Étude des leptospires dans les eaux de surface à Paris : quantification, dynamique, persistance et identification des espèces circulantes

Élise Richard

▶ **To cite this version:**

Élise Richard. Étude des leptospires dans les eaux de surface à Paris : quantification, dynamique, persistance et identification des espèces circulantes. Ingénierie de l'environnement. École des Ponts ParisTech, 2021. Français. NNT : 2021ENPC0014 . tel-03541692

HAL Id: tel-03541692
https://pastel.hal.science/tel-03541692v1

Submitted on 24 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

École des Ponts ParisTech

THÈSE DE DOCTORAT

de l'École des Ponts ParisTech

Étude des leptospires dans les eaux de surface à Paris : quantification, dynamique, persistance et identification des espèces circulantes

École doctorale N° 531, Science Ingénierie et Environnement SCI

Sciences et techniques de l'environnement

Thèse préparée au sein du laboratoire R&D Biologie de la DRDQE d'Eau de Paris et de l'unité Biologie des Spirochètes de l'Institut Pasteur

Thèse soutenue le 21/07/2021, par
Elise RICHARD

Composition du jury :

Jean-Marie MOUCHEL — *Rapporteur*
Professeur & Directeur UMR 7619 METIS - Sorbonne Université

Emma ROCHELLE-NEWALL — *Rapportrice*
Directrice de recherche, Institut d'écologie et des sciences de l'environnement - Sorbonne Université

Florence AYRAL — *Examinatrice*
Maître de conférences en pathologie infectieuses, INRA - VetAgro Sup

Célia FONTANA — *Examinatrice*
Research Consultant Boehringer Ingelheim. Altizem - Université Claude Bernard Lyon 1

Françoise LUCAS — *Examinatrice*
Professeure - Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbain (Leesu), UPEC

Laurent, MOULIN — *Directeur de thèse*
Responsable de la recherche, DRDQE - Eau de Paris

Mathieu, PICARDEAU — *Co-directeur*
Responsable de l'unité Biologie des Spirochètes, Directeur CNR de la Leptospirose - Institut Pasteur

Sébastien, WURTZER — *Encadrant*
Responsable du service Biologie moléculaire et pathogènes émergents, DRDQE - Eau de Paris

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du département de Recherche et Développement de la Direction de la Recherche, du Développement et de la Qualité de l'Eau d'Eau de Paris, en association avec l'unité Biologie des Spirochètes de l'Institut Pasteur, dont je tiens à remercier les directeurs respectifs, Alban Robin et Mathieu Picardeau.

J'adresse mes remerciements à Emma Rochelle-Newall, professeure des universités à l'Institut d'écologie et des sciences de l'environnement de Sorbonne Université, ainsi qu'à Jean-Marie Mouchel, professeur et directeur de l'UMR 7619 METIS de Sorbonne Université qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également, Florence Ayral, maître de conférences en pathologie infectieuses de VetAgro Sup, et Françoise Lucas, professeure au Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbain de l'UPEC qui ont aussi accepté de participer à l'évaluation de ce travail.

Je souhaite aussi remercier les membres de mon comité de suivi, Florence Ayral, Emma Rochelle-Newall et Pierre Servais pour leurs conseils tout au long de ce projet. Aude Lalis et Benoît Pisanu, je vous remercie de m'avoir permis de participer aux dissections au sein de la ménagerie du MNHN et avoir rendu possible l'étude chez les rongeurs.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Laurent Moulin pour avoir permis la réalisation de cette étude et pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire durant toutes ces années. Merci d'avoir partagé tes nombreuses connaissances et d'avoir été disponible, lorsque ton emploi du temps chargé te le permettait. Je souhaite remercier également mon co-directeur Mathieu Picardeau. Un grand merci pour tes conseils, ton écoute et ton accueil au sein de l'équipe de l'Institut Pasteur ; et également Pascale Bourhy pour le partage de tes connaissances sur l'environnement.

Sébastien, mentor scientifique et humoristique, je souhaite à tout(e) étudiant(e) la chance de pouvoir être formé à tes côtés ; de profiter de ton savoir, de ta patience et de ton humour plus ou moins taquin (en même temps on a le même humour). Merci à toi de m'avoir fait confiance et de m'avoir totalement guidée et épaulée durant mon séjour à EDP, aussi bien lors de mon stage de fin d'école d'ingénieurs mais surtout durant cette thèse. N'avoir aucune formation en biologie et mener une thèse sur les leptospires n'a été possible que grâce à un encadrant patient et particulièrement pédagogue : sans toi, tout ceci n'aurait pas pu aboutir. Prunelle disait vrai (comme d'habitude) dans son manuscrit de thèse : ce manuscrit serait beaucoup trop conséquent si je devais à mon tour être exhaustive dans mes remerciements à ton égard.

Prunelle, brillante collègue et amie, tu as été et est toujours pour moi un réel exemple à suivre. Un grand merci pour ces moments de partage scientifique (de nombreux conseils bienveillants), amical (du concert au cirque d'hiver à ton mariage) et également sportif (des centaines de kilomètres courus ensemble). Notre trio du bureau 107 fut pour moi l'une des plus belles choses de mon passage à EDP. Ces derniers jours ont dû être pour toi, remplis de nouvelles découvertes. Profite bien de ta nouvelle aventure au pays de Pasteur.

Morgane, le cœur sur la main : merci pour ta générosité, ton altruisme et ta bienveillance envers tout le monde. Ta bonne humeur est l'un des éléments qui égayent une journée au labo. Nolwenn, binôme du « bureau des médisances » (comme tu aimes le nommer) avec Morgane, tu as également participé à la bonne ambiance et aux nombreuses conversations plus ou moins sérieuses. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse qui arrivera très prochainement.

Je remercie également les autres membres des équipes R&D Biologie, Biologie moléculaire et pathogènes émergents, Chimie et Process d'Eau de Paris. Héberte, un grand merci pour ces aller-retours en voiture, pour ton amitié et surtout pour ta bonne humeur au quotidien. Marion, le laboratoire ne fonctionnerait pas aussi bien si tu n'étais pas là pour veiller à la logistique du quotidien, merci pour ton aide dans ce projet. Sophie, merci pour tes encouragements et nos échanges sur la baignade. Jacques, merci pour tes conseils et ton aide dans les réseaux de neurones et les ACP et merci également à Xavier pour sa bienveillance et sa bonne humeur démonstrative. Un grand merci également à Carole pour sa bonne humeur et sa gentillesse légendaires. Merci pour ton aide dans tous les aspects administratifs engendrés par ce travail. Merci également à Jean et Alban pour leur écoute et leurs précieux conseils dans la suite de ma carrière professionnelle. Enfin, merci Imad pour ta bonne humeur, tes innombrables coups de main et pour nos échanges qui me manqueront beaucoup.

Plus généralement, un grand merci aux sportifs de la R&D qui m'ont accompagnée tout au long de ces années ; parfois sous la pluie, la neige ou lors de la canicule (n'est-ce pas Monzer) : Anais (la fidèle partenaire), Véronique (la bonne humeur dans la souffrance), Marie (spécialiste Hit & Run), Monzer (coach hors pair, toujours dispo pour une session), Patrick (coach Patpat), Guillaume C (pour les courses côtés Marne) et Guillaume D (pour les nombreux kilomètres qui m'ont permis d'évoluer).

Un grand merci également à l'unité biologie des spirochètes de l'Institut Pasteur : Céline, Farida, Nadia, Bobby, Crispin, Olivier et ceux que j'oublie. Jean-François, un grand merci pour avoir eu une oreille attentive et toujours bienveillante à mon égard. J'espère un jour avoir la chance de travailler avec des personnes telles que toi, passionnées mais surtout brillantes.

Un merci tout particulier à mon groupe de capoeira, groupe Lagoa Azul, qui est un peu ma deuxième famille.

Gostaria agradecer ao meu mestre, Mestre Serra Pelada. Muito obrigada por tudo o que voce e a capoeira me trazem na vida quotidiana. Graças a isso, encontrei um verdadeiro equilíbrio que me permitiu levar a cabo este projecto em boas condições físicas e mentais. Obrigada também por me apresentar a sua família e outra parte do Brasil na nossa viagem com o professor Kamikaze.

Je souhaite également remercier tout particulièrement les deux autres membres du trio des « -ou » : Miuda et Sininho, qui ont accompagné ce projet en long, en large et en travers. Merci pour votre soutien et votre présence au quotidien à mes côtés. Dans la même lignée, je remercie aussi les autres membres de la team Gros Lion pour les séjours entre amis passés, mais également à venir.

Un grand merci également aux autres membres des bureaux des associations de capoeira de Caen et d'Issy-Les-Moulineaux : Chafiaa, Fada Madrinha et Lu. Merci pour votre soutien, en particulier dans les dernières semaines. Votre aide a été plus que précieuse.

Gwen, ma fidèle amie, tu m'as aussi beaucoup soutenue dans ce projet et depuis bien des années maintenant. Bientôt c'est ton diplôme d'ingénieur que l'on fêtera ensemble. A tout ce qu'on… !

Enfin, je souhaite remercier particulièrement ma famille. Merci à mes parents de nous avoir permis d'avoir les moyens techniques de faire de longues études tous les trois. Merci aussi pour ces nombreux moments de partage cette dernière année. A mon grand-père, mes frères, mes belles-sœurs et mes nièces (et les autres à venir…) : les mots ne sont pas notre fort, mais sachez que vous avez toujours été présents à mes côtés par la pensée. Beaucoup de beaux événements sont à venir et j'ai hâte de les partager avec vous.

A ma grand-mère, qui aurait été sans doute fière du travail effectué et du chemin parcouru.

Je suis sûre que de là ou tu es, tu accompagneras toujours nos différents projets.

Table des matières

Liste des figures I
Liste des tableaux IV
Liste des abréviations V
Introduction 1
1. Leptospirose 3
1.1. Epidémiologie 3
1.2. Réservoirs et cycle de transmission 12
1.3. Aspects cliniques 21
1.4. Traitement 23
2. Leptospires 26
2.1. Phylum 26
2.2. Taxonomie et classification 29
2.3. Caractéristiques morphologiques et métaboliques 39
3. Diagnostic et techniques de détection 43
3.1. Diagnostic humain 43
3.2. Détection-Isolement des leptospires dans l'environnement 47
4. Environnement et qualité de l'eau 51
4.1. Environnement 51
4.2. Résistance aux traitements 66
4.3. Qualité de l'eau 70
5. L'approche One Health 72
Objectifs de la thèse 76
Matériel et méthodes 78
1. Prélèvement d'échantillons et milieux de culture 78
1.1. Souches isolées 78
1.2. Prélèvements d'échantillons environnementaux 78
1.3. Milieu de culture et antibiotiques 78
2. Lyse et extraction 79
3. Mise en place de la qPCR multiplex 79
3.1. Design des amorces 79
3.2. Plasmides et contrôle interne 81
4. Traitement au propidium monoazide 81
5. Tests de persistance 82
5.1. Exposition à la chaleur 82

5.2. Exposition aux ultraviolets (UV) 82
5.3. Traitement au chlore 83
6. Analyse statistique avec le logiciel GraphPad 83
7. Etude de la diversité des leptospires par séquençage haut débit (NGS) 84
7.1. Préparation et contrôle de librairie 85
7.2. Normalisation et séquençage 85
7.3. Analyse des données 86
Chapitre 1 : Effets des traitements de désinfection et quantification des leptospires viables dans les eaux de surface par une qPCR d'intégrité de haute sensibilité 87
Introduction 87
Conclusion du chapitre 1 117
Chapitre 2 : Diversité des leptospires présentes dans les eaux de surface et chez les rongeurs à Paris : détection par une qPCR d'intégrité et comparaison par séquençage NGS 119
Introduction 119
Conclusion du chapitre 2 147
Discussion générale et conclusion 151
Les pathogènes du rat 155
Les adaptations anthropiques 157
Références 160

Liste des figures

Figure 1. Carte des épidémies de leptospires relatées dans la littérature entre 1970 et 2012, en fonction des différentes écorégion définies par Olson 2001, tiré de Munoz-Zanzi 2020. 4

Figure 2. Estimation de la morbidité annuelle de la leptospirose par pays ou territoire, tiré de Costa 2015. 5

Figure 3. Répercussion de la leptospirose en nombre d'années de vie corrigé du facteur d'invalidité (DALYs) pour 100 000 habitants (issu de Torgerson 2015). 6

Figure 4. Distribution des principaux sérogroupes identifiés (MAT) parmi les cas de leptospirose humaine, tiré du rapport CNR 2018. 8

Figure 5. Répartition des cas de leptospirose en métropole au cours de la période 2015-2019 (tiré du rapport du CNR 2019-2020). 10

Figure 6. Phylogénie MLST des souches de leptospire isolées aux Caraïbes et en Amérique centrale (n = 53) (Noda 2020). 16

Figure 7. Diversité et répartition des espèces de leptospires pathogènes les plus fréquentes selon chaque région géographique (tiré de Guglielmini 2020). 17

Figure 8. Cycle de transmission de la leptospirose (Bourhy et al., 2012b). 18

Figure 9. Répartition des épidémies de leptospirose humaine en fonction des conditions d'exposition, recensées dans la littérature entre 1970 et 2012 (n = 306) (Munoz-zanzi 2020). 21

Figure 10. Cinétique de la leptospirose (Ko 2009). 22

Figure 11. Ce schéma représente les différentes étapes de mise au point d'un vaccin, ici contre la leptospirose (Grassmann 2017). 24

Figure 12. Arbre phylogénétique de la diversité des bactéries (tiré et adapté de Castelle et al., 2018). 27

Figure 13. Arbre phylogénétique des Spirochètes basé sur les séquences génétiques du gène rrs (Grupta et al., 2013). 28

Figure 14. Schéma représentatif de divers spirochètes : Spirochaeta thermophila, Leptospira illini et Borrelia burgdorferi (respectivement de haut en bas) (Wirth 2016). 29

Figure 15. Arbre phylogénétique des leptospires basé sur leur identité en gène rrs. 33

Figure 16. Arbre phylogénétique des leptospires basé sur les séquences nucléotidiques de 1371 gènes orthologues (Vincent et al., 2019). 38

Figure 17. Morphologie cellulaire et structure de l'enveloppe de L.interrogans (Picardeau, 2017; Schiettekatte, 2018). 39

Figure 18. Représentation schématique de la configuration d'une leptospire lorsqu'elle est statique ou lorsqu'elle est en mouvement (Wolgemuth, 2015). 40

Figure 19. Leptospires en microscopie à fond noir (A) et en microscopie électronique (B et C) (Bourhy 2012)..... 41

Figure 20. Evolution du pan-génome (A) et du core-génome (B) pour les génomes des quatre sous-clades de leptospires (Vincent et al., 2019). 42

Figure 21. Nombre de génomes de leptospires disponibles en fonction du temps et de l'arrivée des différentes technologies, d'après Mathieu Picardeau (Schiettekatte, 2018). 43

Figure 22. Techniques de diagnostic de la leptospirose en fonction de l'avancement de la maladie (CNR de la leptospirose, Institut Pasteur). 44

Figure 23. Schéma de principe des différentes étapes d'utilisation des intercalants de l'ADN : ajout de l'intercalant, incubation, exposition à la lumière, extraction d'ADN et qPCR (Biotium®). 49

Figure 24. Illustration des mécanismes hypothétiques de survie et de dispersion des leptospires dans l'environnement lors de pluies intenses (Bierque et al., 2020b). 58

Figure 25. Superposition temporelle de la moyenne des précipitations sur une semaine avant le prélèvement et la présence de leptospires spp. dans l'eau de loisir (Dzulaikha et al., 2018). 59

Figure 26. Échantillonnage de sol (cercle) et d'eaux usées (croix) sur trois sites (A, B et C) du site de Pau da Lima (Schneider et al., 2018). 62

Figure 27. Formation du biofilm de leptospires en microscopie électronique à balayage ; à 1, 7, 10, 15 et 20 jours après l'inoculation (Thibeaux et al., 2020). 64

Figure 28. Analyse quantitative en contraste de phase du nombre d'agrégats de biofilm (courbe bleue) et de la surface du biofilm (courbe rouge) entre 12h et 216h après inoculation (Thibeaux et al., 2020)..... 65

Figure 29. Activité métabolique relative des biofilms mutants WT et c-di-GMP soumis à un stress osmotique et à des rayonnements UV (Thibeaux et al., 2020). 69

Figure 30. Normes de qualité des eaux et classement des zones de baignade (ministère chargé de la santé, Gouvernement français). 70

Figure 31. Illustration globale du concept One Health et des conséquences probables dans différents domaines (une seule santé), INRAE. 74

Figure 32. Etapes du processus de séquençage. 85

Figure 33. Déroulement des différentes étapes d'analyse des résultats de séquençage (Workflow). 86

Figure 34. Représentation des différents états possibles des leptospires : différenciation entre les bactéries intègres, viable et cultivables. 118

Figure 35. Diversité des leptospires identifiées dans les échantillons d'eau de surface, le long de la Seine (A) et dans la zone de baignade du canal de l'Ourcq (B). 149

Figure 36. Localisation des points de capture des rats, de leur positivé aux leptospires pathogènes et de la diversité des espèces bactériennes identifiées dans les reins. 150

Figure 37. Localisation des déversoirs d’orage du réseau parisien le long de la Seine (A) et au niveau du bassin de la Villette (B) (ville de Paris). 153

Liste des tableaux

Tableau 1. Estimation annuelle de la morbidité et de la mortalité selon les régions définies par le GBD (Global Burden of Disease), tiré de Costa 2015. 5

Tableau 2. Estimation de la morbidité et de la mortalité par leptospirose par pays, appartenant à la sous-région Europe de l'Ouest définie par l'OMS (d'après Costa 2015). 7

Tableau 3. Incidence de la leptospirose par région, en France métropolitaine en 2019 (CNR 2019). ... 8

Tableau 4. Incidence de la leptospirose par régions d'Outre-mer en 2019 (CNR 2019)..... 9

Tableau 5. Répartition de l'incidence de la leptospirose entre les femmes et les hommes à travers le monde (Costa 2015, Pasteur 2019). 11

Tableau 6. Prévalence de leptospires chez les rats dans les pays d'Europe (tiré de Boey 2019, mis à jour). 13

Tableau 7. Sérogroupes infectieux présumés dans les cas de leptospirose retrouvés chez différents hôtes, Rio Grande do Sul, 2013-2015 (Polo 2019). 14

Tableau 8. Caractéristiques de leptospires pathogènes et saprophytes. 30

Tableau 9. Récapitulatif des sérogroupes et sérotypes chez Leptospira spp. (tiré de Caimi 2020). 31

Tableau 10. Données disponibles concernant les 64 espèces de leptospires (+2 probables), tiré de Caimi 2020. 35

Tableau 11. Présence des leptospires pathogènes dans les eaux de surface (d'après (Goarant et al., 2019) et mis à jour). 53

Tableau 12. Présence des leptospires pathogènes dans les eaux usées et les égouts (d'après Institut Pasteur International Network, 2019 et mis à jour). 54

Tableau 13. Présence des leptospires pathogènes dans le sol et à l'interface sol-eau (d'après Institut Pasteur International Network, 2019 et mis à jour). 55

Tableau 14. Présence des leptospires pathogènes dans l'eau déstinée à la consommation humaine (d'après Institut Pasteur International Network, 2019 et mis à jour). 57

Tableau 15. Identification de la présence de leptospires par PCR dans les eaux potables à destination humaine et animale dans la région de Los Rios au Chili, entre 2010-2012 (Mason et al., 2016). 60

Tableau 16. Liste des microorganismes utilisés pour définir la spécificité de la qPCR multiplex. 80

Tableau 17. Amorces et sondes de qPCR pour la quantification des leptospires spp. et des leptospires pathogènes. 81

Liste des abréviations

ACP : analyse en composantes principales

ANI : average nucleotide identity

BSA : bovine serum albumin

CAAT : cross agglutination adsorption test

CAP : connaissance, attitude et pratique

CDDP : cis-diamminodichloroplatine

cgMLST : core genome multilocus sequence typing

CMI : concentrations minimales inhibitrices

CMB : concentrations minimales bactéricides

DALYs : disability adjusted life years

DPD : N, N-diéthyl-p-phénylène-diamine

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

EMA : ethidium monoazide

EMJH : Ellinghausen Mccullough Johnson Harris medium

EPA: environmental protection agency

FAO: food and agriculture organisation

FVR : fièvre de la vallée du Rift

GBD : Global Burden of Disease

GLEAN : Global Leptospirosis Environmental Action Network

GMP : guanosine monophosphate

IgM : immunoglobulines M

ILS : international leptospirosis society

IPC : internal positive control

LD : limite de détection

LPS : lipopolysaccharides

MAT : microscopic agglutination test

MERS : syndrome respiratoire du Moyen-Orient

MLST : multilocus sequencing typing

MNHN : museum national d'histoire naturelle

NAC : nouveaux animaux de compagnie

NCBI: national center for biotechnology information

NGS : next generation sequencing

OIE : office international des épizooties

OMS : organisation mondiale de la santé

PBS : phosphate buffered saline

PCR : polymerase chain reaction

PMA : propidium monoazide

PubMLST : Public databases for molecular typing and microbial genome diversity

qPCR : PCR quantitative

RT : reverse transcription

SARS-CoV : severe acute respiratory syndrome coronavirus

Spp : species plurimae

STAFF : sulfamethoxazole, trimethoprim, amphotericin B, fosfomycin, fluorouracil

TLR: Toll-like receptor

VBNC : viable but non culturable

Introduction

L'expansion des activités aquatiques avec notamment la mise en place de zones de baignade suscite un intérêt tout particulier concernant la présence de différents pathogènes dans les eaux de surface. Dans le cadre de la réglementation sanitaire liée aux utilisations récréative et sportive de ces eaux, seuls deux paramètres bactériologiques sont surveillés (*Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux) alors que de nombreux autres microorganismes pathogènes y sont également présents. Parmi ces bactéries pathogènes, les leptospires sont de plus en plus impliquées dans les infections humaines ayant lieu lors d'activités aquatiques (Guillois et al., 2018; Morgan et al., 2002; Pagès et al., 2016).

Avec plus d'un million de cas estimés chaque année, la leptospirose fait partie des zoonoses bactériennes les plus importantes au monde (Costa et al., 2015). L'incidence de cette infection bactérienne est plus forte dans les régions tropicales dans lesquelles les conditions climatiques et sanitaires sont particulièrement favorables à la transmission (température et humidité), et notamment lors de fortes pluies. Pathologie émergente dans les bidonvilles des régions tropicales elle s'intensifie avec l'urbanisation, la surpopulation, les mauvaises conditions d'hygiène et la prolifération des rats, considérés comme le principal réservoir animal (Desvars-Larrive et al., 2017; Fávero et al., 2017; Levett, 2001). L'homme se retrouve être un hôte accidentel dans un cycle impliquant les animaux domestiques et sauvages infectés par les leptospires, qui contaminent l'environnement via l'excrétion de leurs urines (Ricaldi et al., 2013).

L'incidence varie considérablement entre les régions tempérées et les régions tropicales et est parfois sous-estimée du fait de l'absence de diagnostic fiable, du manque de système de surveillance dans certains pays endémiques et de symptômes cliniques non spécifiques dans la leptospirose humaine (Izurieta et al., 2008). Cette maladie représentant un problème de santé publique majeur, des améliorations dans l'élaboration d'un vaccin optimal, d'outils rapides de diagnostic et de prise en charge des patients sont nécessaires.

L'épidémiologie de la leptospirose et l'écologie des leptospires sont particulièrement compliquées compte tenu de la diversité génétique du genre *Leptospira*. Les leptospires sont des bactéries ubiquitaires dont les espèces peuvent être saprophytes (isolées de l'environnement et ne provoquant pas de maladie) ou pathogènes (responsables d'infections) et réparties en 64 espèces et plus de 300 sérovars. La survie des leptospires pathogènes dans l'environnement joue un rôle essentiel pour la transmission à l'homme ou l'animal. Bien qu'elles soient plus fréquemment isolées dans des

échantillons de sol, leur présence dans les eaux environnementales peut expliquer une partie des contaminations humaines (Barragan et al., 2016; Thibeaux et al., 2017a).

Dans la littérature, de nombreux animaux ont été cités comme porteurs de leptospires : les porcs (Lee et al., 2014), les chevaux (Verma et al., 2013), les bovins (Cabral Pires et al., 2018), les chiens (Sant'Anna et al., 2017) et divers animaux sauvages (Dos Santos et al., 2017; Mohammed et al., 2011). Parmi eux, les rongeurs et principalement les rats sont des réservoirs asymptomatiques et représentent les principaux vecteurs de la maladie (Mwachui et al., 2015; Zilber et al., 2016).

1. Leptospirose

La leptospirose est une infection bactérienne zoonotique qui sévit dans le monde entier, à dominante tropicale et constituant un enjeu de santé publique (Picardeau, 2015a). En 1886, Adolf Weil décrit les premiers cas cliniques (formation d'ictères) de ce qui s'appellera plus tard, la maladie de Weil (1886). Dès les années 1900, de premières descriptions des spirochètes sont relatées par Stimson, après observation de tissus de patients atteints de fièvre jaune (1907). La responsabilité des leptospires dans la maladie de Weil ou leptospirose est relatée dans les publications de l'équipe de Inada (Inada and Kaneko, 1915) suivie par celle de Noguchi (Noguchi, 1919). Touchant plus d'un million de personnes par an dans le monde, elle entraine le décès d'environ 60 000 personnes (Costa et al., 2015; Ko et al., 2009). Le taux de mortalité peut varier d'un pays à l'autre et malgré qu'elle soit parfois sous-estimée du fait de la difficulté du diagnostic (Costa et al., 2015). La leptospirose est considérée comme une maladie émergente du fait du réchauffement climatique et de l'urbanisation grandissante notamment dans les pays tropicaux. L'ensemble des mammifères peuvent être porteurs de leptospires et principalement les rats, animaux ubiquitaires à travers le monde.

1.1. Epidémiologie

L'épidémiologie étudie les facteurs qui entrent en jeu dans l'apparition et le développement des maladies, que ces facteurs soient individuels ou environnementaux.

1.1.1. Situation mondiale

La leptospirose est l'une des zoonoses les plus répandues à travers le monde. Par manque d'informations des populations et de données locales sur sa morbidité et sa mortalité, elle reste également une maladie tropicale négligée dans certaines zones géographiques.

Dans leur étude, Munoz-zanzi et son équipe ont établis une carte recensant les différentes épidémies de leptospirose relatées dans la littérature, entre 1970 et 2012 (Munoz-Zanzi et al., 2020).

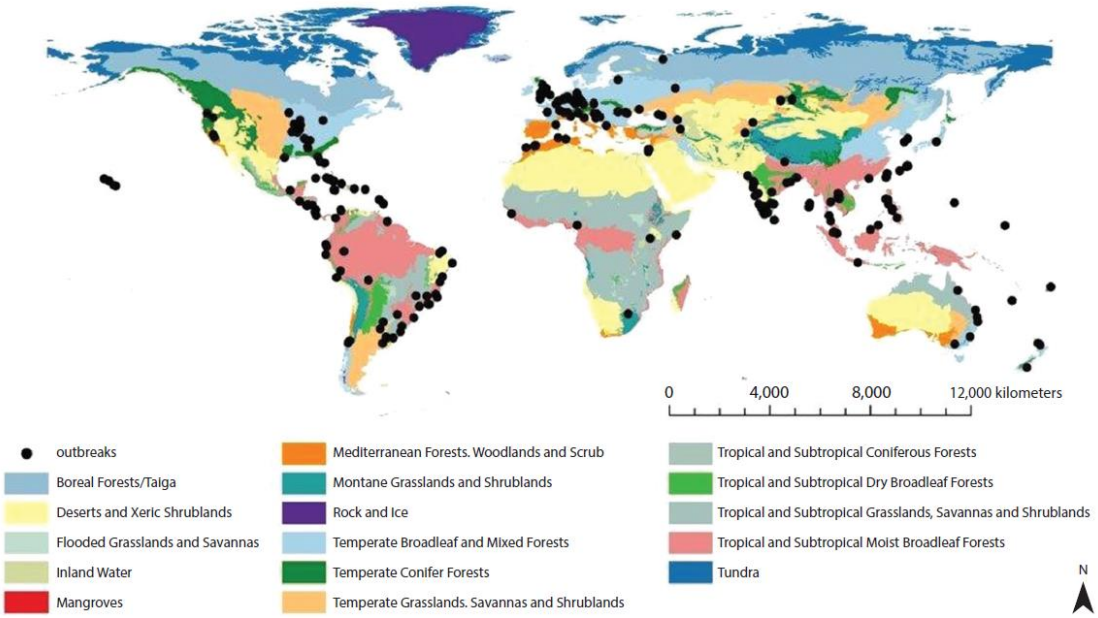


Figure 1. Carte des épidémies de leptospires relatées dans la littérature entre 1970 et 2012, en fonction des différentes écorégion définies par Olson 2001, tiré de Munoz-Zanzi 2020.

Les zones géographiques ayant rapportés le plus grand nombre d'épidémies sont l'Amérique latine avec 35,8% (principalement au Brésil et à Cuba), l'Asie du Sud avec 12,9% et l'Amérique du Nord avec 10,7%. Même si cette étude ne mentionne pas les épidémies survenues depuis 2012, elle synthétise une quantité considérable d'informations relatives aux épidémies et donne un premier aperçu de la localisation de la plupart des études.

Il est important de faire la distinction entre les pays rapportant de nombreuses épidémies (Figure 1) et ceux dans lesquelles l'incidence est la plus élevée (Figure 2). Dans certaines régions, la littérature ne relate quasiment aucune épidémie de leptospirose par manque d'informations ou de méthodes de diagnostic, alors que l'incidence y est supposée très élevée comme en Afrique. Pour cela, Costa et ses collaborateurs ont mis en place une estimation mondiale de la morbidité liée à la leptospirose, ajustée en fonction de l'âge et du sexe (Costa et al., 2015).

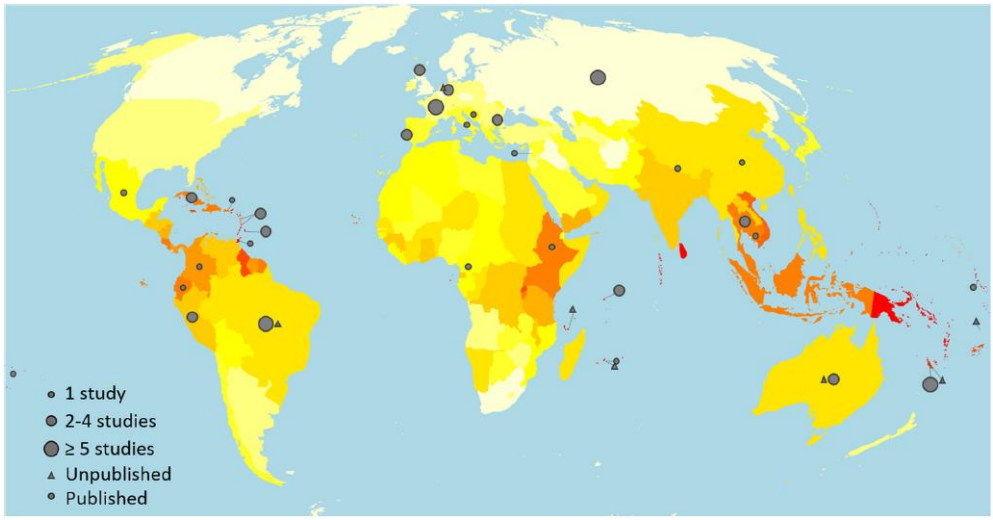


Figure 2. Estimation de la morbidité annuelle de la leptospirose par pays ou territoire, tiré de Costa 2015.

L'incidence annuelle de la leptospirose est illustrée par une variation de couleur. Elle indique le nombre de cas pour 100 000 habitants : blanc (0–3), jaune (7–10), orange (20–25), rouge (>100). Les études recensées dans cette publication sont signalées par les différentes formes (cercle et triangle).

Au niveau mondial, la morbidité et la mortalité annuelles incombant à la leptospirose sont respectivement estimées à 15 cas et 1 décès, pour 100 000 habitants (Tableau 1). Les incidences les plus fortes (nombre de cas pour 100 000 habitants) sont retrouvés en Océanie (151), en Asie du Sud-Est (56), aux Caraïbes (51) et en Afrique subsaharienne orientale (26).

Tableau 1. Estimation annuelle de la morbidité et de la mortalité selon les régions définies par le GBD (Global Burden of Disease), tiré de Costa 2015.

GBD régions	**Morbidité [a]**	**Cas**	**Mortalité [a]**	**Décès**
	Estimation (intervalle de confiance à 95%)			
Total des régions GBD	14,77 (4,38–25,03)	1 030 000 (434 000–1 750 000)	0,84 (0,34–1,37)	58 900 (23 800–95 900)
Asie-Pacifique à revenu élevé	6,95 (2,51–11,87)	14 800 (5 300–25 100)	0,31 (0,13–0,52)	700 (300–1 100)
Asie centrale	5,53 (2,07–9,51)	4 400 (1 600–7 300)	0,29 (0,12–0,49)	200 (100–400)
Asie de l'Est	10,28 (3,58–18,28)	142 000 (49 400–252 000)	0,50 (0,19–0,88)	6 900 (2 600–12 200)
Asie du Sud	17,97 (6,20–32,25)	289 000 (99 800–519 000)	1,02 (0,41–1,71)	16 500 (6 500–27 600)
Asie du Sud-Est	55,54 (20,32–99,53)	266 000 (97 500–477 000)	2,96 (1,65–4,93)	14 200 (5 600–24 000)
Australasie	9,13 (2,79–16,36)	2 400 (700–4 200)	0,40 (0,16–0,69)	100 (0–200)
Caraïbes	50,68 (14,93–87,58)	22 300 (6 700–34 700)	2,90 (1,14–4,72)	1 300 (500–1 900)
Europe centrale	4,02 (1,21–6,85)	4 800 (1 500–8 200)	0,21 (0,08–0,33)	200 (100–400)
Europe de l'Est	1,43 (0,51–2,69)	2 900 (1 100–5 500)	0,09 (0,04–0,16)	200 (100–300)
Europe de l'Ouest	3,90 (1,45–6,49)	16 300 (6 100–27 100)	0,18 (0,07–0,29)	800 (300–1 200)
Amérique latine (Andes)	21,90 (7,92–39,82)	11 700 (4 200–21 200)	0,96 (0,37–1,68)	500 (200–900)
Amérique latine centrale	15,77 (5,83–27,37)	36 000 (12 300–62 400)	0,68 (0,27–1,15)	1 600 (600–2 600)

Amérique latine méridionale	3,87 (1,43–6,74)	2 400 (900–4 100)	0,18 (0,07–0,31)	100 (0–200)
Amérique latine tropicale	13,53 (4,47–26,56)	27 300 (9 000–53 200)	0,66 (0,23–1,28)	1 300 (500–2 600)
Afrique du Nord / Moyen-Orient	7,30 (2,58–11,79)	33 300 (11 800–53 800)	0,34 (0,14–0,56)	1 600 (600–2 500)
Amérique du Nord à revenu élevé	3,64 (1,02–6,50)	12 800 (3 600–22 900)	0,18 (0,07–0,31)	600 (200–1 100)
Océanie	150,68 (40,32–272,29)	16 700 (4 500–30 200)	9,61 (3,56–17,11)	1 100 (400–1 900)
Afrique subsaharienne centrale	13,49 (4,48–23,56)	13 100 (4 400–22 900)	1,33 (0,52–2,23)	1 300 (500–2 200)
Afrique subsaharienne orientale	25,65 (9,29–43,31)	91 100 (33 000–154 000)	1,87 (0,79–3,12)	6 700 (2 800–11 100)
Afrique subsaharienne australe	3,44 (1,34–5,78)	2 400 (900–4 100)	0,33 (0,13–0,53)	200 (100–400)
Afrique subsaharienne occidentale	9,67 (3,62–16,16)	32 000 (12 000–53 500)	0,85 (0,35–1,36)	2 800 (1 200–4 500)

[a] *Morbidité et mortalité sont indiqués en nombre de cas et nombre de décès pour 100 000 habitants.*

En l'absence de symptômes spécifiques, la leptospirose se confond avec d'autres maladies telles que le paludisme ou la dengue (Lozano, 2012) dans certaines zones géographiques.

A la suite de cela, un autre projet a été mené afin d'évaluer l'impact de la leptospirose concernant le nombre d'années de vie corrigé du facteur d'invalidité (DALYs) (Torgerson et al., 2015). Ce paramètre somme le nombre d'années de vie perdues à la suite des décès ou dues à des invalidités imputables à la leptospirose, pour l'ensemble des patients d'une même zone géographique (Figure 3).

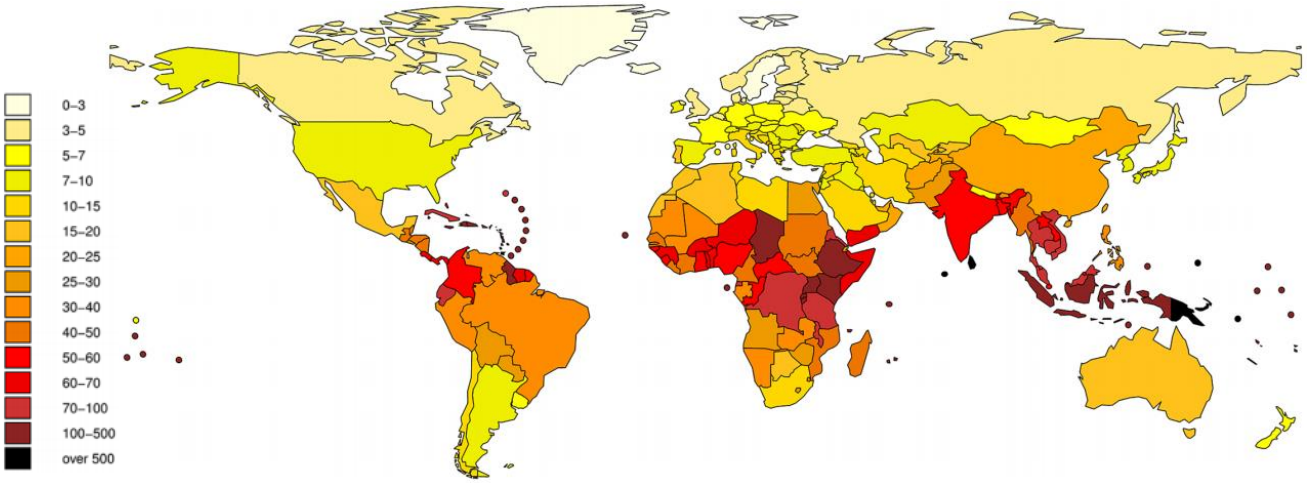


Figure 3. Répercussion de la leptospirose en nombre d'années de vie corrigé du facteur d'invalidité (DALYs) pour 100 000 habitants (issu de Torgerson 2015).

Pour certaines zones géographiques (ex : Caraïbes, Asie du Sud) le nombre élevé d'épidémies recensées dans la littérature (Figure 1) coïncide avec la forte morbidité estimée (Figure 2) ainsi que la valeur élevée de DALYs (Figure 3). Cependant, d'autres pays à forte prévalence bénéficient de peu d'analyse publiée (ex : Guyane) alors que le DALYs y est particulièrement élevé.

Avec 7,1 DALYs / 100 000 habitants, l'Europe de l'Ouest est placée 20ème/21 des régions mondiales (définies par le Global Burden of Disease) touchées par la leptospirose. La région la plus touchée est l'Océanie (515) et la moins touchée est l'Europe de l'Est (3,8).

Tableau 2. Estimation de la morbidité et de la mortalité par leptospirose par pays, appartenant à la sous-région Europe de l'Ouest définie par l'OMS (d'après Costa 2015).

Pays	Morbidité[a] (95% CI)	Mortalité[a] (95% CI)
Lichtenstein	31,44 (9,19 – 71,10)	1,19 (0,33 – 2,79)
Guernesey	13,57 (4,04 – 27,43)	0,56 (0,18 – 1,25)
Jersey	13,18 (4,02 – 26,43)	0,54 (0,15 – 1,10)
Portugal	8,50 (3,13 – 15,41)	0,38 (0,12 – 0,68)
Slovénie	7,68 (2,51 – 14,17)	0,35 (0,11 – 0,65)
Açores	6,55 (2,21 – 11,60)	0,35 (0,12 – 0,64)
Italie	5,94 (2,01 – 10,86)	0,26 (0,09 – 0,47)
Grèce	5,58 (1,99 – 9,79)	0,26 (0,09 – 0,45)
Croatie	5,34 (1,71 – 9,73)	0,27 (0,09 – 0,49)
Espagne	5,10 (1,85 – 9,10)	0,22 (0,07 – 0,39)
Ile de Man	4,94 (1,53 – 9,62)	0,23 (0,07 – 0,47)
Irlande	4,79 (1,67 – 9,16)	0,18 (0,06 – 0,35)
Israël	4,72 (1,55 – 8,87)	0,19 (0,06 – 0,34)
Autriche	4,53 (1,57 – 8,27)	0,21 (0,07 – 0,38)
Suisse	4,25 (1,44 – 7,66)	0,19 (0,06 – 0,36)
Malte	3,82 (1,26 – 7,18)	0,18 (0,05 – 0,34)
Saint-Marin	3,76 (1,21 – 6,88)	0,16 (0,05 – 0,30)
France	3,67 (1,28 – 6,85)	0,16 (0,05 – 0,29)
Andorre	3,54 (1,13 – 6,51)	0,15 (0,05 – 0,30)
Netherlands	3,50 (1,18 – 6,69)	0,16 (0,05 – 0,33)
Germany	3,04 (1,00 – 5,81)	0,15 (0,05 – 0,30)
République tchèque	2,78 (0,90 – 5,31)	0,14 (0,04 – 0,26)
Luxembourg	2,51 (0,83 – 4,87)	0,11 (0,04 – 0,22)
Danemark	2,42 (0,76 – 4,83)	0,12 (0,04 – 0,22)
Monaco	2,38 (0,79 – 4,55)	0,12 (0,04 – 0,24)
Finlande	2,31 (0,72 – 4,75)	0,11 (0,03 – 0,24)
Royaume-Uni	2,24 (0,72 – 4,27)	0,10 (0,03 – 0,20)
Norvège	1,74 (0,54 – 3,79)	0,08 (0,02 – 0,16)
Belgique	1,59 (0,52 – 3,49)	0,08 (0,02 – 0,15)
Suède	1,56 (0,46 – 3,17)	0,07 (0,02 – 0,15)
Islande	1,17 (0,35 – 2,46)	0,05 (0,01 – 0,10)

[a] *La morbidité et la mortalité sont signalées en nombre de cas pour 100 000 habitants*

1.1.2. Situation en France métropolitaine

En France, l'estimation de la morbidité est de 4 et celle de la mortalité est inférieure à 1 (en nombre de cas pour 100 000 habitants) (Tableau 2).

Les données de l'année 2020 ne seront disponibles qu'en fin d'année 2021, les résultats portent sur l'année précédente.

En 2019 et à l'image de ces 6 dernières années, l'incidence réelle avoisine la valeur d'1 cas pour 100 000 habitants, en France métropolitaine. Sur cette année, 676 cas de leptospirose ont été recensé, cette valeur est la plus forte enregistrée depuis le suivie de la maladie (CNR de la leptospirose, 2019).

Lors de l'identification sérologique par le test d'agglutination microscopique (MAT), le sérogroupe Icterohaemorrhagiae (ICT) est majoritairement identifié comme agent causant la maladie chez l'homme, et ce depuis plusieurs années (Figure 4) (CNR de la leptospirose, 2018).

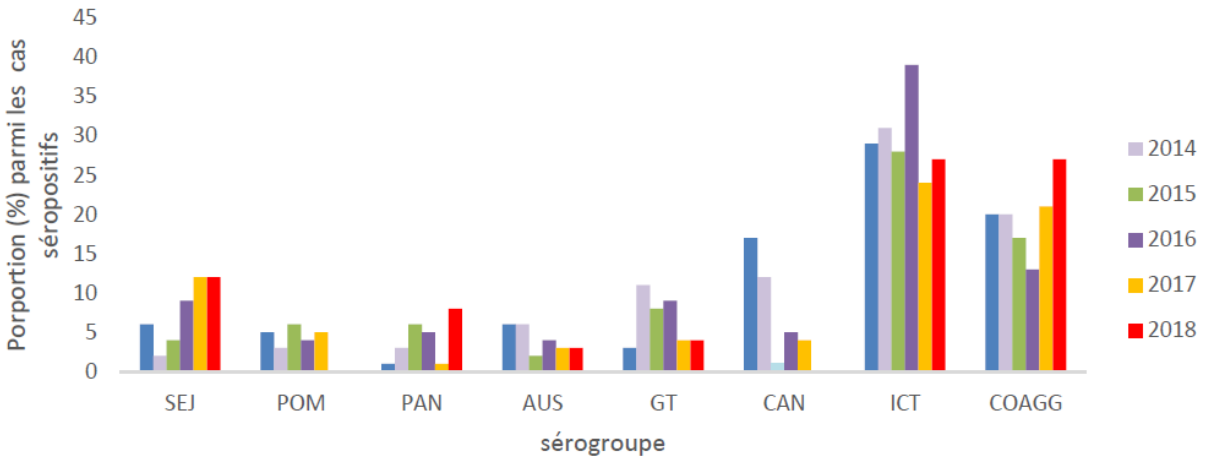


Figure 4. Distribution des principaux sérogroupes identifiés (MAT) parmi les cas de leptospirose humaine, tiré du rapport CNR 2018.

L'identification de la souche incriminée n'est pas réalisable pour environ un quart des cas, à cause de réactions croisées ou de phénomènes de coagglutinations (COAGG). Le second groupe le plus représenté est Sejroe (SEJ) dont l'augmentation est visible ces dernières années. Les autres sérogroupes identifiés Panama (PAN), Grippotyphosa (GT) et Australis (AUS) ne représentent qu'un faible pourcentage. En 2018, les sérovars Canicola (CAN) et Pomona (POM) n'ont pas été identifiés.

Certaines régions notent une augmentation du nombre de cas entre 2018 et 2019. La région Ile-De-France enregistre 153 cas (contre 82 en 2018). La Provence-Alpes-Côte d'Azur et la Bourgogne-Franche-Comté passent respectivement de 79 à 108 et de 25 à 40 sur la dernière année d'étude (Tableau 3).

Tableau 3. Incidence de la leptospirose par région, en France métropolitaine en 2019 (CNR 2019).

Région	Incidence (/100 000 hab.)	Région	Incidence (/100 000 hab.)
Corse	3,06	Hauts-de-France	0,85
Provence-Alpes-Côte d'Azur	2,16	Hauts-de-France	0,85
Bourgogne-Franche-Comté	1,41	Pays De La Loire	0,73
Nouvelle-Aquitaine	1,29	Grand Est	0,7
Île-de-France	1,27	Centre-Val De Loire	0,62
Normandie	1,05	Bretagne	0,58
Occitanie	1,02	Auvergne-Rhône-Alpes	0,55

La surveillance de la maladie est variable selon les régions et peut entrainer une sous-estimation du nombre de cas réels. Dans les régions ayant subis de graves cas de leptospirose, le personnel de santé est plus sensibilisé à la maladie et permet une meilleure identification des cas. C'est pourquoi ces dernières années, le nombre de cas a augmenté dans les régions Bretagne et Aquitaine à la suite d'événements sportifs aquatiques ayant entrainé des cas groupés (Guillois et al., 2018).

Dans les régions d'Outre-mer, l'incidence de la maladie est considérablement supérieure à celle en métropole et représente une priorité de santé publique : elle est multipliée par 12 en Guyane et jusqu'à 70 en Polynésie française (Tableau 4).

Tableau 4. Incidence de la leptospirose par régions d'Outre-mer en 2019 (CNR 2019).

Régions	Incidence/100 000 hab.
Polynésie française	72,63
Mayotte	54,84
Martinique	34,82
Guadeloupe	32,92
Nouvelle-Calédonie	22,34
Ile de la Réunion	14,49
Guyane	12,24
Total Outre-mer	30,34
Total Métropole	1,05

Au total 805 cas ont été recensés dans ces régions en 2019 (835 en 2018), contre une valeur maximale de 866 cas atteinte en 2017. Il faut cependant noter que depuis septembre 2014, la technique de MAT n'est plus remboursée et les demandes de ce test sont en baisse, entraînant nécessairement une perte d'informations. Aujourd'hui, l'ELISA IgM et la PCR sont les deux techniques, toutes deux remboursées, les plus utilisées pour le diagnostic de la leptospirose. La sous-estimation ou la diminution du nombre de cas d'une année sur l'autre dépend également du système de surveillance mis en place et de la sensibilisation des médecins locaux à la maladie et sont influencés par la survenue de cas au sein de ces régions.

De nombreuses études restent encore à mener dans les zones où la remontée des informations est partielle et les techniques de diagnostic ne sont pas encore mises en place. Ces travaux permettent de mieux appréhender les multiples facteurs influençant la prolifération de cette maladie.

1.1.3 Facteurs de risque

L'incidence de la leptospirose n'est pas égale à travers le monde et ceci peut s'expliquer par l'influence de nombreux paramètres épidémiologiques. Bien que certains soient liés à l'environnement, des facteurs anthropiques sont également impliqués. Augmentant l'apparition de phénomènes

météorologiques extrêmes dans les régions tropicales ou favorisant des comportements propices aux expositions récréatives dans des pays développés, le réchauffement climatique favorise la transmission de certains agents pathogènes d'origine hydrique tels que les leptospires (Lau et al., 2010; Rossati, 2017).

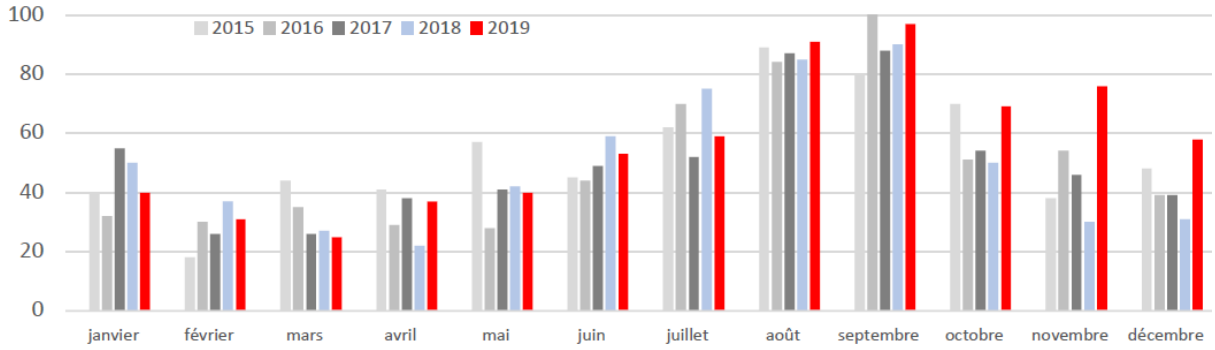


Figure 5. Répartition des cas de leptospirose en métropole au cours de la période 2015-2019 (tiré du rapport du CNR 2019-2020).

L'augmentation du nombre de cas observés en France depuis 2014 (Figure 5) n'est pas un cas isolé, on retrouve une augmentation similaire aux Pays-Bas (Pijnacker et al., 2016). La maladie suit une variation saisonnière (Figure 5). Dans les pays développés, sa forte prévalence sur la période estivale s'explique en partie par l'exposition liée aux activités aquatiques, très développées durant cette période : nage en eau vive, kayak, etc (Hochedez, 2015; Pagès et al., 2016).

Cette hausse est également retrouvée dans d'autres pays et les variations liées au climat sont des premiers éléments pouvant expliquer cette tendance. Les conditions climatiques favorisant la survenue d'épidémies de leptospirose sont principalement corrélées avec la présence d'un climat tropical humide. De nombreuses études ont permis d'établir un lien direct entre la survenue de catastrophes naturelles telles que les inondations (Casanovas-Massana et al., 2018a; Concepción-Acevedo et al., 2018; Ganoza et al., 2006; Mohd Radi et al., 2018; Mwachui et al., 2015; Weinberger et al., 2014), les crues (Haake and Levett, 2015) ou les ouragans (CNR 2019), et l'apparition de la maladie, entrainant une plus forte exposition des populations (Garba et al., 2017). Les populations exposées à ces phénomènes météorologiques sont plus vulnérables face à la leptospirose, d'autant plus si les conditions sanitaires restent précaires (Pagès et al., 2016, 2014). La promiscuité et le manque de mesure d'hygiène favorisent également la formation de foyers épidémiques (Ko et al., 2009).

Présente de manière endémique dans certaines régions du globe, la maladie peut aussi créer de plus petits foyers épidémiques (Morgan et al., 2002; Stern et al., 2010). En effet, outre l'exposition professionnelle ubiquitaire au niveau mondial, l'exposition dans les pays en développement est

majoritairement induite par les conditions de vie tandis que les pays développés sont principalement exposés durant les activités récréatives ou professionnelles.

Dans une étude réalisée de 1970 à 2012, Munoz et ses collaborateurs ont montré que l'exposition récréative, facteur climatique mais aussi anthropique, représente 22% des expositions, derrière l'exposition professionnelle (25%) et l'exposition aux eaux de crue (23%) (Munoz-Zanzi et al., 2020).

