

LA LEPTOSPIROSE : LES DÉFIS ACTUELS D'UNE ANCIENNE MALADIE

LEPTOSPIROSIS: CURRENT CHALLENGES OF AN OLD DISEASE

Par Paula RISTOW⁽¹⁾⁽²⁾
(mémoire présenté le 26 avril 2007)

RÉSUMÉ

La leptospirose, maladie infectieuse atteignant l'homme et les animaux, est considérée comme la zoonose la plus répandue dans le monde ; chaque année, elle est responsable de graves épidémies dans les pays tropicaux et en voie de développement. Son agent causal, *Leptospira interrogans*, est un spirochète de forme hélicoïdale, extrêmement mobile. Le tableau clinique varie du fait de la diversité du genre *Leptospira* et d'une épidémiologie complexe. Les leptospiroses animales touchent plusieurs espèces de mammifères qui développent majoritairement des formes chroniques de la maladie et deviennent ainsi des réservoirs de l'agent infectieux. La forme humaine ou maladie de Weil, dont le taux de mortalité est élevé, est provoquée par les leptospires du sérotype Icterohaemorrhagiae. La vaccination de l'homme et des animaux a des effets limités car les vaccins utilisés sont spécifiques du sérotype et n'offrent qu'une protection de courte durée. Le test de microagglutination (MAT) présente des inconvénients comme l'impossibilité d'identifier la phase précoce de la maladie mais des progrès diagnostiques sont encore envisageables. En effet, le récent séquençage du génome des leptospires et le développement d'outils génétiques spécifiques marquent le début de l'ère post-génomique dans la recherche sur les spirochètes. Nos efforts portent actuellement sur la compréhension des mécanismes de virulence des leptospires, ainsi que sur la mise au point de tests diagnostiques et de vaccins plus performants. L'Unité de Biologie des Spirochètes, de l'Institut Pasteur de Paris, vient d'identifier un facteur de virulence des leptospires, une protéine de la famille OmpA, Loa22, exposée à la surface de la bactérie. La protéine Loa22 est un candidat pour le développement d'un vaccin.

Mots-clés : leptospirose, épidémiologie, facteur de virulence, génétique, protéine OmpA, Loa22.

SUMMARY

*Leptospirosis is an infectious disease which affects man and animals, and is considered as the most common zoonosis worldwide. Every year, it is responsible for serious epidemics in tropical and developing countries. The pathogen is *Leptospira interrogans*, an extremely mobile and helicoidal spirochete. The clinical presentation of leptospirosis varies due to the diversity within the genus *Leptospira* and its complex epidemiology. Several mammal species may develop leptospirosis, mainly in its chronic form, and thus act as reservoirs for the disease. Human leptospirosis, or Weil's disease, has a high mortality rate and is caused by *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae. The vaccination of man and animals has limited effects because vaccines are specific to the serovar and induce only a short-term immunity. The microagglutination test (MAT) used for the diagnosis of leptospirosis also has limitations, such as the inability to identify the early stage of the disease. However, progress is expected in diagnostic procedures, as the recently sequenced genome of *Leptospira* and the development of specific genetic tools mark the beginning of the post-genomic era in research on spirochetes. Our efforts are currently turned towards the understanding of leptospiral virulence mechanisms, as well as the development of more effective vaccines and diagnostic tests. The Spirochetes' Biology Unit at Institut Pasteur, Paris, has just identified the first leptospiral virulence factor, Loa22, a protein of the OmpA family exposed on the cell surface of the bacteria. Loa22 is a candidate for the development of a vaccine.*

Key words: leptospirosis, epidemiology, virulence factor, genetics, OmpA protein, Loa22.

(1) Chercheuse à l'Unité de Biologie des Spirochètes, Institut Pasteur, 25-28 rue du Docteur Roux 75724 Paris CEDEX 15.

(2) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes. CEP: 21941-902. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: paularistow@bigfoot.com

DE LA MÉSOPOTAMIE À L'INSTITUT PASTEUR DE MARTIN ET PETTIT

La leptospirose est une zoonose à multiples facettes, causée par les bactéries du genre *Leptospira*. Dans cette revue, nous traiterons des particularités métaboliques et pathogéniques des leptospires, depuis leur découverte par Stimson en 1907 jusqu'à l'ère post-génomique et les récentes avancées de la recherche dans le domaine.

La leptospirose a été décrite pour la première fois en 1886, de manière claire et irréfutable, par le médecin allemand Adolf Weil, dans un article intitulé : « Au sujet d'une maladie infectieuse caractéristique qui provoque splénomégalie, néphrite et ictère ». Suite à la description de la forme grave de la leptospirose humaine causée par le sérotype Icterohaemorrhagiae, elle a été nommée Maladie de Weil (Faine *et al.* 1999).

Stimson, en 1907, a observé pour la première fois les leptospires sur des coupes histologiques de rein, traitées par imprégnation argentique de Levaditi, et provenant d'un patient chez lequel avait été diagnostiquée par erreur la fièvre jaune. Il les a décrits comme des organismes spiralés, de couleur noire opaque, avec une ou deux extrémités en crochet et les a dénommés *Spirochaeta interrogans* en raison de leur forme en point d'interrogation. Il a aussi remarqué leur capacité à former des agrégats dans le tissu rénal (Faine *et al.* 1999). Quelques années plus tard, Noguchi appellera le microorganisme *Leptospira icteroides* (Noguchi, 1920).

Les leptospires pathogènes ont été isolés pour la première fois en 1916 par le groupe d'Inada, au Japon, sur le milieu de culture de Noguchi. Dans une remarquable série d'études, le même groupe montrait, entre 1916 et 1918, l'infection expérimentale et la protection passive du cobaye, les modes d'infection, le rôle du rat comme réservoir, la distribution de la bactérie dans les tissus, son excrétion, ainsi que ses caractéristiques morphologiques. À la même époque, la maladie de Weil et l'infection expérimentale du cobaye ont été décrites en Europe par Huebener et Reiter, pendant la Première Guerre Mondiale (Faine *et al.* 1999). La leptospirose a été effectivement très répandue pendant les guerres. D'ailleurs, la souche souche utilisée pour le vaccin en France, *Leptospira interrogans* sérovar Icterohaemorrhagiae, souche Verdun, a été isolée d'un soldat présent sur les champs de bataille de Verdun.

Dès le début du XX^e siècle, quelques années après la découverte de l'agent de la maladie de Weil, ont été établis les concepts de base concernant la leptospirose, qui sont encore couramment utilisés aujourd'hui. Les années 1930-1940 ont été marquées par la description d'autres formes de la maladie comme les formes anictériques, par la découverte d'autres types de *Leptospira* et de nombreux sérovars comme les sérovars Canicola, Pomona, Grippotyphosa et Bataviae, et par la mise en évidence de l'importance de la maladie chez les animaux (Faine *et al.* 1999). Le test d'agglutination microscopique ou MAT (pour *Microscopic Agglutination Test*), évolution du test décrit par Martin et Pettit à l'Institut Pasteur de Paris (Martin & Pettit,

1919), est encore aujourd'hui le test de référence pour le séro-diagnostic de la leptospirose.

Même si les premières descriptions de la maladie et de son agent datent d'un peu plus d'un siècle, des textes beaucoup plus anciens mentionnent une maladie ictérique qui pourrait être la leptospirose. Hippocrate avait écrit dans ses Aphorismes, en 400 av. J-C : *quand l'ictère apparaît après la fièvre avant le septième jour, c'est un mauvais symptôme, à moins qu'il y ait des décharges aqueuses des intestins*. Selon la croyance populaire en Mésopotamie, on retrouve l'affirmation suivante : *quand la rivière apporte des plantes jaunes, l'ictère apparaît au pays*. Dans le passé, en Chine, la médecine populaire nommait la leptospirose *wei ni* pour l'ictère de la culture du riz, *nanukayami* pour la fièvre des sept jours et au Japon, *akiyami* pour la fièvre automnale. Plus tard et un peu partout dans le monde, la leptospirose a été associée à des activités et conditions environnementales particulières : elle a reçu les noms de maladie des coupeurs de canne, des éleveurs de porc, des mineurs, des égoutiers et de fièvre de la boue (Faine *et al.* 1999).

DES BACTÉRIES UNIQUES PARMIS LES EUBACTERIA

Les leptospires (du grec *leptós* fin, petit, délicat et *speira*, boucle, spire) sont des bactéries spiralées, qui mesurent entre 5-10 µm de longueur et 0,1 µm de diamètre, avec des extrémités en spirale ou crochet (**figure 1**). Elles sont extrêmement mobiles, car elles sont dotées d'un endoflagelle à chaque extrémité, qui se localise entre la membrane externe et interne de la bactérie. En fonction de la souche, le temps de génération peut varier de 3 à 15 heures, entraînant un temps de culture et d'isolement parfois très long, allant de 2 à 30 jours. Le pH optimal de croissance est de 7,2 à 7,6 et la température optimale de 30 °C. Ces bactéries sont sensibles à la dessiccation et à la plupart des antibiotiques. Par contre, elles peuvent survivre dans l'eau, les rivières, les terrains alcalins (Faine *et al.* 1999), les lacs, les cours d'eau et les marécages (Henry & Johnson, 1978), ce qui contribue à leur maintien dans la nature.



