.V., Renne T. 2000. Human leptospirosis in Denmark 1970-1996: an epidemiological and clinical study. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 32:533-538.

Hookey J.V., Bryden J., Gatehouse L. 1993. The use of 16S rDNA sequence analysis to investigate the phylogeny of Leptospiraceae and related spirochaetes. *J Gen Microbiol*. 139(11), 2585e90.

Houhamdi L., Lepidi H., Drancourt M., Raoult D. 2006. Experimental model to evaluate human body louse as a vector of plague. *J. Infect. Dis*. 194(11), 1589-1596.

Hovind-Hougen K. 19810 Morphologie des leptospires. *Méd. Mal. Infect.* 11(2), 60-70.

Hübener EA, Reiter H. 1915. Beiträge zur Aetiologie der Weilschen Krankheit. *Dtsch Med Wochenschr.* 41, 1275-1277.

Ido Y., Hoki R., Ito H., Wani H. 1917. The rat as a carrier of Spirochaeta icterohaemorrhagiae, the causative agent of Weil's disease (Spirochaetosis icteohaemorrhagica). *J Exp Med*. 26: 341-353.

Inada R., Ido Y., Hoki R., Kaneko R. et Ito H. (1916) : The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (Spirochaetosis icterohaemorrhagica). J. Exp. Med. 23(3), p: 377-402.

Inglesby T.V., Henderson D.A., O'Toole T., Dennis D.T. 2000. Safety precautions to limit exposure from plague-infected patients. *JAMA*. 284(13), 1648-1649.

INSP : Institut National de Santé Publique. Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hôspitalière

Isa S.E., Onyedibe K.I., Okolo M.O., Abiba A.E., Mafuka J.S., Simji G.S., Nathan S.Y., Udoh U.A., Awang S.K., Egah D.Z., Banwat E.B., Newport M., Ahmed A. 2014. A 21-year-old student with fever and profound jaundice. *PLoS Negl Trop Dis*. 8(1):e2534.

Isogai E., Kitagawa H., Isogai H., Kurebayashi Y., Ito N. 1986. Phagocytosis as a defense mechanism against infection with leptospiras. *Zentbl. Bakteriol*. 261:65-74.

Isogai E., Isogai H., Kubota T., Fujii N., Hayashi S., Indoh T., Takagi S., Miura H., Kimura K. 1998. Apoptosis of lymphocytes in mice administered lipopolysaccharide from *Leptospira interrogans. Vet. Med. B.* 45, 529-537.

Jacobs J.W., Korver H., Terpstra W.J. 1986. Leptospirosis in a poultry slaughterhouse. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 130(30), 1367-9.

Jamshidi S., Akhavizadegan M., Maazi N., Ali A.G., Bokaie S. 2009. Serologic study of feline leptospirosis in Tehran. Iran J Microbiol. 1, 32-36.

Jarrett C.O., Deak E., Isherwood K.E., Oyston P.C., Fischer E.R., Whitney A.R., Kobayashi S.D., DeLeo F.R., Hinnebusch B.J. 2004. Transmission of Yersinia pestis from an infectious biofilm in the flea vector. *J Infect Dis*. 190(4), 783-92.

Johnson R.C., Rogers P. 1964. 5-Fluorouracil as a selective agent for growth of Leptospirae. *J. Bacteriol*. 87, 422-426.

Johnson R.C. Harris V.G. 1967. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. *J. Bacteriol*. 94(1), 27-31.

Joshi K., Thakur J.S., Kumar R., Singh A.J., Ray P., Jain S., Varma S. 2009. Epidemiological features of pneumonic plague outbreak in Himachal Pradesh. *India. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103(5), 455-460.

Juvet F., Schuller S., O'Neill E.J., O'Neill P.A., Nally J.E. 2011. Urinary shedding of spirochaetes in a dog with acute leptospirosis despite treatment. *Vet. Rec.* 168(21), 564.

Kadlec R.P., Zelicoff A.P., Vrtis A.M. 1997. Biological weapons control.Prospects and implications for the future. *JAMA*. 278, 351–356.

Kalin M., Devaux C., DiFruscia R., Lemay S., Higgins R. 1999. Three cases of canine leptospirosis in Quebec. *Can Vet J*. 40(3), 187-91.

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. 2007. Relationship between genome similarity and DNA-DNA hybridization among closely related bacteria. *J Microbiol Biotechnol*. 17(6), 945-51.

Kaoneka A.R.S., Solberg B. 1994. Forestry-related land use in the West Usambara mountains, Tanzania. *Agric. Ecosyst. Environ.* 49(2), 207-215.

Kassem A.M., Tengelsen L., Atkins B., Link K., Taylor M., Peterson E., Machado A., Carter K., Hutton S., Turner K., Hahn C. 2016. Notes from the Field: Plague in Domestic Cats - Idaho, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 65(48), 1378-1379.

Katz A.R. 2012. Quantitative Polymerase Chain Reaction: Filling the gap for Early Leptospirosis Diagnisis. *Clin Infect dis*. 54 (9), 1256-1258.

Kaufmann A.F., Mann J.M., Gardiner T.M., Heaton F., Poland J.D., Barnes A.M., Maupin G.O. 1981. Public health implications of plague in domestic cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179(9), 875-878.

Khan I.A. 2004. Plague: the dreadful visitation occupying the human mind for centuries. *Transaction of the royal society of tropical medicine and hygiene*. 98(5), 207-227.

Kilonzo B.S., Makundi R.H., Mbise T.J. 1992. A decade of plague epidemiology and control in the western Usambara mountains, north-east Tanzania. *Acta. Trop.*, 50(4), 323-329.

Kilonzo B.S., Gisakanyi N.D., Sabuni C.A. 1993. Involvement of dogs in plague epidemiology in Tanzania. Serological observations in domestic animals in Lushoto District. *Scand. J. Infect. Dis*. 25(4), 503-506.

Kilonzo B.S., Mbise T.J., Mwalimu D.C., Kindamba L. 2006. Observations on the endemicity of plague in Karatu and Ngorongoro, northern Tanzania. *Tanzan. Health. Res. Bull.* 28(1), 1-6.

Kingscote B.F. 1985. Leptospirosis in livestock. *Can Vet J*. 26(8), 235-236.

Klaasen H.L., Molkenboer M.J., Vrijenhoek M.P., Kaashoek M.J. 2003. Duration of immunity in dogs vaccinated against leptospirosis with a bivalent inactivated vaccine. *Vet Microbiol*. 95(1-2), 121-32.

Klaasen H.L., van der Veen M., Molkenboer M.J., Sutton D. 2013. A Novel Tetravalent Leptospira Bacterin Protects against Infection and Shedding Following Challenge in Dogs. *Vet Rec*. 172(7), 181.

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

Klopfleisch R., Kohn B., Plog S., Weingart C., Nöckler K., Mayer-Scholl A., Gruber A.D. 2010. An emerging pulmonary haemorrhagic syndrome in dogs : similar to the human leptospiral pulmonary haemorrhagic syndrome. *Vet Med Int. Hindawi Limited*. 928541.

Knöpfler S., Mayer-Scholl A., Luge E., Klopfleisch R., Gruber A.D., Nöckler K., Kohn B. 2017. Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis. *J Small Anim Pract*. 58(10):582-588.

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

Kobayashi Y. 2001. Discovery of the causative organism of Weil's disease: historical view. *Journal of infection and chemotherapy*. 7(1), 10-15.

Kohn, B., Steinicke K., Arndt G., Gruber A.D., Guerra B., Jansen A., Kaser-Hotz B., Klopfleisch R., Lotz F., Luge E., Nöckler K. 2010. Pulmonary Abnormalities in Dogs with Leptospirosis. *J Vet Intern Med.* 24(6), 1277-1282.

Kositanont U., Rugsasuk S., Leelaporn A., Phulsuksombati D., Tantitanawat S., Naigowit P. 2007. Detection and differentiation between pathogenic and saprophytic Leptospira spp. by multiplex polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 57(2), 117-122.

Kosossey Vrain C. 2004. La leptospirose canine : Revue bibliographique. Thèse pour le doctorat vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. 135p.

Koutinas A.F., Papazahariadou M.G., Rallis T.S., Tzivara N.H., Himonas C.A. 1995. Flea species from dogs and cats in northern Greece: environmental and clinical implications. *Vet. Parasitol.* 58(1-2), 109-115.

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

Kukkonen M., Lähteenmäki K., Suomalainen M., Kalkkinen N., Emödy L., Lång H., Korhonen T.K. 2001. Protein regions important for plasminogen activation and inactivation of alpha2-antiplasmin in the surface protease Pla of Yersinia pestis. *Mol. Microbiol*. 40(5), 1097-1111.

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

Lamrani Alaoui G. 2008. La leptospirose ictero-hemorragique (a propos de 69 cas). These, Université sidi mohammed Ben Abdellah, faculte de medecine et de pharmacie Fes, 156p.