Indépendamment de la zone géographique, les hommes représentent 80% des cas de leptospiroses et ont majoritairement entre 20 et 50 ans. Cette prédominance s'explique principalement par l'exposition lors d'activité professionnelle, postes principalement occupés par les hommes (Cassadou et al., 2011; Munoz-Zanzi et al., 2020) (Tableau 5). Lors d'activités récréatives (ex : événement sportif), les femmes et les hommes étant exposés d'une manière similaire, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le sexe des candidats et le développement de la maladie (Agampodi et al., 2014; Morgan et al., 2002; Sejvar et al., 2003).

Tableau 5. Répartition de l'incidence de la leptospirose entre les femmes et les hommes à travers le monde (Costa 2015, Pasteur 2019).

Geographical Area of Study	Gender	Incidence per 100,000 inhabitants	Year of Data Collection
Africa	Female	8,6	1971 to 2008
	Male	25,5	1972 to 2008
Americas	Female	6,6	1973 to 2008
	Male	23,3	1974 to 2008
Asia and Oceania	Female	10,9	1975 to 2008
	Male	37,5	1976 to 2008
Europe	Female	2,3	1977 to 2008
	Male	7,8	1978 to 2008

La mobilité humaine internationale est également un facteur non négligeable de prolifération de la leptospirose, notamment lors de voyages dans des zones endémiques (ex : Asie du Sud Est) (Bandara et al., 2014).

D'autres facteurs entrent en considération concernant les conditions idéales de prolifération de la maladie. L'étude CAP (connaissance, attitude et pratique) (José and Oudou, 2013) dans les zones surpeuplées permet d'établir des stratégies de prévention contre la leptospirose. Ainsi, certaines mesures peuvent être mise en place et concernent principalement l'amélioration des habitudes d'hygiène et une meilleure gestion des animaux porteurs (rongeurs), afin de limiter les potentiels

contacts avec l'homme (Nozmi et al., 2018). La précarité et la présence des rats jouent également un rôle considérable dans la flambée des cas (Costa et al., 2015; Roqueplo et al., 2019).

Outre les nombreux facteurs décrits précédemment, l'utilisation accrue des tests de diagnostic ces dernières années peut également être à l'origine d'une augmentation artificielle des cas humains de leptospirose.

Dans les prochaines années, l'impact du changement climatique sur la survenue de la leptospirose sera sans précédent : augmentation des habitats précaires (surpopulation des mégalopoles) et multiplication des événements climatiques extrêmes (dégradant les conditions sanitaires). Endémique dans certaines zones en développement et réapparaissant dans des régions développées (Strand et al., 2015), la leptospirose reste sous le scope des instances sanitaires et de nombreuses études sont encore à mener pour lutter contre cette maladie infectieuse. Les paramètres épidémiologiques, écologiques, socio-économiques, climatiques sont nécessaires à la mise en place d'une meilleure gestion globale de la maladie.

1.2. Réservoirs et cycle de transmission

1.2.1. Réservoirs

Considérée comme maladie principalement associée à l'animal, elle affecte aussi bien les mammifères sauvages que domestiques. On distingue les réservoirs asymptomatiques (principalement les rongeurs) des symptomatiques, dits sensibles (animaux d'élevage, animaux de compagnie. Dans les formes sévères, le schéma clinique chez l'animal sensible est majoritairement similaire à celui chez l'homme, ce qui peut conduire à de fortes pertes au sein des exploitations animales (avortements, baisse de production de lait, etc.). Sur ces exploitations, la présence de rats et de chiens représente un facteur de risque non négligeable de transmission de la maladie (Fávero et al., 2017). Certains génotypes retrouvés chez l'animal ont également été détectés chez l'homme. Ces données génotypiques sont à corréler avec les données épidémiologiques afin d'établir des preuves de transmission ainsi que le rôle des différents réservoirs éventuels de leptospires (Barragan et al., 2016). Les leptospires pathogènes se multiplient et se concentrent dans le système rénal des animaux porteurs, puis sont excrétées dans l'environnement à travers les urines (Ko et al., 2009; Villanueva et al., 2014). Elles peuvent persister dans l'environnement (sol, eau douce) pendant plusieurs mois, en fonction de la qualité du milieu (Andre-Fontaine et al., 2015).

Les rongeurs, en particulier les rats et les souris, sont considérés comme principaux réservoirs asymptomatiques de leptospires (Levett, 2001). Ils jouent un rôle important dans la transmission de la leptospirose et sont considérés comme les disséminateurs majoritaires de leptospires pathogènes dans l'environnement (Byers et al., 2019). Le rat brun (*Rattus norvegicus*) et le rat noir (*Rattus rattus*)

représentent la source d'infection prédominante pour les hôtes sensibles qu'ils soient animaux ou humains (Haake and Levett, 2015; Seguel et al., 2017). La prévalence des leptospires chez le rat varie considérablement selon les continents. Proche de zéro dans certaines parties du globe (Tanzanie et îles Féroé) elle est prédominante dans des pays tels que le Brésil, l'Inde ou les Philippines avec une prévalence supérieure à 80% (Boey et al., 2019; Faria et al., 2008). Récemment, une étude réalisée en Irak a également montré une présence élevée chez les rats (Karim and Abbas, 2021). Les souris peuvent également représenter un réservoir considérable de leptospires. Soupé-Gilbert et son équipe ont montré que les souris adultes excrèteraient une quantité importante de ces bactéries à chaque miction, pouvant atteindre 10^7 bactéries/mL d'urine (Gerault et al., 2017). Dû à la grande quantité d'urine rejetée journalièrement par les grands mammifères (ex : bovins), ils représentent les producteurs majoritaires de leptospires (10^9 bactéries/jour) (Barragan et al., 2017).

En Europe, la prévalence des leptospires chez les rats a été recensée dans divers pays, et majoritairement en France, en Italie et au Royaume-Uni (Tableau 6).

Tableau 6. Prévalence de leptospires chez les rats dans les pays d'Europe (tiré de Boey 2019, mis à jour).

Localisation géographique	Nombre d'articles	Séroprévalence	Prévalence moléculaire/ culture/autre	Sérovars détectés	Espèce	Références
Autriche	2	25%	0%-36%	ND	RN	Heuser 2016, Desvars-Larrive 2020
Açores (Portugal)	2	55.0%	20.9%–26.4%	Aborea, Ballum, Icterohaemorrhagiae, Sejroë	RN, RR	Collares Pereira 1997, 2001
Danemark	2	ND	20.0%–52.5%	Icterohaemorrhagiae, Pomona, Sejroë	RN	Heuser 2016, KRØJGAARD 2009
Iles Féroé (Danemark)	1	ND	0%	ND	RN	Jensen 2015
Finlande	1	60.0%	9.5%–61.0%	Icterohaemorrhagiae	RN	Rislakki 1955
France	6	36.1%–100%	0%–66.7%	Cynopteri, Copenhageni, Icterohaemorrhagiae, Magnus, Sejroë	RN	Socolovschi 2011, Aviat 2009, Ayral 2015, Ayral 2015.2, Zilber 2016, Desvars-Larrive A,2017
Germany	1	ND	15.1%–17.2%	ND	RN	Heuser 2016
Hongrie	1	ND	0%	ND	RN	Heuser 2016
Italie	5	18.2%–69.6%	29.9%–45.5%	Ballum, Icterohaemorrhagiae	RN, RR	Ammadeo 1996, Pezzella 2004, Vitale 2007, 2017, Magi 2020
Portugal	1	ND	50.0%	ND	ND	Ferreira 2014
Spain	1	ND	5.9%	Icterohaemorrhagiae	RN, RR	Millan 2017
Suède	1	16.7%	ND	Icterohaemorrhagiae, Istrica	RN	Stand 2015
Suisse	1	ND	10.3%	ND	RN	Heuser 2016
Royaume-Uni	4	1.2%–3.9%	0%–41.7%	Bratislava, Icterohaemorrhagiae, Ballum	RN	Broom 1953, Michna 1974, Middleton 1929, Webster 2015

ND : non détecté. RN : Rattus norvegicus. RR : Rattus rattus.

La séroprévalence indique que le système immunitaire a développé des anticorps contre les leptospires (infections récente ou ancienne). Elle est très variable selon les pays et peut atteindre 100% dans une étude réalisée en France. La prévalence moléculaire indique la présence des leptospires dans

les tissus et peut être très hétérogène (de 0 à 66%). Il semble nécessaire de mener des études locales pour préciser ce portage. Le sérovar Icterohaemorrhagiae et l'espèce *Rattus norvegicus* ont été majoritairement identifiés, suivi des sérovars Ballum et Sejroë.

D'autres rongeurs peuvent être impliqués dans la transmission de la leptospirose. Parmi ces espèces, certaines sont sauvages (castor, ragondins, campagnol, mulot, musaraigne) tandis que d'autres sont domestiques mais sensibles (hamster, gerbille, chinchillas, cochon d'Inde) (Marquez, 2019). Outre ces rongeurs, d'autres espèces de mammifères sauvages peuvent également être porteurs asymptomatiques de leptospires : vison, martre (Moinet et al., 2010), chauves-souris (Dietrich et al., 2018), etc.

La plupart des sérotypes sont spécifiques de l'espèce animale réservoir. La base de la spécificité des leptospires vis-à-vis de leur hôte est mal connue. Elle peut résulter d'une adaptation entre un sérovar et un hôte (Cordonin et al., 2020) ou seulement dépendre des contraintes écologiques limitant les interactions avec d'autres hôtes spécifiques. Chez le rat brun, la plupart des sérovars appartiennent au sérogroupe Icterohaemorrhagiae, responsable de nombreuses infections chez l'homme et notamment des formes graves (Picardeau, 2013). Certains sérovars sont adaptés à un réservoir animal spécifique. La majorité du temps cette adaptation n'entraine pas de signes chez l'hôte réservoir (asymptomatique). Cependant, le même réservoir infecté par un autre sérovar peut entrainer des signes de la maladie.

Des études récentes ont recensé la diversité et la répartition des espèces de leptospires retrouvées chez l'hôte humain ou animal (réservoirs symptomatiques et asymptomatiques). Le Tableau 7 est un exemple de répartition des différents sérogroupes de leptospires identifiés dans les cas de leptospiroses humaine ou animal, au Brésil.

Tableau 7. Sérogroupes infectieux présumés dans les cas de leptospirose retrouvés chez différents hôtes, Rio Grande do Sul, 2013-2015 (Polo 2019).

Sérogroupe	Espèces					Total
	n (% sérogroupes totaux)					
	Humain	Bovin	Canin	Equin	Autres	n (% total)
Andamana	4 (100)	-	-	-	-	4 (1,04)
Australis	12 (42,86)	7 (25,00)	1 (3,57)	8 (28,57)	-	28 (7,27)
Autumnalis	1 (9,09)	3 (27,27)	1 (9,09)	6 (54,55)	-	11 (2,86)
Ballum	6 (100)	-	-	-	-	6 (1,56)
Bataviae	2 (66,67)	1 (33,33)	-	-	-	3 (0,78)
Canicola	3 (33,33)	-	3 (33,33)	3 (33,33)	-	9 (2,34)

Castellonis	-	1 (100)	-	-	-	1 (0,26)
Celledoni	-	9 (39,13)	6 (26,09)	7 (30,43)	1 (4,35)	23 (5,97)
Cynopteri	3 (60,00)	-	2 (40,00)	-	-	5 (1,30)
Djasiman	1 (100)	-	-	-	-	1 (0,26)
Grippotyphosa	7 (77,78)	2 (22,22)	-	-	-	9 (2,34)
Hebdomadis	2 (33,33)	4 (66,67)	-	-	-	6 (1,56)
Icterohaemorrhagiae	18 (50,00)	10 (27,78)	4 (11,11)	2 (5,56)	2 (5,56)	36 (9,35)
Javanica	1 (33,33)	1 (33,33)	-	1 (33,33)	-	3 (0,78)
Mini	-	1(100)	-	-	-	1 (0,26)
Panama	1 (11,11)	2 (22,22)	2 (22,22)	4 (44,44)	-	9 (2,34)
Pomona	6 (60,00)	4 (40,00)	-	-	-	10 (2,60)
Pyrogenes	3 (75,00)	-	-	1 (25,00)	-	4 (1,04)
Sejroe	9 (4,62)	142 (72,82)	-	19 (9,74)	25 (12,82)	195 (50,65)
Semaranga	4 (100)	-	-	-	-	4 (1,04)
Shermani	2 (100)	-	-	-	-	2 (0,52)
Tarassovi	5 (33,33)	-	-	10 (66,66)	-	15 (3,90)
TOTAL	90	187	19	61	28	385

Cette étude réalisée entre 2013 et 2015 au Brésil permet d'avoir un aperçu de la prédominance des sérovars majoritairement impliqués (Polo et al., 2019). Chez l'homme, le sérogroupe Icterohaemorrhagiae est retrouvé dans plus de 20% des cas. Les bovins et les équins semblent être principalement touchés par les sérogroupes Sejroe (76% et 89% respectivement), Pomona (Verma et al., 2013) et Hardjo (Ellis et al., 1986) ; tandis que les canins semblent être affectés par le sérogroupe Celledoni (32%) et Canicola (Morrison and Wright, 1976).

Dans leur étude de 2020 réalisée aux Caraïbes et en Amérique centrale, Noda et son équipe ont également étudié la répartition des espèces de leptospires. Le lien entre l'hôte et l'espèce impliquée dans la maladie varie avec la localisation géographique (Noda et al., 2020) (Figure 6).

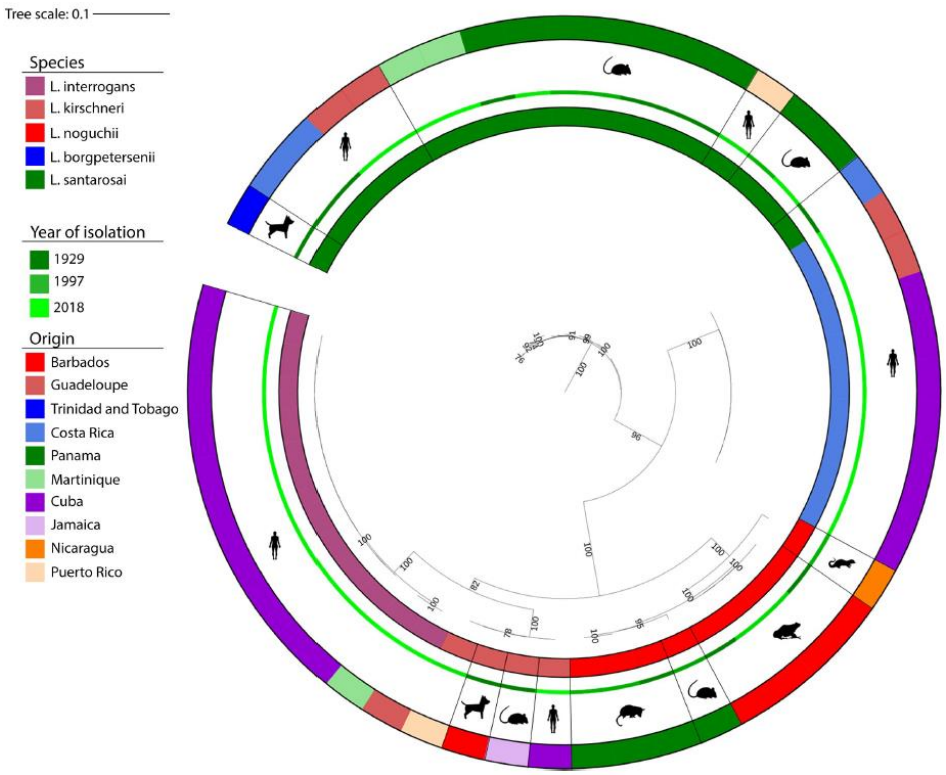


Figure 6. Phylogénie MLST des souches de leptospire isolées aux Caraïbes et en Amérique centrale (n = 53) (Noda 2020).

Les séquences ont été collectées sur la base de données accessible au public pubMLST ainsi qu'à l'Institut Pasteur, De l'intérieur vers l'extérieur, les cercles représentent respectivement l'espèce, l'année d'isolement et l'origine, La nature de l'hôte d'isolement est signalée par les silhouettes (humain, chien, amphibien, rat / rongeur, opossum et belette).

Absente de Cuba, *L.santarosai* est prédominante dans la majorité des pays étudiés (Costa Rica, Trinité-et-Tobago, Guadeloupe, Martinique et Panama) et a été isolée dans différents hôtes : les chiens, les humains et les rongeurs. *L.interrogans*, impliquée dans la plupart des infections humaines, a été principalement retrouvée à Cuba (50% des échantillons), en Guadeloupe, en Martinique (Noda et al., 2020) ainsi qu'à St Kitts-et-Nevis (Rajeev et al., 2020). De manière surprenante, *L.interrogans* n'a pas été isolée dans l'étude de Moseley et de son équipe réalisée à Johannesburg (Moseley et al., 2020). Les conditions environnementales (hivers froids et secs) à Johannesburg pourraient probablement limiter sa transmission. Seule l'espèce *borgpetersenii* a été retrouvée chez l'ensemble des rongeurs infectés.

Guglielmini et collaborateurs ont également étudié la distribution des espèces à travers les différents continents (Figure 7) (Guglielmini et al., 2019)). *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* sont les espèces retrouvées dans l'ensemble des régions du monde. *L.kirschneri* a été plus fréquemment retrouvée en Europe et à Mayotte qu'en Asie et en Amérique. Pour *L. santarosai, L. noguchi et L. mayottensis*, leur présence n'a pas été identifiée sur l'ensemble du globe mais dans des zones géographiques

spécifiques sur : le continent américain et les Caraïbes, en Amérique, sur les îles de l'océan Indien, respectivement.

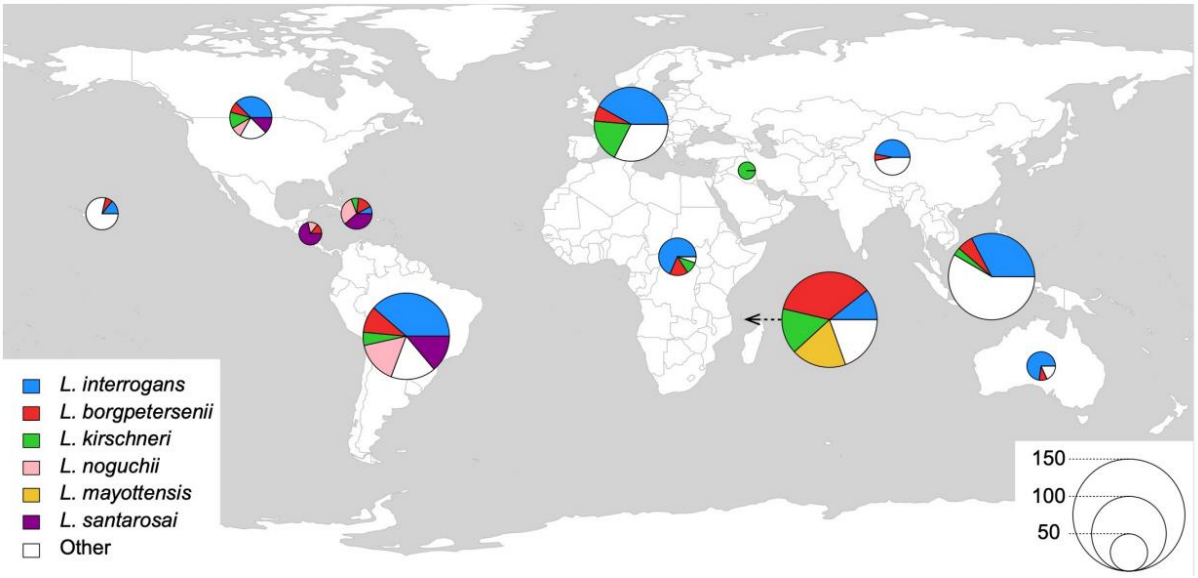


Figure 7. Diversité et répartition des espèces de leptospires pathogènes les plus fréquentes selon chaque région géographique (tiré de Guglielmini 2020).

Les différentes régions du monde sont représentées par les formes circulaires avec de gauche à droite : Océan Pacifique, Amérique du Nord, Amérique centrale, Caraïbes, Amérique du Sud, Europe, Afrique, Moyen-Orient, Océan Indien, Asie, Asie du Sud-Est, Océanie. La taille des cercles est proportionnelle au nombre d'espèces isolées. La catégorie « Autres » comprend toutes les espèces pathogènes non citées précédemment (Guglielmini et al., 2019).

Zakharova et collaborateurs ont recensés 434 épidémies de leptospirose chez les animaux entre 1995 à 2019 dans une province russe (Zakharova et al., 2020). Durant cette période, 2728 animaux ont été contaminés dont 31,4% de bovins et 57,2% de chevaux. Le reste des infections se répartit en moindre proportions entre les porcs (7.6%), les moutons (1.2%) et d'autres animaux domestiques ou sauvages (2.6% pour les chats, les chiens, les rennes et les lapins). Ceci illustre la diversité des réservoirs susceptibles d'être infectés ainsi que la variabilité dans le taux d'infection de chaque espèce animale. Plus globalement, la séroprévalence chez les bovins peut atteindre 84% (de Freitas et al., 2010). Chez le chien, la maladie présente une évolution variable, de l'ictère à l'hémorragie (Adler and Moctezuma, 2010) et la séroprévalence peut atteindre 35% (Gay et al., 2014; Schuller et al., 2015). Elle diffère selon les saisons et la localisation géographique (Lee et al., 2014). Le sérogroupe Icterohaemorrhagiae est fréquemment retrouvé dans les infections canines (Bertasio et al., 2020).

Sauf en cas d'immunodéficience (sida félin), les chats sont asymptomatiques vis-à-vis de la maladie (Azócar-Aedo et al., 2014; Beaudu-Lange and Lange, 2014). Une évolution chronique de la maladie est

fréquente chez les chevaux (Timoney et al., 2011; Verma et al., 2013) tandis que la forme asymptomatique prédomine chez le mouton (Cerri et al., 1996; Lilenbaum et al., 2009). De manière ponctuelle, quelques cas de leptospirose ont été décrits chez des animaux sauvages (loup, otarie, chevreuil, chauve-souris) (Andreoli, 2014; Avalos-Téllez et al., 2016; "DICEROS BICORNIS MICHAELI)," 2001; Dietrich et al., 2015), ou des animaux d'élevage (visons et martres d'Amérique, campagnols aquatiques) (Gelling et al., 2015; Moinet et al., 2010). Les animaux infectés deviennent à leur tour réservoirs secondaires de la leptospirose (Allan et al., 2015; Lilenbaum and Martins, 2014; Schneider et al., 2015). Malgré l'isolement de quelques leptospires chez des amphibiens et des reptiles, les animaux à sang froid ne sont pas considérés comme jouant un rôle dans la transmission humaine de la leptospirose.

1.2.2. Cycle de transmission

L'homme peut être infecté par contact direct ou indirect avec l'animal réservoir, tandis que la transmission interhumaine est rare (Figure 8).

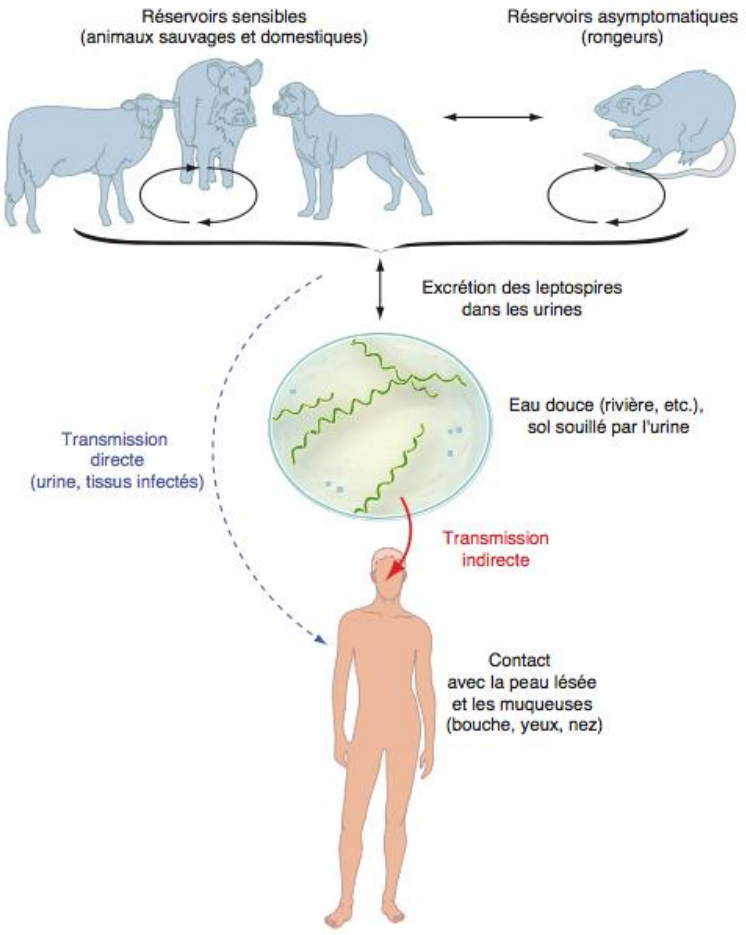


Figure 8. Cycle de transmission de la leptospirose (Bourhy et al., 2012b).

L'infection de l'homme aux leptospires peut se faire lors d'un contact direct avec des tissus ou de l'urine provenant d'animaux infectés (sauvages ou domestiques).

L'homme peut également être contaminé de manière indirecte par contact avec un environnement souillé. En effet, les leptospires des animaux infectés se retrouvent excrétés dans l'environnement via leurs urines et contaminent l'eau ou le sols (Ko et al., 2009; Koizumi et al., 2009). C'est pourquoi, la plupart des infections humaines est dû à une exposition environnementale à ces matrices contaminées. Cette exposition a lieu pendant une exposition professionnelle (égoutiers, agriculteurs, etc,) ou lors d'activité de loisirs (baignade/natation en eau de surface, kayak, etc.).

Certains professionnels faisant partie des personnes à risques (égoutiers, employés d'urbanisme, militaire) peuvent être contaminés par des leptospires pathogènes, rejetés par les rongeurs dans l'eau ou sur toute surface ou objet contaminés (Brinker and Blazes, 2017; Neela et al., 2019). En contact avec des animaux potentiellement porteurs de leptospires pathogènes, vétérinaires et agriculteurs sont également une cible potentielle (Brightman, 2018; Wasiński and Dutkiewicz, 2013). L'utilisation intensive des terres par l'homme modifie l'habitat des animaux dans ces zones. Cette modification peut entrainer une exposition directe ou indirecte à certains animaux, dont certains peuvent être vecteurs de leptospires tels que les rongeurs. Ceci peut également conduire à l'introduction de nouvelles espèces de leptospires, initialement absente à l'état naturel (Herrera et al., 2020). Dans leur étude réalisée aux Seychelles, Biscornet et collaborateurs ont montré que sur 213 cas de leptospirose, 30% des patients étaient des agriculteurs ou paysagistes (Biscornet et al., 2020). Au Maroc la majorité des professionnels contaminés par les leptospires semble être des travailleurs du secteur agricole (45/121) et des vendeurs de denrées alimentaires sur les marchés (ex : poissonniers (42/161)) d'après El Azhari (Azhari et al., 2020). Ces deux lieux de travail dépourvus de conditions d'hygiène sont propices à la survie d'un grand nombre de rongeurs et leur fournissent une source abondante de nourriture. Dans les pays de l'UE, les cas liés au travail représentent entre 30% et 50% de la leptospirose humaine (Abgueguen et al., 2008; Jansen et al., 2005; Taseva et al., 2007), L'amélioration des mesures de prévention concourt à réduire l'importance relative de ces risques professionnels.

En ce qui concerne l'exposition lors d'activité récréatives, la leptospirose touche de plus en plus de pratiquants de loisirs aquatiques (sports d'eaux vives, pêche, etc.) et de voyageurs en zone tropicale (Bourhy, 2016; Sejvar et al., 2003). En 1998 dans l'Illinois, une épidémie de leptospirose a été révélée à la suite d'un triathlon, parmi les athlètes et les habitants locaux : 11% des athlètes testés (474/876) et 6% des résidents (14/248) étaient positifs aux leptospires (Morgan et al., 2002). De la même manière d'autres études ont mis en évidence des épidémies similaires lors de compétitions sportives : 3 % de cas lors d'un triathlon en Allemagne (Brockmann et al., 2010), 7% d'infection lors d'un trail aux USA

(Stern et al., 2010) et 5,6% de leptospirose lors d'un triathlon à la Réunion (Hochedez, 2015; Pagès et al., 2016). En Bretagne, un cluster de kayakistes a été identifié à la fin de la période estivale (Guillois et al., 2018). Parmi ces sportifs, tous présentaient des signes cliniques, mais seulement 8 ont été biologiquement confirmés. L'enquête faite sur ces infections a révélé que les patients appartenaient à 4 clubs de sport distincts s'entraînant sur une même rivière la Vilaine mais dans des zones différentes et que les infections s'étaient produites de manière isolée et en dehors de toute compétition sportive.

Lors de ces infections, des facteurs aggravants peuvent expliquer la survenue de l'épidémie entre les athlètes. L'ingestion accidentelle d'eau de surface contaminée (Stern et al., 2010), la présence de plaies ouvertes (Brockmann et al., 2010) l'utilisation de matériel de protection (combinaisons intégrales, lunettes de protection, etc.) ou une absence de sensibilisation (notamment pour les participants non licenciés) (Pagès et al., 2016) sont mis en évidence dans ces études. Ces activités ayant lieu principalement l'été, la maladie et le nombre de cas ont donc une évolution saisonnière, avec un pic durant la saison estivale. Cette augmentation saisonnière est également favorisée par la hausse des températures, élément favorable à la prolifération des leptospires dans l'environnement (Adler, 2015).

Dans leur étude réalisée entre 1970 et 2012, Munoz-Zanzi ont permis de caractériser en partie l'origine de l'infection recensée dans la littérature (Munoz-Zanzi et al., 2020). Pour 22% des épidémies (28/127), l'exposition a eu lieu lors de séance de natation récréative, de sports nautiques ou de baignade ; et ce de manière ponctuelle (Figure 9).

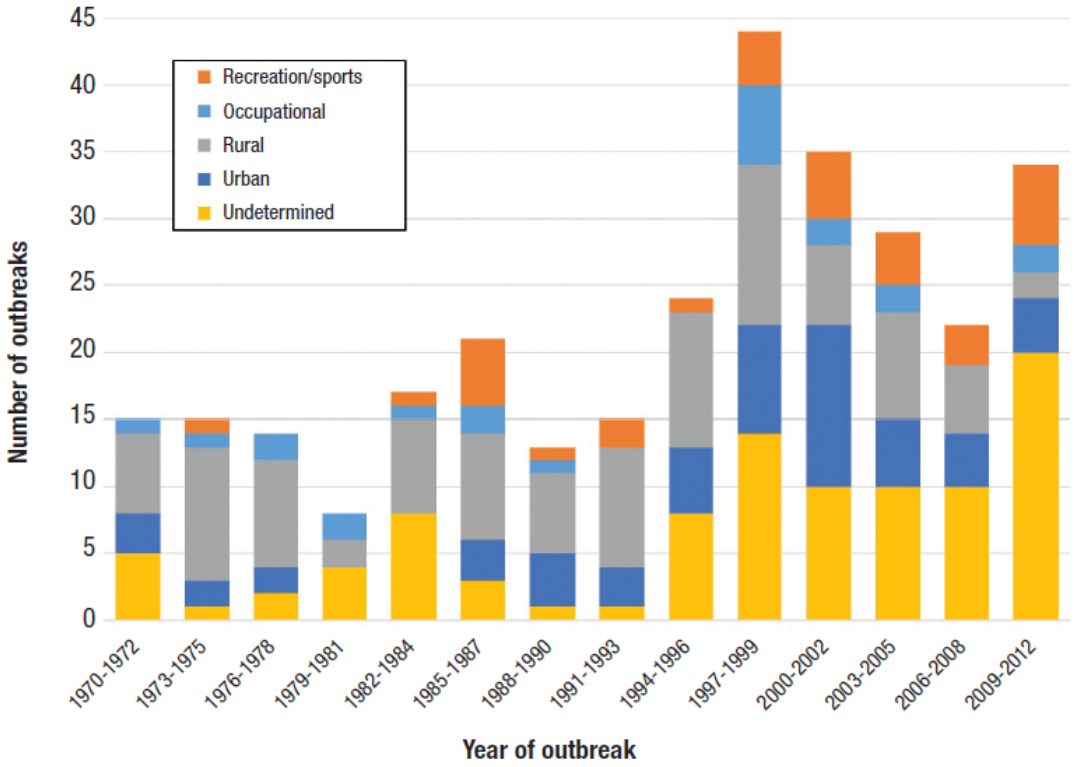


Figure 9. Répartition des épidémies de leptospirose humaine en fonction des conditions d'exposition, recensées dans la littérature entre 1970 et 2012 (n = 306) (Munoz-zanzi 2020).

Des épidémies supplémentaires (12) ont été recensées sur cette période mais n'apparaissent pas dans cette figure car aucune année d'apparition n'a été précisée.

D'autres cas d'infection ont été recensés de manière exceptionnelle. L'infection par ingestion d'une eau potable contaminée après traitement est possible mais extrêmement rare (Ramakrishnan et al., 2003; Vinetz et al., 2018). L'attrait grandissant pour les NAC (nouveaux animaux de compagnie) peut également représenter un risque potentiel d'infection par les leptospires pour les propriétaires. Entre 2009 et 2016, une étude réalisée en Belgique et en France a pu identifier 6 cas de leptospirose humaine, en lien avec un contact direct avec des rongeurs de compagnie (souris ou rats) (Mori et al., 2017). Les reins de ces animaux étaient porteurs de leptospires, principalement le sérogroupe Icterohaemorrhagiae, ce qui suggère une contamination via l'urine contaminée de ces animaux entraînant une forme grave. Chez certaines espèces animales, la leptospirose pourrait être sexuellement transmissible de manière exceptionnelle (Figueiredo da Costa et al., 2018).

1.3.Aspects cliniques

L'évolution clinique de la leptospirose est variable, allant de la forme anictérique bégnine (sans jaunisse) dans 90 % des cas à la défaillance multiviscérale pouvant entrainer la mort. Cette forme sévère se définit par l'apparition de graves complications (Adler and Moctezuma, 2010) telles que la formation d'un ictère (35%), d'une insuffisance rénale et/ou des atteintes viscérales et pulmonaires

(maladie de Weil). Dans les zones endémiques (Nicaragua, Pérou, Thaïlande), l'infection asymptomatique peut représenter un fort pourcentage, avec de 61% à 89% des cas étudiés (Bragg et al., 2000; Ganoza et al., 2010; Phraisuwan et al., 2002). La prolifération des leptospires dans l'organisme de l'hôte et la gravité des dégâts qui en découlent sont dépendantes de différents paramètres : l'inoculum lors de l'infection, la virulence de la souche incriminée (*Grippotyphosa* : syndrome grippal, *Icterohaemorrhagiae* : forme sévère) (HAS, 2011) ou encore les facteurs génétiques individuels sont autant de facteurs expliquant la diversité clinique de la maladie (Bharti et al., 2003; Levett, 2001).

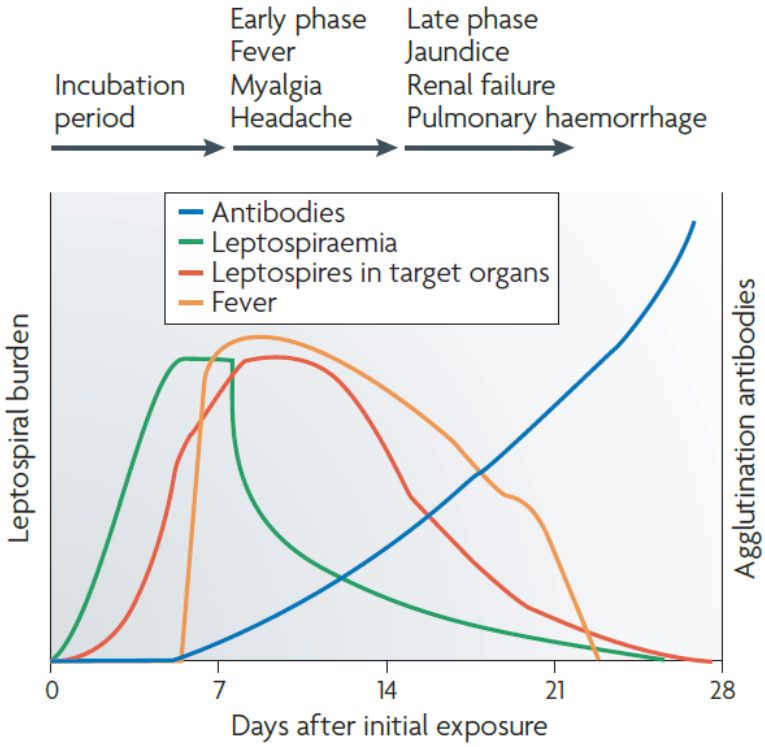


Figure 10. Cinétique de la leptospirose (Ko 2009).

Dans les premiers jours suivant l'exposition, l'infection entraine la prolifération des leptospires dans le sang, puis la colonisation se poursuit au sein des tissus de certains organes comme le foie, les poumons et les reins (Figure 10). Après 10 jours d'incubation en moyenne (de 2 à 26 jours), les premiers signes cliniques se manifestent chez l'homme avec la survenue de fièvre élevée associée à des frissons, de myalgies et de maux de tête pour la plupart des patients. Ils représentent les symptômes les plus fréquemment identifiés dans les études d'épidémie : 90% des cas lors d'une épidémie en Malaisie (Philip et al., 2020) et 75 % lors d'un événement aux Seychelles (Biscornet, 2020). Non spécifiques de la leptospirose, ces symptômes ne permettent pas un diagnostic clinique précis et sont souvent associés à un syndrome grippal. Il est donc nécessaire de mener des recherches complémentaires afin d'identifier une autre infection bactérienne, virale ou parasitaire, en prenant en considération le

contexte d'infection. La production d'anticorps agglutinants a lieu de J5 à J14 post-exposition et permettent l'élimination des leptospires du sang et des organes touchés.

Bien que bégnine en phase précoce d'infection, un sous-ensemble de signes non spécifiques peut apparaître plus tardivement. Ils peuvent touchés différents organes tels que le système digestif (nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales) (Philip et al., 2020), le système pulmonaire (hémorragie pulmonaire, syndrome de détresse respiratoire aiguë) (Segura et al., 2005), le système neurologique, le système rénal (jaunisse, insuffisance rénale avec la maladie de Weil) (Al Hariri et al., 2019; Taylor et al., 2015).

Les symptômes cutanés sont rares et peuvent suggérer une autre pathologie comme la dengue ou la fièvre chikungunya (Burt et al., 2012; Zaki and Shanbag, 2010). L'altération de la conjonctive est un symptôme parfois présent mais souvent négligé. Dans une étude en Argentine, plus de 50% des patients testés présentaient cette atteinte conjonctive (Vanasco et al., 2008).

En cas d'aggravation en ictère hémorragique, une atteinte avancée de la leptospirose est à craindre (Haake and Levett, 2015). La gravité potentielle de la leptospirose peut entrainer une hospitalisation en soins intensifs (Chawla et al., 2004). Peu de cas de leptospiroses ont été rapportés chez les patients infectés par le VIH (Ganoza et al., 2006) ainsi que ceux ayant subis une transplantation d'organe (Song et al., 2016). La survenue de la maladie durant une grossesse peut entrainer des complications aussi bien pour la mère que pour l'enfant (Carles et al., 1995).

1.4.Traitement

1.4.1. Préventif

a. Hygiène et protections individuelles

Actuellement, la lutte contre les rongeurs et notamment les rats semble être la mesure la plus efficace pour lutter contre la maladie. Elle repose sur une meilleure gestion des populations de rongeurs (dératisation, hygiénisation locale) ainsi qu'une meilleure gestion des résidus alimentaires, facteur majeur de leur prolifération.

Cependant concernant l'exposition de l'homme aux leptospires, des mesures d'information (comme par exemple la diffusion de messages lors des périodes à risques (inondations)) et de protection restent plus faciles à mettre en place. Encore sous-évalués dans certains pays (Allan et al., 2015; Costa et al., 2015), la prise en compte des facteurs de risque par les populations est primordiale pour prévenir et diagnostiquer rapidement la maladie (Picardeau et al., 2014). En ce sens, l'amélioration de la qualité de vie permet de limiter le développement d'environnements insalubres, facteur conséquent dans l'infection par les leptospires (Haake and Levett, 2015).

En termes de prévention, les professionnels potentiellement exposés au cours de leur activité doivent recourir à des équipements de protection individuelle (tenue et chaussures de protection, gants et masque de protection), ainsi qu'à des gestes de soins d'urgence en cas d'infection.

b. Vaccins

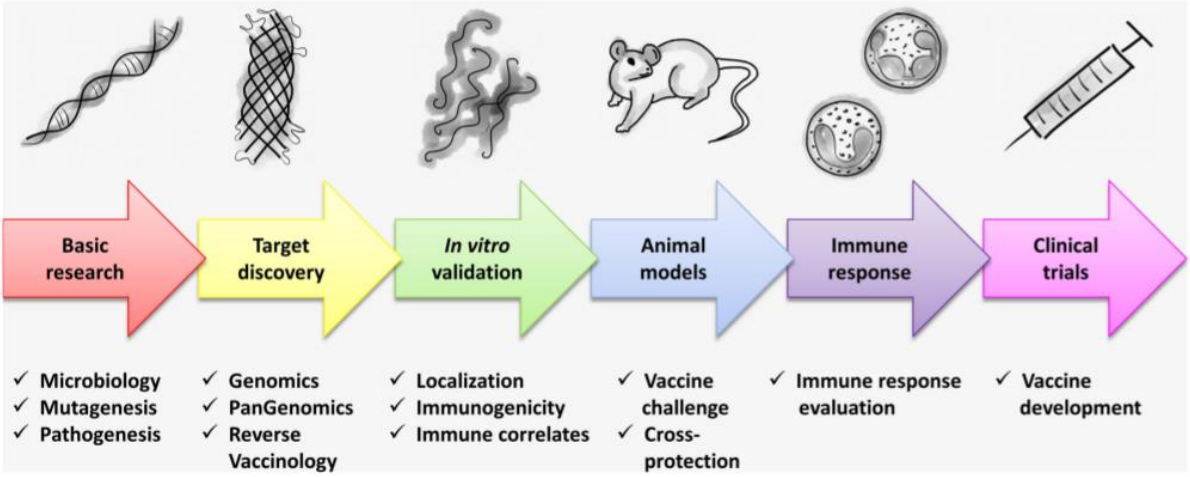


Figure 11. Ce schéma représente les différentes étapes de mise au point d'un vaccin, ici contre la leptospirose (Grassmann 2017).

La conception des vaccins est un processus long et relativement complexe nécessitant la mise en place de nombreuses étapes allant de la recherche fondamentale en microbiologie ou en mutagenèse, jusqu'aux essais cliniques (Figure 11). Leur développement dépend de l'évolution de la recherche fondamentale en microbiologie et en biologie moléculaire. Les études génomiques et pangénomiques sont nécessaires pour identifier les potentiels candidats vaccins. Une investigation plus approfondie de certaines des étapes décrites figure 11 est encore à mener (ex : étape de reverse vaccinology) et l'immunogénicité peut être évaluée dès l'étude in vitro (Grassmann et al., 2017). La réponse immunitaire protectrice n'est que partiellement établie et la protection croisée n'a pas été évaluée, la poursuite des recherches dans ce domaine est nécessaire.

Dans le cadre de la leptospirose, les bactéries sont très difficiles à isoler en culture et les outils de génétique moléculaire n'ont été développés que très récemment. Ceci explique le retard dans de nombreux domaines tels que la compréhension des mécanismes de virulence ou le développement des vaccins (Adler, 2015; Evangelista and Coburn, 2010).

Pendant près de cent ans de recherche, de nombreuses tentatives de vaccins ont été expérimentées (Ido, 1916). Les seuls vaccins autorisés utilisent des bactéries inactivées (Adler, 2015). Dans certains cas, les vaccins n'offrent qu'une immunité spécifique d'un sérogroupe (antigène vaccinal correspond

au LPS). Pour les vaccins canins, le vaccin multivalent confère une protection contre plusieurs sérogroupes. Les rappels doivent être fait tous les ans ou 2 ans.

En raison des mesures préventives et de la faible incidence dans la majorité des pays industrialisés, rares sont ceux produisant des vaccins. En Asie (Chine, Japon) et en Europe, les vaccins sont utilisés dans le cadre professionnel, pour prévenir l'apparition de la maladie (Nardone et al., 2004; Verma et al., 2013; Zamora et al., 2005). En 2004, une étude réalisée à Cuba a démontré une diminution de 80% des infections après vaccination (Martínez et al., 2004). Cette vaccination est recommandée pour les personnes exposées à des eaux ou animaux potentiellement contaminés dans leur cadre professionnel (égoutier, vétérinaire, etc.) (Bourhy et al., 2012). En France, dans les années 1970, l'Institut Pasteur a développé un vaccin à destination des égoutiers de la Ville de Paris, dirigé contre le sérovar Icterohaemorrhagiae, impliqué dans la majorité des formes humaines graves (Verma et al., 2013). Ce vaccin est maintenant commercialisé par la société Imaxio et il est l'un des seuls vaccins contre la leptospirose humaine utilisé à travers le monde.

Enfin, la recherche d'un vaccin à large spectre, c'est à dire protecteur contre un grand nombre de sérogroupes, est toujours en cours et pourrait apporter une couverture plus globale contre la leptospirose (Grassmann et al., 2017). Cependant, la difficulté de trouver un vaccin cross-protecteur et le fait que les régions endémiques sont, pour la plupart, des pays en voie de développement, limitant ainsi le marché et les débouchés d'un tel vaccin, ne semble pas encourager les compagnies pharmaceutiques à développer des projets dans ce sens.

Afin de lutter contre l'infection de l'homme liée à la dispersion environnementale des leptospires, il est primordial de considérer également la vaccination animale (animaux domestiques et d'élevage). La vaccination des chiens et du bétail est ainsi pratiquée dans certains pays (Ellis, 2015; Gay et al., 2014). En Nouvelle-Zélande, l'utilisation de vaccins a été mis en œuvre dans nombre d'élevages et une diminution considérable des cas humains dans cette région a été observée (Thornley et al., 2002). Elaboré à partir d'une combinaison de différents sérovars, le vaccin animalier couvre un spectre plus large que celui pour l'homme ; mais il présente également de plus sévères complications (Spiri et al., 2017).

Couteux et spécifique d'un sérovar (pour l'homme), il reste encore de nombreuses avancées et améliorations à entreprendre à l'avenir concernant les vaccins contre la leptospirose.

1.4.2. Curatif

Le diagnostic biologique de la leptospirose n'étant pas effectué de manière systématique ou dans des délais raisonnables, la plupart des symptômes disparaissent et aucun traitement spécifique n'est envisagé. Bien que des études ont émis des doutes concernant l'efficacité de l'utilisation de la

pénicilline dans les leptospiroses ictériques, l'utilisation d'antibiotiques reste globalement recommandée dans les formes prouvées, suspectées mais également dans les formes modérément sévères (Bourhy et al., 2012; Haake and Levett, 2015). La mise en place d'une antibiothérapie précoce permettrait de réduire la mortalité induite par la leptospirose, et particulièrement lorsque les défaillances (rénales, cardiaques, etc.) sont traitées de manière rapide.

Dans le cadre d'une forme modérée, l'usage de certains antibiotiques suffiraient à la guérison : cyclines ou macrolides (ex : doxycycline, azithromycine (Phimda et al., 2007) ; tandis que l'injection de β-lactamines en intraveineuse est requise en cas de forme grave (pénicilline, ampicilline, ceftriaxone ou cefotaxime (Adler, 2015)). Aucune résistance à ces molécules n'a actuellement été identifiée chez une souche clinique.

Cependant, en cas de syndrome de Weil, l'usage des antibiotiques est assez contesté (Guerrier et al., 2017; Tsuha et al., 2016) dû au potentiel risque de complication (réaction inflammatoire d'Herxheimer). Dans ce cas, la réaction inflammatoire peut être apparenté à un choc cytokinique (Cagliero et al., 2018) et aggraver la santé du patient voire même entrainer son décès (Belum et al., 2013). L'analyse bénéfices/risques de l'usage des antibiotiques est encore à démontrer de manière unanime. Bien que difficile à mettre en œuvre, il est donc nécessaire d'envisager des études supplémentaires sur l'action de ces molécules.

Chez l'animal, le recours aux antibiotiques peut également être envisagé avec des molécules à large spectre d'hôte : céfovécine pour le chat (Beaudu-Lange and Lange, 2014), pénicilline et doxycycline pour le chien (Lau et al., 2016), streptomycine pour les bovins et les porcs (Ellis, 2015), streptomycine et pénicilline pour les chevaux (Timoney et al., 2011; Verma et al., 2013).

2. Leptospires

Ce prélude non exhaustif permet de faire un état des lieux global des connaissances actuelles sur les leptospires, et est indispensable à la compréhension de ce travail de recherche.

2.1. Phylum

Les leptospires sont des bactéries appartenant au phylum Spirochaetes (morphologie spiralée), à la famille des Leptospiraceae et au genre *Leptospira*. Divergent vis-à-vis d'autres bactéries (Figure 12), ce phylum présente une forte diversité au sein de son groupe (Gupta et al., 2013).

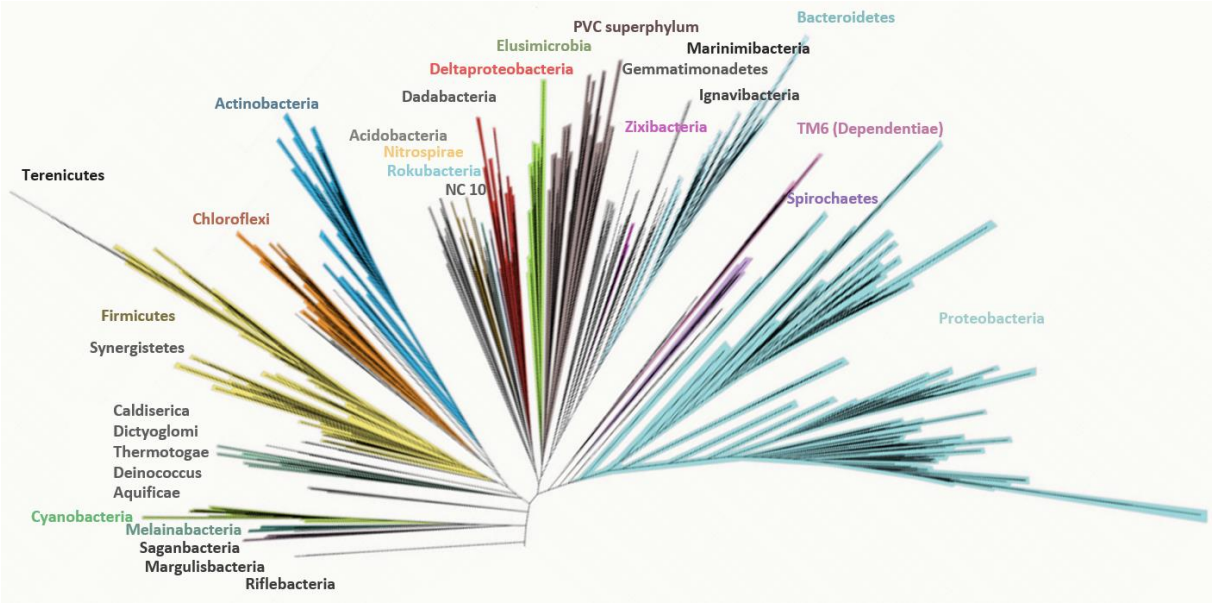


Figure 12. Arbre phylogénétique de la diversité des bactéries (tiré et adapté de Castelle et al., 2018).

L'arbre a été calculé à l'aide d'un algorithme de vraisemblance maximale (RAxML avec modèle PROTCATLG) basé sur des séquences génomiques de protéines ribosomales (protéines ribosomales L2, L3, L4, L5, L6, L14, L15, L18, L22, L24, S3, S8 , S17 et S19). L'alignement des protéines ribosomales concaténées a été construit comme décrit précédemment (Hug et al., 2016).

Le phylum des spirochètes est divisé en quatre familles d'après les homologies des séquences du gène *rrs* codant l'ARN ribosomal 16S : Brachyspiraceae, Brevinemataceae, Leptospiraceae, Spirochaetaceae (Gupta et al., 2013). Au sein de ces différentes familles existent des genres bactériens particulièrement bien étudiés : les *Treponema* (Šmajs et al., 2018), les *Borrelia* (Barbour et al., 2017; Loh et al., 2016) et les *Leptospira* ; vecteurs de maladies chez l'homme (la syphilis via *Treponema pallidum*, la maladie de Lyme via *Borrelia burgdorferi* et la leptospirose via *Leptospira*).

