ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2010 - Thèse n°

ROLE DES RAGONDINS DANS L'EPIDEMIOLOGIE DES LEPTOSPIROSES EN ZONE HUMIDE : EXEMPLE DE LA DOMBES

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 18 mai 2010
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Pierre CROIZIER
Né le 29 septembre 1984
à Lyon (69)

Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, membre de UNIVERSITÉ DE LYON

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2010 - Thèse n°

ROLE DES RAGONDINS DANS L'EPIDEMIOLOGIE DES LEPTOSPIROSES EN ZONE HUMIDE : EXEMPLE DE LA DOMBES

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 18 mai 2010
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Pierre CROIZIER
Né le 29 septembre 1984
à Lyon (69)

Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, membre de UNIVERSITÉ DE LYON

ENVL

DEPARTEMENT ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ENVL

Directeur : Stéphane MARTINOT

Mise à jour : 24/11/2009

Nom	Prénom	Grade	
ALOGNINOUWA	Théodore	PR1	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	MC Classe Normale	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt Production animale
ARCANGIOLI	Marie-Anne	MC Classe Normale	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale UR UMR ENVL AFSSA Mycoplasmose des Ruminants
ARTOIS	Marc	PR1	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Production animale UR UMR 5525 CNRS EJF EPHE INP ENVL TIMC-IMAG
AVISON	Timothy	PCEA	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé)
BECKER	Claire	MC Classe Normale Stagiaire	UP Pathologie du bétail UR UMR ENVL AFSSA Mycoplasmose des Ruminants
BELLI	Patrick	MC Contractuel	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Analyses de Laboratoire
BELLUCO	Sara	MC Classe Normale Stagiaire	UP Pathologie Morphologique et Clinique
BENAMOU-SMITH	Agnès	MC Classe Normale	UP Equine - Dpt Equine UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
BENOIT	Etienne	PR1	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
BERNY	Philippe	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
BERTHELET	Marie-Anne	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie,Soins intensifs)
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL ERI 22 (INSERM) Agression Vasculaire Réponse tissulaire PT Logistique Bureau de la Pédagogie et de la Vie Etudiante Direction Adjoint au directeur - Chargée de la Vie étudiante
BOULOCHER	Caroline	MC Classe Normale Stagiaire	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Carnivores - UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
BOURDOISEAU	Gilles	PR1	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Carnivores UR Thématique Leishmaniose Direction Adjoint au Directeur
BOURGOIN	Gilles	MC Classe Normale	PT Laboratoires d'analyses Parasitologie
BRUYERE	Pierre	MC Contractuel	UP Reproduction
BUBLOT	Isabelle	MC Contractuel	UP Médecine des Carnivores - Dpt Carnivores
BUFF	Samuel	MC Classe Normale	UP Reproduction - Dpt Carnivores UR UPSP ENVL ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle PT CERREC PT Formation continue
BURONFOSSE	Thierry	MC Hors Classe	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Analyses de Laboratoire UR UMR 271 INSERM Hépatites virales
CADORE	Jean-Luc	PR1	UP Médecine des Carnivores - Dpt Equine UR UMR 754 INRA - UCBL - ENVL - EPHE Rétrovirus Pathologie comparée Direction Adjoint au directeur - Chargé de missions
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UR UMR 958 Protozoaires entéricoles des volailles
CAROZZO	Claude	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
CHABANNE	Luc	PR2	UP Médecine des Carnivores Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes
CHALVET-MONFRAY	Karine	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Industrie UR UMR 5525 CNRS EJF EPHE INP ENVL TIMC-IMAG
COMMUN	Loic	MC Contractuel	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) Dpt Analyses de Laboratoire
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie UR UMR CNRS 5558
DEMONT	Pierre	PR2	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
DESJARDINS PESSON	Isabelle	MC Contractuel	UP Equine
EGRON-MORAND	Germaine	MC Classe Normale	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) Dpt Production animale
ESCRIOU	Catherine	MC Classe Normale	UP Médecine des Carnivores Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
FAU	Didier	PR2	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Carnivores - UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
FLEURY	Catherine	PR2	UP Equine - Dpt Equine
FOURNEL	Corinne	PR1	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes
FRANCK	Michel	PR1	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt Production animale -
FRIKHA	Mohamed-Ridha	MC Classe Normale	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale
GANGL	Monika	MC Contractuel	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Equine
GARNIER	François	PR1	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores
GENEVOIS	Jean-Pierre	PRX	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	PR2	UP Biologie Fonctionnelle

ENVL

DEPARTEMENT ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ENVL

Directeur : Stéphane MARTINOT

Mise à jour : 24/11/2009

Nom	Prénom	Grade	
GONTHIER	Alain	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UR UMR 958 Protozoaires entéricoles des volailles
GRAIN	Françoise	PR2	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) Dpt Analyses de Laboratoire PT Logistique Bureau de la Pédagogie et de la Vie Etudiante Direction Adjoint au directeur - Chargée de la Pédagogie
GRANCHER	Denis	MC Hors Classe	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt Production animale UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques Direction Adjoint au directeur - Chargé des relations intérieures
GREZEL	Delphine	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
GUERIN	Pierre	PR2	UP Reproduction - Dpt Production animale UR UPSP ENVL ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle
GUERIN-FAUBLEE	Véronique	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Analyses de Laboratoire UR UMR CNRS 5558
HUGONNARD	Marine	MC Classe Normale	UP Médecine des Carnivores - Dpt Carnivores UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne
JAUSSAUD	Philippe	PR1	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Industrie PT Laboratoires d'analyses Laboratoire LEPS
JUNOT	Stéphane	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL ERI 22 (INSERM) Agression Vasculaire Réponse tissulaire
KECK	Gérard	PR1	UP Biologie fonctionnelle Dpt Industrie UR UMR 1233 INRA/ENVL/ISARA Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
KODJO	Angeli	PR2	UP Santé Publique Vétérinaire Dpt Industrie UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne
LACHERETZ	Antoine	PR1	UP Santé Publique Vétérinaire Dpt Industrie
LAMBERT	Véronique	MC Classe Normale	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) Dpt Analyses de Laboratoire
LE-GRAND	Dominique	MC Hors Classe	UP Pathologie du bétail - Dpt Production animale
LEBLOND	Agnes	PR2	UP Santé Publique Vétérinaire Dpt Equine UMR INRA EPIA - UR 346
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	MC Classe Normale	UP Reproduction - Dpt Equine UR UPSP ENVL ISARA Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle
LEPAGE	Olivier	PR1	UP Equine - Dpt Equine
LOUKIADIS	Estelle	ISPV	UR UPSP 5201 Microbiologie alimentaire et prévisionnelle
LOUZIER	Vanessa	MC Classe Normale	UP Biologie Fonctionnelle
MARCHAL	Thierry	MC Hors Classe	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes
MARTIN	Gillian	PCEA	PT Logistique LANGUES
MIALET	Sylvie	ISPV	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie
MOUNIER	Luc	MC Classe Normale	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt Production animale UR UMR INRA URH
PIN	Didier	MC Classe Normale	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Carnivores
PONCE	Frédérique	MC Classe Normale	UP Médecine des Carnivores + Dpt Carnivores UR UPSP 5203 Pathologie Comparée des cellules dendritiques et présentatrices d'antigènes
PORTIER	Karine	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Equine
POUZOT	Céline	MC Contractuel	PT CHEV CHEVAC - SIAMU
PROUILLAC	Caroline	MC Classe Normale	PT CHEV UMR 1233 Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques
REMY	Denise	PR2	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores
RICHARD	Yves	PRX	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UR UMR 5557 UCBL CNRS ENVL INRA Ecologie Microbienne PT Logistique Bureau de la Recherche Direction Directeur scientifique
ROGER	Thierry	PR1	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Industrie UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux PT ICLB PT Formation continue
SABATIER	Philippe	PR2	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Production animale UR UMR 5525 CNRS EJF EPHE INP ENVL TIMC-IMAG
SAWAYA	Serge	MC Classe Normale	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) Dpt Equine UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
SERGENTET	Delphine	MC Classe Normale	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Industrie UR UPSP 5201 Microbiologie alimentaire et prévisionnelle
THIEBAULT	Jean-Jacques	MC Hors Classe	UP Biologie fonctionnelle - Dpt Carnivores
VIALARD	Jacquemine	MC Hors Classe	UP GEGAZS (Gestion des élevages : génétique, alimentation, zootechniqe et santé) - Dpt Analyses de Laboratoire -
VIGUIER	Eric	PR1	UP ACSAI (Anatomie, Chirurgie, Anesthésiologie, Imagerie, Soins intensifs) - Dpt Carnivores UR UMR UCBL ENVL Réparation tissulaire, interaction biologique et biomatériaux
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothée	MC Contractuel	UP Pathologie Morphologique et Clinique - Dpt Analyses de Laboratoire
ZENNER	Lionel	PR2	UP Santé Publique Vétérinaire - Dpt Production animale

A notre jury de thèse,

***A Monsieur le Professeur Gharib**,*
De la faculté de médecine de Lyon,
Qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider notre jury.
Qu'il trouve ici l'expression de nos sentiments respectueux.

A Madame le Professeur Agnès Leblond,
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,
Qui a dirigé notre travail et nous a accordé sa confiance.
Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Angeli Kodjo
De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,
Qui a accepté la lecture critique de notre travail et de participer à notre jury de thèse.
Hommages respectueux.

Au Docteur vétérinaire Julie Vein,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon,

Son aide, sa gentillesse et sa disponibilité m'ont été précieuses.

Sincères remerciements.

Aux Docteurs vétérinaires Jean-François et Claude Jamet,

dont le professionnalisme conjugué à la gentillesse sont pour moi un exemple.

A mes grands-parents, pour leurs précieux conseils et leur affection.

A ma grande tante Nadège, pour son accueil, sa joie et sa présence.

A mes parents, mes frères et sœurs, pour m'avoir supporté toutes ces années.

A ma famille et aux proches, sur qui j'ai toujours pu compter.

A mes amis,

pour tous les moments passés ensemble,

et pour ceux que nous partagerons encore...

« Si tu veux marcher vite, marche seul. Si tu veux marcher loin, marche avec d’autres. »

Table des matières

Liste des abréviations 13
Liste des figures 15
Liste des tableaux 17

Introduction générale 19

PREMIERE PARTIE
LA LEPTOSPIROSE, UNE ZOONOSE EMERGENTE ?

Introduction 23
Préambule : de la découverte de la leptospirose et des leptospires 24

I. Bactériologie appliquée aux leptospires 25
1. Taxinomie 25
1.1 Taxinomie fondamentale 25
1.2 Ancienne nomenclature 25
1.3 Nouvelle nomenclature 26
2. Caractères bactériologiques 27
3. Microbiologie 28
4. Biologie 29
4.1 Habitat 29
4.2 Résistance aux agents physicochimiques 30
4.3 Pathogénie et facteurs de virulence 30
5. Diagnostic de laboratoire 32
5.1 Diagnostic direct 33
5.2 Diagnostic indirect 35
5.3 Typage pour le diagnostic épidémiologique (VNTR/MLVA, MLST) 38
6. Arsenal thérapeutique, sensibilité aux antibiotiques 39
7. Prophylaxie 40
7.1 Immunité mise en jeu 41
7.2 prophylaxie médicale 41
7.3 Prophylaxie sanitaire 45

II. Importance médicale et épidémiologique 50
1. Importance médicale et épidémiologique chez l'homme 51
1.1 Une maladie infectieuse ubiquiste recrudescente 51
1.2 Importance médicale de la leptospirose chez l'homme 52
2. Importance médicale et économique chez nos espèces domestiques 57
2.1 Réceptivité et sensibilité des principales espèces domestiques 57
2.2 Signes cliniques 59
3. Modes de contamination (épidémiologie analytique) 63
3.1 Sources de leptospires 63
3.2 Modes de transmission 63
3.3 Un cycle épidémiologique impliquant plusieurs acteurs ... .66
3.4 ... et plusieurs facteurs ! 66
Conclusion de la première partie 68

SECONDE PARTIE
LE RAGONDIN : ECOLOGIE, BIOLOGIE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Introduction 71
I. Répartition géographique et statut actuel du Ragondin 72
1. Dans le monde 72
1.1 Région d'origine 72
1.2 Motifs d'introduction dans d'autres pays 72
1.3 De l'atout économique au statut de mammifère nuisible 73
1.4 Répartition mondiale actuelle du Ragondin 75
2. En France 76
2.1 Sites d'implantation préférentiels 76
2.2 Statut actuel et dommages causés par le Ragondin 77
2.3 Méthodes de lutte 78
3. Dans l'Ain 81
3.1 Estimation du nombre d'individus 81
3.2 Statut fixé par arrêté préfectoral en 2008 et 2009 81
3.3 Politique corrélative adoptée dans l'Ain 81
II. Ecologie et biologie 82
1. Taxinomie 82
2. Aspects morphologiques 83
3. Biométrie 84
4. Habitats et adaptations 85
4.1 Zones électives dans son habitat d'origine 85
4.2 Adaptations morphologiques du Ragondin liées à son mode de vie 86
4.3 Les limites de l'acclimatation du Ragondin à nos climats tempérés 87
4.4 Aménagements territoriaux 87
5. Comportement 87
5.1 Régime alimentaire 87
5.2 Comportement agonistique 88
5.3 Marquage territorial 89
6. Structure et mouvement des populations 89
6.1 Structure générale 89
6.2 Densité de population 89
6.3 Domaine vital, déplacements et mouvements de population 90
6.4 Incidence des inondations et du froid sur la structure démographique 91
7. Caractéristiques de reproduction 92
7.1 Longévité, puberté et maturité sexuelle 92
7.2 Cycle oestral 92
7.3 Gestation et élevage de la portée 92
8. Méthodes d'étude 93
8.1 Estimation de l'âge des ragondins 93
8.2 Capture des ragondins 95
8.3 Contention chimique 96
8.4 Marquage des ragondins 96
III. Place du Ragondin dans l'épidémiologie de la leptospirose 97
1. Notions d'animaux porteurs ou de « réservoirs », réceptifs mais peu ou pas sensibles 97
2. Principaux réservoirs actuellement identifiés et modes de contamination 98
3. Résultats sérologiques de précédentes études en France 99
Conclusion de la deuxième partie 100

TROISIEME PARTIE
ETUDE EXPERIMENTALE

Contexte et préambule 103
I. Matériel et méthodes 104
1. Sites et méthodes de prélèvements 104
1.1 Données physiques, écologiques et sociologiques 104
1.2 Zones d'étude 106
2. Animaux inclus dans l'étude 108
3. Autopsie et prélèvements organiques 108
3.1 Prélèvements sur le terrain 108
3.2 Autopsie 109
3.3 Prélèvements 110
4. Analyses de laboratoire 111
4.1 Sérologie par test d'agglutination microscopique (MAT) 111
4.2 Mise en culture 116
4.3 PCR sur cultures 118
5. Données concernant les leptospiroses humaine et animale 118

II. Résultats de la campagne de piégeage 2008 dans la Dombes et de l'étude des données du laboratoire leptospire de l'ENVL 119
1. Animaux piégés : étude descriptive de la population 119
1.1 Numération, poids, sexe et âge 119
1.2 Autopsie et lésions 120
2. Séroprévalence de la leptospirose chez les Ragondins de la Dombes, et répartition des différents sérogroupes incriminés 120
3. Résultats d'analyses par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur culture 122
4. Répartition des sérogroupes infectants de leptospires chez le chien et chez les bovins entre 2007 et 2009, en région Rhône-Alpes 124
5. Données collectées sur le site CNR Pasteur 125

III. Discussion 127
1. Campagne de piégeage de la Dombes : méthode d'étude, protocole et biais 127
2. Séroprévalence globale chez le Ragondin et sérogroupes identifiés 129
3. Résultats PCR 131
4. Confrontation des résultats concernant les sérogroupes avec les données épidémiologiques chez l'homme et chez nos espèces domestiques 132

Conclusion 135

Références bibliographiques 137
Références réglementaires 148
Annexe 1 : zone d'étude 149
Annexe 2 : questionnaire « pièce d'eau » 150
Annexe 3 : caractéristiques « site » 151
Annexe 4 : questionnaire « piège » 152
Annexe 5 : questionnaire « séance de capture » 153
Annexe 6 : questionnaire « animal » 154

Liste des abréviations

°C : degré Celsius
ADN : Acide désoxyribonucléique
Ag : Antigène
ALAT : Alanine amino-transférase
AP : Arrêté préfectoral
ARN : Acide ribonucléique
CAAT : Cross Agglutinin Absorption Test
CDC : Center for Disease Control and prevention
cm : centimètre
CO2 : dioxyde de carbone
DTm(e) : Différence de stabilité thermique
ELISA : Enzyme-linkes immunosorbent assay
EMJH : Ellinghausen-McCullough modifié par Johnson et Harris
ENVL : Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon
FDPA : Fédération des piégeurs de l'Ain
FNGPC : Fédération Nationale de Groupement et de Protection des Cultures
ha : hectare
Hap : Haemolysin-associated protein
HLA : Human leukocyte antigen
INRS : Institut National de la Recherche Scientifique
kg : kilogramme
IFI : Immunofluorescence indirecte
Ig : Immunoglobuline
ILS : International Leptospirosis Society
IM : Intramusculaire
Lig : Immunoglobulin Like
LPS : Lipopolysaccharide
MAT : Microscopic agglutination test
mg : milligramme
mL : millilitre
MLST : Multi locus sequence typing
MLVA : Analyse VNTR sur l*oci* multiples
µL : microlitre
µm : micromètre
Omp : Outer membran protein
OMS : Organisation mondiale de la santé
ONCFS : Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage
ONU : Organisation des Nations Unies
OR : odd ratio
pb : paires de bases
PCR : Polymerisation chain reaction
RIA : Radioimmunoassay
RFLP : Restriction Fragment Lenght Polymorphism
SID : Single injection daily
SPHS : Syndrome pulmonaire hémorragique sévère
ST : séquence type
t : tonne
UN : United Nations
UNAPAF : Union Nationale des Associations de Piégeurs Agréés de France
USA : United States of America
VNTR : Variable Nucléotide Tandem Repeat
WHO : World Health Organization

Abréviations de sérogroupes de leptospires

AUS : Australis
AUT : Autumnalis
BAL : Ballum
BAT : Bataviae
CAN : Canicola
CYN : Cynopteri
GRIP : Grippotyphosa
HEB : Hebdomadis
IH : Icterohaemorrhagiae
PAN : Panama
POM : Pomona
PYR : Pyrogenes
SEJ : Sejroe
TAR : Tarassovi

Liste des figures

- **Figure 1** : Leptospires, microscopie électronique 24
- **Figure 2** : Leptospire en microscopie électronique..... 28
- **Figure 3** : Diagramme représentant les nombres de gènes uniques et partagés parmi *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* et *L. biflexa* 29
- **Figure 4** : Pathogénie de l'infection leptospirosique 30
- **Figure 5** : Prophylaxie sanitaire en vue de réduire l'exposition à la leptospirose 47
- **Figure 6** : Incidence de la leptospirose en France en 2006 51
- **Figure 7** : Tropisme organique des leptospires et lésions ou signes cliniques associés 54
- **Figure 8** : Interrelations entre les acteurs épidémiologiques de la leptospirose et risque associé.....64
- **Figure 9** : Répartition du Ragondin en Europe en 2007 75
- **Figure 10** : Répartition du Ragondin en 1960 et en 1995 en France métropolitaine.....77
- **Figure 11** : Crâne de Ragondin 83
- **Figure 12** : Dessin d'une tête de Ragondin.....83
- **Figure 13** : Photo de Ragondin 83
- **Figure 14** : Schéma du pied postérieur du Ragondin 84
- **Figure 15** : Cypéracées 88
- **Figure 16** : Piège à double entrée 95
- **Figure 17** : Piège en X ou « Conibear ».....96
- **Figure 18** : Carte géographique de la Dombes 104
- **Figure 19** : Vue aérienne de la Dombes 105
- **Figure 20** : Etang de la fondation Vérot (réserve naturelle) 106
- **Figure 21** : Représentation schématique du gradient de végétation de la Dombes.....106
- **Figure 22** : Cartographie de la zone d'étude recouvrant les transects de prospection (Dombes).....107
- **Figure 23** : Coulée de Ragondin (Etang du Petit Laurencin, Dombes) 108
- **Figure 24** : Microscope à fond noir (photo personnelle, laboratoire leptospires de l'ENVL) 112
- **Figure 25** : Répartition des antigènes et sérums sur la plaque microtitre 113
- **Figure 26** : Observation d'épreuves d'agglutination microscopique des leptospires au microscope à fond noir.....115
- **Figure 27** : Pourcentages relatifs des différents sérogroupes de leptospires identifiés chez les Ragondins de la Dombes piégés en 2008 121
- **Figures 28** et **29** : Pourcentages relatifs des sérogroupes de leptospires identifiés chez le chien et chez les bovins séjournant en région Rhône-Alpes 124
- **Figure 30** : Nombre de cas de leptospiroses en France métropolitaine et en région Rhône-Alpes sur les 10 dernières années (Centre National de Référence de la leptospirose humaine, Institut Pasteur).125

➧**Figure 31** : Evolution du pourcentage relatif des six sérogroupes de leptospirose identifiés en France métropolitaine entre 1998 et 2008 (Centre National de Référence de la leptospirose humaine de l'Institut Pasteur) 126
➧**Figure 32** : Stomacher® 400, Seward®, France 129

Liste des tableaux

- **Tableau 1** : Nomenclature phénotypique : Sérogroupes et quelques sérovars de *L. interrogans*.....25
- **Tableau 2** : Espèces génomiques de leptospires et sérogroupes correspondants 27
- **Tableau 3** : Signes cliniques et biologiques de la leptospirose chez le chien 59
- **Tableau 4** : Classification taxinomique du Ragondin 82
- **Tableau 5** : Données environnementales des étangs de prospection 107
- **Tableau 6** : Batterie de sérovars utilisés dans le MAT et sérogroupes associés 113
- **Tableau 7** : Diagramme d'une plaque microfiltre dans la technique de dépistage groupé par agglutination microscopique 114
- **Tableau 8** : diagramme de détermination du titre en anticorps par agglutination microscopique 115
- **Tableau 9** : Séquences des amorces utilisées telles que publiées par Levett (2005).....118
- **Tableau 10** : Synthèse des résultats de la campagne de piégeage 2008 sur la Dombes.....120
- **Tableau 11** : Synthèse par étang des résultats de la campagne de piégeage 2008 dans la Dombes..121
- **Tableau 12** : Pourcentage de séropositivité par étang.....122
- **Tableau 13** : Synthèse des résultats PCR de la campagne de piégeage 2008 dans la Dombes.....122
- **Tableau 14** : Synthèse par étang des résultats PCR de la campagne de piégeage 2008 dans la Dombes.....123
- **Tableau 15** : Comparaison des résultats par PCR sur culture et sérologiques issus de la campagne de piégeage 2008 dans la Dombes 123
- **Tableau 16** : Répartition par espèce et par sérogroupe des sérums positifs sur la région Rhône-Alpes entre 2007 et 2009 124
- **Tableau 17** : Nombre de cas de leptospiroses en France métropolitaine et en région Rhône-Alpes sur les 10 dernières années (données issues du Centre National de Référence de la leptospirose humaine de l'Institut Pasteur) 125
- **Tableau 18** : Nombre de cas par sérogroupe en région Rhône-Alpes entre 1998 et 2005 (Centre National de Référence de la leptospirose humaine de l'Institut Pasteur).....127

Introduction générale

La faune et les habitats de France sont parmi les plus diversifiés d'Europe. A titre d'exemple, 65% de la faune vertébrée européenne séjourne sur le territoire français (Gautier, 2009). Toutefois, les pressions exercées par les activités humaines sur les espaces naturels et l'urbanisation croissante entraînent une diminution de surface et un morcellement des aires naturelles. A cela s'ajoute une augmentation des effectifs de faune sauvage depuis quelques années (Gautier, 2009). Il en résulte une interpénétration croissante des milieux de vie de l'homme et des espèces domestiques et sauvages.
Cette situation génère des conflits portant sur l'usage des zones naturelles, mais soulève également des problèmes sanitaires. En effet, de nombreuses espèces sauvages constituent des hôtes réservoirs d'agents pathogènes susceptibles d'être transmis à l'homme ou aux espèces domestiques. La cohabitation dans des espaces communs accroît donc le risque de contact et d'échange de ces agents.

La leptospirose est une zoonose qui s'inscrit parfaitement dans cette problématique. Le Rat en constitue le principal réservoir sauvage, mais de nombreuses autres espèces ont été identifiées comme hôtes réservoirs des leptospires (Zunino & Pizarro, 2007). Le Ragondin, espèce de rongeur exogène importée en France à la fin du XIXème siècle, en est un exemple. Il est aujourd'hui réparti sur la majorité du territoire, et son habitat s'étend jusque dans les zones urbanisées, où il colonise plans d'eau ou rivières.

Le travail présenté se décline en trois parties. Dans un premier temps, nous nous sommes consacrés à l'actualité, l'ubiquité et la complexité des leptospiroses. L'étude du Ragondin a fait l'objet de notre seconde partie, dans le but de dégager son rôle dans le cycle épidémiologique des leptospires. Enfin, nous avons entrepris d'illustrer, sur la base de résultats expérimentaux, l'impact sanitaire potentiel du Ragondin dans la Dombes (Ain). Ces travaux visent à évaluer le risque zoonotique de leptospirose lié à la présence de ragondins dans les zones humides. Ils sont le fruit de la collaboration entre la doctorante Julie Vein et ses encadrants, Philippe Berny, Agnès Leblond et Angeli Kodjo, qui travaillent respectivement dans les unités de recherche UMR 1233 INRA ENVL ISARA - Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques, INRA UR 346 Epidémiologie Animale de Clermont-Ferrand/Theix, et UMR CNRS 55 57 UCBL ENVL S/C INRA - Ecologie Microbienne .

PREMIERE PARTIE :

LA LEPTOSPIROSE, UNE ZOONOSE EMERGENTE ?

Introduction

La leptospirose est une infection bactérienne causée par des espèces pathogènes de spirochètes du genre *Leptospira*, sévissant dans les zones tropicales, subtropicales et tempérées (Levett, 2001).

Il convient de s'interroger sur le qualificatif de «maladie émergente » communément appliqué à la leptospirose dans les publications scientifiques. Ce terme désigne en effet une maladie dont l'incidence réelle augmente de manière significative dans une population, une région et une période données par rapport à la situation épidémiologique habituelle (Toma & Thiry, 2003). Or, jusqu'au séquençage du génome de certaines souches de *Leptospira* réalisé dans la dernière décennie, la leptospirose demeurait méconnue. Aujourd'hui encore, elle reste largement sous diagnostiquée, tant en médecine humaine que vétérinaire, et ce indépendamment de l'indice de développement des pays. Du progrès effectué dans le dépistage et la connaissance de la maladie peut donc résulter une « émergence » artéfactuelle, non pas liée à la recrudescence du nombre de cas, mais plus vraisemblablement à la recrudescence du nombre de cas dépistés.

En outre, bien plus qu'une zoonose « émergente », la leptospirose apparaît fondamentalement être une zoonose des « pays émergents », d'Amérique Latine ou du sud de l'Asie, où elle est endémique depuis plusieurs siècles (Vijayachari *et al*., 2008). Primitivement cantonnée aux populations rurales pauvres exposées, la leptospirose est aujourd'hui ubiquiste et s'est transposée aux quartiers pauvres des villes. La leptospirose a défrayé l'actualité scientifique avec l'augmentation de l'incidence de cas survenus dans des pays industrialisés à la suite d'évènements sportifs aquatiques, ou contractés par des voyageurs s'adonnant à du tourisme aventure dans des zones d'endémie (McBride *et al*., 2005). Ces observations ont, sans doute, contribué à renforcer ce sentiment d'émergence.

Néanmoins, du fait des incidents climatiques toujours plus nombreux, notamment des inondations et cyclones, de nombreux foyers se déclarent, et l'incidence annuelle est aujourd'hui estimée à plus d'un demi million de cas humains dans le monde (Picardeau *et al*., 2008a). Par ailleurs, la surpopulation et l'extension irrémédiable des bidonvilles, qui vont de pair avec un niveau d'hygiène précaire et un contact accru avec les rongeurs -réservoirs animaux principaux de la maladie- majorent le risque de survenue de foyers. Enfin, les modifications climatiques ou encore l'introduction d'espèces exogènes concourent à l'apparition de la leptospirose dans des régions géographiques autrefois épargnées.
Aussi, après avoir entrepris d'étudier les caractères bactériologiques des leptospires, nous situerons l'importance épidémiologique et médicale de la maladie, chez l'homme et chez nos principales espèces domestiques. De ces connaissances fondamentales et des particularités inhérentes au cycle des leptospires, nous envisagerons les applications en terme de protection publique et de prophylaxie sanitaire et médicale.

Préambule : de la découverte de la leptospirose et des leptospires

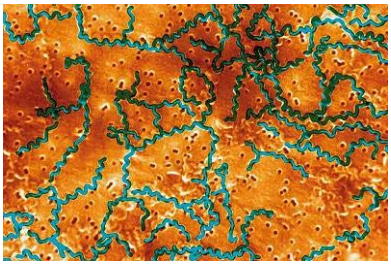


Figure 1 : Leptospires, microscopie électronique (Encyclopédie Larousse, [en ligne])

En Mésopotamie comme dans la Chine antique, des maladies cliniquement proches de la leptospirose étaient décrites chez les populations de riziculteurs, mais ce n'est qu'en 1886 que la leptospirose fut identifiée pour la première fois de manière univoque par Adolf Weil. Ce dernier décrivit un syndrome caractérisé par l'association de néphrite, d'ictère et de splénomégalie, d'où naquit la dénomination « maladie de Weil », correspondant à l'une des formes de la leptospirose (Vijayachari *et al.*, 2008 ; Ristow, 2007).

En 1907, Stimson releva la présence de micro-organismes spiralés dans un prélèvement de rein humain suite au décès d'un patient suspecté d'avoir contracté la fièvre jaune. Il les dénomma *Spirochaeta interrogans* du fait de leur forme en point d'interrogation (figure 1). Ce n'est toutefois qu'en 1915 que fut isolé pour la première fois l'agent étiologique de la leptospirose par une équipe de recherche japonaise conduite par Inada et Ido (Levett, 2001). Cette même équipe, de 1916 à 1918, reproduisit expérimentalement l'infection et la maladie de Weil chez le Cochon d'Inde en utilisant du sang d'animaux infectés. Huebener et Reiter, à la même époque mais en Europe, obtinrent des résultats similaires (Vijayachari *et al.*, 2008 ; Ristow, 2007).

Outre la maladie de Weil, d'autres formes de la maladie furent identifiées, tels l'ictère de la culture de riz *wei ni*, la fièvre des sept jours '*nanukayami*', et la fièvre hémorragique d'Andaman. Les années 1930-1940 furent également marquées par la description de formes anictériques, par la découverte d'autres types de *Leptospira* et par la mise en évidence de la maladie chez les animaux (Vijayachari *et al.*, 2008 ; Ristow, 2007).

I. Bactériologie appliquée aux leptospires

1. Taxinomie

1.1 Taxinomie fondamentale

Les leptospires appartiennent à la division des gracillicutes, à la classe des Scotobacteria, à l'ordre des Spirochaetales et à la famille des Leptospiraceae, qui inclut trois genres : *Leptospira*, *Leptonema* et *Turneria* (Vijayachari *et al*., 2008).

1.2 Ancienne nomenclature

La taxinomie bactérienne a longtemps été fondée sur une classification phénotypique. Cette classification utilise un faible nombre de caractères considérés comme importants tels que la morphologie, la présence d'une spore, la mise en évidence d'un caractère biochimique jugé essentiel, l'habitat ou le pouvoir pathogène par exemple (Euzéby, 2008).

Sérogroupes	Sérovars
Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae, copenhageni, lai, zimbabwe
Canicola	canicola
Sejroe	sejroe, hardjo, saxkoebing
Australis	Australis, bratislava, lora
Pomona	pomona
Panama	panama, mangus
Grippotyphosa	grippotyphosa, canalzonae, ratnapura
Hebdomadis	hebdomadis, jules, kresmatos
Autumnalis	autumnalis, fortbragg, bim, weerasinghe
Bataviae	bataviae,
Javanica	javanica
Cynopteri	cynopteri
Djasiman	djasiman
Sarmin	sarmin
Mini	mini, georgia
Tarassovi	tarassovi
Ballum	ballum
Celledoni	celledoni
Louisiana	louisiana, lanka
Ranarum	ranarum
Manhao	manhao
Shermani	shermani
Hurstbridge	hurstbridge

Tableau 1 : Nomenclature phénotypique : Sérogroupes et quelques sérovars de *L. interrogans*

Ainsi, jusqu'en 1989, le genre *Leptospira* était divisé en deux espèces (Levett, 2004) :

- *L. interrogans*, regroupant toutes les souches pathogènes, et
- *L. biflexa*, regroupant les souches saprophytes.

Ces deux espèces étaient divisées en de nombreux sérovars, eux-mêmes subdivisés en souches. Les sérovars présentant des homologies antigéniques étaient traditionnellement regroupés en sérogroupes (tableau 1). Vingt-cinq sérogroupes regroupant 268 sérovars ont ainsi été dénombrés ! Cette classification en sérogroupes, bien que dénuée de fondements taxinomiques, était d'une grande utilité pour les épidémiologistes. A tel point que les études épidémiologiques actuelles et le diagnostic expérimental se basent encore largement sur cette ancienne nomenclature (Michel *et al*., 2002 ; Levett, 2001, Haake *et al*., 2002).
Mais la classification phénotypique a l'inconvénient de ne refléter qu'une quantité d'information réduite. De plus le choix de critères qualifiés d' « importants » est subjectif et constitue une source potentielle d'instabilité. Cette classification a donc ensuite été complétée par une classification génotypique (Euzéby, 2008).

1.3 Nouvelle nomenclature

La nouvelle nomenclature, fondée sur des critères génétiques, fournit une base solide pour l'approfondissement des connaissances sur la leptospirose, et se révèle pertinente d'un point de vue taxinomique. En revanche, cette nouvelle classification moléculaire est incompatible avec le système de sérogroupes qui était et est encore aujourd'hui utilisé par les cliniciens et épidémiologistes (Levett, 2004).

Pour comprendre le principe et les fondements de la nouvelle nomenclature, il convient de revenir sur la définition d'espèce bactérienne, ou « genomospecies ». En 1987, le comité « Wayne *et al.* » a donné une première définition phylogénétique de l'espèce bactérienne. Selon ce comité, une espèce bactérienne est définie génétiquement comme le rassemblement de souches ayant des relations ADN-ADN qui se traduisent à la fois par des valeurs d'hybridation supérieures ou égales à 70% et par une différence de stabilité thermique ($DT_{m(e)}$) inférieure ou égale à 5 °C (Euzéby, 2008).

Les premières études génotypiques ont abouti à la définition de dix espèces génomiques de *Lesptospira* (tableau 2). Six autres espèces génomiques ont été identifiées par la suite, puis quatre plus récemment, portant à 20 le nombre d'espèces génomiques actuellement identifiés de *Leptospira* (Picardeau *et al*., 2008a).
Les espèces génomiques de *Leptospira* ne correspondent donc pas à la précédente dichotomie (*L. interrogans* et *L. biflexa*) et certaines espèces actuelles comprennent à la fois des souches pathogènes

et non pathogènes. Il s'est même avéré que des souches appartenant à deux espèces génomiques différentes, possédaient les mêmes antigènes O (partie variable du lipopolysaccharide) et avaient donc été classées auparavant dans le même sérovar (Levett, 2004).

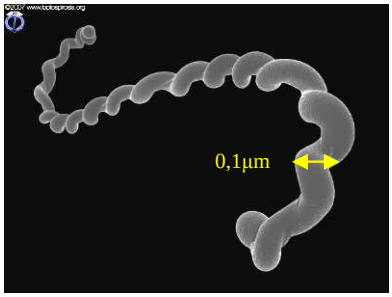
	Espèces	Sérogroupes
ESPECES PATHOGENES DE LEPTOSPIRES	*L. borgpetersenii*	Javanica, Ballum, Hebdomadis, Sejroe, Tarassovi, Mini, Celledoni, Pyrogenes, Bataviae, Australis, Autumnalis
	L. interrogans	Icterohaemorrhagiae, Canicola, Pomona, Australis, Autumnalis, Pyrogenes, Sejroe, Grippotyphosa, Djasiman, Hebdomadis, Mini, Bataviae, Louisiana, Sarmin, Ranarum
	L. alexanderi	Manhao, Hebdomadis, Javanica, Mini
	L. alstonii	
	L. noguchii	Panama, Autumnalis, Pyrogenes, Louisiana, Bataviae, Tarassovi, Shermani, Australis, Pomona, Djasiman
	L. kirshneri	Grippotyphosa, Autumnalis, Cynopteri, Hebdomadis, Australis, Pomona, Djasiman, Canicola, Icterohaemorragiae, Bataviae
	L. licerasiae	
	L. terpstrae	
	L. santarosai	Shermani, Hebdomadis, Tarassovi, Pyrogenes, Autumnalis, Bataviae, Mini, Grippotyphosa, Sejroe, Pomona, Javanica, Sarmin, Cynopteri
	L. weilii	Celledoni, Icterohaemorrhagiae, Sarmin, Javanica, Mini, Tarassovi, Hebdomadis, Pyrogenes, Manhao, Sejroe
	L. wolffii	
ESPECES INTERMERDIAIRES DE LEPTOSPIRES	*L. inadai*	Lyme, Shermani, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Manhao, Canicola, Panama, Javanica
	L. fainei	Hurstbridge
	L. broomii	
ESPECES SAPROPYTES DE LEPTOSPIRES	*L. meyeri*	Ranarum, Semaranga, Sejroe, Mini, Javanica
	L. biflexa	Semaranga, Andamana
	L. yanagawae	
	L. kmetyi	
	L. vanthielii	
	L. wolbachii	Codice

Tableau 2 : Espèces génomiques de leptospires et sérogroupes correspondants (Adler & De la Peña Moctezuma, 2009 ; Levett, 2004 ; Perrin, 2009)

L. interrogans et *L. borgpetersenii* constituent deux des plus importantes espèces pathogènes. Combinées, elles sont responsables de la grande majorité des cas humains de leptospirose et regroupent 48% des 230 sérovars connus (Bulach *et al*., 2006).

2. Caractères bactériologiques

Les leptospires sont des bactéries aérobies strictes longues, fines et spiralées (le terme « leptospira » vient du grec leptós = fin, petit, délicat et speira = boucle, spire) avec des extrémités en crochets ou



spiralées (figure 2). Leur longueur est comprise entre 6 et 20 micromètres (µm) tandis que leur diamètre mesure 0,1 µm. L'amplitude de l'hélice est comprise entre 0,1 et 0,15 µm et le pas d'hélice mesure approximativement 0,5 µm.

Figure 2 : Leptospire en microscopie électronique (www.leptospirosis.org)

La structure du germe comprend un cylindre protoplasmique hélicoïdal délimité par une membrane peptidoglucidique. L'ensemble du germe est engainé par une enveloppe externe. L'espace péri-cytoplasmique comprend deux flagelles insérés aux pôles du spirochète, rendant la bactérie particulièrement mobile. Les leptospires sont catalase et oxydase positives (Bharti *et al*., 2003).

L'architecture de la bactérie regroupe des caractères appartenant à la fois aux bactéries Gram négatif et Gram positif, mais les leptospires ne prennent pas la coloration de Gram. La constitution de la double membrane rappelle celles des bactéries Gram négatif tandis que l'attachement du peptidoglycane à la membrane interne évoque un caractère de bactérie Gram positif. Ces caractères rendent sensibles les leptospires à un large panel d'antibiotiques. Les lipopolysaccharides (LPS) constituent les principaux antigènes de la membrane externe, mais s'avèrent peu toxiques en comparaison de ceux de *E.Coli* (Adler & De la Peña Moctezuma, 2009 ; Vijayachari *et al*., 2008).

La surface cellulaire des leptospires est dominée par le LPS, éminemment variable selon les souches. La multiplicité des sérovars procéderait d'ailleurs essentiellement de la variation de ces épitopes. Par opposition, les protéines de la membrane externe sont très conservées parmi les différentes souches de leptospires. Deux grands types sont distingués : les lipoprotéines et les protéines transmembranaires (Pinne & Haake, 2009). Chez les souches pathogènes, la lipoprotéine LipL32 représente 75% des protéines de la membrane externe (Murray *et al*., 2009b).

3. Microbiologie

Le séquençage de *L.. interrogans* sérovar Lai a été établi en Chine, tandis que celui de *L. interrogans* sérovar Copenhageni souche Fiocruz L1-130 a été établi au Brésil. Ces deux sérovars ont montré de fortes homologies (Bharti *et al*., 2003 ; McBride *et al*., 2005).
Actuellement, six séquençages de génomes de leptospires ont été publiés. Outre les deux précités, deux souches de *L. borgpetersenii* sérovar Hardjo et deux souches de *L. biflexa* sérovar Patoc ont été séquencées (Adler & De la Peña Moctezuma, 2009 ; Picardeau *et al*., 2008a).

L. interrogans contient un grand chromosome circulaire de 4,33 millions de bases, et un petit chromosome circulaire de 359 000 bases. 3379 gènes ont été identifiés, soit 211 gènes de moins que *L. biflexa*, qui contient 3590 gènes (Majed *et al*., 2005 ; Adler & De la Peña Moctezuma, 2009).

Les espèces saprophytes et pathogènes de leptospires appartiennent à deux groupes phylogéniques distincts, partageant en commun 2052 gènes, dont l'on présume qu'ils constituent le noyau génétique du genre *Leptospira*. Ainsi, la plupart des catégories fonctionnelles (métabolisme ADN et ARN, sécrétion et synthèse de protéines, structure cellulaire, métabolisme énergétique et intermédiaire) impliquées dans les mécanismes fondamentaux de survie des leptospires sont représentées dans ce noyau génétique (figure 3) (Picardeau *et al*., 2008a).

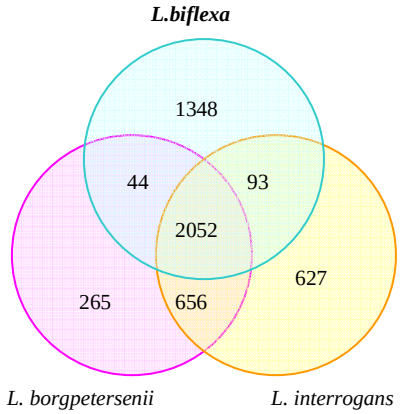


Figure 3 : Diagramme représentant les nombres de gènes uniques et partagés parmi *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* et *L. biflexa* (d'après Picardeau *et al.*, 2008a)

4. Biologie

4.1 Habitat

Le genre *Leptospira* contient des espèces pathogènes et saprophytes qui diffèrent dans leur capacité de survie dans l'environnement. Leurs milieux électifs varient ainsi de l'eau ou de la boue aux tissus de mammifères hôtes colonisés durant l'infection chronique ou aiguë (Picardeau *et al*., 2008a).

Les souches pathogènes et saprophytes de leptospires peuvent former des biofilms d'architecture spécifique sur des surfaces abiotiques *in vitro*. La propension des souches pathogènes de leptospires à former des biofilms pourrait être l'un des principaux facteurs présidant à leur survie à long terme dans un environnement aqueux. La formation de biofilms pourrait également jouer un rôle important dans le maintien du portage chronique de *L. interrogans* chez les hôtes réservoirs (Ristow *et al*., 2008).

Aussi les leptospires peuvent-elles survivre durant de longues périodes dans l'environnement (Vijayachari *et al*., 2008). Elles s'y multiplient même probablement lorsque les conditions sont favorables. Toutefois, la survie des leptospires est conditionnée par la présence d'un environnement

liquide, à pH neutre ou légèrement alcalin (pH 7,2 à 8), chargé de matières organiques et à l'abri des rayons ultraviolets capables de les inactiver. La température doit être douce, de l'ordre de 20°C, car les leptospires sont sensibles à la chaleur (Zunino & Pizarro, 2007 ; Luciani, 2004). Du fait de ces propriétés, les leptospires peuvent survivre dans des urines alcalines, mais sont peu adaptées à des urines acides.

4.2 Résistance aux agents physico-chimiques

Les leptospires sont sensibles à la chaleur (> 60°C), à la salinité, aux ultraviolets, aux désinfectants classiques (alcool, ammoniums quaternaires, aldéhydes), aux pH acides ou très alcalins (>8) et à la dessiccation (INRS, 2009).

4.3 Pathogénie et facteurs de virulence

4.3.1 Pathogénie (figure 4)

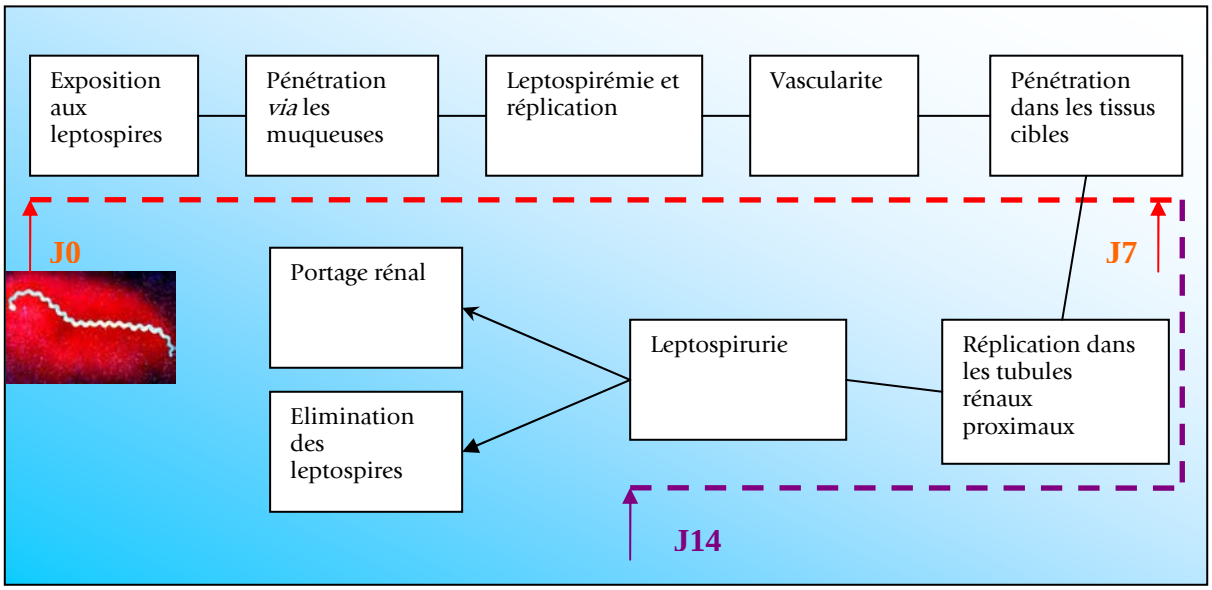


Figure 4 : Pathogénie de l'infection leptospirosique

Les leptospires pénètrent chez leur hôte *via* des microcoupures ou abrasions de la peau ainsi qu'au travers de muqueuses, ou tout simplement à travers la peau humide. Il s'ensuit une leptospirémie, qui se prolonge jusqu'à sept jours post infection. Les bactéries sanguines sont alors détruites par opsonophagocytose. Si le nombre de leptospires dans le sang et les tissus a pu atteindre un seuil critique, des lésions surviennent, dues à l'action des toxines bactériennes ou de composants cellulaires toxiques. Des lésions de l'endothélium des petits vaisseaux sanguins sont les premières à se développer, entraînant des phénomènes ischémiques. Selon l'organe atteint, une nécrose tubulaire

rénale, des lésions pulmonaires, une méningite, une myosite ou encore une placentite s'installent. Les lésions tissulaires, aussi sévères soient-elles, demeurent réversibles si les défenses immunitaires se développent suffisamment rapidement. Dans les reins, les leptospires semblent se déplacer *via* les jonctions intercellulaires puis colonisent les cellules épithéliales des tubules rénaux proximaux (McBride *et al*., 2005 ; Adler & De la Peña Moctezuma, 2009).
Une fois la maladie installée, elle évolue vers la mort ou vers l'installation d'une immunité protectrice, engendrant l'élimination du micro-organisme ou le développement de l'état de porteur chronique (Ristow, 2007). Des leptospires ont été détectés par PCR sur urine plus d'un an après infection chez l'homme (Bal *et al*., 1994).