Figure 1 : À gauche, morphologie fine et spiralée de *Leptospira biflexa* révélée en microscopie électronique à transmission (Coloration négative d'uranyle acétate, grossissement X 12 500; technique réalisée par Evelyne Couture-Tosi à l'Institut Pasteur). À droite, la section histologique d'un foie de cobaye infecté par *Leptospira interrogans* sérovar Lai montre les nombreux leptospires en noir opaque, disposés entre les hépatocytes et formant parfois des agglomérats (coloration argentique de Warthin-Starry, grossissement X 1 000).

Les leptospires sont exigeants du point de vue nutritionnel; les acides gras à chaîne longue, les vitamines B1 et B12 (WHO 2003), certains métaux comme le fer (Louvel *et al.* 2006) sont essentiels pour leur métabolisme. Le milieu de culture le plus utilisé est celui de Ellinghausen, McCullough, Johnson & Harris (EMJH), qui présente dans sa composition le Tween 80 comme source d'acides gras et la sérulalbumine bovine comme détoxifiant (Ellinghausen & McCullough, 1965; Johnson & Harris, 1967). Les leptospires peuvent être cultivés en milieu EMJH liquide (avec ou sans agitation), en milieu semi-solide (0,3 % d'agar noble) utilisé pour le maintien des souches à moyen terme, et en milieu solide (1 % d'agar noble) où les leptospires poussent en colonies isolées, en dessous de la surface.

Les colorations classiques des bactéries comme celle de Gram ne sont pas applicables aux leptospires. Même s'ils sont structurellement plus proches des bactéries à Gram négatifs, les leptospires présentent des caractéristiques singulières de la paroi, comme par exemple un peptidoglycane lié à la membrane interne (Haake 2000). L'observation classique des leptospires se fait au microscope optique à fond noir. Ils peuvent aussi être observés au microscope optique à contraste de phase ou mis en évidence par des colorations argentiques classiques comme celle de Warthin-Starry (*figure 1*).

Les leptospires appartiennent à l'Ordre Spirochaetales, qui fait partie d'un phylum bactérien à part entière regroupant les agents d'autres maladies telles que celui de la syphilis (*Treponema pallidum*) et celui de la borréliose de Lyme. Ils possèdent une ultra-structure cellulaire unique et les études de séquençage de l'ARN 16S montrent leur appartenance à un phylum très ancien (Paster *et al.* 1991). De grande diversité génétique, ils se répartissent en 17 espèces génomiques, parmi lesquelles sept sont pathogènes pour l'homme et les animaux, qui forment le complexe *L. interrogans sensu lato* (Morey *et al.* 2006). La classification des leptospires est en fait bien plus compliquée, de par la grande diversité de la composition lipopolysaccharidique de leur paroi. On peut cependant les classer en deux grands groupes: *Leptospira interrogans sensu lato*, qui comprend le groupe des pathogènes et *Leptospira biflexa sensu lato*, qui comprend celui des saprophytes (Bharti *et al.* 2003). La classification sérologique du genre a permis l'identification de sous-espèces ou sérovars (Faine *et al.* 1999). Des sérovars possédant des similarités antigéniques ont ainsi été regroupés en sérogroupes qui n'ont pas de valeur taxonomique, mais dont l'utilisation simplifie l'étude clinique et épidémiologique de la leptospirose. Plus de 250 sérovars regroupés en 24 sérogroupes existent actuellement. Les études d'hybridation ADN-ADN ont permis de regrouper les leptospires en espèces génomiques, mais le manque de corrélation systématique entre les espèces génomiques et les sérovars fait que la classification sérologique est encore très utilisée dans les études cliniques et épidémiologiques (Bharti *et al.* 2003). Le Centre National de Référence (CNR) de la Leptospirose, localisé à l'Institut Pasteur de Paris, réalise, outre la classification sérologique en sérogroupes et sérovars, l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE), le séquençage de

l'ARN 16S et l'étude des minisatellites ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) (Salaun *et al.* 2006) pour la classification génétique des leptospires.

LA LEPTOSPIROSE, UNE ÉPIDÉMIOLOGIE COMPLEXE

La leptospirose est une zoonose présente sur tout le globe, en zones urbaines ou rurales. Les cas de leptospirose humaine sévère sont estimés à 500.000 par an dans le monde (WHO, 1999). Les réservoirs principaux de l'agent pathogène sont les rongeurs au premier rang desquels se trouve le rat dont le rein est chroniquement infecté et qui élimine, par ses urines, les leptospires dans l'environnement. Toutes autres espèces de mammifères, sauvages et domestiques, peuvent être un réservoir de leptospires, d'où une grande diversité de réservoirs. Ces animaux réservoirs hébergeant dans leurs reins des sérovars spécifiques sont adaptés à l'infection (*tableau 1*). Ils sont peu sensibles aux leptospires et ont tendance à ne pas faire la maladie ou à développer des formes chroniques. Dans le cycle de la leptospirose, l'élimination rénale des leptospires est donc un élément clé pour leur persistance dans l'environnement. Une fois dans l'environnement, les leptospires contaminent les sols et l'eau. Les eaux contaminées sont une très importante source de transmission indirecte de la maladie aux humains et animaux, surtout en cas de contact prolongé. La transmission directe se produit par le contact avec les urines et les sécrétions d'animaux infectés. Les voies d'infection classiques sont la peau et les muqueuses. L'homme n'est qu'un hôte accidentel dans le cycle de la leptospirose, d'où son extrême sensibilité aux leptospires et sa propension à développer des formes graves de la maladie (Faine *et al.* 1999).

Le taux d'infection des rats par les leptospires varie, selon les auteurs, de 10 % (Johnson *et al.* 2004) à 36 % (Lilenbaum *et al.* 1993). En France, la séroprévalence est de 33 % chez les ragondins, avec une prédominance des sérogroupes Icterohaemorrhagiae et Australis (Michel *et al.* 2001). Quant aux réservoirs que peuvent constituer les animaux domes-

Réservoir	Sérogroupe	Sérovar (s) adapté (s)
Rat	<i>Rattus norvegicus</i> , <i>Rattus rattus</i>	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni
Mulot	<i>Apodemus agrarius</i>	Lai
Chien*	Canicola	Canicola
Porc	Pomona, Tarassovi	Pomona, Tarassovi
Bovins	Sejroe	Hardjo
Ragondin	Icterohaemorrhagiae Australis Sejroe	Icterohaemorrhagiae, Copenhageni Australis, Bratislava, Munchen Sejroe

Tableau 1 : *Leptospirose animale : réservoirs, sérogroupes et sérovars.*
*Le chien est le réservoir de *Canicola* lors d'une infection rénale chronique.

tiques, une étude a soulevé l'importance des bovins dans la persistance du sérovar Hardjo, ce sérovar ayant été isolé à partir de prélèvements rénaux chez 57 vaches sur 200 examinées (Ellis *et al.* 1981).

La leptospirose chez les animaux domestiques

Chez les animaux d'élevage (bovins, porcs, chèvres, moutons), la leptospirose se manifeste par des troubles de la reproduction: avortements, mortinatalité, infertilité et augmentation de l'intervalle entre vêlages (Lilenbaum & Souza, 2003; Ramos *et al.* 2006). On note une chute importante de la production de lait dans les élevages bovins laitiers, connue comme le *milk drop syndrome* (Pearson *et al.* 1980). Même si les troubles de la fertilité ont tendance à atteindre un plateau et à rester chroniques dans l'élevage, ils sont responsables d'importantes pertes économiques. La sévérité de la maladie semble être liée à l'âge des animaux et à leur état immunitaire. Les cas aigus chez les bovins et les porcs sont plus rares, touchant plutôt les jeunes animaux, et ils sont caractérisés par la prostration, la fièvre, l'anémie, l'ictère et les vomissements (Faine *et al.* 1999).

Les chevaux atteints présentent des troubles chroniques de la reproduction (Léon *et al.* 2006) et/ou une uvéite causée par la présence des leptospires et des anticorps spécifiques dans les chambres oculaires; cette uvéite laisse l'animal très sensible à la lumière et peut évoluer vers la cécité.