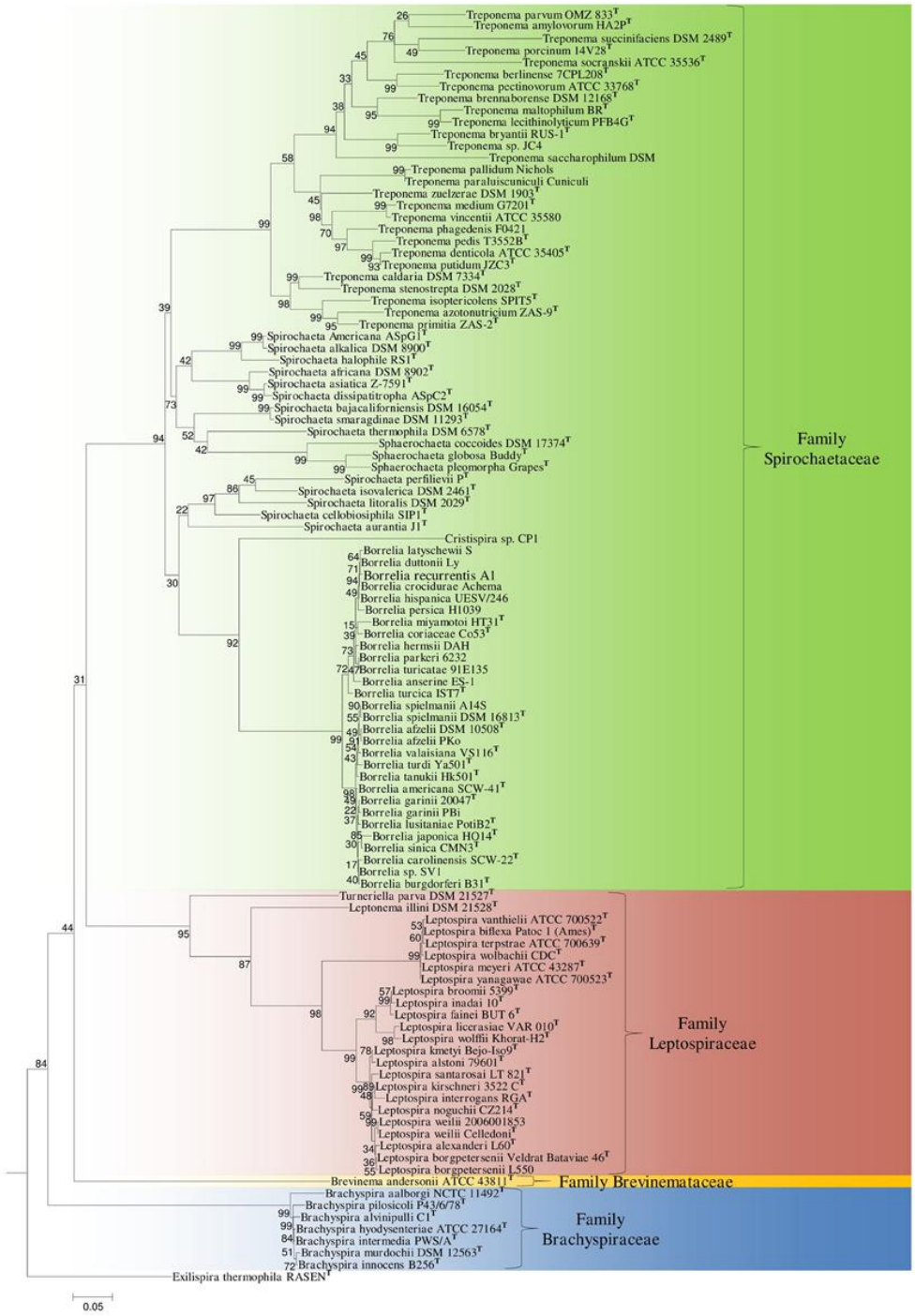


Figure 13. Arbre phylogénétique des Spirochètes basé sur les séquences génétiques du gène rrs (Grupta et al., 2013).

Les valeurs de bootstrap sont affichées au niveau des nœuds de branche. Les accolades permettent d'indiquer les différentes familles du phylum des Spirochètes. La souche type de l'espèce est signalée par le symbole ^{T}.

Initialement scindé en 2 genres, *Leptonema* et *Leptospira* (Hovind-Hougen, 1979), la famille des Leptospiraceae comprend désormais 3 genres : *Leptospira*, *Leptonema* et *Turneriella* (Levett, 2005). La distinction de ces genres bactériens s'effectue, entre autres, sur la comparaison de leur quantité en

bases GC de leur génome. Cette proportion est de 33-43% pour *Leptospira*, 53,6% pour *Turneriella* et 54% pour *Leptonema* (Stackebrandt et al., 2013; Yasuda et al., 1987).

2.2.Taxonomie et classification

2.2.1. Classification phénotypique

Certaines caractéristiques phénotypiques des leptospires peuvent permettre leur identification par microscopie optique (Noguchi, 1919) telles qu'une grande mobilité ou la présence d'une extrémité en crochet (Bourhy et al., 2014).

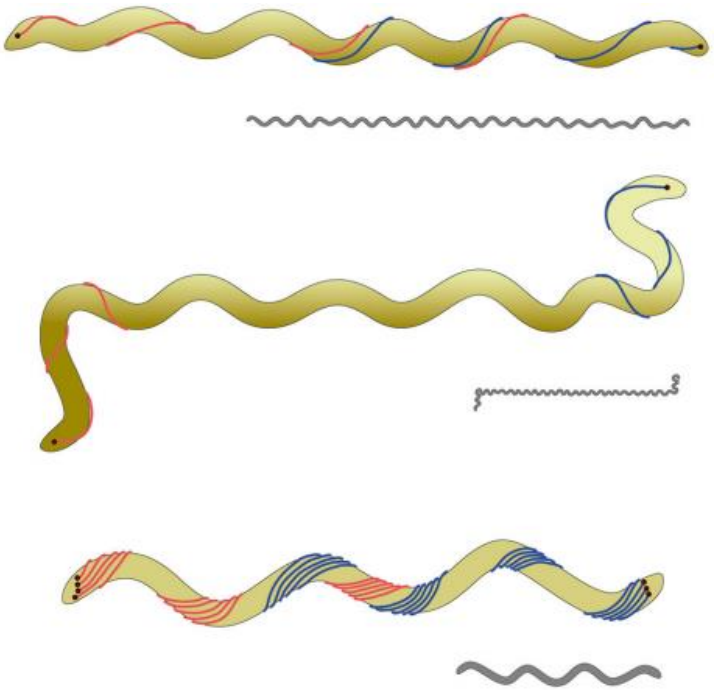


Figure 14. Schéma représentatif de divers spirochètes : Spirochaeta thermophila, Leptospira illini et Borrelia burgdorferi (respectivement de haut en bas) (Wirth 2016).

Dans un souci de clarté, la membrane externe des trois bactéries n'apparait pas. Chez S. thermophila, les endoflagelles se chevauchent contrairement à ceux de L.illini. Pour B. burgdorferi, l'endoflagelle s'enroule autour du corps cellulaire en formant un cordon. Les schémas gris permettent d'apprécier les dimensions relatives de chaque bactérie (20µm pour S. thermophila contre 10µm pour L. illini et B. burgdorferi) (Wirth 2016).

Cependant, ces éléments étant partagés par d'autres genres bactériens, l'analyse génétique est dorénavant favorisée pour le classement des bactéries dans le genre *Leptospira* (Puche et al., 2018).

Au sein du genre *Leptospira*, quelques caractères phénotypiques peuvent permettre d'orienter l'identification entre les leptospires pathogènes et les non-pathogènes. Souvent de taille inférieure aux souches saprophytes, la taille des leptospires pathogènes est un premier indicateur, même si ce paramètre semble varier avec les conditions de culture (Satou et al., 2015).

D’autres caractéristiques peuvent également aiguiller la distinction entre les deux catégories de leptospires :

Tableau 8. Caractéristiques de leptospires pathogènes et saprophytes.

	Saprophytes	Pathogènes	Source
Motilité	+	++	Takabe et al. 2013
Croissance à 13°C	+	-	Johnson and Harris, 1967
Temps de génération à 30°C	6-8 h	14-18 h	Adler, 2015
Résistance à la 8-azaguanine	+ (225 µg/ml)	-	Johnson and Rogers, 1964

Toutefois, ces informations ne sont pas suffisantes pour préciser la nature pathogène d’une souche de leptospires, qui requière des tests de virulence chez l’animal. Des études récentes ont permis de mettre en évidence que des souches, initialement classées dans le groupe pathogène, n’étaient pas virulentes chez l’animal ; ce qui, d’un point de vue biologique, complique d’autant plus la distinction des différents groupes (Thibeaux et al., 2018b).

2.2.2. Classification sérologique

La classification historique des leptospires est la sérologie (Ayral et al., 2015; Lau et al., 2012). Deux méthodes d’agglutination peuvent être utilisées : le CAAT et le MAT. L’identification par la méthode CAAT (cross agglutination adsorption test) repose sur l’utilisation de sérums de souris possédants des anticorps agglutinants spécifiques des sérovars de référence (Babudieri, 1971). Plus de 300 sérovars, regroupés en sérogroupes (Brenner et al., 1999; Pinna et al., 2018) ont pu être identifiés via cette méthode (Picardeau, 2017), dont une majorité d’espèces pathogènes (Bharti et al., 2003). La liste de sérovars est continuellement mise à jour (Kmety and Dikken, 1993). Méthode longue et difficile à mettre en application, elle a été remplacée par le MAT (microscopic agglutination test), qui se base sur l’identification d’antigènes bactériens à l’aide d’anticorps provenant de sérums de lapins, préalablement infectés par des souches connues de leptospires. Le MAT présente également quelques inconvénients ; avec notamment une identification restreinte au sérogroupe (et non au sérovar (Levett, 2001)). En effet, la désignation de sérovar se fait par le CAAT et repose sur des éléments de surface, notamment le LPS, dont les gènes peuvent subir un transfert horizontal entre espèces différentes (Haake and Levett, 2015). Ce transfert a pour conséquence un partage de mêmes sérovars par différentes espèces (Levett, 2001; Picardeau, 2013) (Tableau 9).

Tableau 9. Récapitulatif des sérogroupes et sérotypes chez Leptospira spp. (tiré de Caimi 2020).

Serogroup	**Serovar (s)**
Anarum	Pingchang
Andaman	Andamana
Australis	Australis / Bajan / Bangkok / Bratislava / Fugis / Hawain / Jalna / Lora / Muenchen / Nicaragua / Peruviana / Pina / Ramisi / Rushan / Soteropolitana
Autumnalis	Alice / Autumnalis / Bangkinang / Bim / Bulgarica / Butembo / Carlos / Erinaceiauriti / Fortbragg / Lambwe / Mooris / Mujunkumi / Nanla / Rachmati / Srebarna / Sumatrana / Weerasinghe
Ballum	Aroborea / Ballum / Castellonis / Guangdong / Kenya / Peru / Sichuan
Bataviae	Argentiniensis / Balboa / Bataviae / Brasiliensis / Claytoni / Djatzi / Kobbe / Losbanos / Paidjan / Rioja / Santarosa / Waimea
Canicola	Bafani / Benjamini / Bindjei / Broomi / Canicola / Galtoni / Jonsis / Kamituga / Kuwait / Malaya / Manilae / Portlandvere / Qunjian / Schueffneri / Sumneri
Celledoni	Anhoa / Celledoni / Cynopteri / Hainan / Mengdeng / Whitcombi
Codice	Codice
Cynopteri	Cynopteri / Tingomaria
Djasiman	Agogo / Buenos Aires / Djasiman / Gurungi / Huallaga / Sentot
Grippotyphosa	Bananal / Canalzonae / Dadas / Grippotyphosa / Grippotyphosa Type Duyster / Grippotyphosa Type Moskva / Honghe / Huanuco / Liangguang / Linhai / Muelleri / Ratnapura / Valbuzzi / Vanderhoedeni
Hebdomanis	Borincana / Goiano / Hebdomadis / Jules / Kabura / Kambale / Kremastos / Manzhuang / Maru / Medanensis / Nanding / Nona / Sanmartini / Worsfoldi
Holland	Holland
Hurstbridge	Hurstbridge / Hurstbridge type HB6
Icterohaemorrhagiae	Birkini / Bogvere / Copenhageni / Dakota / Gem / Hongchon / Honghe / Hualin / Icterohaemorrhagiae / Lai / Lai Type Langkawi / Liangshan / Mankarso / Monymusk / Mwogolo / Naam / Nanxi / Ndahambukuje / Ndambari / Smithi / Sokoine / Tonkini / Yeonchon
Iquitos	Varillal
Javanica	Arenal / Ceylonica / Coxi / Dehong / Fluminense / Javanica / Kalimantani / Mengla / Mengma / Mengrum / Menoni / Menrun / Poi / Sofia / Sorexjalna / Vargonicas / Yaan / Zhenkang
Louisiana	Lanka / Louisiana / Orleans
Lyme	Lyme
Manhao	Lichuan / Lincang / Lushui / Manhao / Qingshui
Mini	Beye / Georgia / Hekou / Mini / Perameles / Ruparupae / Swajizak / Tabaquite / Yunnan
Panama	Cristobali / Mangus / Panama
Pomona	Altodouro / Kennewicki / Kunming / Mozdok / Pomona / Proechimys / Tropica / Tsaratsovo
Pyrogenes	Abramis / Alexi / Biggis / Camlo / Costa Rica / Guaratuba / Hamptoni / Kwale / Manilae / Menglian / Myocastoris / Nigeria / Princestown / Pyrogenes / Robinsoni / Varela / Zanoni
Ranarum	Evansi / Pingchang / Ranarum
Sarmin	Cuica / Machiguenga / Rio / Sarmin / Waskurin / Weaveri
Sehgali	Portblairi
Sejroe	Balcanica / Caribe / Dikkeni / Geyaweera / Gorgas / Guaricura / Haemolytica / Hardjo / Hardjo type Bovis / Hardjo type Prajitno / Istrica / Jin / Medanensis / Nyanza / Polonica / Recreo / Ricardi / Roumanica / Saxkoebing / Sejroe / Trinidad / Unipertama / Wolf
Semaranga	Patoc / Semaranga / Saopaulo
Shermani	Aguaruna / Badudieri / Carimagua / Luis / Shermani
Tarassovi	Atchafalaya / Atlantae / Bakeri / Banna / Bravo / Chagres / Corredores / Darien / Gatuni / Gengma / Guidae / Kanana / Kaup / Kisuba / Langati / Malaysia / Mengpeng / Mogden / Moldaviae / Navet / Ningxia / Rama / Sulzerae / Tarassovi / Topaz / Tunis / Vughia / Yunxian

Il recense les éléments tirés de différentes bases de données : PubMLST (Public databases for molecular typing and microbial genome diversityle), le centre de références de la leptospirose des Pays Bas, NCBI (National Center for Biotechnology Information) ; et basé sur Levett, 2001 (Levett, 2001), Bharti et ses collaborateurs (Bharti et al., 2003), tiré de Caimi 2020.

Les classifications sérologique et génétique ne sont donc pas systématiquement homogènes. Malgré cela, le MAT reste utile pour identifier et évaluer la circulation des sérogroupes ; tandis que l'identification des espèces se fait par analyse génomique.

2.2.3. Classification génomique

Avant les années 90, l'ensemble des souches du genre *Leptospira* formé deux groupes distincts : *Leptospira interrogans* sensu lato recensait les souches pathogènes pour l'homme et l'animal tandis que *Leptospira biflexa* sensu lato regroupait les souches saprophytes et aquicoles (Johnson et al., 1984; Ramadass et al., 1992). Ces souches saprophytes, non pathogènes et non isolées chez l'homme ou l'animal, sont essentiellement présentes dans les eaux de surface (eau douce) ou retrouvées dans les sols humides. Certaines espèces de leptospires présentant des variations biochimiques et n'étant pas pathogènes pour certains animaux de laboratoire, ont permis la création d'un troisième groupe. Ce groupe, appelé intermédiaire et initialement composé de *L. fainei* et *L. inadai* (Perolat et al., 1998), forme un groupe distinct possédant des différences significatives de la séquence du gène *rrs*.

En effet, la notion d'espèce se définit à l'aide de différentes méthodes moléculaires. La méthode d'hybridation ADN-ADN (Haapala et al., 1969; Moore et al., 1987; Yasuda et al., 1987) permet une comparaison globale du génome des bactéries à des températures spécifiques d'hybridation. Méthode difficile à mettre en application, elle a été remplacée par la méthode de similarité nucléotidique moyenne ANI (Average Nucleotide Identity)). Les génomes bactériens sont comparés à des génomes de référence connus, en utilisant un seuil de 95 % : si les génomes possèdent plus de 95% d'identité, ils appartiennent à la même espèce ; au contraire, si les génomes ont une identité inférieure à 95%, ils appartiennent à deux espèces différentes (Puche et al., 2018; Vincent et al., 2019). Depuis l'expansion de la biologie moléculaire (années 1980), l'analyse de similarité de gènes bactériens, comme l'étude du gène *rrs*, a permis de généraliser l'utilisation de la classification génomique.

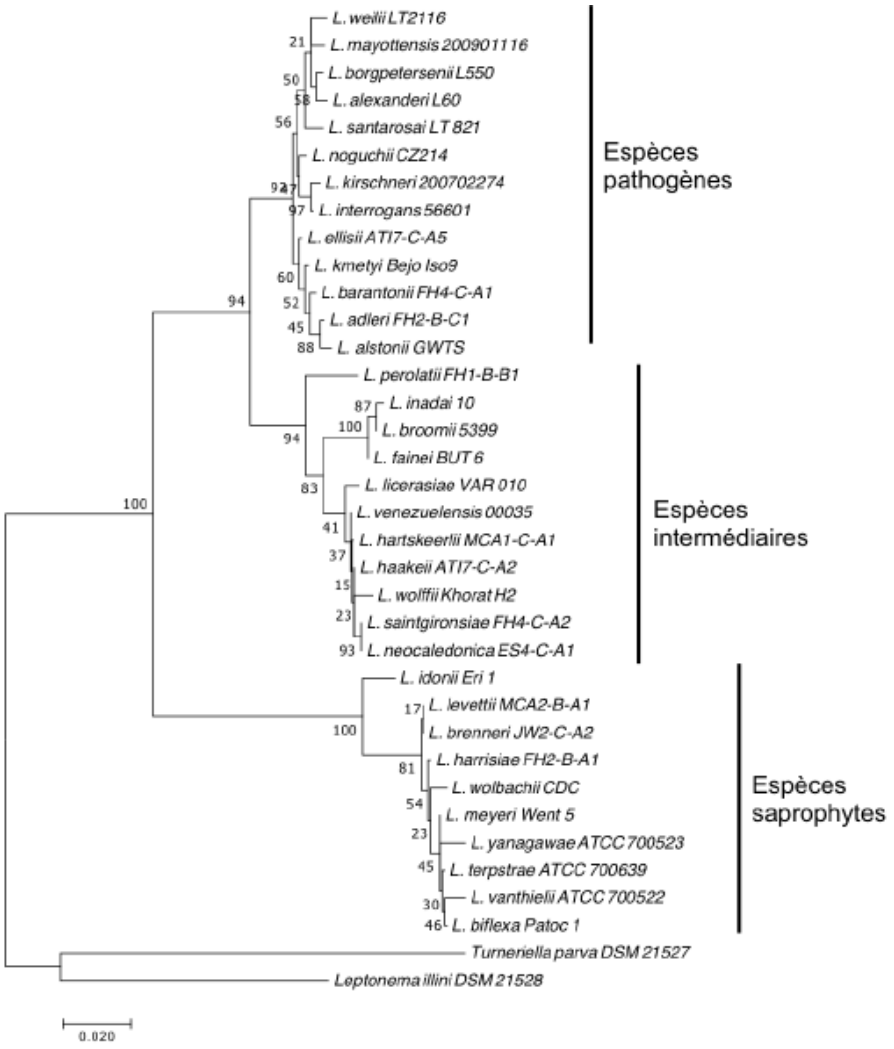


Figure 15. Arbre phylogénétique des leptospires basé sur leur identité en gène rrs.

Arbre phylogénétique des leptospires basé sur leur identité en gène rrs. Ici, 34 espèces sont décrites. L'assignement a été réalisé avec MEGA7 (Tamura et al., 2011). La valeur de bootstrap est signalée au niveau du nœud (Schiettekatte, 2018).

Dans les années 2010, une vingtaine d'espèces de leptospires étaient décrites (Cerqueira and Picardeau, 2009; Puche et al., 2018). Récemment, des améliorations dans l'isolement des souches, en particulier pour les souches environnementales, ont permis la description de nouvelles espèces. Ainsi plusieurs dizaines de souches supplémentaires ont rejoint le genre *Leptospira* (Thibeaux et al., 2018a, 2018b). Ces dernières années, des améliorations techniques : accessibilité et réduction du coût du séquençage à haut débit et utilisation d'un milieu sélectif pour l'isolement de souches (Chakraborty et al., 2011) et l'essor de nouveaux centres d'intérêt (métagénomique, analyses environnementales) ont permis d'identifier de nouvelles espèces de leptospires pathogènes, intermédiaires ou saprophytes, montant à 64 le nombres d'espèces actuellement connues au sein du genre (Caimi and Ruybal, 2020; Casanovas-Massana et al., 2018b; Vincent et al., 2019).

Dans leur récente publication, Caimi et ses collaborateurs ont recensé l'ensemble des informations liées à ces espèces (Caimi and Ruybal, 2020). Pour cela, ils ont collecté les éléments tirés de différentes bases de données : PubMLST (Public databases for molecular typing and microbial genome diversity), le centre de références de la leptospirose des Pays Bas, NCBI (National Center for Biotechnology Information) et une publication de Nieves en 2019 (Nieves et al., 2019). Les espèces sont classées selon différentes classifications. La classification ANI est basée sur les valeurs d'identité nucléotidique moyenne des génomes (Casanovas-Massana et al., 2020; Vincent et al., 2019). La classification cgMLST (core genome multilocus sequence typing) est basée sur les données MLST du core-genome (Guglielmini et al., 2019).

Tableau 10. Données disponibles concernant les 64 espèces de leptospires (+2 probables), tiré de Caimi 2020.

Species	Classification			Strains (N)	Genomes (N)	pubMLST (N)	Geographic origin	Source of isolation	Reference
	Virulence	ANI	cgMLST						
L.adleri	pathogenic	P1	P1–5	3	3	0	Africa - Oceania	environmental	(Thibeaux et al., 2018a)
L.alexanderi	pathogenic	P1	P1–2	13	6	11	Asia	bovine - hedgehog - human	(Brenner et al., 1999)
L.alstonii	pathogenic	P1	P1–3	5	5	5	Asia	amphibians	(Brenner et al., 1999;Smythe et al., 2013)
L.andrefontaineae	probable intermediate	P2	ND	2	1	0	Oceania	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.bandrabouensis	probable saprophytic	S1	S1–1	3	2	0	Africa	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.barantonii	pathogenic	P1	P1–4	2	2	0	Asia - Oceania	environmental	(Thibeaux et al., 2018a)
L.biflexa	saprophytic	S1	S1–2	9	7	2	Asia - Europe North America	environmental - human	(Faine and Stallman, 1982; Yasuda et al., 1987)
L.borgpetersenii	pathogenic	P1	P1–2	220	60	180	Africa - Asia - Europe - North America - Oceania - South America	amphibians - bandicoot - bovine - canine - equine - hedgehog - human - opossum - porcine - roden - shrew	(Yasuda et al., 1987)
L.bourretii	probable saprophytic	S1	ND	5	4	0	Oceania	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.bouyouniensis	probable saprophytic	S1	S1–2	4	3	0	Africa - Oceania	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.brenneri	probable saprophytic	S1	S1–1	2	2	0	Oceania	environmental	(Thibeaux et al., 2018a)
L.broomii	intermediate	P2	P2–3	1	1	1	Europe	human	(Levett et al., 2006)
L.congkakensis	probable saprophytic	S1	S1–1	4	3	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.dzianensis	probable pathogenic	P1	P1–4	7	6	0	Africa - Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.dzoumogneensis	probable intermediate	P2	P2–1	2	1	0	Africa	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.ellinghausenii	probable saprophytic	S1	S1–2	1	1	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.elllisii	pathogenic	P1	ND	2	2	0	Oceania	environmental	(Thibeaux et al., 2018a)
L.fainei	intermediate	P2	P2–3	1	1	1	Oceania	porcine	(Perolat et al., 1998)
L.fletcheri	probable intermediate	P2	ND	1	1	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.fluminis	probable intermediate	P2	ND	1	1	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.gomenensis	probable pathogenic	P1	ND	5	4	0	Oceania	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.haakeii	intermediate	P2	ND	2	2	0	Oceania	environmental	(Thibeaux et al., 2018a)
L.harrisiae	probable saprophytic	S1	S1–1	2	2	0	Oceania	environmental	(Thibeaux et al., 2018a)
L.hartskeerlii	intermediate	P2	ND	2	2	0	Oceania	environmental	(Thibeaux et al., 2018a)
L.idonii	saprophytic	S2	ND	2	1	1	Asia	environmental	(Saito et al., 2013)

L.ilyithenensis	probable saprophytic	S2	ND	1	1	0	Africa	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.inadai	intermediate	P2	P2–3	8	2	3	Africa - Asia - North America - Oceania - South America	bandicoot - human - mongoose - opossum - rodent	(Matthias et al., 2008)
L.interrogans	pathogenic	P1	P1–1	845	365	792	Africa - Asia - Europe - North America - Oceania - South America	amphibians - bandicoot - bat - bovine - canine - environmental - equine - hedgehog - human - marine mammal - opossum - ovine - porcine - shrew	(Faine and Stallman, 1982; Yasuda et al., 1987)
L.jelokensis	probablesaprophytic	S1	S1–2	3	2	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.johnsonii	probable intermediate	P2	P2–1	1	1	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.kanakyensis	probable saprophytic	S1	S1–2	4	3	0	Oceania	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.kemamanensis	probable saprophytic	S1	ND	2	1	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.kirschneri	pathogenic	P1	P1–1	86	33	78	Africa - Asia - Europe - North America - South America	bat - bovine - canine - environmental - equine - hedgehog - human - porcine - rodent - shrew	(Ramadass et al., 1992)
L.kmetyi	pathogenic	P1	P1–4	8	7	2	Asia - Oceania	environmental	(Slack et al., 2009; Thibeaux et al., 2018a)
L.kobayashii	probable saprophytic	S2	ND	1	1	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.koniamboensis	probable intermediate	P2	ND	2	1	0	Oceania	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.langatensis	probable intermediate	P2	ND	2	2	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.levettii	probable saprophytic	S1	S1–2	14	14	0	Africa - Asia - Oceania	environmental	(Thibeaux et al., 2018a)
L.licerasiae	intermediate	P2	P2–1	6	4	5	Africa - South America	bat - environmental - human - opossum	(Matthias et al., 2008)
L.macculloughii **	probable saprophytic	ND	ND	1	1	0	Oceania	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.mayottensis	pathogenic	P1	P1–2	6	6	4	Africa	environmental - human - tenrec	(Bourhy et al., 2014)
L.meyeri	saprophytic	S1	S1–1	13	11	3	Africa - Asia - Europe - North America - Oceania	bandicoot - environmental - human - rodent	(Thibeaux et al., 2018a; Yasuda et al., 1987)
L.montravelensis	probable saprophytic	S1	ND	3	2	0	Oceania	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.mtsangambouensis	probable saprophytic	S1	S1–1	2	1	0	Africa	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.neocaledonica	intermediate	P2	ND	1	1	0	Oceania	environmental	(Thibeaux et al., 2018a)
L.noguchii	pathogenic	P1	P1–1	53	24	40	Asia - North America - South America	amphibians - armadillo - bovine - canine - human - mongoose - nutria - opossum - porcine - rodent - weasel	(Yasuda et al., 1987)
L.noumeaensis	probable saprophytic	S1	ND	2	1	0	Oceania	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.ognonensis	probable saprophytic	S2	ND	1	1	0	Europe	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.perdikensis	probable saprophytic	S1	S1–1	2	1	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.perolatii	intermediate	P2	ND	2	2	0	Oceania	environmental	(Thibeaux et al., 2018a)
L.putramalaysiae	probable pathogenic	P1	P1–5	2	2	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.ryugenii	probable saprophytic	S2	ND	1	1	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.saintgironsiae	intermediate	P2	P2–1	1	1	0	Oceania	environmental	(Thibeaux et al., 2018a)

L.santarosai	pathogenic	P1	P1–2	109	40	78	Africa - Asia - North America - South America	bovine - canine - caprine - capybara - environmental - human - opossum - porcine - raccoon - rodent	(Yasuda et al., 1987)
L.sarikeiensis	probable intermediate	P2	P2–1	2	1	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.selangorensis	probable intermediate	P2	P2–1	3	3	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.semungkisensis	probable intermediate	P2	ND	1	1	0	Asia	environmental	(Vincent et al., 2019)
L.stimsonii	probable pathogenic	probable P1	ND	2	2	0	North America	environmental	(Casanovas-Massana et al., 2019)
L.terpstrae	Unknown	S1	ND	1	1	1	Asia	Unknown	(Smythe et al., 2013)
L.tipperaryensis	probable pathogenic	P1	P1–5	1	1	0	Europe	Shrew	(Vincent et al., 2019)
L.vanthielii	saprophytic	S1	S1–1	2	2	1	Europe	environmental	(Smythe et al., 2013)
L.venezuelensis	intermediate	P2	P2–1	3	3	0	South America	bovine - human - rodent	(Puche et al., 2018)
L.weilii	pathogenic	P1	P1–2	39	20	32	Asia - Europe - North America - Oceania	amphibians - bovine - canine - environmental - equine - human	(Yasuda et al., 1987)
L.wolbachii	saprophytic	S1	S1–1	1	1	1	North America	environmental	(Yasuda et al., 1987)
L.wolffii	intermediate	P2	P2–2	7	7	1	Asia - Oceania	environmental - human	(Slack et al., 2009; Thibeaux et al., 2018a)
L.yanagawae	Unknown	S1	ND	2	2	1	Oceania - South America	environmental	(Smythe et al., 2013)
L.yasudae	probable pathogenic	probable P1	ND	2	2	0	South America	environmental	(Casanovas-Massana et al., 2019)
Leptospira sp.	–	–	–	14	3	6	Asia - Europe - North America - South America	bovine - environmental - human - opossum - rodent	–
TOTAL STRAINS				1563	704	1249			

Le groupe des intermédiaires comprenait jusqu'alors les espèces dont la pathogénicité n'était pas avérée. En 2019, afin de restreindre le caractère incertain de virulence de ces souches, Vincent et ses collaborateurs proposent une nouvelle nomenclature. Les groupes « pathogène » (identifié par la lettre P) et « saprophyte » (identifié par la lettre S) sont divisés en 2 sous-groupes : P1 et P2 pour les pathogènes et S1 et S2 pour les saprophytes. Les sous-groupes P1 et S1 correspondent respectivement aux groupes anciennement nommés « pathogène et saprophyte ». Le sous-groupe P2 regroupe les espèces anciennement classées comme intermédiaires. Enfin, le sous-groupe S2 est un nouveau groupe comprenant des espèces saprophytes (Vincent et al., 2019).

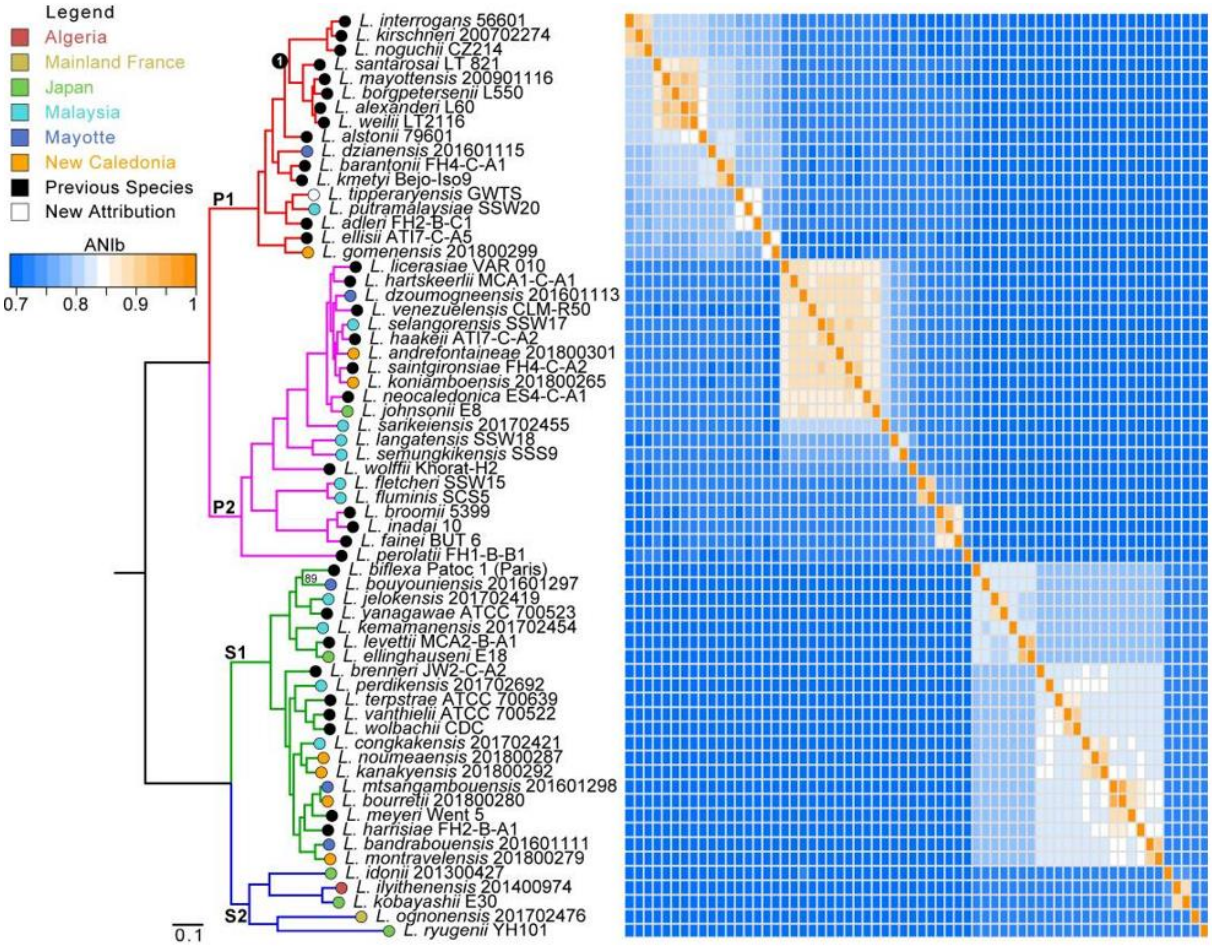


Figure 16. Arbre phylogénétique des leptospires basé sur les séquences nucléotidiques de 1371 gènes orthologues (Vincent et al., 2019).

L'arbre phylogénétique ci-dessus donne la valeur d'ANI pour l'ensemble des séquences génomiques étudiées. Les sous-groupes P1, P2, S1 et S2 sont symbolisés par des couleurs spécifiques, respectivement rouge, violet, vert et bleu. L'origine géographique des espèces étudiées est représentée par des cercles colorés. Les valeurs de bootstrap étant de 100% pour l'ensemble des nœuds excepté un, seule la valeur de ce nœud apparait (entre *L.biflexa* et *L. bouyouniensis*). Dans le

groupe P1, les espèces pathogènes communément responsables de maladie chez l'homme sont regroupées au niveau du nœud 1.

Ces découvertes récentes montrent que diversité des leptospires n'est pas encore achevée et que d'autres espèces seront certainement identifiées dans le futur.

Comme mentionné ci-dessus, les classifications sérologiques et génomiques présentent des variations et ne sont pas toujours superposables (Levett, 2001). Au-delà de la classification des espèces de leptospires, la génomique permet d'obtenir d'importantes informations concernant l'implication de certains gènes dans la pathogénicité. Cependant, elle n'a pas remplacé la classification sérologique, utilisée dans les études épidémiologiques afin d'identifier le réservoir animal spécifique des sérovars isolés.

2.3.Caractéristiques morphologiques et métaboliques

2.3.1. Morphologique

Les spirochètes, bactéries hélicoïdales, possèdent une paroi bactérienne spécifique. A l'image des bactéries à Gram négatif, l'enveloppe de ces bactéries possèdent deux membranes. La membrane interne (ou cytoplasmique) permet l'adhésion au peptidoglycane qui leur confère rigidité, forme et résistance (Cameron, 2015).

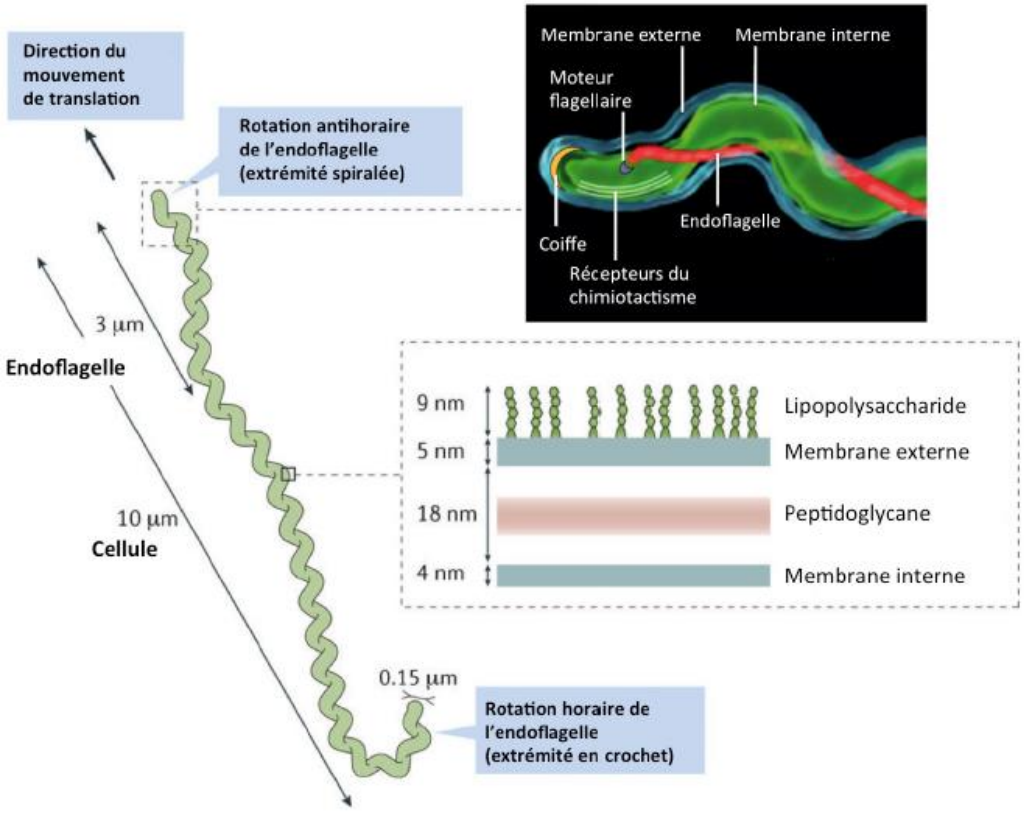


Figure 17. Morphologie cellulaire et structure de l'enveloppe de L.interrogans (Picardeau, 2017; Schiettekatte, 2018).

La membrane externe contient des protéines de surface et un lipopolysaccharide (LPS) ; LPS qui, pour les spirochètes, est présent uniquement chez *Leptospira* (Patra et al., 2015). La structure du LPS des leptospires est atypique ce qui rend le lipide A moins toxique que pour d'autres bactéries pathogènes à Gram-négatif et lui permet d'échapper à la reconnaissance des TLR4 du système immunitaire humain (Murray et al., 2010; Nahori et al., 2005; Werts, 2017).

Chez *Leptospira*, un endoflagelle ou flagelle périplasmique est ancré à chaque extrémité de la cellule, contrairement à d'autres genres de spirochètes (Wirth et al., 2016; Wolgemuth, 2015). La mobilité des bactéries et l'apparition de crochet ou spirale à leurs extrémités sont dues à la rotation de l'endoflagelle (Ko et al., 2009). La configuration structurale des extrémités (crochet ou spirale) détermine le mouvement ou l'état statique de la bactérie (Figure 18).

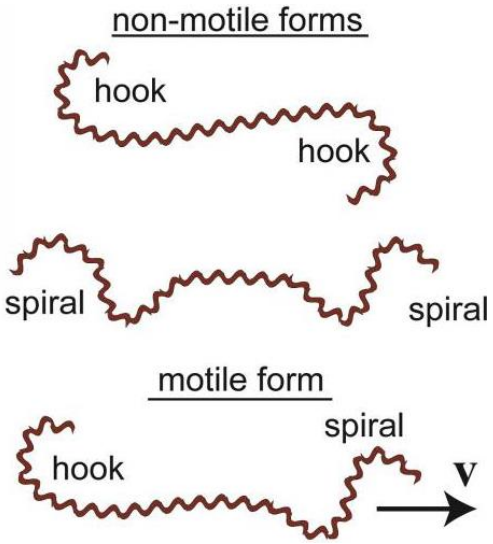


Figure 18. Représentation schématique de la configuration d'une leptospire lorsqu'elle est statique ou lorsqu'elle est en mouvement (Wolgemuth, 2015).

Si les deux extrémités ont la même forme (en crochet ou en spirale), aucun déplacement ne se fait. Lorsqu'une extrémité est en crochet et l'autre en spirale, il y a déplacement de la bactérie en direction de l'extrémité spiralée. Dans un milieu classique, quelques secondes suffisent pour effectuer un déplacement de 20 µm (Faine et al., 1999). La forme en crochet, ressemblant à un point d'interrogation, a donné le nom de l'espèce *Leptospira interrogans*.

Ils possèdent également des chimiorécepteurs, qui permettent aux leptospires de se diriger dans leur milieu en fonction de la concentration d'attractants ou de répulsifs (Lambert et al., 2012). Leur dispersion dans les organes serait également facilitée par leur capacité à ramper sur les cellules de l'hôte dans certaines conditions (Tahara et al., 2018). Cette adhésion bactérienne à des surfaces solides est médiée par le LPS et d'autres composants de la surface cellulaire (Hori and Matsumoto, 2010).

Les leptospires ont une longueur allant de 6 à 20 µm, un diamètre autour de 0,1 µm (Adler, 2015; Picardeau, 2017) et le corps cellulaire hélicoïdal a une longueur d'onde d'environ 0,5 µm (Goldstein and Charon, 1990). Ces petites dimensions nécessitent l'utilisation de microscopes particuliers afin de les étudier (à fond noir ou à contraste de phase) (Figure 19).

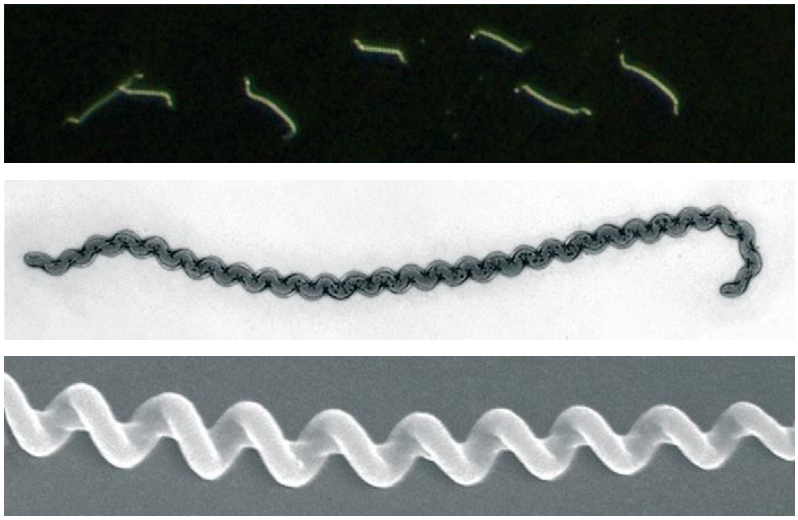


Figure 19. Leptospires en microscopie à fond noir (A) et en microscopie électronique (B et C) (Bourhy 2012).

2.3.2. Métabolisme

Les leptospires sont des organismes à croissance lente avec des besoins nutritionnels spécifiques. Bactéries chimio-organotrophes, les leptospires oxydent les composés organiques pour produire leur énergie. Une particularité des leptospires réside dans le fait qu'elles obtiennent cette énergie ainsi que du carbone après bêta-oxydation d'acides gras à longue chaîne, insaturés pour les pathogènes (chaine comportant plus de 15 C) (Henneberry and Cox, 2011; Khisamov and Morozova, 1992). Les leptospires doivent donc se servir des acides gras présents dans le milieu de croissance ou dans l'environnement (interface solide-liquide) (Kefford and Marshall, 1984). Certains éléments sont nécessaires pour favoriser la croissance des leptospires : de l'azote (sels d'ammonium ou désamination d'acides aminés (Shenberg, 1967)), des vitamines (B1, B12), du fer ferreux (Bourhy et al., 2012; Ellinghausen and Mccullough, 1965). Certaines souches requièrent la présence d'autres suppléments tels que la thiamine, la biotine ou encore le calcium et le magnésium. Elles produisent de la catalase et de l'oxydase (Levett, 2001).

2.3.3. Génomique bactérienne

Le génome des leptospires a une taille de 3,8 à 4,6 mégabases, soit une taille beaucoup plus élevée que celle des autres spirochètes comme *Borrelia* et *Treponema* (Picardeau, 2015b). La variabilité du genre est perceptible par la teneur en GC du génome, pouvant varier de 35% à 45% en fonction des différentes souches (Picardeau, 2017). Le génome est composé de deux chromosomes circulaires

codant un total d'environ 3500 gènes. Plus de 1100 gènes composent le core-génome (Fouts et al., 2016). Le chromosome principal (chromosome circulaire de 4 277 kb, contre 350 kb pour le second chromosome) regroupe environ 90 % du génome (Zuerner et al., 1993) intégrant les principaux gènes, nécessaires au fonctionnement de base de l'organisme (Picardeau, 2015b) tels que deux copies du gène *rrs*, 23S et une copie de ARNr 5S (Levett, 2001). Le pan-génome du genre *Leptospira* est ouvert chez les espèces appartenant à la sous-clade P1, témoignant de la grande diversité des pathogènes et laisse supposer que l'ensemble du répertoire des gènes du genre reste encore à explorer (Figure 20).

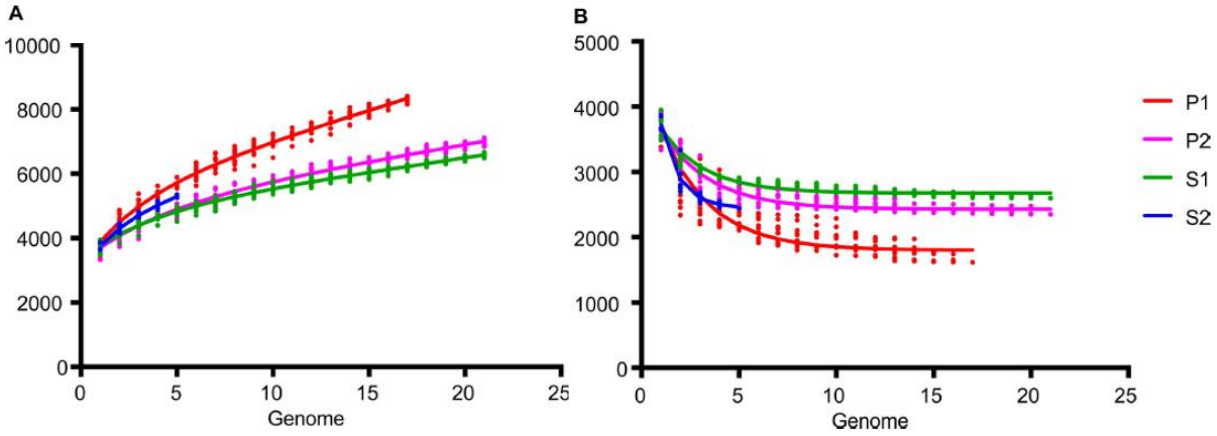


Figure 20. Evolution du pan-génome (A) et du core-génome (B) pour les génomes des quatre sous-clades de leptospires (Vincent et al., 2019).

Les analyses ont été réalisées avec GET_HOMOLOGUES (utilisant 17 génomes pour P1, 21 pour P2, 21 pour S1 et 5 pour S2).

Le core-génome représente les gènes partagés par l'ensemble des bactéries du genre *Leptospira*. Le pan-génome représente l'intégralité des gènes présents dans les bactéries du genre *Leptospira* (Figure 21).

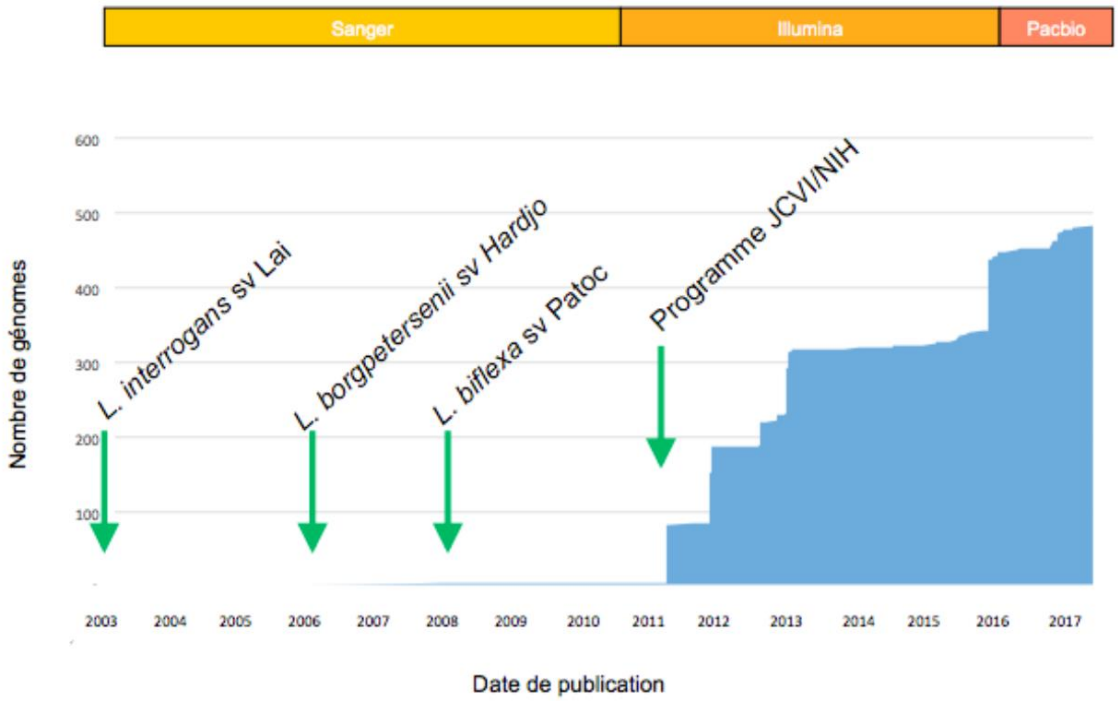


Figure 21. Nombre de génomes de leptospires disponibles en fonction du temps et de l'arrivée des différentes technologies, d'après Mathieu Picardeau (Schiettekatte, 2018).

Les séquenceurs de première génération ont permis le séquençage du premier génome des leptospires (Ren et al., 2003). Actuellement, plus de 1000 génomes de leptospires sont disponibles dans les bases de données, et ce depuis la mise en place de programmes de séquençage (JCVI, NIH) ainsi que l'arrivée de certaines technologies telles que celle d'Illumina (Bulach and Adler, 2018).

3. Diagnostic et techniques de détection

3.1. Diagnostic humain

La leptospirose étant cliniquement difficile à identifier, son diagnostic peut se faire selon 3 principes : par microbiologie standard (microscopie et culture), par sérologie et par biologie moléculaire (Haake and Levett, 2015; Picardeau, 2013; Rajapakse et al., 2015).

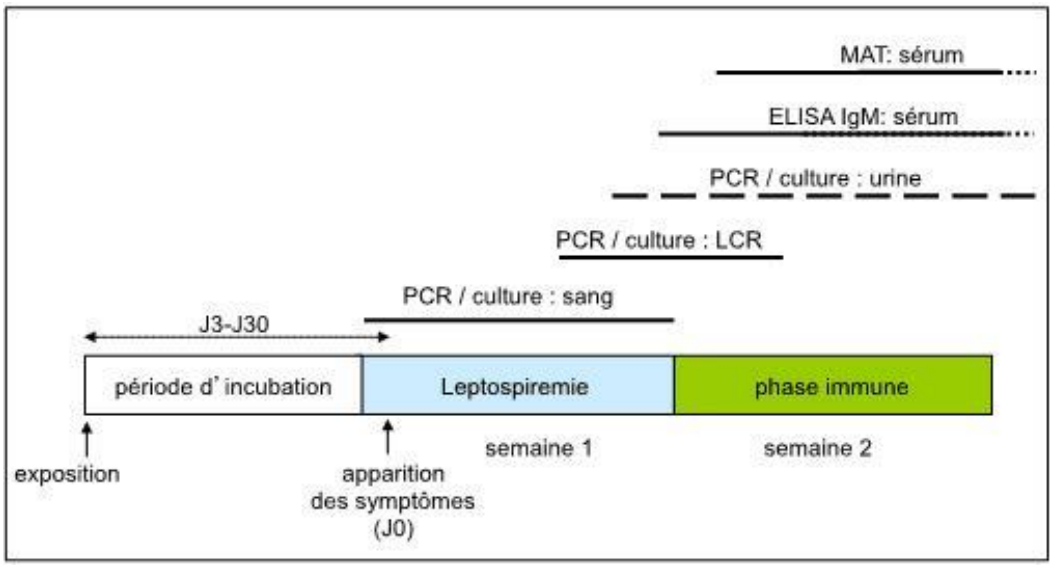


Figure 22. Techniques de diagnostic de la leptospirose en fonction de l'avancement de la maladie (CNR de la leptospirose, Institut Pasteur).