4.3.2 Facteurs d'hôte et facteurs de virulence

La déclaration d'une forme clinique de leptospirose procède :

- de la charge bactérienne de l'*inoculum* lors de l'infection,
- de facteurs d'hôte,
- des facteurs de virulence de la bactérie.

➦ Certains facteurs génétiques de sensibilité d'hôte à la leptospirose ont été identifiés. Une étude impliquant les triathlètes du lac Springfield (foyer de leptospirose, Etats-Unis, 1998) a permis d'établir une corrélation entre le génotype correspondant à l'antigène de leucocyte humain (HLA) –DQ6 et le risque de contracter la leptospirose. Ainsi, les triathlètes « positifs » pour HLA-DQ6 avaient 2,8 fois plus de chances (OR=2 ,8 ; p=0,04) que les autres de contracter la leptospirose (Lingappa *et al*., 2004).

➦ Le premier facteur de virulence de *Leptospira* mis en évidence génétiquement fut la lipoprotéine de surface Loa22. Bien que la fonction de cette protéine demeure inconnue, un transposon mutant du gène *loa22* a pu être atténué chez des modèles animaux (hamster et cochon d'Inde) de leptospirose aiguë (Ristow *et al.*, 2007). L'existence de cette protéine chez l'espèce saprophyte *L. biflexa* suggère que cette protéine est surtout impliquée dans un mécanisme de survie (Picardeau *et al*., 2009).

Il semblerait que la lipoprotéine de surface LipL32, absente chez les espèces saprophytes de leptospires mais qui représente à elle seule 75% des protéines de la membrane externe des leptospires pathogènes, ne joue aucun rôle dans l'infection chronique ou aiguë. Ainsi, l'inoculation du hamster (modèle expérimental de l'infection aiguë par les leptospires) à partir de souches de leptospires mutantes dénuées de lipoprotéines de surface LipL32 a entraîné une forme aiguë de leptospirose suivant exactement le même schéma que lors d'inoculation par une souche pathogène sauvage. Quant au rat (modèle expérimental de l'infection chronique par les leptospires), son infection expérimentale

par ces mêmes souches s'est traduite par une colonisation des tubules rénaux aussi efficace que celle causée par les souches sauvages (Murray *et al*., 2009b).

Des protéines bactériennes Lig (Immunoglobulin Like) présentant des domaines communs avec certains facteurs de virulence tels que l'intimine ou l'invasine, ont été récemment découvertes. Les gènes *lig* s'avèrent présents chez les espèces pathogènes et absents chez les espèces saprophytes. Leur expression est réduite ou inhibée lorsque des souches virulentes sont atténuées par des passages successifs en culture. Les protéines Lig pourraient donc jouer un rôle dans la virulence des leptospires. Elles seraient notamment impliquées dans l'adhésion aux tissus hôtes (Picardeau *et al*., 2008a ; McBride *et al*., 2005).

La capacité des leptospires à envahir rapidement (en vingt minutes) les cellules Véro (modèles expérimentaux de fibroblastes) et à induire l'apoptose des macrophages a été associée à la virulence de ces bactéries (Merien *et al*., 1997). Les leptospires pourraient par ce processus se soustraire rapidement aux défenses immunitaires de l'hôte.

En comparant la teneur en antigènes O du LPS des leptospires récoltés sur des rats infectés chroniques et sur des cochons d'Inde présentant une leptospirose aiguë, Nally et ses collaborateurs (2005) ont démontré que la teneur en antigène O était plus importante sur les rats que sur les cochons d'Inde. Ces observations ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle la régulation de l'antigène O déterminerait le caractère chronique ou aigu de l'infection par *Leptospira* (Nally *et al*., 2005).

Enfin, sept gènes codant des sphyngomyélinases ont été identifiés chez différentes espèces pathogènes de leptospires. Leur absence chez l'espèce saprophyte *L. biflexa* a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle ces sphyngomyélinases pourraient jouer un rôle dans la virulence des leptospires, mais leur rôle demeure controversé. Ces sphyngomyélinases pourraient simplement jouer un rôle dans l'acquisition de nutriments chez l'hôte mammifère (Picardeau *et al*., 2008 ; Bulach *et al*.., 2006 ; Merien *et al*., 1997).

5. Diagnostic de laboratoire

Du fait de la faible spécificité des signes cliniques de la leptospirose d'une part, et des paramètres biologiques d'autre part, le recours au diagnostic de laboratoire est incontournable pour confirmer une suspicion diagnostique.

5.1 Diagnostic direct

5.1.1 Observation microscopique

A partir de prélèvements biologiques (sang, urine ou fluide de dialyse notamment) ou d'eau et de boue, les leptospires peuvent être visualisées soit au moyen d'un microscope à fond noir, soit par immunofluorescence ou microscopie compensée par un marquage approprié. La sensibilité et la spécificité sont toutefois faibles : 10^4 à 10^5 leptospires/ml sont nécessaires pour qu'une cellule par champ microscopique soit visible en microscopie à fond noir, et les confusions avec des amas de protéine ou de fibrine sont fréquentes. L'observation microscopique du sang de malade suspect n'est pertinente que durant les premiers jours de l'infection aiguë, à la faveur de la leptospirémie.
Des méthodes de marquage ont été développées afin d'améliorer la sensibilité de l'observation microscopique. Celles-ci incluent notamment le marquage par immunofluorescence, expérimenté sur de l'urine de bovin et sur des prélèvements d'eau et de boue, et le marquage par immunoperoxydase du sang et de l'urine (Levett, 2001 ; Bolin, 1996).

5.1.2 Mise en culture et isolement de leptospires

La détection des leptospires par culture constitue un diagnostic de certitude, mais pâtit des faibles taux de croissance de certaines souches de *Leptospira* et des longues périodes d'incubation nécessaires à l'installation d'une souche.
Les leptospires peuvent être cultivés dans un milieu artificiel contenant 10% de sérum de lapin ou 1% d'albumine de sérum de bovin, avec des acides gras à longue chaîne à un pH compris entre 6,8 et 7,4. La température optimale de croissance est comprise entre 28 et 30°C. Il convient de s'assurer de l'absence de bactéries contaminantes après 3-4 jours. Les milieux peuvent être rendus sélectifs par l'addition de différents antibiotiques, dont les plus usités sont le 5-fluorouracile et le sulfate de néomycine. La rifampicine, la vancomycine et la polymyxine B peuvent également être employées. Le milieu d'Ellinghausen-McCullough modifié par Johnson et Harris (EMJH) est fréquemment employé. Il contient 1% d'albumine de sérum de bovin et du Tween 80® (source d'acides gras à longue chaîne).
L'incubation pendant au moins 13 semaines à 30°C avec examen hebdomadaire par microscopie optique à fond noir est nécessaire pour affirmer le caractère négatif d'une culture.
La mise en culture n'est pas considérée comme un test pertinent de routine pour le diagnostic de la leptospirose mais elle reste incontournable pour des études épidémiologiques et l'identification précise du sérovar de l'espèce génomique infectante (Bharti *et al*., 2003 ; Adler & De la Peña Moctezuma, 2009 ; Levett, 2004).

5.1.3 Détection antigénique

Les méthodes ELISA (Enzyme-Linkes Immunosorbent Assay) et RIA (Radioimmunoassay) peuvent respectivement détecter 10^5 et 10^4 leptospires/ml. Récemment, une méthode par capture immunomagnétique d'antigènes associée à une méthode d'immunofluorescence a permis de détecter 10^2 leptospires/ml dans de l'urine de bovins infectés par le sérovar hardjo (Levett, 2001).

Les protéines recombinantes font l'objet de recherches en vue du développement de tests de détection rapide. Les études portant sur les protéines recombinantes LipL32 (= Hap1) et GroEL n'ont pas apporté totale satisfaction. La protéine de leptospire apparentée aux immunoglobulines (Lig) est en revanche très prometteuse. Les essais immunologiques basés sur cette protéine ont montré une sensibilité et une spécificité bien supérieure à ceux basés sur la bactérie entière (McBride *et al*., 2005).

5.1.4 PCR, intérêt et inconvénients des cibles les plus employées

Plusieurs protocoles PCR destinés à détecter l'ADN des leptospires ont été développés depuis les années 1990, mais le diagnostic par PCR n'est pas encore employé en routine. La plupart des protocoles ont montré une bonne sensibilité, avec un seuil de détection limité à 1-10 leptospires/ml (Gravekamp *et al.*, 1992), mais seuls deux ont été plus largement évalués dans des études cliniques. Le protocole de Merien et de son équipe (1995) repose sur une technique spécifique de genre permettant la détection des espèces saprophytes et pathogènes de leptospires. Les amorces utilisées amplifient un fragment de 331 paires de bases (pb) de l'ARN ribosomal 16S. Dans le cas d'une contamination d'individus par des leptospires non pathogènes, cette méthode pourrait donc aboutir au diagnostic de faux positifs. Une autre approche, plus discriminante, a été développée par Gravekamp et son équipe (1992). Celle-ci requiert deux sets d'amorces. Le premier comprend les amorces G1 et G2 utilisées pour la détection des sérovars pathogènes. Cependant, comme elles n'amplifient pas les sérovars de *L. kirshneri*, un second set d'amorces constitué par B64-I et B64-II doit être utilisé (Gravekamp *et al*., 1992 ; Merien *et al*., 1995).

L'équipe de Gravekamp et Bal a évalué la pertinence du diagnostic de la leptospirose par PCR à partir d'échantillons d'urine provenant d'hommes malades (Bal *et al*., 1994). Les leptospires furent détectés dans 26 sur 29 (90%) des échantillons d'urine. Bien qu'il soit communément admis que la leptospirurie ne débute qu'à partir de la seconde semaine de la maladie, les leptospires furent détectés dans huit échantillons d'urine de patients dont la maladie évoluait depuis moins de huit jours. De plus, seuls deux sur sept des sérums correspondants ont donné des résultats positifs en PCR ! L'analyse PCR sur l'urine pourrait donc être une méthode plus sensible que l'analyse PCR sur sérum pour le diagnostic précoce de leptospirose, contrairement à ce que le schéma pathogénique de l'infection

laisse supposer. De plus, la méthode PCR sur urines s'est avérée deux fois plus sensible que la mise en culture (Bal *et al*., 1994).
Vinetz et ses collaborateurs (1996) ont également utilisé avec succès la PCR pour diagnostiquer précocement une leptospirose chez deux patients, respectivement sur sérum et liquide céphalorachidien.
L'usage de la PCR dans le diagnostic de la leptospirose est donc prometteur. Il sous-tend d'évaluer le plus précisément possible le jour de la contamination afin de réaliser des prélèvements adéquats correspondant avec la phase de leptospirémie ou de leptospirurie. Les chances de détecter l'ADN bactérien seront ainsi optimisées.

La PCR constitue également un outil permettant l'évaluation précise de la charge bactérienne chez des patients atteints de leptospirose. Ces méthodes ont été utilisées pour démontrer que la leptospirémie était supérieure à 10 000 bactéries par millilitre de sang chez les patients atteints de Syndrome Pulmonaire Hémorragique Sévère (SPHS) (McBride *et al*., 2005 ; Adler & De la Peña Moctezuma, 2009). Enfin, la sensibilité de la PCR peut encore être améliorée en utilisant une PCR quantitative associée soit à la technique TaqMan® (Slack *et al*., 2007), soit à la fluorescence SYBR Green®.

5.2 Diagnostic indirect

De nombreux cas de leptospirose sont diagnostiqués par sérologie. Les anticorps (IgM) sont décelables dans le sang cinq à sept jours après le début des symptômes. Du fait de la réponse immunitaire, les leptospires ne sont plus détectables dans le sang à partir du dixième jour de maladie (Bal *et al*., 1994).

5.2.1 Test d'agglutination microscopique (MAT = Microscopic Agglutination Test)

La méthode de référence pour le diagnostic sérologique de la leptospirose est le test d'agglutination microscopique (MAT). Cette méthode, anciennement désignée sous le terme de réaction d'agglutination-lyse de Martin et Pettit, consiste à évaluer au microscope à fond noir le pourcentage d'agglutination de suspensions de souches représentatives de différents sérogroupes de leptospires en présence de différentes dilutions du sérum du patient. Le seuil de positivité en France est fixé à 1/100ème. La séroconversion est confirmée lorsque le titre est multiplié par 4 entre deux prélèvements espacés de deux à trois semaines. Le MAT est une épreuve spécifique de sérogroupe : le panel d'antigènes utilisés doit donc inclure des sérovars représentatifs de tous les sérogroupes, ainsi que tous les sérovars communs dans la zone géographique d'origine du patient. L'un des sérovars des espèces non pathogènes de leptospires (*L. biflexa*) peut être inclus car des réactions croisées existent. Cette précaution permet parfois de confirmer un diagnostic si le sérogroupe infectant n'est pas dans le panel utilisé (Levett, 2001).

Le MAT est un test complexe dans son contrôle, sa réalisation et dans son interprétation. Des cultures vivantes de tous les sérovars doivent être entretenues afin de conserver des antigènes. Or, la culture hebdomadaire répétée de souches représente un danger pour le personnel de laboratoire. Un autre désavantage de cette technique consiste en un risque permanent de contamination croisée des cultures d'antigènes, nécessitant la vérification périodique de chaque sérovar (Levett, 2001).

Le MAT est lu au microscope à fond noir. Le point final *(end point*) correspond à la plus haute dilution de sérum pour laquelle un pourcentage d'agglutination de 50% est encore observé. En raison de la difficulté d'appréciation du pourcentage d'agglutination de 50%, le point final est évalué par la présence d'approximativement 50% de leptospires libres et non agglutinés, et comparé avec une suspension contrôle sans agglutination. Des efforts considérables sont requis afin de réduire la part de subjectivité liée à l'interprétation du degré d'agglutination. A cet effet, il est préférable que ce soit toujours le même personnel qui réalise la lecture microscopique. L'interprétation est encore compliquée par le fort pourcentage de réactions croisées qui se produisent entre différents sérogroupes, notamment dans les prélèvements en phase aiguë. Ces réactions demeurent dans une certaine mesure interprétables, les patients ayant souvent des titres similaires pour tous les sérovars appartenant à un même sérogroupe. Des réactions paradoxales sont assez communes, au cours desquelles les titres les plus élevés sont détectés pour un sérogroupe non relié au sérogroupe infectant. Les prélèvements effectués durant la phase de convalescence montrent en revanche une bonne spécificité de sérogroupe. Cette différence est à attribuer à la détection concomitante par la technique MAT des immunoglobulines M et G (IgM et IgG) ainsi qu'à la présence de nombreux antigènes communs parmi les leptospires (Levett, 2001).

Des sérums appariés sont requis afin de confirmer un diagnostic de leptospirose avec certitude. Les titres doivent être multipliés par 4 ou davantage entre chacun des prélèvements. L'intervalle entre le premier et le second prélèvement dépend du délai entre l'apparition des symptômes et la présentation du patient. Si les symptômes visibles de la leptospirose sont présents, il faut compter trois à cinq jours pour déceler une élévation du titre en anticorps. Cependant, si le patient est admis plus tôt dans l'évolution de la maladie ou si la date d'apparition des symptômes est inconnue, il est recommandé d'attendre 10 à 14 jours entre les deux prélèvements. Notons que les patients atteints de leptospirose fulminante peuvent mourir avant toute séroconversion (Levett, 2001).

Une infection aiguë doit être envisagée lors d'une simple élévation du titre concomitante à un syndrome fébrile. La définition actuelle du Centre de Contrôle des Maladies d'un cas est la suivante : un titre $\geq$ 200 associé avec des signes cliniques compatibles. Toutefois, la magnitude du titre dépend du niveau d'exposition de la population. Ainsi, dans les zones où la leptospirose est endémique, des

titres de l'ordre de 800 à 1600 chez des patients symptomatiques seront indicatifs de leptospirose. Les titres faisant suite à une infection aiguë peuvent être extrêmement élevés (≥ 25 600) et peuvent mettre des mois, voire des années à redescendre. Il est bien souvent impossible de déterminer un sérogroupe prédominant plusieurs mois après infection, car les titres des différents sérogroupes décroissent à des vitesses différentes (Levett, 2001).

Des antigènes formolés puis lyophilisés ont été utilisés en MAT afin de surmonter certaines des difficultés liées à l'usage d'antigènes vivants. Les titres obtenus avec ces antigènes sont souvent plus bas, et de plus nombreuses réactions croisées sont détectées. L'agglutination d'antigènes traités par le formol est qualitativement différente de celle observée avec des antigènes vivants ; elle constitue cependant une alternative intéressante pour les laboratoires ne disposant pas d'un personnel ou d'une expertise permettant la culture et l'entretien d'antigènes vivants (Levett, 2001).

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

5.2.2 Autres tests sérologiques

Du fait de la complexité de mise en œuvre du MAT, d'autres tests sérologiques rapides utilisables lors d'infection aiguë ont été développés. Aujourd'hui, ce sont principalement des méthodologies basées sur la technique ELISA. Les anticorps IgM étant décelables dès la première semaine de maladie, il devient possible de confirmer rapidement le diagnostic de leptospirose et, par là même, d'initier un traitement antibiotique approprié au moment où il est susceptible d'avoir le plus d'efficacité (Levett, 2004).

La lipoprotéine recombinante rLipL32 constitue un antigène utilisable dans la détection d'IgG par ELISA chez les bovins. Une étude récente réalisée sur sérums de bovins a en effet montré que l'antigène LipL32 avait une sensibilité aussi bonne que la détection par agglutination microscopique (MAT) (Quaresma Bomfim *et al*., 2005). La sensibilité de rLipL32 s'est avérée légèrement moins bonne que celle du MAT dans des études de diagnostic de leptospiroses humaines et canines (97% de sensibilité et de spécificité par rapport au MAT pour la leptospirose canine).

De nombreux tests basés sur la détection d'IgG par ELISA sont aujourd'hui disponibles en médecine vétérinaire. Ces tests sont bien souvent spécifiques de sérovars : hardjo et pomona pour les bovins et hardjo pour les moutons par exemple (Levett, 2001).

5.2.3 Immunofluorescence indirecte (IFI)

Les techniques d'immunofluorescence sont parfois utilisées dans le diagnostic de la leptospirose. Il s'agit d'un test spécifique de genre. L'immunofluorescence peut être destinée à identifier directement des leptospires dans un tissu purifié, dans la boue ou dans l'eau ; elle peut également révéler la présence d'IgG ou d'IgM de sérum de patient par fixation sur des antigènes de *Leptospira*. L'intérêt de l'IFI réside donc notamment dans sa capacité à détecter précocement la maladie chez un patient. De plus, à l'instar des méthodes ELISA, l'immunofluorescence présente l'avantage de ne pas nécessiter la culture et le maintien de nombreuses souches vivantes de *Leptospira*. La sensibilité et la spécificité de ce test ont été respectivement évaluées à 89,5% et 100% par une équipe de recherche colombienne (Agudelo-Flórez *et al*., 2006). La fluorescence verte comme la fluorescence orange peuvent être employées. Cette dernière fournit un excellent contraste (Henry *et al*., 1971).
Plus récemment, l'immunofluorescence a été employée avec succès afin de déterminer si les protéines de la membrane externe des leptospires OmpL 36, OmpL37, OmpL47 et OmpL54 étaient exposées à la surface des leptospires (Pinne & Haake, 2009).

5.3 Typage pour le diagnostic épidémiologique (VNTR/MLVA, MLST)

Une répétition en tandem est une succession de motifs d'ADN répétés les uns derrière les autres. Les répétitions en tandem sont présentes chez tous les organismes : eucaryotes, procaryotes, et même virus (Denoeud, 2003).
L'analyse du nombre variable de répétitions en tandem (VNTR), aussi qualifiée d'analyse VNTR sur *loci* multiples (MLVA), s'avère être une méthode extrêmement discriminante pour l'étude structurelle des populations bactériennes ainsi que pour caractériser des souches d'une population bactérienne monomorphe. Le séquençage du génome de *L. interrogans* sérovar lai a permis de définir une paire d'amorces jouxtant certains *loci* VNTR-like (Majed *et al*., 2005).
Majed et ses collaborateurs (2005) ont évalué la pertinence de l'analyse VNTR dans la discrimination et le typage des sérovars appartenant à *L. interrogans sensu stricto*. Pour ce faire, ils ont analysé par PCR et pour les 51 sérovars de *L. interrogans*, le nombre de répétitions en tandem sur 7 *loci* VNTR sélectionnés. Pour chaque *locus* VNTR, le nombre de répétitions en tandem a été calculé en mesurant la taille des produits amplifiés par PCR sur chacun des sérovars, laquelle montrait un fort degré de polymorphisme (suggérant des variations dans le nombre de répétitions en tandem). Les différentes souches de leptospires ont ainsi pu être caractérisées grâce à la variabilité du nombre de répétitions en tandem sur chacun des *loci* étudiés. Les sept marqueurs utilisés ont permis de différentier 43 des 51 sérovars de *L. interrogans*, mais les mêmes résultats ont pu être obtenu en utilisant 3 *loci* VNTR judicieusement choisis pour leur fort degré de polymorphisme.

Une fois les sérovars caractérisés, l'intérêt diagnostique de la méthode VNTR a été évalué en analysant 23 souches cliniques dont les sérovars avaient préalablement été identifiés à l'aide d'enzymes de restriction, avec les 7 *loci* VNTR les plus discriminants. Les résultats ont montré une correspondance exacte avec les souches de référence utilisées. Là encore, l'usage de seulement trois marqueurs fortement discriminants (VNTR7, VNTR 10 et VNTR 19) a suffi à l'identification de tous les sérovars (Majed *et al.*, 2005).

Cette approche moléculaire a été étendue à d'autres espèces pathogènes de *Leptospira*, *L. kirshneri* et *L. borgpetersenii*, en modifiant les amorces et en sélectionnant d'autres *loci* VNTR (VNTR-4, VNTR-7 et VNTR-10). 92% des sérovars de *L. interrogans* et 90% des sérovars de *L. kirshneri* peuvent ainsi être identifiés (Salaün *et al*., 2006). Pour *L. borgpetersenii*, qui dispose de beaucoup moins de répétitions en tandem, il est conseillé de procéder en deux étapes : utiliser dans un premier temps les amorces VNTR-4, VNTR-7 et VNTR-10, puis pour les souches où seul VNTR-10 est amplifié, utiliser d'autres paires d'amorces, VNTR-Lb4 et VNTR-Lb5. Cette méthode s'avère alors discriminante pour 60% des sérovars de *L. borgpetersenii* (Salaün *et al*., 2006).

Ces études ont montré l'intérêt de la méthode basée sur le polymorphisme des répétitions en tandem. En terme d'applications, le typage VNTR est à même de fournir une méthode pratique et simple basée sur la PCR pour l'identification de sérovars de *L. interrogans*, *L. kirshneri* et dans une moindre mesure de *L. borgpetersenii*. Dans cette optique, d'autres espèces génomiques de leptospires seront certainement étudiées (Majed *et al*., 2005 ; Salaün *et al*., 2006).

6. Arsenal thérapeutique, sensibilité aux antibiotiques

Les leptospires, qui présentent des caractères morphologiques communs aux bactéries Gram positif et Gram négatif, présentent une sensibilité aux antibiotiques actifs sur les unes comme sur les autres. Les leptospires sont notamment sensibles aux β-lactamines, aux macrolides, aux tétracyclines, aux fluoroquinolones et à la streptomycine (Vijayachari *et al*., 2008 ; Levett, 2004).

Le traitement antibiotique de la leptospirose est d'autant plus efficace qu'il est initié précocement lors de la maladie aiguë. Idéalement, celui-ci doit être entrepris dans les 7 à 10 jours succédant l'infection.

Le choix thérapeutique comprend la doxycycline *per os* ou la pénicilline G par voie intraveineuse. La pénicilline G peut ainsi être administrée par doses de 5 millions d'unités par jour pendant 5 jours. La doxycycline à 100 mg, deux fois par jour, est également recommandée. Enfin, les tétracyclines peuvent être employées, mais sont contre-indiquées chez les patients insuffisants rénaux, chez les enfants et chez les femmes enceintes (Vijayachari *et al*., 2008 ; Levett, 2004). Les céphalosporines de

troisième génération (ceftriaxone, cefotaxime) et la doxycycline ont une efficacité équivalente à la pénicilline (McBride *et al*., 2005).

Le traitement antibiotique doit être associé à un traitement de soutien, tout particulièrement lors de forme grave de leptospirose, chez l'animal comme chez l'homme. Chez l'homme, lors de syndrome pulmonaire hémorragique sévère, une ventilation assistée utilisant de faibles volumes courants (<6ml/kg) doit être mise en place. Lors de maladie de Weil, la dialyse par hémofiltration continue est indispensable ; il s'agit du principal facteur susceptible de diminuer significativement la mortalité lorsqu'elle est entreprise précocement (McBride *et al*., 2005). Si l'insuffisance rénale aiguë est détectée précocement, et que l'hypokaliémie non oligurique est détectée, le patient peut être traité en restaurant la volémie et la kaliémie.

Chez les bovins, une injection unique d'oxytétracycline (20 mg/kg intra musculaire (IM)), de tilmicosine (10 mg/kg SC) ou d'une association pénicilline-dihydrostreptomycine (25 mg/kg IM) suffit à interrompre l'excrétion urinaire de leptospires et la maladie. Il est possible d'employer le ceftiofur (20mg/kg SID pendant 3j, ou 5 mg/kg SID pendant 5j, IM). (Alt *et al*., 2001). Cette efficacité permet d'envisager une utilisation préventive d'antibiotiques afin de réduire la contamination entre individus (Grooms *et al*., 2006).

7. Prophylaxie

La capacité des leptospires à pénétrer rapidement dans les cellules de mammifères avant de rejoindre la circulation sanguine, et leur propension à pénétrer rapidement dans les fibroblastes où elles initient un programme d'apoptose affectant les macrophages (Merien *et al*., 1997) ont rendu difficile la conception de vaccins efficaces et sans danger. Les vaccins actuels, construits à partir d'antigènes de surface, pâtissent en effet d'un spectre de protection étroit et ne préviennent pas l'excrétion persistante de leptospires chez les individus infectés (Koizumi & Watanabe, 2005).
Le site web 'Leptospirosis Vaccine Ontology Database' (Wang *et al*., 2007b) répertorie les avancées actuelles en terme de développement de vaccins, et nous présenterons dans cette partie certaines pistes de recherche prometteuses.

Toutefois, si elle ne passait que par des mesures médicales, la prophylaxie visant à se prémunir de l'infection par les leptospires serait vouée à l'échec. Il convient en effet d'aborder la problématique en amont, par une prophylaxie sanitaire offensive et défensive. De telles mesures passent par le contrôle des animaux porteurs (sains et malades, réservoirs), des environnements susceptibles d'être contaminés par des formes pathogènes de leptospires, mais aussi bien sûr par l'amélioration de

l'hygiène chez les populations défavorisées, notamment dans les bidonvilles, et le développement d'équipements de protection chez les professionnels exposés à un risque de contamination important.

7.1 Immunité mise en jeu

Chez l'homme et chez de nombreuses espèces, incluant notamment chiens, cochons, cobayes et hamsters, l'immunité à médiation humorale est prédominante. La capacité de protection des sérums ou des anticorps monoclonaux est corrélée au taux d'anticorps anti-LPS, dont on a montré qu'ils sont à la fois agglutinants et opsonisants. En leur présence, les leptospires sont phagocytés par des macrophages ou par des polynucléaires neutrophiles. Le LPS des leptospires est en effet riche en antigènes. Cette propriété est conservée chez les leptospires inactivés ainsi que dans les préparations purifiées de LPS : dans tous les cas, le LPS présente un bon pouvoir immunogène (Adler & De la Peña Moctezuma, 2009).

Les mécanismes immunitaires sont toutefois fort différents chez les ruminants. Chez certains animaux, de forts taux d'anticorps agglutinants ne semblent pas garantir une protection efficace contre une infection leptospirosique. L'immunité cellulaire est privilégiée chez ces espèces, et fait intervenir des lymphocytes Th1 à la suite d'une libération d'interférons γ (Adler & De la Peña Moctezuma, 2009).

Par ailleurs, le schéma pathogénique de la leptospirose a permis d'envisager un phénomène immunopathogénique sous-jacent. Une étude a montré qu'une leptospirémie importante conduisait préférentiellement à l'expansion des populations de lymphocytes T γ-δ. Ces lymphocytes sécrètent des interférons γ sans nécessiter d'activation antigénique préalable. Ces cellules pourraient jouer un rôle majeur dans la réponse pro-inflammatoire en assurant la transition entre réponse immunitaire innée et acquise, mais elles pourraient également exacerber les symptômes lors de la phase aiguë de la maladie (Klimpel *et al*., 2003 ; Barry *et al*., 2006).

De ces fortes divergences mécanistiques immunitaires résulte nécessairement une approche multilatérale de la conception de vaccins.

7.2 Prophylaxie médicale

La prophylaxie médicale inclut des mesures de protection à court terme (chimioprophylaxie par les antibiotiques) et la protection à moyen ou long terme par les vaccins.

7.2.1 Antibioprévention

➡ **Chez l'homme**

En 1982, une étude impliquant 940 soldats américains en mission d'entraînement au Panama a montré une différence significative ($p < 0,001$) du nombre de cas de leptospirose entre des soldats ayant pris de la doxycycline en prévention (200 mg/semaine) et ceux ayant reçu un placebo (1 cas contre 22 respectivement) (Bharti *et al*., 2003).

En revanche, aucune différence significative du taux d'infection (mesuré par séroconversion) n'a pu être obtenue au cours d'une étude évaluant la chimioprophylaxie par la doxycycline (200 mg/semaine) sur des habitants d'une zone fortement endémique (îles Andaman du Nord, Inde), réalisée sur 782 personnes, dont la moitié recevait un placebo. Une différence significative a cependant été observée dans le taux d'expression clinique de la maladie (3,1% d'expression clinique pour le groupe traité contre 6,8% pour le groupe placebo) (Bharti *et al*., 2003).

Ces résultats suggèrent que la prophylaxie à base de doxycycline ne prévient pas l'infection leptospirosique, mais a un effet significatif sur la réduction de la mortalité et de la morbidité, y compris dans les zones endémiques. La chimioprophylaxie s'avère donc peu applicable dans des zones de forte endémie, mais pourrait être utile pour les touristes adeptes de voyage aventure et le personnel militaire amenés à séjourner dans des zones endémiques (Bharti *et al*., 2003).

➡ **Chez l'animal**

Chez les bovins, un traitement antibiotique des animaux infectés pourrait supprimer le stade de portage rénal des leptospires. Il s'agit donc à la fois d'une mesure curative et préventive (Grooms, 2006).

7.2.2 Vaccination

La prévention à plus grande échelle de la leptospirose passe par le développement de vaccins. Ces derniers sont utilisés chez l'homme et l'animal depuis 1920, et ont longtemps été conçus sur la base de bactérines (appartenant au LPS bactérien). Du fait de leur manque d'innocuité et/ou de leur efficacité en demi-teinte, les vaccins inactivés et atténués constituent des pistes de recherche dont les applications sont aujourd'hui essentiellement destinées à la médecine vétérinaire (Wang *et al*., 2007).

➡ **Chez l'homme**

Certains pays endémiques pour la leptospirose, notamment Cuba et la Chine, ont développé des vaccins humains à partir de protéines d'enveloppe et de bactérines, dont l'efficacité avoisine les 75%. Ces vaccins encore aujourd'hui largement utilisés dans les pays endémiques, tout particulièrement chez les populations à risque (riziculteurs par exemple), ne confèrent pas d'immunité croisée et ne

protègent donc que contre les sérogroupes inclus dans la préparation (généralement deux ou trois sérogroupes locaux). De plus, ces vaccins, s'ils fournissent une protection évitant la forme mortelle de la maladie, ne préviennent pas l'excrétion persistante de leptospires chez les individus infectés (Koizumi & Watanabe, 2005 ; Branger *et al*., 2005 ; McBride *et al*., 2005 ; Adler & De la Peña Moctezuma, 2009). Afin de pallier le manque d'efficacité des vaccins à base de bactérines, des recherches visant à développer des vaccins sous-unités ont été entreprises.

◊ Vaccins recombinants à base de protéines transmembranaires et lipoprotéines de surface

Les protéines de surface partagées par les sérovars pathogènes pourraient induire une protection croisée (Haake *et al.,* 2004) et constituent donc de sérieuses pistes de recherche. L'immunisation du hamster contre *L. kirshneri* sérovar Grippotyphosa a notamment pu être obtenue à partir de fractions de membrane d'*E. Coli* contenant les protéines de surface de leptospires OmpL1 et LipL41 (Adler & De la Peña Moctezuma, 2009). OmpL1 et LipL41 agissent en synergie sans que le mécanisme ait été élucidé (Koizumi & Watanabe, 2005). De fait, deux ans plus tard, l'immunisation de la gerbille ne put être obtenue sur la base de la seule protéine OmpL1 véhiculée par un adénovirus (Wang *et al*., 2007).

D'autres protéines de surface ont été évaluées et ont permis d'obtenir des degrés divers de protection. Branger et son équipe (2005) ont travaillé sur la lipoprotéine Hap1 (Hémolysin-Associated Protéin 1, encore appelée LipL32 ou LP32), partagée par les espèces bactériennes pathogènes de leptospires mais absente chez les espèces bactériennes saprophytes. Hap1 (LipL32), qui représente 75% des protéines de surface des souches pathogènes de leptospires, a longtemps été suspectée de jouer un rôle important dans la pathogénie et la virulence des leptospires. En réalité, cette protéine ne jouerait aucun rôle dans l'infection chronique ou aiguë (Murray *et al*., 2009). Une immunisation et une protection partielle de la gerbille ont pu être obtenues avec l'utilisation d'un adénovirus véhiculant un gène codant la protéine Hap1 (Branger et al., 2005). Ce résultat reste équivoque car plus de 50% des gerbilles du lot témoin avaient également survécu. L'administration directe de protéines recombinantes Hap1 à des gerbilles avait généré une réponse immunitaire fugace et non protectrice (Branger *et al*., 2005 ; Wang *et al*., 2007 ; Koizumi & Watanabe, 2005 ; Murray *et al.*, 2009b).

La réponse anticorps induite par Hap1 (LipL32) est bonne, mais semble peu protectrice. L'une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène est que les anticorps Hap1 pourraient être dirigés contre des épitopes non accessibles à la surface des leptospires ; les anticorps pourraient également avoir une action inhibitrice sur l'activité biologique, liée au fait que la protéine Hap1 a une action liante sur les protéines de la matrice extracellulaire des mammifères (Adler & De la Peña Moctezuma, 2009).

Enfin, les protéines Lig, identifiées en tant que composants majeurs de la surface des leptospires, ont fait l'objet de recherches dont les résultats sont variables. La protéine recombinante LigA ou LigB a induit une protection supérieure à 90% chez la souris contre les formes létales de leptospirose, bien que la souris ne soit pas reconnue comme modèle animal pour la leptospirose. Une autre étude a montré une efficacité chez le hamster, mais comme pour la protéine Hap1, le lot témoin présentait un fort taux de survie (75%). Des travaux plus récents ont montré une protection non équivoque de hamsters avec l'utilisation de la portion C-terminale de LigA (McBride *et al*., 2005 ; Adler & De la Peña Moctezuma, 2009).

◊ Vaccins ADN

Les vaccins ADN constituent un pôle de recherche très actif. Ils conduisent à une expression prolongée des antigènes et donc à une amplification de la réponse immunitaire. En outre, ces vaccins ADN sont facilement conçus et produits, engendrent un faible coût de production de masse et ont la capacité de stimuler à la fois les réponses immunes cellulaires et humorales. On comprend de ce fait l'intérêt qu'ils suscitent, malgré les résultats en demi-teinte obtenus jusqu'à présent (Branger *et al*., 2005).

Des résultats plutôt concluants et similaires à ceux obtenus avec l'adénovirus vecteur ont été obtenus par Branger et ses collaborateurs (2005) en incluant le gène hap1 dans un plasmide vecteur. L'usage d'un plasmide vecteur plutôt que d'un adénovirus présente plusieurs avantages, notamment en terme de coût de production en vue de la production éventuelle à grande échelle (et à moyen terme) d'un vaccin. De plus, le plasmide bactérien induit une réponse immunitaire double : il stimule intrinsèquement les lymphocytes T cytotoxiques, mais engendre également une forte réponse immunitaire dirigée contre le gène étranger produit (Branger *et al*., 2005 ; Wang *et al*., 2007). Un autre vaccin ADN comportant un gène d'endoflagelle (flaB2) est à l'étude (Vijayachari *et al*., 2008 ; Wang *et al*., 2007).

En conclusion, si les protéines candidates à la réalisation d'un vaccin humain contre la leptospirose sont nombreuses, aucune d'entre elles n'a encore montré d'efficacité suffisante. Les vaccins inactivés ont fait l'objet de recherches importantes dans les années 1970 et 1980, mais leur manque d'innocuité et leur efficacité limitée les ont quelque peu fait tomber en désuétude. Il n'en demeure pas moins que ce sont aujourd'hui les seuls vaccins utilisés en médecine humaine. Quant aux vaccins atténués, leur sécurité constitue encore un sérieux problème.

L'adjonction d'un adjuvant au vaccin a montré un renforcement de son immunogénicité. Enfin, la voie d'administration du vaccin ne doit pas être négligée, étant donné le mode de pénétration des leptospires dans les organismes (Wang *et al*., 2007).

➡ **Chez l'animal**

Concernant les vaccins animaux, des préparations commerciales sont disponibles pour les bovins, les porcins et chiens, mais là encore la vaccination n'a qu'une efficacité limitée, du fait notamment de l'existence locale de sérovars autres que ceux présents dans le vaccin.

◈ Les vaccins canins contiennent généralement les sérovars canicola et icterohaemorrhagiae. Dans des conditions expérimentales, ces vaccins ont montré une bonne protection contre la maladie et le portage rénal, mais cette protection reste limitée aux sérovars contenus dans la préparation. Certains vaccins plus récents peuvent également inclure les sérovars grippotyphosa et pomona, dont l'incidence croissante dans les infections chez le chien a été démontrée (Adler & De la Peña Moctezuma, 2009 ; Goldstein *et al*., 2006 ; Prescott *et al*., 2002).

◈ La plupart des vaccins bovins et porcins comprennent les sérovars hardjo et pomona. L'efficacité protectrice de leptospires tués (sérovar hardjo) chez le bétail est corrélée à la propension à stimuler une réponse Th1 caractérisée par un largage d'interférons γ. Les vaccins n'induisant pas une telle réponse ne protègent pas le bétail contre l'infection, en dépit d'une forte réponse anticorps. La vaccination du bétail, réalisée tous les trois mois dans les zones de forte endémicité de leptospirose, a prouvé son efficacité : elle s'accompagne notamment d'une diminution de la libération urinaire de leptospires, et par là même du risque de transmission aux éleveurs (Adler & De la Peña Moctezuma, 2009). Ainsi, la vaccination permet l'interruption du cycle endémique de l'infection au sérovar hardjo dans le troupeau (Little *et al*., 1992).

Ces observations soulignent la nécessité d'un suivi épidémiologique rigoureux, afin de connaître l'évolution de l'incidence des différents sérovars de leptospires au cours du temps dans une population et une région données.

7.3 Prophylaxie sanitaire (figure 5)

La prophylaxie sanitaire passe par des mesures d'épidémiosurveillance, de contrôle (des réservoirs, personnes ou animaux infectés) et de prévention :

- Le contrôle inclut la notification et l'isolement des patients ou animaux infectés et la désinfection du matériel contaminé par l'urine (Zunino & Pizarro, 2007).
- La prévention passe par l'éducation de la population, la protection des travailleurs exposés, et par l'hygiène individuelle et collective.

7.3.1 Prophylaxie sanitaire offensive

Le contrôle des réservoirs animaux constitue un pan incontournable du contrôle de la leptospirose. Celui-ci inclut en premier lieu le contrôle de la pullulation des rongeurs (figure 5), qui sont les réservoirs principaux de la maladie, susceptibles de libérer des leptospires dans l'environnement. Citons pour exemple la dératisation, ou encore le piégeage de rats musqués ou de ragondins. Dans les années à venir, le suivi épidémiologique des populations de ratons laveurs ou d'écureuils sera sans doute à considérer aux Etats-Unis en raison de leur probable implication dans les contaminations urbaines humaine et animale (Barry *et al*., 2006). Des mesures de contrôle seront alors peut être à prévoir.

Mais, comme nous l'avons vu, les rongeurs et la faune sauvage ne constituent pas les seuls réservoirs de leptospires : les animaux domestiques, et notamment les bovins, du fait de leurs effectifs importants et de leur propension à libérer des leptospires dans les urines ou le lait, sont également à considérer.
Plusieurs méthodes ont été proposées pour réduire la charge bactérienne d'animaux domestiques porteurs. Little et son équipe (1992) ont montré que l'immunisation totale d'un troupeau permettait de contrôler la leptospirose chez les bovins. Les politiques d'assainissement des troupeaux conduites en Grande-Bretagne, fondées sur la catégorisation du bétail en différents échelons corrélés à leur statut d'immunisation ou d'infection, furent inefficaces. Une stratégie fondée sur l'abattage systématique de bovins infectés a été envisagée en l'absence d'alternatives (Vijayachari *et al*., 2008).
Chez l'homme, les patients sous antibiothérapie continuent d'excréter des leptospires (Bal *et al*., 1994). Toute détection de cas humain doit donc s'accompagner de mesures de notification et d'isolement des patients (figure 5).

7.3.2 Prophylaxie sanitaire défensive

➡ **Chez l'homme**

La prophylaxie sanitaire défensive passe d'abord par des mesures d'hygiène et de protection individuelles, mais s'inscrit également dans un dessein global qui intéresse la collectivité toute entière.

La prévention à l'échelle de l'individu inclut le port d'équipements de protection (figure 5) pour les travailleurs exposés. Une étude sur un foyer de cas en Thaïlande a montré que le port de vêtements protecteurs, notamment de bottes en caoutchouc, diminuait le risque d'infection tandis qu'au contraire, la présence de blessures cutanées majorait ce risque (McBride *et al*., 2005). Outre les bottes, gants, lunettes, combinaisons et masques peuvent concourir à minimiser le risque de contamination à partir de l'environnement ou à partir d'espèces réservoirs.

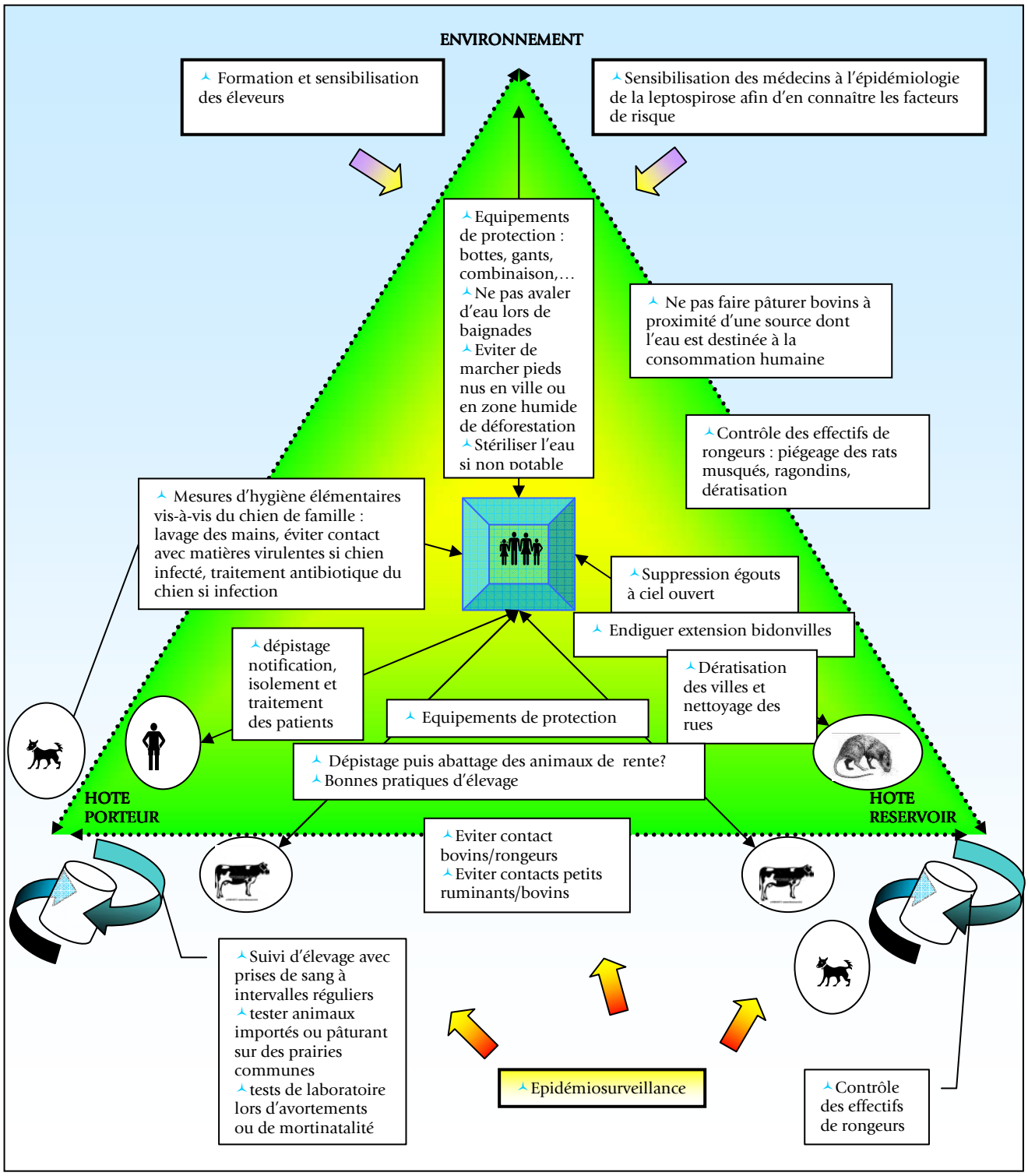


Figure 5 : Prophylaxie sanitaire en vue de réduire l'exposition à la leptospirose (d'après Vijayachari *et al.*, 2008 ; Adler & De la Peña Moctezuma, 2009 ; Lilenbaum *et al.*, 2008 ; Bharti *et al.*, 2006 ; Lilenbaum & Souza, 2003 ; Kingscote, 1985)

L'hygiène individuelle comprend le lavage des mains et du corps, notamment après contact avec un environnement susceptible d'être contaminé, mais il est bien sûr primordial d'éviter les contacts avec de l'eau potentiellement contaminée. En l'absence d'eau potable, l'eau doit être stérilisée avant toute consommation (Zunino & Pizarro, 2007).