Landouzy M. 1883. Typhus hépatique. La Gazette des Hôpitaux civils et militaries, 115(56), 913-914.

Langston C.E., Heuter K.J., 2003. Leptospirosis. A re-emerging zoonotic disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 33(4), 791-807.

Larsson C.E., Santa Rosa C.A., Hagiwara M.K., Paim G.V., Guerra J.L. 1984. Prevalence of feline leptospirosis: serologic survey and attempts of isolation and demonstration of the agent. *Int. J. Zoonoses*. 11(2), 161-169.

Larsson C.E., Santa Rosa C.A., Larrson M.H. Birgel E.H., Fernandes W.R., Paim G.V. 1985. Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis. *Int J Zoonoses*. 12(2), 111-119.

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

Lee SH, Kim KA, Park YG, Seong IW, Kim MJ, Lee Y.J. 2000. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from Leptospira interrogans serovar lai. *Gene*. 254(1-2), 19-28.

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

Legrand E. 2007. La leptospirose bovine. Thèse pour le doctorat vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort. 135p.

Leighton F.A., Artsob H.A., Chu M.C., Olson J.G. 2001. A serological survey of rural dogs and cats on the southwestern Canadian prairie for zoonotic pathogens. *Can. J. Public. Health.* 92(1), 67-71.

Lepoivre P. 2003. Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. *De Boeck Supérieur*. 224: 432p.

Leslie T., Whitehouse C.A., Yingst S., Baldwin C., Kakar F., Mofleh J., Hami A.S., Mustafa L., Omar F., Ayazi E., Rossi C., Noormal B., Ziar N., Kakar R. 2011. Outbreak of gastroenteritis caused by Yersinia pestis in Afghanistan. *Epidemiol Infect*. 139(5), 728-735.

Leulmi H., Socolovschi C., Laudisoit A., Houemenou G., Davoust B., Bitam I., Raoult D., Parola P. 2014. Detection of Rickettsia felis, Rickettsia typhi, Bartonella Species and Yersinia pestis in Fleas (Siphonaptera) from Africa. PLoS Negl Trop Dis. 8(10), e3152.

Levett P.N. 2001. Leptospirosis. *Cinical Microbiology Reviews*. 14(2), 296-326.

Levett P.N. 2004. Leptospirosis: A forgotten zoonosis? *Clinical and Applied Immunology Reviews*. 4(6), 435-448.

Levett P.N., Morey R.E., Galloway R., Steigerwalt A.G., Ellis W.A. 2005. Reclassification of Leptospira parva Hovind-Hougen et al. 1982 as Turneriella parva gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 55(Pt 4), 1497-1499.

Levett P.N., Morey R.E., Galloway R.L., Turner D.E., Steigerwalt A.G., Mayer L.W. 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. *J Med Microbiol*. 54:45-49.

Levy C.E., Gage K.L. 1999. Plague in the United States 1995-1996. *Infect. Med.* 16, 54-64.

Li B., Guo Y., Guo Z., Liang Y., Zhu Z., Zhou Q., Yan Y., Song Z., Yang R. 2008. Serologic survey of the sentinel animals for plague surveillance and screening for complementary diagnostic markers to F1 antigen by protein microarray. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79(5), 799-802.

Li Y.F., Li D.B., Shao H.S., Li H.J., Han Y.D. 2016. Pague in China 2014-All sporadic case report of pneumonic plague. *BMC Infect Dis*. 16, 85.

Lilenbaum, W., Ribeiro V., Martin E., Bispo V. 1993. Serologic study for detecting anti-Leptospira antibodies in Rattus norvegicus from Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Latinoam Microbiol*, 35(4), 357-380.

Lilenbaum W., Souza G.N. 2003. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro. Brazil. *Res. Vet. Sci*. 75(3), 249-251.

Lilenbaum W., Monteiro R.V., Albuquerque C.E., Ristow P., Fraguas S., Cardoso V.S., Fedullo L.P. 2004. Leptospiral antibodies in wild felines from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *Vet. J.* 168(2), 191-193.

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

Llewellyn J.R., Krupka-Dyachenko I., Rettinger A.L., Dyachenko V., Stamm I., Kopp P.A., Straubinger R.K., Hartmann K. 2016. Urinary shedding of leptospires and presence of Leptospira antibodies in healthy dogs from Upper Bavaria. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 129(5-6), 251-7.

Lounici M., Lazri M., Rahal K. 2005. Plague in Algeria: about five strains of *Yersinia pestis* isolated during the outbreak of June 2003. *Pathol, Biol*. 53(1), 15-18.

Malek M.A., Hammani A., Beneldjouzi A., Bitam I. 2015. Enzootic plague foci, Algeria. *New Microbes New Infect*. 4, 13-16.

Malek M.A., Bitam I., Levasseur A., Terras J., Gaudart J., Azza S., Flaudrops C., Robert C., Raoult D., Drancourt M. 2017. Yersinia pestis halotolerance illuminates plague reservoirs. *Sci Rep*. 7:40022.

Mani I., Maguire J.H. 2009. Small animal zoonoses and immuncompromised pet owners. *Top Companion Anim Med*. 24(4), 164-174.

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

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

Mastrorilli C., Dondi F., Agnoli C., Turba M.E., Vezzali E., Gentilini F. 2007. Clinicopathologic features and outcome predictors of Leptospira Interrogans Australis serogroupinfection in dogs: a retrospective study of 20 cases (2001-2004). *J Vet Intern Med*. 21(1), 3-10.

Mathison B.A., Pritt B.S. 2014. Laboratory identification of arthropod ectoparasites. *Clin Microbiol Rev*. 27(1), 48-67.

Mayer-Scholl A., Draeger A., Luge E., Ulrich R. Nöckler K. 2011. Comparison of two PCR systems for the rapid detection of Leptospira spp. from kidney tissue. *Curr. Microbiol*., 62(4), 1104-1106.

Mayr B. 1993. Pets as permanent excretors of zoonoses pathogens. *Zentralbl Hyg Umweltmed*. 194(1-2), 214-222.

McElroy K.M., Blagburn B.L., Breitschwerdt E.B., Mead P.S., McQuiston J.H. 2010. Flea-associated zoonotic diseases of cats in the USA: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague. *Trends in Parasitology*. 26(4), 197-204.

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

McIntyre W.I.M., Montgomery G.L. 1952. Renal lesions in Leptospira canicola infections in dogs. *J. Pathol. Bacteriol.* 64(1), 145-160.

Mediannikov O., Fenollar F., Socolovschi C., Diatta G., Bassene H., Molez J.F., Sokhna C., Trape J.F., Raoult D. 2010. Coxiella burnetii in humans and ticks in rural Senegal. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(4):e654.

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

Merien F., Amouriaux P., Perolat P., Baranton G., Saint Girons I. 1992. Polymerase Chain Reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples. *J Clin Microbiol*, 30(9), 2219-2224.

Merien F., Baranton G., Perolat P. 1995. Comparaison of Polymerase Chain Reaction with Microagglutination Test and Culture for diagnosis of leptospirosis. *J. Infect. Dis*. 172(2), 281-285.

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

Merien F., Portnoi D., Bourhy P., Charavay F., Berlioz-Athaud A., Baranton G. 2005. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett*. 249(1), 139-147.

Messick J.P., Smith G.W., Barnes A.M. 1983. Serologic testing of badgers to monitor plague in southwestern Idaho. *J. Wildl. Dis.* 19(1), 1-6.

Mgode G.F., Mhamphi G.G., Katkweba A.S., Thomas M. 2014. Leptospira infections in freshwater fish in Morogoro Tanzania: a hidden public health threat. *Tanzan J Health Res*. 16(2), 112-7.

Mgode G.F., Machang'u R.S., Mhamphi G.G., Katakweba A., Mulungu L.S., Durnez L., Leirs H., Hartskeerl R.A., Belmain S.R. 2015. Leptospira Serovars for Diagnosis of Leptospirosis in Humans and Animals in Africa: Common Leptospira Isolates and Reservoir Hosts. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(12), e0004251.

Miarinjara A., Vergain J., Kavaruganda J.M., Rajerison M, Boyer S. 2017. Plague risk in vulnerable community: assessment of Xenopsylla cheopis susceptibility to insecticides in Malagasy prisons. *Infect Dis Poverty*. 6(1), 141.

Michel V., Ruvoen-Clouet N., Menard A., Sonrier C., Fillonneau C., Rakotovao F., Ganiere JP., André-Fontaine G. 2001. Role of the coypu (Myocastor coypus) in the epidemiology of leptospirosis in domestic animals and humans in France. *Eur.J.Epidemiol*. 17(2), 111-121.

Migliani R., Ratsitorahina M., Rahalison L., Rakotoarivony I., Duchemin J.B., Duplantier J.M., Rakotonomenjanahary J., Chanteau S. 2001. Resurgence of the plague in the Ikongo district of Madagascar in 1998. 1. Epidemiological aspects in the human population. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 94(2), 115-118.