3.1.1. Culture et microscopie

Les leptospires sont des organismes dont la croissance est fastidieuse et nécessite des besoins nutritionnels spécifiques, dont l'utilisation d'acide gras à longue chaîne comme source de carbone et d'énergie. Cependant, ces acides gras peuvent également avoir un effet délétère car toxiques. C'est pourquoi, des détoxifiants comme l'albumine de sérum bovin (BSA) servant de détoxifiant d'acides gras thermolabiles sont ajoutés au milieu de croissance (Faine et al., 1999).

Se développant toutes deux en aérobiose, les leptospires saprophytes et pathogènes ont une température optimale de croissance *in vitro* située entre 28°C et 30°C. Le pH varie de 7 à 8 pour une croissance optimale (Adler, 2015).

En milieu liquide dans des conditions optimales, le temps de doublement des leptospires saprophytes est de 6-8h sous agitation moyenne, contre 18h pour les souches pathogènes fraichement isolées (Adler, 2015). En comparaison des autres bactéries, ce temps de doublement est particulièrement long. Classiquement, 4-7 jours pour les pathogènes et 2-3 jours les saprophytes sont nécessaires en milieu liquide EMJH pour obtenir une croissance maximale (en partant d'une culture adaptée à 1-10% de suspension bactérienne en phase stationnaire) et une concentration autour de 10^7-10^8 leptospires/mL (Faine et al., 1999; Zuerner, 2015). Le microscope à fond noir permet de contrôler la croissance mais le dénombrement se fait à l'aide d'une chambre de comptage de Petroff-Hausser (Humberd et al., 2005).

En milieu liquide, la culture des leptospires peut être réaliser dans différents milieux : milieu EMJH, milieu de Stuart ou milieu de Korthof (Faine et al., 1999). Cependant, le milieu EMJH est le plus utilisé actuellement (crée par Ellinghausen et Mccullough en 1965, modifié par Johnson et Harris en 1967).

En milieu solide, la culture des leptospires est possible dans un milieu EMJH auquel est ajouté 1,2% d'agar noble (Slamti and Picardeau, 2012). Une particularité des leptospires réside dans le fait que ces bactéries vont pousser à l'intérieur de la gélose. Cependant, moins compétitives que d'autres micro-organismes (Goarant, 2016; Loureiro et al., 2015; Schaechter, 2001) et ayant une croissance lente, ce mode de culture est difficilement utilisable pour isoler les souches bactériennes. En 2011, Chakraborty et collaborateurs proposent l'utilisation d'un cocktail d'antibiotiques (sulfamethoxazole, triméthoprime, amphotéricine B, Fosfomycine, 5-fluorouracil) appelé STAFF, limitant le développement de la flore interférente et pour lesquels les leptospires sont résistantes (Chakraborty et al., 2011). Incubées à 30°C, la positivité des cultures est contrôlée régulièrement par microscopie et peut nécessiter plusieurs semaines (Picardeau, 2013).

La culture n'est pas pertinente en tant que test de diagnostic de routine mais elle permet d'isoler des souches pour mener des études épidémiologiques. Pour le diagnostic, des techniques plus rapides telles que la PCR, sont privilégiées.

3.1.2. PCR

Les tests PCR ont été développés pour accéder à un diagnostic moléculaire rapide et précis pour détecter l'ADN des leptospires pathogènes. Cette technique amplifie spécifiquement un gène d'intérêt permettant l'identification des bactéries responsables de la pathologie (une partie des 38 espèces). Les tests PCR en temps réel ciblent différents gènes pour distinguer les pathogènes (ex : gène *lipL32*) des non pathogènes. Pour cela l'utilisation des sous-unités du gène *rrs* fournit des résultats pertinents pour la détection des leptospires totales (Mérien et al., 1992) ; tandis que l'amplification du gène *lipL32* discrimine les pathogènes. Dans le cadre du diagnostic de la leptospirose, des échantillons de sang, d'urine, de LCR ou de tissus peuvent être analysés par PCR (Woods et al., 2018). Cependant, ces techniques de PCR utilisées en routine ne permettent pas d'identifier le sérogroupe ou le sérovar impliqué dans la maladie.

La PCR présente de nombreux avantages : rapide, quantitative, sensible et spécifique. Elle reste néanmoins relativement coûteuse dans certaines zones endémiques (Musso and La Scola, 2013).

L'utilisation de la PCR peut se faire à différentes étapes de la maladie. En phase précoce, l'analyse se fera à partir d'un échantillon de sang ; tandis qu'un échantillon d'urine sera utilisé pour une analyse en phase tardive (Figure 22). Dans la détection des cas de leptospirose humaine utilisant la PCR, le résultat est principalement qualitatif (positivité ou non). En PCR quantitative, la sensibilité analytique

varie de 10 à 50 leptospires/mL de sang (HAS) et différentes études ont montré des taux de leptospires de l'ordre de 10^6 bactéries/mL de sang dans les cas humains (Agampodi et al., 2012; Haake and Levett, 2015; Segura et al., 2005; Truccolo et al., 2001). Des limites de détection, utilisant des souches bactériennes produites en laboratoire, ont été établies lors de la mise en place des techniques de PCR, et semble varier selon les études. En 2020, Perez et collaborateurs ont pu établir une LD autour de 2,2 copies/réaction, pour la détection des espèces pathogènes et saprophytes, indépendamment de l'usage en simplex ou en multiplex (Pérez et al., 2020) ; contre 20 copies/réaction de culture de *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae dans l'étude de Stoddard (Stoddard et al., 2009).

D'autres techniques de détection et d'identification existent également comme la cytométrie en flux, le séquençage ou encore la technique LAMP (Loop isothermal Amplification). Cette dernière technique se base sur la détection du gène *rrs* et pourrait convenir à de nombreux pays en voie de développement étant donné sa rapidité et son faible coup (Koizumi et al., 2012; Samrot et al., 2021). Dans une étude réalisée sur dix-neuf patients, le séquençage du core génome par un schéma de cgMLST a ainsi identifié quatre principaux groupes clonaux, appartenant pour la plupart à *L. interrogans, L. borgpetersenii* et *L. kirschneri* (Noda et al., 2020).

3.1.3. Sérologie

Dans certaines situations (consultation en phase tardive de la maladie), la détection par sérologie est applicable. Elle repose sur la détection des anticorps dans les sérums des patients selon différentes techniques. Le test ELISA (technique d'immuno-absorption par enzyme liée) permet de repérer l'apparition d'anticorps de type IgM, 6 jours après l'apparition des premiers signes cliniques. Disponible sous la forme de kits commercialisés et rapide elle reste toutefois peu spécifique en zone endémique (Bajani et al., 2003; Rosa et al., 2017). La détection des anticorps anti-leptospires par ELISA n'est pas suffisante pour confirmer la pathologie ; la confirmation doit être faite par le test MAT.

Ce test de confirmation repose sur le test MAT (micro-agglutination test) qui permet d'identifier le sérogroupe incriminé dans certains cas, mais non le sérovar. En effet, la précision du test n'est pas suffisante pour discriminer les réactivités croisées qui existent entre les sérovars d'un même sérogroupe ou entre sérogroupes. Elle se base sur la reconnaissance entre les anticorps de patients (spécifiques des leptospires) et les antigènes de souches connues de leptospires. Le délai de positivité du test est plus tardif que pour l'ELISA IgM (Aviat et al., 2010; Levett, 2001). Sensible et spécifique, le test MAT est reconnu comme test sérologique de référence. Cependant, contrairement à l'ELISA, il requiert l'utilisation et le maintien de cultures vivantes des différents sérovars, spécifiques des zones géographiques étudiées. Les antécédents de vaccinations des patients ou des animaux sont à prendre en compte lors d'un MAT car, ce dernier ne différencie pas les anticorps produits lors de l'infection de

ceux produits lors de la réponse vaccinale. Depuis 2014, le MAT (non-remboursé par l'assurance maladie) a été remplacé par l'ELISA IgM (remboursé), ce qui a entrainé perte d'informations des sérogroupes impliqués dans les infections.

3.2. Détection-Isolement des leptospires dans l'environnement

Dans l'environnement, les leptospires peuvent être analysées selon deux techniques : culture puis isolement ou utilisation des techniques de biologie moléculaire (PCR).

3.2.1. Culture

Initialement, l'isolement des espèces pathogènes de l'environnement se faisait par inoculation de l'échantillon environnemental directement chez l'animal, puis récupération des organes ou du sang en cas d'apparition de la maladie (Baker and Baker, 1970; Diesch and McCulloch, 1966). Bien que spécifique, cette méthode a été interdite pour des raisons éthiques évidentes et par manque de sensibilité.

Après nombre d'essais sur des milieux de culture variés, le milieu EMJH reste le plus répandu dans les études. Il est fréquemment supplémenté par le cocktail d'antibiotiques STAFF (voir partie ci-dessus) (Chakraborty et al., 2011). Des études supplémentaires seraient nécessaires pour établir l'efficacité de ces milieux de culture et agents sélectifs sur la croissance de l'ensemble des souches de leptospires (Goarant et al., 2019). Ce processus d'isolement est donc susceptible d'engendrer une perte de diversité au sein de l'échantillon. Malgré l'absence de données sur les VBNC (leptospires viables mais non-cultivables), la capacité de différentes souches à croître *in vitro* dans des milieux de culture reste encore incertaine (Li et al., 2014). De la même manière, le délai de croissance étant variable entre les espèces, l'isolement des saprophytes (culture plus rapide) sera favorisé au détriment des pathogènes (Chaiwattanarungruengpaisan et al., 2018; Scialfa et al., 2018).

Isoler les leptospires pathogènes de l'environnement reste particulièrement compliqué (Benacer et al., 2013) et il n'existe actuellement aucun protocole standard et que peu d'études concernant la culture de ces espèces issues d'échantillons environnementaux (eau ou sol). Outre leurs exigences spécifiques de croissance (Ellinghausen, 1973) et la compétition avec les saprophytes, l'isolement des pathogènes peut être très impactée par la prolifération de flore interférente (Saito et al., 2013). Une filtration sur filtre 0,22 µm permet de réduire cette contamination bactérienne (Kaboosi and Razavi, 2010).

Cette approche non quantitative permet d'obtenir uniquement une détection en présence/absence des leptospires. Les conditions exigeantes ainsi que la lenteur de croissance des leptospires entraîne une faible sensibilité de la détection par culture (Limmathurotsakul et al., 2012). Les limites de quantification et détection par culture sont difficiles à déterminer, car elles sont particulièrement

dépendantes de la qualité et de la composition du milieu de culture (Budihal, 2014; Musso and La Scola, 2013).

3.2.2. PCR

Considérant les nombreuses problématiques inhérentes à la culture des leptospires issues d'échantillons environnementaux, l'utilisation de la biologie moléculaire a été généralisée. Elle permet d'amplifier la teneur en ADN, ce qui est extrêmement utile lorsque la quantité initiale de matériel biologique dans les échantillons est faible (Samrot et al., 2021).

Les techniques de PCR se sont développées autour de gènes spécifiques des leptospires. L'utilisation d'amorces du gène *rrs* permettent de détecter l'ensemble des leptospires, i.e. espèces saprophytes et pathogènes (Mohd Ali et al., 2018; Pérez et al., 2020). Les gènes *secY* et *flaB* sont des gènes conservés et ont fréquemment été utilisés pour concevoir des amorces permettant une détection spécifique des pathogènes(Ahmed et al., 2011; Guernier et al., 2018; Villanueva et al., 2014). La majorité des études se base sur la détection des espèces potentiellement pathogènes, en ciblant des gènes spécifiques des pathogènes (groupe P1) tels que *lipL32* (Gamage et al., 2020; Muñoz-Zanzi et al., 2014; Rawlins et al., 2014), *ligB* (Benacer et al., 2017), ou *lfb1* (Guernier et al., 2018). Des polymorphismes dans les séquences des gènes *secY* et *lipL32* peuvent limiter l'identification de certaines leptospires pathogènes présentes dans l'environnement, appartenant au groupe P2 (anciennement groupe intermédiaire) (Ganoza et al., 2006; Thaipadungpanit et al., 2013).

L'utilisation de la PCR multiplex (combinaison d'amorces) ciblant différents gènes permet de limiter l'apparition de ces faux positifs et d'améliorer la sensibilité et la spécificité de la détection (Ahmed 2012). Plusieurs équipes ont mis en place une PCR multiplex ciblant les gènes *rrs* (16S) et *lipL32* permettant ainsi la discrimination entre leptospires totales et leptospires pathogènes (Bedir et al., 2010; Vital-Brazil et al., 2010).

Par manque de sensibilité, la PCR conventionnelle étant parfois remise en question (Brown et al., 1995; Mérien et al., 1992), elle a été remplacée par la PCR quantitative en temps réel (qPCR). Cette technique de détection sensible et spécifique, permet de suivre cycle après cycle l'évolution de la réaction de PCR et la quantité d'ADN cible synthétisé, et ce grâce à un marqueur fluorescent (Espy et al., 2006).

Il existe principalement deux chimies différentes : SYBR Green et TaqMan. La technologie SYBR Green est relativement rentable et facile à utiliser. Elle se base sur la liaison du colorant fluorescent à l'acide désoxyribonucléique double brin (dsDNA). La technologie TaqMan est un peu plus chère et se base sur l'activité d'oligonucléotide et d'exonucléase à double marquage de l'enzyme Taq polymérase. La différence la plus importante entre ces deux techniques repose sur le fait que la chimie SYBR Green

détectera tous les ADN double brin, y compris des produits de réaction non spécifiques tandis que la technologie TaqMan présente une plus grande spécificité (Tajadini et al., 2014).

La PCR conventionnelle permet d'obtenir une quantification absolue ou relative de la quantité initiale d'ADN cible (ou ARN dans le cas d'une RT-PCR) (Musso and La Scola, 2013). Avec cette méthode, les limites inférieures de détection se situent en moyenne entre 1 à 10 copies/réaction selon les études et les matrices (Riediger et al., 2016) en accord avec le MIQE (Bustin et al., 2009).

L'ADN génomique est ainsi quantifiable par les méthodes classiques de qPCR mais elles ne permettent pas de statuer du caractère viable de ces bactéries. Des intercalants de l'ADN (EMA, PMAxx, CDDP) sont utilisés pour amplifier uniquement les bactéries dont la paroi est intègre (aucune amplification sur les non-intègres et sur l'ADN libre) (Figure 23).

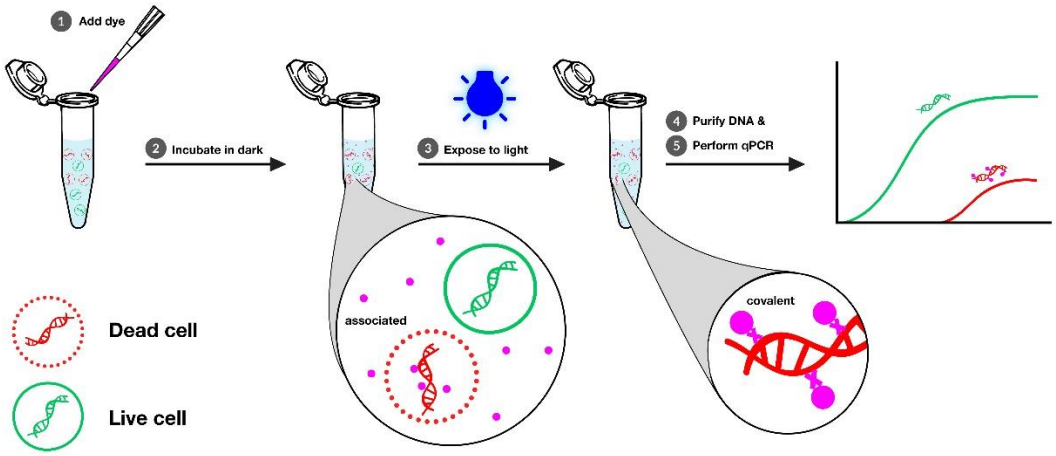


Figure 23. Schéma de principe des différentes étapes d'utilisation des intercalants de l'ADN : ajout de l'intercalant, incubation, exposition à la lumière, extraction d'ADN et qPCR (Biotium®).

Cette PCR, dite d'intégrité, limite la surestimation potentielle des pathogènes car elle n'amplifie pas l'ADN libre issu de la lyse de la bactérie (Casanovas-Massana et al., 2018c; Thibeaux et al., 2017a).

3.2.3. Séquençage

Le métabarcoding de l'ADN environnemental peut être utilisé pour explorer les microbiomes environnementaux et d'évaluer la diversité des espèces bactériennes et notamment les pathogènes. Ainsi pour les leptospires pathogènes qui sont difficiles à isoler et longues à cultiver, le traçage direct de tout l'ADN aquatique par métagénomique constitue une alternative intéressante. L'optimisation de l'analyse des leptospires dans ces matrices environnementales est toujours d'actualité (Thibeaux et al., 2018b), avec notamment des projets concernant l'amélioration de l'étape d'extraction (étape sujette aux problèmes d'inhibition) (Riediger et al., 2016). Enfin, l'avènement des approches de séquençage de l'ADN de nouvelle génération fournissent des données supplémentaires (Huang, 2014;

Sato et al., 2019; Takhampunya et al., 2019) sur l'écologie des leptospires essentielles pour mettre en œuvre des mesures de prévention adaptées. Le métabarcoding environnemental a révélé l'impact de la nature des régions agroécologiques sur la diversité des espèces de leptospires, des bactéries environnementales et des espèces animales réservoirs (Gamage et al., 2020).

Contrairement aux tests conventionnels, et malgré leur coût élevé, les technologies de séquençage nouvelle génération (NGS) présentent de nombreux avantages. En effet, elles font preuve d'un délai d'exécution plus rapide pour des volumes d'échantillons élevés, d'une limite de détection relativement basse, d'un débit plus élevé grâce au multiplexage des échantillons ainsi que d'une capacité à séquencer simultanément des milliers de gènes ou de régions génétiques. Cependant, afin d'éviter la contamination de l'échantillon par la matrice, des tests plus conventionnels (PCR conventionnelle ou le séquençage de Sanger) peuvent parfois être utilisés en contrôle.

En 2018, Jorge et coll. ont utilisé le séquençage du génome entier pour décrire la diversité des leptospires pathogènes à Rio de Janeiro (Jorge et al., 2018). L'étude a été faite dans de l'eau d'une piscine abandonnée et *L.interrogans* a été détecté dans ces échantillons (Forster et al., 2013).

En 2021, Urban et son équipe ont utilisé des nanopores portables afin d'établir l'analyse métagénome de l'environnement hydrique de Cambridge (Urban et al., 2021). Cette technique leur a permis d'obtenir une représentation temporelle et physico-chimique du microbiome dans ces eaux douces. Dans une démarche de protection des populations, ces données permettraient d'avoir une cartographie des pathogènes au niveau de l'espèce, mais également d'identifier les contaminations ponctuelles par des eaux usées.

Le NGS a également été utilisé dans le cadre de l'identification des souches de leptospires retrouvées chez l'homme (W et al., 2017; Wilson et al., 2014) et au sein du réservoir animal (Desvars-Larrive et al., 2020). Ces études sur le diagnostic humain suggèrent que le NGS a un fort potentiel d'application dans l'identification des agents infectieux au sein des échantillons cliniques, permettant de confirmer ou exclure l'implication des bactéries dans la pathologie humaine.

Bien que le gène *lipL32* soit une cible adaptée dans la détection clinique des leptospires pathogènes, la forte présence d'orthologues de *lipL32* dans l'environnement impacte l'usage de ces techniques particulièrement sensibles (Sato et al., 2019). Le gène *rrs* semble être une cible plus adaptée dans la détection bactérienne au sein d'une large variété d'environnement(Gamage et al., 2020).

Ces dernières années, le séquençage d'amplicon du gène ARNr 16S a été utilisé dans différentes analyses bactériennes. Brandt et coll. ont pu établir une limite de détection à 10^1 bactéries/mL en utilisant des solutions contrôles dopées avec *E.coli*. Cependant, à faible concentration ($<10^1$

bactéries/mL), ils ont remarqué plusieurs OTU contaminantes constituant environ 8% des séquences lues. L'abondance relative des OTU semble également varier avec la région de l'ARNr 16S choisie (meilleure identification dans la région V3-V4). L'expérience de limite de détection met également en évidence l'importance d'inclure des échantillons de contrôle appropriés dans le flux de travail (Brandt and Albertsen, 2018).

4. Environnement et qualité de l'eau

4.1. Environnement

L'isolement des leptospires provenant d'échantillons environnementaux étant compliqué, les études portant sur ces pathogènes environnementaux ont été assez limitées par le passé. Il n'existe aucune technique phénotypique simple et spécifique permettant l'identification des espèces. Comme évoqué précédemment, la culture des leptospires à partir d'échantillons environnementaux est souvent inhibée par la prolifération de flore interférente. Dans le cadre de l'identification des leptospires pathogènes, leur croissance peut également être freinée par le développement d'espèces saprophytes à croissance plus rapide. Les auteurs ayant utilisé la culture dans l'analyse environnementale, ont majoritairement détecté des leptospires saprophytes (Cinco et al., 1987; Thibeaux et al., 2017a; Wilson and Fujioka, 1995). Contrairement aux espèces pathogènes qui ne font que survivre dans l'environnement, les saprophytes s'y multiplient, ce qui peut expliquer en partie leur prédominance lors des isolements. Certains travaux d'inoculation d'échantillons environnementaux chez l'animal sensible ont permis d'isoler quelques leptospires pathogènes (Diesch and McCulloch, 1966).

Pour pallier à cela, des méthodes moléculaires ont été développées, permettant l'amplification de gènes spécifiques de leptospires à partir d'échantillons environnementaux. Des études récentes ont été menées à la suite d'épisodes d'infection et ont permis une quantification de ces bactéries dans les eaux ou le sol (Thaipadungpanit et al., 2013).

La compréhension de l'écologie et de la survie des leptospires dans l'environnement a obtenu un regain d'intérêt ces dernières années, depuis l'avènement de la démarche One Health (Dzulaikha et al., 2018; Gamage et al., 2020; Wójcik-Fatla et al., 2014). Le développement accru des techniques de séquençage haut débit permettra d'obtenir une meilleure identification des espèces impliquées dans ces infections. Des études génomiques ont permis de suggérer une adaptabilité de certaines leptospires pathogènes avec le maintien de gènes associés à la survie dans l'environnement (Saito et al., 2013; Thibeaux et al., 2018a, 2018b). Les espèces résistantes dans l'environnement (ex : *L. interrogans*) peuvent donc être transmises par l'eau tandis que d'autres (ex : *L. borgpetersenii* serovar Hardjo souches L550 et JB197), délaissées de ces gènes de survie, seraient uniquement transmises lors de contact direct d'hôte à hôte (Bulach et al., 2006).

Les Tableau 11, Tableau 12, Tableau 13 et Tableau 14 recensent la plupart des études portant sur la détection des leptospires (majoritairement pathogènes) au sein des différentes matrices environnementales (Goarant et al., 2019).

Les leptospires ont été retrouvées dans les zones urbaines et rurales. Cependant la concentration des espèces pathogènes en zone urbaine est fréquemment supérieure à celle en zone rurale. Au Pérou et en Inde, des études ont montré une proportion d'échantillons positifs plus importante en ville (bidonville) plutôt qu'en campagne (fermes). Au sein d'une même étude (à limite de quantification constante) ce facteur peut être jusqu'à 20 fois supérieur entre ces deux environnements (Ganoza et al., 2006; Lall et al., 2016). De même la diversité des leptospires semble plus importante en milieu rural qu'en milieu urbain. L'eau douce représente l'un des principaux vecteurs de leptospiroses humaine et animale.

Tableau 11. Présence des leptospires pathogènes dans les eaux de surface (d'après (Goarant et al., 2019) et mis à jour).

Localisation	Année	Description de l'échantillon	% positivité (Nombre)	Méthode de détection	Références
Brazil (Pelotas)	NR[a]	Stagnant Water (abandoned swimming pool with dead possums and rats)	100% (1/1)	Culture (Few Drops)	Forster et al., 2013
Brazil (Rio de Janeiro, Petropolis)	2009 (May to July)	Community water supplies, small lakes, and surface water	0.1% (1/100)	Multiplex PCR on 125 mL. lipl32 and 16srRNA both genes amplified in pathogenic species	Vital-Brazil et al., 2010
Brazil (Salvador, Pau da Lima)	2011 to 2012 (July to January)	Standing Water	34% (82/250)	lipL32 qPCR on 40 mL water sample	Casanovas-Massana et al., 2018
Chile (Los Rios)	2010 to 2012 (November to April)	Puddles	19.3% (36/306)	lipL32-PCR on 50mL to 1.0L water	Muñoz-Zanzi et al., 2014
Chile (Los Rios)	2010 to 2012 (November to April)	Water in open containers	45.5% (10/22)	lipL32-PCR on 50mL to 1.0L water	Muñoz-Zanzi et al., 2014
Chile (Los Rios)	2010 to 2012 (November to April)	Water Canals/Rivers	3.9% (4/103)	lipL32-PCR on 50mL to 1.0L water	Muñoz-Zanzi et al., 2014
Chile (Los Rios)	2010 to 2012 (October to April)	Puddles	27.3% (84/208)	PCR and sequencing on 50 mL to 1L water	Mason et al., 2016
Chile (Los Rios)	2010 to 2012 (October to April)	Water in open containers	14.4% (28/194)	PCR and sequencing on 50 mL to 1L water	Mason et al., 2016
Chile (Los Rios)	2010 to 2012 (October to April)	Water Canals/Rivers	9.7% (13/134)	PCR and sequencing on 50 mL to 1L water	Mason et al., 2016
Colombia (Cordoba)	2009 to 2011	Well Water	0% (0/18)	Culture enrichment. 0.5 mL with and without filtration through 0.45µm filter	Calderon et al., 2014
Colombia (Cordoba)	NA[b]	Untreated water samples	0% (0/13)	15 mL water samples collected on farms. Centrifuged 14,000 rpm / 5 min. Pellet washed by PBS. PCR and sequencing.	Ensuncho-Hoyos et al., 2017
Ecuador (Abdon Calderon and Santa Ana de Vuelta Larga)	December 2013 and March 2015 2015 (April and May)	Water river	3.7% (4/ 108) 4.2% (1/24)	SNP111 (rrs) PCR	Miller et al., 2021
France (Lyon)	2008 (Spring)	Water	6.38% (3/47)	qPCR on 50 mL of water. 10^3 to 10^4 genome-equivalents/mL	Vein et al., 2012
India (Nicobar and Andaman Islands)	2012	Urban Water Samples	9.7% (11/113)	PCR on 20 mL water sample, Centrifuged 8,000 g for 10 min. DNA extracted from pellet	Lall et al., 2016
India (Nicobar and Andaman Islands)	2012	Rural Water Samples	6.7% (9/133)	PCR on 20 mL water sample, Centrifuged 8,000 g for 10 min. DNA extracted from pellet	Lall et al., 2016
India (Nicobar and Andaman Islands)	2012	Paddy Fields	15.9% (18/113)	PCR on 20 mL water sample, Centrifuged 8,000 g for 10 min. DNA extracted from pellet	Lall et al., 2016
Island of St. Kitts	NA	Water (Environmental water: ponds, puddles, water dams, mountain spring and stream)	18.18% (8/44)	qPCR on 300 mL environmental water sample (20.6 to 56 genomes per 300 mL)	Rawlins et al., 2014
Italy	2005	Water (From toilet and tap)	50% (2/4)	Environmental source tracking after fatal case	Luchini et al., 2008
Japan (Kanto region)	2018-2019 (April to January)	Environmental sources (rivers, agriculture waterways, rice fields, lakes, puddles, fish tanks)	48% (48/100)	rrs qPCR on 10 mL of surface water	Masuzawa et al., 2019
Malaysia	2012 to 2013 (December to November)	Water	0% (0/72)	40 mL of water filtered through 0.2µm, filtrate centrifuged 4,000g/27°C/20 min before culture.	Azali et al., 2016
Malaysia (Lubuk, Yu, Pahang)	2011	Stagnant Water	100% (8/8)	PCR on 100 mL of water	Sapian et al., 2012
Malaysia (Kelantan)	2016 (June to September)	Water	0% (0/21)	100 mL sample, cultured 1 mL filtered through 0.22µm with 5-Fluoro-Uracil	Mohd Ali et al., 2018
Malaysia (Kelantan and Terengganu)	2009 (April)	Water after culture pre-enrichement	6.78% (12/177)	PCR after enrichment in culture, 5-10 drops used	Ridzlan et al., 2010

Malaysia (Sarawak)	2014 to 2015 (April to February)	Water (Drain effluent, river, lake, puddle)	1.96% (6/324)	PCR on 50 mL water sample	Pui et al., 2017b
Malaysia (Terengganu)	2012 (February and March)	Water	7.5% (3/40)	Culture (EMJH media) and PCR. 2.5 ml of 0.22µm filtrated water or pellet of 985 ml	Ismail et al., 2014
Malaysia (Selangor, Semenyih district)	2016 (February to July)	Recreationnal stream water samples	21.4% (27/126)	lipL32 qPCR on 500 mL of water sample	Dzulaikha et al., 2018
Nicaragua (León, Chinandega, Jinotega)	2017-2018 (July to February)	Water (Stored water, Puddles, Wells, Rivers)	5.12% (4/78)	1L water sample, lipL32 PCR after enrichment in culture with STAFF, 3 drops used	Flores et al., 2020
New Caledonia (North province regions)	2016 (March to June)	Water	0% (0/10)	PCR/Viability-PCR on 10 mL of water. Linked the identity of environmental *Leptospira* to human infecting strain	Thibeaux et al., 2017
Russia (lake Nero, Yaroslav region)	1974 (June to September)	marsh and bank of lake (moisture: 69.5 to 70.3%, pH 7.4 to 7.8)	1.1% (7/630)	1 g sample suspended into 5 mL. Inoculation to hamsters. Isolated 4 serogroups grippotyphosa and 1 serogroup hebdomadis	Karaseva et al., 1977
Sri Lank (Yatinuwara and dunuwara DS, Kandy District, Girandurukotte, Mahiyanganaya DS, Badulla District)	2018 (December)	Irrigation water	60% (12/20)	flab sequencing on 500mL-1L filtered through 0.45µm	Gamage et al. 2020
Thailand (Khon Kaen and Nakhon Ratchasima Province)	2005 to 2006 (Nov to Jan)	Water	23% (23/100)	Duplex PCR	Tansuphasiri et al., 2006
Thailand (Bangkok)	2011 (November)	River Water	0% (0/2)	1.5-6 L. qPCR. Bacteria collected on 0.2 µm filter membrane	Chaturongkasumrit et al., 2013
Thailand (Bangkok)	2011 (November)	Flood Water	8.33% (1/12)	1.5 to 6 L. qPCR. Bacteria collected on 0.2 µm filter membrane (Single positive from urban residential area, sample was turbid with pH 8.05, Vibrio cholerae detected)	Chaturongkasumrit et al., 2013
Thailand (Bangkok province, Don Muang district and Nakhon Pathom province)	2011 (November and December)	Floodwater	0.9% (1/110)	PCR and Culture on 100 mL of flood water (50 mL for PCR, 50 mL for culture)	Thaipadungpanit et al., 2013
Thailand (Nan Province)	2013 to 2016	Water	21.4% (3/14)	Rrs nested PCR and MLST performed on 50 mL of water. Underground water source used in animal husbandry, drinking/cleaning pens, and/or rice fields	Kurilung et al., 2017
Thailand (western)	2018 (February)	Water (river, mud pond, wtaer supplies)	83% (10/12)	rrs qPCR	Chaiwattanarungruengpaisan et al., 2020
			75% (9/12)	secY qPCR on 0.5 mL filtered through 0.22 µm from 30 mL, cultured at 28°C	
Thailand (Si Sa Ket and Nakhon Si Thammarat provinces)	NR	Water (pond, ground water, rivers or irrigation channels)	28% (9/32) 50% (11/22)	rss qPCR LipL32 qPCR on 20 mL of water	Narkkul et al., 2020
USA (IL)	1998 (July)	Water from coastal and non-coastal areas. Lake Springfield (Triathlon)	3.7% (1/27)	PCR	Morgan et al., 2002

aNR: Not Reported; bNA: Not Available

Tableau 12. Présence des leptospires pathogènes dans les eaux usées et les égouts (d'après Institut Pasteur International Network, 2019 et mis à jour).

Localisation	**Année**	**Description de l'échantillon**	**% positivité (Nombre)**	**Méthode de détection**	**Références**
Brazil (Salvador, Pau da Lima)	2014 (July and August)	sewage	88% (7/8)	*Lip*L32 qPCR on 40 mL water sample	Casanovas-Massana et al., 2018 bis
Brazil (Salvador, Pau da Lima)	2011 to 2012 (July to January)	Sewage Water	36% (121/335)	*Lip*L32 qPCR on 40 mL water sample	Casanovas-Massana et al., 2018

Colombia (Cordoba)	2009 to 2011	Waste water (from pig stable)	5.56% (1/18)	Culture enrichment 0.5 mL with and without filtration through 0.45µm filter	Calderon et al., 2014 ;
UK (London)	1977	Sewage (cattle market and farms)	100% (2/2)	Culture of 20 mL, serogroup Tarassovi identified	Coghlan and Kmety, 1987
UK (Oxford)	1980 to 1981	Sewage and sewage sludges	15.9% (30/189)	Culture[a] 20ml reduced to 0.2ml. Via centrifugation/filtration. Tarrassovi serotype identified	Jones et al., 1981

[a]Liquid and solid EMJH supplemented with 5-Fluoro-Uracil (100 µg/ml), rabbit serum 1%, Amphotericine B (50µg/ml), Sulphatiazole (50 mg/L), neomycin sulphate (5 mg/L), actidione (0.5 mg/L) and incubated at 29°C. Identification by serological typing.

Tableau 13. Présence des leptospires pathogènes dans le sol et à l'interface sol-eau (d'après Institut Pasteur International Network, 2019 et mis à jour).

Localisation	**Année**	**Description de l'échantillon**	**% positivité (Nombre)**	**Méthode de détection**	**Références**
Brazil (Salvador, Pau da Lima)	2014 (July and August)	Soil	31% (22/70) 86% (60/70)	*lip*L32 qPCR on 5g soil sample *rrs* qPCR on 5g soil sample	Schneider et al., 2018
Ecuador (Abdon Calderon and Santa Ana de Vuelta Larga)	2014 (July and August) 2015 (April and May) 2018 (July)	Soil (shore of rivers)	22% (14/64) 16.7% (8/48) 40% (10/25)	SNP111 (rrs) PCR	Miller et al., 2021
India (Archipelago of Andaman and Nicobar)	NR[a]	Waterlogged paddy field soil	60% (6/10)	PCR on five sterile glass rods (buried up to 3'' deep in different waterlogged paddy field soils and allowed to rest for 48 h)	Vinod Kumar et al., 2015b
India (Nicobar and Andaman Islands)	2014 (July to August)	Paddy field Water and Leaves	24% (34/142)	PCR on sterile glass slides incubated for 48 h in different sources of water. Paddy leaves were collected and cut to 1 cm in length at air-liquid interphase	Vinod Kumar et al., 2016a
Japan (Hokkaido and Okinawa)	2014 to 2016 (July to April)	Soil	9.1% (12/132)	20 g of soil, culture with STAFF and 16S rDNA for identification	Masuzawa et al., 2018
Malaysia	2012 to 2013 (December to November)	Soil	1.39% (1/72)	No sample volume for soil. Soil resuspended with sterile water. Supernatant filtered through 0.2µm before culture.	Azali et al., 2016
Malaysia (Kelantan)	2016 (June to September)	Soil	33.3% (7/21)	20 g soil sample, cultured 1 mL washings filtered through 0.22µm with 5-Fluoro-Uracil	Mohd Ali et al., 2018
Malaysia (20 miles around Kuala Lumpur)	1961 to 1962	Water and Soil	2.9% (397/13,848)	1 to 5 ml of water. 0.5 ml washing of topsoil. Inoculation to hamsters/guinea pigs. Serogroup Pomona isolated[b]	Baker and Baker, 1970
Malaysia (Lubuk, Yu, Pahang)	2011	Surface Soil	50% (2/4)	PCR of 100 g of soil	Sapian et al., 2012
Malaysia (Lubuk, Yu, Pahang)	2011	Deep Soil (30 cm)	12% (3/25)	PCR of 100 g of soil	Sapian et al., 2012

Malaysia (Sarawak)	2014 to 2015 (April to February)	Surroundings of housing areas, landfills, open field, and lake soil	11.6% (34/292)	PCR on 20 g	Pui et al., 2017a
Nicaragua (León, Chinandega, Jinotega)	2017-2018 (July to February)	Soil (Puddles, Rivers)	4.76% (2/42)	3 g soil sample, l*ipL32* PCR after enrichment in culture with STAFF, 3 drops used	Flores et al., 2020
New Caledonia (North province regions)	2016 (March to June)	Soil	56.69% (30/52)	PCR/Viability-PCR on 250 mg soil. Pathogenic leptospires were alive and present in soils several weeks after the infecting event	Thibeaux et al., 2017
New Caledonia (North province regions)	2016 (March to June)	Vegetal Float debris	12.2% (2/11)	PCR/Viability-PCR on 250 mg vegetal debris	Thibeaux et al., 2017
Philippines (Leyte Province)	2014 (January)	Wet Soil	48% (11/23)	PCR and culture enrichment on 10 g of wet soil (16S rRNA gene sequence similar to L. kmetyi)	Saito et al., 2014
Poland (Lublin province)	2010 to 2013	Water and Soil	0.94% (2/212)	Traditional and Nested PCR targeting *lip*L-32 (5L of water and soils were collected in 50mL falcon tube)	Wojcik-Fatla et al., 2014
Taiwan (Yunlin, Chiayi, Tainan)	2010 (May-December)	Soil	30.6% (33/108)	Nested PCR on 100 mg soil sample. Investigation following two flood hazards due to typhoons Morakot and Fanapi	Fuh et al., 2011
Thailand (Western Part)	2016 (November)	Water and Soil	35.3% (6/17)	Cultured in liquid and solid EMJH supplemented with 100µg/ml of 5-Fluoro-Uracil followed by a rrs nested PCR. Water: 0.5 mL filtered through 0.22 µm from 30 mL, cultured at 28°C.Soil: 50 g, washings filtered through 0.22µm cultured at 28°C	Chaiwattanarungruengpaisan et al., 2018
Thailand (western)	2018 (February)	Soil (river, mud pond, elephant barn)	67% (8/12) 58% (7/12)	*rrs* qPCR *secY* qPCR on 50 g, washings filtered through 0.22µm cultured at 28°C	Chaiwattanarungruengpaisan et al., 2020
UK (London)	1935	Slime from London sewers	6.7 (2/30)	Inoculation to guinea pigs	Alston, 1935
USA (FL, Tampa)	2017 (December)	WaterSoil	0.0% (0/15) 0.0% (0/11)	500 µl to 30 ml of water cultivated in EMJH medium with 5-fluoruracil	Stern et al., 2010
USA (IA)	1964 (August to September)	Big Creek water. Sampled with soil	30% (1/3)	Inoculation to guinea pigs. 5ml Intraperitoneal injection	Diesch and McCulloch, 1966
USA (CA, Long Valley, Little Hot Creek Spring)	2015 (June)	Dendrolitic cone	100% (1/1)	16S metagenomic sequencing (Illumina MiSeq platform). V4 region of the 16S rRNA gene (positions 519 to 802, *Escherichia coli* numbering). Dendrolitic cones ranged in height from 0.5-2.0 cm	Bradley et al., 2017

aNR: Not Reported; bIsolated from blood cultures of moribund animals

Tableau 14. Présence des leptospires pathogènes dans l'eau déstinée à la consommation humaine (d'après Institut Pasteur International Network, 2019 et mis à jour).

Localisation	Année	Description de l'échantillon	% positivité (Nombre)	Méthode de détection	Références
Chile (Los Rios)	2010 to 2012 (November to April)	Animal drinking water[a]	14.5% (12/83)	*lip*L32-PCR on 50mL to 1.0L water	Muñoz-Zanzi et al., 2014
Chile (Los Rios)	2010 to 2012 (November to April)	Human drinking sources	19.1% (9/47)	*lip*L32-PCR on 50mL to 1.0L water	Muñoz-Zanzi et al., 2014
Chile (Los Rios)	2010 to 2012 (October to April)	Animal drinking water[a]	16.5% (14/85)	PCR and sequencing on 50 mL to 1L water	Mason et al., 2016
Chile (Los Rios)	2010 to 2012 (October to April)	Human drinking sources	14.7% (14/95)	PCR and sequencing on 50 mL to 1L water	Mason et al., 2016
China (Nanjing, Bejhekou drinking water plant)	NA[b]	Drinking Water	0.45% of total metagenomic reads	Metagenomics (454 pyrosequencing). *L. interrogans* still in tap water after chlorination	Huang et al., 2014
Colombia (Cordoba)	2009 to 2011	Animal drinking water[a]	5.56% (1/18)	Culture enrichment. 0.5 mL with and without filtration through 0.45µm filter	Calderon et al., 2014
Colombia (Cordoba)	NA	Drinking Water	0% (0/13)	15 mL water samples collected on farms. Centrifuged 14,000 rpm / 5 min. Pellet washed by PBS. PCR and sequencing.	Ensuncho-Hoyos et al., 2017
Thailand (Bangkok)	2011 (November)	Tap Water	0% (0/11)	1.5-6 L. qPCR. Bacteria collected on 0.2 µm filter membrane	Chaturongkasumrit et al., 2013
Thailand (Bangkok)	2011 (November)	Filtered Tap Water	0% (0/5)	1.5-6 L. qPCR. Bacteria collected on 0.2 µm filter membrane	Chaturongkasumrit et al., 2013
Thailand (Si Sa Ket and Nakhon Si Thammarat provinces)	NR	Tap water	100% (2/2)	*LipL32* qPCR on 20 mL of water	Narkkul et al., 2020

[a]Non-potable drinking water for animals; bNA: Not Available

4.1.1. Eaux

a. Eaux de surface

Historiquement, la détection par les méthodes de culture a majoritairement mis en évidence la présence de leptospire saprophytes, ubiquitaires dans l'environnement. Par la suite, l'utilisation de la PCR classique a mis en évidence que 23% des échantillons d'eau de surface testés en Malaisie et en Thaïlande contenait des leptospires pathogènes (Azali et al., 2016; Benacer et al., 2013; Tansuphasiri et al., 2006). La quantification des leptospires au sein des échantillons environnementaux a été possible par l'utilisation de la PCR quantitative en temps réel (qPCR). Ces estimations ont été retrouvées dans différentes publications ; elles étaient de 10^2 leptospires/mL dans un bidonville brésilien (Casanovas-Massana et al., 2018a), de 1 à 10^4 bactéries/mL dans les eaux de surface péruviennes (Ganoza et al., 2006) et de 10^3 à 10^4 bactéries/mL dans des étangs français (Vein et al., 2012). Ces résultats sont à considérer avec précaution car, l'absence de méthode de détection standardisée peut en partie être à l'origine de ces variations et sous-évaluer leur prévalence dans les zones endémiques.

En climat tropical, l'analyse des cours d'eau hawaïens a révélé la présence de leptospires dans 98,8% des échantillons analysés (Viau and Boehm, 2011) ainsi qu'une corrélation entre concentration en bactéries et turbidité. Les zones soumises à des phénomènes de crue sont également propices à de fortes concentrations en leptospires et restent à surveiller (Chaturongkasumrit et al., 2013) (Figure 24).

Figure 24. Illustration des mécanismes hypothétiques de survie et de dispersion des leptospires dans l'environnement lors de pluies intenses (Bierque et al., 2020b).

Cependant, d'autres études ont démontré une corrélation négative entre la quantité de pluie et la présence de leptospires (Figure 25). En 2018, l'évaluation statistique de l'équipe de Dzulaikha a montré une relation négative significative entre ces deux paramètres (Dzulaikha et al., 2018).

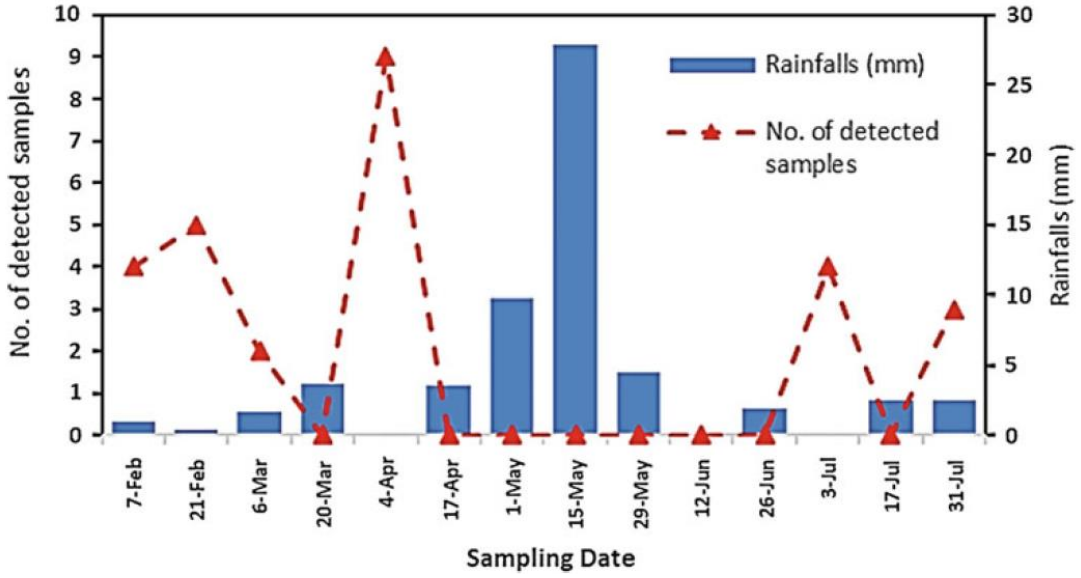


Figure 25. Superposition temporelle de la moyenne des précipitations sur une semaine avant le prélèvement et la présence de leptospires spp. dans l'eau de loisir (Dzulaikha et al., 2018).

Le nombre le plus élevé de *Leptospira* a été détecté alors que la précipitation était nulle. Pendant la saison des pluies (17 avril - 26 juin 2016), aucune leptospire n'a été détectée. La probabilité de détecter des *leptospires spp.* dans les eaux était plus élevée au moment des faibles précipitations. Premier rapport sur l'association des précipitations et de la présence de leptospires spp. dans les eaux destinées aux activités de loisir, il a soulevé la nécessité d'une surveillance particulière de ces bactéries pendant la saison sèche, dans les pays au climat tropical mais également lors de forts événements pluvieux. En effet, dans certains cas, on peut observer un délai entre les événements pluvieux et la survenue des cas de leptospiroses (Desvars-Larrive et al., 2017).

Actuellement, aucun consensus n'a émergé concernant le lien entre la présence des leptospires dans l'environnement et la pluviométrie. En 2017, Joshi et ses collègues ont analysé l'impact de l'augmentation de différents paramètres (température, humidité, pluviométrie, ensoleillement, etc.) sur la présence des leptospires pathogènes (Joshi et al., 2017a). Quotidiennement, l'augmentation de 1% de l'humidité relative minimale et l'augmentation de 1 mm des précipitations ont été respectivement associées à des augmentations de 4 % et de 2 % des cas de leptospirose hebdomadaires, à 11 et 6 semaines plus tard. Cet effet retardé entre une dégradation des conditions météorologiques et une augmentation des leptospires détectées dans l'environnement a également été relaté par Dhewantara (Dhewantara et al., 2019). Dans cette étude, l'utilisation de la télédétection

environnementale et l'analyse de certains paramètres (pluviométrie, indicateur d'inondation et température) semblent être de bons prédicteurs d'épidémie de leptospirose. Ils pourraient représenter une voie pour le développement d'un système d'alerte précoce contre cette maladie en Chine.

Les facteurs météorologiques jouent donc un rôle important dans les épidémies de leptospirose et leur impact varie en fonction du type de climat (Goarant et al., 2009). Leur analyse représente la clé pour prévenir le risque de cette maladie : la protection des populations doit alors être adaptée pour chaque pays.

b. Eaux souterraines et eau potable

La présence des leptospires dans les eaux souterraines est très peu documentée. Cependant, certains auteurs ont montré que de l'ADN de leptospires a été significativement plus abondant dans les amibes issues d'échantillons d'eau provenant de sources de surface, que de sources souterraines (Delafont et al., 2016). En Thaïlande, des leptospires pathogènes ont été retrouvées dans des sources d'eau souterraines utilisées uniquement pour l'abreuvage des animaux (Kurilung et al., 2017), 14 échantillons d'eau à destination de la consommation animale ont été testés. Le séquençage a permis de montrer que 3 d'entre eux contenaient des leptospires pathogènes avec notamment *L. interrogans* et *L.weilii*.

De l'ADN de leptospires a été retrouvé dans des eaux destinées à la consommation humaine (Mason et al., 2016), dans des puits d'eau en zone rural (Muñoz-Zanzi et al., 2014) ou au sein des amibes dans les réseaux de distribution d'eau potable (Delafont et al., 2016). D'autres études ont également révélé la présence d'ADN de leptospires dans les eaux destinées aux animaux (Calderón et al., 2014; Mason et al., 2016; Muñoz-Zanzi et al., 2014). Mason a étudié ces deux types d'eaux et parmi ces échantillons, 9 échantillons pour la consommation animale et 9 pour l'humaine humaine contenaient le pathogène *L. interrogans*.

Tableau 15. Identification de la présence de leptospires par PCR dans les eaux potables à destination humaine et animale dans la région de Los Rios au Chili, entre 2010-2012 (Mason et al., 2016).

	Village rural n = 217	Ferme n = 359	Bidonville urbain n = 240	Total n = 816
Abreuvoir pour animaux	5/28 (17,9%)	9/55 (16,4%)	0/2 (0%)	14/85 (16,5%)
Eau potable destinée à l'homme	0/10 (0%)	11/47 (23,4%)	3/38 (7,9%)	14/95 (14,7%)

Dans les filières de production d'eau potable, des leptospires ont été retrouvées après l'étape de chloration ainsi qu'au sein du réseau de distribution (Huang, 2014; Zhang et al., 2017). Des recherches supplémentaires doivent encore être menées pour établir le rôle du biofilm dans cette résistance.

c. Eaux usées et égouts

Appelée pendant longtemps « maladie des égoutiers », la leptospirose est depuis toujours associée aux eaux usées (Coghlan and Kmety, 1987; Jones et al., 1981). Les techniques moléculaires ont permis de mettre en évidence les leptospires pathogènes dans les eaux usées en Amazonie (Ganoza et al., 2006), en Colombie (Ensuncho-Hoyos et al., 2017) ou encore au Brésil (Casanovas-Massana et al., 2018c). Lors de cette étude dans des bidonvilles de Salvador, 36% des échantillons d'eaux usées (121/336) et 34% (85/250) des échantillons d'eau stagnante contenaient des leptospires pathogènes à une concentration moyenne de 152 EqG/mL. Cette forte présence de leptospires s'explique en partie par l'existence de nombreux égouts à ciel ouvert, mais surtout par la présence d'urine de rats dans ces zones. Les fortes concentrations sont mesurées lors de la saison des pluies, à proximité des zones inondables. Non considérées comme une source d'infection humaine, des leptospires ont également été isolées à partir de boues d'épuration (Coghlan and Kmety, 1987).

d. Eau de mer

Bien que les leptospires semblent avoir une faible résistance à l'eau de mer, certains auteurs ont mentionnés une relative tolérance à l'eau salée pour certaines souches (voir Salinité). L'infection des animaux marins a également été signalée et serait liée au déplacement des leptospires de la terre vers la côte à la suite de l'effet de l'écoulement des pluies (Escobedo-Hinojosa and Pardo-López, 2017).

Saito et coll. ont effectué une étude comparative sur la survie des leptospires dans l'eau de mer ou en présence de chlorure de sodium. Après exposition à une solution de chlorure de sodium à 3% (même pression osmotique que l'eau de mer), les isolats (MS432 et MS422) ont été tués en 12 h tandis qu'ils ont survécu dans l'eau de mer artificielle (eau de mer mélangée à des particules de sol) pendant 4 jours (Saito et al., 2014).

4.1.2. Sols

En raison des difficultés de culture, la présence des leptospires dans les sols a été peu investiguée par le passé. Durant la deuxième moitié du XX^{ème} siècle, les études ont montré que ces bactéries étaient plus fréquemment isolées dans des échantillons provenant du sol que ceux issus de l'eau (Alexander et al., 1975; Henry and Johnson, 1978; Schneider et al., 2018; Wilson and Fujioka, 1995) (Figure 26).