Des mesures visant à se prémunir d'une contamination par le chien de famille (figure 5) ont été préconisées. Celles-ci stipulent (Brown, 2008) :

- de se laver systématiquement les mains après avoir caressé son chien
- de s'assurer que le chien reçoit un traitement antibiotique bien conduit en cas d'infection
- d'éviter tout contact avec l'urine, les fèces ou la salive d'un chien infecté et de nettoyer les surfaces susceptibles d'être contaminées par l'urine à l'aide d'une solution désinfectante
- de rester vigilant vis-à-vis de tout signe de type grippal chez un membre de la famille

L'hygiène individuelle est malheureusement bien souvent tributaire de l'hygiène collective. Aujourd'hui, 560 millions de personnes n'ont pas accès à des services d'assainissements adéquats, soit plus de 25% de la population urbaine mondiale (Nations Unies, 2007). Ainsi, les égouts à ciel ouvert contribuent largement à la transmission de la leptospirose lors des épidémies (McBride *et al*., 2005). Le développement d'infrastructures visant à accroître la salubrité constitue donc une mesure prophylactique indispensable pour la réduction du risque de contact avec les rongeurs. Les mesures visant à endiguer l'extension des bidonvilles sont un préalable indispensable à l'atteinte de tels objectifs (figure 5).

➦ Chez l'animal

La prophylaxie sanitaire concerne également nos espèces domestiques, tout particulièrement les espèces de rente. Une étude de facteurs de risque pour la leptospirose sur des troupeaux de chèvres au Brésil a mis en évidence un facteur de risque associé à la fréquence de supervision du troupeau par le vétérinaire (OR = 2,35) (Lilenbaum *et al*., 2008). Ainsi, les troupeaux visités au moins toutes les 2 semaines montraient une moyenne de séropositivité de 12,4%, contre 25,8% pour ceux n'étant jamais visités par le vétérinaire. Cette observation fut d'autant plus intéressante que moins de 15% des vétérinaires caprins interrogés étaient sensibilisés à la leptospirose ou au courant de sa présence dans le troupeau suivi. Ainsi, même si le vétérinaire n'est pas impliqué dans un programme intrinsèque de contrôle de la leptospirose, sa présence conduit à une amélioration des pratiques d'élevage et sanitaire, qui à leur tour, indirectement, améliorent les conditions des animaux. Cette observation, qui avait été démontré antérieurement sur les bovins, montre l'importance de la prophylaxie sanitaire et des pratiques d'élevage dans le contrôle de maladies infectieuses en général, et de la leptospirose en particulier (Lilenbaum *et al*., 2008 ; Lilenbaum & Souza, 2003).

Kingscote (1985) recommande de réaliser un suivi sérologique des troupeaux vis-à-vis de le leptospirose, de tester tout animal introduit dans un élevage, de traiter et de vacciner le troupeau si nécessaire, de tester les animaux pâturant sur des prairies communes à d'autres élevages ou encore d'effectuer des analyses de laboratoire lors d'avortements ou de mortinatalité (figure 5).

Le contrôle des réservoirs constitue donc un point clé de la prophylaxie sanitaire. Le risque de transmission de la leptospirose des ruminants à l'éleveur peut être minoré par la vaccination des animaux. Pour que celle-ci soit le plus efficace possible, les éleveurs doivent recevoir, sinon une formation, *a minima* des informations sur la leptospirose, afin qu'ils puissent saisir la pertinence d'une amélioration des mesures d'hygiène (figure 5) (Adler & De la Peña Moctezuma, 2009).

7.3.3 Epidémiosurveillance

L'*International Leptospirosis Society* a développé une base de données web, *Leptonet* : ce système de surveillance permet de répertorier les cas de leptospirose humaine. Ces données demeurent encore insuffisantes, car seules sont répertoriées les formes sévères, alors que la majorité des cas se présentent sous la forme subclinique (McBride *et al*., 2005). Au-delà de la volonté politique, c'est surtout le manque de tests de laboratoire adéquats qui réduit les possibilités d'épidémiosurveillance. Le MAT, avec toutes les contraintes qu'il suppose et les limites qui lui sont inhérentes, demeure pour l'instant la méthode diagnostique sérologique de référence. L'avènement de la biologie moléculaire et le développement de nouvelles techniques basées sur le séquençage du génome bactérien suscitent néanmoins un espoir dans le développement de nouveaux outils, sans doute plus sensibles et dont l'application pratique serait bien plus aisée.

Les expérimentations destinées à déterminer la présence de leptospires pathogènes dans l'eau ont montré l'intérêt limité de telles analyses. Sur 27 échantillons d'eau du lac Springfield (Etats-Unis) analysés par PCR, un seul résultat positif fut obtenu pour une espèce pathogène, et seules deux cultures furent positives pour des leptospires saprophytes, alors même que de nombreux cas cliniques humains se sont déclarés suite au contact avec l'eau du lac. Ainsi, l'analyse d'échantillons d'eau semble être un indice peu fiable quant à la sécurité sanitaire de l'eau. De plus, en cas de résultat positif sur un échantillon, le risque réel pour la santé publique est inconnu, car l'infection dépend de la dose et du type d'exposition (Morgan *et al*., 2002).

Les notions fondamentales abordées dans ce premier chapitre consacré à la leptospirose vont nous permettre d'appréhender la complexité de l'épidémiologie de la leptospirose. Nous allons également en découvrir le polymorphisme clinique, tant chez l'homme que chez nos espèces domestiques.

II. Importance médicale et épidémiologique

La leptospirose est considérée comme la zoonose dont la recrudescence est la plus forte dans le monde. Citons l'exemple de la Thaïlande, où l'incidence annuelle de la leptospirose a progressé de 0,3 cas sur 100 000 personnes (entre 1982 et 1995) à 3,3 cas sur 100 000 personnes (entre 1997 et 1998) (Vijayachari *et al*., 2008). Le nombre de cas humains annuels est supérieur à 500 000 (World Health Organisation, 1999), dont 10 000 en moyenne nécessitent une hospitalisation. Plusieurs épidémies ont été reportées ces dernières années, notamment au Nicaragua, au Salvador, à Rio de Janeiro (Brésil), ainsi qu'à Orissa, Mumbai et dans l'archipel des Andaman (Inde) (Vijayachari *et al*., 2008).

Récemment, l'actualité de cette maladie infectieuse a été marquée par une épidémie de syndrome pulmonaire hémorragique sévère (SPHS) au Nicaragua en 1995 à la suite d'inondations et par l'identification de la maladie parmi des populations sans-abri de quartiers déshérités des Etats-Unis. Par ailleurs, de nombreux cas cliniques de leptospirose ont pu être observés lors du triathlon du lac Springfield en 1998 (Etats-Unis) et lors du Bornéo Eco-Challenge (Malaisie) en 2000. Enfin, la probable sous-évaluation de l'incidence de la leptospirose dans les pays développés a été prise en considération ces dernières années (McBride *et al*., 2005).

Outre la fréquence des infections dans les zones endémiques et l'émergence de la maladie dans les pays industrialisés, l'importance médicale de la leptospirose réside dans la gravité de la maladie, dont les formes les plus sévères peuvent conduire à la mort. Ces dernières incluent la maladie de Weil, triptyque clinique associant ictère, néphrite et splénomégalie et le syndrome pulmonaire hémorragique sévère (SPHS). De plus, la faible spécificité des signes cliniques, les confusions possibles avec les maladies indigènes endémiques (dengue, malaria, fièvre jaune) dans les zones tropicales et le recours non systématique aux tests de laboratoires minorent vraisemblablement l'incidence réelle de la leptospirose.

Si bon nombre de pays se sont appliqués à réaliser un suivi épidémiologique de la leptospirose, les données épidémiologiques encore peu recoupées et le morcellement des informations rendent difficile la définition précise de zones d'endémicité. Il convient néanmoins de souligner les efforts de coordination entrepris depuis une dizaine d'années à l'échelle mondiale, sous l'impulsion d'organisations humanitaires internationales ou de sociétés spécialisées. Parmi ces dernières, l'*International Leptospirosis Society* (ILS) joue un rôle prépondérant. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'ILS ont ainsi récemment développé une base de données mondiale, « Leptonet » (http://www.leptonet.net) dont l'objectif est de collecter des données épidémiologiques mondiales sur la leptospirose (Pappas *et al*., 2007 ; World Health Organisation, 1999).

1. Importance médicale et épidémiologique chez l'homme

1.1 Une maladie infectieuse ubiquiste recrudescente

Les pays tropicaux et subtropicaux en général, et plus particulièrement l'Asie du sud-est, l'Océanie, les Caraïbes et les Amériques Centrale et du Sud, connaissent de fréquents cas de leptospiroses cliniques chez l'homme. Ainsi, depuis 1988, de nombreux foyers ont été identifiés dans l'archipel des Andaman (Inde), zone hyperendémique de leptospirose. Le Salvador et le Brésil sont aussi fréquemment concernés par des foyers, à tel point que la surveillance épidémiologique de la leptospirose au Salvador a permis de détecter 326 cas (sur une population de deux millions d'habitants !) en huit mois, avec un taux de mortalité de 15% (Vijayachari *et al*., 2008).
Dans les régions endémiques, la leptospirose peut se déclarer sous forme d'épidémie, comme ce fut le cas au Nicaragua en 1995, où un foyer épidémique associé à des hémorragies pulmonaires a touché 400 personnes, dont 13 n'ont pas survécu (Zunino & Pizarro, 2007 ; Pappas *et al*., 2007 ; Morgan *et al.*, 2002).

Dans le sud-est de l'Asie, la leptospirose représente au moins 17% des cas d'ictères non associés à l'hépatite A et au moins 13% des cas de syndromes fébriles non paludéens (Laras *et al*., 2002). Au sein du continent asiatique, le Sri Lanka et la Thaïlande sont extrêmement touchés, avec une incidence estimée respectivement à 54 et 48,9 cas annuels par million d'habitants tandis qu'en Amérique Centrale et du Sud, le Costa Rica et l'Uruguay présentent respectivement des incidences annuelles de 67,2 et 25 cas annuels par million d'habitants (Pappas *et al*., 2007). Dans de nombreux pays d'Asie et d'Amérique du Sud, comprenant des pays aussi vastes que la Chine, l'Inde, le Brésil ou l'Argentine, les données épidémiologiques actuelles ne sont pas exhaustives, et minorent l'incidence annuelle de cas. Néanmoins, en Inde, la leptospirose serait impliquée dans 12,7% des cas de syndrome fébrile traités en milieu hospitalier (Vijayachari *et al*., 2008). En Chine, la ville de Chengdu a connu à elle seule 300 980 cas en 1999 (World Health Organisation, 1999). L'absence ou la faiblesse des données épidémiologiques en Afrique ne permet pas de définir de zones d'endémicité, bien que la présence de la maladie sur le continent ait été confirmée par la survenue récente de cas au Kenya (Pappas *et al*., 2007).

Bien que dénuées des principaux facteurs d'endémicité de la leptospirose, l'Europe et l'Amérique du Nord ne sont pas épargnées. Au sein du vieux continent, les pays d'Europe de l'Est et d'Europe Centrale connaissent les incidences de cas les plus élevées. La Russie et la Croatie sont particulièrement touchées. La France (figure 6), avec une incidence annuelle moyenne de 3,9 cas par million d'habitants, est le pays le plus affecté d'Europe de l'Ouest. Les fluctuations sont néanmoins importantes d'une année à l'autre, et fortement corrélées aux aléas météorologiques, notamment à la

survenue d'inondations (Pappas *et al*., 2007). Aux Etats-Unis, l'incidence annuelle reste extrêmement faible (52 cas en 1999) mais la survenue d'une épidémie à la faveur du triathlon du Wisconsin et de l'Illinois, en 1998, où 74 athlètes ont contracté la leptospirose, a considérablement remis en cause le paradigme épidémiologique qui faisait de la leptospirose une maladie essentiellement tropicale (World Health Organisation, 1999 ; Morgan *et al*., 2002).

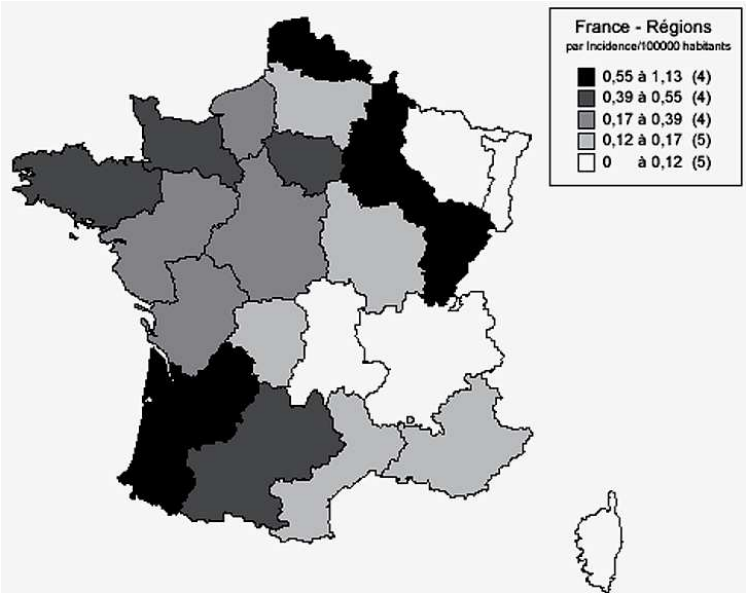


Figure 6 : Incidence de la leptospirose en France en 2006. L'incidence dans le Nord-Pas-de-Calais est surestimée, car l'origine géographique des cas n'est pas communiquée par les deux laboratoires réalisant le diagnostic (rapport d'activités 2006 du Centre National de Référence de la leptospirose, Institut Pasteur)

Dans les pays en voie de développement, la leptospirose touche primitivement les populations rurales pauvres, et tout particulièrement les agriculteurs, du fait de leur exposition à des environnements contaminés par l'urine de réservoirs animaux domestiques et sauvages. Néanmoins, les populations urbaines, et notamment celles des bidonvilles, ne sont pas épargnées. En 2007, 998 millions de personnes vivaient dans des bidonvilles (United Nations, 2003 ; Amnesty international, 2009 ; McBride *et al*., 2005). Aussi la situation de la leptospirose est-elle d'autant plus préoccupante que ce chiffre pourrait doubler dans les 25 ans à venir (Nations Unies, 2007). Citons l'exemple du Brésil où chaque année des épidémies surviennent dans les favelas durant la période de fortes précipitations, portant à 10 000 en moyenne le nombre de cas annuels de leptospirose sévère (McBride *et al*., 2005).

1.2 Importance médicale de la leptospirose chez l'homme

La leptospirose est une zoonose souvent omise dans le diagnostic différentiel d'un syndrome fébrile. Elle est encore aujourd'hui largement sous diagnostiquée, notamment dans les zones endémiques (Segura *et al*., 2005). La faible spécificité des signes cliniques durant les premiers temps de l'infection

rend difficile le diagnostic précoce de la leptospirose chez l'homme, et les erreurs de diagnostic constituent un problème patent dans les régions endémiques pour la dengue et d'autres maladies infectieuses (Segura *et al*., 2005 ; McBride *et al*., 2005 ; Levett, 2004).

Pourtant, le diagnostic revêt une importance majeure au regard de la gravité et de la fréquence de la maladie. Le taux de mortalité chez les patients atteints de leptospirose sévère varie en effet entre 5% et 40%. Il a notamment atteint 23,6% dans les Iles Barbade (Caraïbes) (Michel *et al*., 2002, Haake *et al.*, 2002).
Les études de séroprévalence humaine effectuées entre 1982 et 1996 ont indiqué une séropositivité de 51% en Somalie, 43% dans les Iles Barbade, 33% en Inde, 31% à Détroit (Etats-Unis) et en Bolivie, 21% en Espagne, 16% en Corée ainsi qu'à Baltimore (Etats-Unis) et 12% en Italie. Une étude de séroprévalence au Chili a montré des taux de positifs s'échelonnant entre 0,2% chez des chasseurs et 38% chez des riziculteurs (Zunino & Pizarro, 2007).

1.2.1 Facteurs prédisposants et facteurs aggravants

Il est possible de distinguer les facteurs de risque extrinsèques - liés à l'environnement, à l'exposition, des facteurs de risque intrinsèques - liés à la sensibilité individuelle, aux méthodes de protection.

➦ **Facteurs extrinsèques**. Les deux principales voies d'exposition à la leptospirose sont les voies professionnelles ou liées aux loisirs, mais certains cas survenus dans des centres-villes (Brésil et Etats-Unis par exemple) ont touché des personnes dérogeant à ce paradigme. Ces dernières ont vraisemblablement contracté la leptospirose par contamination percutanée à partir d'urines de rat déposées dans des ruelles urbaines (Vinetz *et al*., 1996). L'insalubrité, notamment la proximité des bidonvilles avec des égouts à ciel ouvert constitue un facteur de risque important (McBride *et al*., 2005). La présence d'eaux stagnantes, les inondations ou encore la surpopulation constituent autant de facteurs de risque (Pappas *et al*., 2007 ; Haake *et al*., 2002).

➦ **Facteurs intrinsèques**. Du point de vue de la contamination, les morsures de sangsues, les microlésions ou abrasions de la peau et l'exposition des muqueuses représentent autant de facteurs favorisants. La durée et le degré d'immersion dans l'eau contaminée jouent probablement un rôle important, notamment en cas d'exposition de la conjonctive ou de macération de la peau. Enfin, l'ingestion d'eau s'avère être également un facteur favorisant. Une étude réalisée sur du personnel militaire soumis à une course d'obstacles sous-marine a montré que le risque de leptospirose était multiplié par 18 chez les militaires avalant de l'eau durant l'immersion (Haake *et al*., 2002). Les facteurs présidant au déclenchement d'une forme sévère, modérée ou asymptomatique n'ont pas encore été totalement identifiés. Deux exemples illustrent cette problématique : au cours de l'épidémie

nicaraguayenne de 1995, les infections asymptomatiques ont représenté 60 à 70% des cas, alors qu'au contraire, lors du triathlon du lac Springfield (Etats-Unis), presque tous les athlètes ayant été contaminés par un leptospire ont développé des signes cliniques de la maladie (McBride *et al*., 2005).

1.2.2 Formes cliniques chez l'homme

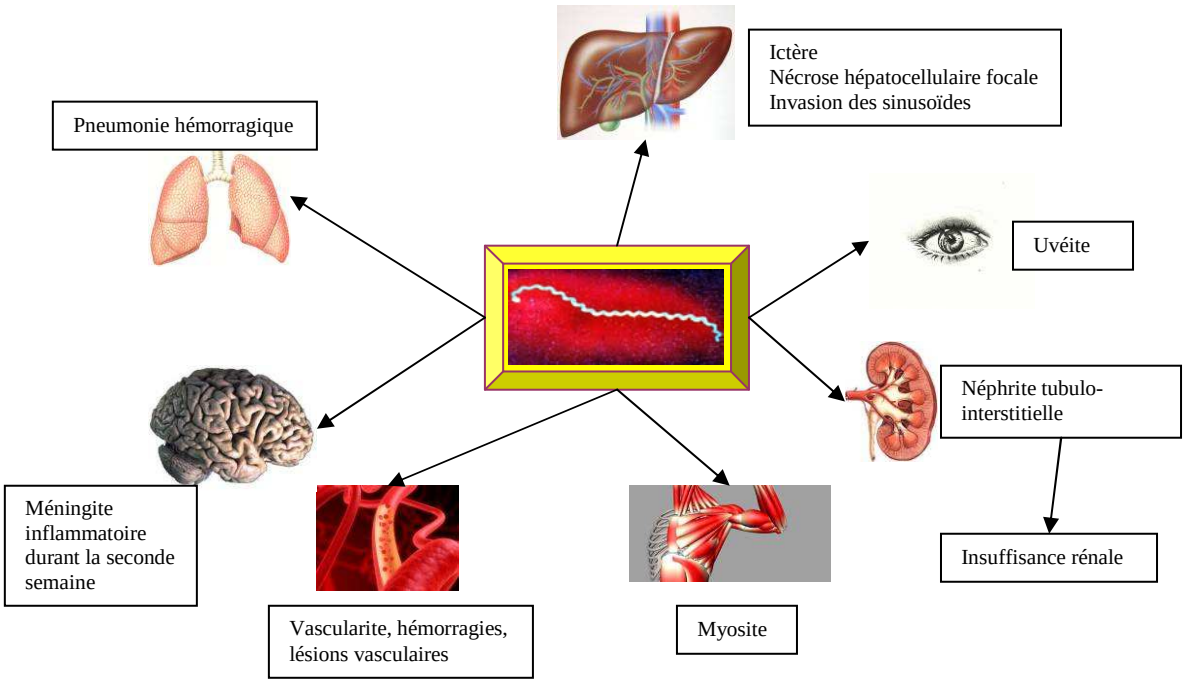


Figure 7 : Tropisme organique des leptospires et lésions ou signes cliniques associés (google images, photo leptospire Direction des Affaires Sanitaires et Sociales de Nouvelle Calédonie)

➦ **Contamination**. Les leptospires pénètrent chez l'homme par contact direct avec l'urine contaminée ou des tissus infectés, ou de manière indirecte, à travers l'eau ou les sols contaminés. La bactérie pénètre principalement par inoculation à travers la peau saine ou *via* des abrasions de cette dernière, ainsi que par les muqueuses naso-pharyngée, buccale, génitale ou conjonctivale. Des cas exceptionnels de transmission sexuelle et transplacentaire ont été rapportés. Longtemps considérée comme anecdotique, l'ingestion d'eau contaminée semble être une voie d'entrée non négligeable des leptospires. Des bactéries ont pu être mises en évidence dans les nœuds lymphatiques mésentériques de patients atteints de leptospirose (Morgan *et al*., 2002 ; Zunino & Pizarro, 2007).

➦ **Incubation**. La période d'incubation s'échelonne classiquement de 7 à 14 jours, plus rarement entre 2 et 20 jours.

➦ **Signes cliniques**. La leptospirose est une maladie polymorphe et deux formes aiguës peuvent être distinguées : l'une, caractérisée par une expression biphasique, est appelée communément forme anictérique tandis que l'autre, fulgurante, est qualifiée de forme ictéro-hémorragique (Bharti *et al.*, 2003). Toutefois, bon nombre d'infections leptospirosiques sont subcliniques chez l'homme, notamment dans les zones endémiques.

◈ Dans le cas de la forme biphasique, une phase initiale de bactériémie asymptomatique de 7 à 15 jours précède une seconde phase qui se manifeste par des symptômes extrêmement divers. Certains patients ne vont pas déclarer de symptômes et la leptospirose reste alors au stade subclinique, tandis que d'autres développent un syndrome pseudo grippal caractérisé par de la fièvre, des nausées, des malaises, des douleurs musculaires et de l'hyperhémie conjonctivale. L'épisode va durer deux à trois jours puis s'interrompre sans laisser de séquelles. Cependant, dans certains cas, ce syndrome pseudo grippal peut être suivi par une aggravation brutale des symptômes et impliquer de multiples organes comme le foie, le système nerveux et/ou le système respiratoire (Bharti *et al*., 2003).

◈ La maladie de Weil et le syndrome pulmonaire hémorragique sévère (SPHS) sont les deux principales formes cliniques graves sévissant chez l'homme. Elles font partie des formes fulgurantes de leptospirose. Plus de 10% des cas sont mortels lors de la maladie de Weil et de 50 à 70% des cas lors de SPHS. La survenue de ces syndromes ne concerne qu'une faible proportion de patients (McBride *et al*., 2005 ; Vijayachari *et al*., 2008 ; Zunino & Pizarro, 2007).

- **Maladie de Weil**. Parfois qualifiée de syndrome hépatorénal, la maladie de Weil correspond à une forme d'insuffisance rénale aiguë avec hypokaliémie non oligurique (McBride *et al*., 2005). Cette forme se développe chez une minorité de patients. L'ictère, s'accompagnant généralement d'hépatomégalie, apparaît classiquement entre le quatrième et le sixième jour. La mort n'est que rarement due à l'insuffisance hépatique. En revanche, les complications rénales représentent les causes de mort les plus fréquentes. Bon nombre de patients ne développent pas d'oligurie associée, ce qui majore leur pronostic vital, mais celle-ci peut survenir au cours de la seconde semaine. Anorexie, vomissements, confusions, hallucinations et convulsions peuvent se produire. Les complications cardiaques et pulmonaires sont fréquentes, et peuvent parfois être responsables de mort subite. Les saignements importants des tractus digestif et respiratoire peuvent également conduire au décès. Les patients faiblement atteints peuvent entrer en convalescence dès la seconde semaine. Pour les autres, la survie est conditionnée par la mise en place d'un traitement d'urgence. L'ictère peut mettre du temps à disparaître (Vijayachari *et al*., 2008 ; Bharti *et al*., 2003).

- **Syndrome pulmonaire hémorragique sévère (SPHS).** La survenue de la pneumonie hémorragique est soudaine et s'accompagne d'un syndrome fébrile caractérisé par des céphalées, de l'hyperthermie et des douleurs corporelles multifocales. La toux concomitante, sèche au départ, devient en deux ou trois jours sécrétoire et hémorragique. Le SPHS se traduit par une hémoptysie franche, une détresse respiratoire et des signes de toxémie (hyperthermie marquée, tachycardie, tachypnée, parfois hypertension). L'insuffisance respiratoire qui en résulte peut conduire à l'asphyxie puis à la mort. L'aspect radiographique des lésions est très variable ; celles-ci peuvent être isolées, multicentriques ou lobaires. Dans les cas mortels, une opacification alvéolaire bilatérale est fréquemment objectivée (Vijayachari *et al*., 2008).

◊ Au-delà de ces deux grands syndromes, la leptospirose peut présenter d'autres manifestations cliniques. Une étude prospective comprenant 58 patients a montré que le système nerveux central était affecté dans 12% des cas sans se compliquer par des méningites, et que 40% des patients souffraient d'hypotension. 75,8% des patients (44 sur 58) ont guéri suite à l'administration d'antibiotiques, les autres sont décédés (Vijayachari *et al*., 2008).

La présentation clinique des patients dépend des organes atteints. De la fièvre, des frissons, des céphalées sévères, persistantes (le plus souvent frontales ou rétro orbitaires), et des douleurs corporelles, souvent des membres inférieurs, sont les premiers signes observés. Prostration, fatigabilité, anorexie, nausées et vomissements sont fréquents. Chez certains patients, des signes nerveux (*delirium*, confusion, hallucinations, comportement psychotique entre autres) peuvent constituer les symptômes principaux. Chez d'autres, la leptospirose se présente sous la forme d'une gastro-entérite aiguë avec douleur abdominale, vomissements et diarrhée. Une suffusion conjonctivale bilatérale peut apparaître dès les premiers stades de la maladie. Les myalgies, sévères, concernent surtout les membres inférieurs. Des signes cutanés sont parfois observés, notamment sur le tronc (Vijayachari *et al*., 2008 ; Zunino & Pizarro, 2007).

1.2.3 Modifications des paramètres biologiques

Dans la forme anictérique de la leptospirose, le taux de sédimentation érythrocytaire est élevé. Une leucocytose modérée est parfois observée. L'évaluation biologique de l'activité hépatique montre une élévation discrète des transaminases, de la bilirubine et de la phosphatase alcaline, malgré l'absence d'ictère concomitant. L'analyse d'urine montre une protéinurie, une pyurie, et une hématurie (Levett, 2001).

Les formes sévères de leptospirose se traduisent quant à elles biologiquement par une leucocytose périphérique et une thrombocytopénie parfois sévère. Les atteintes de la fonction rénale se traduisent par une élévation de la créatinine plasmatique et par une azotémie proportionnelle à la gravité de la

maladie. Les tests de fonction hépatique montrent généralement une élévation importante de la bilirubine et une élévation moindre des transaminases et de la phosphatase alcaline (Levett, 2001). Une lymphocytose atypique avec élévation des lymphocytes T γδ est parfois notée (Barry *et al*., 2006).

Les modifications les plus fréquemment observées chez les triathlètes atteints de leptospirose lors de l'épisode du lac Springfield (Etats-Unis) ont été, par ordre décroissant (Morgan J. *et al*., 2002) :

- Elévation des enzymes hépatiques ou de la bilirubinémie
- Thrombocytopénie
- Protéinurie
- Hématurie
- Elévation de la créatinine

2. Importance médicale et économique chez nos espèces domestiques

Les leptospiroses animales, tout particulièrement chez les espèces de production, sont à l'origine de graves pertes économiques dans les pays endémiques (Picardeau *et al*., 2008). L'importance des leptospiroses animales est également médicale, du fait de la gravité et de la fréquence de l'infection, notamment chez le chien.

2.1 Réceptivité et sensibilité des principales espèces domestiques

La forme aiguë de leptospirose peut être observée chez de nombreuses espèces, et particulièrement chez le chien. En revanche, les autres espèces domestiques, telles que le bétail, les cochons ou encore les chevaux, présentent le plus souvent des formes subaiguës ou chroniques de leptospirose. Chez les chevaux, l'infertilité et les avortements sont les signes cliniques les plus évidents (Michel *et al*., 2002). Une espèce de mammifère donnée héberge préférentiellement un sérovar de leptospire donné, mais cette relation n'est pas exclusive. Lorsque l'hôte héberge et excrète un sérovar sans manifester de signes cliniques de la maladie, il joue un rôle de réservoir pour ce sérovar. Ainsi, le chien semble héberger le sérovar canicola, les chevaux le sérovar bratislava, le bétail le sérovar hardjo et les cochons les sérovars bratislava, australis et pomona (André-Fontaine, 2006 ; Zunino & Pizarro, 2007 ; Adler & De la Peña Moctezuma, 2009).

➦ Sérovars identifiés chez le chien

En France, les résultats d'études sérologiques chez le chien montrent une dominance des sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Canicola, qui sont aussi les sérogroupes vaccinaux (Kodjo, 2007 ; André-Fontaine, 2002), mais les sérogroupes Australis et Sejroe sont également fréquemment identifiés (André-Fontaine, 2002). Du fait d'une défervescence des anticorps en trois à six mois, la vaccination

ne peut expliquer à elle seule toutes les réponses sérologiques à Canicola et Icterohaemorrhagiae, en particulier pour les titres supérieurs ou égaux au 320ème sur des chiens présentant des signes cliniques évocateurs de leptospirose (Kodjo, 2007). Il est donc probable qu'un certain nombre de leptospiroses cliniques chez le chien incombent aux sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Canicola.

Au Canada et aux Etats-Unis, des changements majeurs ont été relevés dans le profil sérologique des chiens infectés par la leptospirose. Ainsi, les sérovars canicola et dans une moindre mesure icterohaemorrhagiae, prépondérants dans les années 1950 et 1960, ont été remplacés par les sérovars grippotyphosa, pomona, et bratislava (Prescott *et al*., 2002 ; Goldstein *et al.*, 2006 ; Bolin, 1996). En Amérique du Nord, la diminution relative des sérovars canicola et icterohaemorrhagiae résulte probablement de la vaccination des chiens contre ces deux sérovars, qui sont aujourd'hui encore systématiquement inclus dans les préparations vaccinales, tandis que l'émergence des sérovars pomona et bratislava pourrait être corrélée à l'accroissement des contacts entre chiens et furets, ratons laveurs, ou opossums, qui sont les hôtes réservoirs des sérovars grippotyphosa et pomona (Bolin, 1996). Le sérovar autumnalis est également fréquemment rencontré.

➦ Sérovars identifiés chez le chat

Les sérovars canicola, pomona et grippotyphosa ont été isolés chez le chat. Les chats étant prédateurs de rongeurs, ils pourraient également héberger les sérovars ballum et icterohaemorrhagiae (Bolin, 1996).

➦ Sérovars identifiés chez les bovins, ovins et caprins

Chez les bovins, les sérovars les plus fréquemment identifiés dans le monde sont hardjo, pomona et grippotyphosa. Les bovins constitueraient d'ailleurs un réservoir pour le sérovar hardjo. Deux types indissociables sérologiquement mais génétiquement distincts du sérovar hardjo ont été identifiés : *Leptospira interrogans* sérovar hardjo (type hardjoprajitno) et *Leptospira borgpetersenii* sérovar hardjo (type hardjobovis). Le premier est commun et ubiquiste ; le second, isolé pour la première fois au Royaume-Uni, semble être plus rare (Grooms, 2006 ; Vijayachari *et al*., 2008).

Chez les ovins, plusieurs études brésiliennes ont montré des séroprévalences s'échelonnant entre 10 et 25%. Le sérovar le plus fréquemment identifié est hardjo, suivi par shermani, icterohaemorrhagiae et grippotyphosa (Lilenbaum *et al*., 2007). Les caprins n'étant pas des hôtes réservoirs pour la leptospirose, leur infection survient vraisemblablement à la suite de contact avec les bovins (Lilenbaum *et al*., 2008).

➦ Sérovars identifiés chez le porc

Aucun sérovar ne semble prédominer chez cette espèce, mais le porc pourrait être réservoir des sérovars australis, pomona et bratislava.

➦ **Sérovars identifiés chez le cheval**

Les sérovars prédominants chez le cheval sont *L. interrogans* sérovar bratislava, icterohaemorragiae et pomona, et *L. kirshneri* sérovar grippotyphosa (Båverud *et al*., 2009). Plusieurs études de séroprévalence, dont l'une conduite en Suède en 2009 par Båverud et son équipe, ont montré que le sérovar le plus représenté est bratislava (séroprévalence à un titre ≥ 1 :100 de 16,6%). Le cheval pourrait d'ailleurs constituer un hôte réservoir du sérovar bratislava, dont on sait déjà qu'il est hébergé par le hérisson en Europe. Aux Etats-Unis toutefois, le sérovar pomona est le plus représenté (Clay Hodgin *et al*., 1989).

2.2 Signes cliniques

➦ **La leptospirose chez le Chien**

Entité clinique		Signes cliniques		Signes biologiques
FORME SURAIGUE		▫ Mort brutale sans symptômes		
FORME AIGUE	Forme ictérohémorragique	▫ Ictère « flamboyant » (congestion + ictère) ▫ Troubles digestifs ▫ Syndrome urémique ▫ Mort en 5 à 6 jours	**Signes communs** ▫Hyperthermie, tremblements, vomissements, déshydratation, choc, tachypnée, troubles de l'hémostase, épistaxis, myalgie (se traduisant par des douleurs lombaires)	▫ Leucocytose granulocytaire (4ème jour après infection) faisant suite à une leucopénie fugace ▫ Thrombocytopénie sévère et brutale (3 à 5 jours après infection). Récupération rapide possible ▫ Anémie régénérative transitoire
	Néphrite leptospirosique	▫ Néphrite		▫ Elévation de l'urée et la créatinine sérique ▫ Elévation des transaminases (ALAT notamment) ▫ Elévation des acides biliaires ▫ Elévation de la bilirubine conjuguée ▫ Elévation de la bilirubine totale
	Gastro-entérite hémorragique (ou typhus)	▫ Vomissements, hématémèse ▫ Diarrhée profuse noirâtre ▫ Syndrome urémique ▫ Hypothermie, coma puis mort en quelques heures		▫ Elévation de la créatinine kinase totale
FORME SUBAIGUE ou CHRONIQUE		▫ Fièvre, déshydratation, polyuro-polydipsie ▫ Douleurs musculaires, léthargie ▫ Oligurie, anurie	Insuffisance rénale chronique	▫ Elévation de l'urée ▫ Elévation de la créatinine
		▫ Anorexie, diarrhée, ascite, polyuro-polydipsie ▫ Douleur abdominale ▫ Ictère tardif ▫ Perte de poids ▫ Pétéchies, ecchymoses (< troubles de la coagulation) ▫ Fèces acholiques (< nécrose du foie et cholestase)	Hépatite chronique	▫ Elévation des transaminases (ALAT notamment) ▫ Elévation des acides biliaires ▫ Elévation de la bilirubine conjuguée ▫ Elévation de la bilirubine totale
		▫ Conjonctivite, uvéite, rhinite, amygdalite ▫ Toux, dyspnée ▫ Intussusception (< inflammation et iléus) ▫ Echecs à la reproduction		

Tableau 3 : Signes cliniques et biologiques de la leptospirose chez le Chien

(D'après Van de Maele *et al*, 2008 ; André-Fontaine, 2006 et 2002; Mailloux & Lorne, 1974 ; Prescott *et al*., 2002 ; Bolin, 1996)

L'infection leptospirosique ne se traduit pas toujours par des manifestations cliniques chez le chien. Lorsqu'ils surviennent, les signes cliniques sont de sévérité variable (tableau 3). Ils dépendent de l'immunité de l'hôte, de son âge, du caractère endémique ou non de l'infection dans la région, et de la virulence du sérovar (Van de Maele *et al*., 2008). Les chiens de grande race semblent plus affectés que les autres (Prescott *et al*., 2002). Lors de leptospirose suraiguë, l'insuffisance rénale et l'insuffisance hépatique n'ont pas le temps de se développer.

Goldstein et ses collaborateurs (2006) ont évalué l'influence du sérogroupe infectant sur les signes cliniques développés par les chiens. De manière globale, l'influence du sérogroupe reste mineure, mais les chiens suspectés d'être infectés par le sérogroupe Pomona présentent plus souvent des vomissements (p= 0,01), une thrombocytopénie (p=0,009), une azotémie sévère (p=0,04) et une hyperphosphatémie que les chiens infectés par d'autres sérogroupes (Goldstein *et al*., 2006).

➦ La leptospirose chez le Chat

La leptospirose a rarement été identifiée chez le chat, mais les signes cliniques, lorsqu'ils sont présents, semblent être proches de ceux évoqués chez le chien. Deux études du pouvoir pathogène des leptospires sur le chat, assorties d'une infection expérimentale, réalisées successivement par Fessler et son équipe en 1964 puis par Larsson et ses collègues en 1985 ont démontré la faible sensibilité du chat. Aucun cas de mortalité n'a été rapporté dans ces études, et les seules manifestations cliniques évoquées furent celles d'une hyperthermie discrète et temporaire, n'excédant pas 24 heures, survenant entre 2 et 12 jours post inoculation. Par ailleurs, les érythrocytes félins semblent peu sensibles aux hémolysines leptospirosiques, d'où l'absence d'anémie hémolytique chez le chat. Dans les conditions naturelles, la maladie semble pouvoir évoluer sur un mode aigu et conduire à la mort en moins de 10 jours (Larsson *et al*., 1985). Le tropisme hépatique des leptospires est marqué chez le chat ; il peut en résulter un ictère. En revanche, les chats atteints de leptospirose n'ont à ce jour jamais montré de signes d'insuffisance rénale aiguë (Vijayachari *et al*., 2008 ; Luciani, 2004 ; Larsson *et al.*, 1985).

➦ La leptospirose chez les bovins

En dépit d'un manque d'évaluations fiables des séroprévalences la concernant, la leptospirose bovine représenterait l'une des deux principales causes infectieuses de troubles de la reproduction chez les bovins dans le monde. Sachant que le coût économique des troubles de la reproduction chez les bovins est considérable (estimé à 200 millions de dollars par an pour la seule Californie), il est alors aisé de situer l'importance économique que revêt la leptospirose dans les pays endémiques (Escamilla *et al*., 2006).

Des estimations récentes obtenues à partir d'un échantillonnage sur des troupeaux américains montrent une séroprévalence comprise entre 35 et 50% (Grooms, 2006). La leptospirose s'est avérée être la

cause de 6% à 10% des avortements, dans deux études conduites respectivement au Canada et aux Etats-Unis (Grooms, 2006). En 2003, une étude visant à estimer la part relative des différents agents infectieux incriminés dans les avortements chez les bovins a été réalisée dans un élevage mexicain de 300 vaches en lactation ou gestantes. Les anticorps dirigés contre *Leptospira interrogans* furent les plus fréquemment identifiés, dans 91 % des 99 échantillons (Escamilla *et al*., 2006). Ces résultats doivent cependant être nuancés, car la présence d'anticorps ne signifie pas nécessairement que l'infection est la cause de l'avortement.

La leptospirose touche les vaches laitières et allaitantes. La mortalité et la morbidité sont particulièrement élevées chez les jeunes veaux. Comme chez d'autres espèces, l'infection leptospirosique est le plus souvent assortie d'une symptomatologie fruste, voire inapparente.
Lorsque des manifestations cliniques sont présentes, elles se traduisent le plus souvent chez le bétail par un syndrome fébrile et des troubles de la reproduction. Ceux-ci comprennent les avortements, l'infertilité, la momification fœtale, les naissances prématurées, les rétentions placentaires ou encore une faiblesse des veaux. Les avortements peuvent survenir plusieurs semaines après infection, sans autre manifestation clinique évidente. Des baisses de production laitière sont possibles (Branger *et al*., 2005 ; Vijayachari *et al*., 2008 ; Adler & De la Peña Moctezuma, 2009 ; Grooms, 2006 ; Smith & Perry, 1952).

Dans sa forme la plus grave, la leptospirose bovine se traduit par une hyperthermie marquée, une anémie aiguë, de l'hémoglobinurie et un ictère. La rétrocession de l'hyperthermie assortie à l'hémoglobinurie est souvent annonciatrice du décès. Lorsque l'animal est retrouvé mort au pré, le diagnostic peut s'appuyer sur l'autopsie. Celle-ci révèle, outre l'ictère, l'anémie et la couleur rouge des urines, des hémorragies dans divers tissus, notamment dans les cortex rénaux. Dans les cas chroniques -il s'agit alors bien souvent de découvertes d'abattoir-, le parenchyme rénal peut présenter de petites zones nummulaires ou striées blanches (Smith & Perry, 1952).

Des formes bénignes ont été décrites chez la vache laitière, se traduisant par de l'hyperthermie, un abattement discret, de l'anorexie ainsi que par une modification de la sécrétion lactée. Le lait prend une couleur rose pâle à rouge sombre due à la présence de sang. L'apparence du lait peut revenir à la normale dans les 24 heures, ou bien devenir jaune et floconneuse, prenant parfois l'aspect du colostrum. De manière surprenante, le quartier demeure généralement souple, voire devient flasque, et ce indépendamment de la nature de la sécrétion (Smith & Perry, 1952).

➦ La leptospirose chez les petits ruminants

Des cas de leptospirose sévère à fatale dus aux sérovars pomona et hardjo ont été reportés chez des moutons en Nouvelle-Zélande, aux Etats-Unis, en Italie et en Australie. La maladie était alors

caractérisée par un ictère hémolytique, une hémoglobinurie et une hémoglobinémie, ainsi que par des avortements. Le sérovar grippotyphosa a quant à lui été identifié comme agent responsable de leptospirose subclinique et clinique en Israël, en Iran et aux Etats-Unis (Kingscote, 1985). Néanmoins, les moutons sont le plus souvent porteurs chroniques de *Leptospira*, responsable de troubles de la reproduction ou passant totalement inaperçu.

Les chèvres sont moins sensibles à la leptospirose que les bovins. La leptospirose caprine peut se présenter sous une forme aiguë, avec hyperthermie, anorexie, abattement, ictère et syndrome anémique ou hémorragique. Cependant, la forme chronique associée à de l'infertilité, des morts néonatales, des avortements et des chutes de production laitière survient beaucoup plus fréquemment, conduisant à d'importantes pertes économiques (Lilenbaum *et al*., 2008).

➦ La leptospirose chez le Cheval

Chez le cheval, l'infection inapparente représente 2 à 70% des cas selon la zone géographique (Clay Hodgin *et al*., 1989). Les chevaux présentent communément une forme chronique de leptospirose se traduisant par une uvéite récurrente, parfois même considérée comme une séquelle de l'infection. L'infection clinique peut également se manifester par des avortements généralement tardifs et par des naissances prématurées, ainsi que par des troubles rénaux et hépatiques. Les symptômes associés sont l'hématurie, l'ictère, l'anorexie, la fièvre et une détresse respiratoire. La lésion microscopique la plus consistante est la néphrite interstitielle (Båverud *et al.*, 2009 ; Adler & De la Peña Moctezuma, 2009 ; Clay Hodgin *et al.*, 1989).

Båverud et ses collaborateurs (2009) ont montré qu'il n'existait pas d'association significative entre des titres positifs pour les sérovars bratislava et icterohaemorragiae et la présence de signes cliniques évocateurs de leptospirose chez le cheval, à l'exception de l'association entre troubles respiratoires et séropositivité au sérovar bratislava. Ces observations confortent les résultats d'une étude de séroprévalence réalisée au Brésil entre 1996 et 2005. Sur les 320 chevaux testés, 214 (66,88%) étaient séropositifs pour la leptospirose à un titre seuil de 1/100, mais aucun d'entre eux n'a manifesté de signe clinique évocateur de la maladie (Hashimoto *et al*., 2007). De telles observations - séroprévalence élevée, manifestations cliniques frustes à inexistantes- appuient l'hypothèse stipulant que le cheval pourrait constituer l'un des réservoirs pour la leptospirose.

➦ La leptospirose chez le Porc

Les manifestations cliniques de la leptospirose chez le porc sont les mêmes que celles observées chez les bovins (Adler & De la Peña Moctezuma, 2009).

3. Modes de contamination (Epidémiologie analytique)

3.1 Sources de leptospires

Les leptospires sont ubiquistes. La première source de leptospires provient de l'excrétion urinaire de bactéries par des animaux réservoirs ou chez des hôtes accidentels dont les tubules rénaux sont colonisés par les leptospires. Les animaux réservoirs, réceptifs mais peu sensibles à l'infection leptospirosique, assurent notamment la survie, la persistance et la multiplication des leptospires ainsi que leur dissémination dans l'environnement. L'excrétion urinaire peut être intermittente ou permanente, et la concentration de bactéries émises peut atteindre 10^8 bactéries par millilitre (Adler & De la Peña Moctezuma, 2009). La présence de leptospires dans l'urine de patients humains plus d'un an après contamination a pu être objectivée par PCR, confirmant la capacité des leptospires à survivre longtemps dans les tubules rénaux (Bal *et al*., 1994).

L'urine constitue donc une matière virulente majeure. Le lait doit également être considéré comme matière virulente. Une transmission verticale de la mère à son petit est possible. Cependant, l'acidification lactique et l'action lytique de certains composant du lait rendent ce dernier peu favorable à la survie des leptospires.

Enfin, les sécrétions et excrétions génitales dont le sperme constituent des matières virulentes potentielles. Les leptospires peuvent en effet persister jusqu'à cinq mois dans l'utérus gestant. Lors d'avortement, l'excrétion de leptospires dans le milieu extérieur se prolonge pendant environ une semaine, et l'avorton constitue donc une matière virulente.