Millaán J., Candela M.G., Loápez-Bao J.V., Pereira M., Jime á nez M.A., Leoán-Vizcaõáno L. 2009. Leptospirosis in wild and domestic carnivores in natural areas in Andalusia, Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 9(5), 549-554.

Miller J., Broad W.J, Engelberg S. 2012. Germs: Biological Weapons and America's Secret War. *Simon and Schuster*. 416p.

Minke J.M., Bey R., Tronel J.P., Latour S., Colombet G., Yvorel J., Cariou C., Guiot A.L., Cozette V., Guigal P.M. 2009. Onset and duration of protective immunity against clinical disease and renal carriage in dogs provided by a bi-valent inactived leptospirosis vaccine. *Vet Microbiol*. 137(1-2), 137-45.

Miotto B.A., da Hora A.S., Taniwaki S.A., Brandão P.E., Heinemann M.B., Hagiwara M.K. 2017. Development and validation of a modified TaqMan based real-time PCR assay targeting the lipl32 gene for detection of pathogenic Leptospira in canine urine samples. Braz J Microbiol. 49(3), 584-590.

Miyahara S., Saito M., Kanemaru T., Villanueva S.Y., Gloriani N.G., Yoshida S. 2014. Destruction of the hepatocyte junction by intercellular invasion of Leptospira causes jaundice in a hamster model of Weil's disease. *Int J Exp Pathol*. 95(4), 271-81.

Moch R.W., Ebner E.E., Barsoum L.S., Botros B.A. 1975. Leptospirosis in Ethiopia: a serological survey in domestic and wild animals. *J Trop Med Hyg.* 78(2), 38-42.

Morey R.E., Galloway R.L., Bragg S.L., Steigerwalt A.G., Mayer L.W., Levett PN. 2006. Species-specific identification of Leptospiraceae by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol*. 44(10), 3510-6.

Morgan J., Bornstein S.L., Karpati A.M., Bruce M., Bolin C.A., Austin C.C., Woods C.W., Lingappa J., Langkop C., Davis B., Graham D.R., Proctor M., Ashford D.A., Bajani M., Bragg S.L., Shutt K., Perkins B.A., Tappero J.W. 2002. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis*. 34:1593-1599.

Morse S.S. 2014. Public Health Disease Surveillance Networks. *Microbiol Spectr*. 2(1), OH-0002-2012.

Movilla R., Altet L., Serrano L., Tabar M. D., Roura X. 2017. Molecular detection of vector-borne pathogens in blood and splenic samples from dogs with splenic disease. *Parasit. Vectors.* 10(1), 131.

Muller A., Gau C., Chetboul V., André-Fontaine G. 1999. A case of cholangio-hepatitis associated with leptospirosis in a dog. *Rec. Méd. Vét*. 175 (1/2), 63-68.

Muñoz-Zanzi C., Mason M.R., Encina C., Astroza A., Romero A. 2014. Leptospira contamination in household and environmental water in rural communities in southern Chile. *Int J Environ Res Public Health*. 11(7), 6666–80.

Murray G.L., Srikram A., Henry R., Hartskeerl R.A., Sermswan R.W., Adler B. 2010. Mutations affecting Leptospira interrogans lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol Microbiol*. 78(3), 701-9.

Musso D, La Scola B. 2013. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. *J Microbiol Immunol Infect*. 46(4), 245-252.

Mwengee W., Butler T., Mgema S., Mhina G., Almasi Y., Bradley C., Formanik J.B., Rochester C.G. 2006. Treatment of plague with gentamicin or doxycycline in a randomized clinical trial in Tanzania. *Clin Infect Dis*. 42(5), 614-621.

Myburgh J.G., Posnett S.J. Lawrence J.V. 1993. Serological survey for canine leptospirosis in the Pretoria Area. *South African Veterinarian Association*. 64(1), 37-38.

Mylonakis M.E., Bourtzi-Hatzopoulou E., Koutinas A.F., Petridou E., Saridomichelakis M.N., Leontides L., Siochu A. 2005. Leptospiral seroepidemiology in a feline hospital population in Greece. Vet Rec. 156(19), 615-616.

Neerinckx S., Bertherat E., Leirs H. 2010. Human plague occurrences in Africa: an overview from 1877 to 2008. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 104(2), 97-103.

Nelson A.M., Horsburgh C.R.1998. Pathology of Emerging Infections 2. *ASM Press*. 393 p.

Ngulube T.J., Mwanza K., Njobvu C.A., Muula A.S. 2006. Knowledge, attitudes and public health response towards plague in Petauke. *Zambia. Trop Doct.* 36(4), 223-225.

Nichols M.C., Ettestad P.J., Vinhatton E.S., Melman S.D., Onischuk L., Pierce E.A., Aragon A.S. 2014. Yersinia pestis infection in dogs: 62 cases (2003-2011). *J Am Vet Med Assoc*. 244(10), 1176-1180.

Nyirenda S.S., Hang'ombe B.M., Mulenga E., Kilonzo B.S. 2017a. Serological and PCR investigation of Yersinia pestis in potential reservoir hosts from a plague outbreak focus in Zambia. *BMC Res Notes*. 10(1), 345.

Nyirenda S.S., Hang'ombe B.M., Kilonzo B.S., Kangwa H.L., Mulenga E., Moonga L. 2017b. Potential Roles of Pigs, Small Ruminants, Rodents, and Their Flea Vectors in Plague Epidemiology in Sinda District, Eastern Zambia. *J Med Entomol*. 54(3), 719-725.

Oliveira S.T., Messick J.B., Welker Biondo A., Pires A., Santos D., Stedile R., Dalmolin M.L., de Sá Guimaraes A.M. , Sidi Mohamed A., Riediger I.N., Diaz González F.H. 2012a. Exposure to Leptospira spp. in Sick Dogs, Shelter Dogs and Dogs from an Endemic Area: Points to Consider. *Acta Sci Vet*. 40(403), 1056-1056.

Oliveira T.V., Marinho D.P., Costa Neto C., Kligerman D.C. 2012b. 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*. 17(6), 1569-1576.

Orloski K.A., Eidson M. 1995. *Yersinia pestis* infection in three dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 207(3), 316-318.

Orloski K.A., Lathrop S.L. 2003. Plague: a veterinary perspective. *J Am Vet Med Assoc*. 222(4), 444-448.

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. 2005. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. *Mol Cell Probes*. 19(2), 111-117.

Pappas G., Papadimitriou P., Siozopoulou V., Christou L., Akritidis N. 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *International Journal of Infectious Diseases*. 12, 351–357.

Parija S.C. 2009. Textbook of Microbiology & Immunology. *Elsevier India*. 700 p.

Parkhill J., Wren B.W., Thomson N.R., Titball R.W., Holden M.T., Prentice M.B., Sebaihia M., James K.D., Churcher C., Mungall K.L., Baker S., Basham D., Bentley S.D., Brooks K., Cerdeño-Tárraga A.M., Chillingworth T., Cronin A., Davies R.M., Davis P., Dougan G., Feltwell T., Hamlin N., Holroyd S., Jagels K., Karlyshev A.V., Leather S., Moule S., Oyston P.C., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., Barrell BG. 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature*. 413(6855), 523-527.

Pate G.E., Hogan M.C., FitzSimon N., Mellotte G.J. 2000. A review of the epidemiology of leptospirosis in the Republic of Ireland. *Irish Medical Journal*. 93, 114-117.

Patel T.B., Bhatia S.C., Deobhanker R.B. 1960. A confirmed case of DDT-resistance in *Xenopsylla cheopis* in India. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé.* 23, 301-312.

Pawlowski D.R., Metzger D.J., Raslawsky A., Howlett A., Siebert G., Karalus R.J., Garrett S., Whitehouse C.A. 2011. Entry of Yersinia pestis into the viable but nonculturable state in a low-temperature tap watermicrocosm. *PLoS One*. 6(3), e17585.

Pearson J.K., Mackie D.P., Ellis W.A. 1980. Milk drop syndrome resulting from Leptospira hardjo. *Vet. Rec*. 106(6), 135-136.

Pennisi M.G., Egberink H., Hartmann K., Lloret A., Addie D., Belák S., Boucraut-Baralon C., Frymus T., Gruffydd-Jones T., Hosie M.J., Lutz H., Marsilio F., Möstl K., Radford A.D., Thiry E., Truyen U., Horzinek M.C. 2013. Yersinia pestis infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*. 15(7), 582-584.

Perolat P., Lecuyer I., Postic D., Baranton G. 1993. Diversity of ribosomal DNA fingerprints of Leptospira serovars provides a database for subtyping and species assignation. *Res. Microbiol*. 144(1), 5-15.