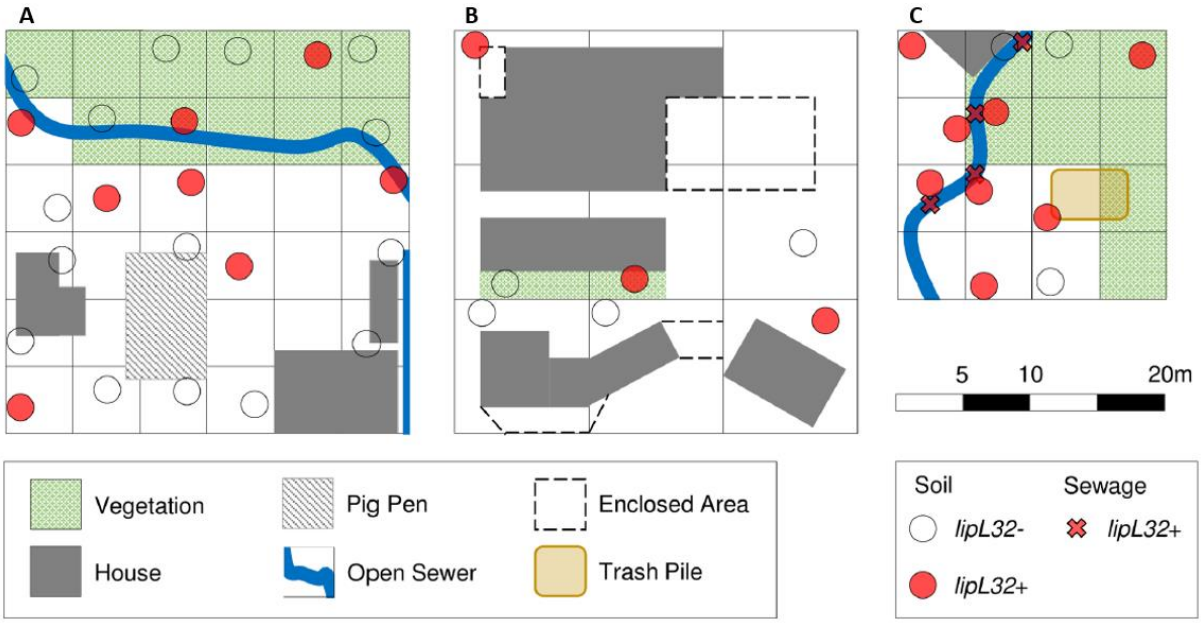


Figure 26. Échantillonnage de sol (cercle) et d'eaux usées (croix) sur trois sites (A, B et C) du site de Pau da Lima (Schneider et al., 2018).

Cette observation peut être reliée à des différences de concentration dans les deux matrices ainsi que dans les prises d'échantillons. Cela conforte la meilleure survie des bactéries dans les sols et de leur éventuelle dispersion lors de la remise en suspension des particules au cours des fortes pluies (Miller et al., 2021; Thibeaux et al., 2018b, 2018a). L'impact des inondations dans les épidémies et le lien évident entre la présence de leptospires et la turbidité confortent également cette interaction leptospires-sol (Viau and Boehm, 2011).

Contrairement à l'hétérogénéité des charges dans les eaux environnementales, Schneider et coll. ont montré qu'aucune différence significative n'a été relevée dans la concentration en leptospires au sein des échantillons de sol : 88% des échantillions prélevés à Salvador (Brésil) étaient porteurs de leptospires pathogènes (Schneider et al., 2018). Une étude environnementale réalisée au Japon montre également que la diversité des espèces isolées dans les sols semble plus développée que dans les eaux (Masuzawa et al., 2019).

En Nouvelle-Calédonie, l'utilisation de la qPCR a montré que 58% des échantillons de sol (30/52) étaient positifs aux leptospires pathogènes. Parmi ces échantillons, une partie comprenait des leptospires viables, retrouvées dans les sols des rivières plusieurs semaines après des épisodes de contamination (Thibeaux et al., 2017a). La réalisation d'enquêtes rétrospectives a démontré que cette persistance dans les sols pouvait perdurer jusqu'à 4 mois.

4.1.3. Autres

De manière occasionnelle, des aérosols comportant des leptospires ont été impliqués dans des infections des voies respiratoires (Levett, 2001). Cependant, en dépit de ces quelques cas, la leptospirose n'est pas considérée comme une infection aéroportée.

Le fumier peut être une source de contamination du fait de l'excrétion de leptospires en grande quantité via les urines des grands mammifères. La forte présence de flore bactérienne au sein de cette matrice rend leur détection ou l'isolement particulièrement compliquée (Gillespie, 1963). L'amélioration de la gestion des effluents d'élevage en Corée a diminué la prolifération des leptospires dans l'environnement (Ryu et al., 2017).

4.1.4. Survie dans l'environnement et formation de biofilms

Précurseur du concept OneHealth, Noguchi fut l'un des premiers a démontré la survie des leptospires dans l'eau potable, soulevant alors l'importance de la survie dans l'environnement comme un élément important pour comprendre l'épidémiologie de ces bactéries (Noguchi, 1919). Concernant l'étude des sols, la survie et la virulence des leptospires pathogènes furent étudiées et démontrées par Okazaki et Ringen dès 1957 (Okazaki and Ringen, 1957).

Bierque et coll. ont recensé la plupart des études portant sur la persistance des leptospires pathogènes dans l'environnement (Bierque et al., 2020a). Parmi elles, certaines confirment que les bactéries pathogènes sont capables de survivre et de rester virulentes durant plusieurs semaines dans l'eau et le sol (Casanovas-Massana et al., 2018a; Hu et al., 2017). Cette capacité de survie environnementale est espèce-dépendante mais également souche-dépendante (Smith and Turner, 1961). Au sein du sous-groupe P1 et contrairement *à L. interrogans*, espèce de référence et persistante dans l'environnement (Thibeaux et al., 2017a), *L. borgpetersenii* ne semble pas survivre longtemps après excrétion hors de l'hôte (Bulach et al., 2006). A l'inverse, des espèces telles que *L. kmetyi* ont uniquement été identifiées dans l'environnement, avec une forte présence dans les sols (Slack et al., 2009). Une survie de 20 mois de *L. interrogans* dans de l'eau minérale a été observée par André-Fontaine et collaborateurs. Ces résultats doivent être considérés avec précaution car la matrice était également composée de milieu EMJH (0,7%), ce qui correspond à un milieu de culture particulièrement dilué (Andre-Fontaine et al., 2015).

Communément accepté dans le domaine scientifique, les leptospires pathogènes peuvent survivre pendant plusieurs semaines sous forme d'agrégats, dans des conditions favorables (température et humidité) (Trueba et al., 2004) mais également en l'absence de nutriments (Bierque et al., 2020b). Cette configuration favorise le taux de transmission des leptospires et l'apparition d'épidémies (Dierks et al., 2018; Mohd Radi et al., 2018). La formation du biofilm et son rôle dans la persistance des

leptospires pathogènes dans l'environnement sont des thématiques émergentes et leurs études sont assez récentes (Ristow et al., 2008). Les leptospires adaptent leur stratégie de survie en fonction du milieu ambiant. En l'absence de nutriment, les bactéries s'organisent en biofilm afin d'assurer leur survie et font preuve d'une mobilisation rapide lorsque les nutriments sont à nouveau suffisants (Barragan et al., 2011a). En 2020, une étude réalisée en Nouvelle-Calédonie a permis d'analyser plus en détail la structure du biofilm chez certaines espèces de leptospires (Thibeaux et al., 2020).

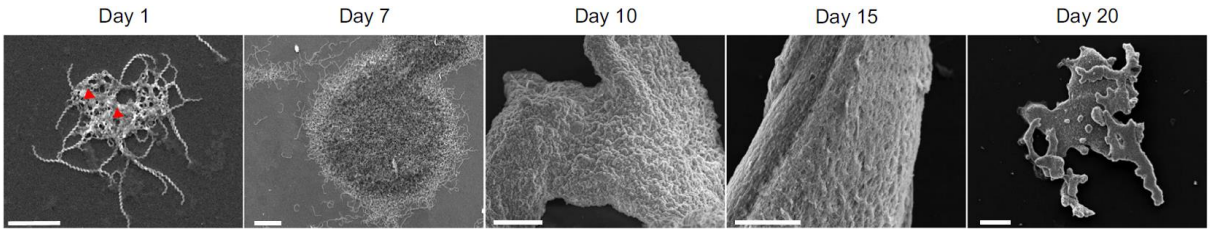


Figure 27. Formation du biofilm de leptospires en microscopie électronique à balayage ; à 1, 7, 10, 15 et 20 jours après l'inoculation (Thibeaux et al., 2020).

Les flèches rouges indiquent le dépôt de matrice extracellulaire. Barres d'échelle : 5 µm (jour 1), 10 µm (jour 7), 50 µm (jours 10 et 15), 100 µm (jour 20).

Ce phénomène très dynamique (Figure 27) permet la mise en place d'une matrice d'ADN extracellulaire garantissant une forte cohésion de la structure. Des voies métaboliques préférentielles (ex : voie du c-di-GMP) jouent un rôle important dans cette formation et procurent une certaine résistance vis-à-vis de contraintes environnementales (Figure 28). L'assemblage de ces bactéries en amas a un effet sur leur persistance environnementale mais peut également influencer leur résistance à différents traitements physico-chimiques ou antibiotiques. Leur tolérance aux antibiotiques peut être multipliée par cinq (Samrot et al., 2021).

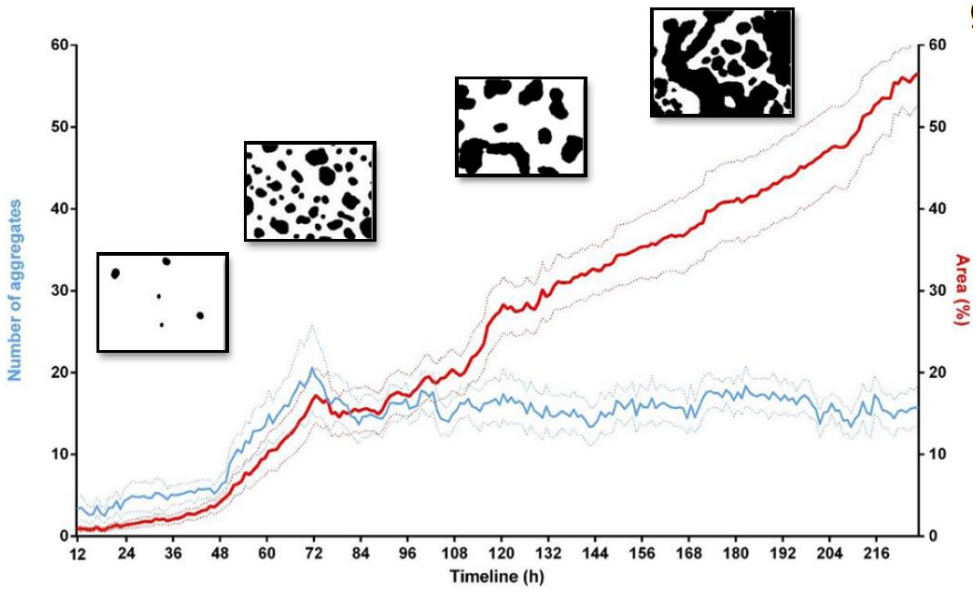


Figure 28. Analyse quantitative en contraste de phase du nombre d'agrégats de biofilm (courbe bleue) et de la surface du biofilm (courbe rouge) entre 12h et 216h après inoculation (Thibeaux et al., 2020).

Les courbes en pointillés représentent l'erreur standard de la moyenne. Les encarts montrent des images binarisées représentatives de l'aspect du biofilm à 36, 72, 132 et 180 h après l'inoculation.

De récents travaux ont permis d'évoquer la nécessité d'utiliser la qPCR d'intégrité pour établir l'état de survie ou de dégradation des leptospires dans l'eau ou les sols. En effet, l'ADN libre étant parfois omniprésent, il fausserait les résultats dans le cas d'une qPCR classique en surestimant les concentrations (Casanovas-Massana et al., 2018b).

Lall et collaborateurs (Lall et al., 2016) ont montré qu'il existe un lien entre la présence de leptospires pathogènes et celle de certains éléments nutritifs dans le sol (nitrate, fer, manganèse, cuivre). De manière opposée, les populations initiales peuvent être réduites par la prédation ou la réduction des éléments nutritifs afin de préserver la capacité de charge maximale d'un écosystème (Casanovas-Massana et al., 2018b). Une autre étude a pu révéler la corrélation positive entre la concentration en leptospires dans l'eau et la turbidité de celle-ci (Viau and Boehm, 2011).

L'étude du mode de vie des leptospires semble primordiale pour expliquer les différences de survie et identifier les corrélations avec la composition du milieu naturel. De nombreuses études restent encore à mener pour expliquer l'ensemble de ces mécanismes. Néanmoins, la formation de biofilms et l'interaction avec d'autres micro-organismes pourraient en partie assurer une protection des leptospires et expliquer l'amélioration de leur survie (Casanovas-Massana et al., 2018b).

4.2. Résistance aux traitements

Actuellement, il n'existe que peu de données concernant la résistance des leptospires vis-à-vis de certains paramètres physico-chimiques ou de traitements de désinfection. La majorité des informations disponibles sont relativement anciennes. Il est donc nécessaire d'acquérir plus d'informations pour comprendre l'écologie des leptospires et pour envisager l'élimination de ces bactéries lors de certains processus, tels que la production d'eau potable.

4.2.1. Température et pH

La température et le pH peuvent influencer la survie des leptospires. Une température optimale de 25°C à 27°C ainsi qu'un pH neutre sont des conditions optimales de maintien pour ces bactéries (Ganoza et al., 2006; Rawlins et al., 2014). A faible température, la durée de vie des bactéries augmente tandis que leur multiplication est à l'arrêt. Cette multiplication est optimale à des températures ambiantes, pour lesquelles la survie est diminuée. A plus haute température, la flore interférente se développe plus rapidement que les leptospires, ce qui empêche leur détection et créé également un environnement défavorable à leur développement (Chang et al., 1948a).

André-Fontaine et son équipe ont testé la survie et la virulence des leptospires pathogènes, inoculées dans des eaux douces et soumis à des conditions particulières de température et de pH (Andre-Fontaine et al., 2015). Ces expériences ont été menées durant de nombreuses semaines et le caractère virulent a été contrôlé sur un modèle animal. Il a été montré que ces bactéries peuvent survivre jusqu'à 300 jours à 4°C, et 417 jours à pH 5,7. Malgré des conditions de stockage hostiles (faible température, pH acide et manque de nutriments), survie et la virulence des leptospires a été maintenue durant plusieurs mois (> 20 mois). Le centre pour la sécurité alimentaire et la santé publique (CFSPH, 2013) de l'Iowa a également stipulé que les leptospires sont sensibles à la chaleur humide (121°C durant 15 min) ainsi qu'à la pasteurisation et à l'autoclavage (Noguchi, 1919).

4.2.2. Chlore

Recommandée par l'EPA (USEPA, 1999), la désinfection au chlore est un des traitements les plus utilisés pour supprimer les agents pathogènes. Les leptospires ont souvent été considérées comme sensibles au chlore, à de faibles concentrations (Faine et al., 1999; WHO, n.d.). En effet, Chang et ses collaborateurs ont mis en évidence l'élimination totale des leptospires après l'utilisation de 1mg/L à 3,5mg/L de chlore résiduel, en trois minutes et une minute d'exposition respectivement (à pH neutre) (Chang et al., 1948a).

De l'ADN de leptospires a été retrouvé dans des eaux destinées à la consommation humaine (Mason et al., 2016; Muñoz-Zanzi et al., 2014). Lors de la production d'eau potable, Huang et son équipe ont montré que ces bactéries pourraient résister à un certain degré de chloration (chloration à 0,6-0,8 mg

/ L de chlore libre) et pourraient persister au sein du réseau (0,1 mg / L de chlore résiduel au robinet du consommateur) (Huang, 2014).

Cependant les leptospires étant capables de former des biofilms (Ristow et al., 2008), il est important d'établir dans quelles mesures cette formation avec la matière organique les protège de la chloration et explique leur persistance après traitement.

4.2.3. UV

Traitement utilisé pour l'élimination de certains pathogènes, l'exposition aux UV soulève encore de nombreuses interrogations concernant la variabilité d'efficacité propre à chaque pathogène (Cheng et al., 2020; Rose and O'Connell, 2009). Faine et son équipe ont montré que les leptospires pouvaient être éliminées par l'exposition à la lumière UV naturelle durant 1 à 2 heures, dans une matrice exempte d'inhibiteurs (eau distillée) (Faine et al., 1999). Pour une même dose d'exposition, les leptospires saprophytes apparaissent plus sensibles que les pathogènes, elles-mêmes plus sensibles que d'autres bactéries telle qu'*E.coli* (Stamm and Charon, 1988). Cette forte inactivation doit être considérée différemment et revue à la baisse lorsqu'il s'agit de matrice plus complexe (ex : matrice environnementale), la turbidité due à la présence de matière organique atténuant fortement l'action des rayonnements.

De la même manière que pour le traitement au chlore, la survie des leptospires aux rayonnements UV est améliorée lors de la formation de biofilms ou lorsqu'elles sont incubées avec d'autres bactéries (Thibeaux et al., 2017a).

4.2.4. Salinité

La survie des leptospires semble varier selon les concentrations en sels. Non tolérantes aux fortes concentrations en sel, leur survie dans de l'eau de mer ne durerait que quelques heures (Chang et al., 1948a).

Une étude de la mobilité des leptospires a été menée en fonction de différentes valeurs d'osmolarité (variant de 150 à 300 mM de NaCl). La mobilité des leptospires pathogènes est maintenue à 150 mM de NaCl tandis qu'à 300 mM de NaCl, la mobilité de l'ensemble des bactéries est dégradée. Loin d'être des conditions extrêmes, les leptospires pathogènes semblent plus résistantes à proximité des conditions osmotiques physiologiques, c'est-à-dire en présence de 150-300 mM NaCl (Takabe et al., 2013). Saito et coll. ont également montrés que la présence de particules de sols dans l'eau de mer pourrait conférer aux leptospires, une certaine résistance dans cet environnement extrême (Saito et al., 2014).

Des leptospires sont tout de même retrouvées chez certains mammifères marins et dans certaines eaux du golfe du Mexique (Escobedo-Hinojosa and Pardo-López, 2017). Leur infection survient probablement par contact étroit avec des animaux infectés sur les sites d'échouage des animaux à terre ou à proximité des estuaires (Zuerner et al., 2009). Il semblerait que certaines souches de leptospires pathogènes aient acquis une certaine tolérance à l'eau salée (Grune Loffler et al., 2015). Une étude récente (Cilia et al., 2020) a étudié l'effet des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) en sels sur 16 sérotypes de leptospires. Ces valeurs variaient de 0.3125% à 10% pour la CMI et de 0.625% à >20% pour la CMB. *L. Icterohaemorrhagiae* a été le plus inhibé et *L. Tarassovi* le plus résistant. Cela a permis de mettre en évidence une éventuelle capacité de certaines leptospires à persister dans l'eau de mer.

4.2.5. Biofilm et interaction bactérienne

Particulièrement sensibles aux variations environnementales, les leptospires parviennent à survivre et à persister dans l'environnement (voir Survie dans l'environnement et formation de biofilms). L'hypothèse majeure expliquant cet effet est la formation de biofilm entre les leptospires et les autres composants de l'environnement (bactéries, matière organique, etc.) (Trueba et al., 2004; Vinod Kumar et al., 2015). Seules en solution, les leptospires sont sensibles à de nombreux antibiotiques tels que la pénicilline G, la tétracycline ou l'ampicilline (Murray and Hospenthal, 2004). Au sein de ces biofilms, une étude a montré que la concentration bactéricide minimale est très supérieure à celle nécessaire à l'état planctonique. La configuration en biofilm permet donc à certaines leptospires d'augmenter leur résistance vis-à-vis des composés antibactériens (Davey and O'toole, 2000).

La formation de biofilm a également un effet protecteur des leptospires vis-à-vis de l'impact de la salinité et du traitement UV (Vinod Kumar et al., 2015). Thibeaux et ses collaborateurs ont récemment confirmé cette hypothèse (Thibeaux et al., 2020). Les leptospires produisant du biofilm ont maintenu une activité métabolique au-delà de 40%, à la suite d'une exposition à une forte concentration en sel (36 mg/mL) ou à des rayonnements UV (20 mJ/cm²).

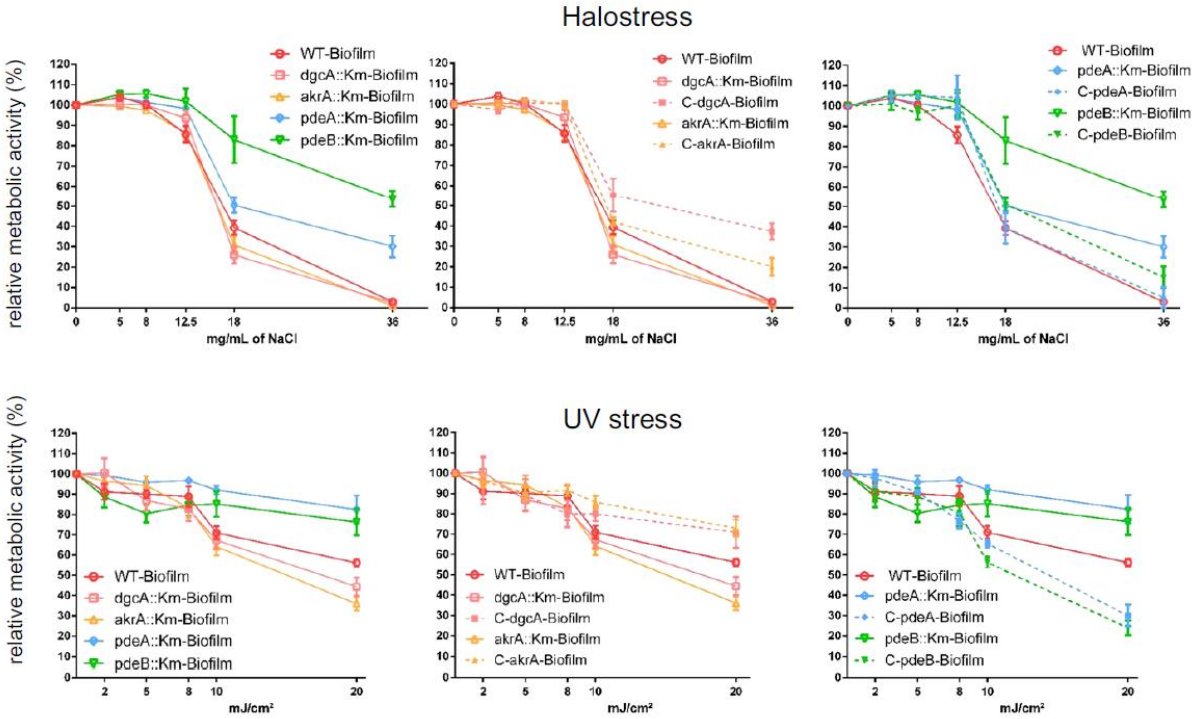


Figure 29. Activité métabolique relative des biofilms mutants WT et c-di-GMP soumis à un stress osmotique et à des rayonnements UV (Thibeaux et al., 2020).

Des biofilms non traités âgés de 3 semaines, ont été utilisés comme contrôle positif de l'activité métabolique (100%). L'effet des contraintes environnementales sur le biofilm a été exprimé en pourcentage de la condition témoin (WT non traitée dans des conditions de culture standard). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de la moyenne de cinq réplicas.

Cette résistance varie avec la composition et la qualité du biofilm formé (Thibeaux et al., 2020). En effet, l'accumulation intracellulaire de c-di-GMP améliore la production de biofilm et confère une meilleure capacité à résister aux stress environnementaux. L'élimination des leptospires devient extrêmement difficile après l'installation d'un biofilm mature.

Outre la formation de biofilm, la persistance des leptospires dans l'environnement peut aussi être favorisée lors d'interactions avec les bactéries environnementales. *L. biflexa* et *L. meyeri* ont survécu pendant près d'un an dans l'eau distillée lorsqu'elles ont été mises en coculture avec *Sphingomonas spp* (Barragan et al., 2011a).

De la même manière, dans leur étude réalisée sur les amibes libres colonisant les réseaux d'eau potable, Delafont et coll. ont identifiés la présence d'ADN de leptospires au sein de ces réservoirs eucaryotes de bactéries. L'analyse du réseau d'eau potable a permis de découvrir des interactions entre les amibes libres et les leptospires dans des échantillons d'eau collectés à l'extrémité du réseau public de distribution, avant d'entrer dans les maisons et les bâtiments privés (Delafont et al., 2016).

4.2.6. Quantité d'oxygène

L'absence d'oxygène ou la présence de biogaz peuvent également être des facteurs limitants du développement bactérien (McGarry and Stainforth, 1978). Dans certaines matrices telles que le fumier ou la boue, la survie des leptospires est très impactée par l'anaérobiose (Diesch and McCulloch, 1966). Ce processus de digestion anaérobie des boues est une piste prometteuse pour l'élimination des leptospires infectieuses.

4.3. Qualité de l'eau

Dans le cadre de la baignade en eau douce, la réglementation actuelle se base sur le suivi de seulement deux paramètres microbiologiques, que sont les bactéries *Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux. Ces deux paramètres sont des indicateurs de contamination fécale et leur analyse, en plus des autres paramètres non-biologiques, assure le respect de la qualité minimale requise pour l'ouverture des zones au public. Les normes de qualité des eaux et le classement des zones de baignade sont regroupés dans la Figure 30.

Classement des eaux de baignades (selon l'annexe I de la nouvelle directive 2006/7/CE)

Pour les eaux intérieures (eaux douces)

	Paramètre	Excellente qualité	Bonne qualité	Qualité suffisante	Méthodes de référence pour l'analyse
1	Entérocoques intestinaux (UFC/100ml)	200 *	400 *	330 **	ISO 7899-1 ou ISO 7899-2
2	*Escherichia coli* (UFC/100ml)	500 *	1000 *	900 **	ISO 9308-3 ou ISO 9308-1

* Evaluation au 95e percentile.
** Evaluation au 90e percentile.

	Entérocoques intestinaux				
Escherichia coli		Percentile 95 < 200	200 < Percentile 95 < 400	Percentile 95 > 400 et Percentile 90 < 330	Percentile 90 > 330
	Percentile 95 < 500	**Excellente**	**Bonne**	**Suffisante**	**Insuffisante**
	500 < Percentile 95 < 1000	**Bonne**	**Bonne**	**Suffisante**	**Insuffisante**
	Percentile 95 > 1000 et Percentile 90 < 900	**Suffisante**	**Suffisante**	**Suffisante**	**Insuffisante**
	Percentile 90 > 900	**Insuffisante**	**Insuffisante**	**Insuffisante**	**Insuffisante**

Figure 30. Normes de qualité des eaux et classement des zones de baignade (ministère chargé de la santé, Gouvernement français).

Paramètre non suivi dans ces normes de qualité, les leptospires sont couramment considérées comme des agents pathogènes impliquées dans l'infection environnementale de l'homme. Les inondations et l'exposition des eaux de surface contaminées par de l'urine animale en sont les principales voies d'infection. Dans le cadre des mesures d'assainissement, la maitrise contrôlée des populations de

rongeurs ainsi que la gestion de l'urine des animaux domestiques sont des mesures fondamentales dans la gestion des leptospires.

4.3.1. Mesures de limitation environnementale

Cependant, dans les régions en développement, certaines recommandations ont été établies afin de se prémunir contre les leptospires (Goarant et al., 2019) :

- L'utilisation des comprimés de chlore pour traiter l'eau potable. En cas d'indisponibilité, le chauffage de l'eau au-dessus de 50°C pendant plus d'une minute peut s'envisager.
- A la suite d'inondations ou à proximité de sources connues de contamination fécale, l'utilisation de ces eaux de surface à des fins récréatives (baignade, etc.) est déconseillée, tout particulièrement pour les personnes ayant des coupures ou des plaies ouvertes.
- Il est nécessaire de composter le fumier ou le digestat dans le cas de leur épandage.
- Le contact entre les excréments de bétail et les eaux de surface doivent être empêchés autant que possible, en particulier dans les eaux fréquemment utilisées.
- Les conditions de stockage des aliments et l'élimination des ordures doivent être améliorées pour limiter la multiplication des rongeurs (rats, souris, etc.).

Aucune solution précise n'a été identifiée afin d'éliminer spécifiquement les leptospires. Des solutions multiples peuvent être envisagées conjointement. Concernant les eaux usées, la mise en œuvre de conditions extrêmes (température, pH, etc.) dans le milieu contenant des leptospires peut avoir un effet considérable dans l'élimination de ces bactéries. Le compostage (Parker & Walker 2011), les fossés d'oxydation (Diesch and McCulloch, 1966), la digestion anaérobie et la production de biogaz (McGarry and Stainforth, 1978) sont des installations permettant de réduire leur présence. Alors qu'aucune étude ne démontre l'efficacité de certaines installation (bioréacteurs à membrane, lagunes aérées, etc.) sur la survie des leptospires dans les eaux usées, les marécages et l'utilisation de boues activées leur confèrent un environnement particulièrement propice à leur multiplication (Bierque 2020 sysytematic). En cas d'absence d'accès à l'eau, le système d'assainissement doit comporter des barrières élémentaires (latrines à fosse, toilettes voûtées, toilettes sèches, etc.)

Dans le cadre de l'eau potable, la désinfection au chlore en traitement tertiaire est le plus fiable pour éliminer les pathogènes telles que les leptospires. Recommandée par l'EPA (USEPA, 1999), la dose de chlore à utiliser dépend de la consommation par la matrice et est comprise entre 5-30 mg/L. Ces résultats ont déjà été mis en avant dans l'étude de Chang et son équipe dans laquelle l'intégralité des leptospires ont été éliminées, après l'utilisation de 3,5 mg/L de chlore résiduel pendant 1 min ou de 1 mg/L pendant 3 min (Chang et al., 1948a). L'action des UV peut également participer à l'élimination

des leptospires, lors d'une exposition naturelle ou par l'utilisation d'un procédé de désinfection UV (voir UV).

Des solutions à long terme ont également été envisagées en Israël pour éviter les contaminations de l'eau (Dadon et al., 2018). Ces mesures se basent sur une meilleure maîtrise de la leptospirose animale chez les ruminants : test de dépistage plus fréquent, recours au traitement antimicrobien et à la vaccination (vaccins polyvalents).

4.3.2. Utilisation d'indicateurs de contamination

La mise en place de mesures afin de limiter la prolifération des leptospires est primordiale. L'identification des contaminations est également essentielle. Actuellement, peu de méthodes efficaces permettent d'anticiper les épidémies et de maitriser la présence des leptospires dans l'environnement, en particulier dans les zones d'activités humaines. Au même titre que les paramètres biologiques étudiés dans le suivi des zones de baignade, certains auteurs se sont interrogés sur la faisabilité d'utiliser également le paramètre leptospire.

Récemment, une équipe a tenté l'utilisation des indicateurs fécaux traditionnels (*Escherichia coli* et entérocoques intestinaux) dans l'évaluation du risque environnemental lors d'une épidémie de leptospirose en Israël (Dadon et al., 2018). L'infection par le sérovar Pomona couplée à une contamination fécale des plans d'eau (origine sanglier et bovin), favoriserait l'infection humaine acquise par une exposition aux excrétions animales lors d'activités récréatives, dans des conditions climatiques privilégiant la transmission (sécheresse et stagnation de l'eau). En l'absence d'essais réglementaires validés pour la contamination de l'environnement par les leptospires pathogènes, les critères de réouverture des plans d'eau au public s'appuient sur une combinaison de données épidémiologiques et de tests microbiologiques afin d'évaluer les risques potentiels.

Cependant, de nombreux événements sportifs survenant dans des eaux de surface relativement propres (dépourvues de contamination fécale) ont souvent été associés à des flambées de leptospirose (Sejvar et al., 2003). Cela peut suggérer qu'*E. coli* et les entérocoques intestinaux ne sont peut-être pas de bons indicateurs pour prévenir le risque de leptospirose (Morgan et al., 2002). Néanmoins, il serait intéressant de déterminer si elles peuvent être des substituts raisonnables pour évaluer les techniques d'élimination des leptospires. L'utilisation de *Campylobacter* spp., bactérie à Gram négatif avec une physiologie similaire, pourrait également servir de substitut.

5. L'approche One Health

Au cours des siècles, la survie des populations a été éprouvée à maintes reprises par des épidémies plus ou moins dévastatrices, qu'elles soient bactériennes ou virales. De la peste noire au XIVe siècle au

chikungunya au début des années 2000 en passant par la grippe espagnole en 1918 et bien d'autres affections (SRAS-CoV, MERS, dengue, Ebola), la santé de l'Homme a souvent été menacée par les maladies infectieuses (Allen, 2015).

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a mis en place une liste bleue des maladies prioritaires pouvant engendrer des épidémies. Parmi ces maladies, on retrouve le SRAS, le MERS, la fièvre de la vallée du Rift (FVR), l'infection à virus Zika, la fièvre de Lassa et le chikungunya (Hui and Peiris, 2019). La liste comprend également des pistes de réflexions sur la variole du singe et la leptospirose, maladies surveillées en raison de leur importance pour la santé publique (Mehand et al., 2018).

Aujourd'hui plus que jamais, la pandémie liée au SARS-Cov2 renforce l'idée selon laquelle les animaux jouent un rôle considérable dans l'émergence de ces nouvelles maladies infectieuses (Richard et al., 2014). Principalement d'origine mammifère ou aviaire (Taylor et al., 2001) et vecteurs de zoonose, certains d'entre eux représentent un risque considérable pour l'Homme. Au sein de ces vecteurs de zoonoses, deux d'entre eux constituent des réservoirs sauvages fréquemment impliqués dans la transmission de ces maladies émergentes, à savoir les chauves-souris et les rongeurs (Allocati, 2016; Han et al., 2015). Ces maladies zoonotiques, multiples et diverses, tant par leur mode de transmission, leur agent pathogène ou leur hôte, représentent un risque sanitaire qui ne cesse de croître. Ce risque infectieux peut être à l'origine de lourdes répercussions tant sur la santé publique que sur un plan socio-économique ou environnemental (Narrod et al., 2012; Nicola et al., 2020).

La santé animale et la santé humaine ont été intégrées au concept One Medicine proposé par Virchow en 1855 (Schultz, 2008), pour conduire au développement du concept One Health au début des années 2000 (Greger, 2007; Zinsstag et al., 2012).

Considérant ces nombreux impacts, la notion de santé est désormais envisagée dans un contexte de santé globale au travers de ce concept One Health (i.e. une seule santé). Il se fonde sur la triade santé humaine, santé animale et santé environnementale ; mais surtout sur l'interdépendance et les interactions étroites que ces trois domaines ont entre eux. La bonne santé humaine passe avant tout par une bonne santé environnementale et animalière (Gibbs, 2014). Adopté conjointement par la FAO (Food and Agriculture Organization), l'OIE (World Organisation for Animal Health) et l'OMS (Organisation mondiale de la Santé) à Hanoi en 2010, le concept One Health a pour but d'apporter des solutions afin de résoudre les problématiques soulevées par les épidémies émergentes, ré-émergentes, les pandémies d'épizooties et de zoonoses. Les enjeux sanitaires qui émergent à la confluence de ces trois domaines nécessitent la mise en place d'une expertise pluridisciplinaire, regroupant les spécialistes de différents domaines autour d'une problématique commune (Figure 31).

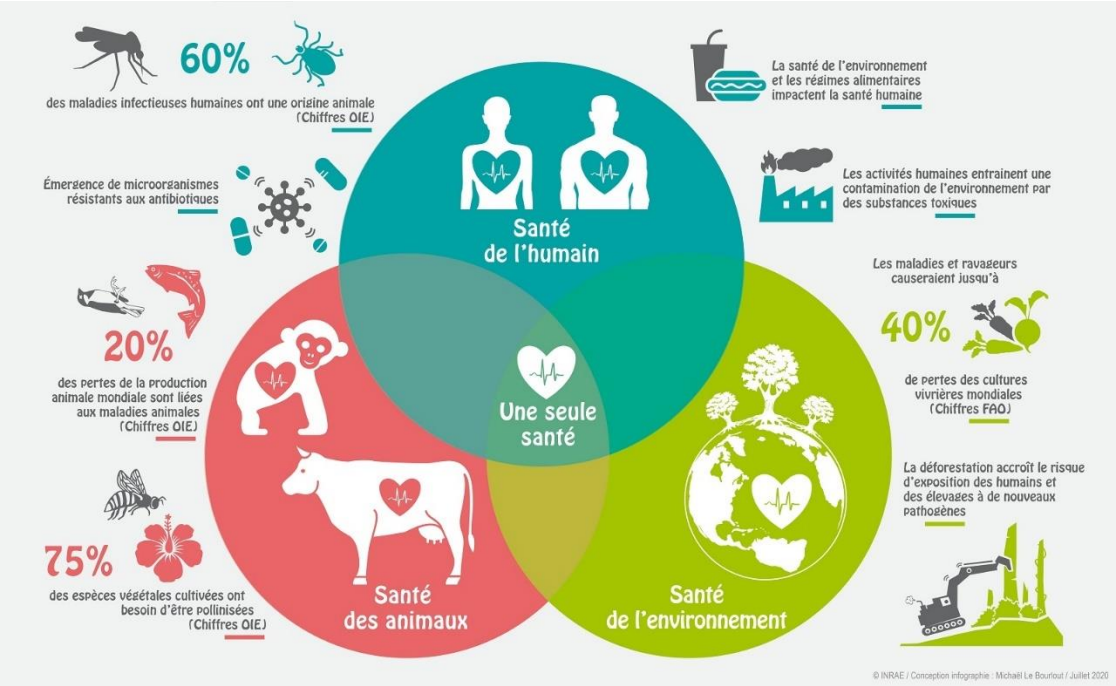


Figure 31. Illustration globale du concept One Health et des conséquences probables dans différents domaines (une seule santé), INRAE.

Initialement mis en place pour améliorer la gestion du danger infectieux, son champ d'action s'est élargi pour prendre en considération les maladies épidémiques et épizootiques ; ainsi que les enjeux environnementaux et climatiques.

En effet, cette notion est apparue dans un contexte de croissance démographique, d'affaiblissement des ressources naturelles, de pression sanitaire changeante (population humaine et populations animales) ; mais surtout de changement climatique global. Tous ces paramètres sont des facteurs aggravant la dispersion des maladies zoonotiques (Bandara et al., 2014; Lau et al., 2010). Bien qu'ils soient essentiels, certains domaines d'études sont encore peu intégrés au concept (la faune, les sciences sociales, juridiques, économiques, la santé des plantes et l'éthique).

Parmi les maladies infectieuses émergentes pouvant se rapporter au concept One Health, la leptospirose constitue une anthropozoonose bactérienne d'intérêt avec plus d'un million de cas humains sévères recensés chaque année dans le monde entier (Allan et al., 2015; Destoumieux-Garzón et al., 2018; Rajala et al., 2017). Malgré les avancées sur la compréhension de l'écologie des leptospires, le cycle de vie de la bactérie reste compliqué et l'évaluation de sa dangerosité dépend fortement des relations dynamiques entre les animaux, les humains et l'environnement. Les rongeurs, principalement le rat, représentent le principal réservoir des leptospires. Chez ce dernier, les bactéries vont venir se loger dans les reins puis être excrétées dans l'urine contaminant ainsi l'environnement et notamment l'eau douce. La proximité des rats avec l'homme (urbanisation, surpopulation, etc.) crée

un environnement propice à la prolifération de ces rongeurs ; et par conséquent augmente fortement la probabilité de transmission de cette maladie (Byers et al., 2019; Panti-May et al., 2016). L'étude des leptospires dans les différents milieux (animal, environnemental et humain) semble donc essentielle (Vokaty et al., 2016), même si celle-ci est complexifiée par la multitude d'interactions se produisant entre ces domaines.

Le Global Leptospirosis Environmental Action Network (GLEAN) est un réseau multidisciplinaire et multisectoriel composé de représentants d'organisations et de fondations internationales ainsi que de chercheurs. Fondé en 2010, ce consortium a pour objectif d'orienter et de coordonner des recherches afin d'améliorer les connaissances sur les leptospires. A terme, leur objectif est d'apporter des conseils opérationnels aux pays et aux communautés touchés par des flambées de leptospirose (GLEAN, 2013).

Objectifs de la thèse

Ces dernières années, de nombreuses études ont permis d'acquérir des connaissances sur l'apparition, la persistance et la survie des leptospires dans l'environnement. Le partage de ces connaissances peut aider à parfaire la prévention de la leptospirose, maladie environnementale transmises par des bactéries pathogènes. Le genre *Leptospira* comprend aussi bien des espèces saprophytes que pathogènes. Les saprophytes, espèces non virulentes, sont des occupants habituels des écosystèmes d'eau douce. Les espèces pathogènes sont les agents étiologiques de la leptospirose humaine et animale. De plus, l'isolement de ces bactéries à partir d'échantillons environnementaux est rendu difficile par leur lenteur de croissance au profit d'une prolifération plus rapide des contaminants de la flore interférente. Malgré les améliorations des méthodes de détection en culture ou en microscopie, l'usage de la biologie moléculaire semble être plus adapter pour suivre les bactéries dans des matrices compliquées telles que les échantillons d'eau de surface.

Ces travaux de thèse portent sur l'étude de la présence des leptospires dans un environnement urbain via l'exemple parisien. Considérant la mise en place d'une approche One Health, l'objectif général est de mettre en relation les domaines de la triade environnement, animal et homme ; ainsi que les interactions qui les relient entre eux. Pour cela, le but premier est d'apporter des éléments de réponse sur la prévalence de ces bactéries dans les eaux de surface en milieu urbain, dont certaines sont destinées à l'accueil de zones de baignade ou d'activités aquatiques (JO Paris 2024). En parallèle, l'identification du réservoir principal de ces bactéries est également étudiée pour confirmer ou infirmer l'implication des rats dans la dissémination de la maladie.

Le premier objectif de la thèse a été de mettre en place une méthode de détection moléculaire, sensible et rapide pour l'identification des leptospires intègres et donc potentiellement virulentes au sein des matrices environnementales. Pour cela une PCR quantitative utilisant un intercalant d'ADN (propidium monoazide) a été évaluée lors de tests d'inactivation puis mise en place sur le suivi des échantillons d'eau de surface. Cette méthode sensible permet de quantifier l'ensemble des leptospires mais également de connaître spécifiquement la part de pathogènes. Cette méthode a été appliquée sur 1031 échantillons d'eau de surface recueillis lors de campagnes de prélèvements ayant eu lieu de Juin 2018 à Septembre 2020. Le maintien des prélèvements tout au long de l'année permet d'établir la présence ou l'absence de liens de corrélations entre la présence de ces bactéries et différents paramètres, tels que les événements climatiques éphémères ou encore l'effet de la saisonnalité.

Dans un second temps, l'étude du portage de leptospires par les rats est menée pour identifier le réservoir potentiel majoritaire. En effet, la ville de Paris étant exempte de zones d'élevages et d'agriculture, la surreprésentation des rats et des réseaux souterrains corroborent la suspicion des rats

comme principaux prolifératrices de leptospires dans l'environnement. Des biopsies de reins de rats capturés ont été analysés avec cette même méthode de détection afin de définir la présence de leptospires pathogènes.

Enfin, l'analyse par séquençage des échantillons positifs (eau superficielle et biopsies rénales de rats) permet d'établir s'il existe une concordance entre les espèces isolées de l'eau de surface et celles retrouvées chez les rongeurs.

Matériel et méthodes

1. Prélèvement d'échantillons et milieux de culture

1.1. Souches isolées

Vingt-cinq échantillons d'ADN de *Leptospira*, dont celui de huit saprophytes (quatre pour S1 et quatre pour S2) et dix-sept agents pathogènes (douze pour P1 et cinq pour P2) (Table S1 du Chapitre 1) ont été utilisés pour tester les performances des tests PCR. Le pathogène *L. interrogans* serovar Manilae souche L495 et le saprophyte *L. biflexa* serovar Patoc souche Patoc 1 ont été utilisés pour des tests d'inactivation. Les souches ont été incubées à 30 ° C dans du milieu liquide Ellinghausen, McCullough, Johnson et Harris (EMJH) (Ellinghausen and Mccullough, 1965; Johnson and Harris, 1967).

1.2. Prélèvements d'échantillons environnementaux

Des prélèvements d'eau de surface ont été effectués à Paris, le long de la Seine ainsi que dans une zone de baignade contrôlée, fréquentée pendant la période estivale (dans le Bassin de la Villette sur le canal de l'Ourcq). Les échantillons ont été analysés dans les 24 h suivant la collecte. Les échantillons d'eau de surface (500 mL) ont été concentrés par des centrifugation successives afin d'obtenir un volume final de 400 µL. Durant le début de l'étude, la moitié de l'échantillon a été traitée avec de l'EMA (comme décrit dans la section sur le traitement au propidium monoazide) et l'autre n'a pas subi de traitement. Par la suite (à partir de juin 2019), le protocole a été amélioré et les échantillons ont uniquement été concentrés dans 200µL puis l'intégralité a été traitée avec 2µL de PMAxx. Tous les échantillons (avec et sans monoazides) ont ensuite été extraits et analysés par la qPCR multiplex.

Les rats ont été capturés selon deux méthodes : par l'utilisation de pièges à éthanol (Ekomille®) dispersés dans tout Paris ou grâce à l'utilisation de furet. La capture au furet se base sur l'envoi de furets dans les galeries souterraines occupées par les rats, forçant ces-derniers à remonter à la surface où ils sont capturés vivants. Les reins de rats ont été disséqués dans le laboratoire du Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris 5ème arr.). Les échantillons ont été conservés à -20 ° C avant extraction et analyse par biologie moléculaire au laboratoire d'Eau de Paris. Tous les échantillons (eau et rat) ont ensuite été extraits et analysés par la qPCR multiplex.

1.3. Milieu de culture et antibiotiques

Pour le dénombrement des colonies, du milieu EMJH supplémenté avec 1,2% d'agar a été utilisé. Les dénombrements bactériens ont été effectués au microscope à fond noir à l'aide d'une chambre Petroff-Hausser. L'ADN et les souches de leptospires ont été fournis par le Centre national de référence (CNR) de la leptospirose (Institut Pasteur, Paris, France). D'autres souches bactériennes utilisées pour déterminer la spécificité de la PCR ont été fournies par le laboratoire Eau De Paris.

Le milieu EMJH a été supplémenté par un cocktail d'antibiotiques (nommé STAFF) afin de limiter le développement de la flore interférente. Conformément à la composition définie par Chakraborty et ses collaborateurs, ce cocktail comporte différents antibiotiques (sulfamethoxazole, triméthoprime, fosfomycine, 5-fluorouracil) et fongicide (amphotéricine B), pour lesquels les leptospires sont résistantes (Chakraborty et al., 2011).

2. Lyse et extraction

Pour les tests d'inactivation, l'ADN a été extrait en utilisant le protocole Q400 du kit QIAsymphony® DSP Virus / Pathogen Midi (Qiagen). Les reins de rats ont été broyés dans du PBS 1X à l'aide de billes de verre, en utilisant le ribolyser Bead Mill 24® (Fisherbrand ™) avant de subir les étapes de lyse et d'extraction.

En raison de la complexité des matrices environnementale et animale, tous les échantillons d'eau de surface et de reins de rats ont été prétraités par une étape de lyse externe (Qiagen®). La lyse cellulaire est effectuée par l'utilisation d'un duo de réactif (PM1-beta mercaptoéthanol). La précipitation des débris cellulaires (réactif de précipitation et centrifugation) permet de récupérer l'ensemble des acides nucléiques dans le surnageant.

Les échantillons d'eau de surface ont été extraits grâce au MagNA Pure Compact System (Roche®) pour la surveillance de l'environnement. Pour les biopsies de rein de rats, l'ADN a été extrait en utilisant le protocole Q1000 avec un kit QIAsymphony® DSP Virus / Pathogen Midi (Qiagen). Dans l'ensemble des protocoles, les acides nucléiques ont été élués dans 50 µL, conformément aux recommandations des fabricants.

3. Mise en place de la qPCR multiplex

Les PCR spécifiques des leptospires disponibles dans la littérature ont été testées et non pas donner de résultats satisfaisants. C'est pour cette raison qu'une PCR multiplex a été totalement redesignée dans le cadre de cette étude.

3.1. Design des amorces

La qPCR multiplex a été testée en utilisant des souches de leptospires isolées chez des patients ou issues de l'environnement. La spécificité de la méthode a été établie par l'analyse des souches de leptospires et d'autres espèces bactériennes, dont la liste figure dans le tableau 16.

Tableau 16. Liste des microorganismes utilisés pour définir la spécificité de la qPCR multiplex.

Genre	Espèce	Status
Leptospira	*L. biflexa*	Saprophyte S1
	L. terpstrae	Saprophyte S1
	L. vanthielii	Saprophyte S1
	L. yanagawae	Saprophyte S1
	L. kobayashi	Saprophyte S2
	L. idonii	Saprophyte S2
	L. ognonensis	Saprophyte S2
	L. ryugenii	Saprophyte S2
	L. adleri	Pathogen P1
	L. alstonii	Pathogen P1
	L. barantonii	Pathogen P1
	L. borgpetersenii	Pathogen P1
	L. ellisii	Pathogen P1
	L. interrogans	Pathogen P1
	L. kirschnerii	Pathogen P1
	L. kmetyi	Pathogen P1
	L. mayottensis	Pathogen P1
	L. noguchii	Pathogen P1
	L. santarosai	Pathogen P1
	L. weilli	Pathogen P1
	L. fainei	Pathogen P2
	L. johnsonii	Pathogen P2
	L. licerasiae	Pathogen P2
	L. venezuelensis	Pathogen P2
	L. wolffii	Pathogen P2
Enterococcus	*E. faecalis*	ND
Escherichia	*E. coli*	ND
Klebsiella	*K. pneumoniae*	ND
Pseudomonas	*P. aeruginosa*	ND
Salmonella	*S. enterica*	ND
Staphylococcus	*Spp*	ND

La PCR pan-*Leptospira* était basée sur l'alignement de la séquence du gène *rrs* de 113 souches appartenant à 22 espèces de leptospires, comprenant des saprophytes (21 souches réparties en 7 espèces) et des pathogènes (92 souches réparties 15 espèces). Les amorces 16S-F267 et 16S-R336, associées à la sonde 16S-P286, ont permis l'amplification d'un fragment de 70 pb. La PCR leptospires pathogènes était basée sur l'alignement de la séquence du gène *lipL32* de 30 espèces de leptospires pathogènes. Les amorces LipL32-F164 et LipL32-R298, associées à la sonde LipL32-P188, permettent l'amplification d'un fragment de 135 pb. L'ensemble des séquences des amorces et des sondes figurent dans le Tableau 17.

Des séquences de la base de données Genbank du National Center for Biotechnology Information (NCBI) ont été utilisées pour concevoir les amorces (Tables S2 et S3 du Chapitre 1). Les amorces et les sondes des deux tests PCR ont été conçues à l'aide du logiciel AlleleID® version 7 (http://premierbiosoft.com/bacterial-identification/index.html).

Chaque réaction de PCR a été réalisée en utilisant le Fast Virus 1-Step Master Mix TaqMan ™ (# 4444434). Contrairement à d'autres polymérases, cette Taq polymérase était moins affectée par l'inhibition due à la matrice environnementale. L'étape RT a été supprimée pour permettre un diagnostic rapide.

Pour la PCR pan-*Leptospira* (gène *rrs*), l'amorce F267 a été utilisée à 500 nM et l'amorce R336 et la sonde P286 à 100 nM. Simultanément, des oligonucléotides de la PCR leptospires-pathogènes (*lipL32*) ont été utilisés à 600 nM pour l'amorce F164 et l'amorce R298, et 200 nM pour la sonde P188. L'IPC a été ajouté au mélange réactionnel à 10^4 copies et détecté en utilisant la sonde IPC à 100 nM.

La réaction de PCR a été réalisée dans un volume de réaction de 20 µl en utilisant un système de PCR en temps réel ViiA 7 (Life Technologies, Carlsbad, CA) dans des plaques 96 puits. Le profil thermique consistait en une étape de dénaturation initiale à 94 °C pendant 20 s, suivie de 45 cycles à 94 °C pendant 5 s et 60 °C pendant 30 s. Les fluorescences (FAM, Yakima yellow et TAMRA) ont été détectées à la fin de l'étape d'élongation.

3.2. Plasmides et contrôle interne

Deux plasmides (*rrs* et *lipL32*) ont été générés en tant que contrôles PCR positifs en utilisant pCR2.1 (Topo TA-cloning, Life Technologies, Carlsbad, CA). Un contrôle d'amplification compétitif (IPC) positif interne a été utilisé pour évaluer la présence d'inhibiteurs de PCR. L'IPC est composé d'une séquence partielle du gène de la β-actine humaine et a été cloné dans le vecteur pCR ™ 2.1-TOPO® (Life Technologies, Carlsbad, CA) et flanqué des amorces *lipL32* en utilisant une approche similaire à celle décrite par Wurtzer et coll. (Wurtzer et al., 2014). Les amorces étaient LipL32_BACT-F1146, LipL32_BACT-R1215 et la sonde était BACT_P1172.