3.2 Modes de transmission

La transmission peut être directe ou indirecte, et dépendrait de l'espèce bactérienne de leptospires. C'est ainsi que l'espèce *L. interrogans* est le plus souvent contractée à partir de la surface d'eau contaminée (contamination indirecte), tandis que l'espèce *L. borgpetersenii* semble privilégier un cycle de transmission d'hôte à hôte (contamination directe). Ceci peut être expliqué par les différences génomiques entre les deux espèces. Le génome de *L. borgpetersenii* est 'amoindri' d'environ 700 kilobases (kb) par rapport à celui de *L. interrogans*. La comparaison des génomes montre que les fonctions perdues au cours de l'évolution par *L. borgpetersenii* semblent être concentrées dans des gènes codant des signaux de transduction et des mécanismes de défense indispensables à l'adaptation et à la survie dans des environnements diversifiés. De plus, la paupérisation des fonctions métaboliques et de transport de solutés limite probablement la diversité des nutriments pouvant être consommés par *L. Borgpetersenii*. Par opposition, *L. interrogans* dispose de davantage de signaux de transduction et de facteurs de régulation de la transcription. Ses fonctions métaboliques et de transport

de solutés sont diversifiées et compatibles avec des capacités de survie dans l'eau (Bulach *et al.*, 2006).

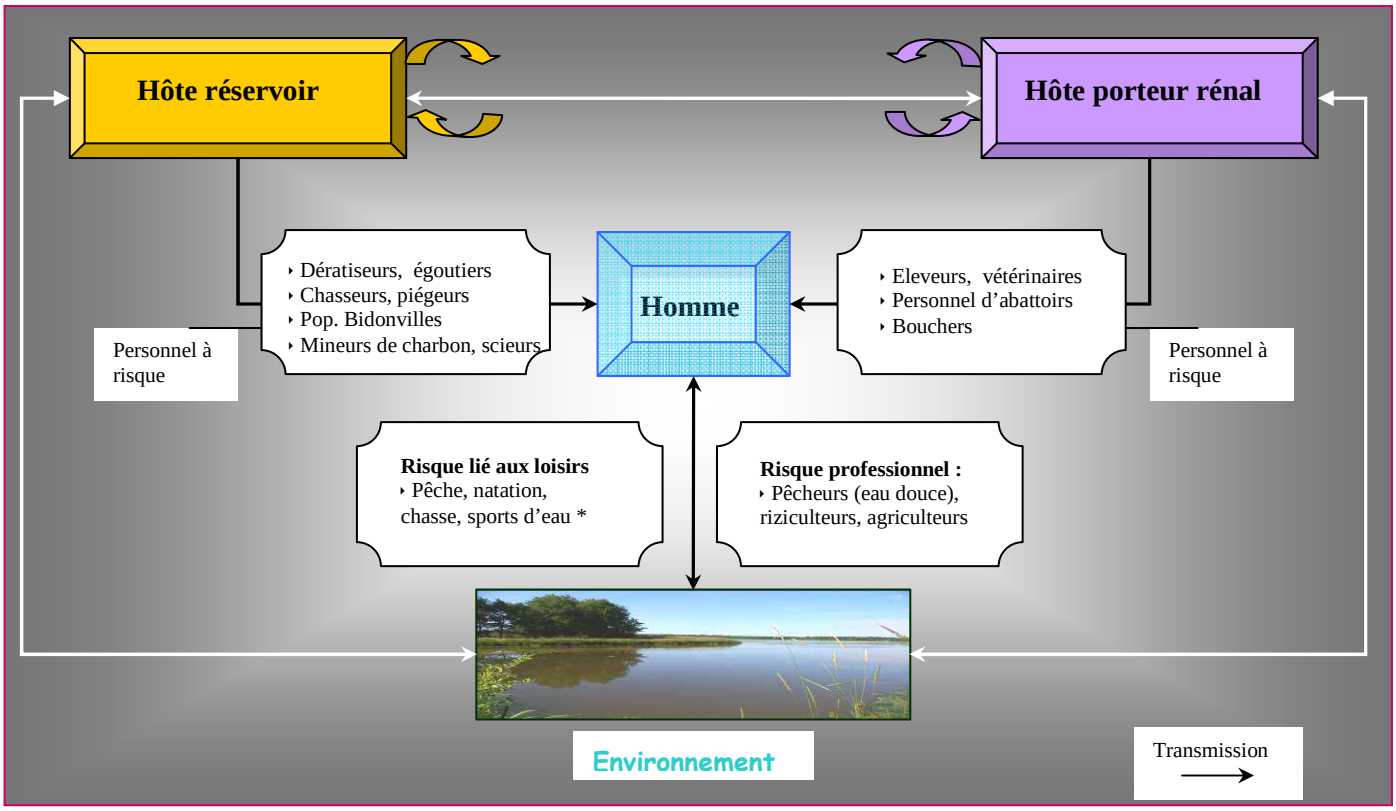


Figure 8 : Interrelations entre les acteurs épidémiologiques de la leptospirose et risque associé, d'après Michel, 2002 ; Morgan *et al.*, 2002 ; Haake *et al.*, 2002 ; Waikins, 1986 (* kayak, canoë, canyoning, rafting, triathlon)

➦ La transmission directe se produit lorsque des leptospires contenus dans des tissus, fluides corporels ou urines d'animaux porteurs asymptomatiques, porteurs chroniques ou infectés aigus pénètrent chez un nouvel hôte et initient une infection. La transmission directe chez les animaux peut être transplacentaire, hématogène ou s'effectuer à la faveur d'un contact sexuel ou lors de la tétée d'une mère infectée (Vijayachari *et al.*, 2008).

La transmission directe de l'animal à l'homme (zooanthroponose) est commune chez les personnes en contact avec les animaux, vivants ou morts, tels que les bouchers, les vétérinaires, les éleveurs de bovins ou de porcs ou encore les personnels affectés à la lutte contre les rongeurs ou au travail dans les égouts (figure 8). Aux Etats-Unis, éleveurs et vétérinaires constituent les catégories professionnelles les plus touchées par la leptospirose. En revanche, la transmission d'homme à homme est pour ainsi dire inexistante (Morgan *et al.*, 2002 ; Vijayachari *et al.*, 2008 ; Adler & De la Peña Moctezuma, 2009).

➦ La transmission indirecte correspond à une infection à partir d'un environnement contaminé. La contamination s'effectue principalement à travers la peau saine de l'hôte. Ainsi, une incidence importante est notée chez les travailleurs exposés quotidiennement à un environnement humide. La leptospirose constitue de fait une maladie bien connue des riziculteurs de Thaïlande ou d'Indonésie. Les personnes s'adonnant à des activités de loisir aquatiques sont particulièrement exposées. Kayakistes, canoéistes, triathlètes, adeptes du canyoning, mais aussi pêcheurs, chasseurs, agriculteurs et notamment riziculteurs constituent donc des personnels à risque (figure 8) (Vijayachari *et al*., 2008, Haake *et al.*, 2002, Morgan *et al*., 2002).

La transmission indirecte ne s'effectue néanmoins pas exclusivement à partir d'un environnement humide. Ainsi, les mineurs de charbon et les employés de scierie ont longtemps constitué les principales catégories professionnelles à risque en Grande-Bretagne. La contamination humaine était due à la contamination de l'environnement par de l'urine de rats chargée de leptospires (Waitkins, 1986).
Ce mécanisme explique également la survenue plus récente de cas de leptospirose urbaine, contractée à partir d'environnements souillés par de l'urine de rat (Vinetz *et al*., 1996). Les mécanismes par lesquels *L. interrogans sensus lato* est transmise de manière sporadique dans les villes, en l'absence d'exposition professionnelle ou de loisir, demeurent méconnus. Il semblerait toutefois qu'outre les rats et souris, les ratons laveurs, les furets et les écureuils, ubiquistes dans les zones périurbaines des Etats-Unis et dont on a montré la séropositivité fréquente pour la leptospirose, jouent un rôle important (Barry *et al.*, 2006). Une étude portant sur trois habitants du centre-ville de Baltimore (Etats-Unis) ayant contracté la leptospirose a montré que leur contamination provenait de coupures après avoir marché pieds nus dans des ruelles infestées de rats. Par ailleurs, 8 rats sur 18 prélevés dans l'une de ces ruelles se sont révélés séropositifs pour *L. interrogans*, avec les titres les plus élevés pour le sérovar icterohaemorragiae (Vinetz *et al*., 1996). Marcher pieds nus en ville ou dans des zones de déforestations propices à la pullulation de rongeurs constitue donc un facteur de risque de transmission (Bharti *et al*., 2003 ; Vinetz *et al*., 1996).

Le sérovar infectant peut varier en fonction du mode de contamination. Ainsi, les éleveurs sont le plus souvent contaminés par le sérovar hardjo, dont les bovins constituent l'espèce réservoir, de même que les vétérinaires ruraux, le personnel d'abattoir et les bouchers. Les personnes contaminées à partir de l'environnement présentent quant à elles majoritairement des titres en anticorps élevés pour le sérovar icterohaemorrhagiae (Waitkins, 1986).

3.3 Un cycle épidémiologique complexe impliquant plusieurs acteurs …

Les leptospires ont une distribution ubiquiste et affectent environ 160 espèces de mammifères domestiques et sauvages (Zunino & Pizarro, 2007).

Les réservoirs principaux de la leptospirose sont les rongeurs, comme nous le verrons dans le second chapitre. Ainsi, une étude de séroprévalence conduite en France et en Guadeloupe a montré que 48% des ragondins (*Myocastor coypus)* et 34 à 50% des rats (respectivement *Rattus norvegicus* et *R. rattus*) étaient séropositifs pour la leptospirose. Le portage rénal (qui suppose une excrétion de leptospires via les urines) était particulièrement élevé chez le rat, beaucoup plus faible chez le ragondin, et nul chez le lapin (Michel *et al*., 2002).

Pour autant, les rongeurs ne constituent pas les seuls réservoirs : la plupart des mammifères, y compris aquatiques, peuvent être porteurs de leptospires. Les plus fréquemment identifiés, outre les rongeurs, sont les petits marsupiaux, le bétail, les cochons et les chiens (Adler & De la Peña Moctezuma, 2009). L'étude conduite par Michel et son équipe (2002) a également mis en exergue le rôle épidémiologique de la mangouste (*Herpestes javanicus*), dont le portage rénal et la séroprévalence étaient tous deux élevés.

Il est important de rappeler qu'une espèce de mammifère donnée héberge préférentiellement un sérovar de leptospire donné, mais que cette relation n'est pas exclusive.

3.4 … et plusieurs facteurs !

Les facteurs présidant à l'émergence d'un foyer de cas dans une région donnée, endémique ou non, suscitent encore aujourd'hui de nombreuses interrogations. Ces incertitudes sont liées à la complexité du cycle épidémiologique des leptospires, à la multiplicité des sources de bactéries, mais aussi à l'insuffisance des données épidémiologiques permettant de mieux comprendre les cycles localement. Ainsi, la mesure de l'incidence de la leptospirose peut être fortement corrélée aux changements intervenus dans la collecte des données et la détection des cas. Par exemple, la leptospirose pourra, à tort, être considérée comme émergente dans un pays où elle n'était auparavant ni suspectée, diagnostiquée ou déclarée.

Les données de la littérature permettent cependant d'identifier certains facteurs « favorisants » :

➦ La survenue d'inondations, de fortes pluies ou d'ouragans dans les pays tropicaux et tempérés s'accompagne presque toujours d'un accroissement de l'incidence des cas de leptospirose. Citons pour exemple l'épidémie de syndrome pulmonaire hémorragique qui a affecté le Nicaragua en 1995, à la suite de graves inondations. Le foyer de cas du lac Springfield a également succédé à une période de précipitations exceptionnelles au mois de juin 1998, puisque les valeurs étaient en moyenne deux fois supérieures à celles enregistrées entre 1994 et 1997. Font exception à ce paradigme les inondations

d'eau de mer, comme celles survenues à la suite du Tsunami : l'eau salée semble être un milieu peu propice à la survie des leptospires (Morgan *et al*., 2002 ; Thaipadungpanit *et al*., 2007).

➦ Les changements climatiques durables peuvent contribuer à modifier le statut de la leptospirose dans un pays, de même que l'accroissement de la pauvreté, qui va de pair avec une diminution du niveau d'hygiène, une multiplication des réservoirs rongeurs et un accroissement de la promiscuité entre rongeurs et hommes.

➦ La déclaration de certains foyers semble déroger à ce schéma épidémiologique. En Thaïlande, les nombreux cas de leptospirose survenus entre 2001 et 2004 seraient expliqués par la réussite biologique d'un clone pathogène de *Leptospira* (Thaipadungpanit *et al*., 2007). Cette hypothèse a été émise suite à un typage génétique par MLST (Multi Locus Sequence Typing) réalisé sur des leptospires isolés à partir de cas humains et de rongeurs réservoirs. Ce typage a permis de définir des séquences types, qui correspondaient à la combinaison de 7 allèles portés par 7 gènes de ménage. Sur les 101 isolats de patients atteints de leptospirose et admis à l'hôpital de Udon Thani (nord-est de la Thaïlande), 12 séquences type (ST) spécifiques de clone ont été identifiées, mais l'une (ST34) s'est révélée être extrêmement prédominante, présente dans 76% des isolats. Cette séquence type (ST) était associée à *L. interrogans*, sérovar Autumnalis. ST34 représentait également 71% (17/24) des isolats humains issus de diverses provinces de Thaïlande, et 88% (7/8) des isolats de Rongeurs.
Cette observation est d'autant plus surprenante qu'il existe une forte variabilité de la structure génétique chez les souches de référence, puisque 59 séquences types différentes ont été identifiées parmi 76 souches de référence. La disparition progressive de ST34 s'est accompagnée de la diminution du nombre de cas de leptospirose en Thaïlande, ce qui a abondé dans le sens d'une corrélation directe entre la présence du clone et le foyer.
ST34 s'est avéré être génétiquement très proche de ST29, isolé à partir d'un humain en Indonésie. Son émergence pourrait être liée à une mutation lui ayant conféré un avantage adaptatif. Plusieurs hypothèses se confrontent : la mutation pourrait augmenter les quantités de leptospires libérées dans l'urine des animaux réservoirs, ou bien renforcerait la résistance des spirochètes dans le milieu extérieur. Cette souche pourrait également être plus pathogène pour l'homme, et la proportion de cas subcliniques par rapport aux cas cliniques aurait été diminuée (Thaipadungpanit *et al*., 2007).

Enfin, Waitkins (1986) a observé une fluctuation saisonnière des cas de leptospirose humaine. Les infections dues au sérovar icterohaemorrhagiae connaissent un pic estival en Grande-Bretagne, dû aux baignades et à la pratique des sports d'eau, ainsi qu'un pic en hiver affectant notamment les agriculteurs et vraisemblablement dû au fait que les rongeurs viennent trouver refuge dans les réserves d'aliment durant la saison froide. Les infections au sérovar hardjo sont communément observées au cours de l'automne, avec la rentrée en stabulation du bétail, laquelle génère un stress favorisant la

libération de leptospires dans les urines (Waitkins, 1986). Dans les pays tropicaux, le pic d'infection se produit généralement au cours de la saison des fortes pluies, l'environnement étant alors favorable à la survie et à la multiplication des leptospires (Bharti *et al.*, 2003).

L'étude de l'épidémiologie descriptive de la leptospirose nous a donc permis dans cette partie de mettre en exergue son ubiquité ainsi que la recrudescence de cas dans le monde. L'épidémiologie analytique nous a permis d'appréhender la complexité épidémiologique du cycle des leptospires, la multiplicité des réservoirs et des facteurs susceptibles de concourir à l'émergence d'un foyer de cas.

Conclusion de la première partie

Cette revue nous a permis de situer l'importance médicale croissante de la leptospirose, chez l'homme tout particulièrement, du fait de sa gravité, de son incidence croissante et des difficultés diagnostiques, mais aussi chez nos espèces domestiques, du fait des pertes économiques qu'elle engendre chez les espèces de rente. Nous avons soulevé également, tant dans son abord descriptif qu'analytique, la complexité du cycle épidémiologique des leptospires. Celui-ci fait intervenir des hôtes « accidentels », réceptifs et généralement sensibles à la maladie, et des hôtes « habituels » des leptospires jouant le rôle de réservoirs, dont nous avons souligné la multiplicité. Nous allons concentrer notre étude dans cette seconde partie sur le rôle particulier joué par un des hôtes réservoirs de la leptospirose : le Ragondin.

SECONDE PARTIE

LE RAGONDIN :
ECOLOGIE, BIOLOGIE et
REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Introduction

Le Ragondin est un rongeur ubiquiste ayant su s'adapter à des conditions de vie fort différentes de celles de son habitat d'origine. L'exportation d'individus, de l'Amérique du Sud vers tous les continents, à l'exception de l'Océanie et de l'Antarctique, s'est faite dès la fin du XIXe siècle en vue de l'utilisation de sa fourrure dans l'industrie de pelleterie. Jusqu'à la moitié du XXe siècle, la connaissance du Ragondin procédait de l'accumulation de données empiriques, voire même parfois issues de quelques légendes traditionnelles. Le besoin d'approfondir ces connaissances s'est alors manifesté. Il s'agissait d'optimiser les pratiques d'élevage dans un souci d'amélioration du rendement de production d'une part, mais aussi, d'autre part, de répondre à l'inquiétude qu'a suscitée son adaptation, sa colonisation, voire son envahissement des milieux sauvages.

Aujourd'hui, quels que soient le statut ou la représentation sociale liés à ce rongeur à l'adaptabilité remarquable, quel que soit le dessein qu'on lui réserve (et nous en soulignerons l'éclectisme), la connaissance de son écologie et de sa biologie sont des préalables indispensables à toute étude épidémiologique le concernant.

L'objet de ce chapitre est donc de présenter de manière relativement concise, l'ensemble des données écologiques, biologiques, ainsi que la répartition en France et dans le monde du Ragondin, dans le but de situer sa place dans l'épidémiologie de la leptospirose.

Les références utilisées pour la rédaction de ce chapitre ne sont pas toutes récentes. Au cours des années 1970 et 1980, les campagnes conduites en vue d'éradiquer le Ragondin en Angleterre et en France ont permis à la recherche de bénéficier du soutien financier des autorités publiques. Depuis, l'éco-biologie du Ragondin n'a suscité qu'un intérêt relatif et n'a fait l'objet que de rares publications, hormis en Argentine, où, en 2002, un grand projet gouvernemental visant à promouvoir une gestion durable du Ragondin a permis d'impulser un nouveau souffle à leur étude.

I. Répartition géographique et statut actuel du Ragondin

Le Ragondin est un rongeur subtropical semi-aquatique dont la répartition est aujourd'hui ubiquiste. L'Australie et l'Antarctique sont les deux seuls continents non colonisés par le Ragondin.

1. Dans le monde

1.1 Région d'origine

Le Ragondin est natif d'Amérique du Sud, au sud d'une ligne correspondant à une latitude de 23°. Sa région originelle inclut donc l'Argentine, la Bolivie, le sud du Brésil, le Chili, le Paraguay et l'Uruguay. Son habitat naturel comprend des marais, lacs, rivières à faible débit et estuaires (Carter & Leonard, 2002 ; Laurie, 1946).

1.2 Motifs d'introduction dans d'autres pays

Plusieurs motifs ont conduit à l'introduction du Ragondin hors de son aire géographique d'origine :

- En premier lieu, l'introduction du Ragondin hors de l'Amérique du Sud doit être corrélée à la valeur marchande représentée par sa fourrure, de grande qualité. Il a ainsi été introduit en Europe à la fin du XIXe siècle en vue de l'utilisation de sa fourrure en pelleterie (Mougenot & Roussel, 2006 ; Carter & Leonard, 2002 ; Le Louarn & Quéré, 2003).

- En second lieu, la viande de Ragondin constitue une denrée alimentaire régulièrement consommée, surtout dans les pays sud-américains. Cette possibilité de transformation supplémentaire a pu concourir dans une certaine mesure à « exporter » le Ragondin hors de son continent d'origine. Soulignons de surcroît que le Ragondin fait partie des quarante espèces animales les plus à même de subvenir aux besoins alimentaires de nombreux pays (Hardouin *et al*., 2003).

- Enfin, certaines régions des Etats-Unis ou de France ont tenté d'utiliser le Ragondin en tant que faucardeur afin d'entretenir les marais et étangs, avec l'objectif de réduire l'invasion des plantes aquatiques, mais cette application s'est révélée peu fructueuse : le Ragondin n'est pas assez sélectif, et délaisse sur place 40 à 80% des végétaux qu'il consomme (Woods *et al*., 1992 ; Carter & Leonard, 2002 ; Le Louarn & Quéré, 2003).

1.3 De l'atout économique au statut de mammifère nuisible

Comme nous l'avons vu, le Ragondin a été élevé, et l'est encore en Amérique du Sud ou en Europe de l'Est, essentiellement pour la production de fourrures de qualité. Cette valorisation de la fourrure a été initiée au XIXe siècle en Amérique du Sud, puis s'est répandue sur tous les continents (à l'exception de l'Océanie et de l'Antarctique) dans les premières décennies du XXe siècle (Guichón *et al*., 2003 ; Carter & Leonard, 2002).

Aujourd'hui, le statut du Ragondin est fort divers, puisque classé comme animal gibier ou nuisible dans de nombreux pays, comme en France, il fait l'objet d'une gestion durable de ses effectifs dans d'autres régions du monde, comme en Argentine (Corriale *et al*., 2006). Afin de souligner ces divergences de statut dans le monde, nous exposerons quelques exemples antinomiques en terme de gestion du Ragondin.

L'interaction entre homme et Ragondin est antique en Argentine. Les Indiens Guaranies, Chana-Timbues et Querandies, entre autres, utilisaient sa viande pour l'alimentation et sa fourrure pour la confection de vêtements. Plus tard, les créoles ont intensifié les prélèvements, tant pour assurer leur subsistance que pour répondre à la demande commerciale de fourrure de Ragondin. La vente de fourrure est encore aujourd'hui très importante en Argentine, et près de 5 000 000 de peaux étaient exportées chaque année en moyenne jusqu'en 1997 (Bó *et al*., 2006).

L'urbanisation et l'augmentation des prélèvements par la chasse ont appauvri les effectifs sauvages de ragondins argentins et ont conduit les autorités à promouvoir une gestion durable des effectifs de ce rongeur tropical. Cette entreprise s'inscrit dans un dessein tant écologique qu'économique. On estime en effet que d'un point de vue socio-économique, le Ragondin constitue, avec l'Iguane (*Tupinambis sp*.), la principale ressource de faune sauvage de l'Argentine (Porini *et al*., 2002).

Roberto Fabiàn Bó et son équipe (2006) ont présenté des recommandations en terme de gestion cynégétique du Ragondin. Ils proposent de :

- réduire la période autorisée de chasse et la concentrer durant les seuls mois d'hiver, afin d'éviter notamment la chasse lors des périodes de reproduction qui occasionnent d'énormes pertes de productivité potentielle ;
- interdire la chasse avec chiens, qui ne sont pas assez sélectifs ;
- augmenter la taille minimale des peaux autorisées de 65 à 70 centimètres (longueur totale du cuir non tanné) et n'accepter aucun pourcentage de cuir en deçà de cette norme. Les chasseurs devront par là même porter un soin attentif à ne capturer que des individus adultes (Bó *et al*., 2006).

Les autorités publiques ont ainsi promu une régulation de la chasse ainsi que le développement de l'élevage en captivité. La chasse n'est autorisée que pendant une période s'étalant du mois d'avril au mois de septembre. La classification du Ragondin en tant qu'espèce « d'élevage en captivité» a permis d'améliorer considérablement le rendement économique lié à l'exploitation de sa fourrure et de sa viande, mais a également permis de réduire la pression de chasse, favorisant ainsi la conservation de réservoirs géniques naturels (Porini *et al*., 2002).

Dans son habitat d'origine, les nuisances imputées au Ragondin sont exceptionnelles car les ressources alimentaires de son milieu sont stables (Corriale *et al*., 2006). Aussi les dommages occasionnés aux récoltes sont-ils inexistants. De plus, le Ragondin subit une prédation naturelle et humaine qui tend à maintenir stables ses effectifs. En revanche, dans les pays à climat tempéré pouvant présenter des hivers rigoureux rendant inaccessible l'accès aux monocotylédones aquatiques, le Ragondin risque davantage de causer des dommages aux cultures et aux infrastructures. Enfin, n'étant ni consommé ni utilisé pour la production de fourrure, et ne subissant pas de prédation naturelle, le Ragondin voit ses effectifs rapidement augmenter (Corriale *et al*., 2006).

En Grande Bretagne, le premier Ragondin a été importé en 1929 pour développer des élevages de fourrure, mais dès les années 1960, des efforts ont été entrepris afin de réduire ses effectifs qui devenaient problématiques. Une campagne d'éradication a été conduite par vingt-quatre piégeurs dirigés par Gosling de 1981 à 1989, année à partir de laquelle plus aucun Ragondin n'a été aperçu sur le sol britannique (Doncaster & Jouventin, 1989).

En Europe de l'Est et dans le Caucase, le Ragondin est extrêmement apprécié pour sa fourrure. Ces pays disposent de programmes d'élevage pour produire des fourrures haut de gamme et ont établi des pedigrees. L'Azerbaïdjan a ainsi créé le Ragondin Blanc d'Azerbaïdjan. Bien que l'Argentine et la Louisiane disposent des plus grands élevages au monde de Ragondins, les plus grandes quantités et la meilleure qualité de fourrures proviennent de populations semi captives du Caucase et de l'Europe de l'Est (Carter & Leonard, 2002).

En Pologne, l'élevage fermier de Ragondins constitue aujourd'hui encore une grosse industrie tandis qu'en Finlande, le Ragondin constituait un gibier apprécié avant que ses populations ne s'éteignent.

Il arrive qu'au sein même d'un pays, le statut du Ragondin soit variable. Ainsi, du fait de divergences culturelles, le Ragondin est considéré comme animal nuisible dans l'ouest de l'Allemagne alors qu'il est considéré comme gibier et chassé dans l'est de l'Allemagne (Carter & Leonard, 2002).

1.4 Répartition mondiale actuelle du Ragondin

Le Ragondin est naturellement présent en Amérique du Sud.

Les Ragondins ont été introduits dans une trentaine d'états des Etats-Unis, mais leurs effectifs actuels sont très variables d'un état à l'autre. L'importance des populations de ragondins devient problématique en Louisiane et dans le Maryland, à tel point que l'Etat de Maryland cherche à les éradiquer, tandis que la Louisiane promeut la viande de Ragondin afin d'accroître la pression de prélèvements. Les Ragondins sont à l'état de haret dans de nombreuses parties du Canada (Woods *et al*., 1992 ; Carter & Leonard, 2002 ; Doncaster & Jouventin, 1989). Des individus ont été aperçus au nord du Mexique, laissant supposer leur entrée à partir du Texas voisin (Carter & Leonard, 2002).

Le manque d'études concernant le Ragondin en Afrique ne permet pas une revue exhaustive des pays susceptibles d'en héberger des populations sauvages. Le Ragondin serait toujours présent en Afrique de l'Est, mais semble avoir disparu du sud de l'Afrique (Zambie, Zimbabwe et Botswana) et du Kenya en raison de la forte prédation dont il était la cible (Carter & Leonard, 2002).

Les Ragondins ont été introduits en Chine, au Japon, en Corée, en Thaïlande, à Taiwan ainsi que dans tout le centre de l'Asie et au Moyen-Orient. Leur statut actuel dans les différents pays est aujourd'hui inconnu. En Israël, le Ragondin cause des dommages aux étangs d'élevage piscicole (Carter & Leonard, 2002).

Enfin, les Ragondins sont présents à l'état de haret dans la plupart des pays d'Europe (figure 9), à l'exception de la Grande-Bretagne, qui les a éradiqués en 1989, de l'Irlande et des pays nordiques (Danemark, Finlande, Norvège, Suède) où le Ragondin ne s'est pas acclimaté (Carter & Leonard, 2002).

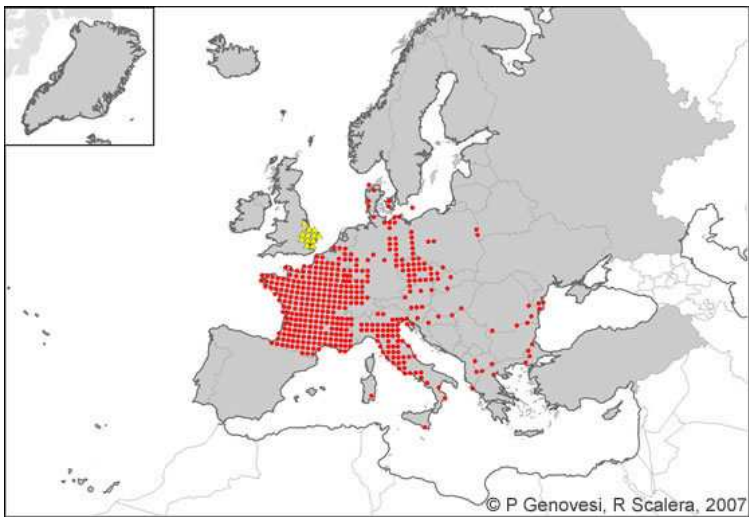


Figure 9: Répartition du Ragondin en Europe en 2007 (www.europ-aliens.org)

2. En France

Le Ragondin fait partie, avec le Rat Musqué, le Surmulot, le Castor Canadien, le Raton Laveur, le Chien Viverrin, le Vison d'Amérique et l'Hydropote de Chine, des huit mammifères aquatiques ou semi-aquatiques introduits en France (Maurin, 1997). Le Ragondin, le Rat Musqué, mais aussi le Surmulot font l'objet d'une attention toute particulière car les conséquences délétères de leur introduction sont particulièrement patentes.

Dès 1858, le Jardin des Plantes possède plusieurs couples de Ragondins. Vers 1882, le naturaliste Pays Mellier se procure deux couples de Ragondins et les installe dans son parc zoologique. Le Ragondin est à cette époque perçu comme un animal d'ornement et de curiosité digne d'intérêt et encore méconnu. Ainsi, au début du XXe siècle, des Ragondins sont exhibés dans des foires et décrits comme des « rats monstres » ou « rats géants » ayant dévoré des enfants vivants (Mougenot & Roussel, 2006).
En 1927 débute en France l'élevage commercial du Ragondin pour sa fourrure. Deux fermes réalisent les premiers essais d'élevage dans le Lot-et-Garonne et le Finistère dans des perspectives commerciales de pelleterie. Rapidement, l'élevage se développe et la profession se partage entre quelques grands élevages professionnels et de multiples petits élevages amateurs.
Dès les années 1930, le Ragondin commence à être relâché en pleine nature. Ce processus va s'accélérer avec la faillite des élevages (concomitante à la crise de 1929), et être accentué par l'échappement de Ragondins hors d'élevages mal clos. Cette colonisation du milieu sauvage ne sera dans un premier temps pas entravée car on prête au Ragondin un rôle d'excellent faucardeur, permettant d'entretenir à moindre coût étangs, canaux et rivières (Mougenot & Roussel, 2006).
Ce n'est qu'en 1937 qu'est pour la première fois attribué au Ragondin le statut d'espèce nuisible en France. L'élevage se poursuivra toutefois jusqu'au milieu des années 1980, où l'industrie de la fourrure, en crise, conduit à la cessation d'activité de nombreux élevages pelletiers. Une lutte intensive est ensuite conduite contre le Ragondin, via les piégeages et empoisonnements -aujourd'hui interdits.
Nous allons aborder dans ce paragraphe la problématique inhérente à l'introduction du Ragondin, la répartition géographique de ses effectifs en France métropolitaine et les conséquences de sa colonisation du territoire.

2.1 Sites d'implantation préférentiels (figure 10)

Le Ragondin est actuellement omniprésent sur le territoire français. Il a notamment colonisé toutes les plaines humides mais évite les zones montagneuses ou de faible humidité. Les Ragondins sont particulièrement nombreux dans le marais poitevin, région du littoral atlantique située au nord de La Rochelle. Cet ancien marécage saumâtre constitue un écosystème propice aux Ragondins, dont

l'expansion n'est que peu limitée par les hivers, tempérés par les influences océaniques. Ils sont également largement implantés dans la Dombes, dans l'Ain, qui constitue notre région d'étude.

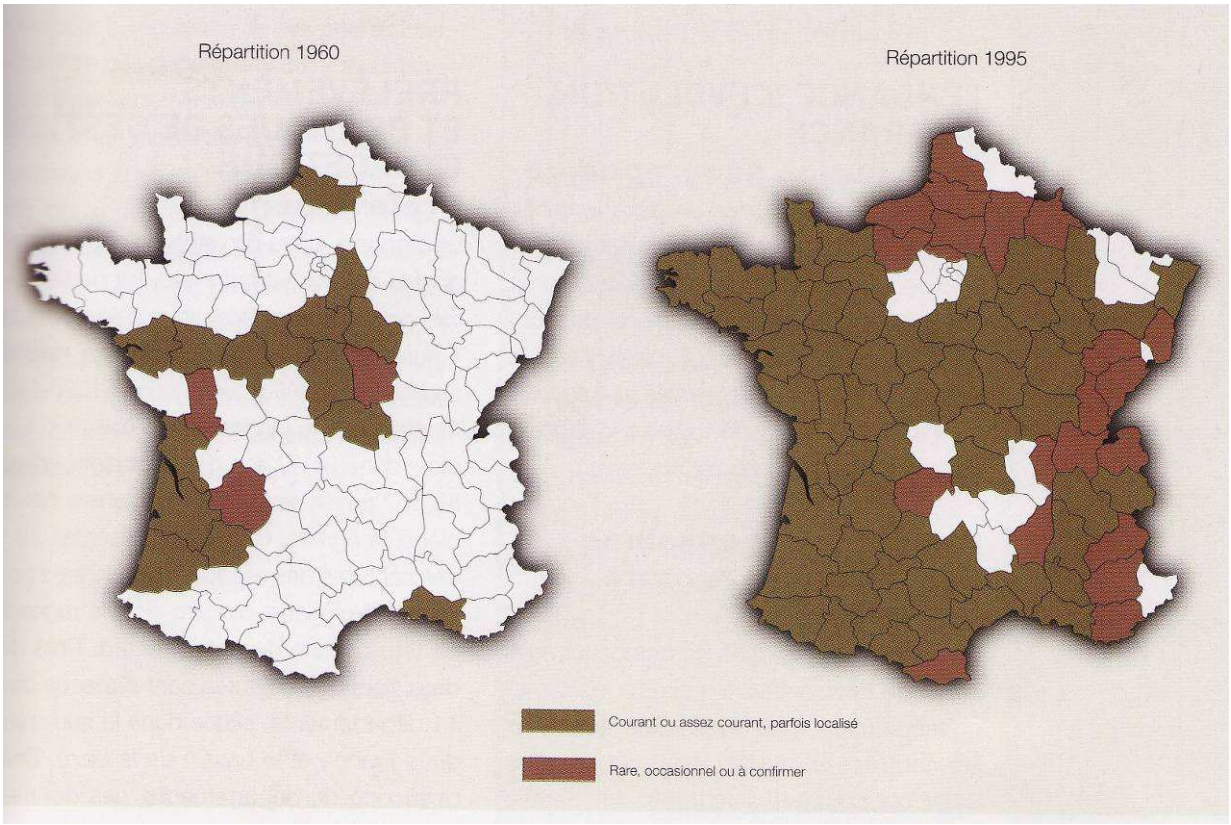


Figure 10 : Répartition du Ragondin (*Myocastor coypus*) en 1960 et en 1995 en France métropolitaine (ONCFS, 2008)

Vers 1960, le Ragondin n'occupait qu'une vingtaine de départements situés pour la plupart dans le sud-ouest de la France et le long de la Loire, tandis qu'en 1995, seules quelques zones montagneuses (Massif Central, Vosges), sèches (Alpes maritimes), et du nord de la France demeuraient non colonisées.

2.2 Statut actuel et dommages causés par le Ragondin

Diverses nuisances sur leur écosystème électif et les infrastructures sont imputées au Ragondin :

- Du fait de son régime alimentaire, le Ragondin constitue une menace pour les cultures céréalières d'une part, mais également pour la végétation naturelle bordant son habitat. Cette menace est proportionnelle à la densité d'individus et à la proximité géographique des sources de nourriture. Ainsi, jusqu'à 10% de la surface cultivée située à proximité d'un habitat linéaire (type canal de drainage) a pu être dégradée par l'action des Ragondins (Woods *et al*., 1992 ; Doncaster & Jouventin, 1989 ; Le Louarn & Quéré, 2003). Les dégâts agricoles imputés au Ragondin doivent toutefois être

relativisés en regard de ceux causés par d'autres espèces de gibier. Ainsi, l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage a établi qu'à eux seuls sangliers et cerfs étaient responsables de 95% des dégâts agricoles en 2000, les 5% restants étant largement imputés aux chevreuils.

- De plus, la tonte de la végétation, y compris les roselières, dont est responsable le Ragondin dans les étangs et marais, induit des perturbations majeures sur l'équilibre faunistique, particulièrement sur les insectes et oiseaux. Citons les exemples du parc régional Ticino, en Italie, où 7 des 12 espèces de plantes menacées sont consommées par les Ragondins, et des marais du nord-est de l'Italie, où le contrôle du Ragondin s'est accompagné d'une augmentation des populations de certaines espèces d'oiseaux, tels le Grèbe Castagneux (*Tachybaptus ruficollis*) ou la Guifette Moustac (*Chlidonia hybridus*) (Cocchi & Riga, 2008). Aussi les opérations de revégétalisation seront-elles largement perturbées dans les zones électives des Ragondins (Le Louarn & Quéré, 2003 ; Woods *et al*., 1992).

- Enfin, l'action la plus redoutée du Ragondin est liée à son activité de fouisseur. Les terriers et galeries formés par les colonies de Ragondins représentent autant de risques de fragilisation, voire de rupture des digues, ou de fuites d'eau *via* les galeries. On a ainsi constaté des affaissements routiers le long de canaux dans les zones de marais de l'ouest de la France où se concentre une grande population de Ragondins. Les barrages et ouvrages bétonnés (digues, ponts,…) peuvent être aussi fragilisés. Les exemples ne manquent pas et sont actuels : au début du mois de juin 2009, en France, le canal reliant Roanne à Digoin s'est vidé sur seize kilomètres, causant des inondations sur les cultures alentours et l'interruption de l'activité plaisancière sur tout le canal.
Les « coulées », ces passages formés par le déplacement de tous les membres d'un groupe de Ragondins sur des pistes bien définies, constituent également des zones de ravinement des plans d'eau ou rivières (Le Louarn & Quéré, 2003 ; Woods *et al*., 1992 ; Doncaster & Jouventin, 1989).

Mais les nuisances imputées au Ragondin sont également d'ordre sanitaire, puisqu'il représente un risque pour la santé humaine, pour le bétail et pour nos espèces domestiques en tant que réservoir pour certaines maladies (Waitkins *et al*., 1985). Concernant la santé humaine, trois maladies bactériennes sont à craindre : la leptospirose, étudiée dans notre première partie, la tularémie, et la salmonellose. On sait par ailleurs que le Ragondin peut héberger la forme adulte de la douve du foie (*Fasciola hepatica*), helminthe trématode parasite des bovins, et donc créer un réservoir secondaire. En cas de lutte contre cette maladie chez les bovins, il est important d'apprécier l'état de la population locale de Ragondins vis-à-vis du parasite (Ménard *et al.*, 2001).

En France, le Ragondin est classé gibier par l'arrêté du 26 juin 1987. Il fait également partie des animaux susceptibles d'être classés nuisibles (arrêté ministériel modifié du 30 septembre 1988).

Néanmoins, le Ragondin n'est pas considéré par la plupart des chasseurs comme une véritable espèce gibier, hormis les archers. Les prélèvements par tir ou piégeage visent surtout à réduire ses effectifs (Fédération Nationale des Chasseurs, ONCFS, 2008).

2.3 Méthodes de lutte

Comme ni l'usage de la fourrure de Ragondin, ni la consommation de leur viande ne constituent une forte incitation aux prélèvements par l'homme en France, trois facteurs sont à même de réduire les effectifs de Ragondins :

- le froid, auquel le Ragondin est très mal adapté
- la lutte physique, par piégeage ou par tir
- la lutte chimique, par l'utilisation d'appâts empoisonnés.

➦ L'hiver constitue pour le Ragondin une période critique au cours de laquelle la mortalité est particulièrement élevée. En Grande-Bretagne, l'hiver exceptionnel de 1962-1963 a éliminé 80 à 90% des animaux. En France, l'hiver de 1986-1987 a réduit les effectifs de 50 à 75%. (Doncaster & Jouventin, 1989).

- En premier lieu, le froid joue un rôle direct dans la mortalité (membres et queues amputés), mais aussi un rôle indirect, en accroissant les dépenses énergétiques d'une part, et en restreignant l'accès aux ressources alimentaires d'autre part, rendues inaccessibles par le gel par exemple (Guichón *et al*, 2003).
- En second lieu, des températures négatives durables sont susceptibles de diminuer l'activité de reproduction des femelles mâtures. Il s'agit même du principal facteur présidant à la diminution de densité des populations (Reggiani *et al*, 1995).
- Enfin, les conditions défavorables poussent les individus, notamment les mâles, à émigrer hors de leur territoire, et contribuent localement à la diminution de densité.

Ainsi le froid représente le moyen naturel le plus efficace pour contenir, voire réduire les effectifs de Ragondins. Toute campagne de destruction doit, si elle se veut efficace, être conduite à la fin de l'hiver, où les effectifs seront minimaux et les animaux affaiblis (Doncaster & Jouventin, 1989).

➦ La lutte physique s'appuie sur la pose de pièges, dont il existe différents types : les pièges à mâchoires, qui présentent l'inconvénient de tuer « aveuglément », et les pièges-cages, que l'on place sur les « coulées » de Ragondins, zones fréquemment empruntées par plusieurs individus d'une colonie, rendues visibles par l'aplatissement des végétaux qui en résulte ou les passages ouverts autour des plans d'eau. Ce système piège les Ragondins vivants, et permet leur sacrifice après les avoir reconnus.

Le tir du Ragondin est autorisé, puisque le Ragondin est classé gibier ou nuisible. Il peut contribuer à accroître la pression de prélèvements (Moutou, 1997).
La chasse est susceptible de constituer une méthode de lutte efficace si celle-ci est entreprise de manière durable et intensive. Ainsi, en Argentine, où la chasse du Ragondin est une tradition culturelle, les densités de Ragondins sont inversement proportionnelles à la pression cynégétique qu'ils subissent (Guichón & Cassini, 2005).

➦ La lutte chimique repose quant à elle sur l'utilisation de la bromadiolone, anticoagulant qui provoque des hémorragies internes, puis la mort. Afin d'éviter que la substance ne soit consommée par des espèces autres que l'espèce cible, en l'occurrence le Ragondin, il est souhaitable de déposer l'appât (carottes par exemple) sur des radeaux espacés de deux cents mètres environ les uns des autres (Doncaster & Jouventin, 1989). Toutefois, son usage n'est plus autorisé en France pour la lutte anti Ragondin sauf dans des cas « exceptionnels » (AP du 6 avril 2007).

La Grande-Bretagne est parvenue à éradiquer totalement le Ragondin de son territoire sans produit chimique, leur usage dans la nature étant strictement réglementé. Seuls les pièges-cages ont été employés. Alors que la population était estimée à deux cent mille individus en 1962, la lutte systématique a permis de réduire leur effectif à sept mille au début des années 1980. Le caractère très circonscrit des populations de Ragondins a sans doute contribué au succès de l'opération.
En effet, Cocchi et Riga, de l'Institut National de la Faune Sauvage (Italie, 2008), ont prouvé par des modèles mathématiques que l'éradication du Ragondin était illusoire dans les zones étendues, de forte densité, avec un fort maillage de canaux lorsque les conditions sont favorables. L'emploi de dizaines de milliers de pièges cages (64 700 dans la zone d'étude, le marais de Campotto !) pendant plusieurs années serait nécessaire! L'éradication du Ragondin est en revanche envisageable dans des zones bien circonscrites présentant une faible densité d'individus. Dans la réserve naturelle de Valenza (Italie), caractérisée par un faible degré de colonisation par le Ragondin, le coût total de son éradication a été évalué à 4553 euros (Bertolino *et al*, 2005 ; Cocchi & Riga, 2008).

La répartition du Ragondin en France et l'importance de ses effectifs rendent inenvisageable son éradication. Cependant, il demeure possible de contrôler la densité des populations en tirant parti des hivers rigoureux pour mener une lutte active par piégeage et/ou une lutte chimique (Doncaster & Jouventin, 1989 ; Reggiani *et al*, 1995).

3. Dans l'Ain

3.1 Estimation du nombre d'individus

Les chiffres avancés en terme de nombre de Ragondins sont compris entre 300 000 et 500 000 pour le seul département de l'Ain. Roland Rousset, président de la Direction Départementale de l'Agriculture et des Forêts de l'Ain, estimait en 2002 à 12 000 le nombre de prises par an par les piégeurs, avant que ne soient comptabilisés les prélèvements.
Le bilan de captures de l'année 2008 établi lors de l'assemblée générale de la Fédération des Piégeurs de l'Ain (FDPA) fait état de :

- 17532 ragondins prélevés par piégeage ;
- 865 ragondins prélevés par tir en dehors de la période de chasse ;
- 5625 ragondins prélevés dans le cadre d'action de chasse.

Soit en tout 24022 ragondins prélevés au cours de l'année 2008 dans le seul département de l'Ain, ce qui représenterait environ 5% de la population totale.

3.2 Statut fixé par arrêté préfectoral en 2008 et en 2009

L'arrêté préfectoral fixant la liste des animaux classés nuisibles pour la période du 1er juillet 2008 au 30 juin 2009 dans le département de l'Ain mentionne le Ragondin, et ce en raison de « dégâts aux cultures, à l'aquaculture, à la flore », et afin de « protéger digues, berges de cours d'eau et ouvrages hydrauliques ». Le rôle zoonotique vis-à-vis de la leptospirose constitue également un motif ayant présidé à la classification du Ragondin parmi les nuisibles du département.

3.3 Politique corrélative adoptée dans l'Ain

L'Ain a choisi, comme la Saône-et-Loire, de rémunérer le piégeage du Ragondin. Chaque queue rapportée est payée 2,50 euros. Il revient à la Fédération des chasseurs de l'Ain de les comptabiliser. Cette mesure constitue à la fois une incitation financière à la lutte et une reconnaissance du rôle social des piégeurs, qui officient bénévolement sous le contrôle de la Direction Départementale de l'Agriculture, chargée de les agréer. Le tir est également autorisé dans l'Ain du 1er mars au 31 mars, de jour, sans chien, autour des plans d'eaux et rivières (AP du 30 juin 2008 relatif aux modalités de destruction à tir des animaux classés nuisibles pour la période du 1er juillet 2008 au 30 juin 2009 dans le département de l'Ain).