Perolat P., Merien F., Ellis W.A., Baranton G. 1994. Characterization of Leptospira isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms. *J Clin Microbiol*, 32(8), 1949-57.

Perry R.D., Fetherston J.D. 1997. *Yersinia pestis* - Etiologic Agent of Plague. *Clinical microbiology reviews*. 10(1), 35-66.

Peterson J.W. 1996. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX), University of Texas Medical Branch at Galveston; Chapter 7, Bacterial Pathogenesis. PMID: 21413346

Picardeau M., Bulach D.M., Bouchier C., Zuerner R.L., Zidane N., Wilson P.J., Creno S., Kuczek E.S., Bommezzadri S., Davis J.C., McGrath A., Johnson M.J., Boursaux-Eude C., Seemann T., Rouy Z., Coppel R.L., Rood J.I., Lajus A., Davies J.K., Médigue C., Adler B. 2008. Genome sequence of the saprophyte Leptospira biflexa provides insights into the evolution of Leptospira and the pathogenesis of leptospirosis. *PLoS ONE*. 3, e1607.

Picardeau M. 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*. 43(1), 1-9.

Pinne M1, Haake D. 2011. Immuno-fluorescence assay of leptospiral surface-exposed proteins. *J Vis Exp.* (53). pii: 2805.

Pollitzer R. 1954. La Peste : Monographie Organisation mondiale de la santé, Genève, 737 p. http://www.who.int/iris/handle/10665/41069.

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. 1993. Leptospirosis in equine fetuses, stillborn foals, and placentas. *Vet Pathol*. 30(4), 362-369.

Postic D. 2000. Diagnostic biologique leptospirose-borreliose de lyme. *Institut Pasteur*. 248p.

Pourcel C., Andre-Mazeaud F., Neubauer H., Ramisse F., Vergnaud G. 2004. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol*. 4, 22.

Prentice M.B., Rahalison L. 2007. Plague. *Lancet*. 369(9568), 1196-1207.

Prescott J. 2008. Canine leptospirosis in Canada: a veterinarian's perspective. *Can Med Assoc J.* 178(4), 397-398.

Prescott J. 2011. Urinary shedding of spirochaetes in a dog with acute leptospirosis despite treatment. *Vet. Rec*. 169(7), 187-188.

Rabiee M.H., Mahmoudi A., Siahsarvie R., Kryštufek B., Mostafavi E. 2018. Rodent-borne diseases and their public health importance in Iran. *PLoS Negl Trop Dis*. 12(4), e0006256.

Raetz C.R.H, Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 71, 635-700.

Rajerison M., Dartevelle S., Ralafiarisoa LA., Bitam I., Tuyet DTN., Andrianaivoarimanana V., Nato F., Rahalison L. 2009. Development and Evaluation of Two Simple, Rapid Immunochromatographic Tests for the Detection of *Yersinia pestis* Antibodies in Humans and Reservoirs. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 3(4), e421.

Ramalingaswami V. 1995. Plague in India. *Nat. Med.* 1(12), 1237-1239.

Ramos A.C., Souza G.N., Lilenbaum W. 2006. Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil. *Theriogenology*. 66(4), 1021-1025.

Raoult D. 1998. Dictionnaire de maladies infectieuses: diagnostic, épidémiologie, répartition géographique, taxonomie, symptomatologie. *Elsevier Masson*. 1162 p.

Raoult D., Mouffok N., Bitam I., Piarroux R., Drancourt M. 2013. Plague: history and contemporary analysis. *J Infect*. 66(1), 18-26.

Rasoamanana B., Rahalison L., Raharimanana C., Chanteau S. 1996. Comparison of Yersinia CIN agar and mouse inoculation assay for the diagnosis of plague. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 90(6), 651.

Rathinam S.R. 2005. Ocular manifestations of leptospirosis. *J. Postgrad. Med*. 51(3), 189-194.

Ratnam S. 1994. Leptospirosis : an Indian perspective. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 12, 228-239.

Ratovonjato J., Duchemin J.B., Duplantier J.M., Chanteau S. 2000. *Xenopsylla cheopis* (*Siphonaptera* : Xenopsyllinae), puces des foyers ruraux de peste des Hautes Terres malgaches : niveau de sensibilité au DDT, aux pyréthrinoïdes et aux carbamates après 50 années de lutte chimique. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*. 66 (1-2), 9-12.

Ratsitorahina M., Chanteau S., Rahalison L., Ratsifasoamanana L., Boisier P. 2000. Epidemiological and diagnostic aspects of the outbreak of pneumonic plague in Madagascar. *Lancet*. 355(9198):111-113.

Ren S.X., Fu G., Jiang X.G., Zeng R., Miao Y.G., Xu H., Zhang Y.X., Xiong H., Lu G., Lu L.F., Jiang H.Q., Jia J., Tu Y.F., Jiang J.X., Gu W.Y., Zhang Y.Q., Cai Z., Sheng H.H., Yin H.F., Zhang Y., Zhu G.F., Wan M., Huang H.L., Qian Z., Wang S.Y., Ma W., Yao Z.J., Shen Y., Qiang B.Q., Xia Q.C., Guo X.K., Danchin A., Saint Girons I., Somerville R.L., Wen Y.M., Shi M.H., Chen Z., Xu J.G. et Zhao G.P. 2003. Unique physiological and pathogenic features of Leptospira interrogans revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 422(6934), 888-893.

Renaud C., Andrews S., Djelouadji Z., Lecheval S., Corrao-Revol N., Buff S., Demont P., Kodjo A. 2013. Prevalence of the Leptospira serovars bratislava, grippotyphosa, mozdok and pomona in French dogs. *Vet J.* 196 (1), 126-127.

Renesto P., Lorvellec-Guillon K., Drancourt M., Raoult D. 2000. rpoB gene analysis as a novel strategy for identification of spirochetes from the genera Borrelia, Treponema, and Leptospira. *J Clin Microbiol*. 38(6), 2200e3.

Rentko V.T., Clark N., Ross L.A., Schelling S.H. 1992. Canine leptospirosis. A retrospective study of 17 cases. *J. Vet. Int. Med*. 6(4), 235-244.

Richardson D.J., Gauthier J.L. 2003. Gauthier, A serosurvey of leptospirosis in Connecticut peridomestic wildlife. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 3(4), 187-93.

Riedel S. 2005. Plague: from natural disease to bioterrorism. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 18(2), 116-124.

Riehm J.M., Rahalison L., Scholz H.C., Thoma B., Pfeffer M., Razanakoto L.M., Al Dahouk S., Neubauer H., Tomaso H. 2011. Detection of *Yersinia pestis* using real-time PCR in patients with suspected bubonic plague. *Mo.l Cell. Probes.* 25(1), 8-12.

Ristow P. 2007. La leptospirose: les défis actuels d'une ancienne maladie. *Bull. Acad. Vét*. 160(4), 276-278.

Roach J.M., van Vuuren M., Picard J.A. 2010. A serological survey of antibodies to Leptospira species in dogs in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 81(3), 156-159.

Rodriguez J., Blais M.C., Lapointe C., Arsenault J., Carioto L., Harel J. 2014. Serologic and urinary PCR survey of leptospirosis in healthy cats and in cats with kidney disease. *J Vet Intern Med*. 28(2), 284-293.

Roehl K., Jankowski M., Hofmeister E. 2016. Antidog igg secondary antibody successfully detects igg in a variety of aquatic mammals. *J Zoo Wildl Med*. 47(4), 970-976.

Rojas P., Monahan A.M., Schuller S., Miller I.S., Markey B.K., Nally J.E. 2010. Detection and quantification of leptospires in urine of dogs: a maintenance host for the zoonotic disease leptospirosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29(10), 1305-1309.

Roqueplo C., Marié J.L., André-Fontaine G., Kodjo A., Davoust B. 2015. Serological survey of canine leptospirosis in three countries of tropical Africa: Sudan, Gabon and Ivory Coast. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 38, 57-61.

Ruiz A. 2001. Plague in the Americas. *Emerg. Infect. Dis*. 7(3), 539-540.

Runfola J.K., House J., Miller L., Colton L., Hite D., Hawley A., Mead P., Schriefer M., Petersen J., Casaceli C., Erlandson K.M., Foster C., Pabilonia K.L., Mason G., Douglas J.M. 2015. Outbreak of Human Pneumonic Plague with Dog-to-Human and Possible Human-toHumanTransmission-Colorado, June-July 2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 64(16), 429-434.

Rust J.H., Miller B.E., Bahmanyar M., Marshall J.D., Purnaveja S., Cavanaugh D.C., Hla U.S. 1971a The role of domestic animals in the epidemiology of plague. II. Antibody to Yersinia pestis in seraof dogs and cats. *J Infect Dis*. 124(5), 527-531.

Rust J.H., Cavanaugh D.C., O'Shita R., Marshall J.D. 1971b. The role of domestic animals in the epidemiology of plague. I. Experimental infection of dogs and cats. *J. Infect. Dis.* 124(5), 522-526.