Tableau 17. Amorces et sondes de qPCR pour la quantification des leptospires spp. et des leptospires pathogènes.

		Séquence	Concentration finale
Leptospires spp – *rrs*	**F267**	5'-GGCCACAATGGAACTGAG-3 '	500 nM
	R336	5'-CCCATTGAGCAAGATTCTTAAC-3'	100 nM
	P286 (FAM)	5'-FAM-CACGGTCCATACTCCT-NFQ-MGB-3 '	100 nM
Leptospires pathogènes – *LipL32*	**F164**	5'-CTGTGATCAACTATTACGG-3 '	600 nM
	R298	5'-GGGAAATCATACGAACTC-3'	600 nM
	P188 (Yakima yellow)	5'-HEX-TAAAGCCAGGACAAGCGCCG-BHQ1-3 '	200 nM
Contrôle interne d'amplification compétitif	**F1146**	5'-CTGTGATCAACTATTACGGttGCAGGAGTATGACGAGT-3 '	10^4 copies / réaction
	R1215	5'-GGGAAATCATACGAACTCttCAAGAAAGGGTGTAACGCAACTAA-3'	
	P1172 (Tamra)	5 '-CCCCTCCATCGTCCACCGCAAATG-3'	100 nM

Les trois plasmides, les contrôles positifs et l'IPC (Tableau 17) ont été quantifiés à l'aide d'un colorant d'acide nucléique fluorescent ultra-sensible pour quantifier l'ADN double brin (réactif Quant-iT ™ PicoGreen® dsDNA), selon le protocole du fabricant.

4. Traitement au propidium monoazide

Avant l'extraction de l'ADN, les échantillons ont été incubés avec des monoazides pour garantir l'intégrité bactérienne (Karim et al., 2015; Prevost et al., 2016). Initialement, l'éthidium monoazide a

été utilisé de septembre 2018 à juin 2019. Par la suite, il a été remplacé par l'utilisation du propidium monoazide (PMAxx) en 2019 et 2020. Une étude comparative entre l'EMA et le PMAxx nous a permis de montrer que le PMAxx, molécule plus petite que l'EMA, s'intégrait mieux dans l'ADN libre et permettait une meilleure inhibition de détection des bactéries non intègres.

La solution de PMAxx a été diluée dans de l'eau de qualité biologie moléculaire pour obtenir une concentration finale de 10 mM et des aliquotes ont été stockées à -20 ° C. Sur la base d'études pilotes (données non présentées), le colorant PMAxx a été utilisé à une concentration finale de 0,1 mM pour prétraiter les échantillons. Après mélange, les échantillons ont été incubés sur de la glace, à l'obscurité, pendant 30 min. La photo-activation a été réalisée pendant 15 min en utilisant le système PhaST Blue (IUL, Barcelone, Espagne). Dans cette étude, la PMAxx-qPCR était également appelée la qPCR d'intégrité et est parfois appelée à tort PCR de viabilité.

5. Tests de persistance

Des tests de persistance ont été réalisés simultanément en duplicata sur deux souches de laboratoire : *Leptospira biflexa* serovar Patoc (saprophyte) et *Leptospira interrogans* serovar Manilae (pathogène).

Comme mentionné dans chaque test référencé ci-dessous, deux méthodes de détection ont été utilisées dans cette étude : l'intégrité qPCR (décrite ci-dessus) et la culture sur milieu EMJH spécifique. La moitié de chaque échantillon a été utilisée pour l'encensement sur boîte. L'autre moitié a été analysée par PMA-qPCR, après remise en suspension dans du PBS 1X et traitement au PMAxx (concentration finale de 100 µM). Les acides nucléiques ont été extraits à l'aide d'un extracteur automatique QIAsymphony (QIAGEN).

5.1. Exposition à la chaleur

Les cultures bactériennes ont été ajustées à une concentration finale d'environ 10^4 leptospires/mL dans du PBS 1X (pH 7,4). Chaque échantillon a été aliquoté et incubé pendant 1 h à différentes températures dans un thermocycleur (Mastercycler® nexus, Eppendorf) : 15 °C, 30 °C, 37 °C, 42,5 °C, 47 °C, 55 °C, 95 °C. Les échantillons testés à 4 °C ont été conservés dans la glace.

5.2. Exposition aux ultraviolets (UV)

Les cultures en phase exponentielle de *L. interrogans* et *L. biflexa* ont été centrifugées à 8 000 x g pendant 10 min. Le culot a été remis en suspension dans du PBS 1X, à une concentration finale de 10^9 *Leptospira*/mL. La suspension bactérienne a été répartie dans des microtubes (450 µl/tube). Pour chaque souche, huit conditions d'exposition aux UV ont été testées en duplicata. La dose de rayonnement variait de 0 mJ/cm^2 à 40 mJ/cm^2 (dose UV appliquée dans les usines de traitement d'eau potable) à l'aide d'une lampe UV de 254 nm (Phillips, Amsterdam, Pays-Bas) utilisée à température

ambiante. L'irradiation UV a été surveillée par un radiomètre UVC numérique (IL Metronic Sensortechnik GmbH, Allemagne). La puissance du rayonnement étant fixe, les échantillons ont été soumis à différent temps d'exposition afin de faire varier la dose perçue par les leptospires.

5.3. Traitement au chlore

La verrerie de laboratoire a été préparée en la trempant dans une solution d'hypochlorite de sodium contenant 40 mg/L de chlore actif libre. La verrerie a ensuite été nettoyée intensivement avec de l'eau sans chlore (CDF). De l'eau CDF a été préparée en utilisant un système de purification Milli-Q® avec un polisseur Biopak® (Merck, Darmstadt, Allemagne). Cette eau a été utilisée pour préparer toutes les solutions expérimentales. Une solution intermédiaire d'hypochlorite de sodium à 0,5 mg/L (pH 6) a été préparée à partir de la solution mère de 81 g/L.

Comme décrit précédemment, *L. interrogans* et *L. biflexa* ont été incubés à 30 °C dans du milieu EMJH liquide afin d'atteindre une concentration d'environ 10^8 leptospires/mL. Les cultures de leptospires ont été centrifugées à 5 000 x g pendant 15 min. Le surnageant ayant été jeté, le culot a été lavé puis remis en suspension dans du NaCl à 0,9%. Des suspensions bactériennes ont été préparées en ajoutant des leptospires (concentration finale de 10^4 bactéries/mL) à une solution de chlore (0,5 mg/L). La concentration en chlore libre a été mesurée avant et après ajout des bactéries, à l'aide d'un colorimètre Pocket II (Hach Lange, Düsseldorf, Allemagne) après activation du réactif DPD (N, N-diéthyl-p-phénylène-diamine). Le chlore libre n'ayant pas réagi a été désactivé par l'ajout de thiosulfate de sodium (100 mg/L) pour arrêter la réaction d'activation.

6. Analyse statistique avec le logiciel GraphPad

L'ensemble des graphiques et des analyses statistiques a été réalisé à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 9 (GraphPad, La Jolla, CA) selon différentes modélisations.

L'abattement bactérien durant les tests d'inactivation a été ajusté à l'aide d'un modèle dose-réponse sigmoïde basé sur l'équation :

$$Y = Ct + \frac{(C_0 - Ct)}{1 + (\frac{IC_{50}}{X})^{\alpha}}$$

Dans cette équation, X était le paramètre étudié (température, temps, dose UV), la variable «Ct» la concentration de leptospires à un moment donné au cours du test, «C_0» la concentration de leptospires à T_0 et IC_{50} la valeur de X à laquelle la réponse était à la moitié entre C_0 et Ct. Enfin, α décrit la pente de la courbe.

Les données environnementales obtenues durant les campagnes ont été analysées avec différents modèles mathématiques. La normalité de la distribution des concentrations en leptospires dans l'eau de surface a été évaluée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. Les groupes appariés (année ou cible PCR) ont été testés à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis qui peut comparer de multiples groupes non appariés. Les valeurs $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

Pour l'analyse de la concentration médiane de leptospires au fil des années, une courbe de Lowess a été appliquée pour suivre la tendance des données qui semblaient légèrement irrégulières. Le paramètre choisi était une courbe moyenne (10 points dans la fenêtre de lissage), se situant entre une structure fine et une structure grossière, atténuant le détail des données.

Pour étudier les relations entre la présence de leptospires et la pluviométrie, des matrices de corrélation ont été utilisées dont le coefficient de corrélation «r» a quantifié la direction et l'ampleur de la corrélation. Ce coefficient variait de -1 pour une corrélation inverse à +1 pour une corrélation parfaite.

L'analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée pour évaluer l'existence de liens de corrélation entre la présence de leptospires et divers paramètres biologiques ou physico-chimiques. L'ACP a reproduit à travers différents tests statistiques la réduction de plusieurs variables d'un ensemble de données.

7. Etude de la diversité des leptospires par séquençage haut débit (NGS)

Certains échantillons issus des campagnes environnementales ou provenant des reins de rats ont été sélectionnés afin d'effectuer un séquençage. L'objectif est d'étudier la diversité des espèces de leptospires présentes au sein des matrices environnementale et animale. Les différentes étapes sont résumées dans la Figure 32.

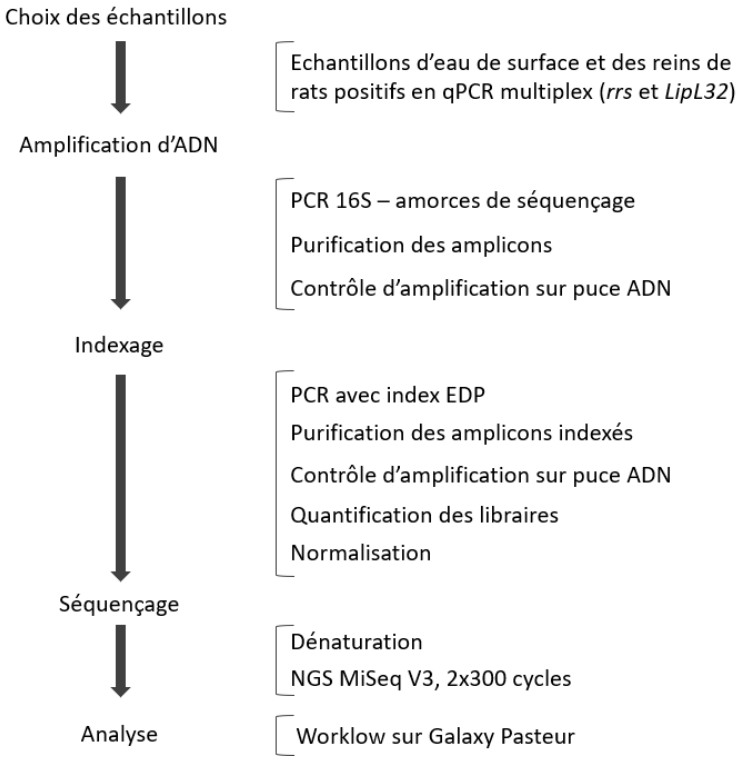


Figure 32. Etapes du processus de séquençage.

7.1. Préparation et contrôle de librairie

La PCR de séquençage des leptospires était basée sur l'alignement de séquence du gène *rrs* de 56 espèces de leptospires, comprenant des saprophytes et des pathogènes. L'amplification de l'ADN sur du gène *rrs* a été réalisée en utilisant l'ADN polymérase haute-fidélité Q5® (New England BioLabs) ainsi que les amorces 16S – F (5'-CGGCGCGTCTTAAACATG-3 ') et 16S – R (5'-TCCGCCTACRCACCCTTTAC-3'), dans un thermocycleur Mastercycler® (Eppendorf).

Après purification et contrôle d'amplification, les échantillons sont étiquetés (tags) avec des marqueurs nucléotidiques spécifiques. Ces tags permettent de dissocier les données de chaque échantillon au sein du pool de données généré lors du séquençage. Les amplicons ont été nettoyés par des billes magnétiques Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter) et quantifiés à l'aide d'un colorant d'acide nucléique fluorescent, ultra-sensible pour quantifier l'ADN double brin (réactif Quant-iT ™ PicoGreen® dsDNA). La distribution de la taille des librairies a été contrôlée avec le kit DNA 1000 (Agilent®) et l'utilisation du Bioanalyzer 2100.

7.2. Normalisation et séquençage

Les échantillons normalisés à 4 nM ont été regroupés dans une seule banque et dilués à une concentration finale de 12 pM. La bibliothèque a été complétée par un contrôle PhiX (5%) fournissant des signaux fluorescents équilibrés pour améliorer la qualité de l'analyse.

En suivant le protocole standard paired-end d'Illumina, une bibliothèque paired-end de 300 pb a été construite, contenant les échantillons d'ADN purifiés. Le séquençage a été réalisé avec la chimie MiSeq V3 2 x 300 cycles, conformément au protocole du fabricant (Illumina®). Entre 13,2 Go et 15 Go de reads ont été obtenus en moyenne (44 à 50 millions de reads).

7.3. Analyse des données

L'analyse des données et l'exécution du workflow ont été exécutées à l'aide du serveur Galaxy Pasteur (Figure 33). Les principaux outils utilisés sur cette plateforme sont :

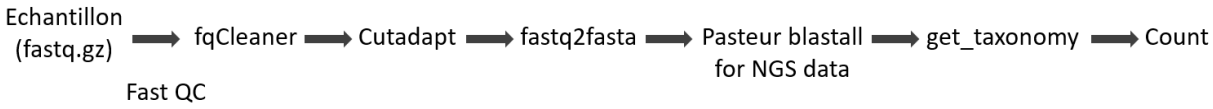


Figure 33. Déroulement des différentes étapes d'analyse des résultats de séquençage (Workflow).

L'outil *FastQC* permet de connaître la qualité des données de séquençage. Lorsque la qualité est correcte, les séquences de trop faible qualité, surreprésentées et les contaminants potentiels sont supprimés grâce à l'outil *fqCleaner*. L'outil *Cutadapt* permet la suppression des index et adaptateurs utilisés lors du séquençage. Les données transformées en format fasta (*fastq2fasta*) peuvent être comparées avec les séquences présentes sur les bases de données publiques (NCBI, Silva, etc.).

Le programme *Pasteur blastall for NGS* data permet ainsi de rechercher les séquences identiques présentes sur NCBI. En fonction des résultats d'alignement, des informations taxonomiques sont associées aux séquences (*get_ taxonomy*). Pour finir, l'outil *Count* permet de dénombrer les séquences propres à chaque assignation taxonomique.

Chapitre 1 : Effets des traitements de désinfection et quantification des leptospires viables dans les eaux de surface par une qPCR d'intégrité de haute sensibilité

Introduction

Les leptospires pathogènes sont responsables de la leptospirose, zoonose de répartition mondiale, dans laquelle l'homme est un hôte occasionnel dans un cycle impliquant des animaux sauvages et domestiques. Bien que principalement considérée comme une maladie tropicale, les pays développés, ont également observé une augmentation du nombre de cas ces dernières années. Les animaux réservoirs, essentiellement les rongeurs, excrètent ces bactéries via leur urine et contaminent l'environnement. Les humains peuvent être infectés par contact direct ou indirect avec de l'urine ou de l'eau contaminée par les leptospires. Maladie professionnelle et récréative, l'exposition à l'eau semble être le principal facteur de risque.

Les soixante-quatre espèces identifiées sont réparties en sous-clades phylogénétiques : pathogènes P1 et P2 et saprophytes S1 et S2. Les saprophytes, espèces non infectieuses, peuvent se multiplier dans l'environnement ; tandis que les agents pathogènes sont principalement isolés chez l'homme et l'animal. Les leptospires peuvent survivre pendant des semaines dans l'environnement, et seules les saprophytes peuvent également s'y multiplier. Les leptospires sont des bactéries à croissance lente, et sont difficiles à isoler en raison d'une possible contamination par une flore interférente à croissance rapide dans le milieu EMJH qui est un milieu riche en nutriments.

Actuellement, il n'existe que peu de données disponibles sur la persistance des leptospires dans l'environnement et leur résistance face aux variations physico-chimiques (température, etc.) ou à la désinfection (UV, chlore, etc.). Les leptospires pathogènes peuvent survivre et rester virulentes dans l'eau et le sol durant de nombreuses semaines. L'analyse des leptospires dans leur globalité (mode de vie, persistance, conditions de survie, etc.) est nécessaire pour expliquer les liens et les interactions qu'elles créent avec le milieu naturel (composition, nature, etc.). Ces mécanismes doivent encore être investigués mais, la formation de biofilms et l'interaction avec d'autres microorganismes pourraient en partie expliquer la protection des leptospires dans l'environnement.

Malgré l'absence de consensus concernant les méthodes de diagnostic moléculaire, elles sont plus sensibles, spécifiques et rapides que la culture. Les tests PCR utilisant la technologie Taqman est privilégiée en raison de sa meilleure spécificité comparée à l'usage du SYBR Green. Ces méthodes se basent sur la détection de gènes communs à toutes les leptospires (*rrs*, *secY*, etc.) ou des gènes uniquement identifiés chez les pathogènes (*lipL32*, *ligA*, *lfb1*, etc.). De récents travaux ont avancé la

nécessité d'utiliser la qPCR d'intégrité afin d'évaluer la survie ou la destruction des leptospires dans ces matrices. Considérant l'ADN libre, l'utilisation d'une qPCR classique surestimerait la concentration de leptospires dans l'environnement. L'utilisation de la qPCR couplée au traitement avec un agent intercalant a été évoquée comme solution afin d'évaluer un risque se rapprochant du risque réel. Cette approche évite l'amplification des bactéries perméables (bactéries endommagées ou mortes) et, ainsi, limite en partie leur surestimation tout en garantissant les atouts des méthodes moléculaires.

Les objectifs de ce chapitre sont d'une part de mettre en place une méthode de détection moléculaire sensible afin de rechercher les leptospires potentiellement viables dans différentes matrices, plus ou moins complexes. Dans un second temps, l'objectif est d'éprouver l'efficacité de cette méthode lors de traitements d'inactivation afin d'établir la résistance des bactéries soumises à différents stresse physico-chimiques, puis sur des échantillons environnementaux. Cette qPCR multiplex inclut un traitement d'intégrité (utilisation de monoazides) permettant une quantification des leptospires intègres et donc potentiellement infectieuses. Ce chapitre se présente sous la forme d'un article scientifique publié dans le journal PlosOne.

Effect of disinfection agents and quantification of potentially viable *Leptospira* in fresh water samples using a highly sensitive integrity-qPCR assay

Elise RICHARD[1,2], Pascale BOURHY[2], Mathieu PICARDEAU[2], Laurent MOULIN[1] *, Sébastien WURTZER[1]

[1]Eau de Paris, DRDQE, 33 Avenue Jean Jaurès, 94200 Ivry-Sur-Seine, France

[2]Institut Pasteur, Unité Biologie des Spirochètes, 28 rue du docteur Roux, 75724 Paris, France

Co-corresponding: mathieu.picardeau@pasteur.fr

* Corresponding author: laurent.moulin@eaudeparis.fr

ABSTRACT

Leptospirosis is an emerging worldwide zoonotic disease, but the general biology of the causative agents is still poorly understood. Humans are an occasional host. The main risk factors are water-associated exposure during professional or recreational activities or during outbreaks in endemic areas. Detecting the presence of pathogenic bacteria in aquatic environments and their capacity to resist various inactivation processes are research fields that need to be further developed. In addition, the methods used for detecting and enumerating *Leptospira* still need to be improved.

We aimed to describe a new quantitative polymerase chain reaction coupled to propidium monoazide treatment (PMAqPCR) that targets not only total *Leptospira* but also discriminates pathogenic from non-pathogenic *Leptospira* while also addressing PCR inhibitors, a frequently encountered problem when studying environmental water. In a second step, the killing efficiency of *Leptospira* to different treatments was tested and PMAqPCR compared to culture-based enumeration. This provided information about the effects of temperature, as well as ultraviolet and chlorine disinfection, that are both related to water treatment processes, in particular for the production of drinking water, on the persistence of both saprophytic and pathogenic *Leptospira.* Finally, PMAqPCR was used for the detection of *Leptospira* in freshwater samples for a proof-of-concept.

In conclusion, our method could be used for routine freshwater monitoring and allows better evaluation of the presence of *Leptospira*, allowing evaluation of the bacterial dynamics in a designated area or assessment of the efficacy of water disinfection processes.

KEYWORDS *Leptospira*, multiplex real-time PCR, monoazide, inactivation treatment, environment

INTRODUCTION

Pathogenic *Leptospira* are responsible for a global zoonosis, leptospirosis, in which humans are found to be occasional hosts in a cycle involving wild and domestic animals. One million severe cases are reported every year worldwide (Costa et al., 2015). Leptospirosis can take various forms, from a flu-like syndrome (fever, myalgia, or headache) to a multisystem disorder, with icteric and hemorrhagic syndrome accounting for 20% of cases, causing at least 60,000 deaths a year.

This disease occurs worldwide but the incidence is the highest in tropical regions (Biscornet et al., 2020; Costa et al., 2015; Tique et al., 2018). However, developed countries, including those in Europe (Bourhy, 2016; Pijnacker et al., 2016), have also observed an increase in the number of reported cases.

Animal reservoirs, mainly rodents, excrete *Leptospira* through urine and contaminate the environment and, potentially, water resources. The dissemination of these bacteria into the environment can allow other animals or humans to be newly infected. Humans can be infected through direct or indirect contact with urine or water contaminated by *Leptospira*. In this context, leptospirosis can be both an occupational disease (affecting veterinarians, farmers, sewer workers, etc.) and a recreational disease associated with water-related activities (bathing, kayaking, canyoning, etc.) (Bharti et al., 2003; Morgan et al., 2002). Leptospirosis is considered to be an emerging zoonotic disease partially due to global warming (Lau et al., 2010) and more frequent and severe flooding events (Munoz-Zanzi et al., 2020). Water exposure appears to be the major risk factor (Mwachui et al., 2015). Floods increase the risk by exposing humans and animals to *Leptospira* that are flushed out of their environment. In France, a study conducted from 1995 to 2005 showed that 42% of patients became infected after practicing water sports, 19% after contact with backwater (ponds, swamps, wells, water holes), and 19% during professional activities (Abgueguen et al., 2008). Recreational water activities are becoming increasingly popular and, for example, a recent study described a cluster of 14 kayakers that exhibited leptospirosis symptoms after contact with water in Britanny, France (Guillois et al., 2018). Leptospirosis cases have also been reported after the consumption of drinking water. Contamination may be caused by failure during water treatment processes or the lack of any water treatment (Cacciapuoti et al., 1987; Ramakrishnan et al., 2003).

To date, sixty-four species and more than three hundred serovars of *Leptospira* have been described and classified into four phylogenetic subclades: pathogenic P1 and P2 and saprophytic S1 and S2 (Vincent et al., 2019). Saprophytes are non-infectious species that can multiply in the environment, whereas pathogens are mostly isolated from both humans and animals and, occasionally the environment, in which they can survive for a few weeks (Thibeaux et al., 2017a). *Leptospira* are slow-growing bacteria (generation time of 5 and 20 hours for saprophytes and pathogens, respectively),

requiring a specific and rich medium (Adler, 2015; Faine et al., 1999). They are fastidious to isolate because of possible contamination with fast-growing interfering flora (Goarant, 2016; Loureiro et al., 2015; Schaechter, 2001). The recent development of a cocktail of antibacterial and antifungal antibiotics to which *Leptospira* are resistant (sulfamethoxazole, trimethoprim, Fosfomycin, 5-fluorouracil, amphotericin B,), thus limiting the development of interfering microorganisms (Chakraborty et al., 2011), should facilitate their culture.

Little information is available on *Leptospira* contamination of surface water and its seasonal evolution. Several authors have highlighted the importance of assessing the bacterial concentration in water resources (Goarant, 2016). Such evaluation is essential for monitoring population exposure to *Leptospira* to ensure public health. Currently, scarce data are available about the persistence of *Leptospira* in the environment and their resistance to physico-chemical parameters or disinfection. According to Huang et al. (Huang, 2014), *Leptospira* genomes were still detected in tap water after treatment, whereas most other pathogens disappeared

The effects of temperature and pH on *Leptospira* were studied by Chang et al. (Chang et al., 1948b). In this study, the authors showed that optimal survival conditions for *Leptospira* are neutral to slightly alkaline pH and a temperature of approximately 25 to 27°C. Other studies (Andre-Fontaine et al., 2015; Bierque et al., 2020a) showed that pathogenic strains of *Leptospira* could survive for > 20 months, despite deleterious storage conditions (cold, nutrient-poor acidic water, etc.). To date, no study has described the antimicrobial effect of ultraviolet (UV) radiation exposure, a process commonly used in tap water production, on the viability of *Leptospira*.

Molecular diagnostic methods appear to be more sensitive, specific, and rapid than culture (Ahmed et al., 2009; Podgoršek et al., 2020a). qPCR appears to be applicable for *Leptospira* detection, although there is no consensus concerning molecular methods. In most recent studies, real-time PCR assays have been based on Taqman technology (Mohd Ali et al., 2018; Stoddard et al., 2009) instead of the SYBR Green approach (Ahmed et al., 2009; Levett, 2005) due to its higher specificity (Stoddard et al., 2009). Molecular methods for *Leptospira* detection have been mainly based on the detection of housekeeping genes, such as *rrs* 16S (Gökmen et al., 2016), *gyrB* (Slack et al., 2006), or *secY* (Ahmed et al., 2009). Pathogen-specific *Leptospira* can be detected using genes such as *LipL32* (Stoddard et al., 2009), *ligA*, or *ligB* (Palaniappan et al., 2005). However, most analyses solely allow quantification of the *Leptospira* genome, irrespective of the viability of the bacteria. These methods tend to overestimate the true risk, which is solely linked to viable bacteria. The use of qPCR coupled with a DNA intercalating agent pretreatment was already described to evaluate the integrity of *Leptospira* (Casanovas-Massana et al., 2018b).This approach avoids the amplification of permeable bacteria (i.e.

damaged or dead bacteria) and, thus, partially limits their overestimation while maintaining the advantages of molecular methods (Roussel et al., 2018).

Our objective was to create a rapid and sensitive method for the quantification of potentially viable *Leptospira* in water samples, discriminating pathogens from saprophytes. This PMAqPCR detection method was also used to evaluate the resistance of *Leptospira* to different treatments such as heat inactivation, chlorine treatment, and UV exposure.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and culture media

Twenty-five *Leptospira* DNA samples, including that of eight saprophytes (four for S1 and four for S2) and seventeen pathogens (twelve for P1 and five for P2) (Table S1) were used to test the performance of the PCR assays. The pathogen *L. interrogans* serovar Manilae strain L495 and the saprophyte *L. biflexa* serovar Patoc strain Patoc 1 were used for inactivation tests. Strains were incubated at 30°C in liquid Ellinghausen, McCullough, Johnson, and Harris (EMJH) medium (Ellinghausen and Mccullough, 1965; Johnson and Harris, 1967).

For colony numeration, EMJH medium supplemented with 1.2% agar was used. Bacterial numbers were determined using a Petroff-Hausser chamber and dark-field microscopy. *Leptospira* DNA and strains were provided by the National Reference Center (NRC) for Leptospirosis (Institut Pasteur, Paris, France). Other bacterial strains used to determine the specificity of the pan-*Leptospira* PCR assay were provided by the Eau De Paris Laboratory.

Extraction

For inactivation tests, DNA was extracted using the Q400 protocol with a QIAsymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit (Qiagen) and the MagNA Pure Compact System (Roche®) for environmental monitoring. Nucleic acids were extracted from 200 µL of sample by elution into 50 µL, according to the manufacturer's protocols.

PCR assays

The multiplex qPCR was tested using *Leptospira* strains isolated from patients and environmental strains. The specificity of the qPCR methodology was established by the analysis of *Leptospira* strains and other bacterial species (Table S1).

The Pan-*Leptospira* PCR was based on the *rrs* (16S) gene sequence alignment of 113 *Leptospira* species, including saprophytes and pathogens. The primers 16S-F267 (5'-GGCCACAATGGAACTGAG-3') and 16S-R336 (5'-CCCATTGAGCAAGATTCTTAAC-3'), associated with the probe 16S-P286 (5'- FAM-CACGGTCCATACTCCT-NFQ-MGB-3'), achieve the amplification of a 70-bp fragment. The pathogenic-*Leptospira* PCR was based on the *LipL32* gene sequence alignment of 30 pathogenic *Leptospira* species. The primers LipL32-F164 (5'-CTGTGATCAACTATTACGG-3') and LipL32-R298 (5'-GGGAAATCATACGAACTC-3'), associated with the probe LipL32-P188 (5'-HEX-TAAAGCCAGGACAAGCGCCG-BHQ1-3'), achieve the amplification of a 135-bp fragment.

Sequences from the Genbank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) were used to design the primers (Table S2 and Table S3). The primers and probes for both PCR assays were designed using AlleleID® software version 7 (http://premierbiosoft.com/bacterial-identification/index.html).

Two plasmids (16S and *LipL32*) were generated as positive PCR controls using pCR2.1 (Topo TA-cloning, Life Technologies, Carlsbad, CA). An internal positive competitive amplification control (IPC) was used (Abdulmawjood et al., 2002) to evaluate the presence of PCR inhibitors. The IPC is composed of a partial sequence of the human *β-actin* gene and was cloned into the pCR™2.1-TOPO® vector (Life Technologies, Carlsbad, CA) and flanked by the *LipL32* primers using an approach similar to that described by Wurtzer et al. (Wurtzer et al., 2014). The primers were LipL32_BACT-F1146 (5'-CTGTGATCAACTATTACGGttGCAGGAGTATGACGAGT-3') and LipL32_BACT-R1215 (5'-GGGAAATCATACGAACTCttCAAGAAAGGGTGTAACGCAACTAA-3'). The probe was BACT_P1172 (5' -CCCCTCCATCGTCCACCGCAAATG-3')

Each PCR reaction was performed using the TaqMan ™ Fast Virus 1-Step Master Mix (#4444434). Unlike other polymerases, this Taq polymerase was less affected by inhibition due to the environmental sample matrix. The RT step was removed to achieve rapid diagnosis. Nevertheless, residual activity of the RT step remained, thus conferring better sensitivity than other kits.

For the pan-*Leptospira* PCR (16S), the F267 primer was used at 500 nM and the R336 primer and P286 probe at 100 nM. Simultaneously, oligonucleotides targeting pathogenic-*Leptospira* PCR (*LipL32*) were used at 600 nM for primer F164 and primer R298, and 200 nM for probe P188. IPC was added to the reaction mixture at 10^4 copies and detected using the IPC probe at 100 nM.

The PCR reaction was performed in a 20-µL reaction volume using a ViiA 7 real-time PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA) in 96-well plates. The thermal profile consisted of an initial denaturation step at 94°C for 20 s, followed by 45 cycles at 94°C for 5 s and 60°C for 30 s. FAM Yakima Yellow and Tamra fluorescence were detected at the end of the elongation step.

The three plasmids, positive controls, and IPC were quantified using an ultra-sensitive fluorescent nucleic acid stain for quantitating double-stranded DNA (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent), according to the manufacturer's protocol.

Propidium monoazide treatment

Before DNA extraction, samples were incubated with propidium monoazide (PMAxx) to ensure bacterial integrity (Coudray-Meunier et al., 2013; Karim et al., 2015; Prevost et al., 2016). The PMAxx solution was diluted in molecular grade water to obtain a final concentration of 10 mM and aliquots were stored at -20°C. Based on pilot studies (data not shown), the PMAxx dye was used at a final concentration of 0.1 mM to pre-treat the samples. After mixing, samples were incubated on ice, in the dark, for 30 min. Photo-activation was performed for 15 min using the PhaST Blue system (IUL, Barcelona, Spain). In this study, PMAxx-qPCR was also called integrity qPCR and is sometimes wrongly called viability PCR.

Persistence tests

Persistence tests were simultaneously performed in duplicate on two laboratory strains: *Leptospira biflexa* serovar Patoc (saprophyte) and *Leptospira interrogans* serovar Manilae (pathogen).

For each test, bacterial inactivation was modeled using GraphPad Prism version 8 software (GraphPad, La Jolla, CA). After testing several models, the *Leptospira* reduction data were adjusted using a sigmoidal dose−response model based on the equation:

$$Y = Ct + \frac{(C_0 - Ct)}{1 + (\frac{IC_{50}}{X})^{\alpha}}$$

In this equation, X was the studied parameter (temperature, CT value, time, UV dose), the variable "Ct" the *Leptospira* concentration at a given time during the assay, "C_0" the *Leptospira* concentration at T0, and IC50 the value of X at which the response was halfway between C_0 and C0. Finally, α described the slope of the curve.

As mentioned in every test referenced below, two detection methods were used in this study: integrity qPCR (described above) and culture on specific EMJH medium.

Heat exposure

Bacterial cultures were adjusted to a final concentration of approximately 10^4 *Leptospira*/mL in 1X PBS (pH 7.4). Each sample was aliquoted in duplicate and incubated for 1 h at various temperatures in a thermal cycler (Mastercycler® nexus, Eppendorf). Samples tested at 4°C were stored on ice.

Half of each sample was used for plating after resuspension in EMJH medium and half for PMA-qPCR analysis after resuspension in 1X PBS and the addition of PMAxx (100 µM final concentration). Nucleic acids were extracted using a QIAsymphony instrument (QIAGEN).

Ultraviolet (UV) exposure

Exponential phase cultures of *L. interrogans* and *L. biflexa* were centrifuged at 8,000 x g for 10 min and the pellet resuspended in 1X PBS to a final concentration of 10^9 *Leptospira*/mL. The bacterial suspension was split into microtubes (450 µL/tube). For each strain, eight UV conditions were tested in duplicate, from 0 mJ/cm2 to 40 mJ/cm^2 (the last is the UV dose applied in drinking-water treatment plants) using a 254 nm UV lamp (Phillips, Amsterdam, Netherlands) at room temperature. A digital UVC radiometer (IL Metronic Sensortechnik GmbH, Germany) was used to monitor UV irradiation.

Samples were subjected to various exposure times according to the tested dose and half used for plating on EMJH agar and half for PMA-qPCR analysis.

Chlorine treatment

Before starting the experiments, laboratory glassware was prepared by soaking it in a sodium hypochlorite solution containing 40 mg/L free active chlorine. Glassware was then intensively cleaned with chlorine demand-free (CDF) water. CDF water was used to prepare all experimental solutions and was prepared using a Milli-Q® Purification system with a Biopak® Polisher (Merck, Darmstadt, Germany). A stock solution of sodium hypochlorite (81 g/L) was used to prepare an intermediate solution of 0.5 mg/L with CDF water (pH 6).

As described previously, *L. interrogans* and *L. biflexa* were incubated at 30°C in liquid EMJH medium until reaching a concentration of approximately 10^8 *Leptospira*/mL. *Leptospira* cultures were centrifuged at 5,000 x g for 15 min, the supernatant discarded, the pellet washed in 0.9% NaCl, and finally resuspended in 0.9% NaCl. *Leptospira* suspensions were prepared by adding bacteria (final concentration of 10^4 *Leptospira*/mL) to a chlorine solution (0.5 mg/L). The free chlorine concentration was measured before and after addition of the *Leptospira* suspension using a Pocket colorimeter II (Hach Lange, Dusseldorf, Germany) after activation of the DPD reagent (N,N-diethyl-p-phenylene-diamine).

Unreacted free chlorine was quenched by the addition of sodium thiosulfate (100 mg/L) to stop the activation reaction. After chlorine treatment, each sample was analyzed by culture, qPCR, and integrity qPCR.

Environmental sample collection

Thirty-four surface-water samples were collected in Paris, including an area which includes a controlled bathing section during the summer period (48.885441128096, 2.3741118618021346). The surface water had not undergone any sanitation treatment.

Samples were analyzed within 24 h of collection. Surface-water samples (500 mL) were concentrated by successive centrifugation steps down to 400 µL. Half of the sample was treated with PMAxx (as described in the section on propidium monoazide treatments) and half remained untreated. All samples (with and without PMAxx) were then extracted and analyzed by qPCR.

Statistical analysis with GraphPad software

In addition to its use in the persistence test to model bacterial inactivation, GraphPad Prism software version 8 (GraphPad, La Jolla, CA) was also used for statistical analysis. Normality of the distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test. Paired groups were tested using the nonparametric Wilcoxon matched pairs signed rank test. P-values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

***Leptospira* multiplex qPCR**

First designed to operate separately, the three qPCR assays were adapted to be performed in a multiplex assay to obtain a single reaction (effectiveness demonstrated below in the section on the analytical sensitivity of the method). This was made possible through the use of different fluorophores. Total *Leptospira*, pathogenic *Leptospira*, and IPC were targeted by different dyes: FAM, Yakima Yellow, and TAMRA, respectively.

Several enzymatic master mixes were tested to optimize the qPCR reaction (FIG 1).

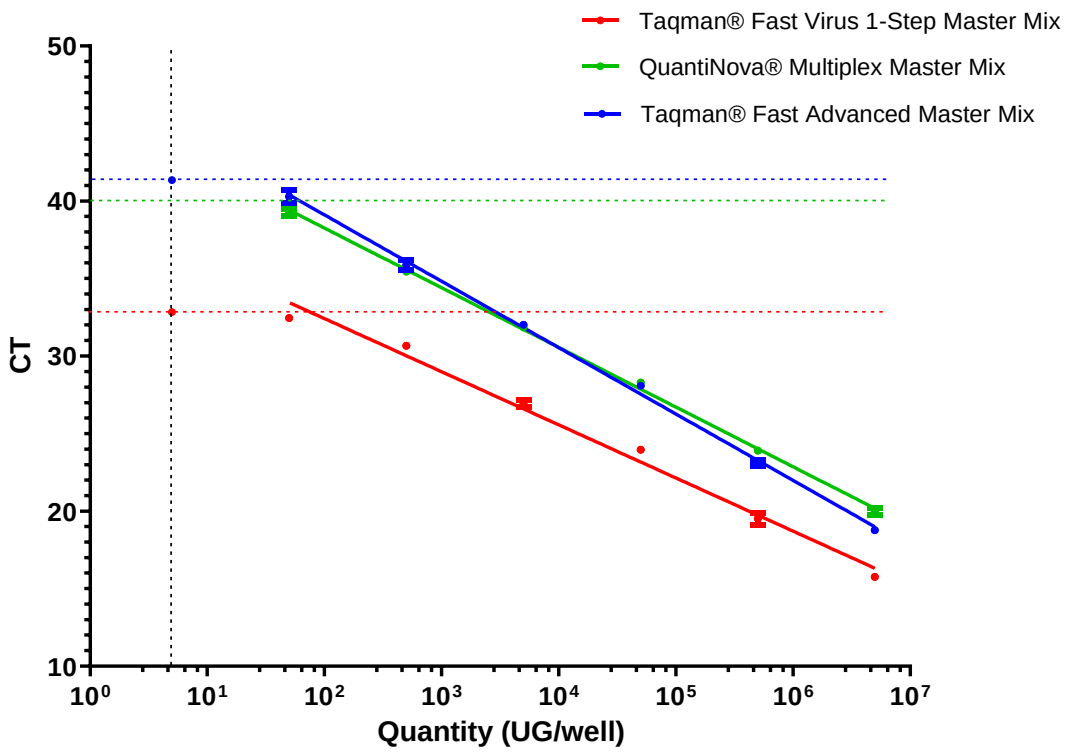


FIG 1: qPCR tests on range of concentrations of the Leptospira 16S plasmid with various enzymatic mixes (Taqman® Fast Virus 1-Step Master Mix, QuantiNova® Multiplex Master Mix, Taqman® Fast Advanced Master Mix). The colored dotted lines correspond to the number of cycles required to obtain the smallest detectable quantity of genome, shown by the black dotted line.

The Fast Virus 1-Step Master mix resulted in better detection limits than amplification using two other enzyme mixes, with a difference of approximately 10 CT between qPCRs. In addition, the efficiency and coefficient of determination (R^2) showed the Fast Virus 1-step master mix to outperform the others in this study (Table 1).

Table 1. Comparison of R^2 and efficiency between various enzymatic mixes.

	TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix	**QuantiNova®**	**Taqman® Fast Advanced Master Mix**
R^2	0.984	0.996	0.994
Efficacity (%)	95.8	81.9	71.3

The efficiency and R^2 were compared between various enzymatic mixes from two suppliers: TaqMan® (Applied Biosystems) and QuantiNova® (Qiagen).

As indicated previously, the two qPCR assays for detecting *Leptospira* and the IPC were first designed to operate independently. We compared the performance of the qPCR assays separately (simplex mode) or together (multiplex mode). The simplex and multiplex modes provided the same results for the 16S target (efficiency of approximately 100% and R2 of approximately 0.98) (

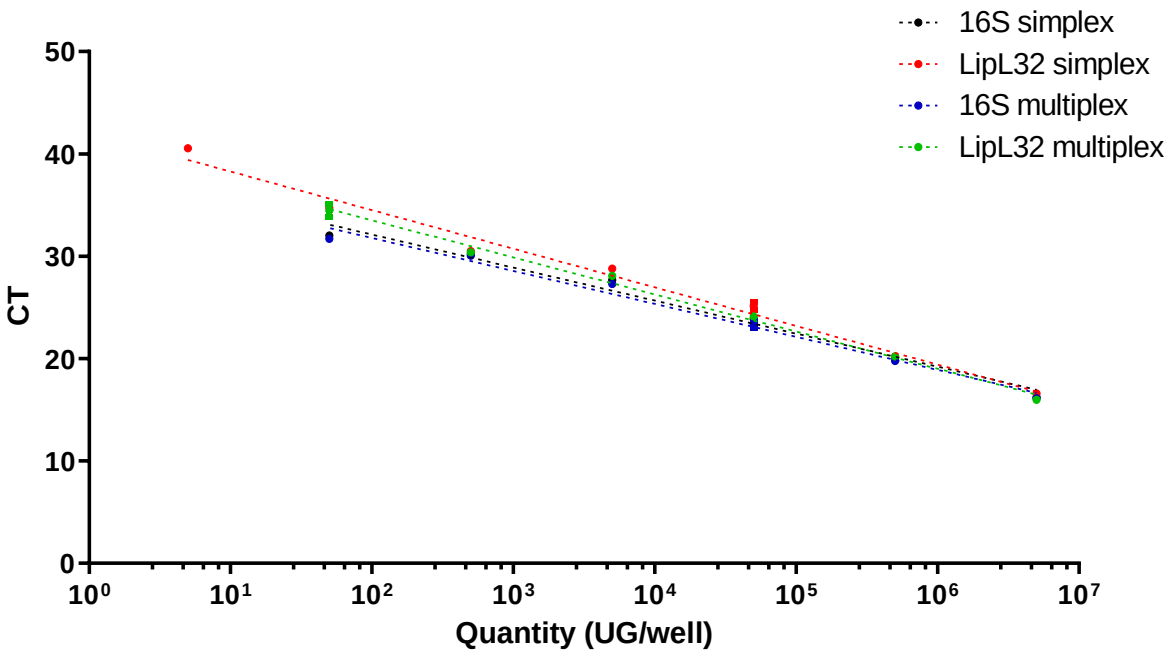


FIG 2) and these two parameters were slightly higher in the multiplex mode (89% of efficiency of 89% and R2 of 0.987) than the simplex mode (efficiency of and 84% R2 of 0.984) for the *LipL32* target (Table 2).

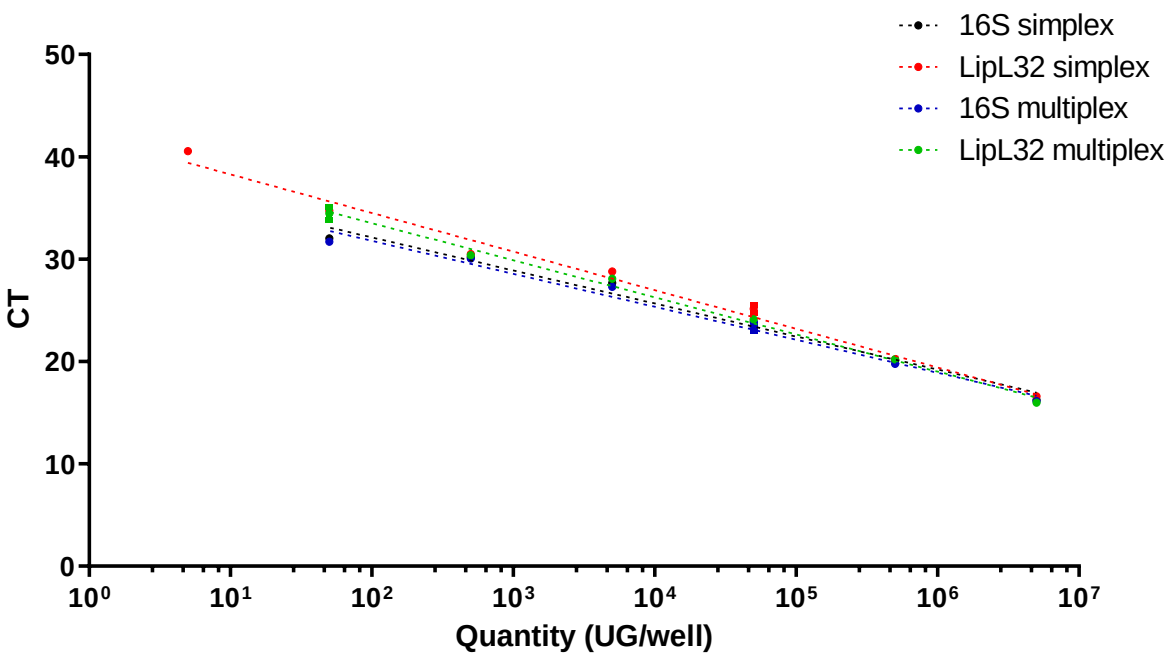


FIG 2 : Comparison between simplex and multiplex qPCR for the two targets: 16S gene and LipL32 gene; using range of plasmids.

Table 2. Comparison of R^2 and efficiency between the simplex and multiplex qPCR assays developed in this study.

	***rrs* (16S) simplex**	***LipL32* simplex**	***rrs* (16S) multiplex**	***LipL32* multiplex**
R^2	0.9827	0.9846	0.9820	0.9873
Efficacity (%)	104	84	104	89

The efficiency and R^2 were compared between the simplex and multiplex modes for two targets: rrs (16S) gene for all Leptospira and LipL32 gene for pathogenic strains.

Ten-fold serial dilutions (ranging from 10^6 copies/µL to 10^3 copies/µL), followed by two-fold serial dilutions (from 10^3 copies/µL to 1 copy/µL), of *L. interrogans* serovar Manilae were used to determine the true analytical sensitivity of the detection method. The limit of detection (LoD) was determined as the quantity of plasmid that could be detected in 95% of the replicates. The limit of quantification (LoQ) was the lowest concentration of plasmid that could be properly quantified in a standard range.

The LoD, LoQ, and amplification range were separately determined for each target (16S, *LipL32*, and IPC) to determine their own parameters. The LoD and LoQ of 16S were both at a CT value of 33.09, corresponding to 1 bacterium/well. For *LipL32*, the LoQ was at a CT value of 37.97, corresponding to 125 bacteria/well (FIG 3), and the LoD at 38.66, corresponding to 86 bacteria/well.

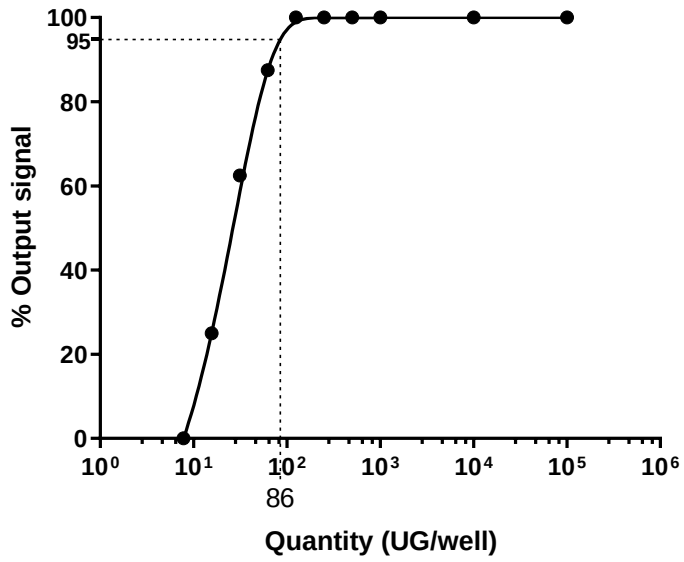


FIG 3 : Determination by PMAqPCR of LoD for the LipL32 gene using serial dilution (eight replicates for each dilution).

We tested the specificity of the pan-*Leptospira* PCR on bacterial strains other than *Leptospira*. The assay was found to be specific for *Leptospira* spp., as none of the six other pathogenic organisms were amplified. Moreover, we tested the specificity of pathogenic-*Leptospira* PCR. None of the nonpathogenic *Leptospira* were detected by the assay. The sensitivity was also measured, and results were mentioned in Table S1.

Evaluation of the efficacy of disinfection treatments of *Leptospira*

Addition of the integrity assay to the detection by qPCR enabled the specific detection of unaltered bacteria and viable but non-cultivable (VBNC) bacteria in the samples (Nocker et al., 2007). An intercalating agent was added and photoactivated to avoid the amplification of “free” or not protected DNA by the qPCR. This protocol was tested on *Leptospira* subjected to disinfection treatments (temperature, UV radiation, chlorine). The bacterial concentration was evaluated by three different methods to validate the use of PMAqPCR: microscopic enumeration, colony-forming units by plating, and PMAqPCR (Table 3).

Table 3. Comparison of Leptospira detection between microscopy, plating and molecular analysis.

	Microscopic enumeration	**Plating enumeration (EMJH)**		**PMAqPCR (PBS)**	**PMAqPCR (EMJH)**
	n = 9	n = 9		n = 6	n = 6
***L. biflexa* Patoc**	1.00E+07	1.66E+07	(16S)	4.25E+08	4.21E+08
***L. interrogans* Manilae**	1.00E+07	1.63E+07	(16S) (*LipL32*)	1.11E+09 7.45E+08	7.10E+08 4.65E+08

Microscopic enumeration was assessed by dark field microscopy using a Petroff-Hausser chamber. Plating enumeration was performed using EMJH semi-solid medium after seven days of incubation for L. biflexa and more than two weeks of incubation for L. interrogans. Detection by molecular analysis was performed in PBS and EMJH liquid medium.

The titrations obtained by microscopy and plating were similar, giving approximately 10^7 *Leptospira*/mL. Quantification of the two genes indicated concentrations 25 to 60 times higher.

Various experiments were independently carried out with fresh *Leptospira* suspensions. Thus, the initial concentration of bacteria could have differed. Nonetheless, this parameter did not interfere with the interpretation of results because the analysis was based on the log of inactivation.

Heat inactivation was assessed by culture analysis and PMA-qPCR analysis. The pathogenic strain appeared to be more resistant than the saprophytic strain. Indeed, the curve of the slope from the culture analysis was lower for *L. interrogans* (-6.945) than *L. biflexa* (-8.211). However, the temperature which induced a reduction of the concentration of the bacteria by half was broadly similar for both strains (32.12°C for *L. interrogans* and 32.91°C for *L. biflexa*) (FIG 4).

Leptospira appeared to not be cultivable on EMJH solid plates beyond 37°C and not detectable by PMA-qPCR beyond 55°C.