Chez les chiens, la leptospirose se présente sous plusieurs formes. Lorsqu'ils sont infectés par le séro-groupe Icterohaemorrhagiae, ils développent une hépatonéphrite suraiguë ou aiguë, qui ressemble à la maladie humaine. Lorsqu'ils sont infectés par Canicola, ils peuvent être victimes et développer une néphrite aiguë nommée Maladie de Stuttgart, ou développer une néphrite chronique et devenir des porteurs et réservoirs de Canicola. Les signes cliniques les plus communs chez les chiens sont la fièvre, les vomissements, la prostration, la rougeur des yeux, la déshydratation et le méléna, accompagnés ou non d'un ictère. Le pronostic est toujours réservé, voire même grave, la maladie pouvant évoluer rapidement vers la mort si elle n'est pas traitée (Faine *et al.* 1999). La vaccination évite que les chiens ne développent les symptômes les plus graves de la maladie, mais n'empêche pas l'infection (André-Fontaine 2006).

En France, la majorité des diagnostics de la leptospirose chez les animaux est assurée par l'École Vétérinaire de Nantes. Les diagnostics, indirects, portent sur des sérums d'animaux (sérodiagnostics), reçus pour confirmation diagnostique. Leurs résultats ne peuvent pas être interprétés comme des données de prévalence de la maladie (**tableau 2**). Au Brésil, comme en France, il n'existe pas d'étude de séroprévalence au plan national. Cependant, des enquêtes séro-épidémiologiques régionales montrent des pourcentages d'animaux positifs de 13 à 81 % pour les bovins (Rodrigues *et al.* 1999; Juliano *et al.* 2000), de 66 % pour les chiens et les porcs (Lilenbaum *et al.* 2002; Ramos *et al.* 2006) et de 11 % pour les chèvres (Lilenbaum *et al.* 2007).

Les chats et autres félins ne sont généralement pas inclus dans les enquêtes séro-épidémiologiques de la leptospirose et il n'existe effectivement que peu de données de la littérature à ce sujet (Luciani 2004; Lilenbaum *et al.* 2004). Le fait que le félin soit plus résistant aux leptospires est assez déconcertant: du fait de la cohabitation du chat domestique avec les chiens et les humains, le rôle des félins comme réservoir possible reste à clarifier. Signalons toutefois que dans une étude récente portant sur 98 chats, 48 % d'entre eux étaient séropositifs au test de la microagglutination (MAT) à *Leptospira* spp., montrant que cette infection est aussi fréquente dans cette espèce (Luciani 2004; André-Fontaine 2006).

La leptospirose humaine

La leptospirose humaine peut se présenter sous des formes bénignes qui guérissent spontanément ou des formes aiguës sévères à très graves, comme la maladie de Weil due au séro-groupe Icterohaemorrhagiae. Dans toutes les formes de la maladie, les symptômes (migraine, fièvre et douleurs musculaires) ne sont pas spécifiques au début. Dans les cas graves, apparaissent des symptômes caractéristiques de l'atteinte hépatorenale (ictère et insuffisance rénale prononcée), des hémorragies oculaires, parfois des troubles méningés et / ou pulmonaires. Dans les cas les plus sérieux, le taux de létalité varie de 5 à 25 % (WHO, 1999). La leptospirose est une maladie professionnelle qui concerne les agriculteurs, les éleveurs d'animaux domestiques, les vétérinaires, les égoutiers, le personnel de laboratoire, les militaires, en bref toutes les professions en contact avec des animaux réservoirs ou de l'eau contaminée.

La leptospirose humaine est endémique et épidémique dans certaines régions du globe, comme les Amériques du Sud et Centrale (Trevejo *et al.* 1998; Ko *et al.* 1999), l'Inde (Jena *et al.* 2004) et le Sud-Est Asiatique (Laras *et al.* 2002). Le caractère endémique est dû aux conditions géographiques et climatiques; le nombre de cas estimés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans les pays au climat tropical humide est de 10 pour 100.000 habitants par an, soit 0,01 % de la population (OMS, 2007). Les conditions démographiques et de développement, à savoir l'augmentation démographique désordonnée, les conditions précaires de vie, le manque d'hygiène et d'éducation sanitaire,

	Nombre d'animaux testés	Pourcentage d'animaux positifs (%)	Sérogroupe les plus réactifs
Bovins	1842	13,1	Icterohaemorrhagiae, Australis, Sejroë
Porcs	2632	19,9	Icterohaemorrhagiae, Australis, Ballum
Chevaux	1883	35,6	Australis, Icterohaemorrhagiae, Canicola
Chiens*	707	66,3	Icterohaemorrhagiae, Canicola, Australis

Tableau 2: Fréquence de séropositivité (microagglutination /MAT) selon l'espèce domestique en 2006 (rapport d'activité ENV Nantes). * Sont inclus les chiens vaccinés contre les sérogroupe Icterohaemorrhagiae et Canicola.

l'urbanisation désordonnée favorisent l'endémicité de la leptospirose. Par exemple, la maladie est fortement répandue dans les bidonvilles où les personnes vivent dans des habitations entourées d'égouts à ciel ouvert, proches du principal réservoir urbain de la maladie, le rat (*Rattus norvegicus*).

Les flambées épidémiques surviennent pendant les mois les plus chauds et pluvieux de l'année, spécialement lors des fortes inondations (Ko *et al.* 1999). Le nombre de cas peut atteindre 100 habitants pour 100.000, soit 0,1 % de la population (OMS, 2007). Au Brésil, la leptospirose est une maladie à déclaration obligatoire et 3.000 cas sont déclarés en moyenne chaque année (Tassinari *et al.* 2004). Lors de l'épidémie de 1996, 326 cas de leptospirose aiguë ont été diagnostiqués dans un seul hôpital et 50 décès déclarés, ce qui montre l'importance de cette maladie et probablement une sous-estimation du nombre de cas dans le pays entier (Ko *et al.*, 1999).

D'importantes épidémies de leptospirose sont survenues dans les dernières années comme au Nicaragua (Trevejo *et al.* 1998) et en Inde (Jena *et al.* 2004). Il faut aussi mentionner les épidémies de leptospirose survenues au contact des eaux de baignade, pendant la pratique d'activités de loisirs ou sportives, comme le rafting en Costa Rica (CDC, 1997), l'Éco Challenge en Malaisie (Sejvar *et al.* 2003), le triathlon en Illinois (Morgan *et al.* 2002).

En France, comme dans la majorité des pays de climat tempéré ou des pays développés, la leptospirose est considérée comme une maladie sporadique et surtout une maladie professionnelle. Le CNR de la Leptospirose de l'Institut Pasteur est le principal laboratoire français à pratiquer le diagnostic de la leptospirose humaine et contribue à la surveillance épidémiologique de la leptospirose en France métropolitaine et Outre-Mer. Il assure l'identification de toutes les souches isolées en pathologie humaine. La leptospirose est diagnostiquée depuis 1920, sans que l'on note de variations significatives au cours des années. Cependant, l'incidence de la maladie est saisonnière, les cas apparaissant surtout pendant la deuxième partie de l'année. Le sérotype Icterohaemorrhagiae représente la majorité des sérodiagnostics positifs, suivi par le sérotype Grippotyphosa (Baranton & Postic, 2006a). En 2006, 594 cas ont été recensés, dont 192 en Métropole (**figure 2**) et 402 en Outre Mer (**tableau 3**) (Baranton & Postic, 2006b). La maladie est considérée comme une zoonose d'importance prioritaire par l'Institut de Veille Sanitaire (Capek *et al.* 2006). Dans une évaluation du risque d'apparition et de l'évolution de zoonoses comme conséquence du réchauffement climatique en France, la leptospirose est considérée comme une maladie dont les conséquences sont faible à modérée pour la santé animale, modérée pour la santé humaine et faible pour l'économie (Gauchard 2005).

Nous possédons peu d'informations sur la maladie en Afrique et ce déficit est probablement dû à une sous-notification des cas et à la présence des nombreuses maladies qui peuvent se confondre avec la leptospirose, comme, par exemple, les fièvres hémorragiques virales. Au Gabon, la séroprévalence de la leptospirose est de 15,7 % (Bertherat *et al.* 1999).

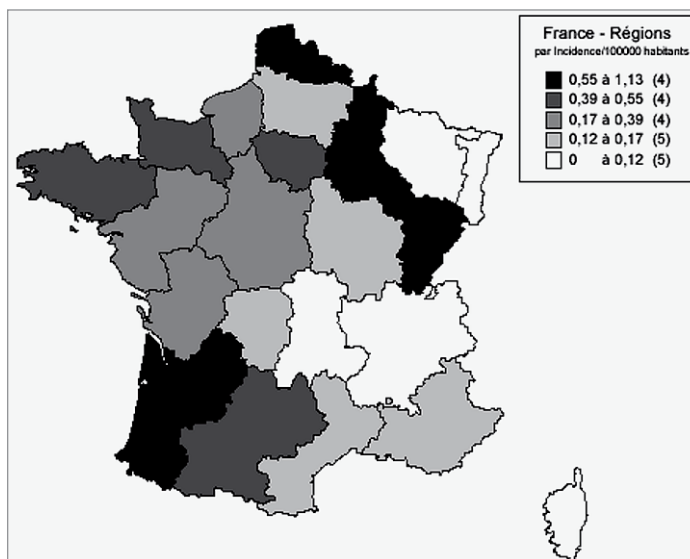


Figure 2 : Incidence de la leptospirose en France en 2006. L'incidence dans le Nord-Pas-de-Calais est surestimée, car l'origine géographique des cas n'est pas communiquée par les deux laboratoires réalisant le diagnostic (rapport d'activités 2006 du Centre National de Référence de la leptospirose).