Ryu E. 1976. An international survey of leptospiral agglutinin of dogs by RMAT. *Int J. Zoonoses*. 3(1), 33-60.

Saavedra Rda C., Dias J.P. 2011. *Yersinia pestis* infection in the State of Bahia: effective control or epidemiological silence?. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44(2), 223-227.

Saengjaruk P., Chaicumpa W., Watt G., Bunyaraksyotin G., Wuthiekanun V., Tapchaisri P., Sittinont C., Panaphut T., Tomanakan K., Sakolvaree Y., Chongsa-Nguan M., Mahakunkijcharoen Y., Kalambaheti T., Naigowit P., Wambangco M.A., Kurazono H., Hayashi H. 2002. Diagnosis of Human Leptospirosis by Monoclonal Antibody-Based Antigen Detection in Urine. *J. Clin. Microbiol.* 40(2), 480-489.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.

Saito M., Villanueva S.Y., Kawamura Y., Iida K., Tomida J., Kanemaru T., Kohno E., Miyahara S., Umeda A., Amako K., Gloriani N.G., Yoshida S. 2013. Leptospira idonii sp. nov., isolated from environmental water. *Int J Syst Evol Microbiol*. 63(Pt 7), 2457-2462.

Salkeld D.J., Stapp P. 2006. Seroprevalence rates and transmission of plague (*Yersinia pestis*) in mammalian carnivores. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 6(3), 231-239.

Salkeld D.J., Salathé M., Stapp P., Jones J.H. 2010. Plague outbreaks in prairie dog populations explained by percolation thresholds of alternate host abundance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107(32), 14247-14250.

Samir A., Soliman R., El-Hariri M., Abdel-Moein K., Hatem M.E. 2015. Leptospirosis in animals and human contacts in Egypt: broad range surveillance. *Rev Soc Bras Med Trop.* 48(3), 272-277.

Sant'anna R., Vieira A.S., Grapiglia J., Lilenbaum W. 2017. High number of asymptomatic dogs as leptospiral carriers in an endemic area indicates a serious public health concern. Epidemiol Infect. 145(9), 1852-1854.

Sarovich D.S., Colman R.E., Price E.P., Chung W.K., Lee J., Schupp J.M., Cobble K.R., Busch J.D., Alexander J., Keim P., Wagner D.M. 2010. Selective isolation of Yersinia pestis from plague-infected fleas. *J Microbiol Methods*. 82(1), 95-97.

Scanziani E., Origgi F., Giusti A.M., Iacchia G., Vasino A., Pirovano G., Scarpa P., Tagliabue S. 2002. Serological survey of leptospiral infection in kennelled dogs in Italy. J. Small. Anim. Pract. 43(4), 154-157.

Schaechter M., Medoff G., Eisenstein B.I. 1999. Microbiologie et pathologie infectieuse. *De Boeck Supérieur*. p:1000.

Schotthoefer A.M., Bearden S.W., Vetter S.M., Holmes J., Montenieri J.A., Graham C.B., Woods M.E., Eisen R.J., Gage K.L. 2011. Effects of temperature on early-phase transmission of Yersina pestis by the flea, Xenopsyllacheopis. *J Med Entomol*. 48(2), 411-417.

Schreiber P., Martin V., Najbar W., Sanquer A., Gueguen S., Lebreux B. 2005. Prevention of renal infection and urinary shedding in dogs by a Leptospira vaccination. *Vet Microbiol.* 108(1-2), 113-118.

Schreiber P., Martin V., Grousson D., Sanquer A., Gueguen S., Lebreux B. 2012. One-Year Duration of Immunity in Dogs for Leptospira Interrogans Serovar Icterohaemorrhagiae after Vaccination. *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 10(4), 305-310.

Schuller S., Francey T., Hartmann K., Hugonnard M., Kohn B., Nally J.E., Sykes J. 2015. "European Consensus Statement on Leptospirosis in Dogs and Cats." The Journal of Small Animal Practice 56(3), 159-179.

Sebbane F., Jarrett C.O., Gardner D., Long D. Hinnebusch B.J. 2006. Role of the Yersinia pestis plasminogen activator in role in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103(14), 5526-5530.

Seguro, A.C., Andrade L. 2013. Pathophysiology of Leptospirosis. *Shock*. 39(1), 17-23.

Seifert L., Harbeck M., Thomas A., Hoke N., Zöller L., Wiechmann I., Grupe G., Scholz H.C., Riehm J.M. 2013. Strategy for sensitive and specific detection of Yersinia pestis in skeletons of the black deathpandemic. *PLoS One*. 8(9), e75742.

Sessions J.K., Greene C.E. 2004. Canine Leptospirosis: Epidemiology, pathogenesis, and diagnosis. *Compendium*. 606-617.

Sharma K.K., Kalawat U. 2008. Early diagnosis of leptospirosis by conventional methods: one-year prospective study. *Indian J Pathol Microbiol*. 51(2), 209-211.

Shepherd A.J., Hummitzsch D.E., Leman P.A., Hartwig E.K. 1983. Studies on plague in the eastern Cape Province of South Africa. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77(6), 800-808.

Shivaji S., Bhanu N.V., Aggarwal R.K. 2000. Identification of *Yersinia pestis* as the causative organism of plague in India as determined by 16S rDNA sequencing and RAPD-based genomic fingerprinting. *FEMS Microbiol Lett*. 189(2), 247-252.

Shophetr 1979. Feline Leptospiral Infection : with particular emphasis on leptospira interrogans serovar ballum. Thesis for the degree of Master of Philosophy in Veterinary Pathology and Public Health at Massey University.

Shropshire S.B., Veir J.K., Morris A.K., Lappin M.R. 2016. Evaluation of the Leptospira species microscopic agglutination test in experimentally vaccinated cats and Leptospira species seropositivity in aged azotemic client-owned cats. *J Feline Med Surg*. 18(10), 768-72.

Shyamal B., Ravi Kumar R., Sohan L., Balakrishnan N., Veena M., Shiv L. 2008. Present susceptibility status of rat flea Xenopsylla cheopis (Siphonaptera: Pulicidae), vector of plague against organochlorine, organophosphate and synthetic pyrethroids 1. The Nilgiris District, Tamil Nadu, India. *J Commun Dis*. 40(1), 41-45.

Simond P. 1898. La propagation de la peste. *Annales de l'Institut Pasteur.* 10, 625-687.

Slack A.T., Symonds M.L., Dohnt M.F., Smythe L.D. 2006. Identification of pathogenic Leptospira species by conventional or real-time PCR and sequencing of the DNA gyrase subunit B encoding gene. *BMC Microbiol*. 6:95.

Smythe L.D., Smith I.L., Smith G.A., Dohnt M.F., Symonds M.L., Barnett L.J., McKay D.B. 2002. A quantitative PCR (Taq- Man) assay for pathogenic Leptospira spp. *BMC Infect Dis*. BioMed Central. 2:13.

Sousa L.L.F., Alencar C.H.M., Almeida A.M.P., Cavalcanti L.P.G. 2017. Seroprevalence and spatial distribution dynamics of Yersinia pestis antibodies in dogs and catsfrom plagu e foci in the State of Ceará, Northeastern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 50(6), 769-776.

Sow D., Parola P., Sylla K., Ndiaye M., Delaunay P., Halfon P., Camiade S., Dieng T., Tine R.C.K., Faye B., Ndiaye J.L., Dieng Y., Gaye O., Raoult D., Bittar F. 2017. Performance of Real-Time Polymerase Chain Reaction Assays for the Detection of 20 Gastrointestinal Parasites in Clinical Samples from Senegal. *Am J Trop Med Hyg*. 97(1), 173-182.

Srivastava SK. 2002. Properties of lipopolysaccharide antigen of Leptospira interrogans serovar pyrogenes. *Ind. Vet. J.* 79(11), 1201-1202.

Steneroden K.K., Hill A.E., Salman M.D. 2011. Zoonotic disease awareness in animal shelter workers and volunteers and the effect of training. Zoonoses Public Health. 58(7), 449-453.

Stenseth N.C., Atshabar B.B., Begon M., Belmain S.R. et Bertherat E. Carniel E., Gage K.L., Leirs H., Rahalison L. 2008. Plague : Past, Present, and Future. *PLoS Med*. 5(1): e3.

Stephenson N., Higley J.M., Sajecki J.L., Chomel B.B., Brown R.N., Foley J.E. 2015. Demographic characteristics and infectious diseases of a population of American black bears in Humboldt County, California. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 15(2), 116-123.

Stimson A. 1907. Note on an organism found in yellow-fever tissue. *Public Health Reports*. 22, 541.

Stokes J., Kancene J., Schall W.D., Kruger J., Miller R.A., Kaiser L., Bolin C. 2007. Prevalence of serum antibodies against six leptospira serovars in healty dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 230, 1657-1665.