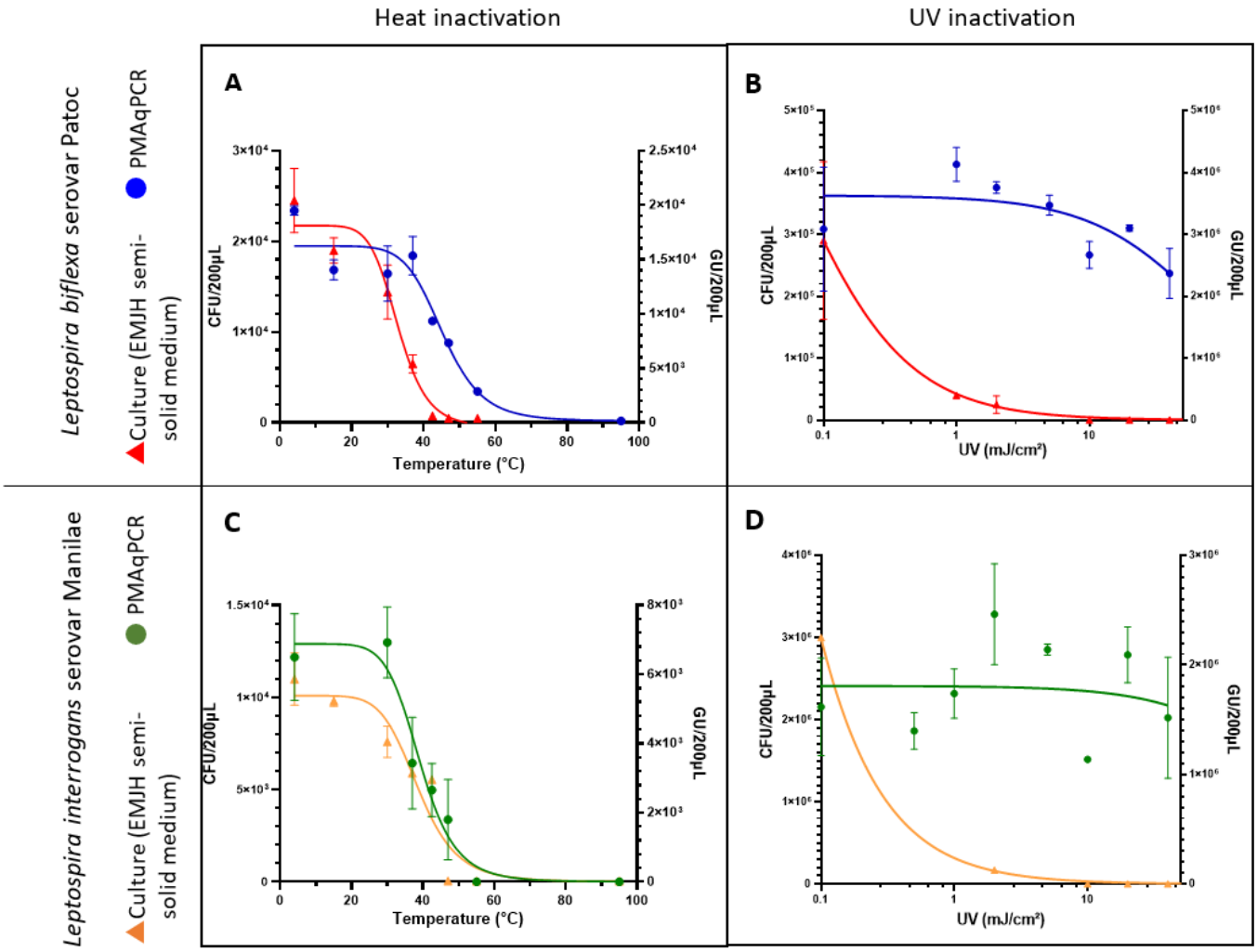


FIG 4 : Heat and UV inactivation for Leptospira biflexa serovar Patoc (A&B, respectively) and for Leptospira interrogans serovar Manilae (C&D, respectively). The X-axis indicates the temperature to which Leptospira were exposed for 1 h (A, C) or the UV dose of exposure (B, D). The left Y-axis represents the median bacterial culture results (in colony-forming units) after several days of incubation in EMJH semi-solid medium at 30°C (circle). The right Y-axis represents the median PMAxxqPCR results (in genome units) after extraction and molecular biology assay based on the 16S gene (triangle).

The time of exposure to free chlorine was calculated from the kinetics of free chlorine consumption and adjusted to reach a CT value equal to 10 mg.min/L (FIG 5). This CT value corresponded to the concentration of this powerful oxidant (mg/L) multiplied by the time (min) of exposure. In this case, we selected the time at which the area under the free chlorine CT curves was 10 mg.min/L. The time of exposure ranged from 0 to 27 min. Chlorine-dependent inactivation was assessed by culture and molecular methods. We observed a slight decrease in the concentration of *L. interrogans* in the presence of the hypochlorous acid during the assay by PMAqPCR. The effect was stronger for *L. biflexa*, with 1.5 log removal at CT = 4mg.min/L and up to 2 logs of inactivation at the end of the experiment

(CT = 10mg.min/L). Both strains showed strong sensitivity to chlorine treatment by culture assay (FIG 6). No *L. interrogans* grew on the EMJH culture media after exposure to the lowest chlorine dose (CT = 0.001 mg.min/L), whereas total inactivation of *L. biflexa* occurred at CT = 0.1 mg.min/L.

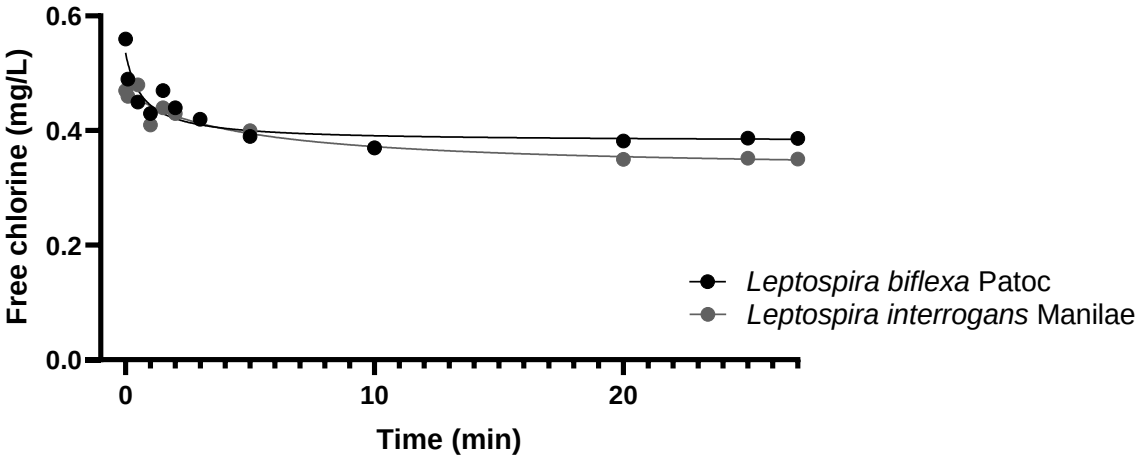


FIG 5 : Free chlorine consumption kinetics for L. biflexa serovar Patoc *and L. interrogans* serovar Manilae. The time of exposure to free chlorine was adjusted to maintain a CT-value equal to 10 mg.min.L^{-1} .

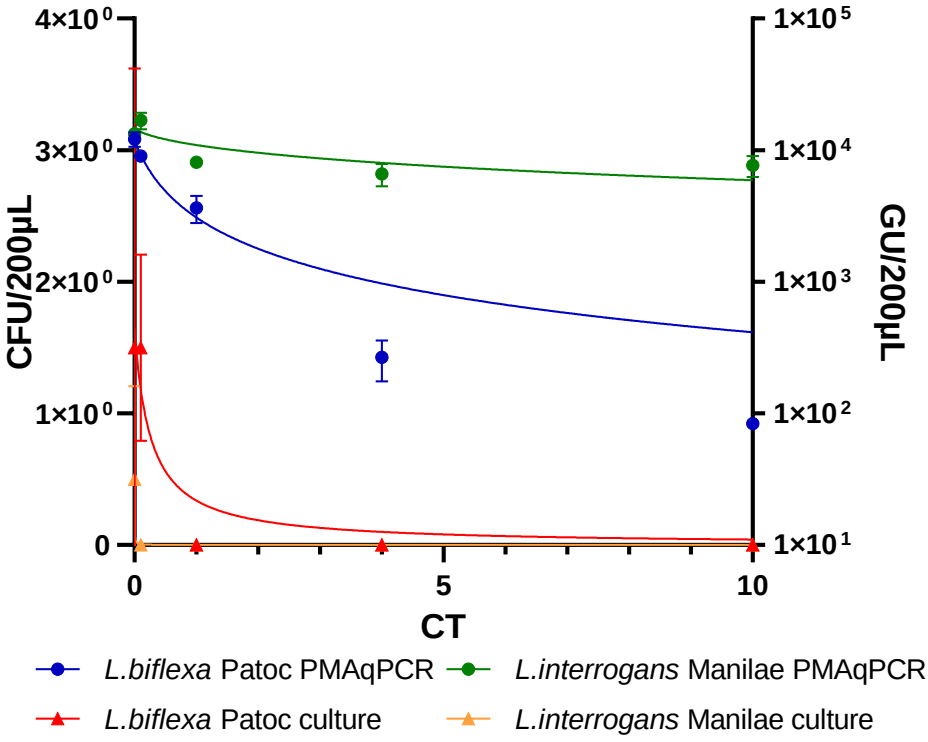


FIG 6 : Chlorine inactivation for L. biflexa serovar Patoc *and L. interrogans* serovar Manilae *by culture and PMAqPCR.* Results were gathered for the two strains *L. biflexa* serovar Patoc (blue, red) and *L.*

interrogans serovar Manilae (green, orange). The X-axis indicates the CT value: powerful oxidant concentration (mg/L) * time (min) of exposure. The left Y-axis represents the median bacterial culture results (in colony-forming units) after several days of incubation in EMJH semi-solid medium at 30°C (triangle). The right Y-axis represents the median PMAxxqPCR results (in genome units) after extraction and molecular biology assay based on the 16S gene (circle).

UV_{254} light inactivates microorganisms by targeting their nucleic acids, resulting in the inhibition of DNA replication and thus their growth in culture. Culture analysis showed the same kinetics for the action of UV radiation for both strains (FIG 4). Three logs of removal were achieved at 10 mJ/cm², whereas 40 J/cm² is currently used in drinking water treatment plants. UV light kills cells by damaging their DNA and does not usually result in cell lysis; the lack of decrease for PMAqPCR signal is therefore consistent with the preservation of membrane integrity.

Proof-of-concept of application for environmental monitoring

Our PMAxx-qPCR method was tested on 32 surface water samples, with and without PMAxx. The results are summarized in FIG 7. A Wilcoxon signed-rank test was performed to show whether the data with PMAxx were significantly different from those without. The two sets of data were significantly different (p-value < 0.0001). The genome concentration using PMAxx-qPCR was consistently lower than that estimated using conventional qPCR in 100% of cases, signifying that a significant proportion of target DNA was “free” or inside permeable bacteria. Adding PMAxx reduced overestimation by amplifying only the genomes of non-permeable bacteria (potentially viable bacteria).

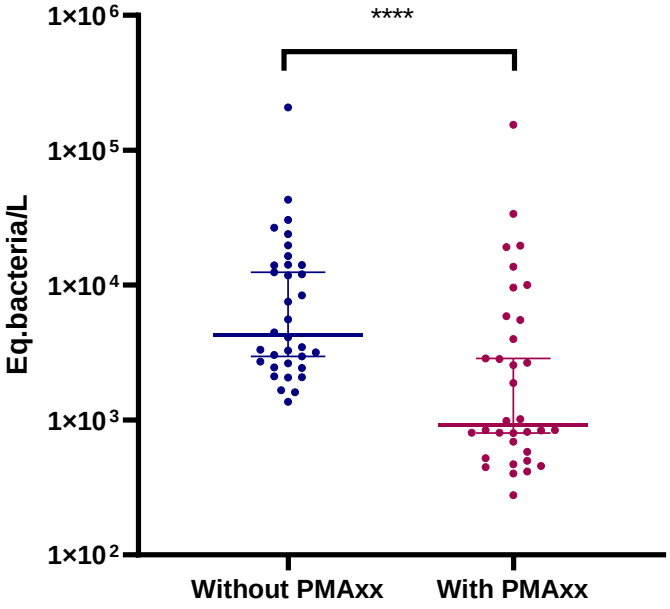


FIG 7 : Distribution and median of Leptospira genome (16S gene) with (red) and without PMAxx (blue) on environmental samples. This analyze was based on 34 environmental freshwater samples collected in the Ourcq canal (Paris) in June-September 2018.

DISCUSSION

Leptospirosis is an emerging waterborne zoonosis of global importance for both humans and animals. However, there is also an urgent need for a robust and easy-to-use *Leptospira* detection method for environmental samples. Traditional culture methods are fastidious and Leptospira are slow-growing bacteria and cultures can be contaminated by other microorganisms (Podgoršek et al., 2020b). Alternative detection methods, such as specific qPCR, have thus been proposed but no gold-standard has been implemented for environmental monitoring. In general, molecular methods allow a rapid measurement of the pathogen concentration coupled with high sensitivity and specificity. In the present study, we implemented a triplex qPCR based on Taqman technology for the detection and quantification of both pathogenic and saprophytic *Leptospira* spp. using the *rrs* gene and specifically pathogenic strains based on *LipL32* gene amplification. An internal competitive amplification control was added to the analysis to evaluate the inhibition of amplification resulting from the samples. In addition, we coupled this method with a bacterial integrity assay. A triplex PCR (two genes and an internal control) was designed and used to discriminate *Leptospira* from subclades P1 and P2 in animal samples (Pérez et al., 2020). This multiplex qPCR was set up, according the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009), to detect all *Leptospira* and selectively discriminate between pathogenic and saprophytic strains. An internal control was also added as a supplementary monitor to check for inhibition of amplification in environmental samples.

Genome amplification by qPCR also has certain limitations. Amplification of any targeted DNA present in the sample makes it impossible to distinguish between live and dead cells, resulting in potential overestimation of the bacterial concentration and the risk of infection. It was also shown that the use of propidium iodide to distinguish between living bacteria from dead bacteria was not relevant under certain experimental conditions and in particular to estimate the effect of chlorination (Virto et al., 2005). Here, we used propidium monoazide (PMAxx) to avoid the amplification of DNA from degraded cells, permeable to the dye, and solely amplify DNA from potentially viable bacteria (Casanovas-Massana et al., 2018c) to reduce potential overestimation.

Validation of the qPCR method was performed by comparing the molecular results (using PMAxx coupled with the RT qPCR measurement) with culture-based methods. A higher number of *Leptospira* was counted by the qPCR. This difference can be explained by various factors, such as colonies not issued from one bacteria (i.e. aggregated bacteria) , genome multiplication before cells separation,

count of viable but non cultivable bacteria and multiple copies of the 16S gene in *Leptospira* (Fukunaga and Mifuchi, 1989).

We compared the survival of pathogenic and saprophytic strains of *Leptospira* in several environments. Heat inactivation experiments revealed different kinetics between pathogenic and saprophytic strains, the pathogenic strain being more tolerant to heat. This relative tolerance may explain their higher prevalence in tropical areas as well as the role of these strains in human infections. Other inactivation processes did not show any significant differences in inactivation kinetics between the two strains.

Our results based on bacterial culture methods suggest that *Leptospira* is rapidly inactivated by free chlorine. However, the use of PMAqPCR shows that leptospiral membranes would not be directly damaged by free chlorine. Several studies have shown that free chlorine inactivates *E. coli* without damaging its cell membranes (Bridges et al., 2020; Cho et al., 2010; Kazama and Otaki, 2013; Mizozoe et al., 2019) further indicating that the use of PMAqPCR is not appropriate to determine the capacity of chlorine to kill bacteria.

In absence of impact of disinfection treatment, it was essential to also consider that the absence of cultivability does not necessarily indicate cell lysis as bacteria could remain as a "viable but non-cultivable" state (Xu et al., 2018).

Contrary to classical PCR, the integrity PCR approach allowed the use of more adaptable and faster molecular methods to assess inactivation efficiencies. Due to interfering flora or organic matter, the culture is too complicated to implement, especially on complex samples whose matrix negatively impacts the re-cultivation of *Leptospira*.

Certain physicochemical parameters (for example, salty water) can alter the survival of *Leptospira* (Chang et al., 1948a), whereas other parameters can provide a protective effect. For example, the presence of organic matter or biofilms could increase the survival of *Leptospira* survival in aquatic environments (Barragan et al., 2011b; Thibeaux et al., 2017b).

The PMAxx approach showed certain limitations concerning its use to evaluate the efficiency of disinfection treatments of *Leptospira*. Although useful results were obtained after heat or low-level free chlorine exposure, the use of PMAxx was not informative for the analysis of UV treatment. It is possible that treatments or conditions that affect bacterial integrity (temperature, chlorine) allow PMAxx to access the genome, contrary to UV radiation. However, when only DNA was targeted for the inactivation of the microorganism, PMAxx had no effect in improving the determination of *Leptospira* sensitivity (FIG 7). Such an observation has already been reported for a virus assay (Prevost et al., 2015).

To date, *Leptospira* are not considered when investigating microorganisms in water. Our methods allowed us to obtain information on the presence and integrity of such bacteria in Parisian surface-water samples (FIG 7). This proof of concept should be applied to answer other questions, such as the influence of seasonal variations or the impact of rodent control campaigns. The development of a sensitive qPCR method using a rapid reverse-transcription step targeting the *rrs* (16S) or *LipL32* genes improved the sensitivity of detection (Waggoner et al., 2014). Within the sampling area, the median concentration was approximately 10^3 eq. bacteria/L. Further studies are under way to determine whether it would be relevant and useful to routinely use this method to monitor *Leptospira* in surface water. These results could be considered to establish threshold alerts, leading to restrictions of access, after events that favor bacterial contamination (heavy rain, flooding, etc.). The impact of various parameters, such as seasons, climatic conditions, and human activities, on *Leptospira* dynamics needs to be evaluated.

Analysis of the presence of viable *Leptospira* in the environment and the measurement of the effectiveness of treatments are essential. The advantages of combining PMAxx addition and RT qPCR methods to detect low levels of non-permeable pathogens in water is now accepted (Gensberger et al., 2014a). The use of PMAxx combined with qPCR is therefore one possible solution for *Leptospira* measurement; it is time saving and avoids overestimation. By detecting non-permeable and VBNC bacteria, this method pinpointed and prevented a *Leptospira* outbreak originating from environmental water (Golpayegani et al., 2019). These data could be useful for quantitative microbiological risk assessment (QMRA) approaches.

Although it is now well known that these bacteria can have a high impact on public health in endemic areas (Pappas et al., 2008) or during specific seasons (Bouscaren et al., 2019a; Joshi et al., 2017b), little is known about the environmental concentration in urbanized areas in Europe affected by the proliferation of rodents, which are the main animal reservoir of *Leptospira*. With ongoing social changes, water-related activities have increased in these regions, with the installation of urban beaches, bathing areas, and aquatic activities in areas with non-treated surface water. Our PMAqPCR method will be further used to better evaluate the presence of pathogenic *Leptospira* in bathing areas in Paris, France. The monitoring of microbial contamination is a requirement for establishing microbial risk assessment guidelines. Moreover, regular monitoring of *Leptospira* could help to provide a better description of infection events. Despite an increase in reported cases of leptospirosis and evidence that most cases are due to exposure to contaminated water, regulations are still based on fecal indicators and do not yet include pathogenic *Leptospira*, probably due to the absence of reliable measurement methods. Indeed, only *Escherichia coli* and intestinal enterococci are analyzed in France (French Public Health Code-D. 1332-15D1332-15). The only existing recommendations related to the

risk of *Leptospira* exposure are to avoid bathing with skin lesions or in uncontrolled bathing areas. *Leptospira* monitoring could be implemented in fresh-water swimming facilities to improve awareness of *Leptospira* exposure. This could consist of identifying sources of pollution prone to affect water quality and the health of bathers. By detecting *Leptospira* in the environmental water during flooding, this assay can also contribute to early warning of potential outbreaks of leptospirosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to the sampling department of Eau de Paris for providing samples to the laboratory. We thank the staff of the National Reference Center for Leptospirosis for support and the processing of some of the samples.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1: Microorganism strains used for specificity tests and results from the TaqMan real-time multiplex (LipL32 and 16S) PCR assays

Gender	Status	Species	Results PCR 16S-*Leptospira*	Results PCR LipL32-*Leptospira*
	Saprophyte S1	*L. biflexa*	+	-
	Saprophyte S1	*L. terpstrae*	+	-
	Saprophyte S1	*L. vanthielii*	+	-
	Saprophyte S1	*L. yanagawae*	+	-
	Saprophyte S2	*L. kobayashi*	+	-
	Saprophyte S2	*L. idonii*	+	-
	Saprophyte S2	*L. ognonensis*	+	-
	Saprophyte S2	*L. ryugenii*	+	-
	Pathogen P1	*L. adleri*	+	ND
	Pathogen P1	*L. alstonii*	+	+
	Pathogen P1	*L. barantonii*	+	ND
	Pathogen P1	*L. borgpetersenii*	+	+
	Pathogen P1	*L. ellisii*	+	+
	Pathogen P1	*L. interrogans*	+	+
	Pathogen P1	*L. kirschnerii*	+	+
	Pathogen P1	*L. kmetyi*	+	ND
	Pathogen P1	*L. mayottensis*	+	ND
	Pathogen P1	*L. noguchii*	+	+
	Pathogen P1	*L. santarosai*	+	+
	Pathogen P1	*L. weilli*	+	+
	Pathogen P2	*L. fainei*	+	-
	Pathogen P2	*L. johnsonii*	+	-
	Pathogen P2	*L. licerasiae*	+	-

	Pathogen P2	*L. venezuelensis*	+		-
	Pathogen P2	*L. wolffii*	+		-
Enterococcus		*E. faecalis*	-		NT
Escherichia		*E. coli*	-		NT
Klebsiella		*K. pneumoniae*	-		NT
Pseudomonas		*P. aeruginosa*	-		NT
Salmonella		*S. enterica*	-		NT
Staphylococcus		*Spp*	-		NT

Table S2: Leptospira sequences and their NCBI accession numbers required to design the primers and probe for the 16S qPCR

No	Organism		Serovar	Group	Accession N°
1	*Leptospira*	*alexanderi*	Manhao	Pathogenic	AY631880
2	*Leptospira*	*alexanderi*	Manhao 3	Pathogenic	NR_043047
3	*Leptospira*	*alexanderi*	Manzhuang	Pathogenic	AY996803
4	*Leptospira*	*alexanderi*	Mengla	Pathogenic	DQ991481
5	*Leptospira*	*alexanderi*	Nanding	Pathogenic	AY996804
6	*Leptospira*	*alstonii*	Pingchang	Pathogenic	AOHD02000026
7	*Leptospira*	*alstonii*	Pingchang	Pathogenic	DQ991480
8	*Leptospira*	*alstonii*	Sichuan	Pathogenic	AY631881
9	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Balcanica	Pathogenic	U12669
10	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Ballum	Pathogenic	AM050581
11	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Ballum	Pathogenic	JQ988847
12	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Ballum	Pathogenic	FJ154591
13	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Ballum	Pathogenic	KU219452
14	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Ceylonica	Pathogenic	FJ154596
15	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Hardjo	Pathogenic	FJ154586
16	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Hardjo	Pathogenic	KU219450
17	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Javanica	Pathogenic	AY887899
18	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Javanica	Pathogenic	NZ_AOUW01000091
19	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Sejroe	Pathogenic	JQ988862
20	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Sejroe	Pathogenic	KR107201
21	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Sejroe	Pathogenic	FJ154593
22	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Tarassovi	Pathogenic	JQ988861
23	*Leptospira*	*interrogans*	Australis	Pathogenic	AY996794
24	*Leptospira*	*interrogans*	Australis	Pathogenic	JQ988863
25	*Leptospira*	*interrogans*	Australis	Pathogenic	FJ154557
26	*Leptospira*	*interrogans*	Autumnalis	Pathogenic	AY996791
27	*Leptospira*	*interrogans*	Bratislava	Pathogenic	JQ988859
28	*Leptospira*	*interrogans*	Bratislava	Pathogenic	AM050583
29	*Leptospira*	*interrogans*	Bataviae	Pathogenic	EF536987
30	*Leptospira*	*interrogans*	Bataviae	Pathogenic	AM050582
31	*Leptospira*	*interrogans*	Bataviae	Pathogenic	FJ154566
32	*Leptospira*	*interrogans*	Bulgarica	Pathogenic	AY996792
33	*Leptospira*	*interrogans*	Canicola	Pathogenic	KR080516
34	*Leptospira*	*interrogans*	Canicola	Pathogenic	AM050566
35	*Leptospira*	*interrogans*	Canicola	Pathogenic	KU053945
36	*Leptospira*	*interrogans*	Copenhageni	Pathogenic	GQ204292
37	*Leptospira*	*interrogans*	Copenhageni	Pathogenic	KY000352
38	*Leptospira*	*interrogans*	Copenhageni	Pathogenic	KR030154
39	*Leptospira*	*interrogans*	Copenhageni	Pathogenic	FJ154569
40	*Leptospira*	*interrogans*	Djasiman	Pathogenic	FJ154550
41	*Leptospira*	*interrogans*	Fortbragg	Pathogenic	JQ906634
42	*Leptospira*	*interrogans*	Grippotyphosa	Pathogenic	JQ906696

43	*Leptospira*	*interrogans*	Grippotyphosa	Pathogenic	JQ906628
44	*Leptospira*	*interrogans*	Hardjo	Pathogenic	AM050568
45	*Leptospira*	*interrogans*	Hardjo	Pathogenic	AY996797
46	*Leptospira*	*interrogans*	Hebdomadis	Pathogenic	JQ988848
47	*Leptospira*	*interrogans*	Hebdomadis	Pathogenic	AM050570
48	*Leptospira*	*interrogans*	Hebdomadis	Pathogenic	JQ906633
49	*Leptospira*	*interrogans*	Icterohaemorrhagiae	Pathogenic	AY631894
50	*Leptospira*	*interrogans*	Icterohaemorrhagiae	Pathogenic	JQ988845
51	*Leptospira*	*interrogans*	Icterohaemorrhagiae	Pathogenic	FJ154555
52	*Leptospira*	*interrogans*	Icterohaemorrhagiae	Pathogenic	FJ154563
53	*Leptospira*	*interrogans*	Icterohaemorrhagiae	Pathogenic	KU053947
54	*Leptospira*	*interrogans*	Javanica	Pathogenic	KY075910
55	*Leptospira*	*interrogans*	Kennewicki	Pathogenic	FJ154571
56	*Leptospira*	*interrogans*	Kirikkale	Pathogenic	HM536967
57	*Leptospira*	*interrogans*	Kirikkale	Pathogenic	HM536965
58	*Leptospira*	*interrogans*	Kremastos	Pathogenic	DQ991467
59	*Leptospira*	*interrogans*	Linhai	Pathogenic	JQ906636
60	*Leptospira*	*interrogans*	Manilae	Pathogenic	FJ154545
61	*Leptospira*	*interrogans*	Parameles	Pathogenic	AB368965
62	*Leptospira*	*interrogans*	Pomona	Pathogenic	JQ988858
63	*Leptospira*	*kirschneri*	Agogo	Pathogenic	DQ991476
64	*Leptospira*	*kirschneri*	Grippotyphosa	Pathogenic	FJ154572
65	*Leptospira*	*kirschneri*	Grippotyphosa	Pathogenic	JQ988856
66	*Leptospira*	*kirschneri*	Mozdoc	Pathogenic	AM050574
67	*Leptospira*	*kirschneri*	Cynopteri	Pathogenic	AY631895
68	*Leptospira*	*kmetyi*	Malaysia	Pathogenic	AHMP02000003
69	*Leptospira*	*kmetyi*	Malaysia	Pathogenic	NR_041544
70	*Leptospira*	*mayottensis*	Not determined	Pathogenic	KJ847187
71	*Leptospira*	*mayottensis*	Not determined	Pathogenic	KT338879
72	*Leptospira*	*mayottensis*	Not determined	Pathogenic	JN683863
73	*Leptospira*	*noguchii*	Autumnalis	Pathogenic	AHOP02000022
74	*Leptospira*	*noguchii*	Panama	Pathogenic	NR_043050
75	*Leptospira*	*santarosai*	Not determined	Pathogenic	AY461889
76	*Leptospira*	*santarosai*	Not determined	Pathogenic	U12672
77	*Leptospira*	*santarosai*	Shermani	Pathogenic	AY631883
78	*Leptospira*	*santarosai*	Bananal	Pathogenic	KJ946437
79	*Leptospira*	*weilii*	Celledoni	Pathogenic	AY631877
80	*Leptospira*	*broomii*	Not determined	Intermediate	AY792329
81	*Leptospira*	*broomii*	Not determined	Intermediate	AY796065
82	*Leptospira*	*broomii*	Not determined	Intermediate	Y19243
83	*Leptospira*	*fainei*	Hurstbridge	Intermediate	AY996789
84	*Leptospira*	*fainei*	Hurstbridge	Intermediate	FJ154578
85	*Leptospira*	*inadai*	Aguaruna	Intermediate	AY631891
86	*Leptospira*	*inadai*	Kaup	Intermediate	AY631887
87	*Leptospira*	*inadai*	Lyme	Intermediate	AY631896
88	*Leptospira*	*inadai*	Lyme	Intermediate	JQ988844
89	*Leptospira*	*licerasiae*	Varillal	Intermediate	EF612278
90	*Leptospira*	*licerasiae*	Not determined	Intermediate	IP
91	*Leptospira*	*wolffii*	Khorat	Intermediate	EF025496
92	*Leptospira*	*wolffii*	Khorat	Intermediate	NR_044042
93	*Leptospira*	*biflexa*	Ancona	Saprophytic	Z21629
94	*Leptospira*	*biflexa*	Andamana	Saprophytic	AY631893
95	*Leptospira*	*biflexa*	Canela	Saprophytic	Z21631
96	*Leptospira*	*biflexa*	Jequitaia	Saprophytic	Z21633
97	*Leptospira*	*biflexa*	Patoc	Saprophytic	AY631876
98	*Leptospira*	*biflexa*	Patoc	Saprophytic	NR_043043
99	*Leptospira*	*biflexa*	Patoc	Saprophytic	IP
100	*Leptospira*	*biflexa*	Patoc	Saprophytic	AF157070
101	*Leptospira*	*idonii*	Not determined	Saprophytic	AB721966
102	*Leptospira*	*idonii*	Not determined	Saprophytic	NR_114336
103	*Leptospira*	*meyeri*	Hardjo	Saprophytic	AY631889
104	*Leptospira*	*meyeri*	Semaranga	Saprophytic	AY631892
105	*Leptospira*	*meyeri*	Ranarum	Saprophytic	AY631878

106	*Leptospira*	*terpstrae*	Hualin	Saprophytic	AY631888
107	*Leptospira*	*terpstrae*	Hualin	Saprophytic	NR_115294
108	*Leptospira*	*vanthielii*	Holland	Saprophytic	AY631897
109	*Leptospira*	*vanthielii*	Holland	Saprophytic	NR_115297
110	*Leptospira*	*wolbachii*	Codice	Saprophytic	AY631879
111	*Leptospira*	*wolbachii*	Codice	Saprophytic	NR_043046
112	*Leptospira*	*yanagawae*	Saopaulo	Saprophytic	AY631882
113	*Leptospira*	*yanagawae*	Saopaulo	Saprophytic	NR_115293

Table S3: Leptospira sequences and their NCBI accession numbers required to design primers and probe for the LipL32 qPCR

No	Organism		Serovar	Group	Accession number
1	*Leptospira*	*alstonii*	Pingchang	Pathogenic	NZ_AOHD02000048
2	*Leptospira*	*alstonii*	Sichuan	Pathogenic	NZ_ANIK01000029
3	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Ballum	Pathogenic	KU219466
4	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Ballum	Pathogenic	AY609322
5	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Hardjo	Pathogenic	KU219468
6	*Leptospira*	*borgpetersenii*	Mini	Pathogenic	AY609333
7	*Leptospira*	*interrogans*	Australis	Pathogenic	AY609325
8	*Leptospira*	*interrogans*	Autumnalis	Pathogenic	AY609324
9	*Leptospira*	*interrogans*	Autumnalis	Pathogenic	JN210551
10	*Leptospira*	*interrogans*	Balico	Pathogenic	JQ013520
11	*Leptospira*	*interrogans*	Canicola	Pathogenic	AY609321
12	*Leptospira*	*interrogans*	Canicola	Pathogenic	KC800990
13	*Leptospira*	*interrogans*	Copenhageni	Pathogenic	GQ204288
14	*Leptospira*	*interrogans*	Copenhageni	Pathogenic	GQ204287
15	*Leptospira*	*interrogans*	Copenhageni	Pathogenic	KU219470
16	*Leptospira*	*interrogans*	Grippotyphosa	Pathogenic	EU871723
17	*Leptospira*	*interrogans*	Grippotyphosa	Pathogenic	JN886738
18	*Leptospira*	*interrogans*	Hardjo	Pathogenic	JN886739
19	*Leptospira*	*interrogans*	Hardjo	Pathogenic	KC800991
20	*Leptospira*	*interrogans*	Hebdomadis	Pathogenic	GU220823
21	*Leptospira*	*interrogans*	Hebdomadis	Pathogenic	AB094436
22	*Leptospira*	*interrogans*	Hebdomadis	Pathogenic	AY609328
23	*Leptospira*	*interrogans*	Icterohaemorrhagiae	Pathogenic	AB094433
24	*Leptospira*	*interrogans*	Icterohaemorrhagiae	Pathogenic	KC800993
25	*Leptospira*	*interrogans*	Javanica	Pathogenic	AY776292
26	*Leptospira*	*interrogans*	Kremastos	Pathogenic	AY461906
27	*Leptospira*	*interrogans*	Manilae	Pathogenic	JQ013519
28	*Leptospira*	*kirschneri*	Not determined	Pathogenic	AY461917
29	*Leptospira*	*kirschneri*	Not determined	Pathogenic	AY461916
30	*Leptospira*	*kmetyi*	Malaysia	Pathogenic	NZ_AHMP02000003

REFERENCES

1. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. Small PLC, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Sep 17;9(9):e0003898.
2. Tique V, Mattar S, Miranda J, Oviedo M, Noda A, Montes E, et al. Clinical and Epidemiological Status of Leptospirosis in a Tropical Caribbean Area of Colombia. BioMed Res Int. 2018 May 29;2018:1–8.
3. Biscornet L, de Comarmond J, Bibi J, Mavingui P, Dellagi K, Tortosa P. An Observational Study of Human Leptospirosis in Seychelles. :10.
4. Pijnacker R, Goris MGA, te Wierik MJM, Broens EM, van der Giessen JWB, de Rosa M, et al. Marked increase in leptospirosis infections in humans and dogs in the Netherlands, 2014. Eurosurveillance [Internet]. 2016 Apr 28 [cited 2021 Apr 7];21(17). Available from: https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30211
5. Bourhy P. DIAGNOSTIC, SURVEILLANCE ET EPIDEMIOLOGIE DE LA LEPTOSPIROSE EN FRANCE / DIAGNOSIS, SURVEILLANCE, AND EPIDEMIOLOGY OF LEPTOSPIROSIS IN FRANCE. :7.
6. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis. 2003 Dec;3(12):757–71.
7. Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM, Bruce M, Bolin CA, Austin CC, et al. Outbreak of Leptospirosis among Triathlon Participants and Community Residents in Springfield, Illinois, 1998. Clin Infect Dis. 2002 Jun 15;34(12):1593–9.
8. Lau CL, Smythe LD, Craig SB, Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? Trans R Soc Trop Med Hyg. 2010 Oct;104(10):631–8.
9. Munoz-Zanzi C, Groene E, Morawski BM, Bonner K, Costa F, Bertherat E, et al. A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970–2012. Rev Panam Salud Pública. 2020 Jul 15;44:1.
10. Mwachui MA, Crump L, Hartskeerl R, Zinsstag J, Hattendorf J. Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. Small PLC, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Sep 17;9(9):e0003843.
11. Abgueguen P, Delbos V, Blanvillain J, Chennebault JM, Cottin J, Fanello S, et al. Clinical aspects and prognostic factors of leptospirosis in adults. Retrospective study in France. J Infect. 2008 Sep;57(3):171–8.
12. Guillois Y, Bourhy P, Ayral F, Pivette M, Decors A, Aranda Grau JH, et al. An outbreak of leptospirosis among kayakers in Brittany, North-West France, 2016. Eurosurveillance [Internet]. 2018 Nov 29 [cited 2020 Aug 10];23(48). Available from: https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.48.1700848
13. Cacciapuoti B, Ciceroni L, Maffei C, Stanislao FD, Strusi P, Calegari L, et al. A WATERBORNE OUTBREAK OF LEPTOSPIROSIS. Am J Epidemiol. 1987 Sep;126(3):535–45.
14. Ramakrishnan R, Patel MS, Gupte MD, Manickam P, Venkataraghavan S. An institutional outbreak of leptospirosis in Chennai, South India. J Commun Dis. 2003 Mar;35(1):1–8.
15. Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus Leptospira through the prism of genomics. Martins EAL, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2019 May 23;13(5):e0007270.

16. Thibeaux R, Geroult S, Benezech C, Chabaud S, Soupé-Gilbert M-E, Girault D, et al. Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. Munoz-Zanzi C, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Feb 27;11(2):e0005414.
17. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. "Leptospira" and leptospirosis [Internet]. MediSci; 1999 [cited 2020 Oct 13]. Available from: https://research.monash.edu/en/publications/leptospira-and-leptospirosis
18. Adler B, editor. Leptospira and Leptospirosis [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015 [cited 2020 Oct 13]. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 387). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-45059-8
19. Goarant C. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. Res Rep Trop Med. 2016 Sep;Volume 7:49–62.
20. Schaechter M. Escherichia coli and Salmonella 2000: the View From Here. Microbiol Mol Biol Rev. 2001 Mar;65(1):119–30.
21. Loureiro AP, Martins G, Pinto P, Narduche L, Teixeira RC, Lilenbaum W. Usage of a selective media (EMJH-STAFF) in primary culturing of pathogenic leptospires from bovine clinical samples. Lett Appl Microbiol. 2015 Dec;61(6):603–6.
22. Chakraborty A, Miyahara S, Villanueva SYAM, Saito M, Gloriani NG, Yoshida S. A novel combination of selective agents for isolation of Leptospira species: Selective medium for Leptospira. Microbiol Immunol. 2011 Jul;55(7):494–501.
23. Huang K. A comprehensive insight into bacterial virulence in drinking water using 454 pyrosequencing and Illumina high-throughput sequencing. Ecotoxicol Environ Saf. 2014;8.
24. Chang SL, Buckingham M, Taylor MP. Studies on Leptospira Icterohaemorrhagiae: IV. Survival in Water and Sewage: Destruction in Water by Halogen Compounds, Synthetic Detergents, and Heat. J Infect Dis. 1948 May 1;82(3):256–66.
25. Andre-Fontaine G, Aviat F, Thorin C. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic Leptospira spp. in Fresh Water. Curr Microbiol. 2015 Jul;71(1):136–42.
26. Bierque E, Soupé-Gilbert M-E, Thibeaux R, Girault D, Guentas L, Goarant C. Leptospira interrogans Retains Direct Virulence After Long Starvation in Water. Curr Microbiol. 2020 Oct;77(10):3035–43.
27. Ahmed A, Engelberts MFM, Boer KR, Ahmed N, Hartskeerl RA. Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic Leptospira Species in Clinical Materials. Bereswill S, editor. PLoS ONE. 2009 Sep 18;4(9):e7093.
28. Podgoršek D, Ružić-Sabljić E, Logar M, Pavlović A, Remec T, Baklan Z, et al. Evaluation of real-time PCR targeting the lipL32 gene for diagnosis of Leptospira infection. BMC Microbiol. 2020 Dec;20(1):59.
29. Stoddard RA, Gee JE, Wilkins PP, McCaustland K, Hoffmaster AR. Detection of pathogenic Leptospira spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;9.
30. Mohd Ali MR, Mohd Safee AW, Ismail NH, Abu Sapian R, Mat Hussin H, Ismail N, et al. Development and validation of pan- Leptospira Taqman qPCR for the detection of Leptospira spp. in clinical specimens. Mol Cell Probes. 2018 Apr;38:1–6.
31. Levett PN. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. J Med Microbiol. 2005 Jan 1;54(1):45–9.

32. Gökmen TG, Soyal A, Kalayci Y, Önlen C, Köksal F. COMPARISON OF 16S rRNA-PCR-RFLP, LipL32-PCR AND OmpL1-PCR METHODS IN THE DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS. Rev Inst Med Trop São Paulo [Internet]. 2016 [cited 2020 Jan 2];58(0). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652016005000248&lng=en&tlng=en
33. Slack AT, Symonds ML, Dohnt MF, Smythe LD. [No title found]. BMC Microbiol. 2006;6(1):95.
34. Palaniappan RUM, Chang Y-F, Chang C-F, Pan MJ, Yang CW, Harpending P, et al. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. Mol Cell Probes. 2005 Apr;19(2):111–7.
35. Casanovas-Massana A, Pedra GG, Wunder EA, Diggle PJ, Begon M, Ko AI. Quantification of Leptospira interrogans Survival in Soil and Water Microcosms. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2018 Jun 18 [cited 2020 Oct 13];84(13). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6007094/
36. Roussel C, Galia W, Leriche F, Chalancon S, Denis S, Van de Wiele T, et al. Comparison of conventional plating, PMA-qPCR, and flow cytometry for the determination of viable enterotoxigenic Escherichia coli along a gastrointestinal in vitro model. Appl Microbiol Biotechnol. 2018 Nov;102(22):9793–802.
37. Ellinghausen HC, Mccullough WG. NUTRITION OF LEPTOSPIRA POMONA AND GROWTH OF 13 OTHER SEROTYPES: FRACTIONATION OF OLEIC ALBUMIN COMPLEX AND A MEDIUM OF BOVINE ALBUMIN AND POLYSORBATE 80. Am J Vet Res. 1965 Jan;26:45–51.
38. Johnson RC, Harris VG. Differentiation of Pathogenic and Saprophytic Leptospires I. Growth at Low Temperatures. J Bacteriol. 1967;94(1):27–31.
39. Abdulmawjood A, Roth S, Bülte M. Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of Escherichia coli O157 by polymerase chain reaction. Mol Cell Probes. 2002 Oct;16(5):335–9.
40. Wurtzer S, Prevost B, Lucas F, Moulin L. Detection of enterovirus in environmental waters: A new optimized method compared to commercial real-time RT-qPCR kits. J Virol Methods. 2014 Sep 4;209.
41. Karim MR, Fout GS, Johnson CH, White KM, Parshionikar SU. Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus. J Virol Methods. 2015 Jul;219:51–61.
42. Coudray-Meunier C, Fraisse A, Martin-Latil S, Guillier L, Perelle S. Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR. BMC Microbiol. 2013;13(1):216.
43. Prevost B, Goulet M, Lucas FS, Joyeux M, Moulin L, Wurtzer S. Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. Water Res. 2016 Mar;91:68–76.
44. Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD, Camper AK. Use of Propidium Monoazide for Live/Dead Distinction in Microbial Ecology. Appl Environ Microbiol. 2007 Aug 15;73(16):5111–7.
45. Podgoršek D, Ružić-Sabljić E, Logar M, Pavlović A, Remec T, Baklan Z, et al. Evaluation of real-time PCR targeting the lipL32 gene for diagnosis of Leptospira infection. BMC Microbiol. 2020 Dec;20(1):59.
46. Pérez LJ, Lanka S, DeShambo VJ, Fredrickson RL, Maddox CW. A Validated Multiplex Real-Time PCR Assay for the Diagnosis of Infectious Leptospira spp.: A Novel Assay for the

Detection and Differentiation of Strains From Both Pathogenic Groups I and II. Front Microbiol. 2020 Mar 20;11:457.
47. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin Chem. 2009 Apr 1;55(4):611–22.
48. Virto R, Mañas P, Álvarez I, Condon S, Raso J. Membrane Damage and Microbial Inactivation by Chlorine in the Absence and Presence of a Chlorine-Demanding Substrate. Appl Environ Microbiol. 2005 Sep;71(9):5022–8.
49. Casanovas-Massana A, Pedra GG, Wunder EA, Diggle PJ, Begon M, Ko AI. Quantification of Leptospira interrogans Survival in Soil and Water Microcosms. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2018 Jun 18 [cited 2020 Oct 13];84(13). Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6007094/
50. Fukunaga M, Mifuchi I. Unique organization of Leptospira interrogans rRNA genes. J Bacteriol. 1989;171(11):5763–7.
51. Mizozoe, Otaki, Aikawa. The Mechanism of Chlorine Damage Using Enhanced Green Fluorescent Protein-Expressing Escherichia coli. Water. 2019 Oct 16;11(10):2156.
52. Bridges DF, Lacombe A, Wu VCH. Integrity of the Escherichia coli O157:H7 Cell Wall and Membranes After Chlorine Dioxide Treatment. Front Microbiol. 2020 May 15;11:888.
53. Cho M, Kim J, Kim JY, Yoon J, Kim J-H. Mechanisms of Escherichia coli inactivation by several disinfectants. Water Res. 2010 Jun;44(11):3410–8.
54. Kazama S, Otaki M. Quantitative Analysis of the Inactivation Mechanisms of Escherichia coli by a Newly Developed Method Using Propidium Monoazide. J Water Environ Technol. 2013;11(6):507–17.
55. Xu L, Zhang C, Xu P, Wang XC. Mechanisms of ultraviolet disinfection and chlorination of Escherichia coli: Culturability, membrane permeability, metabolism, and genetic damage. J Environ Sci. 2018 Mar;65:356–66.
56. Chang SL, Buckingham M, Taylor MP. Studies on Leptospira Icterohaemorrhagiae: IV. Survival in Water and Sewage: Destruction in Water by Halogen Compounds, Synthetic Detergents, and Heat. J Infect Dis. 1948 May 1;82(3):256–66.
57. Barragan VA, Mejia ME, Trávez A, Zapata S, Hartskeerl RA, Haake DA, et al. Interactions of Leptospira with Environmental Bacteria from Surface Water. Curr Microbiol. 2011 Jun;62(6):1802–6.
58. Thibeaux R, Geroult S, Benezech C, Chabaud S, Soupé-Gilbert M-E, Girault D, et al. Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. Munoz-Zanzi C, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Feb 27;11(2):e0005414.
59. Prevost B, Lucas FS, Goncalves A, Richard F, Moulin L, Wurtzer S. Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. Environ Int. 2015 Jun;79:42–50.
60. Waggoner JJ, Balassiano I, Abeynayake J, Sahoo MK, Mohamed-Hadley A, Liu Y, et al. Sensitive Real-Time PCR Detection of Pathogenic Leptospira spp. and a Comparison of Nucleic Acid Amplification Methods for the Diagnosis of Leptospirosis. Lin B, editor. PLoS ONE. 2014 Nov 7;9(11):e112356.
61. Gensberger ET, Polt M, Konrad-Köszler M, Kinner P, Sessitsch A, Kostić T. Evaluation of quantitative PCR combined with PMA treatment for molecular assessment of microbial water quality. Water Res. 2014 Dec;67:367–76.

62. Golpayegani A, Douraghi M, Rezaei F, Alimohammadi M, Nodehi RN. Propidium monoazide–quantitative polymerase chain reaction (PMA-qPCR) assay for rapid detection of viable and viable but non-culturable (VBNC) Pseudomonas aeruginosa in swimming pools. J Environ Health Sci Eng. 2019 Jun;17(1):407–16.
63. Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. Int J Infect Dis. 2008 Jul;12(4):351–7.
64. Bouscaren N, Benoit de Coignac C, Lastère S, Musso D, Teissier Y, Formont J, et al. Leptospirosis in French Polynesia: 11 years of surveillance data, 2007–2017. New Microbes New Infect. 2019 May;29:100518.
65. Joshi YP, Kim E-H, Cheong H-K. The influence of climatic factors on the development of hemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis during the peak season in Korea: an ecologic study. BMC Infect Dis. 2017 Dec;17(1):406.

Conclusion du chapitre 1

Ce premier chapitre a tout d'abord permis de mettre en œuvre une qPCR fonctionnant en triplex et basée sur la technologie Taqman. Cette méthode de détection a pour but de détecter et quantifier l'ensemble des leptospires (pathogènes et saprophytes) par l'utilisation du gène *rrs* et d'en distinguer uniquement les espèces pathogènes, par l'amplification du gène *lipL32*. Un contrôle d'amplification compétitif interne a également été ajouté à l'analyse pour évaluer l'inhibition de l'amplification résultant des échantillons environnementaux. Les gènes *rrs* et *lipL32* étant fortement exprimés chez les leptospires, une activité résiduelle de l'étape de RT a été maintenue, conférant ainsi une meilleure sensibilité de la méthode. L'amplification de l'intégralité de l'ADN d'intérêt présent dans l'échantillon rend impossible la distinction entre les cellules vivantes et mortes, ce qui entraîne une surestimation potentielle de la concentration bactérienne et du risque d'infection. C'est pourquoi, cette méthode a été couplée à un test d'intégrité bactérienne utilisant le PMAxx qui empêche l'amplification de l'ADN libre ou celui des cellules dégradées et n'amplifie uniquement que l'ADN de bactéries potentiellement viables (Casanovas-Massana et al., 2018b) pour réduire la surestimation potentielle. Cependant, l'usage de cet intercalant n'est pertinent que dans certaines conditions expérimentales, notamment lorsque les dégradations ciblent la paroi du microorganisme. Testées sur différents traitements d'inactivation, la qPCR d'intégrité n'a pas donné des résultats pertinents lors de la chloration et lors de l'exposition aux UV. Virto et coll. ont étudié l'impact de la chloration sur différentes espèces bactériennes : *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia enterocolitica* et *Escherichia coli*. Dans leur étude, les concentrations en chlore induisant la perméabilisation de la membrane étaient très supérieures à celles inactivant les bactéries ; démontrant qu'il n'existe pas de relation entre la perméabilisation de la membrane par le chlore et la mort cellulaire (Virto et al., 2005). Concernant l'exposition aux UV, l'inefficacité de la PMAqPCR dans ce cadre a déjà été mentionnée dans l'étude de Prevost et coll. sur la survie des AdV 41 et du CV-B2 (Prevost et al., 2016).

Exposées à différents traitements d'inactivation, la survie des souches pathogènes et saprophytes de leptospires a été étudiée par différentes techniques moléculaires et de culture. Une plus grande quantité de leptospires a été identifiée par la méthode moléculaire. Différents facteurs tels que l'agrégation en colonie des bactéries, la multiplication du génome avant la séparation des cellules, le nombre de bactéries viables mais non cultivables (bien que cet état n'ait pas été décrit chez les leptospires jusqu'à maintenant) et les multiples copies du gène *rrs* chez les leptospires peuvent expliquer cette différence entre méthode moléculaire et culture (Fukunaga and Mifuchi, 1989) (Figure 34).

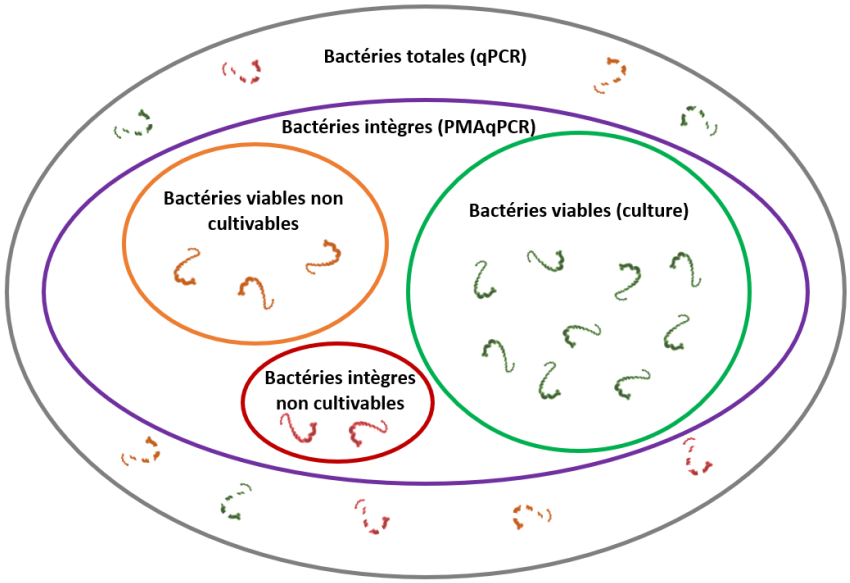


Figure 34. Représentation des différents états possibles des leptospires : différenciation entre les bactéries intègres, viable et cultivables.

Contrairement aux autres traitements d'inactivation qui n'ont montré aucune différence significative entre espèces pathogène et saprophyte, l'inactivation thermique a mis en évidence une résistance plus élevée de l'espèce pathogène ce qui est cohérent avec leur maintien à une température corporelle des mammifères hôtes et probablement leur implication dans l'infection humaine.

Testée sur les traitements d'inactivation notre méthode a été éprouvée sur des échantillons environnementaux afin d'établir la présence et l'intégrité de telles bactéries dans les eaux de surface parisiennes. Dans ces prélèvements, la concentration médiane était d'environ 10^3 éq.bactérie/L.

Cette étude a donc confirmé l'importance de l'analyse de la présence des leptospires viables dans l'environnement et la mesure de l'efficacité des traitements. En plus de fournir un gain de temps et de limiter la surestimation, l'association entre PMAxx et la RT-qPCR semble être une solution pour détecter les faibles niveaux de pathogènes présents dans les matrices environnementales (Gensberger et al., 2014b). Ces résultats pourraient être considérés pour établir des seuils d'alerte, conduisant à des restrictions d'accès, après des événements favorisant la contamination bactérienne (fortes pluies, inondations, etc.). Cette preuve de concept doit permettre de répondre à d'autres questions, telles que l'influence des variations saisonnières ou l'effet des campagnes de lutte contre les rongeurs. L'impact de divers paramètres anthropique sur la dynamique des leptospires doit également être évaluée.

Chapitre 2 : Diversité des leptospires présentes dans les eaux de surface et chez les rongeurs à Paris : détection par une qPCR d'intégrité et comparaison par séquençage NGS

Introduction

De nombreux organismes (bactéries, virus, protozoaires, algues, champignons, etc.) retrouvés dans l'eau de surface sont des agents microbiologiques pouvant être impliqués dans la transmission de maladies plus au moins graves (Bultman et al., 2013). L'engouement pour les activités aquatiques grandissant, l'étude des pathogènes séjournant dans ces eaux parait essentiel afin d'évaluer le risque sanitaire. Parmi ces maladies, l'OMS et l'OIE considèrent que la leptospirose semble être la zoonose la plus répandue à travers le globe de par la possibilité de tous les mammifères à devenir des réservoirs (Flores - Castro, 2010). Elle infecte 1 million de cas et entraînant 60 000 décès chaque année (Costa et al., 2015). Depuis quelques années, une augmentation des cas de leptospirose humaine a été observée dans différents pays d'Europe (Guillois et al., 2018).