Région	Nombre de cas	Population (milliers d'hab.)	Incidence/ 100.000 hab.
Antilles	137	846	16,19
Guyane	12	202	5,94
Réunion	59	784	7,52
Mayotte	16	201	7,96
Polynésie française	74	260	28,46
Wallis	1	10	10
Futuna	38	5	760
Nouvelle-Calédonie	65	232	28,02

Tableau 3 : Leptospirose humaine : incidence selon la région d'Outre Mer en 2006 (rapport d'activités du CNR).

LA PATHOGENIE DE LA LEPTOSPIROSE

La dynamique de la pathogenèse de la leptospirose est complexe et multifactorielle. La mobilité et la morphologie des leptospires favorisent leur pénétration par la peau lésée et les muqueuses, de même que leur dissémination rapide dans le sang et les tissus de l'hôte. Après l'infection, la période de bactériémie est variable et peut durer de 3 à 10 jours en moyenne. Elle est suivie par l'arrivée des leptospires dans les organes cibles : reins, foie et poumons, en provoquant la symptomatologie classique. Une fois la maladie installée, elle évolue vers la mort ou vers l'installation d'une immunité protectrice, engendrant l'élimination du microorganisme ou le développement de l'état de porteur (Faine *et al.* 1999).

La connaissance de la pathogenèse de la leptospirose est basée notamment sur les études de modèles animaux expérimentaux. L'utilisation du cobaye comme modèle expérimental n'est



Figure 3 : Signes cliniques classiques de la leptospirose aiguë chez le cobaye infecté par *Leptospira interrogans* sérovar Lai. L'animal présente un ictère apparent des muqueuses oculaires, de la peau et des tissus sous-cutanés, une hémorragie abdominale et des séreuses.

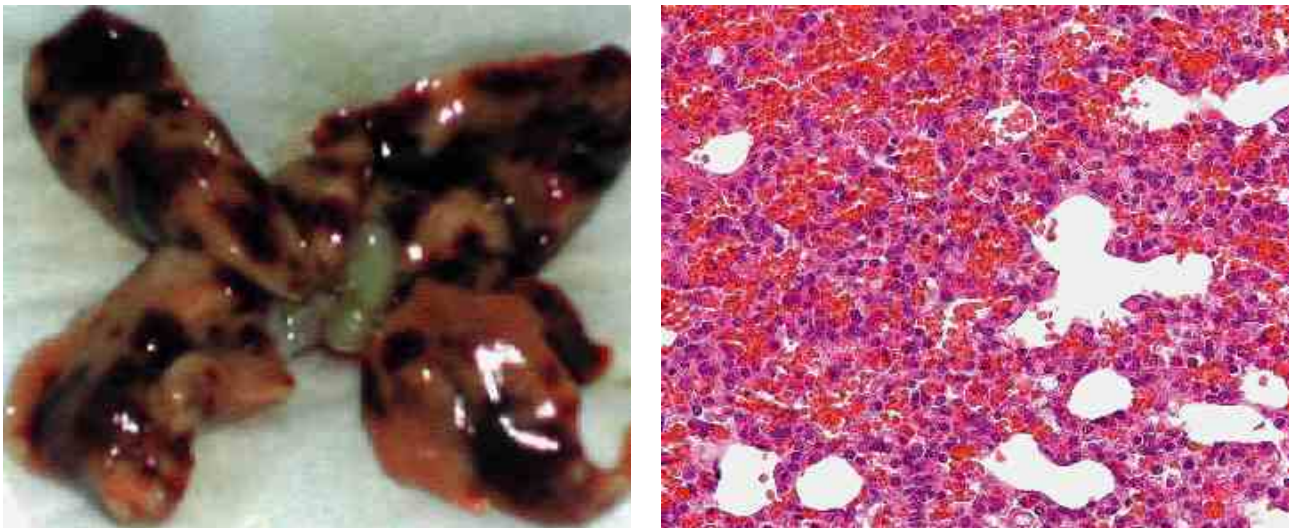


Figure 4 : À gauche, les poumons de cobaye infecté par *L. interrogans* sérovar Lai présentent de larges plages hémorragiques. À droite, les lésions microscopiques pulmonaires sont caractérisées par des hémorragies intra-alvéolaires et des infiltrats inflammatoires lymphoplasmocytaires (hématoxyline éosine, grossissement X 200).

pas récente (Noguchi 1920). Les jeunes cobayes inoculés par des leptospires du sérotype Icterohaemorrhagiae, développent une maladie létale qui mime la leptospirose grave de l'homme et du chien, avec la présence d'un ictère et d'hémorragies sous-cutanées, pulmonaires et abdominales (**figures 3 et 4**). Le hamster et la gerbille sont aussi sensibles aux leptospires. La résistance de la souris empêche son utilisation comme modèle animal. Récemment, il a été montré que des souris génétiquement modifiés en TLR-4 (*Toll-like receptor 4*), récepteur de la réponse immune innée, sont sensibles à la maladie (Nally *et al.* 2005).

La lésion principale de la maladie est constituée par des hémorragies et par l'afflux de cellules inflammatoires. Les leptospires ne sont pas pyogéniques et induisent une réponse inflammatoire lymphoplasmocytaire pauvre en neutrophiles (**figure 4, figure 5 A-B**). Leurs effets directs dans les tissus sont liés à la présence du lipopolysaccharide (LPS) et d'autres toxines comme une

hémolysine (Lee *et al.* 2000) et des lipases (Palaniappan *et al.* 2007). Leur adhésion aux cellules est primordiale pour la colonisation des tissus de l'hôte. Les leptospires sont fréquemment observés en étroit contact avec les membranes cellulaires (**figure 1**) et doivent posséder d'importants facteurs de virulence à cette étape. Capables de réaliser une translocation rapide dans les cellules (Barocchi *et al.* 2001), ils pénètrent dans les cellules phagocytaires et non phagocytaires (Palaniappan *et al.* 2007), mais ne sont pas intracellulaires (Faine *et al.* 1999). Même si les mécanismes de virulence spécifiques des leptospires sont encore obscurs, quelques protéines ont été identifiées comme étant des facteurs de virulence putatifs, comme une protéine qui a pour ligand la fibronectine (Merien *et al.* 2000) et les protéines Lig (Matsunaga *et al.* 2003). Les récentes avancées de la recherche en génomique permettront, en satisfaisant aux postulats moléculaires de Koch (Falkow 1988), de mettre en évidence le rôle de ces facteurs de virulence.