Straley S.C., Skrzypek E., Plano G.V., Bliska J.B. 1993. Yops of Yersinia spp. pathogenic for humans. *Infect. Immun*. 61(8), 3105-3110.

Strasser A., May B., Teltscher A., Wistrela E., Niedermüller H. 2003. Immune modulation following immunization with polyvalent vaccines in dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 94(3-4), 113-121.

Suepaul S., Carrington C., Campbell M., Borde G., Adesiyun A. 2011. Seroepidemiology of leptospirosis in livestock in Trinidad. *Trop Anim Health Prod*. 43: 367-375.

Sykes J.E., Hartmann K., Lunn K.F., Moore G.E., Stoddard R.A., Goldstein R.E. 2011. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med*. 25(1), 1-13.

Tam C., Demke O., Hermanas T., Mitchell A., Hendrickx A.P., Schneewind O. 2014. YfbA, a Yersinia pestis regulator required for colonization and biofilm formation in the gut of catfleas. J *Bacteriol.* 196(6), 1165-1173.

Tarantola A., Mollet T., Gueguen J., Barboza P., Bertherat E. 2009. Plague outbreak in the Libyan Arab Jamahiriya. *Euro Surveill*. 14(26), 19258.

Terpstra W.J., Jabboury-Postema J., Korver H. 1983. Immunoperoxidase staining of leptospires in blood and urine. Zentralbl. *Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A.* 254(4), 534-539.

Thaipadungpanit J., Chierakul W., Wuthiekanun V., Limmathurotsakul D., Amornchai P., Boonslip S., Smythe L.D., Limpaiboon R., Hoffmaster A.R., Day N.P., Peacock S.J. 2011. Diagnostic accuracy of real-time PCR assays targeting 16S rRNA and lipL32 genes for human leptospirosis in Thailand: a case-control study. *PLoS One*. 6:e16236.

Thiermann A.B. 1980. Canine leptospirosis in Detroit. *Am. J. Vet. Res*. 41(10):1659-61.

Thiermann A.B. 1984. Leptospirosis currents, developments and trends. *J. Am. Vet. Med. Assoc*., 184(6), 722-725.

Thomas D.D., Higbie L.M. 1990. In vitro association of leptospires with host cells. *Infect. Immun*. 58(3), 581-585.

Titball R.W., Williamson E.D. 2001. Vaccination against bubonic and pneumonic plague. Vaccine. 19(30), 4175-4184.

Toma C., Okura N., Takayama C., Suzuki T. 2011. Characteristic features of intracellular pathogenic Leptospira in infected murine macrophages. *Cell. Microbiol.* 13(11), 1783-1792.

Tomaso H., Reisinger E.C., Al Dahouk S., Frangoulidis D., Rakin A., Landt O., Neubauer H. 2003. Rapid detection of Yersinia pestis with multiplex real-time PCR assays using fluorescent hybridisation probes. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 38(2), 117-126.

Tong M.J., Rosenberg E.B., Votteri B.A., Tsai C.C. 1971. Immunological Response in Leptospirosis. Report of Three Cases. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 20 (4), 625-230.

Tran T.N., Signoli M., Fozzati L., Aboudharam G., Raoult D., Drancourt M. 2011. High throughput, multiplexed pathogen detection authenticates plague waves in medieval Venice, Italy. *PLoS One*. 6(3), e16735.

Trevejo R.T., Rigau-Pérez J.G., Ashford D.A., McClure E.M., Jarquín-González C., Amador J.J., de los Reyes J.O., Gonzalez A., Zaki S.R., Shieh W.J., McLean R.G., Nasci R.S., Weyant R.S., Bolin C.A., Bragg S.L., Perkins B.A., Spiegel R.A. 1998. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis*. 178(5), 1457-1463.

Tuzio H., Edwards D., Elston T., Jarboe L., Kudrak S., Richards J., Rodan I. 2005. Feline zoonoses guidelines from the American Association of Feline Practitioners. *J Feline Med Surg*. 7(4), 243-274.

Van de Maele I., Claus A., Haesebrouck F., Daminet S. 2008. Leptospirosis in dogs: a review with emphasis on clinical aspects. *Vet Rec*. 163(14), 409-413.

Van den Broek A.H.M., Thrusfield M.V., Dobbiet G.R., Ellisi W.A. 1991. A serological and bacteriological survey of leptospiral infection in dogs in Edinburgh and Glasgow. *Journal of Small Animal Practice*. 32(3), 118-124.

Vanasco N.B., Sequeira M.D., Sequeira G., Tarabla H.D. 2003. Associations between leptospiral infection and seropositivity in rodents and environmental characteristics in Argentina. *Prev. Vet. Med*., 60, 227-235.

Verma, A., Stevenson B. 2012. Leptospiral uveitis - there is more to it than meets the eye! *Zoonoses Public Health*, 2012. 59 (2), 132-141.

Vicari D., Percipalle M., Concetta L.M., Li Vecchi L., Curro V., Vitale M., Vicenzo F. 2007. Evidence of canine leptospirosis in kennels in Sicily, by PCR method. *Rev Cubana Med Trop*. 59(1), 61-62.

Vieira A.S., Pinto P.S., Lilenbaum W. 2018. A systematic review of leptospirosis on wild animals in Latin America. *Trop Anim Health Prod*. 50(2), 229-238.

Villumsen S., Pedersen R., Borre MB, Ahrens P., Jensen J.S., Krogfelt K.A. 2012. Novel TaqMan® PCR for detection of Leptospira species in urine and blood: pit-falls of in silico validation. *J Microbiol Methods*. 91(1), 184-190.

Vinetz J.M., Glass G.E., Flexner C.E., Mueller P., Kaslow D.C. 1996. Sporadic urban leptospirosis. *Ann. Intern. Med*., 125(10), 794-798.

Vinetz J.M. 2001. Leptospirosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 14(5), 527-538.

Von Buettner Ristow C.P.L. 2008. Atténuation de la virulence par mutation de la protéine type OmpA et formation de biofilms dans les Leptospira spp. Thèse exigences pour l'obtention du titre de docteur en sciences biologiques (microbiologie), Institut de Microbiologie, Université fédérale de Rio de Janeiro, 162p.

Von Reyn C.F., Barnes A.M., Weber N.S., Hodgin U.G. 1976. Bubonic plague from exposure to a rabbit: a documented case, and a review of rabbit-associated cases in the United States. *Am. J. Epidemiol*. 104(1), 81-87.

Waltzek T.B., Cortés-Hinojosa G., Wellehan J.F. Jr., Gray G.C. 2012. Marine mammal zoonoses: a review of disease manifestations. *Zoonoses Public Health*. 59(8), 521-35.

Wang B., Sullivan J., Sullivan G.W., Mandell G.L. 1984. Interaction of leptospires with human polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun*. 44:459-464.

Wang L.M., Song X.Y., Zhu X.P., Xie F., Li G.Q., Luo Z.D., Duan Y.J., Qi T., Li F., Wu C.X. 2009. Monitoring the Microtus fuscus plague epidemic in Sichuan province during 2000 - 2008. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 30(11), 1175-1178.

Wang H., Cui Y., Wang Z., Wang X., Guo Z., Yan Y., Li C., Cui B., Xiao X., Yang Y., Qi Z., Wang G., Wei B., Yu S., He D., Chen H., Chen G., Song Y., Yang R. 2011. A dog-associated primary pneumonic plague in Qinghai Province, China. *Clin. Infect. Dis.* 52(2), 185-190.

Wang X., Liang J., Xi J., Yang J., Wang M., Tian K., Li J., Qiu H., Xiao Y., Duan R0, Yang H., Li K., Cui Z., Qi M., Jing H. 2014. Canis lupus familiaris involved in the transmission of pathogenic Yersinia spp. in China. *Vet Microbiol*. 172(1-2), 339-344.

Ward M.P., Glickman L.T., Guptill L.E. 2002. Prevalence of and risk factor for leptospirosis among dogs in the United States and Canada; 677 cases (1970-1998). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220(1), 53-58.

Watson R.P., Blanchard T.W., Mense M.G., Gasper P.W. 2001. Histopathology of experimental plague in cats. *Vet. Pathol.* 38(2), 165-172.

Watt G., Padre L.P., Tuazon M.L., Calubaquib C., Santiago E., Ranoa C.P., Laughlin L.W. 1998. Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. Lancet. 1(8583), 433-5.

Weis S., Rettinger A., Bergmann M., Llewellyn J.R., Pantchev N., Straubinger R.K., Hartmann K. 2017. Detection of Leptospira DNA in urine and presence of specific antibodies in outdoor cats in Germany. J Feline Med Surg. 19(4), 470-476.

Welch TJ., Fricke WF., McDermott PF. 2007. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS One*. 2:e309.