II. Ecologie et Biologie

1. Taxinomie (tableau 4)

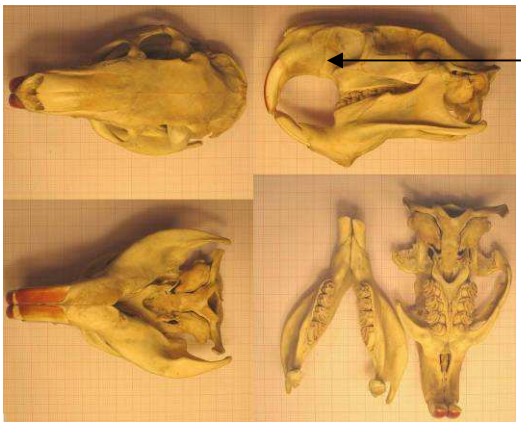
Le Ragondin (*Myocastor coypus* Molina, 1782), encore appelé myocastor, myopotame, nutria, quiyà ou « fausse loutre » dans les pays sud-américains dont il est originaire, est un mammifère qui appartient au grand ordre des Rongeurs, qui comprend à lui seul mille sept cents espèces. C'est en 1782 que Molina, dans ses «Essais sur l'histoire naturelle du Chili» signala et décrivit sous le nom de Coypu une espèce de « rat d'eau » de la grosseur d'une loutre (le terme de *coypus* est dérivé de mots indiens: co = eau; ipun = se déplacer majestueusement).

Règne	*Animal*
Phylum	*Cordé*
Embranchement	*Vertébré*
Classe	*Mammifère*
Ordre	*Rongeur*
Sous-ordre	*Caviomorphe, ou Hystricomorphe*
Superfamille	*Octodontidae*
Famille	*Myocastoridae, (ou Capromyidae)*
Genre	*Myocastor*
Espèce	*Myocastor coypus*

Tableau 4 : Classification taxinomique du Ragondin (Felipe, 2006)

La dénomination du sous-ordre auquel appartient le Ragondin a fait l'objet de discussions. Il a d'abord été classé parmi les *Hystricomorphes*. Ce terme ne représente pas une unité phylogénique (évolutive) mais une caractéristique anatomique commune à un groupe de rongeurs possédant un système zygo-massétérique hystricomorphe. Ainsi, les *hystricomorphes*, ou *hystricognathes*, sont des rongeurs qui se distinguent des autres familles de rongeurs par la structure osseuse de leur crâne. Le foramen infra orbitaire se trouve particulièrement élargi (figure 11), ce qui permet au muscle masséter médial de le traverser partiellement pour rejoindre l'os situé de l'autre côté. Le muscle masséter latéral vient quant à lui s'insérer sur l'arcade zygomatique, comme chez les rongeurs primitifs (Allaby, 1999). L'avènement de la phylogénie a conduit à de nombreux reclassements d'espèces, selon des critères génétiques et non plus morphologiques. C'est pourquoi certains auteurs préfèrent aujourd'hui classer le Ragondin parmi les *Caviomorphes*. Ce dernier sous-ordre comporte près de deux cents espèces de rongeurs, la plupart sud-américains, plus ou moins apparentés au cobaye (*Cavia porcellus*),

généralement de grande taille, dont l'un des représentants, le Capybara, peut atteindre soixante kilogrammes (Doncaster & Jouventin, 1989).



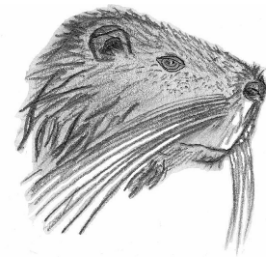
Foramen infra-orbitaire : système zygo-massétérique caviomorphe.

Figure 11 : Crâne de Ragondin (photo de Soebe, Wikipedia commons)

Notons que le Ragondin ne fait pas partie du sous-ordre auquel appartiennent les castors, pourtant proches morphologiquement, ces derniers faisant partie du groupe des *Sciuromorphes*.

De même, la dénomination familiale a fait l'objet de discussions. Lowery (1974, cité par Felipe, 2006) avait classé le Ragondin dans la famille des *Capromyidae* (rongeurs de grande taille caractérisés par une tête massive au museau plus ou moins effilé, des pattes très robustes dont les doigts sont parfois réunis par une membrane et une queue de longueur variable) tandis que Wilson et Reeder (1992) ont proposé une famille exclusive : les *Myocastoridae*. Le Ragondin en est le seul représentant.

2. Aspects morphologiques



¨ **←Figure 12 : Tête de Ragondin (*Myocastor coypus*, dessin personnel) Figure 13 → Photo de Ragondin (N. Aubert)**

Noter l'alignement des organes sensoriels externes

Le Ragondin est un gros rongeur au corps ramassé, dont la tête massive est ornée de petites oreilles arrondies et de longues vibrisses. Les yeux, de taille réduite, sont placés latéralement. La queue, cylindrique et écailleuse, est pourvue de quelques poils épars. On peut ainsi la distinguer de celle du castor, en plateau, et de celle du rat musqué, aplatie (Doncaster & Jouventin, 1989 ; Le Louarn &

Quéré, 2003). Les narines, yeux et oreilles sont disposés suivant une même ligne droite en position haute sur la tête (figures 12 et 13), et restent émergés lorsque l'animal nage (Le Louarn & Quéré, 2003).

Le membre postérieur (figure 14) est plus long et plus large que l'antérieur et pourvu de cinq doigts, dont les quatre premiers sont unis par une membrane interdigitée. Le cinquième doigt demeure libre. Le membre antérieur possède quatre doigts courts, flexibles, sans membrane interdigitée, dotés de fortes griffes permettant le creusement de terriers (Felipe, 2006).

Figure 14 : Schéma du pied postérieur du Ragondin (dessin personnel)

La formule dentaire est la suivante :
Incisives : 1/1, Canines : 0/0, Prémolaires : 1/1, Molaires : 3/3 = 20 (Felipe, 2006).
Les longues incisives, typiques, sont de couleur orange foncé.

Dans les populations sauvages, la fourrure est brun châtaigne à jaune brun. Elle est formée par une couche de poils imperméables, longs et raides, les poils de jarre, recouvrant une couche inférieure de sous poils doux, fins et courts, de couleur grise, constituant le poil de bourre, qui reste sec pendant la nage. Dans les élevages, la couleur du pelage est très variable selon les mutations sélectionnées : on relève notamment des robes blanches, noires, bleutées, grises, crèmes (Felipe, 2006 ; Doncaster & Jouventin, 1989 ; Le Louarn & Quéré, 2003).

3. Biométrie

La taille des Ragondins introduits du nord de l'Europe (tête et corps, à l'exclusion de la queue) est comprise entre 360 et 650 millimètres (mm). Leur queue, de taille relativement fixe, mesure entre 240 et 250 mm, le pied postérieur entre 125 et 140 mm. Le poids des femelles est de 4,8 kilogrammes (kg) en moyenne, celui des mâles de 5,4 kg en moyenne (Le Louarn & Quéré, 2003), mais les mâles peuvent fréquemment atteindre 8 ou 9 kg.
Les Ragondins indigènes d'Amérique du Sud présentent un poids inférieur à maturité sexuelle et une taille inférieure de 20 à 30 % par rapport aux Ragondins introduits du nord de l'Europe (France et Grande-Bretagne) et des Etats-Unis. Cela procéderait d'une adaptation aux hivers rigoureux que

doivent affronter les Ragondins dans leurs milieux d'introduction : un volume corporel plus important réduirait le ratio surface de peau exposée sur volume de thermorégulation, permettrait l'accumulation de réserves énergétiques plus importantes et réduirait les pertes de chaleur par la peau (Guichón *et al*., 2003).

4. Habitat et adaptations

4.1 Zones électives dans son habitat d'origine

L'étude de l'habitat du Ragondin dans sa région d'origine a fait l'objet de publications récentes en Argentine dans le cadre du « Projet Ragondin ». Ce projet, promu par les autorités publiques, a pour but :

- la collecte d'informations éco biologiques fondamentales sur *Myocastor coypus*,
- la proposition et le développement de méthodologies pour l'obtention desdites informations,
- l'évaluation de la situation actuelle des populations sauvages et de leur habitat,
- la formulation de recommandations pour la gestion durable de cette espèce (Bó *et al.*, 2006).

Bó, Porini et leurs collaborateurs (2002) ont ainsi travaillé sur vingt aires pilotes afin de déterminer de manière précise l'habitat du Ragondin en distinguant trois zones selon un gradient croissant d'inondabilité :

- des zones d'altitude relative, non inondables, peu étendues en superficie, avec un couvert de végétation constitué par des zones boisées ainsi que par des prairies artificielles et des cultures ;
- des zones collinaires qui constituent la partie médiane du gradient, couvertes par des prairies d'herbacées graminiformes ;
- des zones de faible altitude, les plus inondables, qui prédominent en terme de superficie. Le couvert végétal comprend des prairies d'herbacées terrestres et aquatiques.

Il s'est avéré que le Ragondin n'utilise que les milieux placés sur des portions relativement basses du gradient topographique caractéristique des grands bassins fluviolacustres d'Argentine. Lagunes et lacs, et dans une moindre mesure petits cours d'eau constituent son habitat privilégié. Au sein de ces zones, le Ragondin sélectionne les secteurs avec une végétation terrestre relativement haute et un couvert végétal important (préférentiellement distribué en manchons de végétation). L'eau y est présente de

manière permanente, la profondeur moyenne est de 35 centimètres (amplitude comprise entre 10 et 65 centimètres) (Porini *et al*., 2002).

La topographie de l'habitat est étroitement corrélée à la biocénose florale qui fournit toutes les ressources matérielles et alimentaires dont a besoin le Ragondin. Les bosquets d'herbes hautes aquatiques arrimées leur permettent de construire des nids (surtout à partir de Scirpe Californien, *Schoenoplectus californicus*) tandis que les plantes aquatiques rases ou peu émergées subviennent à leurs besoins alimentaires. En Argentine, le Ragondin se nourrit essentiellement de sagittaires (*Sagittaria montevidensis*), d'eichhornies (*Eichhornia spp.*) et de grenouillettes (*Limnobium spp*., un petit nénuphar). De plus, une telle végétation fournit une excellente protection vis-à-vis des prédateurs (dont l'homme) tandis que la présence d'eau facilite les déplacements du Ragondin (Bó *et al*., 2006).
Lorsque la végétation aquatique se fait plus rare, les Ragondins s'alimentent d'herbes tendres, notamment de peruvian watergrass (*Luziola peruviana*) et de chiendent (*Cynodon spp.*) sans s'éloigner de l'eau (Bó *et al*., 2006).
Dans ce milieu, le Ragondin peut être considéré comme une « espèce de berge », qui utilise principalement une frange d'eau inférieure à quatre mètres située entre les bosquets de végétation enracinée de haute taille bordant les étangs et ceux de végétation aquatique de petite taille. Le Ragondin ne s'éloigne que rarement du bord des plans d'eau et n'utilise habituellement que les premiers mètres de végétation terrestre (D'adamo *et al.*, 2000 ; Porini *et al*., 2002 ; Bó *et al.*, 2006).

Aussi le Ragondin affectionne-t-il les milieux aquatiques courants ou stagnants, d'eau douce à saumâtre : il fréquente tout autant les marais, étangs ou lagunes à berges que les rivières (Woods *et al*., 1992). Une population de Ragondins fréquentant une zone d'eau salée a été décrite dans l'Archipel de Chonos au Chili (Felipe, 2006). Cette typologie de l'habitat doit être corrélée à l'adaptation remarquable au milieu aquatique dont fait preuve le Ragondin.

4.2 Adaptations morphologiques du Ragondin liées à son mode de vie

Le Ragondin est un rongeur semi aquatique dont plusieurs caractéristiques morpho anatomiques témoignent d'une forte adaptation à la nage. Comme nous l'avons vu dans un sous-chapitre précédent (figures 12 et 13), les narines valvulaires sont alignées avec les yeux et les oreilles : l'ensemble de ces organes des sens peut ainsi rester émergé lors de la nage. En outre, les lèvres, obturables, peuvent fermer la cavité buccale en arrière des incisives pendant que le ragondin coupe la végétation immergée. Enfin, pelage imperméable, pieds postérieurs palmés (figure 14) et mamelles placées sur les flancs (qui permettraient, selon certains auteurs, l'allaitement pendant la nage) sont autant d'éléments conférant au Ragondin une grande aptitude natatoire. Celui-ci plonge également très bien puisqu'il peut passer plus de 10 minutes en apnée (Laurie, 1946 ; Doncaster & Jouventin, 1989).

4.3 Les limites de l'acclimatation du Ragondin à nos climats tempérés

Les extrémités nues et surtout la queue remplissent un rôle de radiateur ; lorsque la température extérieure est élevée, jusqu'à 13% de la production de chaleur de l'animal se dissipe par la queue (Doncaster & Jouventin, 1989). L'eau, thermiquement vingt fois plus conductrice que l'air, permet au Ragondin, dans son milieu d'origine, de lutter contre les élévations de température en s'immergeant et en dissipant la chaleur excédentaire par sa queue. Mais dans nos régions, où l'eau peut geler, les extrémités nues deviennent un handicap, les hivers rigoureux pouvant être à l'origine de blessures responsables d'amputations de membres ou de queue (Doncaster & Micol, 1990).

4.4 Aménagements territoriaux

Les Ragondins construisent des plateformes sur l'eau à partir de matériaux végétaux mais peuvent également aménager des terriers peu profonds le long des berges des plans ou cours d'eau. Ces derniers sont constitués typiquement par un tunnel simple long de deux mètres et large de vingt à trente centimètres aboutissant à une chambre ou par un système plus complexe de galeries pouvant s'étendre sur plus de quinze mètres et parsemé de chambres où ils aménagent un emplacement dédié aux nouveaux-nés. L'entrée des terriers est souvent immergée (Doncaster & Jouventin, 1989 ; Felipe, 2006).

5. Comportement

Le Ragondin est un rongeur d'abord crépusculaire et nocturne, qui peut, s'il n'est pas dérangé par les activités humaines, réaliser de nombreuses tâches pendant la journée. Des populations urbaines de ragondins situées sur la rivière Saale en Allemagne ont même une activité totalement diurne (Meyer, 2005, Le Louarn & Quéré, 2003). Ce comportement, observé sur six ragondins sur lesquels avaient été appliqués des colliers émetteurs, est à mettre en relation avec le dépôt de nourriture humaine par la population locale. Aucune activité n'a été enregistrée entre minuit et l'aube sur ces six ragondins (Meyer *et al*., 2005).

5.1 Régime alimentaire

D'un point de vue qualitatif, le Ragondin est un herbivore strict dont l'alimentation principale est constituée par des monocotylédones hygrophiles et, dans une moindre mesure, terrestres, dont il consomme surtout les graines et fleurs. A ce régime s'ajoutent des Lemnacées (monocotylédones flottantes, du type lentilles d'eau) et des Cypéracées (figure 15), différentes dicotylédones et des racines. Dans les pays de l'hémisphère nord, la consommation de racines devient proportionnellement

plus importante en hiver, corrélativement à la paupérisation de ses ressources alimentaires privilégiées. De manière plus générale, la composition des repas est très diversifiée durant la période végétative des plantes, et plus simplifiée en hiver. A cette saison, la consommation de racines immergées ou de rhizomes est sous-estimée du fait des difficultés d'identification par observation directe (Prigioni *et al*., 2005 ; Woods *et al*., 1992 ; Doncaster & Jouventin, 1989 ; Le Louarn & Quéré, 2003).

Figure 15 : Cypéracées (Wikipedia commons)

Une étude italienne a montré que le Ragondin européen se nourrissait à 50,9% de plantes aquatiques immergées et flottantes, à 30,9% de plantes aquatiques émergées et à 18,2% de plantes terrestres. Les jeunes semblent affectionner plus particulièrement les plantes terrestres (Prigioni *et al*., 2005).

Le régime alimentaire particulier du Ragondin, composé pour majeure partie de plantes aquatiques, semble être la résultante d'une adaptation comportementale visant à minimiser le coût énergétique de l'alimentation et le risque de prédation (Guichón *et al.*, 2003).
Notons que la diversité des ressources alimentaires du Ragondin contribue à son étonnante faculté d'adaptation, mais le dote de fait de capacités de nuisance aux activités agraires humaines, puisqu'en cas de pénurie alimentaire il pourra se reporter sur les cultures de céréales bordant son habitat.

D'un point de vue quantitatif, le Ragondin consomme 800 à 1500 grammes d'aliment par jour. En captivité, un ragondin peut ingérer le quart de son poids en végétaux frais. Il délaisse cependant sur place 40 à 80% des plantes qu'il a sectionnées (Woods *et al*., 1992 ; Doncaster & Jouventin, 1989).

5.2 Comportement agonistique

Le Ragondin possède un répertoire de sons varié lui permettant de communiquer avec ses congénères. Lorsqu'il est acculé, le Ragondin se défend en attaquant et peut infliger de sévères morsures à ses prédateurs (Le Louarn & Quéré, 2003). Toutefois, la seule prédation que doit craindre le Ragondin en France est celle de chiens et bien sûr celle de l'homme. La Loutre pourrait être un prédateur potentiel des jeunes Ragondins lorsque leurs biotopes sont partagés.
Dans son habitat d'origine, le Ragondin connaît de nombreux prédateurs. Ses plus sérieux ennemis sont les Caïmans (dont *Caiman longirostris*, *C. sclerops* et *C. niger*) et les grands félins, notamment le Jaguar (*Felis onca*), le Puma (*Felis concolor*) l'Ocelot (*Felis pardalis*) et le Chat Tigré (*Felis tigrinus*). En Europe, le Loup Rouge (*Canis rufus*) et le Chien (*Canis lupus familiaris*) sont les

principaux prédateurs de Ragondins adultes. Les jeunes Ragondins peuvent être la proie d'Hermines (*Mustela erminea*), de Renards Roux (*Vulpes vulpes*) mais aussi de rapaces, tels la Buse (*Butea lineatus*) ou la Chouette Hulotte (*Strix aluco*). Le Mocassin d'eau (*Agkistrodon piscivorus*), un serpent aquatique des marais d'Amérique du Nord, est également susceptible de chasser les jeunes Ragondins cohabitant avec lui (Woods *et al*., 1992 ; Doncaster & Jouventin, 1989 ; Le Louarn & Quéré, 2003).

5.3 Marquage territorial

Les mâles comme les femelles possèdent une glande anale dont la production sécrétoire, un liquide visqueux, est utilisée pour marquer leur territoire. Son odeur n'est cependant pas détectée par l'être humain (Rafasquino *et al*., 1998).

6. Structure et mouvement des populations

6.1 Structure générale

La colonie est régie par un système d'accouplement polygyne : un mâle adulte cohabite donc avec plusieurs femelles suitées. Grégaires, les Ragondins montrent un sédentarisme tout relatif, puisque l'on estime que seuls 37% des Ragondins d'une colonie sont véritablement sédentaires. Il s'agit principalement de femelles, qui, ayant mis bas, demeurent en place pendant quelques mois (Guichón *et al*., 2003 ; Doncaster & Jouventin, 1989).

Chez les jeunes, le sex ratio est déséquilibré en faveur des mâles tandis qu'il est déséquilibré en faveur des femelles chez les adultes. Le fait que le sex ratio penche en faveur des femelles chez les adultes peut être expliqué par la mortalité associée à la dispersion des mâles (accidents de la route, prédation et chasse notamment) lorsque ceux-ci, arrivés à l'âge adulte, sont chassés de leur colonie.

Le sex ratio en faveur des mâles à la naissance peut être expliqué par le modèle de Trivers et Willard (1973) qui stipule que les femelles de certains mammifères peuvent privilégier la naissance de mâles ou de femelles en fonction de leur condition physique et des conditions du milieu (Guichòn *et al*, 2003).

6.2 Densité de population

En France et de manière plus générale dans les pays de l'hémisphère nord présentant un climat tempéré ou continental, la densité de population montre une fluctuation saisonnière : maximale à la fin de l'automne, elle décroît lors d'hivers rudes pour atteindre un minimum au début du printemps, sauf

lors d'hivers particulièrement doux. Cette fluctuation n'est pas observée dans les régions d'origine du Ragondin (Guichón *et al*, 2003).
Les études conduites en France, en Angleterre et en Italie ont montré que la densité d'individus à l'hectare peut varier de moins de un ragondin par hectare à la fin de l'hiver jusqu'à quatre cinq par hectare au début de l'hiver suivant (Reggiani *et al*, 1995 ; Doncaster & Micol, 1990 ; Doncaster & Jouventin, 1989). La diminution de densité accompagnant la saison hivernale est corrélée à la mortalité des adultes et des jeunes d'une part, mais aussi aux avortements et retards à la maturité sexuelle (Guichón *et al*, 2003). Dans la réserve naturelle de Tevere-Farfa, en Italie, l'émigration d'individus et la mortalité post-natale ne joueraient qu'un rôle mineur dans le déclin démographique d'une population (Reggiani *et al.*, 1995). De fait, lors d'hivers rudes, la diminution de densité incomberait en majeure partie à l'inactivité de reproduction des femelles mâtures.

Dans des marais saumâtres des Etats-Unis, en l'absence d'hiver rigoureux et de régulation des populations par l'homme, des *maxima* de densité quatre fois plus élevés que ceux traditionnellement observés en Europe ont été signalés avec une densité atteignant 21,4 individus par hectare. Le record de densité répertorié est de 24,7 individus par hectare dans un étang pollué de Floride (Doncaster & Jouventin, 1989).

6.3 Domaine vital, déplacements et mouvements de population

Les déplacements du Ragondin sont pour la plupart limités aux voies d'eau et à leurs abords. La vitesse moyenne de déplacement a été évaluée à 107 mètres par heure (Doncaster & Micol, 1988). On a pu montrer, grâce à des techniques de radiopistage, que dans le marais poitevin, les mâles possèdent un domaine vital moyen de 5,7 hectares, alors que celui des femelles est réduit de moitié. Le domaine vital moyen tous sexes confondus a été évalué à 3,82 hectares par individu (Doncaster & Micol, 1988).

Les ragondins mâles adultes s'excluent mutuellement et le territoire de chacun des mâles recouvre les domaines vitaux de plusieurs femelles. Cela explique que la surface occupée par les mâles soit plus importante que celle occupée par les femelles. En revanche, les interactions entre femelles sont nombreuses et le plus souvent amicales, leurs domaines vitaux se chevauchant largement.
Les femelles s'établiraient à proximité de leur mère (Doncaster & Jouventin, 1989), et un lien de parenté relierait l'utilisation de l'espace à la structure sociale. Elles ne s'éloignent que rarement des berges.

Les mâles atteignant la puberté (de six à neuf mois) ainsi que les mâles dominés, sont exclus et peuvent parcourir trois à quatre kilomètres avant de se stabiliser. La faible sédentarité des mâles et leur propension à se disperser ont été corroborées par des études démographiques de populations soumises

à une lutte chimique. L'évaluation à intervalles réguliers du sex ratio, pendant quatre sessions de piégeage suivant la pose d'anticoagulants dans un site d'étude, a montré un accroissement significatif du sex ratio en faveur des mâles. Ce résultat peut s'expliquer par le renforcement de la dispersion des mâles, qui quittent les territoires à forte densité pour rejoindre des territoires de plus faible densité, en l'occurrence ceux dont la densité a diminué suite à la lutte chimique (Doncaster & Micol, 1988).
La pression cynégétique, lorsqu'elle est intensive et durable, conduit à la genèse de flux dynamique de dispersion : les Ragondins se déplacent massivement des zones protégées (où les densités sont fortes) vers les zones chassées (où les densités sont faibles) (Guichón & Cassini, 2005).

6.4 Incidence des inondations et du froid sur la structure démographique

Aucune augmentation de la mortalité n'a pu être mise en évidence lors d'inondations. En revanche, celles-ci s'accompagnent de déplacements beaucoup plus importants des populations de Ragondins, obligés d'aller chercher leur nourriture plus loin. C'est à cette occasion, ou lors de sécheresses importantes, que les ragondins risquent de causer des dégâts aux cultures. Lors des inondations de 1988 dans l'ouest de la France, d'importants dommages ont ainsi été causés à des plantations de peupliers par arrachement d'écorces et cassage de branches (Doncaster & Micol, 1990).

Des températures négatives prolongées sont susceptibles d'entraîner des modifications démographiques notoires. Une inversion saisonnière du sex ratio a pu être mise en évidence lors d'une étude dans le marais poitevin, en France. Alors qu'il était légèrement en faveur des mâles à la fin de l'été 1986 (1 mâle pour 0,9 femelle), le sex ratio s'est nettement inversé en faveur des femelles à la sortie de l'hiver rigoureux de 1987 (1 mâle pour 3,3 femelles) (Doncaster & Micol, 1990 ; Doncaster & Micol, 1988). Les mâles, plus actifs et disposant de moins de réserves énergétiques que les femelles, sont plus sensibles au froid que ces dernières, d'où une mortalité inégale selon le sexe.
Cette inversion saisonnière du sex ratio n'a pas été mise en évidence en Argentine (Guichón *et al*, 2003).

En France, lorsque les températures sont négatives, les petits canaux, susceptibles de geler, sont abandonnés des Ragondins, si bien que la moitié du terrain peut rester inoccupée durant la mauvaise saison, modifiant localement les densités d'individus.

Les facteurs physiques tels qu'un hiver rigoureux ou une raréfaction des ressources alimentaires vont donc aboutir à une diminution des effectifs.

7. Caractéristiques de reproduction

7.1 Longévité, puberté et maturité sexuelle

La longévité du Ragondin est de 6,3 ± 0,4 ans (Woods *et al*., 1992).

Les rongeurs hystricomorphes (dont fait partie le Ragondin) présentent une membrane d'occlusion vaginale, dont l'ouverture est considérée comme un indicateur du début de la puberté. Chez la femelle Ragondin, cette ouverture se produit vers cinq mois (Felipe, 2006). Dans les conditions sauvages, l'activité de reproduction, chez les deux sexes, ne démarre pas avant six mois, avec un poids compris entre 2 et 3,2 kg (Doncaster & Jouventin, 1988 ; Reggiani *et al*, 1995). La puberté des mâles est plus tardive, vers 9 mois environ.

Les mâles comme les femelles sont physiologiquement aptes à la reproduction toute l'année, l'ovulation étant induite par la copulation. Néanmoins, lors d'un hiver rigoureux, les femelles, après avoir épuisé leurs réserves énergétiques, avortent. Les naissances ne reprennent alors que vers mars avril. Dans un tel contexte climatique, on observe une synchronisation « artificielle » des naissances bien que la reproduction ne soit pas saisonnière (Doncaster & Jouventin, 1988).

7.2 Cycle oestral

Le Ragondin est une espèce polyoestrienne annuelle (plusieurs cycles reproductifs en une année). Comme chez de nombreux mammifères, le cycle est subdivisé en étapes successives qualifiées de pro oestrus, oestrus, metoestrus et dioestrus. Les cycles oestraux sont caractérisés par leur grande variabilité temporelle, puisqu'ils peuvent durer entre 20 et 60 jours, avec une moyenne de 35,5 +/- 10,8 jours (Woods *et al*., 1992 ; Felipe, 2006).

7.3 Gestation et élevage de la portée

Le Ragondin présente une durée de gestation prolongée en regard des autres espèces de rongeurs du même sous-ordre. La durée moyenne de gestation est de 132 jours, mais s'étend de 127 à 138 jours. Les femelles produisent 2 portées par an. Le nombre de petits par portée varie de 1 à 12, avec une moyenne de 3,82 petits par portée. Les nouveaux-nés pèsent 200 à 250 grammes, sont nidifuges et naissent totalement couverts de poils (Felipe, 2006 ; Woods *et al*., 1992).
L'allaitement dure 7,7 semaines en moyenne, mais les jeunes sont capables de s'alimenter de manière autonome très précocement (Woods *et al*., 1992 ; Doncaster & Jouventin, 1989).

Les femelles Ragondin disposent de moyens efficaces pour contrôler elles-mêmes leur fécondité en cas de difficultés : lorsque les conditions du milieu sont délétères, le nombre moyen de jeunes par portée diminue ; inversement, il augmente lorsque les conditions redeviennent favorables. La mortalité prénatale intervient jusqu'à la neuvième ou dixième semaine avec des pertes par résorption embryonnaire de près de 30%. L'avortement, ou expulsion de portées entières, peut également se produire avant la treizième semaine ; il concerne près de 30% des portées. L'ensemble des pertes est donc élevé et a été évalué comme étant de l'ordre de 80% chez les femelles de moins de six mois, et à 60% chez les autres (Woods *et al*, 1992 ; Doncaster & Jouventin, 1989). Ce contrôle quantitatif des naissances est à relier à la longueur de la gestation, qui suppose un fort investissement énergétique. Ainsi, l'arrêt brutal de la gestation permet à la femelle de limiter ses pertes énergétiques lorsque les conditions sont défavorables.

8. Méthodes d'étude

L'observation directe de Ragondins sur le terrain est relativement difficile du fait de leur comportement nocturne et de la prédation (chiens et hommes) dont ils sont susceptibles d'être la cible, à l'exception de populations très familières péri urbaines régulièrement nourries par l'homme. On peut néanmoins rechercher visuellement certaines traces de leur présence, comme les couloirs de passage (ou « coulées »), les terriers ou plateformes ainsi que l'observation de fèces. Ces derniers sont typiques car finement cannelés. Leur détection n'est toutefois pas systématique puisque 80% sont produits dans l'eau (Le Louarn & Quéré, 2003). De plus, comme de nombreux autres rongeurs, le Ragondin est caecotrophe : il réingère le matin les crottes émises dans son terrier, permettant une « redigestion » et une absorption d'éléments nutritifs non absorbés lors du premier passage intestinal ou synthétisés par la flore commensale du caecum.

Les possibilités d'observations diurnes d'individus peuvent être accrues lors de déplacements importants de population, ce qui est le cas lors d'inondations ou lorsque les jeunes mâles pubères (six à neuf mois) ou dominés sont chassés et doivent s'installer loin de leur domaine natal.

Afin de pallier ces difficultés d'observations, et par là même d'étude, plusieurs outils sont à la disposition de l'écologue. Nous en présenterons les principaux.

8.1 Estimation de l'âge des Ragondins

La méthode de référence pour évaluer l'âge d'un Ragondin utilise le poids sec du cristallin. Le cristallin est entouré d'une capsule, le cristalloïde, dont la partie antérieure est formée d'un épithélium en mitose perpétuelle, formant ainsi les fibres cristalliniennes. Le cristallin prend donc du poids tout au long de la vie des mammifères. Aussi est-il possible, comme pour de nombreux autres mammifères,

de déterminer l'âge d'un Ragondin à partir du poids d'un de ses cristallins soumis à un traitement de dessiccation.

La méthode mise en œuvre est la suivante : immédiatement après dissection de l'œil, celui-ci est placé dans du formol à 10%. Les yeux sont conservés dans le formol pendant au moins un mois afin de permettre au cristallin d'être fixé. Le cristallin est ensuite extrait de l'œil dans de l'eau, le tissu qui l'entoure est retiré par mouvements de roulement sur un papier absorbant et par grattage précautionneux à l'aide d'un instrument émoussé. Les paires de cristallins sont ensuite séchées à 80°C pendant 22 heures, puis pesées sur une balance de précision (Gosling *et al.*, 1980).

La relation entre âge et poids du cristallin n'est pas linéaire, mais l'usage d'une transformation logarithmique des âges permet d'obtenir une corrélation linéaire approximative. Ainsi, une équation met en relation l'âge du Ragondin avec le poids de son cristallin :

Log10 (âge + K) = 0,511 + 0,013 x (poids du cristallin en milligrammes)

avec K = 4,34 mois, durée de gestation du Ragondin (Gosling *et al.*, 1980).

Contrairement à d'autres espèces de rongeurs dont la courbe de croissance cristallinienne chute brutalement à un âge relativement précoce, le cristallin du Ragondin conserve une croissance significative après la fin de la croissance rapide qui s'achève vers deux ans. Il en résulte qu'en dépit d'un inévitable élargissement de l'intervalle de confiance de la mesure de l'âge chez les vieux ragondins, la courbe de corrélation poids du cristallin – âge demeure utilisable comme indice prédictif durant toute la vie des individus (Gosling *et al.*, 1980). Gosling précise toutefois que cette équation doit être utilisée avec parcimonie et qu'elle nécessite des ajustements en fonction des aires d'étude. Des variations non négligeables de poids de cristallin ont en effet été observées chez des souches génétiques différentes appartenant à une même espèce mammalienne. De plus, le poids du cristallin serait affecté par le degré d'hétérogénéité génétique au sein d'une population. Enfin, le régime alimentaire et le climat influent sur la courbe de croissance et donc sur l'accroissement du cristallin en fonction de l'âge.

.

Si la pesée du cristallin constitue la méthode la plus précise pour évaluer l'âge des Ragondins, il est également possible d'utiliser la longueur du pied postérieur, le poids et la taille des individus. La longueur de queue ne constitue pas un outil satisfaisant d'évaluation dans nos contrées. Hormis le fait que la longueur de la queue est peu variable après l'âge de six mois, de nombreuses variations artéfactuelles peuvent résulter des amputations de queues se produisant lors d'hivers rigoureux et

affectent ainsi la fiabilité des mesures. Ainsi, à Campotto (Italie), 18,3% de la population de Ragondins présente des amputations de queue en raison du froid (Cocchi & Riga, 2008).
Il existe également des méthodes basées sur la mesure de divers caractères morphométriques crâniaux ainsi que sur l'éruption des molaires (Bó *et al* 2006). Selon Bó et son équipe (2006), l'évaluation de l'âge se basant sur la détermination du poids corporel et sur la mesure de trois caractères morphométriques crâniaux (longueur basale, longueur crâniale totale et longueur mandibulaire totale) constituerait le meilleur compromis entre précision, simplicité et facilité d'application sur le terrain.

8.2 Capture des Ragondins

La capture de Ragondins s'effectue à l'aide de pièges dont on distingue deux grandes catégories :

- les pièges non vulnérants
- les pièges vulnérants

Les pièges non vulnérants doivent satisfaire à la double exigence d'efficacité et d'innocuité pour l'animal capturé. On utilise à cet effet des pièges-cages (figure 16), parallélépipèdes grillagés pourvus de deux trappes coulissantes sur leurs extrémités se refermant sur l'animal lorsque celui-ci pénètre dans le piège. Ces pièges sont placés sur les coulées de Ragondin, avec ou sans appât, et régulièrement contrôlés afin ne pas y laisser séjourner un animal pendant plus de 24 heures (obligation réglementaire Française).
En France, les pièges-cages sont classés pièges de première catégorie. Ils ne nécessitent pas l'agrément de piégeur s'ils sont utilisés uniquement pour la capture de Ragondins et de Rats Musqués en bordure d'une pièce d'eau, mais leur usage nécessite une déclaration en mairie.

Figure 16 : Piège à double entrée

Les pièges vulnérants sont de type pièges à mâchoires. Ils sont utilisés lors de campagne de luttes, mais peuvent également s'avérer utiles lors d'études de régime alimentaire car ils stoppent la digestion de l'animal et l'appât généralement non avalé ne perturbe pas les analyses ultérieures des contenus stomacaux (Le Louarn & Quéré, 2003).
Ces pièges sont classés pièges de seconde catégorie en France. Ils sont soumis à homologation, déclaration obligatoire en mairie avant utilisation et agrément obligatoire du piégeur. Ils ne doivent pas

être disposés sur les coulées de Ragondin, sont interdits à moins de deux cents mètres d'une habitation ou à moins de cinquante mètres des voies ouvertes au public.

Le plus utilisé dans la capture de Ragondin est le piège en X, ou « Conibear » (figure 17). La réglementation française permet son utilisation dans les marais et jusqu'à deux cents mètres des cours d'eau, étangs et marais uniquement avec appât végétal (Arrêté du 29 janvier 2007 fixant les dispositions relatives au piégeage des animaux classés nuisibles en application de l'article L. 427-8 du code de l'environnement).

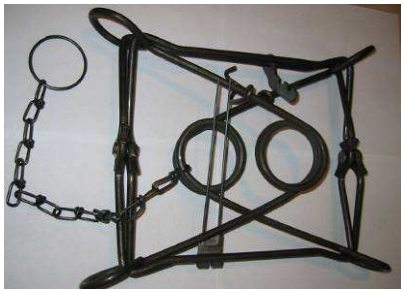


Figure 17 : Piège en X ou « Conibear » (www.trapperbuckshot.addr.com)

8.3 Contention chimique

La sédation des Ragondins peut être obtenue par injection de 0,96 mg/kg de chlorhydrate de kétamine et de 0,048 mg/kg de maléate d'acépromazine. Pour une anesthésie éventuelle, il est possible d'associer le chlorydrate de kétamine (4 mg/kg) au chlorhydrate de xylazine (0,5 mg/kg). Ce dernier protocole serait le plus adapté pour permettre une manipulation adéquate, en n'altérant aucun paramètre physiologique et en assurant une récupération relativement rapide des animaux (Bó *et al*., 2006 ; Palomares F. *et al*, 1994).

Les Ragondins peuvent aussi être tranquillisés par injection intramusculaire de diazépam ou par saupoudrage de diazépam (0,2%) sur des carottes (Meyer, 2006).

8.4 Marquage des Ragondins

Le marquage, dans le cadre d'observations, de suivis ou de différentiations d'individus peut s'effectuer par application de peinture sur la queue, par tonte, coloration (peinture très rémanente) ou décoloration de la fourrure. Dans les deux derniers cas, le ragondin capturé doit être immobilisé ou gardé temporairement car la peinture comme le décolorant mettent du temps à sécher. Le poinçonnage des oreilles, des doigts postérieurs ou de leur membrane interdigitée est controversé et nécessite d'être approuvé par un comité d'éthique (Meyer, 2006).

Il est possible d'utiliser des marqueurs en métal disposés sur l'oreille, mais beaucoup sont perdus par les animaux. Ce marquage sera donc à privilégier pour des études à court terme. Cette méthode permet d'identifier les ragondins jusqu'à cent mètres en utilisant des jumelles 8-10x. Lorsque des chiffres sont

imprimés sur les marqueurs, il n'est possible de les lire que jusqu'à une distance de vingt mètres. Plusieurs études ont été conduites grâce à la pose de colliers émetteurs étanches et bien ajustés sur les ragondins. Ceux-ci sont détectables jusqu'à trois kilomètres dans les zones dégagées, mais leur rayon de détection n'est plus que de trois cent mètres en ville et est inférieur à 20 mètres lorsque les ragondins sont dans leur terrier. Des résultats satisfaisants pour des études à court terme ont également été obtenus en attachant des émetteurs sur la queue (Meyer, 2006).

Une méthode indirecte d'observation consiste à épandre sur de la nourriture de petites pièces de plastique ou à la saupoudrer d'aluminium afin de pouvoir identifier les fèces. Cette approche, non individuelle, permet néanmoins de déterminer le domaine vital et les distances parcourues par les Ragondins (Meyer, 2006).
Enfin, Meyer a expérimenté en 2006 la pose de transpondeurs passifs intégrés. Cette méthode permet l'identification durable d'individus mais un marquage visuel demeure nécessaire pour observer les individus dans leur environnement sans les perturber.

III. Place du Ragondin dans l'épidémiologie de la leptospirose

1. Notions d'animal porteur ou de « réservoir », réceptifs mais peu ou pas sensibles

La réceptivité d'un organisme est son aptitude à laisser un agent infectieux se multiplier en lui, pour une dose infectante donnée. Il est important de noter que la réceptivité n'implique pas forcément l'apparition de symptômes. La sensibilité d'un organisme consiste en son aptitude à exprimer cliniquement la maladie après contact avec un agent pathogène (Toma *et al*, 2006).

Le terme de réservoir désigne toute espèce, milieu ou mécanisme permettant la survie d'un agent pathogène donné en tant qu'espèce (Toma *et al*, 2006). Levett (2001) précise cette définition, désignant comme réservoir toute espèce au sein de laquelle l'infection est endémique et usuellement transférée par contact direct d'un animal à un autre. Une espèce réservoir est donc une espèce réceptive, mais peu ou pas sensible, susceptible d'assurer la dissémination de l'agent pathogène par son excrétion dans le milieu extérieur. Le Ragondin comme le Rat Musqué pourraient être à ce titre des espèces considérées comme réservoirs de la leptospirose, puisqu'ils permettent non seulement la survie, mais également la multiplication et la transmission directe de l'agent infectieux. Néanmoins, le statut de réservoir du Ragondin peut être discuté dans la mesure où sa véritable sensibilité n'a pas encore été réellement évaluée.

Les organismes infectés de façon inapparente représentent une source non négligeable d'agent pathogène compte tenu de leur présence en concentration parfois élevée dans certains tissus, notamment le sang ou l'urine. Toute lutte visant l'éradication d'une maladie donnée doit donc prendre en compte les animaux infectés de manière inapparente si elle ne veut pas être vouée à l'échec (Toma *et al*, 2006).

De ce fait, la compréhension de l'épidémiologie de la leptospirose doit inclure l'étude des espèces qui en constituent un réservoir sauvage.

2. Principaux réservoirs actuellement identifiés et modes de contamination

Les leptospires ont une distribution ubiquiste et affectent environ 160 espèces de mammifères domestiques et sauvages (Zunino & Pizarro, 2007). L'épidémiologie de cette maladie est complexe et le maintien de l'agent pathogène au sein d'une population dépend de l'existence de réservoirs animaux dans lesquels se produisent un portage rénal chronique et une libération de leptospires dans les urines (Michel *et al*., 2001).
Les Rongeurs ont été identifiés comme étant le principal réservoir de leptospires, et le Rat est considéré comme étant le réservoir le plus commun, notamment des sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Ballum. La Souris est le réservoir du sérogroupe Ballum. D'autres rongeurs ont été identifiés en tant que réservoir de la leptospirose : le Rat Musqué (*Ondatra zibethicus*), le Campagnol (*Microtus agrestis*) et le Ragondin (Aviat *et al*., 2008 ; Michel *et al*., 2001).

Des mammifères domestiques ou sauvages n'appartenant pas à l'ordre des Rongeurs (notamment des petits marsupiaux) peuvent aussi constituer des réservoirs. Ainsi, le bétail peut héberger les sérovars pomona, hardjo et grippotyphosa, les cochons les sérovars pomona, tarassovi, ou bratislava, les moutons hardjo et pomona et les chiens le sérovar canicola (Adler & De la Peña Moctezuma, 2009 ; Levett, 2001).

Anchazar et ses collaborateurs (1949) furent les premiers à isoler des leptospires à partir d'un Ragondin en Argentine. Waitkins et son équipe (1984) ont isolé une souche de *Leptospira interrogans* sérovar wolffi sur un Ragondin en Grande-Bretagne. L'isolement de leptospires par mise en culture sur un des ragondins de leur étude a permis de conclure que le Ragondin était un réservoir de la leptospirose en Grande-Bretagne. Jusqu'alors, seules des traces sérologiques du passage de leptospires avaient été mises en évidence. D'autres études ont permis de démontrer que le Ragondin pouvait être porteur d'autres sérovars en Grande Bretagne, notamment icterohaemorrhagiae (Wanyangu *et al*., 1986).

Les travaux d'une équipe de recherche de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes ont permis d'isoler pour la première fois des leptospires sur des Ragondins en France. Cette étude a été la première établissant le rôle de réservoir pour la leptospirose du Ragondin en France (Michel *et al*., 2001). Trois souches (appartenant aux sérogroupes Icteroheamorrhagiae et Sejroe) ont été isolées à partir de 216 cultures de reins.

Cette étude a montré que le Ragondin était, directement ou non, l'une des sources de contamination des herbivores domestiques (bovins et chevaux). Par la libération urinaire de leptospires, le Ragondin contribue à la contamination de l'environnement, notamment de l'eau douce, et à l'infection potentielle d'autres animaux ou de l'homme. Aussi l'augmentation des effectifs de Ragondins en France constitue-t-elle un risque pour l'élevage ainsi que pour la santé publique (Michel *et al.,* 2001). Comme les autres mammifères, le Ragondin peut se contaminer de manière indirecte *via* des abrasions ou coupures sur la peau ou par la conjonctive, sachant qu'une immersion prolongée dans l'eau peut suffire au passage de spirochètes à travers la peau. Une contamination directe est également possible, d'animal à animal, notamment *via* les urines émises lorsqu'elles sont chargées de leptospires (Levett, 2001).

3. Résultats sérologiques de précédentes études en France

En 1988, une étude réalisée en Vendée (France) a montré que 47,3% (45 sur 95) des Ragondins étaient séropositifs pour le sérogroupe Icterohaemorrhagiae (Trap, 1988). En 2001, une étude établie à partir de prélèvements de Ragondins réalisés sur six sites en France sélectionnés pour leur forte densité de Ragondins (Michel *et al*, 2001), a montré des prévalences s'échelonnant de 16,5% (Intervalle de Confiance (IC) avec α = 5% : 10-21%) dans la réserve naturelle de Massereau en Loire Atlantique à 66% (IC avec α = 5% : 55-74%) dans la ville de Tours, en Indre-et-Loire. Les Ragondins prélevés sur les sites suivants présentaient des séroprévalences intermédiaires : lacs de La Martinière (54,7%, IC avec α = 5% : 32-48%), zones rurales de Loire-Atlantique (37,5%, IC avec α = 5% : 32-48%), une ferme de Vendée (20%, IC avec α = 5% : 10-34%) et zones rurales de Haute-Vienne (28,2%, IC avec α = 5% : 23-38%) (Michel *et al*., 2001). La séroprévalence globale de cette étude réalisée sur 738 Ragondins était de 33% (IC avec α = 5% : 30-36%) (Michel *et al*., 2001).

Plus récemment, une enquête a été conduite par la Fédération Nationale des Groupements de Protection des Cultures (FNGPC) afin d'évaluer le rôle potentiel du Ragondin dans l'épidémiologie des leptospiroses animales et humaines. Sur 3231 sérums de ragondin analysés, 1592 se sont révélés positifs en MAT (soit une séroprévalence globale de 49%). Des variations interdépartementales importantes ont toutefois été relevées, avec des valeurs de séroprévalence s'échelonnant de 21,9% pour le département de la Haute-Vienne à 92,9% pour le département de l'Orne. Les données utilisées pour l'étude n'englobaient que 24 départements français du centre et de l'ouest de la France. Aucune donnée ne concernait la région Rhône-Alpes. Dans cette étude, les sérogroupes les plus représentés ont

été par ordre décroissant Icterohaemorragiae, Australis, Sejroe, Grippotyphosa et Panama (Darras, 2004).

La dernière étude de séroprévalence sur le Ragondin en France a été réalisée entre 2002 et 2004 en Isère, dans la région de Bourgoin-Jallieu. La séroprévalence globale a été évaluée à 45,9% (170 ragondins positifs sur 390) mais variait selon les communes de moins de 20% (Sermérieu) à plus de 80% (Saint Marcel Bel) (Fromental, 2004). Parmi les sérums positifs, 83,8% ont agglutiné le sérogroupe Icterohaemorrhagiae, 14,5% le sérogroupe Sejroe, 3,3% le sérogroupe Panama et 1,7% le sérogroupe Australis (Fromental, 2004).

Conclusion de la deuxième partie

Il a donc été montré dans plusieurs pays que le Ragondin présentait toutes les caractéristiques de réservoir potentiel pour la leptospirose. Réceptif et susceptible d'excréter des leptospires *via* ses urines et de contaminer l'environnement, ses congénères ou d'autres espèces (homme ou animaux), il constitue donc probablement un maillon non négligeable dans l'épidémiologie des leptospiroses.