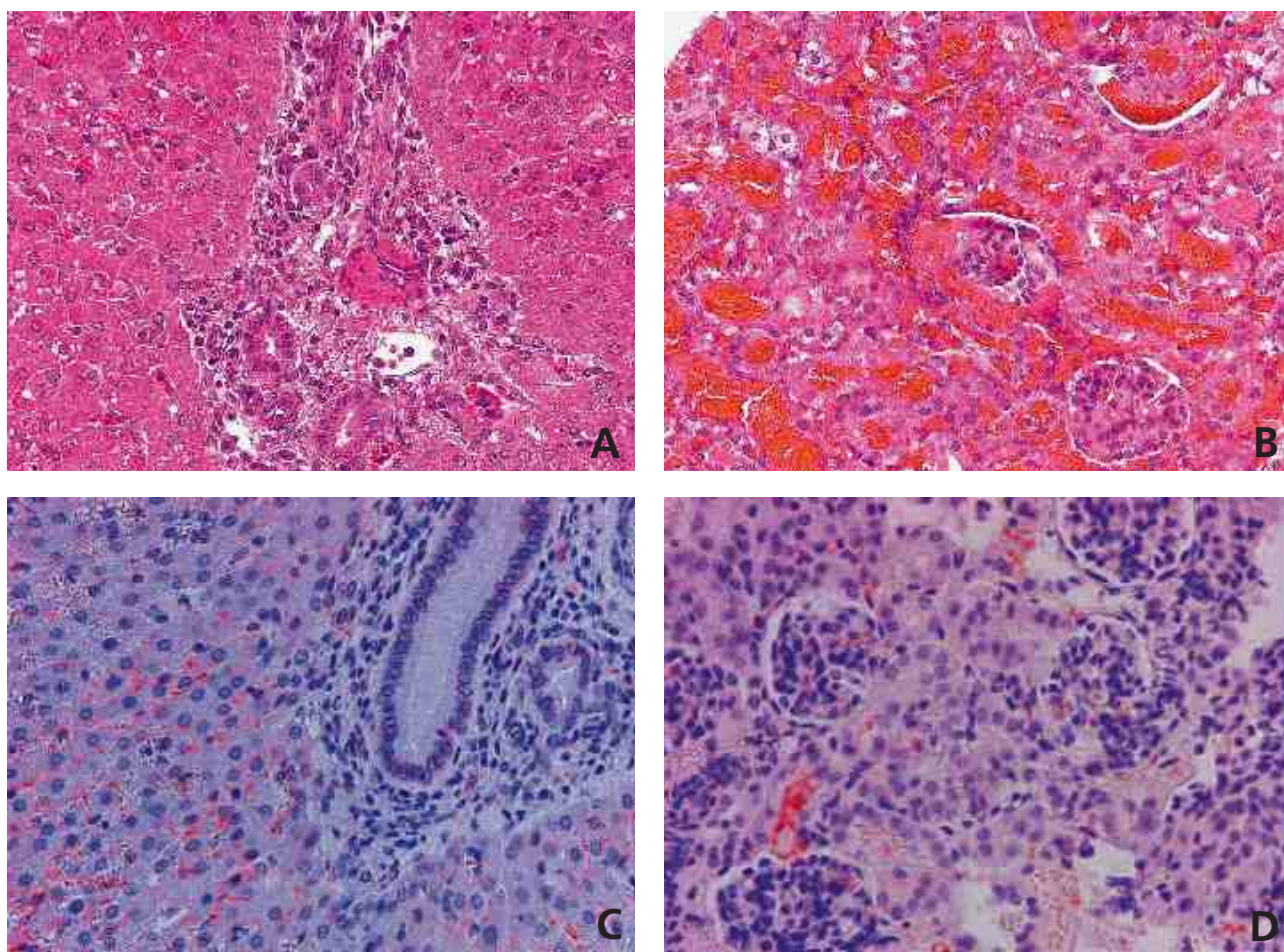


Figure 5 : Coupes histologiques d'organes de cobaye infecté par *L. interrogans* sérovar *Lai*. **A**, le foie présente une importante inflammation lymphoplasmocytaire périportale, des hépatocytes nécrosés et des cellules de Kupffer dilatées. La perte de l'architecture linéaire des hépatocytes est aussi marquée (hématoxyline éosine). **B**, les reins présentent des lésions typiques de leptospirose caractérisées par des hémorragies diffuses du cortex, une nécrose tubulaire et des infiltrats lymphoplasmocytaires (hématoxyline éosine). **C**, l'immunohistochimie avec des anticorps spécifiques dirigés contre la protéine *Loa22* révèle de nombreux leptospires (colorés en rouge) dans les canalicules biliaires. **D**, elle révèle aussi la distribution diffuse des bactéries (colorées en rouge) dans les glomérules du rein et en plus grand nombre dans les tubules proximaux. L'expression *in vivo* de la protéine *Loa22*, essentielle pour la virulence des leptospires, est ainsi démontrée par l'histochimie dans le rein et le foie chez le cobaye (grossissement X 200).

La réponse immunitaire aux leptospires, peu connue, est réalisée par l'intermédiaire des processus de l'immunité innée et acquise. Le LPS est responsable de la stimulation de l'immunité innée par les TLR2 (Werts *et al.* 2001). La réponse humorale est spécifique du sérovar infectant et le LPS semble être un antigène majeur, de même que les protéines de la membrane externe. Les immunoglobulines réalisent l'opsonisation et permettent la phagocytose subséquente des leptospires (Faine *et al.* 1999). La réponse immunitaire cellulaire semble participer aussi à la défense contre les leptospires, avec la production d'interféron gamma (Bharti *et al.* 2003).

LE BESOIN DE MESURES EFFICACES DE CONTRÔLE

La leptospirose est fondamentalement liée aux conditions de pauvreté, et les actions d'éducation sanitaire, d'urbanisation et

d'insertion sociale sont à la base de son contrôle. La protection individuelle (port de bottes) en cas d'inondations et l'éradication des rongeurs sont très importantes pour le contrôle de la maladie. Le traitement de la leptospirose peut être curatif ou préventif et les leptospires sont sensibles aux antibiotiques comme la pénicilline G et la doxycycline.

Le test diagnostique de référence est le test de microagglutination ou MAT, réservé à quelques laboratoires spécialisés. Il est basé sur l'agglutination des différentes souches bactériennes vivantes par le sérum, permettant de quantifier les anticorps agglutinants totaux. Il permet non seulement un diagnostic sensible et spécifique mais aussi la détermination du sérotype. Il a donc un intérêt à la fois diagnostique et épidémiologique. Par contre, il possède une valeur limitée pour le diagnostic de la phase aiguë de la forme sévère de la leptospirose, ainsi que des formes moins sévères. Un autre inconvénient est qu'il nécessite un grand nombre de souches vivantes correspondant aux sérogroupes

attendus. La « batterie » usuelle au CNR de la Leptospirose de l'Institut Pasteur comprend 16 souches et peut être étendue à 23 si l'on suspecte un sérotype ou sérovar plus rare.

En pratique humaine, on retiendra qu'il s'agira tout d'abord d'une recherche sérologique et, en fonction de la demande du biologiste, d'une culture et/ou amplification génique (PCR) dès la prise en charge du patient. Ces trois approches sont complémentaires pour le diagnostic biologique de la leptospirose. L'examen direct au microscope à fond noir est à proscrire à cause des faux positifs.

L'hémoculture est possible durant les 10 premiers jours suivant l'apparition de la fièvre, celle du LCR se fera durant la deuxième semaine de la maladie, et enfin les urocultures à partir de la troisième semaine. L'amplification par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) de gènes spécifiques comme *hap1* (Branger *et al.* 2005) est de plus en plus utilisée, de même que la PCR en temps réel (Merien *et al.* 2005). Enfin le sérodiagnostic est réservé à quelques laboratoires avec la mise en œuvre soit du MAT soit d'un test d'orientation par diverses techniques dont ELISA (IgM) avec la souche saprophyte Patoc. Celui-ci se révèle positif vers les 8 – 10^e jours après le début de la maladie. Les anticorps décroissent sur 3 à 6 mois et peuvent persister à des taux résiduels plusieurs années. La cinétique des anticorps est indispensable (2 tests à 2 semaines d'intervalle) et son interprétation intègre les données chronologiques et cliniques.

Nous avons besoin d'un test diagnostique efficace, simple, économique et sûr pour le personnel de laboratoire, capable d'identifier les phases précoce et tardive de la maladie. Il serait intéressant aussi de différencier les anticorps vaccinaux de ceux

produits par l'infection. Un test diagnostique composé de sous-unités bactériennes conservées parmi les différents sérovars de leptospires pourrait satisfaire à ces demandes.

Le diagnostic différentiel de la leptospirose doit être fait avec les fièvres hémorragiques chez l'homme. La dengue est en effet responsable d'un grand nombre d'erreurs de diagnostic chez l'homme (Ko *et al.* 1999), cette maladie ne sévit que dans certains pays chauds. Chez les ruminants, porcins et équidés, on doit différencier la leptospirose des infestations parasitaires et de troubles de la reproduction ayant d'autres origines.

Une mesure de contrôle spécifique de la leptospirose est la vaccination. Celle des groupes professionnels exposés ou à risque est mise en place en France et dans d'autres pays comme la Chine, le Japon, la Russie et Cuba. La vaccination en médecine vétérinaire est appliquée en routine aux chiens, car ils développent des formes très graves de la maladie. Dans certains pays, comme le Brésil où la maladie est endémique chez les animaux d'élevage, les bovins et porcins peuvent également être vaccinés.

Les vaccins existant actuellement sont constitués de bactéries entières tuées par la chaleur ou le formol et présentent certains inconvénients : une réponse immunitaire de courte durée qui n'est pas toujours protectrice et qui est spécifique du sérovar utilisé dans sa composition. La réponse immunitaire de courte durée implique le besoin de faire des rappels périodiques. L'efficacité de ces vaccins entiers est très limitée. En effet, il existe une grande diversité au sein du genre *Leptospira* (plus de 250 sérovars), due essentiellement à la variation de la structure du lipopolysaccharide (LPS). Cette particularité est une

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

Tableau 4 : Leptospires : principales caractéristiques de trois génomes.