Weniger B.G., Warren A.J., Forseth V., Shipps G.W., Creelman T., Gorton J., Barnes A.M. 1984. Human bubonic plague transmitted by a domestic cat scratch. *JAMA*. 251(7), 927-928.

Werner S.B., Weidmer C.E., Nelson B.C., Nygaard G.S., Goethals R.M., Poland J.D. 1984. Primary plague pneumonia contracted from a domestic cat at South Lake Tahoe, Calif. *JAMA*., 251(7), 929 -931.

Wheelis M. 2002. Biological warfare at the 1346 siege of Caffa. *Emerg Infect Dis*. 8(9), 971-975.

Whitaker A.P. 2007. Fleas (*Siphonaptera*). *Royal Entomological Society.* p :178.

WHO (World Health Organisation) (OMS) 2003. Plague in Algeria – update 2. *Wkly Epidemiol Rec*. 78, 253-60.

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.

Wolgemuth C.W. 2016. Flagellar motility of the pathogenic spirochetes. *Semin Cell Dev Biol*. 46, 104-112.

Wong D., Wild M.A., Walburger M.A., Higgins C.L., Callahan M., Czarnecki L.A., Lawaczeck E.W., Levy C.E., Patterson J.G., Sunenshine R., Adem P., Paddock C.D., Zaki S.R., Petersen J.M., Schriefer M.E., Eisen R.J., Gage K.L., Griffith K.S., Weber I.B., Spraker T.R., Mead P.S. (2009) : Primary Pneumonic Plague Contracted from a Mountain Lion Carcass. *Clinical Infectious Diseases.* 49(3), 33-38.

Xu C, Loftis A, Ahluwalia SK, Gao D, Verma A, Wang C, Kaltenboeck B. 2014. Diagnosis of canine leptospirosis by a highly sensitive FRET-PCR targeting the lig genes. *PLoS One*. 9(2), e89507.

Xu Y., Zhu Y., Wang Y., Chang Y.F., Zhang Y., Jiang X., Zhuang X., Zhu Y., Zhang J., Zeng L., Yang M., Li S., Wang S., Ye Q., Xin X., Zhao G., Zheng H., Guo X., Wang J. 2016. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic Leptospira. *Sci Rep*. 6, 20020.

Yang R. 2017. Plague: Recognition, Treatment, and Prevention. *J Clin Microbiol*. 56(1). pii: e01519-17.

Yersin A. 1894. La peste bubonique à Hong-Kong. *Annales de l'Institut Pasteur.* 8, 662-667.

Yin J.X., Geater A., Chongsuvivatwong V., Dong X.Q., Du C.H., Zhong Y.H. 2011. Predictors for abundance of host flea and floor flea in households of villages with endemic commensal rodent plague, Yunnan Province, China. *PLoS Negl Trop Dis.* 5: e997.

Younes-Ibrahim M., Burth P., Faria M.V., Buffin-Meyer B., Marsy S., Barlet-Bas C., Cheval L., Doucet A. 1995. 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*. 318(5), 619-25.

Yuri K., Takamoto Y., Okada M., Hiramune T., Kikuchi N., Yanagawa R. 1993. Chemotaxis of leptospires to hemoglobin in relation to virulence. *Infect. Immun.* 61(5), 2270-2272.

Zakeri S., Khorami N., Ganji Z.F., Sepahian N., Malmasi A.A., Gouya M.M., Djadid N.D. 2010. Leptospira wolffii, a potential new pathogenic Leptospira species detected in human, sheep and dog. *Infect. Genet. Evol.* 10(2), 273-277.

Sources Internet (Consultées en Mai 2019)

Source internet 1 :
https://fr.wikipedia.org/wiki/Alger

Source internet 2 (modifée) :
https://www.algerieprofonde.net/alger/carte-dalger/

ANNEXES

ANNEXE 01

Tableau illustrant les différents sérovars appartement à *L. interrogans sensu lato* qui infectent l'homme et les animaux (Sessions et Greene, 2004)

Sérovar	Hôtes connus comme réservoirs primaires	Hôtes accidentels	
		Animaux domestiques et humains	Animaux sauvages
Bratislava	Rat, porc, cheval	Chien, homme, vache, cheval	Souris, raton-laveaur, opossum, campagnol, renard, moufette, belette, ragondin
Autumnalis	Souris	Chien, homme, vache	Rat, raton-laveaur, opossum
incterrohaemorrhagiae	Rat	Chien, chat, homme, vache, cheval, porc	Souris, raton-laveaur, opossum, renard, marmotte, singe, mouffette
Pomona	Vache, porc, mouffette, opossum	Chien, chat, homme, cheval, mouton, chèvre, lapin	Souris, raton-laveaur, loup, renard, lion de mer, cerf
Canicola	Chien	Chien, chat, homme, vache, cheval, porc	Rat, raton-laveaur, tatou, mangouste, ragondin, campagnol, chacal, mouffette
Bataviae	Chien, rat, souris	Chien, chat, homme, vache	Hérisson, campagnol, tatou, musaraigne, léopard
Hardjo	Vache	Chien, homme, porc, cheval, mouton	Bovidés Sauvages
Grippotyphosa	Campagnol, raton laveur, mouffette, opossum	Chien, chat, homme, vache, porc, mouton, chèvre, lapin, gerbille	Souris, rat, renard, écureuil, lynx roux, musaraigne, hérisson, rat musqué, belette, taupe, léopard

ANNEXE 02

Tableau illustrant les signes cliniques chez le chien atteint de leptospirose (Schuller et *al*., 2015)

Référence	**Rentko et al. 1992**	**Harkin et al. 1996**	**Birnbaum et al. 1998**	**Adin et al. 2000**	**Prescott et al. 2002**	**Goldstein et al. 2006**	**Steger-Lleb et al. 1999**	**Mastrorilli et al. 2007**	**Gelsen et al. 2007**	**Gerlach et al. 2007**	**Kohn et al. 2010**	**Tangeman et Llttman 2013**
Pays	**USA Massachusettes**	**USA New Jersey**	**USA New York**	**USA Californie**	**USA Ontario**	**USA New York**	**Suisse**	**Italie**	**Sud de l'Allemagne**	**Nord de l'Allemagne**	**Nord-est de l'Allemagne**	**Nouvelle Orléans**
Nombre de chiens	n=17	n=17	n=36	n=36	n=31	n=55	n=11	n=16	n=42	n=39	n=50	n=51
Anorexie % (n)	NR	NR	67 (24)	68 (24)	81 (25)	75 (41)	73 (8)	69 (11)	76 (32)	R	84 (42)	57 (29)
Vomissement % (n)	NR	NR	50 (18)	88 (33)	81 (25)	64 (35)	82 (9)	81 (13)	57 (24)	R	72 (36)	41 (21)
Léthargie % (n)	24 (4)	88 (15)	58 (21)	65 (23)	90 (28)	78 (43)	18 (2)	87,5 (14)	81 (42)	R	90 (45)	43 (22)
Douleurs abdominales % (n)	29 (5)	35 (6)	33 (12)	42 (15)	65 (20)	22 (12)	45 (5)	37,5 (6)	19 (8)	NR	36 (18)	NR
Diarrhée % (n)	24 (4)	6 (1)	33 (12)	NR	NR	29 (16)	36 (4)	38 (6)	40 (17)	NR	50 (25)	12 (6)
Ictère % (n)	NR	35 (6)	11 (4)	NR	29 (9)	13 (7)	36 (4)	17 (2)	45 (18)	R	10 (5)	NR
Déshydrations % (n)	NR	NR	36 (13)	NR	52 (16)	26 (14)	27 (3)	NR	31 (13)	NR	6 (3)	NR
Raideur / douleur musculo-squelettique % (n)	12 (2)	17 (3)	25 (9)	23 (9)	35 (11)	NR	NR	44 (7)	NR	NR	8 (4)	2 (1)
Fièvre (temp. rectale >39.5°C) % (n)	6 (1)	6 (1)	11 (4)	15 (4)	13 (4)	9 (5)	18 (2)	19 (3)	36 (15)	R	8 (4)	NR
Hypothermie (temp. rectale <38°C) % (n)	12 (2)	12 (2)	NR	22 (8)	NR	NR	36 (4)	38 (6)	17 (7)	NR	6 (3)	NR
Oligurie/ anurie % (n)	NR	NR	6 (2)	39 (14)	NR	NR	18 (2)	44 (7)	NR	NR	20 (10)	4 (2)
Dyspnée/ tachypnée % (n)	6 (1)	NR	3 (1)	NR	35 (11)	NR	NR	44 (7)	NR	NR	38 (19)	2 (1)
Faiblesse % (n)	NR	NR	39 (14)	NR	NR	NR	18 (2)	NR	52 (21)	NR	NR	NR
PU/PD % (n)	NR	NR	50 (18)	NR	NR	31 (17)	27 (3)	NR	NR	NR	NR	NR
Perte de poids % (n)	NR	NR	44 (16)	NR	NR	35 (19)	9(1)	NR	17 (7)	NR	NR	NR

NR : non rapporté. R : rapporté, pas de nombre.