Les études de séroprévalences réalisées en France ont montré un taux de séropositivité moyen à la leptospirose de 50% chez le Ragondin avec une prédominance des sérogroupes Icterohaemorrhagiae, Australis et Sejroë. Des variations de séroprévalence sont néanmoins à noter en fonction des sites d'étude. Dans notre dernière partie, nous allons analyser de manière descriptive des résultats de séroprévalences chez le Ragondin de la Dombes (Ain) issus des travaux des équipes de recherche de l'INRA-ENVL et de l'INRA-Clermont Ferrand.

TROISIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

Contexte et préambule

La réalisation de ce travail s'est inscrite dans le cadre plus large d'une thèse de doctorat universitaire réalisée par le Docteur vétérinaire Julie Vein, qui entreprend d'estimer le risque zoonotique de leptospirose lié à la présence de populations de ragondins dans les zones humides. Son travail inclut notamment l'étude de la séroprévalence et du portage rénal de leptospires chez le ragondin et le rat musqué, dans la basse vallée de l'Ognon (Doubs) et dans la Dombes (Ain). Ce travail universitaire, financé par l'agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail, est encadré et conduit par Philippe Berny, de l'unité de recherche 1233 INRA ENVL ISARA - Mycotoxines et toxicologie comparée des xénobiotiques-, et Agnès Leblond, chercheur associée à l'INRA UR 346 d'Epidémiologie Animale de Clermont Ferrand/Theix. L'équipe dirigée par Angeli Kodjo, de l'unité de recherche UMR CNRS 55 57 UCBL ENVL S/C INRA - Ecologie Microbienne, est également partenaire pour cette étude.

Le but de mon travail a été de déterminer la séroprévalence de la leptospirose chez le Ragondin dans la Dombes en 2008, d'identifier les sérogroupes les plus fréquents, et de confronter ces résultats avec des résultats d'études épidémiologiques humaines et animales réalisées en France. Ce recoupement a pour but d'estimer un risque éventuel de transmission de la leptospirose à l'homme ou aux espèces domestiques, dans un environnement fréquenté par des populations importantes de ragondins.

I. Matériel et méthodes

1. Sites et mode de prélèvement

Le site d'étude est la région de la Dombes, dans l'Ain.

1.1 Données physiques, écologiques, et sociologiques

➦ La Dombes est un plateau d'environ 100 000 hectares (Avocat, 1975) résultant de l'étirement de collines morainiques. Elle se situe dans l'Ain, au nord-est de Lyon, dont elle est distante d'environ soixante kilomètres. Elle est délimitée à l'est par la rivière d'Ain, au Sud par la Côtière qui surplombe les plaines du Rhône, à l'ouest par la vallée de la Saône et au nord par la Bresse (Figure 18)

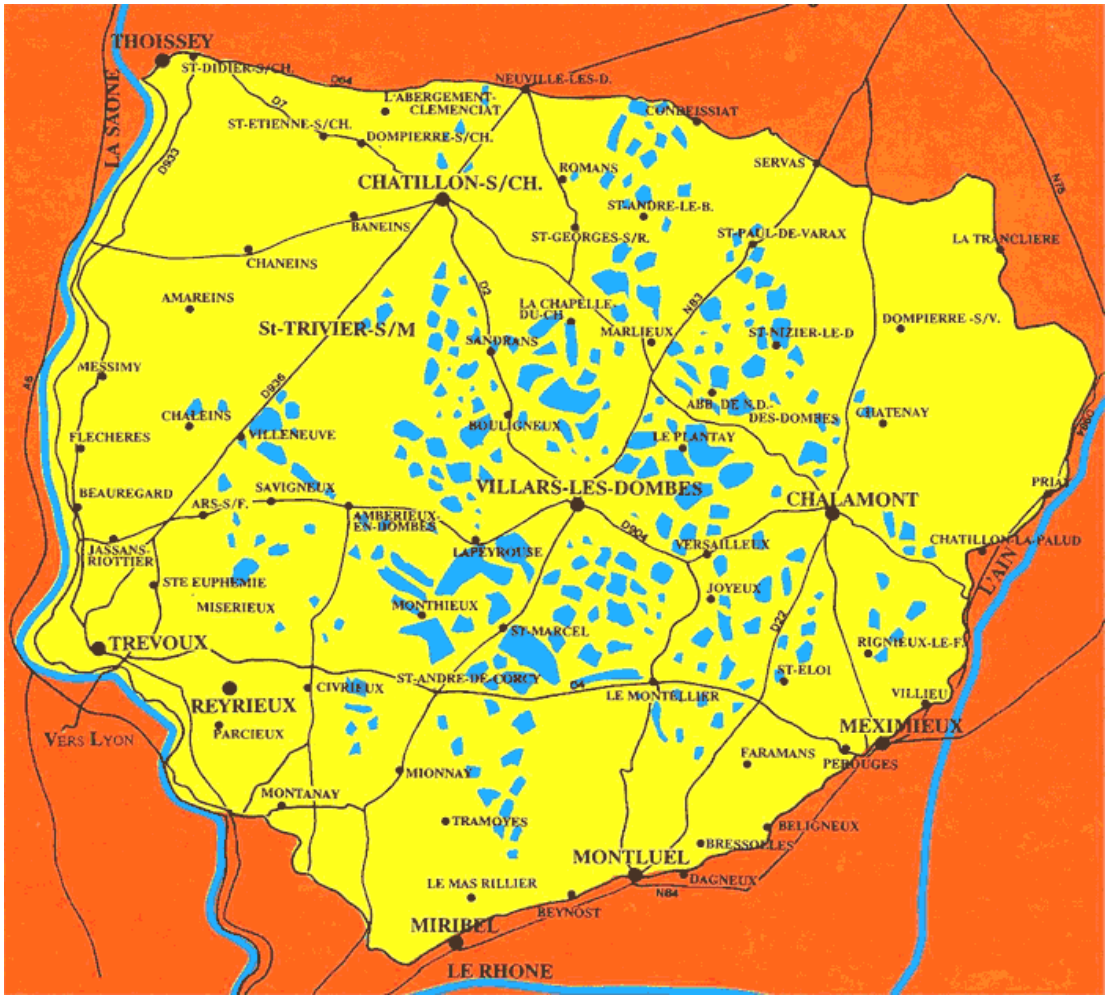


Figure 18 : Carte géographique de la Dombes (http://ladombes.free.fr)

L'écosystème de la Dombes est constitué de très nombreux étangs (figure 19) aménagés par l'homme dès la fin du Moyen-Âge (Billard, 1979) à des fins piscicoles et culturales. L'alternance d'assec (culture céréalière, pendant un an) et d'évolage (pêche, durant deux années), encore pratiquée aujourd'hui, permet d'intriquer les activités de culture céréalière et de pêche intensive en eau douce. Au-delà du particularisme culturel, ces pratiques de culture et d'élevage constituent un pan notoire de l'activité économique de la région. En effet, la Dombes abrite à elle seule près de 18 % de la surface nationale des étangs exploités. Ces piscicultures extensives sont gérées par quelques 300 pisciculteurs qui produisent 21% de la production piscicole nationale (1600 t). Carpes, tanches et brochets constituent les principales espèces d'élevage (etangs.ifrance.com, consulté le 15 septembre 2009).

Figure 19 : Vue aérienne de la Dombes (photo Didier Halatre, site Wikipedia, 28 janvier 2010)

Par ailleurs, la situation intermédiaire de la Dombes, entre Europe du nord-est et bassin méditerranéen, sur l'axe rhéno-rhodanien des migrations transcontinentales, en a fait un relais pour de nombreuses espèces d'oiseaux migrateurs. Aux oiseaux nicheurs autochtones, dont on a pu dénombrer 131 espèces, s'ajoutent périodiquement les migrateurs estivant qui arrivent au printemps et repartent en automne (comme par exemple le héron pourpré (*Ardea purpurea*), l'aigrette garzette (*Egretta garzetta*), le coucou gris (*Cuculus canorus*), le rossignol philomèle (*Luscinia megarhynchos*), la bondée apivore (*Pernis apivorus*) ou encore la sarcelle d'été (*Anas querquedula*)) et les grands migrateurs hivernants qui se reproduisent en Europe du Nord et s'arrêtent afin de trouver repos et nourriture (citons les exemples du balbuzard pêcheur (*Pandion haliaetus*), de la spatule blanche (*Platalea leucorodia*), de la bécasse des bois (*Scolopax rusticola*) ou de la cigogne noire (*Cigonia nigra*)) (Bernard & Lebreton, 2007). De ce fait, la Dombes constitue la zone biogéographique présentant la plus grande diversité d'espèces de la région Rhône-Alpes, et revêt donc un intérêt considérable pour les ornithologues et les chasseurs.

La Dombes constitue également un milieu auquel se sont facilement acclimatés Ragondin et Rat musqué, et pâtit actuellement des conséquences de leur colonisation. L'habitat, constitué d'étangs en assec (culture) ou en évolage (pêche), entourés de prés pâturés ou non, de champs ou de petits bois, leur convient très bien (figures 20 et 21).

Figure 20 : Etang de la fondation Vérot (réserve naturelle), (photo personnelle)

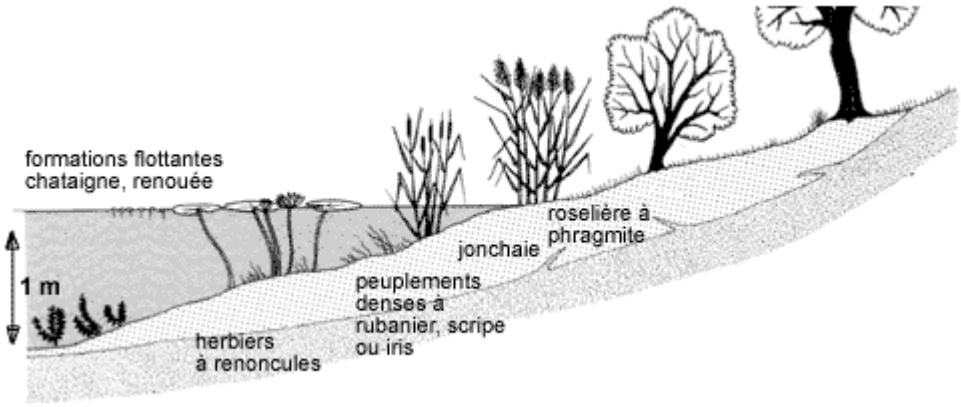


Figure 21 : Représentation schématique du gradient de végétation de la Dombes. Source : Plaquette L'étang, une question d'équilibre (Station ONC "Montfort" 01330 Birieux)

1.2 Zone d'étude

L'écosystème humide typique, la biodiversité des sites de prospection et les population importantes de rongeurs qui séjournent dans la Dombes ont motivé notre choix comme région d'étude. La proximité géographique de la ville de Lyon et de l'Ecole Vétérinaire ont également été des critères logistiques importants. La zone d'étude précise, représentée sur une carte (figure 22), a été établie le long d'un transect (itinéraire rectiligne de prospection et d'échantillonnage, annexe 1) traversant la Dombes de Bourg en Bresse à Saint André de Corcy. Ce type d'échantillonnage permet d'obtenir une grande diversité de situations topographiques, géomorphologiques et végétales. Les étangs inclus dans la zone d'étude sont décrits dans le tableau 5, réalisé à partir des données collectées par un questionnaire « pièce d'eau » (annexe 2). Un questionnaire « site » est rempli pour chacun des sites (annexe 3). Il permet de préciser l'utilisation du site -chasse, pêche, réserve,...- et de recueillir les coordonnées du piégeur opérant sur ce site.

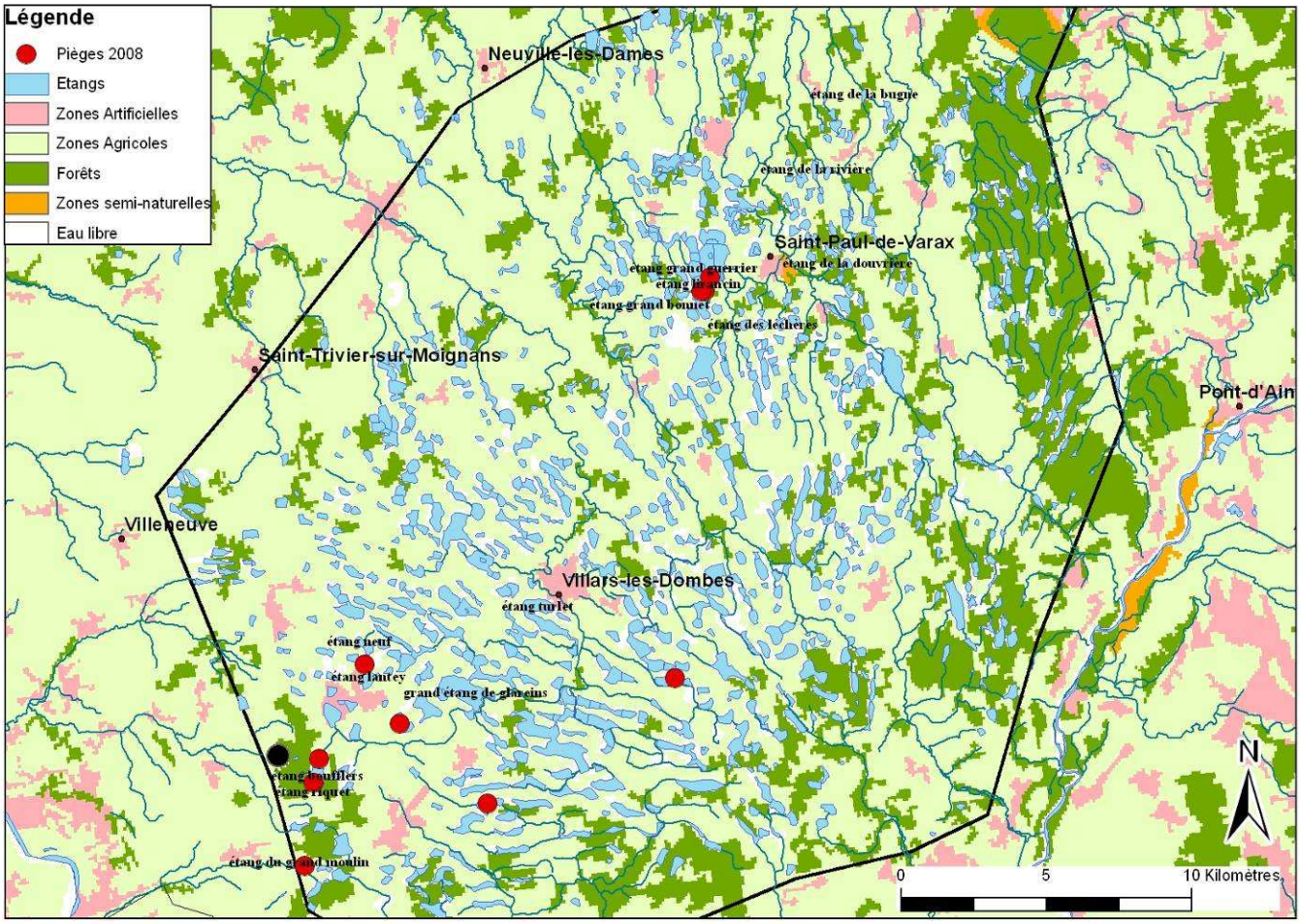


Figure 22 : Cartographie de la zone d'étude recouvrant le transect de prospection dans la Dombes (Leblond, 2010)

Etangs	Surface	Mise eau	Routes	Forêts	Cultures	Habitat humain	Utilisation Site
Etang Neuf	?	A sec en 2008	Chemin de terre	Oui	Oui	Dispersé	Pisciculture Zone chasse/ pêche
Grand guerrier	22 ha	Fin 2007	Chemin de terre Voie communale	Oui	Oui	Absence	Pisciculture Zone chasse / pêche
Grand laurencin	27 ha	Fin 2007	Chemin de terre	Oui	Oui	Absence	Pisciculture Zone chasse / pêche
Grand moulin	8 ha	A sec en 2008	Chemin de terre	Oui	Oui	Dispersé	Pisciculture Zone chasse / pêche
Grand plateron	12 ha	2007	Chemin de terre	Non	Oui	Dispersé	Pisciculture Zone chasse / pêche
Lentais	29 ha	12/2007	Non	Non	Oui	Absence	Pisciculture Zone de chasse / pêche
Mine	26 ha	Fin 2007	Chemin de terre	Oui	Oui	Absence	Pisciculture Zone chasse / pêche Natura 2000
Petit Laurencin	10-15 ha	Fin 2007	Chemin de terre	Oui	Non	Absence	Pisciculture Zone chasse/pêche
Praillebard	22 ha	11/2005	Chemin de terre	Oui	Non	Dispersé	Réserve privée
Riquet	4.2 ha	2005	Chemin de terre (sur ¼ du linéaire)	Oui	Oui (sur ¼ du linéaire)	Dispersé	Réserve privée
Varines	47 ha	10/2007	Voie communale	Non	Oui	Dispersé	Zone chasse / pêche Pisciculture

Tableau 5 : Données environnementales des étangs de prospection

2. Animaux inclus dans l'étude

Sont inclus dans l'étude tous les ragondins, rats musqués et rats piégés vivants et sacrifiés sur place par arme à feu, en veillant à n'occasionner aucune souffrance à l'animal. Sont donc exclus de l'étude les animaux capturés au moyen de pièges vulnérants et mortels (type piège en X, ou Conibear) ou retrouvés morts accidentellement.

Les ragondins et rats musqués sont capturés à l'aide de pièges cages disposés stratégiquement aux abords des étangs. La disposition et l'emplacement des cages sont décidés en collaboration étroite avec des piégeurs agréés. Aucun appât n'est requis pour ce type de capture. Les pièges cages sont parfois placés sur des coulées de Ragondins afin d'optimiser les chances de capture (figure 23). Les pièges ne doivent pas demeurer sans surveillance plus de vingt-quatre heures durant, conformément aux règles éthiques, et requièrent donc un passage quotidien, réalisé avant midi.

Figure 23 : Coulée de Ragondin (Etang du Petit Laurencin, Dombes, photo personnelle)

La période de piégeage retenue pour notre étude s'étend du 10 avril 2008 au 10 juillet 2008.

3. Autopsie et prélèvements organiques

3.1 Prélèvements sur le terrain

La séance de capture consiste à relever l'ensemble des pièges disposés autour des étangs ou aux abords des points d'eau. Cette séance s'effectue le matin, en collaboration avec un piégeur agréé. A chaque emplacement de piège, un questionnaire « piège » est complété (annexe 4). Il mentionne notamment les coordonnées spatiales du piège, recueillies à l'aide d'un GPS portatif, et le nom du site et/ou de la pièce d'eau. Lorsqu'un animal est pris dans un piège, un numéro d'étude lui est affecté, sous la forme AAMMJJ/A01 (A= Année, M= Mois, J=Jour, /A= animal) puis consigné sur le questionnaire (annexe 4). L'animal est ensuite rapidement sacrifié par le piégeur à l'aide d'une arme à feu. Un prélèvement de sang est alors immédiatement réalisé par ponction intra-cardiaque en regard des 4ème ou 5ème espaces inter-costaux. Des tubes secs à mélangeur de phase sont employés à cet effet. Le geste technique est relativement délicat du fait de la taille réduite du cœur et nécessite une aiguille longue (40 mm de longueur, diamètre 12/10 mm). Il s'agit de l'unique prélèvement de terrain réalisé sur l'animal.

Lorsque les pièges-cages sont vides, il peut être opportun de modifier leur emplacement afin d'optimiser les chances de prise.
Un prélèvement d'eau est réalisé environ une fois par séance de capture à proximité d'un piège. La température de l'eau est relevée, puis ce prélèvement est conservé en vue d'une analyse bactériologique (annexe 4). A chaque séance de capture, un questionnaire « séance de capture » (annexe 5) renseignant les conditions météorologiques et le nombre total d'animaux capturés pour chaque espèce est rempli.

3.2 Autopsie

Hormis le prélèvement sanguin réalisé sur le terrain, l'autopsie des ragondins se déroule dans la salle de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (ENVL) prévue à cet effet. Les équipements de protection individuels visant à se prémunir du risque zoonotique comprennent charlotte, lunettes, masque à haut niveau de filtration, blouse, tablier et bottes en caoutchouc, gants remontant jusqu'en haut du bras sur lesquels sont enfilés des gants standards en latex.
Les prélèvements réalisés et l'autopsie achevée, la salle d'autopsie est nettoyée, puis désinfectée à l'aide d'une solution à base d'ammoniums quaternaires.

3.2.1 Mesures biométriques

Des mesures biométriques sont d'abord entreprises, puis relevées sur un questionnaire « animal » (annexe 6) : la taille totale du ragondin (de l'extrémité rostrale à la base de la queue), la taille du pied postérieur, puis celle du pied antérieur sont mesurées successivement. Le poids est évalué à l'aide d'un dynamomètre à ressort (précision à 100 grammes).

3.2.2 Abords et observations

Après énucléation bilatérale, une incision xypho-pubienne est réalisée afin d'avoir accès aux organes abdominaux. La dilatation fréquente du caecum rend délicate cette opération d'où la nécessité d'être précautionneux lors de l'incision du péritoine. Il est crucial d'éviter toute ponction intestinale ou cæcale, qui risquerait de contaminer l'ensemble de la cavité abdominale. Au cours de nos autopsies, l'estomac a semblé présenter une paroi particulièrement fragile.
Suite à l'ouverture de l'abdomen, les organes génitaux sont inspectés afin de confirmer le sexe de l'animal, et d'évaluer s'il est pubère ou non (organes génitaux internes développés ou non). L'observation du tractus génital des femelles permet également d'apprécier leur état de gestation et, le cas échéant, le nombre de petits qu'elles s'apprêtaient à mettre bas, en comptant le nombre de fœtus ou

d'ampoules fœtales. L'état corporel de l'animal est également notifié ; il tient compte de la répartition et de la quantité de graisse de couverture.
Les organes abdominaux sont inspectés et palpés. Enfin, la cavité thoracique est à son tour ouverte afin d'obtenir un accès visuel et tactile au cœur et aux poumons.
Toutes les informations et anomalies éventuelles sont relevées sur la feuille d'autopsie (annexe 6).

3.3 Prélèvements

Tout le matériel destiné à recevoir les prélèvements est préalablement identifié par la date, le lieu de prélèvement, les coordonnées GPS du site de piégeage et le numéro de l'animal.

Sont prélevés sur l'animal :
➦ Du sang, immédiatement après sacrifice, sur le terrain ;
➦ Les yeux, au cours de l'autopsie, à l'ENVL ;
➦ Les reins, au cours de l'autopsie, à l'ENVL ;
➦ De l'urine, de manière non systématique, en salle d'autopsie, à l'ENVL ;
➦ Le tube digestif, et les organes qui lui sont fonctionnellement et anatomiquement rattachés (foie, pancréas) en salle d'autopsie, à l'ENVL.

3.3.1 Techniques de prélèvement

➦ Le sang est collecté immédiatement après sacrifice du ragondin, conformément aux normes éthiques, comme décrit précédemment.
➦ Une énucléation bilatérale est réalisée en début d'autopsie, après avoir effectué les mesures biométriques. L'intégrité oculaire doit être respectée. Il est conseillé de réaliser des incisions péri-palpébrales afin de faciliter l'accès au globe oculaire.
➦ Les reins sont prélevés à l'aide d'une lame de bistouri. A cet effet, il convient de récliner l'ensemble des organes digestifs sur un côté afin de faciliter leur accès. Cette opération doit être réalisée dans des conditions sanitaires optimales. Le feuillet interne du péritoine qui tapisse la capsule rénale doit être préservé le plus possible, car il contribue à réduire le risque de contamination de la capsule et du parenchyme rénal sous jacents. Une fois isolé, le rein est libéré de ses moyens d'unions et prélevé.
➦ Le tube digestif est prélevé avec le foie et le pancréas, pour les besoins d'une autre étude. Le segment prélevé s'étend de l'extrémité distale de l'œsophage à l'extrémité distale du rectum. L'œsophage est sectionné au niveau du hiatus diaphragmatique. Son extrémité libre est alors rendue aveugle au moyen d'un nœud réalisé avec une ficelle. L'ensemble du tube digestif est ensuite isolé,

puis l'extrémité distale du rectum est à son tour sectionnée et rendue hermétique au moyen d'une ficelle.

➦ Lorsque la vessie est pleine, un prélèvement d'urine transvésical est effectué à l'aide d'une seringue et d'une aiguille stériles.

3.3.2 Conservation

➦ Le sang sur tube sec est centrifugé 15 minutes, à 1000 g (centrifugeuse Jouan® GR 4-11, France). Les sérums sont ensuite stockés à – 20°C (congélateur Baltik®).

➦ Immédiatement après prélèvement, les yeux sont placés dans un petit pot identifié contenant du formol.

➦ Le rein est rapidement placé dans un pot à prélèvement stérile et identifié. Le rein controlatéral, également prélevé, sera placé dans sachet stérile. L'un des reins sera immédiatement utilisé pour la mise en culture, l'autre est placé au congélateur.

➦ L'ensemble du tube digestif est placé dans un sachet stérile puis mis au congélateur.

➦ Le prélèvement d'urine sera utilisé le jour même.

3.3.3 Destination

➦ L'échantillon sanguin permettra de réaliser les analyses ultérieures de sérologie par MAT pour les différents sérogroupes de leptospires.

➦ Les yeux seront utilisés après plusieurs mois de fixation et traitement de dessiccation pour évaluer l'âge de l'animal selon le protocole décrit dans la seconde partie bibliographique et ajusté.

➦ Les reins seront utilisés pour les protocoles de mise en culture et de PCR.

➦ Le tube digestif sera destiné à des analyses parasitologiques ultérieures

➦ L'urine sera destinée à la réalisation d'une PCR et à la mise en culture.

4. Analyses de laboratoire

4.1 Sérologie par test d'agglutination microscopique(MAT)

La technique pratiquée par le laboratoire leptospires de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon est conforme au protocole décrit par l'Organisation Mondiale de la Santé et l'*International Leptospirosis Society* (Terpstra *et al*., 2003).

Rappelons que le MAT constitue la méthode diagnostique sérologique de référence pour la leptospirose. Il s'agit d'une méthode de diagnostic indirect, quantitative (détermination d'un titre en anticorps), qui consiste en une lecture au microscope à fond noir (figure 24) du pouvoir agglutinant du

sérum à tester vis-à-vis de cultures vivantes de *Leptospira*. Une batterie de souches choisies en fonction de la fréquence connue de certains sérovars et de la probabilité de les rencontrer selon les critères épidémiologiques locaux est constituée pour permettre l'identification du sérovar en cause.

Figure 24: Microscope à fond noir (photo personnelle, laboratoire leptospires de l'ENVL)

4.1.1 Culture de souches

Les souches requises pour l'analyse sont conservées à -80°C dans un Freezer 86, modèle 938 (Forma Scientific®, inc., USA), à -60°C dans un Biofreezer® (Forma Scientific®, inc., USA), et à -196°C dans une cuve à azote Cryodiffusion B 2048® (France). Elles sont cultivées dans un milieu contenant de la sérumalbumine bovine et du Tween 80, généralement le milieu d'Ellinghausen et McCullough, modifié par Johnson et Harris (milieu EMJH). La préparation commerciale EMJH Indicia Biotechnologie® (Sainte-Foy l'Argentière, France) est classiquement utilisée. Les cultures sont repiquées chaque lundi en vue de leur utilisation le mercredi de la semaine suivante, et placées à 30°C dans un incubateur Incusafe CO2 MCO-15AC (Sanyo®, Japon). La culture utilisée pour l'apport d'antigènes doit en effet avoir sept jours au moins, mais moins de dix jours de croissance à 30°C.
Afin de limiter la croissance bactérienne, les cultures sont entreposées à température ambiante et dans l'obscurité, lorsque la densité atteint 2 à 4 x 10^8 leptospires/ml. Après 10 jours de croissance, il est conseillé de conserver les cultures à 15°C. La viabilité des cellules, objectivée par leur densité et leur motilité, est régulièrement vérifiée au microscope à fond noir. Avant d'être utilisées, les souches sont généralement diluées au 1:2 à l'aide d'eau tamponnée à un pH de 7,4 afin d'obtenir une densité de leptospires comprise entre 1 et 2 x 10^8 leptospires/ml.

4.1.2 Sérovars recherchés dans notre région d'étude

Pour chacun des sérums, une sérologie est réalisée à l'aide d'un panel de 24 sérovars appartenant à 14 sérogroupes (tableau 6).

Sérogroupe	Abréviation du sérogroupe	Sérovar	Abréviation du sérovar	Souche
ICTEROHAEMORRHAGIAE	IH	Icterohaemorrhagiae Copenhageni	19 COP	 ?
AUSTRALIS	AUS	Munchen Australis Bratislava	MUN AUS BRAT	Munchen C 90 Ballico Jez-Bratislava
AUTUMNALIS	AUT	Autumnalis Bim	AKI BIM	Akiyami A 1051
BALLUM	BAL	Castellonis	BAL	Castellon 3
BATAVIAE	BAT	Bataviae	BAT	Van tienen
CANICOLA	CAN	Canicola	CAN	Hond Utrecht IV
GRIPPOTYPHOSA	GRIP	Grippotyphosa Vanderhoedoni	GRIP VAN	Moskva V. OU Andaman Kipod 179
HEBDOMADIS	HEB	Kremastos	HEB	Hebdomadis
PANAMA	PAN	Panama Panama Mangus	PANip PANenvn MAN	CZ 214 K 374 TRVL/CAREC 137774
POMONA	POM	Pomona	POM	Pomona
PYROGENES	PYR	Pyrogenes	PYR	Salinem
SEJROE	SEJ	Sejroe Saxkoebing Wolffi Hardjo	SJ SAX WOLF HJ	Sejroe mus 24 3705 ?
TARASSOVI	TAR	Tarassovi	TAR	Perepelitsin
CYNOPTERI	CYN	Cynopteri	CYN	3522C

Tableau 6 : Batterie de sérovars utilisés dans le MAT et sérogroupes associés

4.1.3 Méthode

L'épreuve d'agglutination microscopique se déroule en deux étapes :

- détermination du sérogroupe responsable par dépistage groupé, suivie d'une
- détermination du titre du sérum par MAT quantitatif.

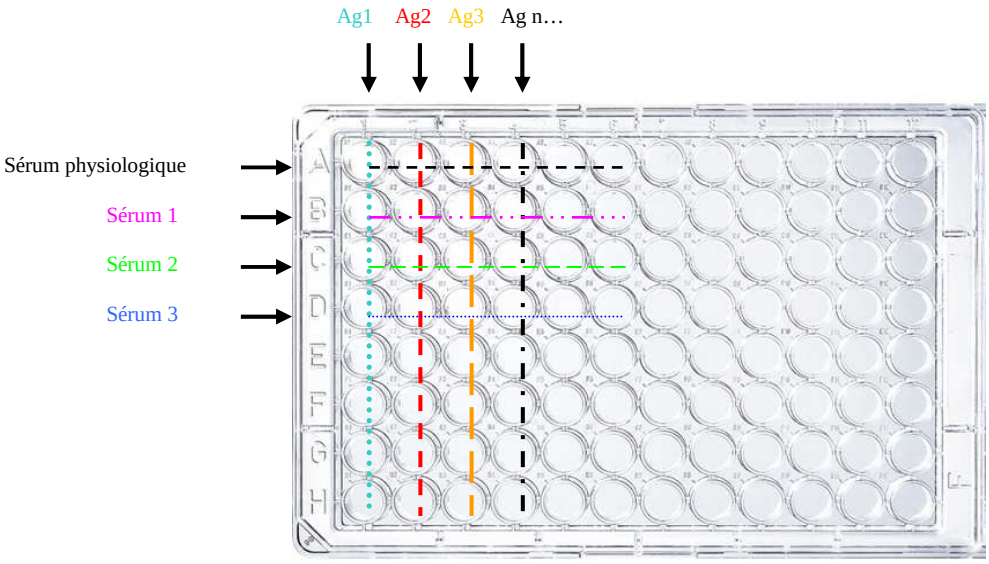


Figure 25 : Répartition des antigènes et sérums sur la plaque microtitre

➦ La procédure de dépistage groupé utilisée est la suivante :

→ Le complément est inactivé en chauffant le sérum à tester à 56°C pendant 30 minutes, puis le sérum est ensuite dilué au 1/50.

→ Un volume de 50 µL de sérum physiologique tamponné est prélevé à l'aide d'une micropipette multicanaux 12 puits 25-200 µL CAPP autoclavable (Starlab®, France), puis déposé dans chacun des puits de la première rangée d'une plaque microtitre NUNC® 269620 (Danemark). Le nombre de puits d'une rangée correspond au nombre d'antigènes testés (figure 25). Cette première rangée constitue la rangée « contrôle », correspondant à une réaction négative.

→ A chaque rangée suivante est affectée un sérum particulier à analyser. Un volume de 50 µL du premier sérum dilué au 1/50 est donc déposé dans chacun des puits de la seconde rangée. L'opération est réitérée pour chacun des sérums à tester, en changeant de rangée à chaque nouveau sérum (figure 25, tableau 7).

→ Chaque colonne correspond à un antigène donné (figure 25, tableau 7). Un volume de 50 µL de l'antigène dilué est déposé dans chacun des puits d'une colonne, incluant le contrôle. L'opération est répétée pour chacun des antigènes testés. La dilution finale du sérum est alors au 1/100 (1/50 de sérum + 1/50 de culture d'antigène)

→ Les plaques microtitre sont recouvertes puis placées pendant une heure à 37°C dans une étuve Couprie® (Lyon, France) puis entreposées pendant une heure dans une pièce à 10°C afin de stopper l'agglutination.

→ A l'aide d'une micropipette multicanaux automatique 20-200 µL Eppendorf Research Pro® (Allemagne), un aliquot de chacun des puits est transféré sur une lame de microscope ; la lecture de chaque lame est effectuée au moyen d'un microscope à fond noir Carl Zeiss AXIOSCOP 40® (Göttingen, Allemagne) sous forte lumière.

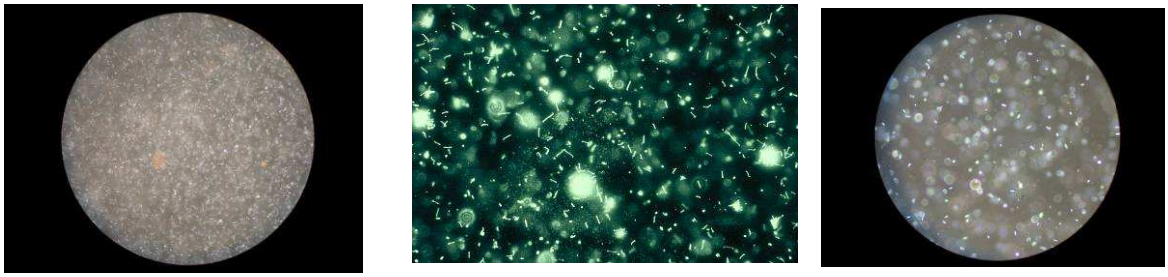
→ Le degré de réaction est interprété théoriquement par estimation du pourcentage des leptospires qui sont agglutinés. Si 100% des leptospires sont agglutinés, la réaction est de 4+ ; 3+ est égal approximativement à 75% d'agglutination ; 2+ est égal à 50% ; et 1+ est égale à moins de 50%.

	Antigène 1	**Antigène 2**	**Antigène 3 (...)**	**Antigène n**
Contrôle négatif	Tampon + Ag 1	Tampon + Ag 2	Tampon + Ag 3 (...)	Tampon + Ag n
Sérum 1	Sérum 1 + Ag 1	Sérum 1 + Ag 2	Sérum 1 + Ag 3 (...)	Sérum 1 + Ag n
Sérum 2	Sérum 2 + Ag 1	Sérum 2 + Ag 2	Sérum 2 + Ag 3 (...)	Sérum 2 + Ag n
Sérum 3	Sérum 3 + Ag 1	Sérum 3 + Ag 2	Sérum 3 + Ag 3 (...)	Sérum 3 + Ag n
Sérum x	Sérum x + Ag 1	Sérum x + Ag 2	Sérum x + Ag 3 (...)	Sérum x + Ag n

Tableau 7 : Diagramme d'une plaque microfiltre dans la technique de dépistage groupé par agglutination microscopique (Terpstra *et al.*, 2003)

Les leptospires agglutinés forment des amas (figure 26 b et c) plus ou moins denses au sein desquels les mouvements des extrémités libres sont visibles. Lorsque l'agglutination est complète, le champ apparaît dénué de tout leptospire libre. En pratique, il est plus aisé d'évaluer le pourcentage de leptospires libres par rapport au contrôle. Ainsi :

- si la proportion de leptospires libres est comprise entre 50 et 100%, la réaction est négative
- si la proportion de leptospires libres est inférieure à 50%, la réaction est positive.



a) b) c)

Figure 26 : Observation d'épreuves d'agglutination microscopique des leptospires au microscope à fond noir. De gauche à droite : a) témoin négatif (pas d'agglutination), b) agglutination < 50%, et c) agglutination > 50%. Sources : photo centrale (b) CDC (Center for Disease Control and Prevention), division « Bacterial and Mycotic Diseases » : Leptospirosis ; photos a) et c) : Marga Goris, KIT Biomedical Reserch, Amsterdam.

➦ Détermination du titre (tableau 8)

	Ag Contrôle	**Dilution 1/50**	**Dilution 1/100**	**Dilution 1/200**	**Dilution 1/400**	**Dilution 1/n**	
Sérum 1	Témoin + Ag 1	Sérum 1 1/25 + Ag1	Sérum 1 1/50 + Ag1	Sérum 1 1/100 + Ag1	Sérum 1 1/200 + Ag1	etc…	**Ag 1**
Sérum 1	Témoin + Ag 2	Sérum 1 1/25 + Ag2	Sérum 1 1/50 + Ag2	Sérum 1 1/100 + Ag2	Sérum 1 1/200 + Ag2	etc…	**Ag 2**
Sérum 1	Témoin + Ag 3	Sérum 1 1/25 + Ag3	Sérum 1 1/50 + Ag3	Sérum 1 1/100 + Ag3	Sérum 1 1/200 + Ag3	etc…	**Ag 3**
Sérum 1	Témoin + Ag n	Sérum 1 1/25 + Ag n	Sérum 1 1/50 + Ag n	Sérum 1 1/100 + Ag n	Sérum 1 1/200 + Ag n	etc…	**Ag n…**
Sérum 2	Témoin + Ag 1	Sérum 2 1/25 + Ag1	Sérum 2 1/50 + Ag1	Sérum 2 1/100 + Ag1	Sérum 2 1/200 + Ag1	etc…	**Ag 1**
Sérum 2	Témoin + Ag 2	Sérum 2 1/25 + Ag2	Sérum 2 1/50 + Ag2	Sérum 2 1/100 + Ag2	Sérum 2 1/200 + Ag2	etc…	**Ag 2**
Sérum 2	Témoin + Ag n	Sérum 2 1/25 + Ag n	Sérum 2 1/50 + Ag n	Sérum 2 1/100 + Ag n	Sérum 2 1/200 + Ag n	etc…	**Ag n…**

Tableau 8 : diagramme de détermination du titre en anticorps par agglutination microscopique (Terpstra *et al.*, 2003)

Lorsqu'un sérum a une réaction de 2+, 3+ ou 4+ à une dilution de 1/100 (soit un pourcentage de leptospires libres < 50%), il est dilué en double n fois (jusqu'à 1/12800). A chaque dilution, le pourcentage d'agglutination est apprécié. **Le titre final est l'inverse de la dilution la plus élevée avec une réaction de 2+ ou plus importante.**

4.1.4 Interprétation

Dans notre étude, un sérum est considéré positif pour des titres en anticorps supérieurs ou égaux à 100 (dilution de 1/100 et plus). Nous avons suivi les recommandations issues de précédentes études réalisées en France chez le ragondin et le rat musqué (Michel *et al*., 2001).

4.2 Mise en culture

Immédiatement après autopsie des ragondins, un protocole de mise en culture de leptospires est initié à partir de l'un des reins fraîchement prélevé. L'ensemble des manipulations se déroule sur un poste de sécurité microbiologique Plastec® H.P.V. S.B. (Vanves, France), ou sous une hotte à flux laminaire Cytair Esi Flufrance® (France) au laboratoire de bactériologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon. Le manipulateur porte des gants désinfectés à l'alcool et une blouse.

4.2.1 Protocole

➦Jour de capture

Après autopsie et prélèvement, le rein est rincé à l'aide d'une solution tampon de PBS (Phosphate-Buffered Saline) ou de sérum physiologique stérile. Puis, dans un cône de stérilité, il est décapsulé et coupé en deux longitudinalement. Une tranche de un gramme environ est prélevée de manière aseptique, scarifiée, puis placée dans un tube de 9 mL d'EMJH, un milieu de culture propice à la croissance des leptospires.

➦24 heures après capture

1 mL de surnageant est prélevé à l'aide d'une micropipette, puis dilué dans 9 mL d'EMJH. L'opération est réitérée trois fois. Les trois tubes de dilutions successives ainsi obtenus sont conservés tandis que le tube mère est éliminé. Dans chacun des tubes est ajouté du 5 Fluoro-Uracile, un antibiotique sélectif, à 200 µg/mL. Le choix d'antibiotique peut également se porter sur la néomycine à 5 µg/mL, voire vers l'association néomycine-5 Fluoro-Uracile, qui semble être le couple le plus efficace pour lutter contre les contaminations tout en préservant l'intégrité des leptospires (Monteiro, communication orale à l'ENVL). Au début de nos travaux, deux séries de tubes de dilutions successives étaient réalisées, l'une comprenant un antibiotique, l'autre n'en comprenant pas.

Toutefois, la contamination systématique des tubes dénués d'antibiotique a rendu obsolète leur observation microscopique, si bien que la série sans antibiotique a été abandonnée.

Le même protocole est utilisé lors de prélèvements urinaires. Neuf mL d'EMJH sont adjoints à 1 mL d'urine, puis trois dilutions successives au 1/10ème sont réalisées. Le tube mère est conservé. Un antibiotique sélectif est ensuite ajouté dans chacun des tubes.

Les séries de trois (prélèvement rénal) ou quatre (prélèvement d'urine) tubes sont ensuite placées en incubation à 30°C dans un Incusafe CO2 Incubator® MCO-15AC (Sanyo®, Japon) pendant au moins trois mois, sachant que le temps requis pour la détection d'une culture positive varie avec le sérovar de leptospire et le nombre d'organismes présents dans l'échantillon.

Si une culture s'avère positive mais contient quelques contaminants, il est conseillé de ne pas rajouter d'antibiotiques, au risque de tuer les leptospires, mais d'utiliser un filtre. En pratique, des filtres de 0,45 µm sont utilisés. Il existe des filtres de 0,22 µm qui laissent théoriquement passer les leptospires (dont la longueur n'excède pas 20 µm), mais ils sont facilement bouchés par des impuretés, ce qui nuit à leur efficacité réelle.

4.2.2 Lecture

La lecture s'effectue au microscope à fond noir (figure 24) sous forte luminosité. La première lecture est réalisée à J+2. Si le prélèvement apparaît contaminé, il est alors abandonné, car les leptospires ne pousseront pas dans ces conditions. Si à J+2, le prélèvement est sain, il est alors conservé jusqu'à J+8, où une seconde observation est réalisée. De cette manière, une lecture hebdomadaire est effectuée au microscope à fond noir pendant au moins trois mois. En cas de culture positive, celle-ci est purifiée par filtration puis repiquée.

4.2.3 Identification de souche

L'identification des souches peut être réalisée sur des critères sérologiques définis pour le MAT. Cette épreuve consiste en une évaluation microscopique sur fond noir de l'agglutination d'une culture de *L. interrogans* par un volume égal de sérum hyper immun de lapin pour chacun des sérogroupes, et pour des dilutions croissantes. Le sérum hyper immun de lapin entraînant une agglutination (moins de 50% de leptospires libres) avec la plus forte dilution définit le sérogroupe de la souche.

4.3 PCR sur cultures

Suite à des problèmes techniques au laboratoire, les cultures réalisées sur les reins des animaux piégés en 2008 n'ont pas pu être purifiées.

Toutefois, afin de pouvoir déterminer si les animaux étaient porteurs, nous avons réalisé une PCR sur les tubes de cultures en utilisant des amorces spécifiques des leptospires pathogènes ciblant le gène LipL32/*hap* 1 (Levett, 2005).

Concrètement, les réactions ont été réalisées dans un volume total de 50 µL comprenant 2 mM de dNTP, 0,6 µM de chaque amorce, 5 µL de tampon de réaction Green GoTaq® Reaction Buffer contenant 1.5mM de $MgCl_2$ et 1,25 unité d' ADN polymerase GoTaq® (Promega®, Madison Wi, USA), 1 µL de culture non purifiée, le volume final étant complété à 50 µL par de l'eau MilliQ® (Millipore®, Molsheim, France). Les témoins positifs ont été réalisés en remplaçant la culture à tester par 1 µL de culture d'une souche connue en phase de croissance exponentielle, les témoins négatifs sont réalisé à l'aide d'eau MilliQ® au lieu des cultures.

Les amplifications ont été effectuées sur le Mastercycler® Gradient (Eppendorf®, Hambourg, Allemagne) selon un programme comportant 2 min de dénaturation à 95°C, puis 37 cycles consistant chacun en 30 s de dénaturation à 95°C, 20 s d'hybridation à 67°C et 40 s d'élongation à 72°C, et finalement une élongation de 5 minutes à 72°C.

La migration a été réalisée dans un gel d'agarose à 1.5% marqué au bromure d'éthydium, pendant 25 minutes à 100V en ajoutant régulièrement un marqueur de poids moléculaire et la lecture s'est faite sur une table à UV.

Le produit attendu est de 423 paires de bases.

	Séquences
LipL32-270F (amorce sens)	5'-CGCTGAAATGGGAGTTCGTATGATT-3'
LipL32-692R (amorce anti-sens)	5'-CCAACAGATGCAACGAAAGATCCTTT-3'

Tableau 9: Séquences des amorces utilisées (Levett, 2005)

5. Données concernant les leptospiroses humaine et animale

L'ensemble des données concernant la leptospirose humaine provient des rapports successifs, entre 1998 et 2008, du centre National de Référence de la leptospirose humaine de l'Institut Pasteur. Ces rapports sont consultables librement sur le site de l'institut pasteur (http://www.pasteur.fr). L'ensemble des rapports des dix dernières années a été compilé, afin de pouvoir objectiver l'évolution dans le temps des tendances épidémiologiques concernant la leptospirose en France métropolitaine et en région Rhône-Alpes.

Les données concernant la leptospirose chez nos espèces domestiques en région Rhône-Alpes sont issues de la banque de données de l'unité « diagnostic leptospirose » intégrée depuis 2007 au laboratoire de bactériologie de l'ENVL et dirigée par le professeur Angeli Kodjo. Tous les cas revenus positifs à l'épreuve d'agglutination microscopique (MAT) entre juillet 2007 (date d'implantation de l'unité) et décembre 2009 ont été relevés de manière manuscrite afin d'étudier l'implication des différents sérogroupes. Les sérovars réagissant à l'épreuve du MAT sont présentés de manière brute dans la banque de données. Pour obtenir des résultats par sérogroupe, il a fallu déduire des résultats sérologiques sur sérovar quel était le sérogroupe le plus probablement incriminé dans la leptospirose clinique. Cette interprétation sérologique suppose un certains nombres d'erreurs, sur lesquelles nous reviendrons dans notre discussion. Les résultats présentés seront donc plutôt à interpréter comme des tendances.