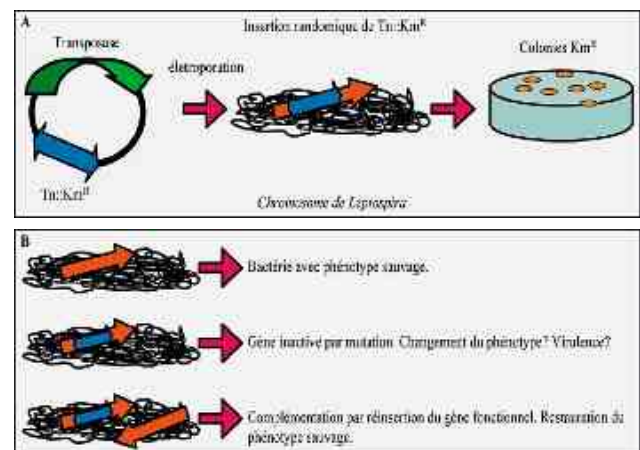


Figure 6 : Outils génétiques développés par l'Unité de Biologie des Spirochètes de l'Institut Pasteur.

A : Mutagenèse aléatoire avec le transposon Himar 1. Après l'insertion aléatoire du transposon dans le chromosome de *Leptospira*, les clones mutants ont acquis le gène qui code la résistance à la kanamycine (Km^R) et pourront être sélectionnés en milieu EMJH solide additionné de cet antibiotique.

B : Après la sélection de clones mutants, des tests sont réalisés pour la recherche d'un phénotype différent du phénotype sauvage, comme l'atténuation de la virulence chez le cobaye. Une fois ce phénotype identifié, il faut ré-insérer le gène identifié dans le chromosome de la bactérie pour restaurer le phénotype sauvage et prouver que ce gène est responsable du phénotype observé.

limite au développement d'un vaccin multivalent, mais aussi au sérodiagnostic. Quelques pays, comme Cuba, utilisent des vaccins polyvalents composés de plusieurs sérovars (Martinez *et al.* 2004), mais ils ne sont pas capables de protéger contre l'ensemble des sérovars connus.

Il faut donc trouver des antigènes conservés chez les leptospires et protecteurs pour développer un vaccin multivalent composé d'une ou plusieurs sous-unités bactériennes. Aujourd'hui, les chercheurs ont la possibilité, en utilisant la stratégie de la vaccinologie inverse (*reverse vaccinology*), de réaliser l'analyse informatique de la totalité du génome pour rechercher des nouveaux candidats vaccins (Koizumi & Watanabe, 2005). Cette stratégie nous permettra de trouver un vaccin moléculaire qui protégera contre un large spectre de leptospires – un défi permanent pour les chercheurs. Ceci devrait permettre aussi d'appliquer un seul vaccin commun à plusieurs espèces animales et à l'homme. Les vaccins composés de sous-unités protéiques ont démontré une protection partielle chez les modèles animaux (Haake *et al.* 1999; Branger *et al.* 2001). Le manque d'outils génétiques a beaucoup freiné la recherche sur les leptospires.

GÉNÉTIQUE ET SANTÉ PUBLIQUE : LA DESCRIPTION DU PREMIER FACTEUR DE VIRULENCE

Le séquençage récent du génome des leptospires marque une très grande avancée pour la recherche sur la leptospirose. Les deux premières souches séquencées, *Leptospira interrogans* sérovars Lai (Ren *et al.* 2003) et Copenhagien (Nascimento *et al.* 2004), sont issues du sérotype Icterohaemorrhagiae et sont responsables respectivement de fréquentes épidémies au Brésil et en Chine. Le génome des leptospires se distingue de celui d'autres bactéries par ses deux chromosomes circulaires : un grand avec environ 4 millions de paires de bases et un petit d'environ 350 000 paires de bases. Il possède un contenu en G-C d'environ 35 % et la majorité des gènes codent des protéines de fonction encore inconnue. Le génome d'une seconde espèce, *Leptospira borgpetersenii* sérovar Hardjo, a aussi été séquencé (Bulach *et al.* 2006) et présente un génome réduit (**tableau 4**), suggérant que le microorganisme est moins adapté pour survivre dans l'environnement et peut être en train d'évoluer vers un parasite obligatoire, bien que des données expérimentales manquent toutefois pour confirmer cette hypothèse. Une troisième espèce, *Leptospira biflexa*, non pathogène, a été séquencée au sein de l'Institut Pasteur (**tableau 4**). Cette étude permettra de réaliser la génomique comparative des leptospires saprophytes et pathogènes. Elle sera d'une grande utilité pour identifier des facteurs spécifiques du mode de vie des leptospires pathogènes et permettra de mieux comprendre l'évolution d'une bactérie saprophyte de l'environnement en une bactérie pathogène pour l'homme et l'animal.

Un système de mutagenèse ciblée a été développé chez les leptospires saprophytes avec un vecteur navette (Bauby *et al.* 2003), de même qu'un système de mutagenèse aléatoire, avec le trans-

poson « marinier » de la famille *Himar 1* (Louvel *et al.* 2005) (**figure 6 A**). Le séquençage du site d'insertion du transposon permet ensuite de savoir quel est le gène interrompu. Ultérieurement, l'utilisation des logiciels informatiques comme MAGE (*Magnifying Genomes*, <http://www.genoscope.cns.fr/agc/mag>) précise la localisation du gène, ainsi que sa fonction putative. De nombreux efforts ont été entrepris pour adapter ces techniques aux leptospires pathogènes, qui sont plus difficiles à manipuler génétiquement et qui pour l'instant, sont à peine transformables par mutagenèse aléatoire (Bourhy *et al.* 2005). La mutagenèse aléatoire des leptospires saprophytes est d'une bien meilleure efficacité. Elle permet la génération de milliers de clones à chaque électroporation et de multiples stratégies de criblage sont possibles en fonction du phénotype attendu (**figure 6 B**). Par exemple, pour identifier les systèmes de régulation et de transport du fer, de nombreux criblages ont été réalisés en milieu de culture avec ou sans source de fer (Louvel *et al.* 2006). Dans le cas des mutants obtenus chez les leptospires pathogènes, le phénotype recherché est l'atténuation de virulence. On sait que la virulence d'un microorganisme se traduit par sa capacité de produire une maladie, y compris sa capacité de se multiplier dans l'hôte, atteindre les organes cibles et provoquer des lésions. Le phénotype de virulence atténuée des leptospires est donc identifié par l'absence de maladie et de létalité chez le cobaye ou, en système de culture cellulaire, en vérifiant les étapes classiques de virulence comme l'adhésion, l'invasion et la multiplication.

Après avoir réalisé une mutation, il faut ensuite réinsérer le gène fonctionnel dans le génome pour prouver qu'il est bien responsable du phénotype observé. La complémentation du gène interrompu chez les leptospires pathogènes est faite par insertion aléatoire dans le génome (**figure 6 B**). Le but majeur de ces efforts est, avec l'aide des séquences génomiques disponibles, d'identifier des gènes impliqués dans la virulence des leptospires et, en conséquence, des molécules d'intérêt vaccinal et diagnostique.

La stratégie de mutagenèse aléatoire a permis, pour la première fois, d'inactiver un gène de virulence de la souche pathogène *Leptospira interrogans* sérovar Lai qui appartient au sérotype Icterohaemorrhagiae (Ristow *et al.* 2007). Le transposon s'est inséré dans un gène qui code une protéine de la famille OmpA (*Outer membrane protein*), Loa22. La virulence du mutant obtenu est atténuée, car injecté chez le cobaye et le hamster il ne produit pas les lésions typiques de la maladie et n'entraîne pas la mort des modèles animaux. De plus, lorsque le gène est complétement dans ce mutant, la virulence est restaurée chez les animaux. Cette petite protéine, de fonction encore inconnue, a un domaine consensus conservé OmpA en partie C terminale. L'analyse *in silico* de la séquence en acides aminés révèle les caractéristiques d'une lipoprotéine. Nous avons réalisé l'immunofluorescence directe et observé que cette protéine est exposée à la surface de *L. interrogans* sérovar Lai. Les protéines de la membrane externe peuvent avoir un fort pouvoir immunogénique et cette protéine n'est pas une exception, puisque nous avons observé des fortes réactions vis-à-vis de Loa22 comme antigène avec les échantillons de sérums humains pré-

levés chez des patients ayant fait la maladie aiguë et chronique. Loa22 est fortement exprimée par les leptospires pathogènes *in vitro* (Koizumi & Watanabe, 2003), mais aussi *in vivo* par les leptospires infectant les organes de cobayes présentant une leptospirose aiguë (**figure 5 C-D**). Les protéines de la famille OmpA sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques chez d'autres bactéries, comme leur adhérence sur les cellules (Shin *et al.* 2005) et l'induction de cytokines (Jeannin *et al.* 2005). La protéine Loa22 des leptospires satisfait les postulats moléculaires de Koch caractérisant un facteur de virulence (Falkow 1988) et semble capitale pour induire le pouvoir pathogène des leptospires. La protéine Loa22 des leptospires est un candidat potentiel pour un vaccin recombinant à finalité humaine et vétérinaire.