ANNEXE 03

Tableau illustrant les altérations biochimiques constatées chez des chiens atteints de leptospirose (Schuller et *al*., 2015)

Référence	**Rentko et al. 1992**	**Harkin et al. 1996**	**Birnbaum et al. 1998**	**Adin et al. 2000**	**Prescott et al. 2002**	**Boutilier et al. 2003**	**Goldstein et al. 2006**	**Steger-Lleb et al. 1999**	**Mastrorilli et al. 2007**	**Gelssen et al. 2007**	**Gerlach et al. 2007**	**Kohn et al. 2010**	**Tangeman et Llttman 2013**
Pays	**USA Massachusettes**	**USA New Jersey**	**USA New York**	**USA Californie**	**USA Ontario**	**Canada Saskatchewan**	**USA New York**	**Suisse**	**Italie**	**Sud de l'Allemagne**	**Nord de l'Allemagne**	**Nord-est de l'Allemagne**	**Nouvelle Orléans**
Nombre de chiens	n=17	n=17	n=36	n=31	n=31	n=15	n=54	n=11	n=16	n=42	n=39	n=50	n=51
Augmentation de la créatinine % (n)	100 (17)	82 (14)	83 (30)	100 (36)	87 (27)	80 (12)	93 (50)	55 (6)	100 (16)	57 (24)	72 (28)	88 (44)	71 (36)
Augmentation de l'urée % (n)	100 (17)	82 (14)	81 (29)	100 (36)	94 (29)	73 (11)	93 (50)	54 (6)	100 (16)	62 (26)	72 (28)	88 (44)	75 (38)
Augmentation de l'ALAT % (n)	35 (6)	35 (6)	33 (12)	NR	26 (8)	33 (5)	32 (17)	55 (6)	69 (11)	74 (31)	28 (11)	78	51 (26)
Augmentation de l'ASAT % (n)	29 (5)	NR	39 (14)	NR	NR	NR	56 (30)	55 (6)	69 (11)	61 (22/36)	28 (11)	NR	47 (24)
Augmentation de la PAL % (n)	59 (10)	65 (11)	56 (20)	19 (7)	58 (18)	33 (5)	57 (31)	55 (6)	63 (10)	69 (29)	28 (11)	90 (42/47)	59 (30)
Hyperbilirubinémie % (n)	24 (4)	42 (7)	17 (6)	22 (8)	68 (21)	33 (5)	41 (22)	55 (6)	56 (9)	79 (34)	15 (6)	73 (35/48)	37 (19)
Hypoalbunémie % (n)	18 (3)	NR	NR	NR	NR	NR	35 (19)	64 (7)	75 (12)	NR	NR	NR	NR

NR : non rapporté.

ANNEXE 04

Tableau citant les enquêtes de séroprévalence de l'infection féline à *Yersinia pestis*

Région géographique	L'année de l'étude	Nombre de sérums prélevés	Technique utilisée	Positifs		Références
				Prévalence	%	
Afrique du Sud	1982	6	HP	2	33,3%	**Shepherd et *al*., 1983**
Alberta et Saskatchewan (Canada)	1995	242	HP	13	5,4%	**Leighton et *al*., 2001**
Californie (USA)	1979-1991	466	HP	15	3,22%	**Chomel et *al*., 1994**
Etat de Ceará (Brésil)	1990-1999	__	HA	170	__	**Aragão et *al*., 2002**
Province du Yunnan (Chine)	2006	151	HP	40	26,5%	**Li et *al*., 2008**
Etat du Ceará (Brésil)	1997-2006	50 849	HA	395	0,8%	**Aragão et *al*., 2009**
Etat de Ceará (Brésil)	1990-2014	61 135	HP et HIn	426	0.7%	**Sousa et *al*., 2017**

HA : Hémagglutination. HP : Hémagglutination passive. HIn : Hémagglutination par inhibition.

ANNEXE 05

Tableau citant les enquêtes de séroprévalence de l'infection canine à *Yersinia pestis*

Région géographique	L'année de l'étude	Nombre de sérums prélevés	Technique utilisée	Positifs		Références
				Prévalence	%	
Epidémies dans des différentes régions du monde (USA et Asie)	__	1 556	HA	336	21,6%	**Rust et *al*., 1971a**
Afrique du Sud	1982	5 938	HP	21	0,35%	**Shepherd et *al*., 1983**
Montagnes d'Usambara occidentaux (Tanzanie)	1980-1990	176	HP	11	6,3%	**Kilonzo et *al*., 1992**
Lushoto (Tanzanie)	__	201	HP	11	5,5%	**Kilonzo et *al*., 1993**
Californie (USA)	1979-1991	4 115	HP	86	2,09%	**Chomel et *al*., 1994**
Équateur	1998	14	HP	5	35,7%	**Gabastou et *al*., 2000**
Alberta et Saskatchewan (Canada)	1995	240	HP	24	10%	**Leighton et *al*., 2001**
Etat de Ceará (Brésil)	1990-1999	__	HA	720	__	**Aragão et *al*., 2002**
Jordanie (Frontières Saoudiennes)	1997	17	HA et ELISA	3	17,6%	**Arbaji et *al*., 2005**
Karatu et Ngorongoro (Tanzanie)	__	38	ELISA	1	2,6 %	**Kilonzo et *al*., 2006**
Californie (USA)	2004-2005	183	HP	5	2,7%	**Henn et *al*., 2007**
Province du Yunnan (Chine)	2006	689	HP	162	23,5%	**Li et *al*., 2008**
Etat du Ceará (Brésil)	1997-2006	95 883	HA	2 234	2,3%	**Aragão et *al*., 2009**
Madagascar	1999	63	TICR et ELISA	15	23,8%	**Rajerison et *al*., 2009**
Etat de Bahia (Brésil)	2009	480	HA	0	0%	**Saavedra et Dias, 2011**
Ouest d'Iran	2011-2012	117	ELISA	4	3,42%	**Esamaeili et *al*., 2013**
Nouveau Mexique (USA)	2003-2011	62 malades	__	62	100%	**Nichols et *al*., 2014**
Provinces Gansu et Qinghai (Chine)	__	226	HI	49	21,6%	**Wang et *al*., 2014**
Californie (USA)	2001-2003	80	HP et HIn	1	1,25%	**Stephenson et *al*., 2015**
Zambie	2012-2013	165	ELISA	5	3%	**Nyirenda et *al*., 2017**
Etat de Ceará (Brésil)	1990-2014	203 311	HP et HIn	3 023	1.5%	**Sousa et *al*., 2017**

HA : Hémagglutination. HI : Hémagglutination Indirecte. HP : Hémagglutination passive. HIn : Hémagglutination par inhibition. TICR : Test immuno-chromatographique rapide. ELISA : Dosage d'immunoabsorption par enzyme liée.

ANNEXE 06 :

Les informations relatives aux animaux prélevés pour l'étude de la leptospirose

Variable/ Catégorie	Nombre de chiens testés	Nombre de chats testés
Nombre Total	**104**	**107**
Sexe		
Mâle	69 (66.34%)	66 (61.68%)
Femelle	35 (33.65%)	41 (38.31%)
Age		
≤ 1 an	17 (16,34%)	18 (16,82%)
> 1 an	87 (83,65%)	86 (80,37%)
Race		
Race mixte	86 (82,69%)	107 (100%)
Autres races	18 (17,30%)	0 (0%)
Races canines		
- Berger allemand	8 (7,69%)	-
- Berger croisé	8 (7,69%)	-
- American Staffordshire	2 (1,92%)	-
		-
Autres races félines	-	-

ANNEXE 07 :

Les informations relatives aux animaux prélevés pour l'étude de la peste

Variable/ Catégorie	Nombre de chiens testés	Nombre de chats testés
Nombre Total	**127**	**140**
Sexe		
Mâle	65 (51,58%)	78 (55,71%)
Femelle	62 (48,81%)	62 (44,28%)
Age	48 (37,79%)	44 (31,42%)
≤ 1 an	79 (62,50%)	96 (68,57%)
> 1 an		
Race		
Race mixte	99 (77,95%)	136 (97,14%)
Autres races	28 (22,04%)	4 (2,85%)
Races canines		
- Berger allemand	9 (7,08%)	-
- Berger croisé	11 (8,66%)	-
- American Staffordshire	5 (3,93%)	-
- Pitbull croisé	3 (2,36%)	-
Races félines		
- Siamois croisé	-	4 (2,85%)
Statut clinique		
Sain	105 (81,67%)	127 (90,71%)
Malade	22 (17,32%)	13 (9,28%)
Présence de puces		
- Oui	102 (80,31%)	114 (81,42%)
- Non	25 (19,68%)	26 (18,57%)