II. Résultats de la campagne de piégeage 2008 dans la Dombes et de l'étude des données du laboratoire leptospires de l'ENVL

1. Animaux piégés : étude descriptive de la population

1.1 Numération, poids, sexe et âge

A chaque session de capture, environ 15 à 20 pièges étaient relevés. Le nombre total d'animaux capturés (toutes espèces confondues) par séance était compris entre 0 et 6. Certains pièges étaient régulièrement occupés tandis que d'autres furent toujours retrouvés vides.

En tout, 47 ragondins, 9 rats musqués et 4 rats surmulots ont été capturés durant la session de piégeage s'étendant du 10 avril au 10 juillet 2008. Sur les 47 ragondins, 28 étaient des mâles et 19 des femelles, soit un sex-ratio de 1,5 mâles pour une femelle. Sur les 9 rats musqués, 6 étaient des mâles et 2 des femelles (un rat musqué n'a pas été identifié sexuellement), soit un sex-ratio de 3 mâles pour une femelle. Chez les rats surmulots, les 4 individus piégés comptaient 2 femelles et 2 mâles.

Le poids moyen des ragondins adultes mâtures (20 mâles et 14 femelles) était de 5090g chez les mâles et de 5700g chez les femelles. Parmi les femelles matures, 12 étaient gestantes, portant chacune entre 4 et 9 foetus. Le poids moyen des 4 mâles rats musqués adultes était de 1150g, celui des 2 femelles de 850g. L'une de ces femelles matures était gestante de 6 foetus. Quant aux rats surmulots, le poids moyen des mâles était de 400g, celui des femelles de 250g.

Sur les 47 ragondins, 6 (4 mâles et 2 femelles) avaient moins de trois mois, 7 (4 mâles et 3 femelles) avaient entre 3 et 6 mois environ (âge de la maturité sexuelle) et 34 (20 mâles et 14 femelles) étaient des adultes matures. Sur les 9 rats musqués, 6 étaient des adultes matures et 3 des jeunes. Tous les rats surmulots piégés étaient adultes.

1.2 Autopsie et lésions

Tous les animaux présentaient une bonne condition corporelle, avec une couverture graisseuse généralement importante. Trente-trois animaux (toutes espèces confondues) ont présentés des lésions macroscopiques à l'autopsie, parmi lesquels 15 mâles (dont 13 adultes) et 8 femelles adultes. Les lésions les plus couramment observées concernaient le tégument (cicatrices palmaires, plantaires et sur la queue), les reins (bosselures, adhérence de la capsule rénale, couleur hétérogène avec plages de décoloration, hémorragies plus ou moins diffuses) et le foie (stéatose hépatique chez les femelles gestantes, couleur hétérogène). Les lésions observées exceptionnellement ont été de l'ascite et des calculs vésicaux.

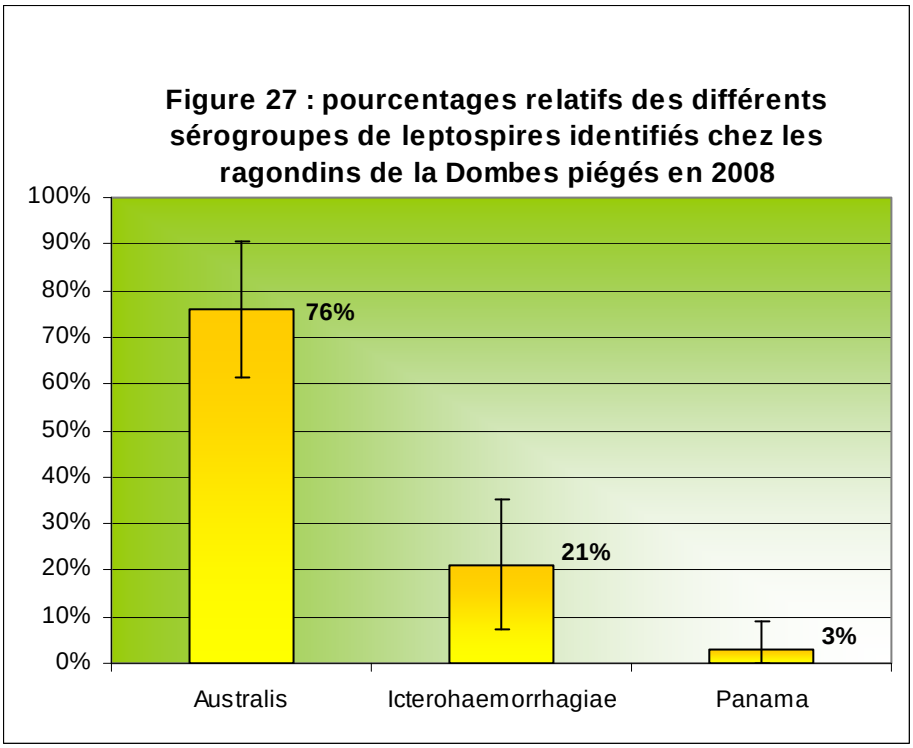
2. Séroprévalence de la leptospirose chez les Ragondins de la Dombes, et répartition des différents sérogroupes incriminés

	Positif				Négatif (%)	Total (%)
	AUS (%)	IH (%)	PAN (%)	BAT (%)		
M. coypus	25 (62,5)	7 (17,5)	1 (2,5)	0	7 (17,5)	40 (100)
O. zibethicus	0	4 (57)	0	0	3 (43)	7 (100)
R. norvegicus	0	1 (33)	0	1 (33)	1 (33)	3 (100)
Total	25 (50)	12 (24)	1 (2)	1 (2)	11 (22)	50 (100)

Tableau 10 : Synthèse des résultats de la campagne de piégeage 2008 sur la Dombes

Sur les 47 ragondins piégés, sept n'ont pas eu de prélèvement de sang, dont deux en raison d'un échec à l'acte et d'un accident (tube cassé), et cinq du fait de leur trop jeune âge (< 3 mois). Deux rats musqués et un rat n'ont pu être prélevés pour des raisons techniques.
Sur les 50 sérums de rongeurs (Ragondin, Rat Musqué, et Rat) piégés dans la Dombes en 2008 et ayant pu être analysés, 39 ont réagi positivement au MAT. La séroprévalence globale est donc de 78%.

Parmi les 40 sérums de ragondins analysés, 33 sont séropositifs à la leptospirose. Il en résulte une séroprévalence de 82,5% ($IC_{95\%}$: 68,1-91,3%) dans cette espèce. Chez le rat musqué et le rat, les séroprévalences atteignent respectivement 57% ($IC_{95\%}$: 25-84%) et 67% ($IC_{95\%}$: 31-94%).



Concernant les sérogroupes identifiés, Australis apparaît extrêmement prédominant chez le ragondin, puisqu'il représente trois quarts des cas de séropositivité (76% ± 14,6%). Il est suivi par le sérogroupe Icterohaemorrhagiae, qui représente 21% (±13,9%) des cas. Le sérogroupe Panama demeure confidentiel : il n'a été identifié que chez un seul individu.

Chez le rat musqué, seul Icterohaemorrhagiae a été identifié : il représente 100% des cas de séropositivité. Cette omniprésence doit cependant être relativisée au regard du faible nombre d'analyses chez cette espèce (7, dont 4 positives).

Les résultats suivants ne tiennent plus compte des rats, du fait de leur effectif trop faible.

	Myocastor coypus			*Ondatra zibethicus*			*TOTAL animaux piégés*		
Site	Séropositifs	Séronégatifs	Total piégés	Séropositifs	Séronégatifs	Total piégés	Séropositifs	Séronégatifs	Total
Etang Neuf	1	0	1	0	0	0	1	0	1
Grand Guerrier	2	3	6	1	0	1	3	3	7
Grand Laurencin	3	1	4	0	0	0	3	1	4
Grand Moulin/Réservoir	0	0	0	2	0	2	2	0	2
Grand Plateron	3	0	3	1	0	1	4	0	4
Le Lentais	1	2	3	0	0	0	1	2	3
Le Mine	1	0	1	0	0	0	1	0	1
Petit Laurencin	3	0	3	0	3	4	3	3	7
Praillebard	13	1	19	0	0	1	13	1	20
Riquet	2	0	2	0	0	0	2	0	2
Varines	4	0	5	0	0	0	4	0	5
TOTAL	33	7	47	4	3	9	37	10	56

Tableau 11 : Synthèse par étang des résultats de la campagne de piégeage 2008 dans la Dombes

Les étangs où furent piégés le plus grand nombre d'individus sont par ordre décroissant Praillebard, avec 20 individus piégés, Grand Guerrier et Petit Laurencin, avec 7 individus, puis Varines, Grand Laurencin et Grand Plateron. Praillebard constitue le premier site de capture des ragondins, tandis que la majorité des rats musqués furent capturés à Petit Laurencin.

Etang	Grand Guerrier	Petit Laurencin	Praillebard	Varines	Grand Plateron
Pourcentage séropositifs	50% (3/6)	50% (3/6)	93% (13/14)	100% (4/4)	100% (4/4)

Tableau 12 : Pourcentage de séropositivité par étang (ragondins et rats musqués)

En ne se limitant qu'aux étangs où 4 individus au moins ont subi une sérologie, une forte variabilité des séroprévalences est observée d'un étang à l'autre. Les individus piégés sur Varines et Grand Plateron se sont avérés être tous séropositifs (100%), mais le faible nombre d'individus ne permet pas d'effectuer de tests statistiques. Le taux de séropositifs des ragondins piégés sur Praillebard s'avère extrêmement élevé, atteignant 93% (± 13,4%), soit 13 positifs sur 14 ragondins testés. Grand Guerrier et Petit Laurencin présentent quant à eux une séropositivité globale en dessous de la moyenne de la zone d'étude, puisqu'elle atteint 50% (± 40%). Toutefois, la dissociation des résultats sérologiques entre ragondins et rats musqués met en exergue des différences notoires. Ainsi, sur Petit Laurencin, les 3 sérums de ragondin analysés se sont avérés tous positifs, tandis que les 3 sérums de rat musqué analysés se sont avérés tous négatifs.

3. Résultats d'analyses par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur cultures

	PCR +	PCR -	TOTAL
M. coypus	9 (33,3%)	18 (66,6%)	27 (100%)
O. zibethicus	1 (20%)	4 (80%)	5 (100%)
Total	10	22	32

Tableau 13 : Synthèse des résultats PCR de la campagne de piégeage 2008 dans la Dombes

Sur les 27 analyses PCR effectuées chez les ragondins, 1/3 (33% +/- 17,7%) sont revenues positives pour la leptospirose. Le trop faible effectif de rats musqués analysés en PCR ne permet pas d'en tirer de conclusions.

	Myocastor coypus			*Ondatra zibethicus*			TOTAL		
Site	PCR +	PCR -	Total	PCR +	PCR -	Total	PCR +	PCR -	totaux
Grand Guerrier	1	4	5	0	1	1	1	5	6
Grand Laurencin	1	3	4	0	0	0	1	3	4
Petit Laurencin	0	2	2	1	3	4	1	5	6
Praillebard	6	3	9	0	0	0	6	3	9
Riquet	1	1	2	0	0	0	1	1	2
Varines	0	5	5	0	0	0	0	5	5
Total	9	18	27	1	4	5	10	22	32

Tableau 14 : Synthèse par étang des résultats PCR de la campagne de piégeage 2008 dans la Dombes

En ne tenant compte que des étangs pour lesquels 5 résultats au moins ont été obtenus, des disparités importantes sont observées entre étangs. Une proportion de positifs particulièrement élevée est observée sur Praillebard (⅔ de positifs), alors qu'elle est nulle sur Varines et de 20% sur Grand Guerrier.

Identification animal	Espèce	Résultats PCR sur culture	Résultats MAT (titre + sérogroupe)			
080710/A01	*M. coypus*	Positif	1/200 IH	1/100 Australis		
080710/A02	*M. coypus*	Positif	1/200 IH			
080617/A02	*M. coypus*	Positif	1/200 IH	1/200 Copenhageni		
080603/A03	*M. coypus*	Positif	1/400 IH	1/800 Australis		
080612/A03	*M. coypus*	Positif	1/100 Panama			
080616/A03	*O. zibethicus*	Positif	NA*			
080612/A05	*M. coypus*	Positif	NA*			
080612/A06	*M. coypus*	Positif	NA*			
080606/A06	*M. coypus*	Positif	NA*			
080606/A04	*M. coypus*	Positif	NA*			
080603/A01	*M. coypus*	Négatif	1/400 Australis	1/100 Hebdomadis		
080603/A02	*M. coypus*	Négatif	1/100 Australis			
080604/A01	*M.coypus*	Négatif	1/6400 Australis	1/400 IH	1/200 Autumnalis	
080606/A01	*O. zibethicus*	Négatif	1/400 IH			
080606/A02	*M. coypus*	Négatif	1/400 Australis			
080606/A03	*M. coypus*	Négatif	1/3200 Australis			
080620/A02	*M. coypus*	Négatif	1/400 Australis	1/200 IH		
080620/A03	*M. coypus*	Négatif	1/400 Australis			
080617/A01	*M. coypus*	Négatif	1/400 Australis	1/100 IH	1/100 Panama	
080616/A02	*M. coypus*	Négatif	1/6400 Australis	1/3200 IH	1/800 Autumnalis et Cynopteri	
080612/A02	*M. coypus*	Négatif	1/400 Australis		1/200 IH	
080612/A04	*M. coypus*	Négatif	1/200 Australis			
080616/A01	*M. coypus*	Négatif	1/200 Australis			
080606/A05	*M. coypus*	Négatif	NA*			
080616/A04	*O. zibethicus*	Négatif	NA*			
080616/A05	*M. coypus*	Négatif	NA*			
080612/A01	*M. coypus*	Négatif	NA*			
080617/A03	*M. coypus*	Négatif	NA*			
080617/A04	*O. zibethicus*	Négatif	NA*			
080620/A01	*O. zibethicus*	Négatif	NA*			
080609/A01	*M. coypus*	Négatif	NA*			
080609/A02	*M. coypus*	Négatif	NA*			

Tableau 15 : Comparaison des résultats par PCR sur culture et sérologiques issus de la campagne de piégeage 2008 dans la Dombes (*NA = sérologie non réalisée)

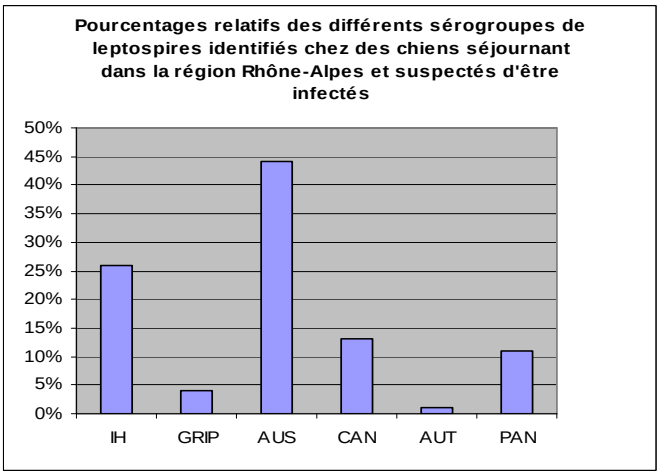
La mise en relation des résultats obtenus à partir de PCR sur culture et des résultats de MAT montre des titres faibles en anticorps, avec une positivité n'excédant jamais la dilution 1/800, chez les cinq animaux positifs en PCR et testés en MAT. En revanche, des titres élevés, atteignant 1/6400 chez le ragondin 080616/A02, sont observés chez certains animaux négatifs en PCR sur culture.

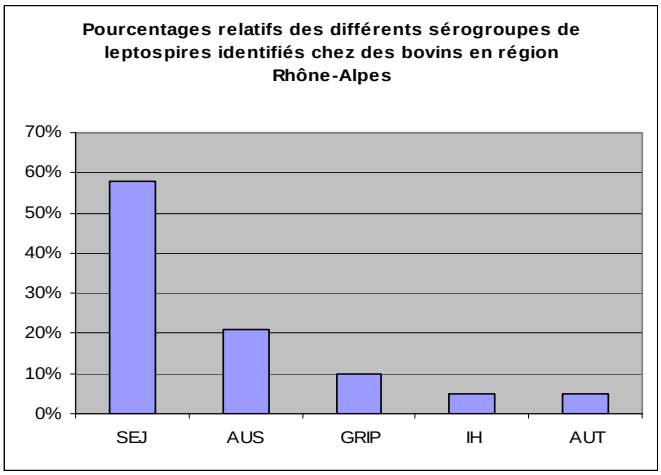
4. Sérogroupes infectants de leptospires chez le chien et chez les bovins entre 2007 et 2009, en région Rhône-Alpes.

Les données exploitées correspondent aux résultats positifs au test de microagglutination (MAT). Le titre seuil retenu est de 40 pour le chien, 100 pour les bovins et les porcs, et de 200 chez le cheval.
Entre juillet 2007 et décembre 2009, 78 résultats séropositifs pour la leptospirose par MAT ont été obtenus à partir de chiens suspects de leptospirose séjournant en région Rhône-Alpes. Seuls 70 de ces résultats ont été exploités pour définir des tendances de répartition par sérogroupes, en raison de l'ambiguïté des 8 autres résultats, qui ne permettaient pas d'incriminer de manière univoque tel ou tel sérogroupe.
Dix-neuf analyses positives ont été relevées chez les bovins, et sept chez les chevaux. Huit porcs appartenant à un même élevage ont également présenté des résultats positifs.

	IH	GRIP	AUS	CAN	SEJ	PAN	BRAT	AUT	TOTAL
CN	18	3	31	9	0	8	0	1	70
BV	1	2	4	0	11	0	0	1	19
CV	3	2	0	0	0	0	2	0	7
PC	8	0	0	0	0	0	0	0	8

Tableau 16 : Répartition par espèce et par sérogroupe des sérums positifs sur la région Rhône-Alpes entre 2007 et 2009





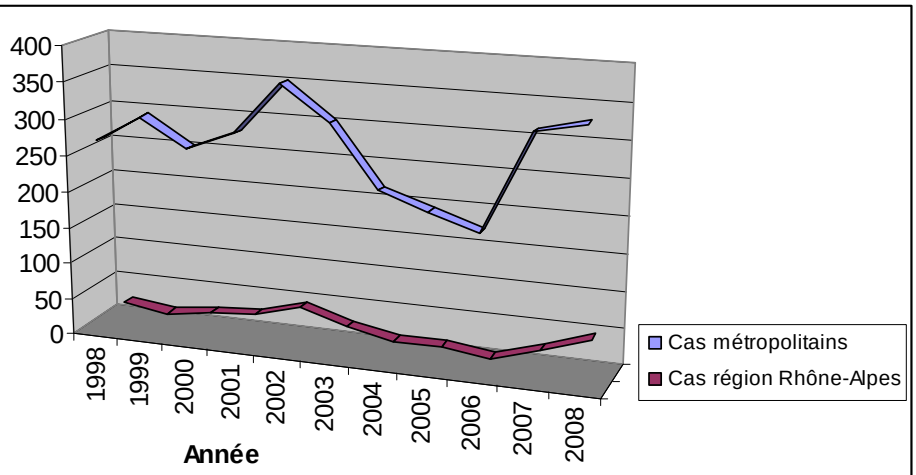
Figures 28 et 29 : Pourcentages relatifs des sérogroupes de leptospires identifiés chez le chien et chez les bovins séjournant en région Rhône-Alpes

Chez le chien, en région Rhône-Alpes, le sérogroupe Australis a été le plus fréquent (44% des cas). Il précède les sérogroupes Icterohaemorrhagiae, Panama et Canicola, qui représentent respectivement 26%, 13% et 11% des cas. Les sérogroupes Grippotyphosa et Panama sont rares.
Chez les bovins, le sérogroupe Sejroe est très nettement prédominant, puisqu'il représente à lui seul 58% des cas, devant Australis (21% des cas) et Grippotyphosa (10% des cas). Icterohaemorrhagiae et Automnalis n'ont été dépistés qu'une seule fois chacun.
Chez le cheval, seuls trois sérogroupes ont été identifiés : Ictérohaemorrhagiae, Bratislava et Grippotyphosa.
Les huit porcs de l'élevage contaminé étaient positifs pour le sérogroupe Icterohaemorrhagiae.

5. Données collectées sur le site CNR Pasteur

Le trop faible nombre de cas de leptospirose en région Rhône-alpes sur l'année 2008 m'a conduit à faire la synthèse des résultats des dix dernières années (1998 à 2008) afin de dégager une tendance sur les sérogroupes infectants de leptospires chez l'homme.

Rappelons que l'ensemble des données ci exploitées provient des rapports successifs, entre 1998 et 2008, du centre National de Référence de la leptospirose humaine de l'Institut Pasteur.



	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Cas métropolitains	269	306	268	294	365	318	235	212	192	327	342
Cas région Rhône-Alpes	21	12	21	25	43	23	11	11	3	23	44

Figure 30 et tableau 17 : Nombre de cas de leptospiroses en France métropolitaine et en région Rhône-Alpes sur les 10 dernières années (données issues du Centre National de Référence de la leptospirose humaine de l'Institut Pasteur)

Le nombre de cas de leptospirose dépistés annuellement en France métropolitaine sur les dix dernières années oscille globalement entre 200 et 350, avec une moyenne de 284 cas annuels. L'incidence moyenne avoisine les 0,5 cas par 100000 habitants (Centre National de Référence de la leptospirose humaine de l'Institut Pasteur, 1998 à 2008). Le faible nombre de cas reportés en 2005 et 2006, en

France métropolitaine comme en région Rhône-Alpes, est lié à un changement de nomenclature du sérodiagnostic de la leptospirose ayant succédé à l'arrêté ministériel paru dans le journal officiel du 11 octobre 2005. En première intention, ce n'est plus le MAT qui est réalisé, mais un test de macro-agglutination utilisant un antigène thermorésistant d'une souche de *L. biflexa*. Le MAT n'est réalisé en seconde intention que lors de résultat positif ou douteux au test de macro-agglutination. Picardeau et son équipe (2008) ont montré le manque de fiabilité du test de macro-agglutination, dont la sensibilité, de 62%, est médiocre, et la valeur prédictive positive, de 33%, insuffisante. De plus, il semble que la capacité du test de macro-agglutination à détecter un cas positif soit variable en fonction du sérogroupe infectant, avec notamment un défaut de dépistage des sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Grippotyphosa (qui sont pourtant les deux sérogroupes les plus fréquents chez l'homme en France!) (Picardeau *et al.*, 2008). En conséquence, les données recueillies à partir de 2005 doivent être interprétées avec prudence.

En région Rhône-Alpes, on dénombre en moyenne 20 cas par an, principalement concentrés dans les départements du Rhône et de l'Ain (Centre National de Référence de la leptospirose humaine de l'Institut Pasteur, 1998 à 2008). L'Ain fait régulièrement partie des dix départements métropolitains les plus affectés par la leptospirose, notamment lorsque l'on considère l'incidence annuelle rapportée au nombre d'habitants

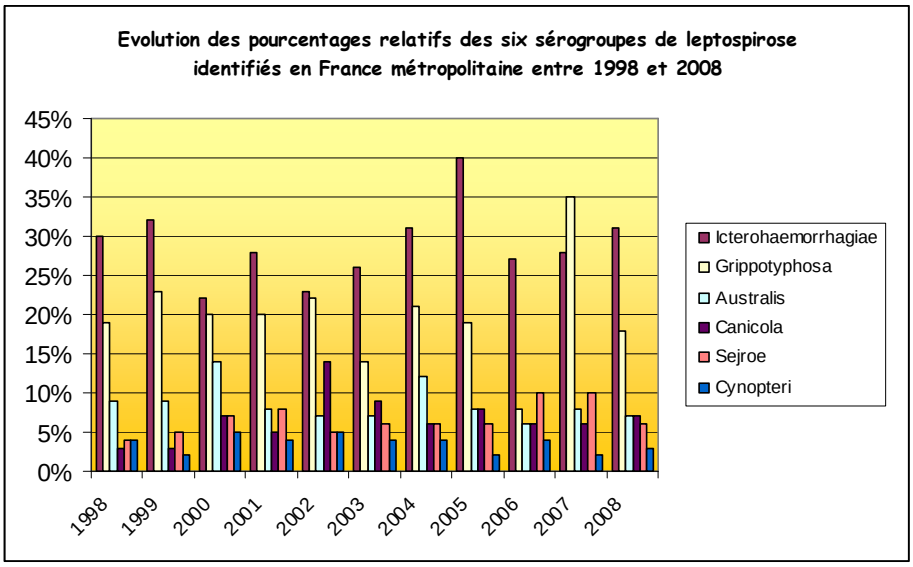


Figure 31 : Evolution du pourcentage relatif des six sérogroupes de leptospirose identifiés en France métropolitaine entre 1998 et 2008 (données issues du Centre National de Référence de la leptospirose humaine de l'Institut Pasteur, 1998 à 2008)

Le sérogroupe Icterohaemorrhagiae est le plus souvent identifié dans les cas de leptospirose humaine en France métropolitaine (figure 31). Il a représenté sur les dix dernières années entre 22% (2000) et 40% (2005) des cas. Il est suivi par les sérogroupes Grippotyphosa (8 à 35% des cas), puis Australis (6

à 14% des cas). Plus rarement, les sérogroupes Canicola, Cynopteri ou encore Sejroe sont incriminés, mais aucun d'eux ne dépasse 10% des cas annuels. Seul Canicola a représenté 14% des cas en 2002, mais ce résultat est vraisemblablement artéfactuel (Centre National de Référence de la leptospirose humaine de l'Institut Pasteur, 1998 à 2008).

Cette répartition des sérogroupes est conservée en région Rhône-Alpes, avec toutefois une prédominance plus nette du sérogroupe Icterohaemorrhagiae, sauf en 2001, où Grippotyphosa a causé davantage de cas que Icterohaemorrhagiae (respectivement 9 cas contre 6). Les données concernant Canicola en 2002 sont là encore biaisées, et ne peuvent donc être interprétées en l'état.

	Icterohaemorrhagiae	Grippotyphosa	Australis	Panama	Canicola	Sejroe
1998	4	2	3	4	0	1
1999	1	2	4	1	2	0
2000	6	5	2	0	3	0
2001	6	9	2	0	3	0
2002	9	4	4	3	12	2
2003	5	1	3	1	2	2
2004	6	2	0	1	2	0
2005	6	2	0	1	2	0
Total	43	27	18	11	26	3

Tableau 18 : Nombre de cas par sérogroupe en région Rhône-Alpes entre 1998 et 2005 (Centre National de Référence de la leptospirose humaine de l'Institut Pasteur, 1998 à 2008)

La survenue des cas est généralement concentrée sur l'été et l'automne, ce qui peut s'expliquer par l'exposition accrue aux leptospires en période estivale lors de baignades ou sports aquatiques d'une part, et par les précipitations automnales d'autre part.

III Discussion

1. Campagne de piégeage dans la Dombes : méthode d'étude, protocole et biais

➥ Population piégée, sex-ratio, état corporel

L'ensemble des résultats obtenus sur les ragondins ne s'applique qu'à notre région d'étude : la Dombes. Une forte variabilité des séroprévalences peut être en effet observée entre différentes régions, voire, entre différents sites d'étude appartenant à une même région. Il devient dès lors imprudent d'extrapoler des résultats d'une région à l'autre. De même, l'évaluation d'un risque éventuel pour l'homme et certaines espèces domestiques ne s'applique qu'à notre région d'étude.

La réussite au piégeage était variable selon les pièges et les sites de capture. Cette variabilité peut s'expliquer par plusieurs phénomènes. En premier lieu, la disposition du piège semble être un

paramètre important à considérer. Il semblerait que les pièges disposés sur les lieux de passages fréquents des ragondins soient plus à même de capturer des individus que ceux disposés en dehors de ces passages. L'accessibilité difficile ou les possibilités de fuite réduites pourraient inciter les ragondins à « éviter » certaines zones, et donc certains pièges.
Un piégeage très fructueux comme à Praillebard (19 ragondins et 1 rat musqué capturés) peut s'expliquer par un biotope particulièrement favorable à l'acclimatation des ragondins. Le volontarisme des piégeurs pourrait également jouer un rôle : la disponibilité du personnel, la fréquence du piégeage ou le changement de place des pièges-cages sont autant de facteurs pouvant créer un biais de sélection d'un site par rapport à un autre. En outre, une pression de piégeage importante entraîne un effet puits, conduisant des individus à émigrer vers les zones laissées vacantes. Il se crée ainsi un flux dynamique de dispersion, observé par exemple en Argentine dans des zones soumises à une forte pression cynégétique (Guichón & Cassini, 2005).

Ce même effet puits pourrait avoir une incidence sur le sex-ratio. En effet, ce sont essentiellement les mâles qui, arrivés à maturité sexuelle, quittent leur colonie pour s'installer sur un autre territoire. Se déplaçant davantage que les femelles, la probabilité qu'ils se fassent piéger est supérieure. Un tel phénomène pourrait expliquer le déséquilibre du sex-ratio observé dans notre étude, de 1,5 mâles pour une femelle chez le ragondin et de 3 mâles pour une femelle chez le rat musqué. Ce déséquilibre est indépendant des classes d'âge, contrairement à ce qui a pu être observé dans de précédentes études (Guichón *et al*., 2003) : généralement, le sex-ratio est déséquilibré en faveur des mâles chez les jeunes et déséquilibré en faveur des femelles chez les adultes du fait de la résistance moindre des mâles aux hivers rigoureux.
Cette tendance inhabituelle pourrait s'expliquer par la douceur exceptionnelle de l'hiver 2007-2008, qui a été le 10ème hiver le plus doux depuis le début du XXème siècle. Les moyennes de températures en janvier et février furent respectivement de 2,3°C et 1,9°C au-dessus des normales saisonnières en France. L'ensoleillement en région Rhône-Alpes fut exceptionnel, avec 333 heures d'ensoleillement à Lyon durant l'hiver contre 221 heures en moyenne entre 1991 et 2000 dans la même ville (bilan météo France de l'hiver 2007-2008, www.meteofrance.com).
Cette douceur de l'hiver 2007-2008 pourrait avoir aussi contribué à la bonne condition corporelle observée chez l'ensemble des ragondins, en favorisant une reprise précoce de la végétation aquatique au printemps et en ayant limité les pertes énergétiques dues au froid pendant l'hiver.

➦ Mise en culture et analyses de laboratoire

Nous avons rencontré au début de nos travaux des difficultés pour la mise en culture des leptospires, liées à la contamination fréquente des milieux de culture ainsi qu'à des problèmes techniques d'entretien des cultures. Les cultures de 2008 n'ont pas pu être purifiées. Le protocole alors utilisé consistait à broyer un gramme de parenchyme rénal immergé dans 9 mL de PBS stérile dans un sac à

filtre à l'aide d'un STOMACHER® 400 CIRCULATOR (Seward®, Angleterre, figure 32). Plusieurs dilutions successives appariées de l'ultrafiltrat obtenu étaient ensuite réalisées, avec une série contenant un antibiotique sélectif, et une autre en étant dénuée. La série sans antibiotique a rapidement été abandonnée car quasiment systématiquement contaminée, puis le protocole a été simplifié, en supprimant l'étape de broyage du parenchyme rénal.

Figure 32: Stomacher® 400, Seward®, France (photo personnelle, laboratoire leptospires de l'ENVL)

Ces difficultés de mise en culture des leptospires sont récurrentes dans les études et ce n'est qu'en 2001 que Michel et ses collaborateurs ont isolé avec succès et pour la première fois en France des leptospires à partir de cultures de reins (3 cultures positives sur 216).

Lorsqu'une culture est positive, une méthode d'identification de souches par agglutination utilisant un sérum hyper immun de lapin est usuellement employée au laboratoire leptospires de l'ENVL. Il est possible de recourir à d'autres techniques, sérologiques -comme l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou le CAAT (Cross Agglutinin Absorbtion Test) qui est la technique de référence pour la détermination du sérovar de la souche- ou génomiques - comme le VNTR, le RFLP, restriction fragment length polymorphism, ou le typage génétique MLST, multilocus sequence typing.

2. Séroprévalence globale chez le Ragondin et sérogroupes identifiés

La séroprévalence globale chez le ragondin, établie à partir de 40 sérums de ragondins piégés dans la Dombes, s'est élevée à 82,5 % ($IC_{95\%}$: 68,1%-91,3%) en 2008. Cette valeur est supérieure à celles mises en évidence dans de précédentes études en France, qui se situaient plutôt autour de 50%. Trapp, en 1988, avait relevé une séroprévalence de 47,3% en Vendée. Plus récemment, une étude conduite dans le Centre-Ouest de la France avait mis en exergue des séroprévalences comprises entre 16,5 et 66% (Michel *et al*., 2001), et une étude conduite par la Fédération Nationale des Groupements de Protection des Cultures (FNGPC) avait situé la séroprévalence globale en France à 49% (André-Fontaine *et al*., 2002). Les disparités interdépartementales étaient cependant importantes, et une séroprévalence de 92,9% a pu être relevée dans le département de l'Orne. Enfin, une étude de séroprévalence réalisée chez le ragondin en Nord Isère en 2003 a montré une prévalence sérologique globale de 45,9% dans cette région d'étude (Fromental, 2004).

Ces valeurs élevées de séroprévalence dans notre étude pourraient être liées à un environnement compatible avec la survie des leptospires ainsi qu'à la forte concentration de rongeurs dans la Dombes.

Le pH des étangs sur fond d'argile, comme le sont ceux de la Dombes, est proche de la neutralité (Avocat, 1975), et plutôt favorable à la survie des leptospires. De plus, compte tenu de leur faible profondeur, généralement comprise entre 60 et 75 centimètres d'eau, les étangs de la Dombes atteignent des températures élevées, supérieures à 20°C pendant 6 mois et dépassant 25°C à 30°C pendant les mois les plus chauds (Avocat, 1975). Cette douceur des températures est également favorable à la survie des leptospires dans le milieu extérieur. Enfin, la pluviométrie annuelle est comprise selon les zones en moyenne entre 800 et 1100 mm. Cette abondance relative contribue à maintenir un degré d'humidité important dans l'écosystème Dombiste (Avocat, 1975), là encore indispensable à la survie des leptospires dans le milieu extérieur.

La séroprévalence de la leptospirose chez le ragondin présente une forte variabilité selon les étangs, puisqu'elle s'échelonne entre 50% (Grand Guerrier, Petit Laurencin) et 100% (Varines, Grand Plateron), bien que certaines de ces valeurs pâtissent d'un manque de précision liée à la faiblesse des effectifs.

Le cas de l'étang de Praillebard est toutefois intéressant, puisqu' une séroprévalence de 93% a pu être établie à partir de 14 analyses de sérums. Praillebard a également présenté le plus fort taux de réactions positives par PCR (6/9). Il se trouve par ailleurs que cet étang a constitué le site le plus fructueux de capture de ragondins. Bien que le sédentarisme des ragondins soit tout relatif, le grand nombre d'individus piégés peut laisser présager d'une densité d'individus plutôt élevée. Rappelons néanmoins qu'une forte pression de piégeage entraîne un effet « puits » : les individus se déplacent des zones les plus peuplées vers celles laissées vacantes du fait du piégeage.

En dehors des paramètres environnementaux macroscopiques (présence d'ombre, d'obstacles contribuant à réduire la variabilité thermique du milieu,…) et microscopiques (qualité et paramètres physicochimiques de l'eau), la densité élevée de ragondins pourrait être à considérer pour expliquer la séropositivité élevée observée dans certains étangs.

Concernant l'analyse des sérogroupes identifiés, Australis et Icterohaemorrhagiae ont été les deux principaux sérogroupes agglutinés par les sérums de ragondins positifs. Deux sérovars –copenhageni et 19- étaient employés pour la détection du sérogroupe Icterohaemorrhagiae et trois –munchen, australis et bratislava- pour la détection du sérogroupe Icterohaemorrhagiae.

De ces deux sérogroupes, Australis a été le plus souvent mis en évidence, puisqu'il a représenté trois quarts des cas de séropositivité tandis qu'Icterohaemorrhagiae n'a agglutiné qu'un peu moins d'un quart des sérums de ragondins positifs.

Ces résultats rejoignent ceux établis à partir de précédentes études en France. Ainsi, Michel et ses collaborateurs (2001) avaient mis en évidence la prépondérance de ces deux sérogroupes à la faveur de leur étude de profils sérologiques de ragondins dans six régions du centre-ouest de la France. Dans

certains sites, la séropositivité entre Icterohaemorrhagiae et Australis n'était pas significativement différente. Dans d'autres sites, tantôt Australis, tantôt Icterohaemorrhagiae était significativement prédominant.

Plus récemment, l'enquête conduite par la Fédération Nationale des Groupements de Protection des Cultures (FNGPC) afin d'évaluer le rôle potentiel du ragondin dans l'épidémiologie des leptospiroses animales et humaines avait permis de mettre en évidence une représentation majoritaire des sérogroupes Icterohaemorragiae, Australis, Sejroe, Grippotyphosa et Panama, par ordre décroissant (André-Fontaine *et al*., 2002). Icterohaemorragiae et Australis représentaient cependant à eux seuls ⅔ des cas de séropositivité (Darras, 2004).

L'étude de Perrine Fromental (2004) sur la séroprévalence de la leptospirose des ragondins en Nord-Isère a montré dans cette zone une très forte prédominance du sérogroupe Icterohaemorrhagiae (83,5%) alors que le sérogroupe Australis n'a représenté que 1,7% des réactions positives à l'épreuve d'agglutination microscopique, précédé par les sérogroupes Sejroë (14,5%) et Panama (3,3%).

Globalement, les résultats de notre étude ne montrent donc pas de divergence sur la nature des sérogroupes identifiés dans la Dombes en 2008 avec ceux mis en évidence par ces récentes études conduites en France chez le ragondin. Seule la répartition des sérogroupes semble être variable d'une région à l'autre.

3. Résultats PCR

Bien que les cultures sur rein n'aient pu être purifiées en 2008, il a été possible de les utiliser pour la réalisation de PCR. Un tiers (33% ± 17,7%) des PCR sur culture se sont avérées positives dans notre étude. De tels résultats confirment l'existence de porteurs rénaux parmi les ragondins. Les leptospires libérés dans l'environnement à la faveur des mictions, en persistant dans l'eau, pourraient donc contaminer d'autres ragondins, voire d'autres espèces domestiques ou sauvages réceptives.

La confrontation des résultats sérologiques avec ceux obtenus par PCR sur culture montre des titres en anticorps faibles (toujours inférieurs ou égaux à 1/800) chez les ragondins positifs en PCR sur culture. En revanche, des titres élevés, atteignant 1/6400 sont observés chez des ragondins négatifs en PCR sur culture. Il apparaît donc que les animaux positifs en PCR n'ont pas forcément les titres en anticorps les plus élevés. Priya et son équipe (2007) ont pu isoler des leptospires chez des rats sérologiquement négatifs. Ce phénomène, observé chez d'autres espèces de rongeurs, ne semble d'ailleurs pas rare (Priya *et al*., 2007).

Du fait des faibles effectifs étudiés, de tels résultats peuvent être le fruit du hasard. Mais ils pourraient également étayer l'hypothèse selon laquelle les animaux réservoirs réagiraient moins que les autres lors de rencontre avec l'agent infectieux, en raison d'un état d'immunité succédant à une leptospirémie

initiale (Waitkins *et al*., 1985). En revanche, ces observations vont à l'encontre de celles de Thiermann (1981), qui avait montré que des rats infectés par le sérogroupe Icterohaemorrhagiae développaient un état de porteur chronique, excrétaient régulièrement des leptospires, et conservaient des titres élevés (compris entre 1/640 et 1/1280) en anticorps tout au long de l'état de portage.

4. Confrontation des résultats concernant les sérogroupes avec les données épidémiologiques chez l'homme et chez nos espèces domestiques

4.1 Chez nos espèces domestiques

L'étude de la répartition des sérogroupes responsables de leptospirose clinique chez les chiens en région Rhône-Alpes montre une nette prédominance du sérogroupe Australis. Icterohaemorrhagiae, Panama et Canicola sont également fréquemment identifiés. Cette répartition confirme la tendance déjà observée aux Etats-Unis, au Canada et en France (Prescott *et al*., 2002 ; Goldstein *et al.*, 2006 ; Bolin, 1996 ; Kodjo, 2007) de la diminution du nombre de leptospiroses cliniques à Canicola et Icterohaemorrhagiae depuis les années 1980. La vaccination des chiens contre les sérovars Canicola et Icterohaemorrhagiae en est probablement la cause ; elle entraîne une diminution des leptospiroses cliniques imputées à ces sérogroupes. Geneviève André-Fontaine (2002) avait mis en évidence des résultats similaires sur la base d'une analyse des sérogroupes de 397 chiens positifs. Si Icterohaemorrhagiae et Canicola demeuraient les principaux sérogroupes détectés chez les chiens positifs à la leptospirose, il est apparu que de nombreux animaux étaient effectivement infectés par des leptospires autres que Canicola et Icterohaemorrhagiae, essentiellement Australis et Sejroë.

Il convient d'apporter à nos résultats une certaine réserve, liée à la difficulté d'interprétation des résultats sérologiques du MAT. En effet, lors de réaction positive à un sérogroupe se produisent de manière quasi inéluctable des réactions croisées avec d'autres sérogroupes. Aussi, il est fréquent que des titres élevés soient observés dans deux, voire trois sérogroupes distincts. Il est alors impossible, à partir d'un seul sérum, d'imputer de manière univoque l'implication de l'un ou l'autre des sérogroupes dans la leptospirose clinique. De plus, les sérogroupes vaccinaux réagissent également parfois fortement lors d'infection par une souche sauvage, et complexifient encore l'interprétation des résultats. Pour réduire ce risque d'erreur, il est nécessaire de réaliser une cinétique d'anticorps, permettant d'évaluer dans le temps l'évolution et la défervescence des anticorps des différents sérogroupes. Cette cinétique est, à tort, très peu réalisée en pratique, car le clinicien souhaite uniquement savoir s'il est probable ou non que l'animal soit infecté. Enfin, l'interprétation des résultats doit tenir compte du statut vaccinal de l'animal. Malheureusement, celui-ci n'est pas toujours renseigné, et peut là encore conduire à des erreurs d'interprétation.

Face à ces incertitudes, il peut être intéressant de n'étudier que la prévalence des différents sérogroupes, sans préjuger de leur implication dans la maladie. Les résultats montrent alors clairement et logiquement une dominance sérologique des sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Canicola, qui sont les sérogroupes vaccinaux (Kodjo, 2007). Les sérogroupes Australis, Autumnalis et Grippotyphosa ont également une prévalence sérologique non négligeable dans l'espèce canine.

La confrontation des résultats obtenus chez le chien avec ceux issus de la campagne de piégeage 2008 chez le ragondin montre une séroprévalence importante chez ces deux espèces du sérogroupe Australis. Chez le chien, en région Rhône-Alpes, Australis semble aujourd'hui impliqué dans de nombreuses leptospiroses cliniques, tandis que chez le ragondin de la Dombes, ce sérogroupe représente 76% des cas de séropositivité. Par ailleurs, la mise en évidence de leptospires dans les urines ou par mise en culture de prélèvement rénal a permis de confirmer le portage rénal de leptospires par certains ragondins. Nous pourrions donc à ce titre envisager l'hypothèse selon laquelle les ragondins seraient susceptibles de contaminer l'environnement extérieur *via* leurs urines contaminées. Par là même, et connaissant la réceptivité et la sensibilité des chiens au sérogroupe Australis, nous pourrions émettre l'hypothèse selon laquelle la présence de ragondins dans un environnement humide pourrait constituer un facteur de risque de leptospirose pour le chien, vis-à-vis du sérogroupe Australis notamment, mais aussi vis-à-vis du sérogroupe Icterohaemorrhagiae.

Chez les bovins, les résultats sont à interpréter également avec prudence, en raison du faible nombre de suspicions cliniques. Toutefois, les résultats sérologiques sont beaucoup plus explicites chez les bovins que chez les chiens, du fait du nombre plus réduit de réactions croisées d'une part, et de l'absence de vaccination d'autre part. Le sérogroupe Sejroë apparaît clairement prédominant dans cette espèce. Aucun ragondin n'a montré de réaction positive au test de micro-agglutination pour le sérogroupe Sejroë. On ne peut donc, à partir de cette seule étude, établir une relation entre la séropositivité de certains bovins au sérogroupe Sejroë en région Rhône-Alpes et la présence de ragondins dans un environnement proche.

4.2 Chez l'homme

Les résultats sérologiques des ragondins de la Dombes montrent la trace sérologique chez cette espèce des sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Australis, sérogroupes responsables de leptospiroses cliniques chez l'homme. Le ragondin pourrait donc jouer un rôle dans l'épidémiologie de la leptospirose humaine, en participant de la contamination de l'environnement extérieur par la libération de leptospires *via* les urines lors de portage rénal. Le typage de souches mises en culture à partir de prélèvement rénal de ragondin pourrait permettre de corroborer cette hypothèse.

Conclusion

L'objectif de ce travail était d'évaluer la séroprévalence de la leptospirose chez les ragondins de la Dombes et de déterminer les sérogroupes majoritaires dans ces populations. A partir d'une confrontation des résultats de cette étude avec des données épidémiologiques humaines et animales domestiques, nous avons tenté d'évaluer l'existence d'un risque de contamination de l'homme et nos espèces domestiques à partir de l'environnement.

L'écosystème de la Dombes a été, par ses caractères physiques et biotiques, propice à l'acclimatation des ragondins, qui ont rapidement colonisé le milieu. Les résultats de notre étude montrent une séroprévalence de la leptospirose chez le Ragondin dans la Dombes en 2008 de 82,5% ($IC_{95\%}$: 68,1-91,3%), supérieure à la moyenne nationale de 50% rapportée par de précédences études. L'écosystème Dombiste, de par ses caractères physico-chimiques macro et microscopiques, pourrait donc être favorable à la survie des leptospires dans le milieu extérieur.

Les sérogroupes Australis et Icterohaemorrhagiae ont été les plus fréquemment identifiés. Etant donnée la réceptivité du ragondin, de l'homme et du chien pour ces sérogroupes, le ragondin pourrait jouer un rôle dans certaines infections leptospirosiques humaines et canines, notamment en tant qu'hôte réservoir et par la contamination du milieu par des urines souillées.

Ces résultats montrent l'importance de la mise en oeuvre de mesures de prévention, qui passent par la lutte contre la bactérie elle-même et la lutte contre les hôtes réservoirs. L'une comme l'autre sont rendues délicates par la complexité épidémiologique du cycle des leptospires d'une part, et par la multiplicité des hôtes réservoirs et la difficulté que pose leur éradication d'autre part. La lutte contre la bactérie passe par des mesures prophylactiques sanitaires et médicales. La lutte contre le ragondin doit notamment savoir tirer parti des hivers rigoureux et s'appuyer sur un piégeage assidu et une pression cynégétique.