À QUOI PEUT-ON S'ATTENDRE À L'ÈRE POST-GÉNOMIQUE DES LEPTOSPIRES ?

L'ère post-génomique marque une période de changements dans la recherche sur les leptospires. Un peu plus d'un siècle après

la description du microorganisme et l'élaboration des concepts les plus primordiaux concernant la clinique et l'épidémiologie de la maladie, les chercheurs ont la carte génétique dans leurs mains et un plan à parcourir : l'avancée dans la connaissance de la biologie et la pathogénie des leptospires et le développement urgent des mesures de contrôle applicables. Cette approche ne peut être que multidisciplinaire, associant généticiens, médecins, vétérinaires, épidémiologistes, bioinformaticiens, pour aboutir à l'amélioration des tests de diagnostic de la leptospirose et au développement d'un vaccin. Les récents travaux menés au sein de l'Unité de Biologie des Spirochètes ouvrent la voie et vont dans ce sens.

Cette nouvelle ère de la recherche en génétique et dans le processus pathogénique ne doit pas faire oublier aux chercheurs que la leptospirose est une maladie favorisée par les conditions de pauvreté et que les mesures les plus fondamentales d'hygiène et d'amélioration des conditions d'une vie digne sont à la base de la maîtrise de la maladie. Même si elle implique d'importants problèmes de santé publique, la leptospirose continue d'être une maladie négligée.

REMERCIEMENTS

À Mathieu Picardeau pour son accueil à l'Institut Pasteur, sa direction de thèse et notre fructueux travail développé en France.
À Walter Lilenbaum (UFF, Rio de Janeiro, Brésil) et Leila Fonseca (UFRJ, Rio de Janeiro, Brésil) pour leur encadrement et direction de ma thèse au Brésil et leur perpétuel soutien.

Aux équipes du Laboratoire de Recherche et des Centres Nationaux de Référence de la Leptospirose et des *Borrelia* de l'Institut Pasteur, particulièrement à Pascale Bourhy, pour leurs conseils, travail d'équipe et esprit critique.

À Michel Huerre et Patrick Ave pour le travail réalisé à la Plateforme d'Histotechnologie de l'Institut Pasteur.

À Albert Ko pour son soutien et esprit critique.

À Hervé Bourhy pour son encouragement.

À Mathieu Picardeau et à Viviane Morel pour la lecture critique de ce manuscrit.

Aux financements de CAPES, Brésil ; FIOCRUZ, Salvador, Brésil – Institut Pasteur, Paris et Association Pasteur – Weizmann.

BIBLIOGRAPHIE

- André-Fontaine, G. 2006. Canine leptospirosis - Do we have a problem? *Vet Microbiol.* 117: 19 – 24.
- Baranton, G. & Postic, D. 2006a. Trends in leptospirosis epidemiology in France. Sixty-six years of passive serological surveillance from 1920 to 2003. *Int J Inf Dis.* 10: 162 – 170.
- Baranton, G. & Postic, D. 2006b. Rapport Annuel d'Activité - année 2006. Centre National de Référence de la leptospirose.
- Barocchi, M.A., Ko, A.I., Ferrer, S.R., Faria, M.T., Reis, M.G., Riley, L.W. 2001. Identification of new repetitive element in *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni and its application to PCR-based differentiation of *Leptospira* serogroups. *J Clin Microbiol.* 39: 191 – 195.
- Bauby, H., Saint Girons, I., Picardeau, M. 2003. Construction and complementation of the first auxotrophic mutant in the spirochaete *Leptospira meyeri*. *Microbiology* 149: 689 – 693.
- Bertherat, E., Renaut, A., Nabias, R., Dubreuil, G., Georges-Courbot, M. 1999. Leptospirosis and Ebola Virus Infection In Five Gold-Panning Villages In Northeastern Gabon. *Am J Trop Med Hyg.* 60: 610-615.
- Bharti, A.R., Nally, J.E., Ricaldi, J.N., Matthias, M.A., Diaz, M.M., Lovett, M.A., Levett, P.N., Gilman, R.H., Willig, M.R., Gotuzzo, E., Vinetz, J.-M. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis.* 3: 757 – 771.
- Bourhy, P., Louvel, H., Saint Girons, I., Picardeau, M. 2005. Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a *mariner* transposon. *J Bacteriol.* 187: 3255 – 3258.
- Branger, C., Sonrier, C., Chatrenet, B., Klonjkowski, B., Ruvoen-Clouet, N., Aubert, A., André-Fontaine, G., Eloit, M. 2001. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. *Infect Immun.* 69: 6831 – 6838.
- Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., Chevallier, B., André-Fontaine, G. 2005. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene *hap1* encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol Lett* 243: 437 – 445.
- Bulach, D.M., Zuerner, R.L., Wilson, P., Seemann, T., McGrath, A., Cullen, P.A., Davis, J., Johnson, M., Kuczek, E., Alt, D.P. et al. 2006. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14560 – 14565.
- Capek, I., Vaillant, V., Mailles, A., de Valk, H. 2006. Définition des priorités et actions réalisées dans le domaine des zoonoses non alimentaires, 2000-2005. *BEH n° 27/28 juillet*: 196 – 198.
- CDC. 1997. Outbreak of Leptospirosis Among White-Waters Rafters - Costa Rica, 1996. *Morbidity and Mortality Weekly Report CDC*, US Department of Health and Human Services 46: 577 – 578.
- Ellinghausen, H.C. & McCullough, W.G. 1965. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *Am J Vet Res.* 26: 45 – 51.
- Ellis, W.A., O'Brien, J.-J., Cassells, J. 1981. Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype hardjo infection in Northern Ireland. *Vet Rec.* 108: 555 – 557.
- Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Pérolat, P. 1999. *Leptospira and leptospirosis*, Melbourne, Australia: MedScience.
- Falkow, S. 1988. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev Infect Dis.* 10: 274 – 276.
- Gauchard, F. 2005. Évaluation du risque d'apparition et de développement des maladies animales compte tenu d'un éventuel réchauffement climatique. *Bulletin Épidémiologique AFSSA- Agence Française de Sécurité des Aliments n° 19/décembre*: 1 – 3.
- Haake, D.A. 2000. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology* 146: 1491 – 1504.
- Haake, D.A., Mazel, M.K., McCoy, A.M., Milward, F., Chao, G., Matsunaga, J., Wagar, E.A. 1999. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. *Infect Immun.* 67: 6572 – 6582.
- Henry, R.A. & Johnson, R.C. 1978. Distribution of the genus *Leptospira* in soil and water. *Appl Environ Microbiol.* 35: 492 – 499.
- Jeannin, P., Bottazzi, B., Sironi, M., Doni, A., Rusnati, M., Presta, M., Maina, V., Magistrelli, G., Haeuw, J.-F., Hoeffel, G. et al. 2005. Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity* 22: 551 – 560.
- Jena, A.B., Mohanti, K.C., Devadasan, N. 2004. An outbreak of leptospirosis in Orissa, India: the importance of surveillance. *Trop Med Int Health.* 9: 1016 – 1021.
- Johnson, M.A., Smith, H., Joeph, P., Gilman, R.H., Bautista, C.T., Campos, K.J., Cespedes, M., Klatsky, P., Vidal, C., Terry, H. et al. 2004. Environmental exposure and leptospirosis, Peru. *Emerg Infect Dis.* 10: 1016 – 1022.
- Johnson, R.C. & Harris, V.G. 1967. Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires. *J Bacteriol.* 94: 27 – 31.
- Juliano, R.S., Chaves, N.S.T., Santos, C.A., Ramos, L.S., Santos, H.Q., Meireles, L.R., Gottschalk, S., Filho, R.A.C.C.F. 2000. Prevalence and epidemiology aspects of bovine leptospirosis in dairy herd from Goiania micro-region, Goias Sate, Brazil. *Ciencia Rural* 30: 857 – 862.
- Ko, A.I., Galvao Reis, M., Ribeiro Dourado, C.M., Johnson, W.D.J., Riley, L.W. 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Salvador Leptospirosis Study Group. Lancet* 354: 820 – 825.
- Koizumi, N. & Watanabe, H. 2003. Molecular cloning and characterization of a novel leptospiral lipoprotein with OmpA domain. *FEMS Microbiol Lett.* 226: 215 – 219.
- Koizumi, N. & Watanabe, H. 2005. Leptospirosis vaccines: past, present, and future. *J Postgrad Med.* 51: 210 – 214.
- Laras, K., Cao, B.V., Bounlu, K., Nguyen, T.K., Olson, J.-G., Thongchanh S., Tran, N.V., Hoang, K.L., Punjabi, N., Ha, B.K. et al. 2002. The importance of leptospirosis in Southeast Asia. *Am J Trop Med Hyg.* 67: 278 – 286.
- Lee, S.H., Kim, K.A., Park, Y.G., Seong, I.W., Kim, M.J., Lee, Y.J. 2000. Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. *Gene* 254: 19 – 28.
- Léon, A., Pronost, S., Tapprest, J., Foucher, N., Blanchard, B., André-Fontaine, G., Laugier, G., Leclercq, R. 2006. Identification of pathogenic *Leptospira* strains in tissues of a premature foal by use of polymerase chain reaction analysis. *J Vet Diagn Invest.* 18: 218 – 221.
- Lilenbaum, W., de Souza, G.N., Ristow, P., Moreira, M.C., Fraguas, S., Cardoso, V.S., Oelemann, W.M. 2007. A serological study on *Brucella abortus*, caprine arthritis-encephalitis virus and *Leptospira* in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. *Vet J.* 173: 408 – 412.
- Lilenbaum, W., Monteiro, R.V., Albuquerque, C.E., Ristow, P., Fraguas, S., Cardoso, V.S., Fedullo, L.P. 2004. Leptospiral antibodies in wild felines from Rio de Janeiro Zoo, Brazil. *Vet J.* 168: 191 – 193.

- Lilienbaum, W., Ribeiro, V., Martin, E., Bispo, V. 1993. Estudo sorológico para detecção de anticorpos anti-*Leptospira* em *Rattus norvegicus* de Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Lat Amer Microbiol.* 35: 357 – 360.
- Lilienbaum, W., Ristow, P., Fraguas, S.A., da Silva, E.D. 2002. Evaluation of a rapid slide agglutination test for the diagnosis of acute canine leptospirosis. *Rev Latinoam Microbiol.* 44: 124 – 128.
- Lilienbaum, W. & Souza, G.N. 2003. Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Res Vet Sci.* 75: 249 – 251.
- Louvel, H., Bommezzadri, S., Zidane, N., Boursaux-Eude, C., Creno, S., Magnier, A., Rouy, Z., Medigue, C., Girons, I.S., Bouchier, C., Picardeau, M. 2006. Comparative and functional genomic analyses of iron transport and regulation in *Leptospira* spp. *J Bacteriol.* 188: 7893 – 7904.
- Louvel, H., Saint Girons, I., Picardeau, M. 2005. Isolation and characterization of FecA- and FeoB- mediated iron acquisition systems of the spirochete *Leptospira biflexa* by random insertional mutagenesis. *J Bacteriol.* 187: 3249 – 3254.
- Luciani, O. 2004. Réceptivité et sensibilité du chat aux leptospires. Thèse Méd. Vet., ENV Nantes; 123p.
- Martin L. & Pettit A. 1919. *Spirochètose ictérohémmorragique*. Masson et Cie, Paris.
- Martinez, R., Perez, A., Quinones, M. del C., Cruz, R., Alvarez, A., Armesto, M., Fernandez, C., Menendez, J., Rodriguez, I., Baro, M. *et al.* 2004. Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. *Rev Panam Salud Publica.* 15: 249 – 255.
- Matsunaga, J., Barocchi, M.A., Croda, J., Young, T.A., Sanchez, Y., Siqueira, I., Bolin, C.A., Reis, M.G., Riley, L.W., Haake, D.A., Ko, A.I. 2003. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol.* 49: 929 – 945.
- Merien, F., Portnoi, D., Bourhy, P., Charavay, F., Berlioz-Arthaud, A., Baranton, G. 2005. A rapid and quantitative method for the detection of *Leptospira* species in human leptospirosis. *FEMS Microbiol Lett.* 249: 139 – 147.
- Merien, F., Truccolo, J., Baranton, G., Pérolat, P. 2000. Identification of a 36-kDa fibronectin-binding protein expressed by a virulent variant of *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*. *FEMS Microbiol Lett.* 185: 17 – 22.
- Michel, V., Ruvoen-Clouet, N., Ménard, A., Sonrier, C., Fillonneau, C., Rakotovo, F., Ganière, J.-P., André-Fontaine, G. 2001. Role of the coypu (*Myocastor coypus*) in the epidemiology of leptospirosis in domestic animals and humans in France. *Eur J Epidemiol.* 17: 111 – 121.
- Morey, R.E., Galloway, R.L., Bragg, S.L., Steigerwalt, A.G., Mayer, L.W., Levett, P.N. 2006. Species-specific identification of *Leptospiraceae* by 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol.* 44: 3510 – 3516.
- Morgan, J., Bornstein, S.L., Karpati, A.M., Bruce, M., Bolin, C.A., Austin, C.C., Woods, C.W., Lingappa, J., Langkop, C., Davis, B. *et al.* 2002. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin Infect Dis.* 34: 1593 – 1599.
- Nally, J.E., Fishbein, M.C., Blanco, D.R., Lovett, M.A. 2005. Lethal infection of C3H/HeJ and C3H/SCID mice with an isolate of *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni*. *Infect Immun.* 73: 7014 – 7017.
- Nascimento, A.L., Verjovski-Almeida, S., Van Sluys, M.A., Monteiro-Vitorello, C.B., Camargo, L.E., Digiampietri, L.A., Harstkeerl, R.A., Ho, P.L., Marques, M.V., Oliveira, M.C. *et al.* 2004. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni*. *Braz J Med Biol Res.* 37: 459 – 477.
- Noguchi, H. 1920. *Leptospira Icteroides* and Yellow Fever. *Proc Nat Acad USA.* 6: 110 – 111.
- OMS 2007. *Les maladies liées à l'eau*. Organisation mondiale de la Santé. <http://www.who.int>
- Palaniappan, R.U.M., Ramanujam, S., Chang, Y.-F. 2007. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis.* 20: 284 – 292.
- Paster, B.J., Dewhirst, F.E., Weisburg, W.G., Tordoff, L.A., Fraser, G.J., Hespell, R.B., Stanton, T.B., Zablén, L., Mandelco, L., Woese, C.R. 1991. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J Bacteriol.* 173: 6101 – 6109.
- Pearson, J.K., Mackie, D.P., Ellis, W.A. 1980. Milk drop syndrome resulting from *Leptospira hardjo*. *Vet Rec.* 106: 135 – 136.
- Ramos, A.C., Souza, G.N., Lilienbaum, W. 2006. Influence of leptospirosis on reproductive performance of sows in Brazil. *Theriogenology* 66: 1021 – 1025.
- Ren, S., Fu, G., Jiang, X., Zeng, R., Xiong, H., Lu, G., Jiang, H.Q., Miao, Y., Xu, H., Zhang, Y. *et al.* 2003. Unique and physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole genome sequencing. *Nature* 422: 888 – 893.
- Ristow, P., Bourhy, P., McBride, F.W.C., Figueira, C.P., Huerre, M. Ave, P., Saint Girons, I., Ko, A.I., Picardeau, M. 2007. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. *PLOS Pathogens* 3:1 – 10.
- Rodrigues; C.G., Müller; E.E., Freitas; J.-C. 1999. Bovine leptospirosis: serology at dairy farms in Londrina region, Parana State, Brazil. *Ciência Rural* 29: 309 – 314.
- Salaun, L., Merien, F., Gurianova, S., Baranton, G., Picardeau, M. 2006. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 44: 3954 – 3962.
- Sejvar, J., Bancroft, E., Winthrop, K., Bettinger, J., Bajani, M., Bragg, S., Shutt, K., Kaiser, R., Marano, N., Popovic, T. *et al.* 2003. Leptospirosis in «Eco-Challenge» athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg Infect Dis.* 9: 702 – 707.
- Shin, S., Lu, G., Cai, M., Kim, K.S. 2005. *Escherichia coli* outer membrane protein A adheres to human brain microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 330: 1199 – 1204.
- Tassinari, W.S., Pellegrini, D.C.P., Sabroza, P.C., Carvalho, M.S. 2004. Spatial distribution of leptospirosis in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 1996 – 1999. *Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro* 20: 1726 – 1729.
- Trevejo, R.T., Rigau-Perez, J.-G., Ashford, D.A., McClure, E.M., Jarquin-Gonzalez, C., Amador, J.-J., de los Reyes, J.O., Gonzalez, A., Zaki, S.R., Shieh, W.J. *et al.* 1998. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis.* 178: 1457 – 1463.
- Werts, C., Tapping, R.I., Mathison, J.-C., Chuang, T.H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D.A., Godowski, P.J., Hayashi, Ozinsky, A. *et al.* 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol.* 2: 346 – 352.
- WHO. 1999. *Leptospirosis worldwide, 1999*. Weekly Epidemiological Record World Health Organization, Geneva 74: 237 – 244.
- WHO. 2003. *Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control*. http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CSR_EP_H_2002_23.pdf