Le Professeur responsable
De VetAgroSup, campus Vétérinaire de Lyon

Le Président de la thèse

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 26 AVR. 2010

Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales
Professeur F.N. GILLY

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON I

Vu : Le Directeur
de VetAgroSup

Par délégation
Pr F. Grain - DEVE

VetAgro Sup
Campus Vétérinaire

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1) ADLER B. and DE LA PENA MOCTEZUMA A. (2009)
Leptospira and Leptospirosis.
Veterinary Microbiology 140 (3-4) : 287-296

2) AGUDELO-FLOREZ P., RESTREPO M., and LOTERO M.A (2006)
Evaluación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de leptospirosis humana.
Biomédica 26 : 216-223

3) ALT D.P., ZUERNER R.L., and BOLIN C.A. (2001)
Evaluation of antibiotics for treatment of cattle infected with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo.
Journal of the American Veterinary Medical Association 219(5) : 636-639

4) ANDRE-FONTAINE G. (2006)
Canine leptospirosis – Do we have a problem?
Veterinary Microbiology 117 : 19-24

5) ANDRE-FONTAINE G. (2002)
Actualités sur la leptospirose canine.
Le Point Vétérinaire 225 : 26-31

6) ARTOIS M., DELAHAY R. and CHEESEMAN C. (2001)
Control of Infectious Diseases of Wildlife in Europe.
The Veterinary Journal 162 : 141-152

7) AVOCAT C. (1975)
La Dombes, milieu naturel ou milieu en équilibre ? Introduction à une éco-géographie de l'espace dombiste.
Revue de Géographie de Lyon 50(1) : 35-58

8) BARRY M., WISNEWSKI A.V., MATTHIAS M.A., INOUYE S.K., and VINETZ J. (2006)
Suburban Leptospirosis: Atypical Lymphocytosis and γ-δ T cell Response.
Clinical Infectious Diseases 43 : 1304-1307

9) AVIAT F., BLANCHARD B., MICHEL V., BLANCHET B., BRANGER C., HARS J., MANSOTTE F., BRASME L., DE CHAMPS C., BOLUT P., MONDOT P., FALIU J., ROCHEREAU S., KODJO A. and ANDRE-FONTAINE G. (2008)
Leptospira exposure in the human environment in France : A survey in feral rodents and in fresh water.
Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases 32 (6) : 463-476

10) BAL A.E., GRAVEKAMP C., HARTSKEERL R.A., DE MEZA-BREWSTER J., KORVER H., and TERPSTRA W.J. (1994)
Detection of Leptospires in Urine by PCR for Early Diagnosis of Leptospirosis.
Journal of Clinical Microbiology 32(8) : 1894-1898

11) BAVERUD V., GUNNARSSON A., OLSSON ENGVALL E., FRANZEN P. and EGENVALL A. (2009)
Leptospira seroprevalence and associations between seropositivity, clinical disease and host factors in horses.
Acta Veterinaria Scandinavica 51(15) doi : 10.1186/1751-0147-51-15

12) BERNARD A. and LEBRETON P. (2007)
Les oiseaux de la Dombes. Catalogue des espèces nicheuses, migratrices et hivernantes.
« Dombes » 27 , numéro spécial Les Oiseaux de la Dombes, une mise à jour : 39-111

13) BERTOLINO S. and GENOVESI P. (2007)
Semi-aquatic mammals introduced into Italy : case study in biological invasion.
In : GHERARDI F. (Eds), 2007 : Biological invaders in inland waters : profiles, distribution, and threats. Edition Springer, Kluwer Academic Publishers Group. Dordrecht, the Nederland : 175-191

14) BERTOLINO S., PERRONE A. and GOLA L. (2005)
Effectiveness of coypu control in small Italian wetland areas.
Wildlife Society Bulletin 33(2) : 714-720

15) BHARTI A.R., NALLY J.E., RICALDI J.N., MATTHIAS M.A., DIAZ M.M., LOVETT M.A., LEVETT P.N., GILMAN R.H., WILLLIG M.R., GOTUZZO E. and VINETZ J. (2003)
Leptospirosis : a zoonotic disease of global importance.
Lancet Infectious Disease 3: 757-771

16) BILLARD A. (1979)
L'étang de Dombes. Insertion dans le paysage agraire.
Kmae Journal 13 : 71-93

17) BO R.F., PORINI G.M., CORRIALE M.J. and ARIAS S.M. (2006)
Estudios ecológicos básicos para el manejo sustentable de *Myocastor coypus* en la Argentina.
In : Bolkovic M.L. and Ramadori D. (Eds), 2006 : Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programas de uso sustentable.
Rapport de : Dirección de Fauna Silvestre, Secretaria de Ambiante y Desarollo Sustentable, Buenos Aires, Argentine : 93-103

18) BO R.F, PALOMARES F., BELTRAN J.F., DE VILLAFANE G. and MORENO S. (1994)
Immobilization of coypus (*Myocastor coypus*) with ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride.
Journal of wildlife diseases 30(4) : 596-598

19) BOLIN C.A. (1996)
Diagnosis of Leptospirosis : A Reemerging Disease of Companion Animals.
Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal) 11(3) : 166-171

20) BRANDAO A.P., CAMARGO E.D., DA SILVA E.D., SILVA M.V., and ABRAO R.V. (1998)
Macroscopic Agglutination Test for Rapid Diagnosis of Human Leptospirosis.
Journal of Clinical Microbiology 36(11) : 3138-3142

21) BRANGER C., CHATRENET B., GAUVRIT A., AVIAT F., AUBERT A., BACH J.M. and ANDRE-FONTAINE G. (2005)
Protection against *Leptospira interrogans Sensu Lato* Challenge by DNA Immunization with the Gene Encoding Hemolysin-Associated Protein 1.
Infection and Immunity 73(7) : 4062-4069

22) BROWN K. (2008)
Leptospirosis in the family dog : a public health perspective.
Canadian Medical Association 178(4) : 399-401

23) BULACH D.M., ZUENER R.L., WILSON P., SEEMANN T., McGRATH A., CULLEN P.A, DAVIS J., JOHNSON M., KUCZEK E., ALT D.P., PETERSON-BURCH B., COPPEL R.L., ROOD J.I. and ADLER B. (2006)
Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential.
Proceedings of the National Academy of Sciences 103(39) : 14560-14565

24) CARTER J. and LEONARD B. (2002)
A review of the literature on the worldwide distribution, spread of, and efforts to eradicate the coypu (*Myocastor coypus*).
Wildlife Society Bulletin 30(1) : 162-175

25) CHABOT J. and DAVID N. (1988)
La majuscule dans la nomenclature zoologique.
Bulletin de l'Entomofaune 3 : 3-4

26) CLAY HODGIN A., MILLER D.A., and LOZANO F. (1989)
Leptospira abortion in horses.
Journal of Veterinary Diagnosis Investigation 1 : 283-287

27) COCCHI R. and RIGGA F. (2008)
Control of the coypu *Myocastor coypus* population in northern Italy and management implications. Italian Journal of Zoology 75(1) : 37-42

28) CORRIALE M.J., ARIAS S.M., BO R.F. and PORINI G. (2006)
Habitat-use patterns of the coypu *Myocastor coypus* in an urban wetland of its original distribution. Acta Theoriologica 51(3) : 295-302

29) D'ADAMO P., GUICHON L., BO R. and CASSINI M.H. (2000)
Habitat use by coypu *Myocastor coypus* in agro-systems of the Argentinean Pampas.
Acta Theorologica 45(1) : 25-33

30) DARRAS C. (2004)
Etude comparée des séroprévalences vis-à-vis des leptospires des rongeurs aquatiques et des bovins (à partir d'une enquête menée sur 26 départements).
Thèse de Médecine Vétérinaire, Nantes, France, 85 p.

31) DENOEUD F. (2003)
Analyse des génomes à la recherche de répétitions en tandem polymorphes : outils d'épidémiologie bactérienne et locus hypermutables humains.
Thèse de doctorat en sciences de l'université, Paris XI Orsay, France : 19-26

32) DONCASTER P. and JOUVENTIN P. (1989)
Les Ragondins.
La Recherche 20(211) : 754-761

33) DONCASTER C. P. and MICOL T. (1989)
Annual cycle of coypu (*Myocastor coypus*) population : male and female strategies.
The Zoological Society of London 217 : 227-240

34) DONCASTER C. P. and MICOL T. (1990)
Response by coypus to catastrophic events of cold and flooding.
Holartic Ecology 13 : 98-104

35) DUCHET-SUCHAUX M. (2008)
Invisible mais dangereux, le portage bactérien commence à révéler ses secrets.
INRA Productions Animales 21(2) : 201-212

36) ENNA ZUNINO M. y ROLANDO PIZARRO P. (2007)
Leptospirosis. Puesta al dìa.
Infectologìa al dìa 24(3) : 220-226

37) ESCAMILLA H.P., JUAN MARTINEZ M.J., MEDINA C.M. and MORALES S.E. (2007)
Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, Mexico. The Canadian Journal of Veterinary Research 71 : 314-317

38) FAINE S., ADLER B., BOLIN C. and PEROLAT P. (1999)
Leptospira and Leptospirosis, 2nd edition. Medisci, Melbourne, Australia. 272 p.

39) Fédération Nationale des Chasseurs and ONCFS (2008)
Tout le gibier de France. Atlas de la biodiversité de la faune sauvage – Les 90 espèces chassables.
Hachette pratique, Paris, France, 503 p.

40) FELIPE A.E. (2006)
El coipo (*Myocastor coypus*), un roedor sudamericano muy explotado pero poco conocido.
La Revista 23 : 1-9

41) FROMENTAL P. (2004)
Infection des rongeurs sauvages par les leptospires en Nord Isère. Etude comparée de la prévalence sérologique et du portage rénal.
Thèse de Médecine Vétérinaire, Nantes, France, 117 p.

42) GAUTIER D. (2009)
Gestion des espaces naturels : interactions entre activités humaines et faune sauvage.
Cours universitaire de l'ENVL, spécialité faune sauvage, 12 p.

43) GOLDSTEIN R.E., LIN R.C., LANGSTON C.E., SCRIVANI P.V., ERB H.N., and BARR S. (2006)
Influence of Infecting Serogroup on Clinical Features of Leptospirosis in dogs.
Journal of Veterinary Internal Medicine 20 : 489-494

44) GOSLING M.L., HUSON L. W. and ADDISON G.C. (1981)
Age estimation of coypus (*Myocastor coypus*) from eye lens weight.
Journal of Applied Ecology 17 : 641-647

45) GRAVEKAMP C., VAN DE KEMP H., FRANZEN M., CARRINGTON D., SCHOONE G.J., VAN EYS G.J.J.M., EVERARD C.O.R., HARTSKEERL R.A., and TERPSTRA W.J. (1993)
Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers.
Journal of General Microbiology 139 : 1691-1700

46) GROOMS D.L. (2006)
Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea and leptospirosis.
Theriogenology 66 : 624-628

47) GUICHON M. L., BENITEZ V. B., ABBA A., BORGNIA M. and CASSINI M.H. (2003)
Foraging behaviour of coypus *Myocastor Coypus*: Why do coypus consume aquatic plants?
Acta Oecologica 24 : 241-246

48) GUICHON M.L., BORGNIA M., FERNANDEZ RIGHI C., CASSINI G.H. and CASSINI M.H. (2003)
Social behavior and Group formation in the coypu (*Myocastor coypus*) in the argentinean pampas.
Journal of Mammalogy 84(1) : 254-262

49) GUICHON M.L. and CASSINI M. (2005)
Population parameters of indigenous populations of *Myocastor coypus* : the effect of hunting pressure.
Acta Theoriologica 50(1) : 125-132

50) GUICHON M.L., DONCASTER C.P. and CASSINI M.H. (2003)
Population structure of coypus (*Myocastor coypus*) in their region of origin and comparison with introduced populations.
The Zoological Society of London 261 : 265-272

51) HAAKE D.A., DUNDOO M., CADER R., KUBAK B.M., HARTSKEERL R.A., SEJVAR J.J. and ASHFORD D.A. (2002)
Leptospirosis, Water Sports and Chemoprophylaxis.
Clinical Infectious Disease 34 (9) : e 40-e43

52) HARDOUIN J., THYS E., JOIRIS V. and FIELDING D. (2003)
Mini-livestock breeding with indigenous species in the tropics.
Livestock Research for Rural Development 15 (4) from http://www.lrrd.org/lrrd15/4/hard154.htm

53) HARKIN K.R., ROCHETAU Y.M., SULLIVAN J.T., PURVIS T.J. and 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 dog.
Journal of the American Veterinary Medical Association 222 (9) : 1230-1233

54) HASHIMOTO V.Y., GONCALVES D.D., DA SILVA F.G., DE OLIVEIRA R.C., ALVES L.A., REICHMAN P., MULLER E.E. and FREITAS J.C. (2007)
Occurrence of antibodies against *Leptospira spp*. in horses of the urban area of Londrina, Parana.
Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 49(5) : 327-330

55) HENRY R.A., JOHNSON R.C., BOHLOOL B.B., and SCHIMDT E.L. (1971)
Detection of Leptospira in Soil an Water by Immunofluorescence Staining.
Applied Microbiology 21(5) : 953-956

56) HOWERTH E. W., REEVES A. J., McELVEEN M.R., and AUSTIN F. W. (1994)
Survey for Selected Diseases in Nutria (*Myocastor coypus*) from Louisiana.
Journal of Wildlife Diseases 30(3) : 450-453

57) KINGSCOTE B. (1985)
Leptospirosis in Sheep in Western Canada.
Canadian Veterinary Journal 26 : 164-168

58) KLIMPEL G.R., MATTHIAS M.A., and VINETZ J. (2003)
Leptospira interrogans Activation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells : Preferential Expansion of TCR$\gamma\delta^+$ T Cells vs TCR $\alpha\beta$+ T Cells.
The journal of Immunology 171 : 1447-1455

59) KODJO A. (2007)
Rapport de l'activité « diagnostic leptospirose » Juillet 2007-Septembre 2007 du laboratoire de diagnostic bactériologique de l'ENV Lyon, 17p.

60) KOIZUMI N. and WATANABE H. (2005)
Leptospirosis vaccines : Past, Present, and Future.
Journal of Postgraduate Medicine 51 : 210-214

61) LARAS K., VAN C.B., BOUNLU K., THI KIM TIEN N., OLSON J.G., THONGCHANH S., VAN ANH T.N., KIMI LOAN H., PUNJABI N., KHIEM H.B., SAM AN U., INSISIENGMAY S., WATTS D.M., BEECHAM H.J., and CORWIN A.L. (2002)
The Importance of Leptospirosis in Southern Asia.
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 67(3) : 278-286

62) LARSSON C.E., SANTA ROSA C.A., LARSSON M.H., BIRGEL E.H., FERNANDES W.R., PAIM G.V. (1985)
Laboratory and clinical features of experimental feline leptospirosis.
International Journal of Zoonosis 12 : 111-119

63) LAURIE E.M.O. (1946)
The Coypu (*Myocastor coypus*) in Great Britain.
Journal of Animal Ecology 15(1) : 22-34

64) LEGRAND E. (2007)
La leptospirose bovine.
Thèse de médecine vétérinaire, Maisons-Alfort, France, 103 p.

65) LE LOUARN H. and QUERE J.P. (2003)
Les rongeurs de France, Faunistique et Biologie, 2nde édition revue et augmentée.
INRA Editions, Paris, France, 256 p.

66) LEVETT P.N. (2004)
Leptospirosis : A forgotten zoonosis ?
Clinical and Applied Immunology Reviews 4 : 435-448

67) LEVETT P.N. (2001)
Leptospirosis.
Clinical Microbiology Reviews 14 (2) : 296-326

68) LILENBAUM W., VARGES R., MEDEIROS L., CORDEIRO A.G., CAVALCANTI A., SOUZA G.N., RICHT ZENHAIN L. and VASCONCELLOS S.A. (2008)
Risk factors associated with leptospirosis in dairy goats under tropical conditions in Brazil.
Research in Veterinary Science 84 : 14-17

69) LILENBAUM W., MORAIS Z.M., GONCALES A.P., SOUZA G., RICHTZENHAIN L., and VASCONCELLOS S.A. (2007)
First isolation of leptospires from dary goats in Brazil.
Brazilian Journal of Microbiology 38 : 507-510

70) LILENBAUM W. and SOUZA G.N. (2003)
Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil.
Research in Veterinary Science 75(3) : 249-251

71) LINGAPPA J., KUFFNER T., TAPPERO J., MIZE A., KAISER R. and McNICHOLL J. (2004)
HLA-DQ6 and ingestion of contaminated water : possible gene-environment interaction in an outbreak of Leptospirosis.
Genes and Immunity 5 : 197-202

72) LITTLE T.W., HATHAWAY S.C., BROUGHTON E.S., and SEAWRIGHT D. (1992)
Control of *Leptospira hardjo* infection in beef cattle by whole-herd vaccination.
The Veterinary Record 131(5) : 90-92

73) LOPEZ E. and WARAH R. (2007)
Tendances urbaines et bidonvilles au XXIème siècle.
In : Le rapport 2006/2007 sur l'état des villes dans le monde, ONU-HABITAT, New York, New Jersey

74) LUCIANI O. (2004)
Réceptivité et sensibilité du chat aux leptospires.
Thèse de médecine vétérinaire, Nantes, France, 123 p.

75) MAJED Z., BELLENGER E., POSTIC D., POURCEL C., BARANTON G. and PICARDEAU M. (2005)
Identification of Variable-Number Tandem-Repeat Loci in *Leptospira interrogans Sensu Stricto*.
Journal of Clinical Microbiology 43(2) : 539-545

76) MAURIN H. (1997)
L'Homme et les mammifères de France métropolitaine : évolution historique et introductions d'espèces dans les milieux humides et aquatiques.
Bulletin Français de Pêche et de Pisciculture 344/345 : 117-132

77) MAY Brian (2009)
Bidonvilles – Là aussi les droits humains existent.
Amnesty International mai 2009 ACT 35/004/2009

78) McBRIDE A.J.A., ATHANAZIO D.A., REIS M.G. and KO A.I. (2005)
Leptospirosis.
Current Opinion in Infectious Disease 18 : 376-386

79) MENARD A., AGOULON A., L'HOSTIS M., RONDELAUD D., COLLARD S. and CHAUVIN A. (2001)
Myocastor coypus as a reservoir host of *Fasciola hepatica* in France.
Veterinary Research 32 : 499-508

80) MERIEN F., AMOURIAUX P., PEROLAT P., BARANTON G. and SAINT GIRONS I. (1992)
Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira spp*. in Clinical Samples.
Journal of Clinical Microbiology 30(9) : 2219-2224

81) MERIEN F. and BERLIOZ-ARTHAUD A. (2005)
La Leptospirose, une Zoonose Sous Surveillance en Nouvelle-Calédonie et dans le Pacifique.
Revue Française des Laboratoires 374 : 1-6

82) MERIEN F., BARANTON G. and PEROLAT P. (1997)
Invasion of Vero Cells and Induction of Apoptosis in Macrophages by Pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence.
Infection and Immunity 65(2) : 729-738

83) MEYER J. (2006)
Field Methods for Studying Nutria.
Wildlife Society Bulletin 34(3) : 850-852

84) MEYER J., KLEMANN N. and HALLE S. (2005)
Diurnal activity patterns of coypu in a urban habitat.
Acta Theriologica 50(2) : 207-211

85) MICHEL V., RUVOEN-CLOUET N., MENARD A., SONRIER C., FILLONNEAU C., RAKOTOVAO F., GANIERE J.P. and ANDRE-FONTAINE G. (2001)
Role of the coypu (*Myocastor coypus*) in the epidemiology of leptospirosis in domestic animals and humans in France.
European Journal of Epidemiology 17 : 111-121

86) MICHEL V., BRANGER C. and ANDRE-FONTAINE G. (2002)
Epidemiology of leptospirosis.
Revista Cubana de Medicina Tropical 54(1) : 7-10

87) MORGAN J, BORNSTEIN S.L., KARPATI A.M., BRUCE M., BOLIN C.A., AUSTIN C.C., WOODS C.W., LINGAPPA J., LANGKOP C., BELINDA D., GRAHAM D.R., PROCTOR M., ASHFORD D.A., BAJANI M., BRAGG S.L., SHUTT K., PERKINS B.A. and TAPPERO J.W. (2002)
Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and Community Residents in Springfield, Illinois, 1998.
Clinical Infectious Disease 34 : 1593-1599

88) MOUGENOT C. and ROUSSEL L. (2006)
Peut-on vivre avec le ragondin? Les représentations sociales reliées à un animal envahissant.
Natures Sciences Sociétés 14 : 22-31

89) MOORE G.E., GUPTILL L.F., GLICKMAN N.W, CALDANERO R.J., AUCOIN D. and GLICKMAN L.T. (2006)
Canine Leptospirosis, United States, 2002-2004.
Emerging Infectious Diseases 12 (3) : 501-503

90) MOUTOU F. and ARTOIS M. (2001)
Les mammifères sauvages réservoirs potentiels de zoonoses.
Médecine et Maladies Infectieuses 31 supplément 2 : 159-167

91) MOUTOU F. (1997)
Mammifères aquatiques et semi-aquatiques introduits en France. Risques et conséquences.
Bulletin Français de Pêche et de Pisciculture 344/345 : 133-139

92) MURRAY G.L., SRIKRAM A., HOKE D.E., WUNDER Jr E.A., HENRY R., LO M., ZHANG K., SERMSWAN R.W., KO A.I. and ADLER B. (2009)
Major Surface Protein LipL32 Is Not Required for Either Acute or Chronic Infection with *Leptospira interrogans.*
Infection and Immunity 77(3) : 952-958

93) NATIONS UNIES (2003)
The challenge of slums. Global report on human settlements 2003.
Earthscan Publications Ltd, London and Sterling, United Kingdom, 345p.

94) NIMIS R. (1990)
Contribution à l'étude du Ragondin *Myocastor Coypus* (Molina).
Thèse de Médecine Vétérinaire, Toulouse, France, 122p.

95) PAPPAS G., PAPADIMITRIOU P., SIOZOPOULOU V., CHRISTOU L. and AKRITIDIS N. (2008)
The globalisation of leptospirosis : worlwide incidence trends.
International Journal of Infectious Diseases 12 : 351-357

96) PERRIN A. (2009)
Mise au point d'une technique de PCR quantitative pour la détection et la quantification des leptospires pathogènes en milieu aquatique.
Mémoire de Master de Microbiologie et Ecologie, Lyon, France, 14p.

97) 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., JONHSON M.J., BOURSAUX-EUDE C., SEEMAN T., ROUY Z., COPPEL R.L., ROOD J.I., LAJUS A., DAVIES J.K., MEDIGUE C. and ADLER B. (2008a)
Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the Evolution of Leptospira and the Pathogenesis of Leptospirosis.
PLoS ONE 3(2) : e1607. doi : 10.1371/journal.pone.0001607

98) PICARDEAU M., CORNET M., MOREL V., SERTOUR N., CHAUMET D., BRACHET D., and BOURHY P. (2008b)
Impact du changement de nomenclature médicale sur le diagnostic et la surveillance de la leptospirose en France.
Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire de l'Institut de Veille Sanitaire : 329-331

99) PINNE M & HAAKE D.A. (2009)
A comprehensive Approach to Identification of Surface-Exposed, Outer Membrane-Spanning Proteins of *Leptospira interrogans*.
PLoS ONE 4(6) : e6071. doi:10.1371/journal.pone.0006071

100) PORINI G., BO R.F., MOGGIA L., FERNANDEZ R., OSINALDE J., VILCHES A., CAO G., BUSATTO M., SANZ M.L., ROZATTI J.C. and QUIANI R. (2002)
Estimaciones de densidad y uso de habitat de *Myocastor Coypus* en areas de humedales de Argentina.
Rapport de : Direccion Nacional de Flora y Fauna Silvestres, Secrataria de desarollo sustentable y Politica ambiantal, 16 p.

101) PRESCOTT J.F., McEWEN B., TAYLOR J., WOODS J.P., ABRAMS-OGG A. and WILCOCK B. (2002)
Resurgence of leptospirosis in dogs in Ontario : recent findings.
Canine Veterinary Journal 43 : 955-961

102) PRIGIONI C., BALESTRIERI A. and REMONTI L. (2005)
Food habits of the coypu, *Myocastor coypus*, and its impact on aquatic vegetation in a freshwater habitat of NW Italy.
Folia Zoology 54(3) : 269-277

103) PRIYA C.G., HOOGENDIJK K.T., RATHINAM S.R., AHMED A., MUTHUKKARUPPAN V.R. and HARTSKEEN R.A. (2007)
Field rats form a major infection source of leptospirosis in and around Madurai, India.
Journal of Postgraduate Medicine 53(4) : 236-240

104) QUARESMA BOMFIM M.R., BARBOSA-STANCIOLI E.F. and KOURY M.C. (2008)
Detection of pathogenic leptospires in urine from naturally infected cattle by nested PCR.
The Veterinary Journal 178 : 251-256

105) QUARESMA BOMFIM M.R. and KOURY M.C. (2006)
Evaluation of LSSP-PCR for identification of *Leptospira spp*. in urine samples of cattle with clinical suspicion of leptospirosis.
Veterinary Microbiology 118 : 278-288

106) QUARESMA BOMFIM M.R., KO A. and KOURY M.C. (2005)
Evaluation of the recombinant LipL32 in enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of bovine leptospirosis.
Veterinary Microbiology 109 : 89-94

107) RAFASQUINO, M. E., RAMOS, P. A., ALONSO, C. R. and IDIART, J. R. (1998)
Estudios macro y microscópico del saco anal del coipo (*Myocastor coypus*).
Revista Chiliana de Anatomìa 16(2) : 205-210

108) REGGIANI G., BOITANI L. and DE STEFANO R. (1995)
Population dynamics and regulation in the coypu *Myocastor coypus* in Central Italy.
Echography 18(2) : 138-146

109) REGGIANI G., BOITANI L., D'ANTONI S. and DE STEFANO R. (1993)
Biology and Control of the Coypu in the Mediterranean area.
Supplemento alle Richerche de Biologia della Selvaggina XXI : 67-100

110) RISTOW P. (2007)
La leptospirose : les défis actuels d'une ancienne maladie.
Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France 160(4) : 267-278

111) RISTOW P., BOURHY P., KERNEIS S., SCHMITT C., PREVOST M.-C, LILENBAUM W., and PICARDEAU M. (2008)
Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires.
Microbiology 154 : 1309-1317

112) ROTH E.A., ADAMS W.V., SANFORD G.E., GREERS B. and MAYEUX P. (1962)
Leptospira paidjan (bataviae serogroup) isolated from Nutria in Louisiana.
Public Health Report 77(7) : 583-588

113) SALAUN L., MERIEN F., GURIANOVA S ; BARANTON G and PICARDEAU M. (2006)
Application of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Molecular Typing of the Agent of Leptospirosis.
Journal of Clinical Microbiology 44(11) : 3954-3962

114) SEGURA E.R., GANOZA C.A., CAMPOS K., RICALDI J.N., TORRES S., SILVA H., CESPEDES M.J., MATTHIAS M.A., SWANCUTT M.A., LINAN R.L., GOTUZZO E., GUERRA H., GILMAN R.H. and VINETZ J.M. (2005)
Clinical spectrum of Pulmonry Involvement in Leptospirosis in a Region of Endemicity with Quantification of Leptospiral Burden.
Clinical Infectious Diseases 40(3) : 343-351

115) SLACK A.T., DOHNT M.F., SYMONDS M.L. and SMYTHE L.D. (2005)
Development of a Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) for *Leptospira interrogans* serovar australis isolates from Far North Queensland, Australia.
Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 4(10)

116) SMITH D.L.T. and PERRY D.A. (1952)
Bovine leptospirosis.
Canadian Journal of Comparative Medicine 16(8) : 294-299

117) SMYTHE L.D., SMITH I.L., DOHNT M.F., SYMONDS M.L., BARNETT L.J., and McKAY D.B. (2002)
A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira spp*.
BMC infectious disease 2(13), from http://www.biomedcentral.com/1471-2334/2/13

118) SRIVASTASVA S.K. (2006)
Prospects of developing leptospiral vaccines for animals.
Indian Journal of Medical Microbiology 24(4) : 331-336

119) TARP D. (1988)
Les petits mammifères sauvages, source de leptospirose.
Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties 7(4) : 885-892

120) TERPSTRA W.J., ADLER B., ANANYNA J., ANDRE-FONTAINE G., ANSDELL V. and ASHFORD D.A. (2003)
Human Leptospirosis : Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control.
World Health Organization, Genève, Suisse, 109p.

121) THAIPADUNGPANIT J., WUTHIEKANUN V., CHIERAKUL W., SMYTHE L.D., PETKANCHANAPONG W., LIMPAIBOON R., APIWATANAPORN A., SLACK A.T., SUPUTTAMONGKOL Y., WHITE N.J., FEIL E.J., DAY N.P.J. and PEACOCK S. (2007)
A dominant clone of *Leptospira interrogans* Associated with an Outbreak of Human Leptospirosis in Thailand.
PLoS Negected Tropical Diseases 1(1) : e56. doi : 10.1371/journal.pntd.0000056

122) THIERMANN A.B. (1981)
The Norway Rat as a Selective Chronic Carrier of *Leptospira icterohaemorrhagiae*.
Journal of Wildlife Diseases 17(1) : 39-43

123) TOMA B. and THIRY E. (2003)
Qu'est-ce qu'une maladie émergente?
Epidémiologie et santé animale 44 : 1-11

124) TOMA B., DUFOUR B., SANAA M., BENET J.J., SHAW A., MOUTOU F. and LOUZA F. (2001)
Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures.
AEEMA, Maisons-Alfort, France, 696p.

125) VALVERDE M.A., RAMIREZ J.M., MONTES DE OCA L.G., GORIS M.G.A., AHMED N. and HARTSKEERL R.A (2008)
Arenal, a new *Leptospira* serovar of serogroupe Javanica, isolated from a patient in Costa Rica.
Infection, Genetics and Evolution 8(5) : 529-533

126) VAN DE MAELE I., CLAUS A., HAESEBROUCK F. and DAMINET S. (2008)
Leptospirosis in dogs : a review with emphasis on clinical aspects.
Veterinary Record 163 : 409-413

127) VALLANCE M., POLY J.P. and Collectif ONCFS (2007)
Faune sauvage de France : Biologie, habitats et gestion.
Editions Le Gerfaut, Aix-en-provence, France : 43-48

128) VIJAYACHARI P., SUGUNAN A.P. and SHRIRAM A.N. (2008)
Leptospirosis : an emerging global public health problem.
Journal of Biosciences 33(4) : 557-569

129) VINETZ J.M., GLASS G.E., FLEXNER C.E., MUELLER P. and KASLOW D.C. (1996)
Sporadic Urban Leptospirosis.
Annals of Internal Medicine 125(10) : 794-798

130) WAITKINS S.A., WANYANGU S. and PALMER M. (1985)
The coypu as a rodent reservoir of *Leptospira* infection in Great-Britain.
Journal of Hygiene 95 : 409-417

131) WAITKINS S.A. (1986)
Leptospirosis as an occupational disease.
British Journal of Industrial Medicine 43 : 721-725

132) WANG Z., JIN L. and WEGRZYN A. (2007)
Leptospirosis vaccines.
Microbial Cell Factories 6(39). doi : 10.1186/1475-2859-6-39

133) WANYANGU S.W., WAITKINS S.A. and PALMER M.F. (1986)
Isolation of leptospires from a one week dead coypu (*Myocastor coypus* Molina).
International Journal of Zoo and Wildlife Medicine 13 : 236-240

134) WILSON, D.E. and REEDER, D.A.M. (1993)
Mammal Species of the World. A taxonomic and Geographic Reference. (second edition).
Smithsonian Institution Press, Washington D.C., 1206p.

135) WORLD HEALTH ORGANISATION (1999)
Leptospirosis worldwide, 1999.
Weekly Epidemiology Record 74 : 237-242

136) WOODS C.A., CONTRERAS L., WILLNER-CHAPMAN G. and WHIDDEN H.P. (1992)
Myocastor coypus.
Mammalian Species 398: 1-8

REFERENCES PROVENANT DE PAGES EN LIGNE

137) ALLABY M. (1999) (Page consultée le 14 mars 2009)
"Hystricomorpha." A Dictionary of Zoology.
In : encyclopedia.com, [En ligne].
Adresse URL : http://www.encyclopedia.com/doc/1O8-Hystricomorpha.html.

138) Anonyme (2009) (Page consultée le 9 mai 2009)
Les pièges. Union Nationale des Associations de Piégeurs Agréés de France.
In : unapaf.com , [En ligne].
Adresse URL : http://www.unapaf.com/pièges.php

139) Anonyme (2008a) (Page consultée le 3 janvier 2009)
Bilan de captures de ragondins et de rats musqués. Assemblée générale 2008 de l'Association Des Piégeurs de l'Ain.
In : piegeurs.org, [En ligne].
AdresseURL : http://www.piegeurs.org/spip.php?article78

140) Anonyme (2008b) (Page consultée le 4 juillet 2008)
La leptospirose. Institut Pasteur.
In : pasteur.fr, [En ligne].
Adresse URL : http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-00000j-0hd/presse/fiches-sur-les-maladies-infectieuses/leptospirose

141) Anonyme (2006) (Page consultée le 22 septembre 2008)
Guide EFICATT : *Leptospira interrogans*, agent de la leptospirose. INRS
In : inrs.fr, [En ligne].
Adresse URL : http://www.inrs.fr/htm/leptospira_interrogans_-_agent_de_la_leptospirose.html

142) Anonyme (2003) (Page consultée le 15 avril 2009)
Les dégâts du gibier. Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage.
In : oncfs.gouv.fr, [En ligne].
Adresse URL : http://www.oncfs.gouv.fr/degats/index.php

143) EUZÉBY J.P. (2008)
Définitions d'une génomospecies et d'une espèces bactérienne.
In : Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, bactero.cict.fr [En ligne].
Adresse URL : http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/genomospecies.html

144) DOMONKOS V. (2009) (Page consultée le 6 mai 2008)
Nutria (*Myocastor coypus*).
In : Illinois - Indiana Sea Grant, [En ligne].
Adresse URL : http://www.iisgcp.org/EXOTICSP/nutria.html

145) HILL A. (2009) (Page consultée le 5 juillet 2008)
Mammals and other Wildlife in South America (avec taxinomie mise à jour).
In : focusonnature.com, [En ligne].
Adresse URL : http://www.Focusonnature.com/SouthAmericaMammalList.htm

REFERENCES REGLEMENTAIRES ET INFRA-REGLEMENTAIRES

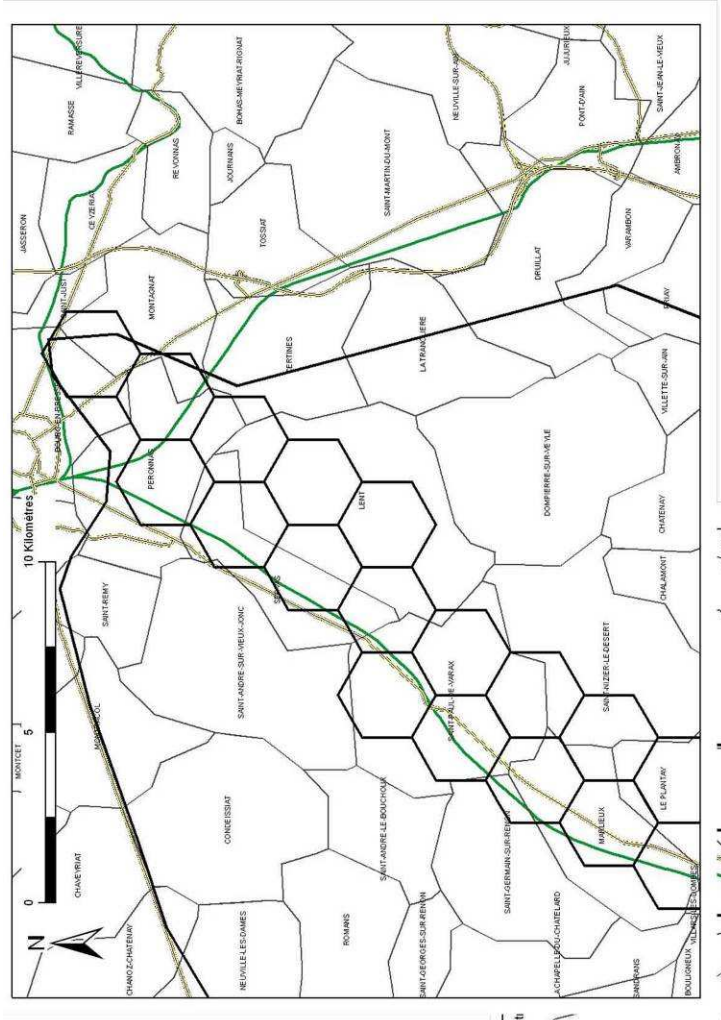
➦ Arrêté ministériel du 29 janvier 2007 fixant les dispositions relatives au piégeage des animaux classés nuisibles en application de l'article L427-8 du code de l'environnement. (NOR : DEVN0700128A)
Journal Officiel de la République Française du 18 avril 2007, texte 31 sur 100.

➦ Arrêté ministériel du 20 septembre 2005 modifiant l'arrêté du 3 avril 1985 fixant la Nomenclature des actes de biologie médicale. (NOR : SANS0523407A)
Journal Officiel de la République Française du 11 octobre 2005, texte 23 sur 100.

➦ Arrêté préfectoral relatif aux modalités de destruction à tir des animaux classés nuisibles pour la période du 1er juillet 2008 au 30 juin 2009 dans le département de l'Ain.
Direction Départementale de l'Agriculture et de la Forêt de l'Ain
Signé le 30 juin 2008 à Bourg en Bresse (Ain)
In : Ain.pref.gouv.fr, [En ligne].
Adresse URL:
http://www.ain.pref.gouv.fr/sections/actions_de_letat/environnement_deve/chasse/arretes_concernant _l/view

➦ Arrêté préfectoral fixant la liste des animaux classés nuisibles en application de l'article L427-8 du code de l'environnement pour la période du 1er juillet 2008 au 30 juin 2009 dans le département de l'Ain.
Direction Départementale de l'Agriculture et de la Forêt de l'Ain
Signé le 30 juin 2008 à Bourg en Bresse (Ain)
In : Ain.pref.gouv.fr, [En ligne].
Adresse URL:
http://www.ain.pref.gouv.fr/sections/actions_de_letat/environnement_deve/chasse/arretes_concernant _l/view

ANNEXE 1 : zone d’étude



ANNEXE 2

Enquête Ragondins 2008
QUESTIONNAIRE PIECE D'EAU

1) Rappel

- Nom piégeur :
- Nom site :

2) Caractéristiques générales

- Nom :
- Type :
  □ Etang
  Si Oui, préciser :
  - Taille (en ha) : ____
  - Taille des berges (en km) : ____

  □ Rivière
  □ Marais
  □ Autre
  Si Autre type, préciser l'Autre type : _____
- Date de dernière mise en eau (mm/aaaa) : __/____
- Débit (en $m.s^{-1}$) :____

3) Environnement autour de la pièce d'eau

- Présence de routes :
  □ Non □ Chemin de terre □ Voie communale
  □ Voie départementale □ Voie nationale ou supérieure
- Présence de Forêt : □ Oui □ Non
- Présence de Cultures : □ Oui □ Non
- Habitat humain : □ Absence □ Dispersé □ Dense
- Présence Animaux domestiques :
  □Oui □Non
  Si Oui, espèces présentes sur le site [1] :
  □ Equins □ Bovins □ Ovins □ Volailles □ Autres
  Si Autres espèces domestiques, les nommer :
  _____
- Présence Autres Espèces animales sauvages sur / autour de la pièce d'eau[2] :
  □Oui □Non
  Si Oui, espèces sauvages présentes sur le site [3] :
  □ Rongeurs □ Sangliers □ Daims □ Autres
  Si Autres espèces sauvages, les nommer:
  _____
- Piégeage :
  - Nombre de nuit- piège par an : _____
  - Nombre de rongeurs piégés par an :_____
  - Estimation de la quantité de ragondins en 2008 :
    □< 10 □ [10-20] □ > 20 □ Autre : ____ **Commentaire libre :**

[1] Plusieurs choix possibles
[2] Autres espèces susceptibles d'être réservoirs : rongeurs, sangliers, daims
[3] Plusieurs choix possibles

ANNEXE 3

Enquête Ragondins 2008
CARACTERISTIQUES SITE

1) Zone

- ☐ Dombes
- ☐ Vallée de l'Ognon
- ☐ Isère

2) Piégeur *(ne remplir que le nom si déjà saisi)*

- Nom :
- Téléphone Fixe :
- Téléphone Portable :
- Adresse :
- Code Postal :
- Commune :
- Adresse email :
- Nombre de sites gérés sur la zone :

3) Site

- Nom du site / propriété :
- Commune :
- Code Postal :
- Utilisation du site (plusieurs choix possibles) :
  - ☐ Base de loisirs
  - ☐ Parc / réserve naturelle,
    Si Oui, préciser Statut de Protection : _____
  - ☐ Zone de chasse ou de pêche
  - ☐ Pisciculture
  - ☐ Zone ouverte au public
  - ☐ Autre,
    Si Oui, préciser l'Autre type : _____
- Espèces de rongeurs les plus fréquentes sur le site[4] :
  _____
- Populations de Ragondin sur le site :
  - Date d'arrivée sur le site (année) : _____
  - Date de début du plan de gestion (année) : _____

Commentaire libre :

[4] Nom latin par ordre décroissant. Par ex. *Myocastor coypus* > *Ondatra zibethicus* >*Rattus norvegicus* …

ANNEXE 4

Enquête Ragondins 2008
QUESTIONNAIRE PIEGE

Identifiant piège[5] : _____

1) Rappels

- Date : _____/ _____/ 2008
- Nom piégeur :
- Nom du site :
- Nom de la pièce d'eau :
- Identifiant capture : _____

2) Géoréférencement piège (Coordonnées (WGS 84 décimal)) :

- **X =**
- **Y =**
- **Z =**

3) Prélèvements

- Prélèvement d'eau :

  ☐ Oui ☐ Non

  Si Oui, noter :
  Température de l'eau (°C) : _____
  Identifiant prélèvement eau[6] : _____

- Capture d'un animal :

  ☐ Oui ☐ Non

Si Oui,
Code journalier A/_____
Remplir le questionnaire ANIMAL

Si Non, questionnaire terminé.

[5] Incrémenté automatiquement dans la base de données
[6] Format aammjj/E n° /initiales du préleveur

ANNEXE 5

Enquête Ragondins 2008
QUESTIONNAIRE SEANCE DE CAPTURE

Identifiant Séance de Capture : _____

1) Généralités

- Date : / / 2008
- Nom du piégeur (rappel) :
- Nom de la pièce d'eau (rappel) :
- Nombre de pièges posés :

2) Météorologie le jour de la séance

- Couverture nuageuse :
  ☐ Ensoleillé ☐ Nuageux ☐ Pluvieux
- Précipitations au cours des dernières 24hres :
  ☐ Oui ☐ Non
  Si Oui, intensité des précipitations :
  ☐ Averses éparses
  ☐ Averses
  ☐ Pluies continues
  ☐ Inondations

3) Hauteur en Eau de la Pièce d'Eau

☐ A sec ☐ Basse ☐ Normale ☐ Haute

4) Animaux capturés pendant la séance

Espèce	Oui	Préciser le nombre	Non
Myocastor coypus	☐		☐
Rattus norvegicus	☐		☐
Ondatra zibethicus	☐		☐
Autres	☐		☐

Si présence d'autres animaux, préciser lesquels

Commentaire libre :

ANNEXE 6

Enquête Ragondins 2008
QUESTIONNAIRE ANIMAL

1) **Rappels**
Date capture : _____/ _____/ 2008
Nom Site :_____
Nom Pièce d'eau : _____
Identifiant Séance de capture : _____
Identifiant Piège : _____
Coordonnées WGS84 décimales : → X : → Y : → Z :

2) **Animal capturé : mesures biométriques**
- Identifiant de l'animal[7] : _____
- Espèce[8] : _____
- Condition corporelle : ☐ Cachectique ☐ Maigre ☐Bonne
- Poids (en g) : _____
- Taille de l'animal (en mm)[9] : _____
- Taille pied postérieur (en mm)[10] : _____
- Taille avant bras (en mm)[11] : _____

3) **Autopsie**
- Sexe : ☐ Mâle ☐ Femelle
- Maturité sexuelle : ☐ Oui ☐ Non
- Statut reproducteur Femelle mature : ☐ RAS ☐ Gravide ☐ A déjà porté
- Détermination de l'âge :
  - Poids cristallin sec Œil 1 (mg) : _____
  - Poids cristallin sec Œil 2 (mg) : _____
  - Age (mois)[12] : _____
- Lésions observées : Oui ☐ Non ☐ **Si Oui , compléter tableau**
  Localisation des lésions (plusieurs choix possibles) :

Organes touchés	Type de Lésions
Reins	
Foie	
TD	
Autre :	
Autre :	

Rappel identifiant animal : _____

4) **Prélèvements**[13]

Prélèvements sur Animal	Nombre d'Echantillons
Sang sur tube sec	
Bout de queue	
Rein	
Intestin	
Foie	
Nœud lymphatique mésentérique	
Autre :	

Commentaire libre :

[7] Format aammjj/ A n° / initiales du préleveur
[8] Indiquer le nom latin
[9] Taille du bout du nez à la base de la queue
[10] Taille depuis le talon jusqu'à la griffe du doigt le plus long
[11] Taille depuis la pointe du coude jusqu'à l'articulation du carpe
[12] D'après la formule de Gosling et al.
[13] Nombre : marquer 0 pour aucun prélèvement

NOM PRENOM : CROIZIER Pierre

TITRE : Rôle des ragondins dans l'épidémiologie des leptospiroses en zone humide : exemple de la Dombes.

Thèse Vétérinaire : Lyon *, le 18 mai 2010*

RESUME : La leptospirose est une zoonose en forte recrudescence dans le monde. Maladie ubiquiste et d'épidémiologie complexe, la leptospirose fait intervenir de nombreux hôtes réservoirs.
Notre étude montre que la séroprévalence de la leptospirose chez le Ragondin de la Dombes en 2008 est de 82,5% ($IC_{95\%}$: 68,1-91,3% ; n=40). Les principaux sérogroupes identifiés sont Australis (76%) et Icterohaemorrhagiae (21%). Un portage rénal a été mis en évidence chez 9 animaux (33%, n=27).
Ces résultats soulignent l'impact sanitaire qu'est susceptible de jouer le Ragondin dans la transmission de la leptospirose à l'homme et aux espèces domestiques.

MOTS CLES :

- Leptospirose
- Ragondin
- Zone humide
- Dombes
- Zoonose
- Coypu
- Leptospirosis
- Wetland

JURY :

Président : Monsieur le Professeur GHARIB
1er Assesseur : Madame le Professeur LEBLOND
2ème Assesseur : Monsieur le Professeur KODJO

DATE DE SOUTENANCE : 18 mai 2010

ADRESSE DE L'AUTEUR :

15, place Louis Pradel
69001 LYON