Ces bactéries sont présentes dans de nombreux réservoirs symptomatiques ou asymptomatiques et se retrouvent excrétées dans l'environnement où elles vont contaminer l'eau et le sol. Elles peuvent y survivre plusieurs semaines en fonction de la composition de l'environnement naturel et les facteurs climatiques (Bierque et al., 2020b; Soo et al., 2020; Thibeaux et al., 2017a). Les leptospires pathogènes peuvent infecter l'homme et l'animal par contact direct ou indirect avec des animaux porteurs ou par de l'eau souillée. Dans les zones rurales, les réservoirs d'animaux infectés peuvent être des animaux domestiques ou d'élevage (Lee et al., 2017). Dans les zones urbaines, les animaux sauvages et principalement les rats sont les vecteurs de la maladie (Pui et al., 2017). L'espèce *Rattus norvegicus* est la plus impliquée dans cette infection car elle est ubiquitaire dans le monde entier et elle héberge des sérogroupes pathogènes (Icterohaemorrhagiae, Copenhageni ou Ballum) (Esfandiari et al., 2015; Goarant, 2016).

Dans les pays de l'UE, l'exposition professionnelle représente 20% à 50% des cas de leptospirose humaine (Jansen et al., 2005; Taseva et al., 2007). En France, une seule étude a analysé le contexte de survenue de la maladie : 42% d'infections à la suite de pratiques de sports nautiques, 19% résultant d'un contact avec des eaux stagnantes (étangs, marécages, puits, points d'eau) et 19% lors d'activités professionnelles (Abgueguen et al., 2008). Maladie professionnelle mais également récréative, l'exposition à l'eau semble être le principal facteur de risque (Mwachui et al., 2015). L'exposition à ces pathogène dans l'environnement fluctue selon la région géographique (Goarant, 2016) et dépend du

climat, des événements climatiques inhabituels (Chadsuthi et al., 2021) et des propriétés du sol (Trueba et al., 2004; Vinod Kumar et al., 2015).

A l'interface homme-animal-écosystème et afin de protéger la santé, l'identification et le contrôle des sources de leptospires sont essentiels pour comprendre le mécanisme de contamination humaine, (notamment lors de la pratique de sports nautiques) et ainsi mettre en place une régulation du réservoir ou des moyens de prévention.

Les objectifs de ce chapitre sont d'une part d'étudier la présence et de quantifier les leptospires présentes au sein de deux grandes matrices que sont l'environnement et l'animal en utilisant les outils développés dans le chapitre précédent. Dans un second temps, l'objectif est d'étudier la diversité des espèces de leptospires retrouvées dans ces échantillons afin d'établir s'il existe, entre elles, des similarités. Ce chapitre se présente sous la forme d'un article scientifique.

High frequency analysis of *Leptospira* in surface water and the relationship with rat contamination in an urbanized area

Elise RICHARD[1,2], Pascale BOURHY[2], Jacques GESLIN[1], Aude LALIS[3], Benoît PISANU[4], Mathieu PICARDEAU[2], Sébastien WURTZER[1] & Laurent MOULIN[1]

[1]Eau de Paris, DRDQE, 33 Avenue Jean Jaurès, 94200 Ivry-Sur-Seine, France

[2]Institut Pasteur, Unité Biologie des Spirochètes, 28 rue du docteur Roux, 75724 Paris, France

[3]Museum National d'Histoire Naturelle, Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité, 57 rue Cuvier, C75005 Paris, France

[4]Office Français de la Biodiversité, UMS Patrimoine Naturel OFB/MNHN/CNRS, 36 rue Geoffroy Saint-Hilaire, CP41 75005 Paris, France

Corresponding author: sebastien.wurtzer@eaudeparis.fr

ABSTRACT

Leptospirosis is a neglected disease, caused by pathogenic bacteria, *Leptospira*, and with a global distribution. Rodents were thought to be the main vector of human leptospirosis by releasing *Leptospira* in the environment. Population can be infected by environmental water during recreational or professional water activities. Study of these bacteria is complex and leptospirosis burden depended on the dynamic relationships between humans, animals and the environment.

To describe *Leptospira* prevalence, this project monitored from 2018 to 2020 the concentration of this bacteria in surface water and in rats kidneys in Paris, using an integrity qPCR method. If all surface water samples contain saprophytic *Leptospira* the prevalence of pathogenic *Leptospira* ranged from 40% (2018) up to an absence of detection (2020). In the same time, we observed that about 15% of rats carried *Leptospira* but the detection was highly dependent on the rodent trapping method, since the used trap method is destructive and could induce an underestimation of positives rats.

The sequencing of 16S rRNA gene by NGS technology was achieved to determine the *Leptospira* species diversity and compare species isolated from surface water and species that potentially be spread by rodents. This sequencing approach also confirmed that urban rats carried pathogenic species of *Leptospira*.

Quantification of *Leptospira* and identification of the animal reservoir of pathogenic species in urban area will be helpful to understand the eco-epidemiology of leptospirosis and to establish prevention and intervention strategies, for organizing aquatic sport events in these urban areas.

Keywords: *Leptospira*, multiplex integrity qPCR, bathing, environment, NGS sequencing, rats, Olympic Games, Paris

INTRODUCTION

Bacteria, viruses, protozoa, seaweed, fungi and many other microbes are all microbiological organisms found in water and some are involved in disease transmission. Although mostly of these microorganisms are non-pathogenic for human, an infectious minority could pose a threat to population health. For some of these pathogens, low doses (few microorganisms ingested) could be sufficient to have consequences, for example *Salmonella* (Bultman et al., 2013) or norovirus. Major zoonosis are anthrax, rabies, tuberculosis, plague, yellow fever or influenza. Among these diseases, WHO (World Health Organization) and IOE (World Organization for Animal Health) consider leptospirosis as the most widespread zoonosis worldwide (Flores - Castro, 2010) infecting 1 million cases with 60.000 deaths each year (Costa et al., 2015). This global zoonosis occurs all around the world, with highest incidences reported in tropical regions but developed countries including those in Europe (Pijnacker et al., 2016) are also observing an increase of reported cases in the past years.

Leptospira are bacteria whose genus is composed by over 60 species, organized into 4 subclades, P1, P2, S1 and S2 (Vincent et al., 2019). S1 and S2 are Saprophytes, non-infectious species that can multiply in the environment, whereas P1 and P2 are pathogens and mostly isolated in both humans or animals and, occasionally in the environment (Thibeaux et al., 2017a). In most human infection, leptospirosis could vary from flu syndrome (fever, myalgia or headache) to multisystem disorder (with ictero-haemorrhagic syndrome) for 20% of cases. Interest on *Leptospira* increase due to the change in hosts reservoir linked with climate change (Costa et al., 2015; Thibeaux et al., 2018a). Humans are found to be an occasional host in a cycle involving wild and domestic animals. After being disseminated through urine of infected animal (Goarant, 2016). *Leptospira* contaminate water and soil where they can survive from a few weeks to months, according to the composition of natural environment and climatic factors (Bierque et al., 2020b; Lall et al., 2016; Soo et al., 2020; Thibeaux et al., 2017a). In rural areas sensitive animal reservoir could be domestic or farmed animals ("SEROPOSITIVITY TO LEPTOSPIROSIS IN DOMESTIC RESERVOIRS AND DETECTION OF Leptospira spp," 2011). In urban areas, wild animals mainly rodents and more specifically rats, are considered as the main vector of spread (Pui et al., 2017) and are asymptomatic. Rattus norvegicus is the rat predominant species involved in the *Leptospira* transmission, and was shown to carry serovars involved in human infection: Icterohaemorrhagiae (Goarant, 2016), Pyrogenes (Klement-Frutos et al., 2020). Study comparing serovars identified in human leptospirosis and in animal wildlife reservoirs highlights the link between human infection and contamination of water by rodents (Gay et al., 2014; Thayaparan et al., 2015).

Contaminated water exposure appeared to be a major risk factor (Miller et al., 2021; Mwachui et al., 2015). For example, in the 2000's in Asia, floods (Chadsuthi et al., 2021) caused increase in leptospirosis

after contact, bathing and drinking of contaminated water (Karande, 2003; Kouadio et al., 2012). Leptospirosis is not simply a tropical waterborne disease (Agampodi et al., 2014; Boland et al., 2004; Gelman et al., 2006) and affect : worker (veterinarians, farmers, sewer workers, etc.) and recreational users (bathers, kayaker, etc.) (Bharti et al., 2003; Morgan et al., 2002; Soo et al., 2020). Due to the expansion of outdoor activities, lot of countries observe the expansion of leptospirosis (Tilahun et al., 2013), mainly when recreational risk factors are implicated. In EU countries, occupationally-linked cases represent between 30% and 50% of human leptospirosis (Abgueguen et al., 2008; Jansen et al., 2005; Taseva et al., 2007). In France, a study conducted during 10 years (from 1995 to 2005) on 62 patients, showed that 42% of them became infected after water sport practices, 19% resulting from contact with backwaters (ponds, swamps, wells, water holes) and 19% during professional activities (Abgueguen et al., 2008). Recreational water activities are increasingly popular, and, for example, a recent study showed a cluster of 14 kayakers suffered from leptospirosis symptoms after water exposure (Guillois et al., 2018). During contaminated water or soil exposure, skins or mucosal lesions enable *Leptospira* infection (Faine et al., 1999) throughout these outdoor activities (Sejvar et al., 2003). In freshwater bathing area, current French regulations are based on monitoring only two microbiological parameters, Escherichia coli bacteria and intestinal enterococci which are indicators of faecal contamination (European directive 2006/7/CE). In addition to other non-biological parameters, their analysis, ensures compliance with the minimum quality required for the areas to be opened.

Floods increased this risk by exposing human and animals to *Leptospira* that were flushed in their environment. Exposure to pathogenic *Leptospira* in the environment fluctuate according to geographical region (Goarant, 2016) and depended on the climate and soil properties (Trueba et al., 2004; Vinod Kumar et al., 2015). Some studies analyzed the link between rainfall, flood and *Leptospira* prevalence. Significant negative relationship was established between *Leptospira* detection and rainfall data in recreational water (Chadsuthi et al., 2021; Dzulaikha et al., 2018). The survival time of pathogenic *Leptospira* in aquatic environments is linked to the presence of organic matter or biofilms could increase (Barragan et al., 2011a; Thibeaux et al., 2017a). Bacterial resistance in the environment may be linked to their infectivity. Further studies on the resistance mechanisms of *Leptospira* in the environment can provide insights about virulence or the differences between strains (Thibeaux et al., 2020).

If it’s now well described that (Bouscaren et al., 2019b; Joshi et al., 2017a) these bacteria can have a high impact on the population health in endemic areas (39) or during specific seasons, little is known about the environmental concentration in European urbanized region. Leptospirosis constitute therefore a significant human-animal-ecosystem interface (Petrakovsky et al., 2014) in which

highlighting and understanding the link between the three domains as well as the interactions that link them together are overriding.

In a One-Health approach, we aim to explore the link through the cross-analysis of environmental *Leptospira* and those isolated in kidney of rats caught in metropolitan France. Knowledge of *Leptospira* contamination in surface water could be helpful for the possibility to organize swimming contest in the Seine river for the Olympics Games in 2024. In order to understand *Leptospira* dynamic, environmental water samples and kidneys of rats were firstly analyzed by a multiplex integrity qPCR. This sensible qPCR targeted rrs (16S) and LipL32 genes and was described in a previous publication (Richard et al., 2021).

Sampling campaigns were conducted from 2018 to 2020, with more than one thousand analyses. One hundred and ninety-three kidneys of rats were trapped throughout Paris and their kidneys were analyzed. A NGS approach was then applied to compare the diversity of *Leptospira* species uncovered in environmental *Leptospira* with species isolated from rats.

MATERIALS AND METHODS

Environmental samples and kidneys of rats collections

Surface water samples were collected in Paris (along the Seine river), including an area which includes a controlled bathing section during the summer period (in the Bassin de la Villette on the Ourcq canal). Hydraulic dynamic of these two rivers was different: the flow of Seine river was about 500 m^3/s, while the flow on the Ourcq canal was about 2 m^3/s and the water were quite stagnant. The Ourcq canal flowed into the Seine at the SP4 sampling point. Samples were collected between the surface and up to 30 cm deep, using a telescopic pole allowing collection up to 1m from the banks. Environmental analysis on surface water were continuously carried out from June 2018 to September 2020. More than one hundred surface-water samples were analyzed during this period. During the summer period (June to September), all samples were taken once a week. The summer periods (from June to September 2018, 2019 and 2020) count eighty percent of the samples (822/1031) (Table S1). The rest of the year, they were taken once a month in the Seine and no samples were taken in the bathing area. Samples were analyzed within 24 h of collection. The Ourcq canal, mainly the supervised artificial swimming pools area represented almost a quarter of samples (251/1031).

Rats were caught in ethanol traps (Ekomille®) dispersed throughout Paris or thanks to the use of ferret. The capture with ferret was based on the sending of ferrets in the underground galleries built by the rats, forcing them to come out to the surface where they were caught alive. Kidneys of rats were dissected in the laboratory of the National Natural History Museum (Paris 5°) according to the animal

experimentation protocol from the MNHN. Sample were stored at -20°C prior to extraction and analysis by molecular biology at the Eau de Paris laboratory.

All samples (water and rats) were then extracted and analyzed by homemade qPCR. The localization of sampling points was referenced in Figure 1.

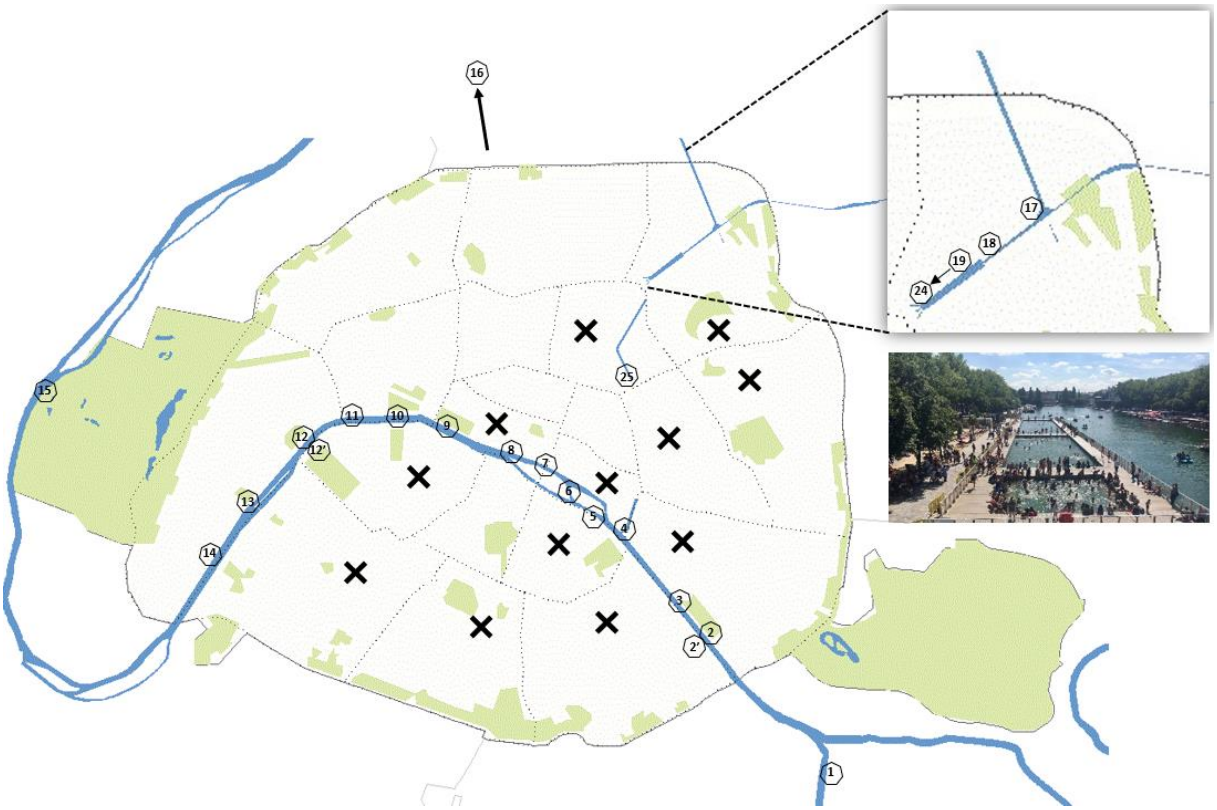


Figure 1. Sampling sites in Paris : surface water and rats. Heptagon with numbers represent samples on surface water on right bank or left bank (') : on the Seine river (1-16), on the Ourck channel (17-25). Samples 20 to 24 correspond to the supervised swimming area. Black crosses refer to the localisation of the rat traps.

Surface water concentration

A volume of 500 mL of surface water samples was concentrated by a first centrifugation at 8,000 x g during 30 min. The 15 mL of pellet was centrifugated at 8,000 x g during 15 min. The final centrifugation (8,000 x g, 15 min) concentrated the 2mL of pellet to 200 µL and then was treated with 2µL PMAxx (as described in part Propidium monoazide treatments).

Propidium monoazide treatments

Before DNA extraction, samples were incubated with propidium monoazide (PMAxx) to ensure bacterial integrity (Karim et al. 2015; Coudray-Meunier et al. 2013; Prevost et al. 2016). The PMAxx solution was diluted in molecular grade water to obtain a final concentration of 10 mM and aliquots were stored at -20°C. Based on pilot studies (data not shown), the PMAxx dye was used at a final concentration of 0.1 mM to pre-treat the samples. After mixing, samples were incubated on ice, in the

dark, for 30 min. Photo-activation was performed for 15 min using the PhaST Blue system (IUL, Barcelona, Spain). In this study, PMAxx-qPCR was also called integrity qPCR.

Extraction

Kidneys biopsies were crushed with glass beads and 1X PBS using Bead Mill 24 homogeniser® (Fisherbrand™). Due to complex matrix, all samples (water and kidneys) were pre-treated through over-binding lysis step (Qiagen®).

For kidneys of rats, DNA was extracted using the Q1000 protocol with a QIAsymphony® DSP Virus/Pathogen Midi Kit (Qiagen) and the MagNA Pure Compact System (Roche®) for environmental monitoring. Nucleic acids were extracted from kidneys shred for an equivalent of 100 µL by elution into 50µL, according to the manufacturer's protocols.

PCR assays

Each PCR reaction was performed using the TaqMan ™ Fast Virus 1-Step Master Mix (#4444434). This amplification was performed in a 20-µL reaction volume using a ViiA 7 real-time PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA) in 96-well plates according to the protocol described in the previous scientific publication (Richard et al., 2021). An internal positive competitive amplification control (IPC) was used to evaluate the presence of PCR inhibitors. *Rss* gene (16S-F267 ; 16S-R336 ; 16S-P286), *LipL32* gene (16S-P286 ; LipL32-R298 ; LipL32-P188) and an IPC (LipL32_BACT-F1146 ; LipL32_BACT-R1215 ; BACT_P1172) were targeted in multiplex mode.

The thermal profile consisted of an initial denaturation step at 95°C for 20 s, followed by 45 cycles at 95°C for 5 s and 60°C for 30 s. Fluorescence were detected at the end of the elongation step.

IPC was added to the reaction mixture at 10^4 copies and detected using the IPC probe at 100 nM. Total Leptospira, pathogenic Leptospira, and IPC were targeted by different dyes: FAM, Yakima Yellow, and TAMRA, respectively.

Sequencing and analysis

The sequencing PCR for *Leptospira* was based on the rrs (16S) gene sequence alignment of 56 *Leptospira* species, including saprophytes and pathogens. DNA amplification on 16S gene was performed in Mastercycler® (Eppendorf) with Q5® High-fidelity DNA polymerase (New England BioLabs) using 16S–F(5'-CGGCGCGTCTTAAACATG-3') and 16S–R(5'-TCCGCCTACRCACCCTTTAC-3') primers.

Each sample is tagged with specific nucleotide markers to dissociate the corresponding reads from the data pool generated in a single sequencing run. Amplicon were cleaned by Agencourt AMPure XP

beads and quantified using an ultra-sensitive fluorescent nucleic acid stain for quantitating double-stranded DNA (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent). Samples normalized at 4.0 nM were pooled into a single library and diluted to 12 pM final concentration. Library was supplemented with PhiX control (5%) providing balanced fluorescent signals to improve the run quality.

Following the standard Illumina paired-end protocol, a 300-bp library was constructed for pooled and purified DNA samples. Sequencing was performed with the MiSeq V3 chemistry with 600 cycles following the manufacturer's protocol (Illumina). On average, from 13.2 Gb to 15 Gb of Illumina reads were produced (44-50 million paired-end reads). Data analysis and workflow execution were executed using the Galaxy Pasteur server. The FastQC tool git information about the quality of the sequencing data. Overrepresented or too low sequences and potential contaminants were removed with the fqCleaner tool. The Cutadapt tool removed indexes and adapters used during sequencing. Data transformed in fasta format (fastq2fasta) were compared with the sequences present on public databases (NCBI, Silva, etc.). The Pasteur blastall for NGS data program compared identical sequences present on NCBI. Depending on the alignment results, taxonomic information was associated with the sequences (get_taxonomy). Finally, the Count tool summed the sequences specific to each taxonomic assignment. This pipeline has been tested on DNA from well-known *Leptospira* species provided by the National Reference Center for Leptospirosis. Although this pipeline did not allow precise identification at species level, a reliable gathering of species according to their belonging to a subgroup has been established. Identification by sequencing was then done by OTUs corresponding to subgroups P1, P2, S1 and S2.

Statistical analysis with GraphPad software

GraphPad Prism software version 9 (GraphPad, La Jolla, CA) was used for statistical analysis. Normality of the distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test. Paired groups were tested using the nonparametric Kruskal-Wallis test that compares three or more unmatched groups. P-values < 0.05 were considered significant.

For the analysis of median concentration of *Leptospira*, a Lowess curve was applied to follow the trend of the data which were a bit jagged, using a medium curve (10 points in smoothing window) between fine structure and obscures detail of data.

To study the relationships between different parameters, correlation matrices were used and the correlation coefficient "r", quantified the direction and magnitude of correlation. This coefficient ranged from -1 for an inverse correlation to +1 for a perfect correlation.

The principal component analysis (PCA) was used to study the existence of correlation links between the presence of *Leptospira* and various biological or physicochemical parameters. PCA reproduced through different statistical tests the reduction of several variables of a set of data.

RESULTS

For the 16S gene targeting *Leptospira* spp., all samples were positives (1031) with median concentration of $5{,}98.10^3$ eq.bacteria/L. Results for each year were reported in table S1. Throughout the sampling campaigns, a significative difference on *Leptospira* spp. concentration was observed with p-value < 0.05 (0.0006 between 2018 and 2019, <0.0001 between 2018 and 2020 and 0.0198 between 2019 and 2020). These bacteria were mainly saprophytic in view of the low *lipL32* concentration found over the campaigns. Samples positives for both *Leptospira spp*. and pathogenic strains fell from 43% in 2018 (155/362), 0.7% in 2019 (3/403) to 0 in 2020 (Figure 2).

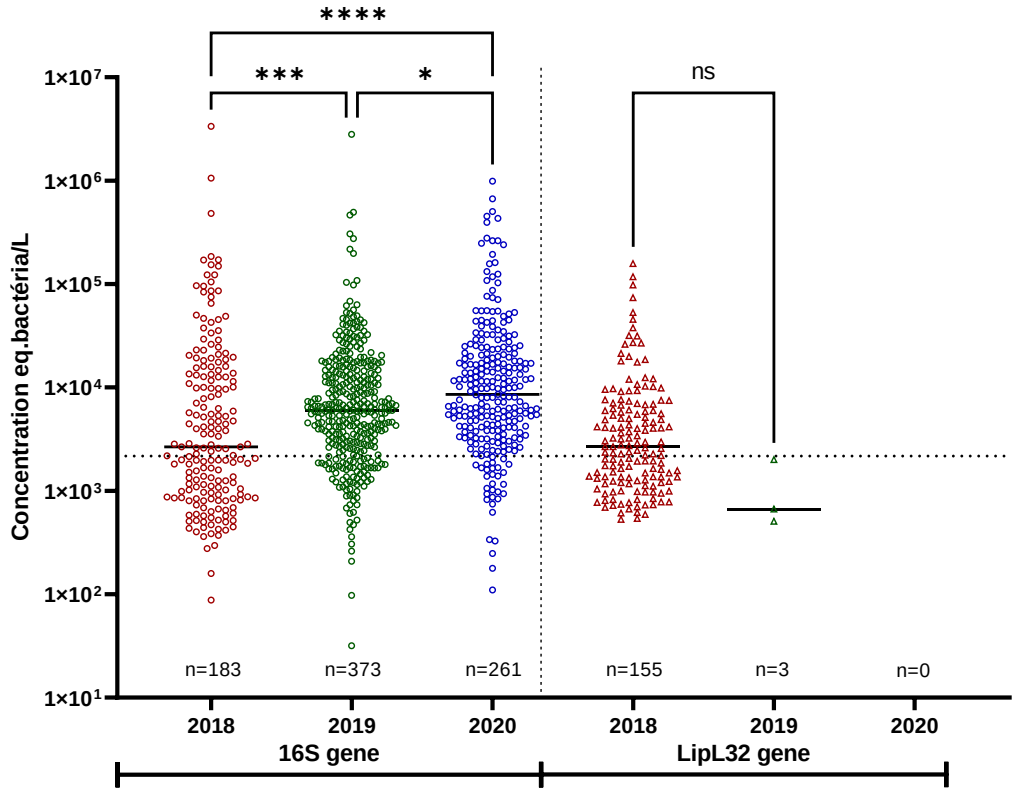


Figure 2. Leptospira concentration in surface-water samples from 2018 to 2020. Three sampling campaigns were described: 2018 (red), 2019 (green) and 2020 (red). Left side showed Leptospira spp. targeting the 16S gene (circle). Right side discriminated the pathogenic bacteria using the LipL32 gene (triangle). For 16S results, "n" represented only the number of quantified samples and not all positives samples, respectively 362 (2018), 403 (2019), 263 (2020).

Leptospira concentrations were analyzed depending on the watercourse of the Seine river and the bathing area, during 2018 and 2019 campaigns to observe potential source of contamination, or specific trends during the river course (Figure 3). The median concentration of *Leptospira spp*. and pathogenic *Leptospira* fluctuated between 10^3 and 10^4 eq.bacteria/L. For some sampling points, the concentration of total or pathogenic *Leptospira* were almost identical (SP4, SP6, SP13, SP18, SP23, SP24). Some other sampling points (SP8, SP9, SP22) were slightly dissimilar. *Leptospira* appeared to be ubiquitous all along the rivers and no area seemed to be free from *Leptospira*. Conversely, no contamination hotspot could be brought to light.

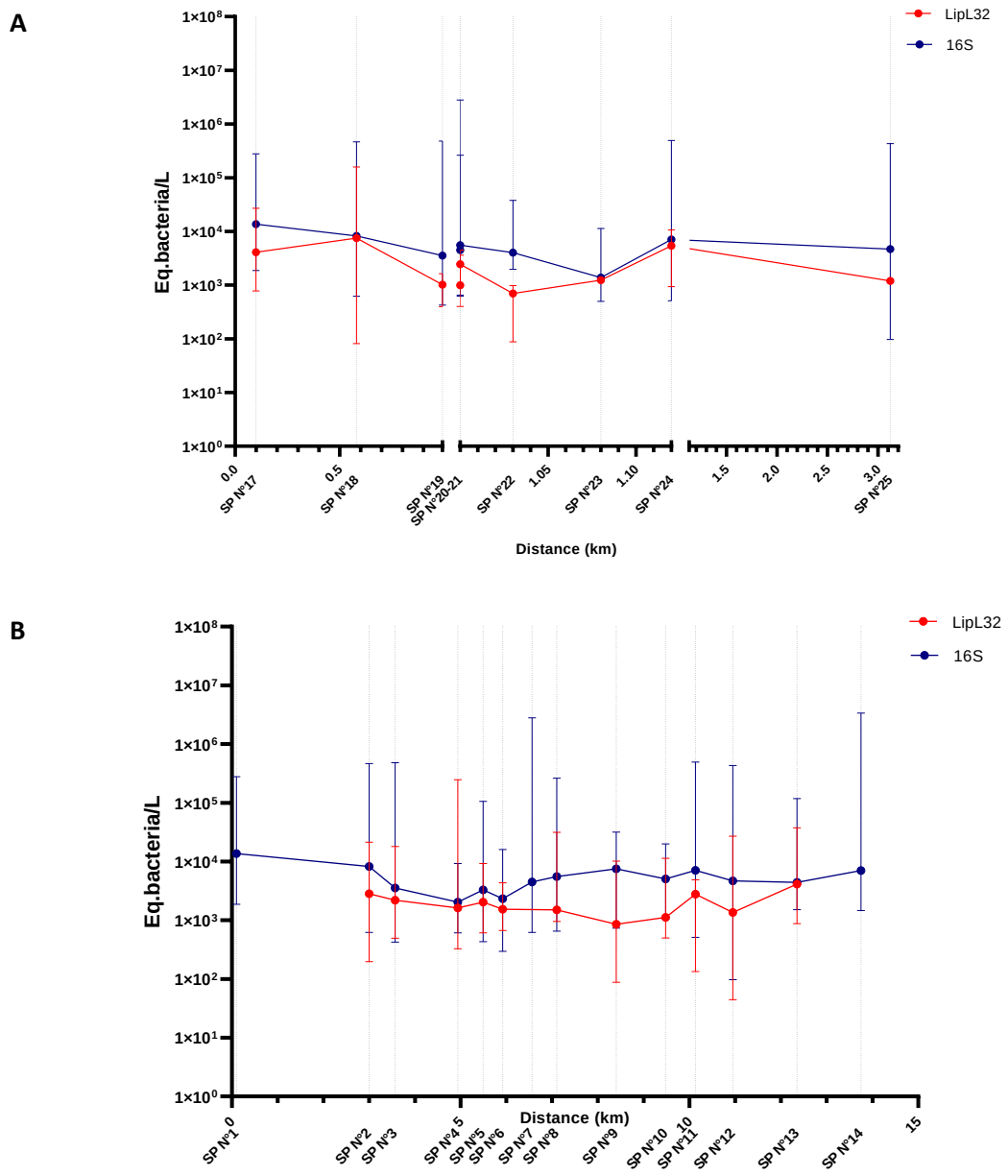


Figure 3. Monitoring of Leptospira concentration median along the bathing area (A) and along the Seine river (B) for campaigns in 2018 and 2019. Blue line and red line represented respectively Leptospira spp. and pathogenic Leptospira concentration median with error bars.

The seasonality of *Leptospira* spp. during the 3 years campaign and rainfall effect was studied along the various sampling points in the Seine river (Figure 4). No instantaneous impact seemed to appear between a heavy (> 50mm/day) or intermediate (> 20mm/day) rainfall and an increase in *Leptospira* concentration in surface waters. Downward trend was observed from June to October 2018 and from June to November 2019. Inversely, upward trend loomed from October 2018 to January 2019 and from December 2019 to April 2020. The pH of the surface water varied from 6.6 to 8.4 with an average value of 8.

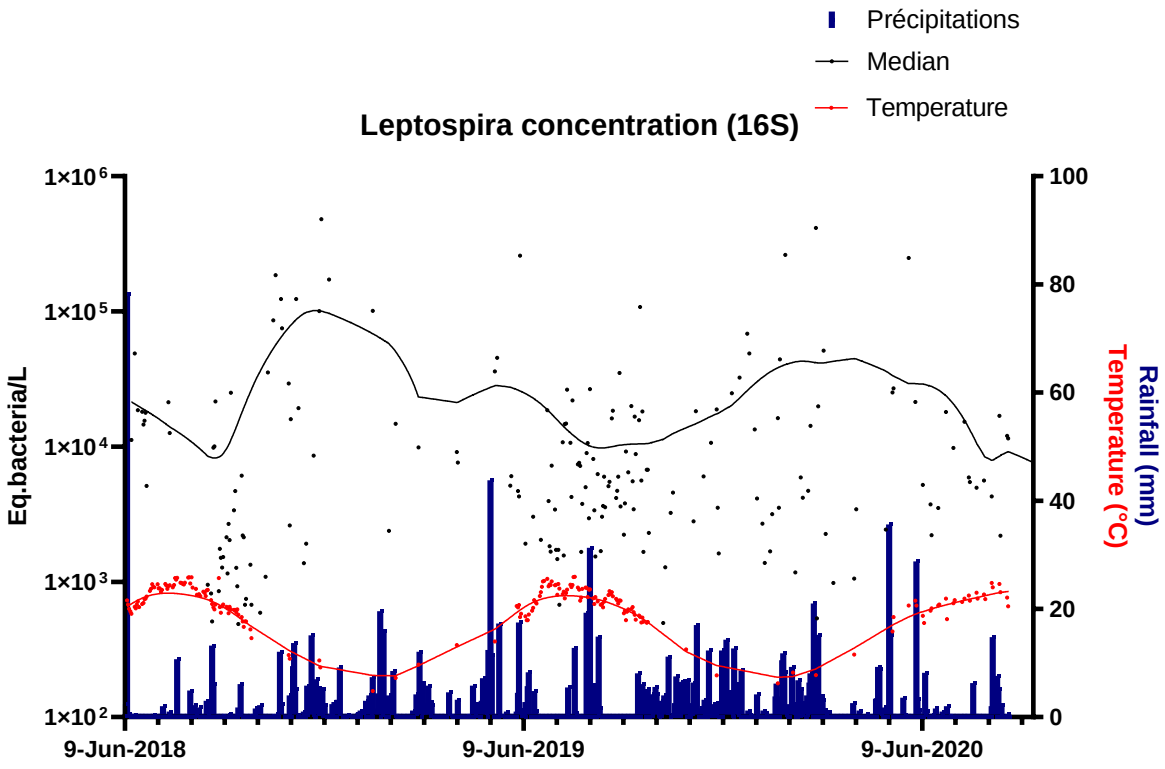


Figure 4. Quantification of Leptospira spp. (eq.bacteria/L) in Seine river, related to the rainfall (mm) from 2018 to 2020. The continuous lines (Lowess curves) referred to the median concentration of Leptospira (black) and to the median temperature (red) for all samples. Blue bar chart indicated rainfall detected at a meteorological station.

To study more precisely the existence of a correlation between rainfall in a temperate climate and *Leptospira* concentration in various sampling points, statistical analysis was performed. (Figure 5). Overall, no correlation was demonstrated between *Leptospira* concentration and rainfall. For most sample points, coefficient of correlation was considered as no significant (arbitrarily set at $r < 0.70$), except for a few exceptions. Positive correlations were observed in bathing area between rainfall and *Leptospira* spp. concentration (C) in SP19 (0.67) and with pathogenic *Leptospira* concentration (D) in

SP20 and SP21 (0.71 and 0.87 respectively). In the Seine river, rainfall was slightly negatively correlated with *Leptospira* spp. concentration (A) in SP15 (-0.70) and with pathogenic *Leptospira* concentration (B) in SP8 (-0.71).

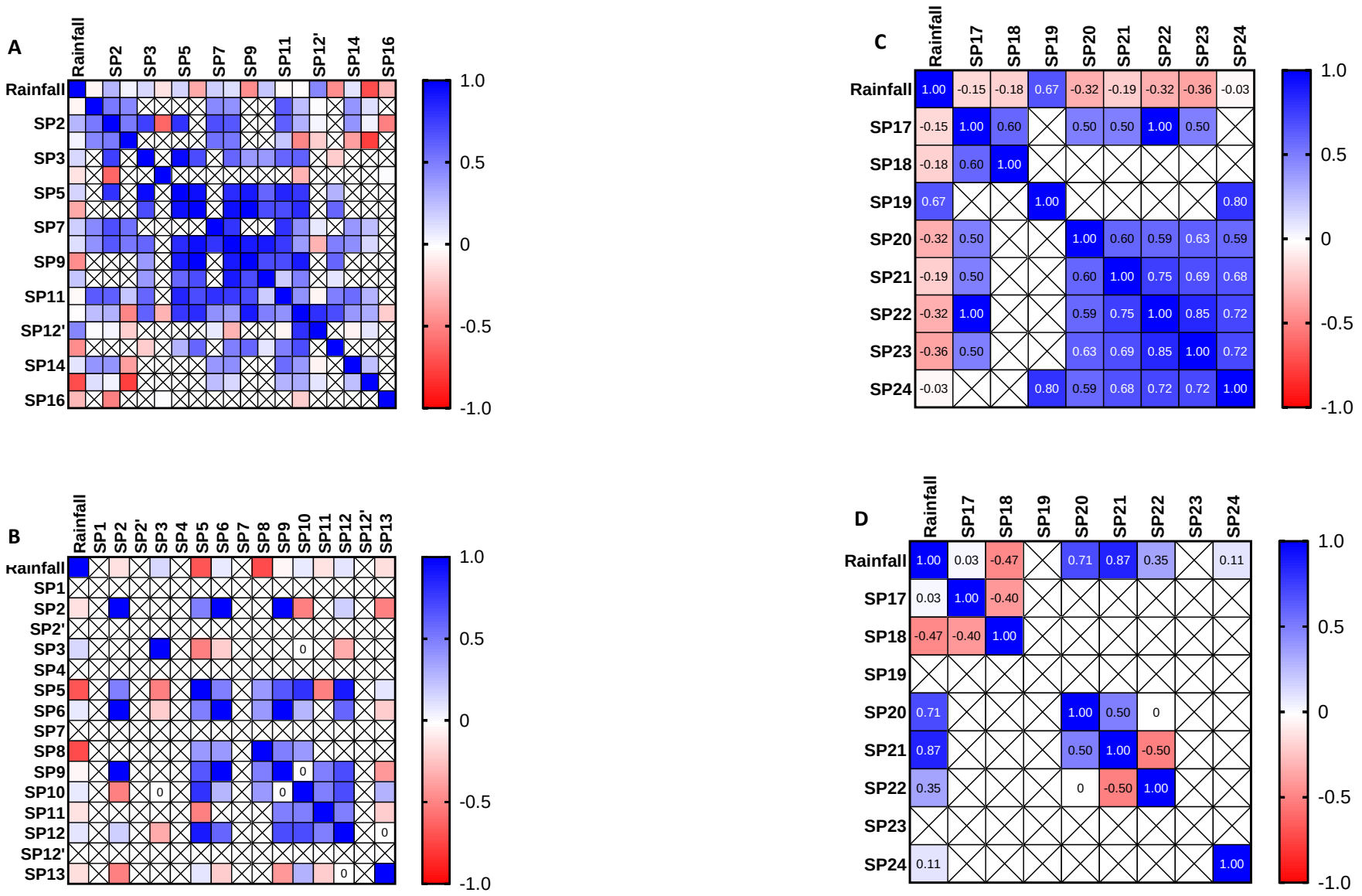
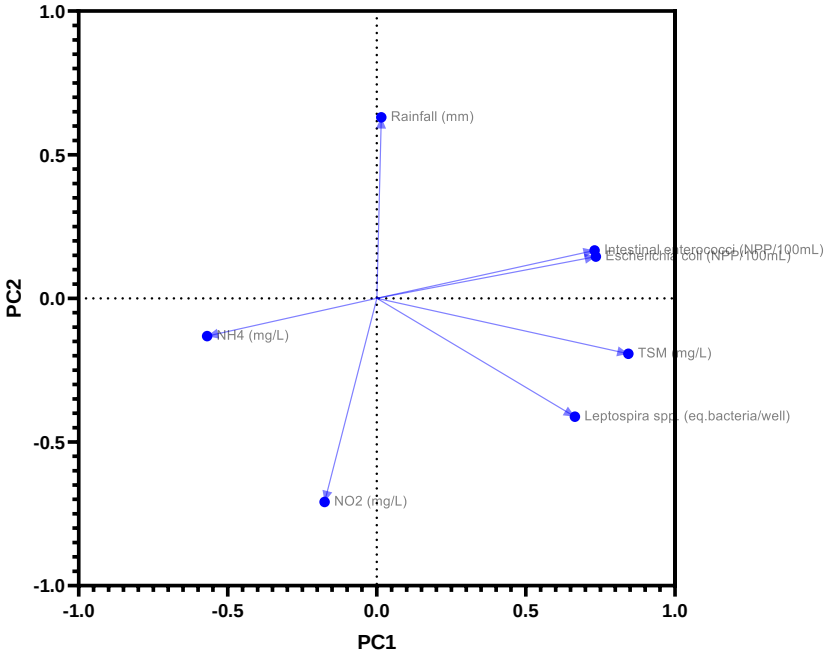


Figure 5. Correlations matrices between rainfall and Leptospira concentration in sample point (SP) in the environment: (A) Leptospira spp. in the Seine river (B) pathogenic Leptospira in the Seine river (C) Leptospira spp. in bathing area (D) pathogenic Leptospira in bathing area.

Independently of the impact of rainfall, this study also made it possible to analyze the presence of correlation with the concentrations of *Leptospira* concentration between diverse sampling points. For *Leptospira spp*. detection, positives correlations appeared for both Seine river sampling points (11 correlations with r > 0.8 and 11 correlations with r > 0.7) and bathing area sampling points (4 correlations with r > 0.7). While some similar results can be explained by the proximity between two sampling points, this did not apply for all the comparisons. Geographical proximity seemed not to be the only factor explaining these correlations.

We established PCA (Principal Component Analysis) on the sampling point N°12 because it was the most followed sampling point during the project (Figure 6). For both analysis, *Leptospira spp*. (A) and pathogenic *Leptospira* (B), cumulative proportion of variance reached over 53% and 56% respectively. *Leptospira* vector was in the opposite direction of fecal indicators vectors on PC1 axis. These vectors had different lengths and poor correlation on PC2 axis. In comparison, *Escherichia coli* and intestinal enterococci vectors had a significant correlation because of the same direction, collinearity and length. No link could be established between the presence of bacterial indicators of fecal contamination (*Escherichia coli* and intestinal enterococci) and the presence of *Leptospira*.

A



B

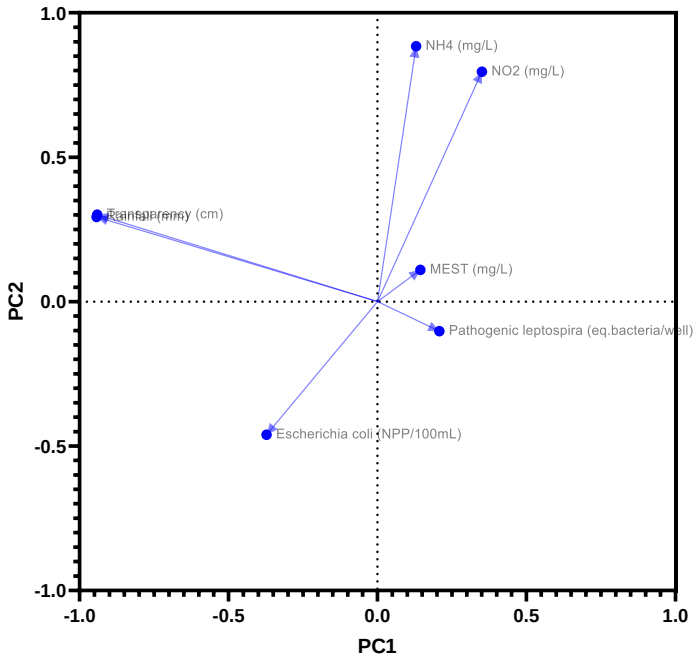


Figure 6. PCA on the sample point N°12 for Leptospira spp. (A, n=116) and pathogenic Leptospira (B, n=29) with physicochemical (rainfall, transparency, NH4, NO2, total suspended matter) and biological (E.coli, intestinal enterococci) parameters. PC1 and PC2 represented 36.86% and 16.75% respectively for A and 30.24% and 26.08% for B.

One hundred and ninety-three kidneys of rats were trapped throughout Paris. Ninety-eight percent of all kidneys (189/193) were analyzed by multiplex qPCR described previously. Sixty-six kidneys were obtained using ferret capture, more than 31% were carriers of pathogenic *Leptospira*. One hundred and twenty-three kidneys were harvested using the ethanol traps, 2% were pathogen positive (Table 1). Using the same extraction method, fewer *Leptospira* were found in ethanol traps than in kidneys captured by ferrets.

Table 1. Data summary of kidneys of rats analyzing by homemade multiplex qPCR.

	Trapping technique	
	Ferret	Ekomille trap
Positive sample	31.82% (21/66)	2.44% (3/123)
Sampling date	2020	2017-2018
Median concentration	2.10^3 eq.bacteria/L	2.10^2 eq.bacteria/L

The study of the correlation matrix on rats did not show any correlation between the carriage of pathogenic *Leptospira* and the different characteristics of the rats, whether it be the animal gender or its morphological data (height, weight, etc.) (Figure 7).

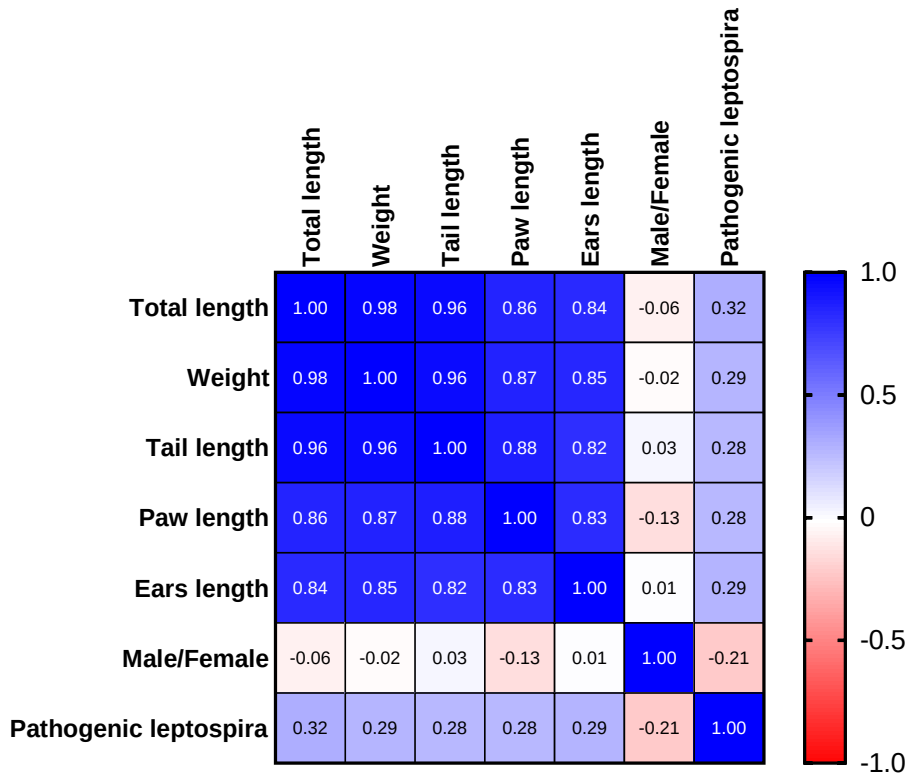


Figure 7. Correlation matrix between rats morphological characteristics and prevalence of pathogenic leptospira in their kidneys.

Sequencing analysis by Illumina highlighted the diversity of *Leptospira* within the different samples. Analysis of the 16S gene allowed identification as an OTU (Operational Taxonomic Unit) and not for species-level precision (Figure 8). Composition of subgroups P1, P2, S1 and S2 were summarized in Table S2. However, the pathogenic (P1, P2) and saprophytic (S1, S2) distinction was relevant. As regards the kidneys of rats, sequencing revealed that they carried a single OTU, grouping together species (*L. interrogans, L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. kirschneri*, *L. tipperaryensi,* all belonging to the pathogenic P1 group. Analysis of environmental samples by sequencing was more complicated due to the great diversity of *Leptospira* and other bacteria in surface waters. Although bacterial species (other than *Leptospira*) were identified during this sequencing due to their proximity in 16S, pathogenic *Leptospira* could still be identified for some samples.

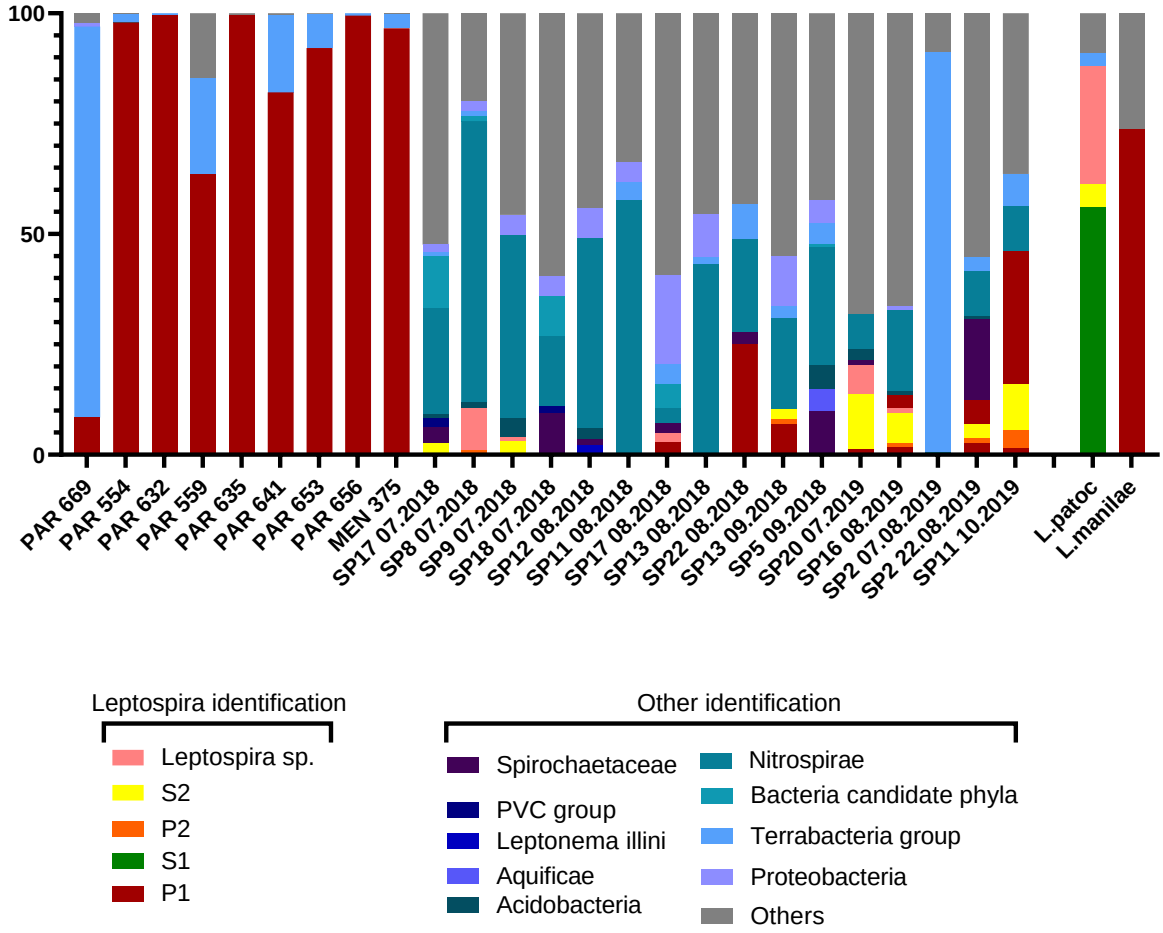


Figure 8. Results of 16S sequencing (Illumina) on rats and water samples, with bacterial distribution. P1, P2, S1 and S2 referred to Leptospira subgroups.

DISCUSSION

In this study, we monitored the *Leptospira* concentration in surface water from 2018 to 2020. Even though *Leptospira* spp. were ubiquitous, pathogenic strains represent only a fraction of the total Leptospira. Moreover, we observe an important decrease in the pathogenic concentration, who shrink from an average of $2{,}8.10^3$ eq.bacteria/L to undetectable. This decrease in pathogenic bacteria could be explained by the combination of various factors. In this urban area rat extermination were intensified in recent years, limiting proliferation of rodents probably impacting the dissemination of pathogenic *Leptospira* in the environment.

Moreover, as part of the opening of surface water bathing areas, the authorities of the city has undertaken many changes in waste water management in the area to reduce the discharge of wastewater that could attract rats to these areas: forbidding to discard used water in the environment in the Ourcq canal by houseboat, decrease in the non-treated waste water reject by storm water outlet. In this context, in addition to the decrease in pathogenic *Leptospira*, a slight decrease in the indicators of faecal contamination was observed by laboratory monitoring, the two parameters having a similar downward trend.

The two-main axis of water contamination by *Leptospira* were: soil leaching and discharge from storm basins. It would be interesting to analyze the presence of Leptospira entering and leaving WWTP because they collected water from sewers in which rats were omnipresent.

We were able to observe a seasonal effect (Figure 4), consistent with data from the literature on human leptospirosis cases (Hochedez, 2015; Pagès et al., 2016). The median *Leptospira* concentration appeared to decrease with increasing temperature. However, no direct link with rain has been established, even considering the rainfall over the 5 days before sampling from the environment. Currently, studies have not established a consensus regarding the link between rainfall and the presence of *Leptospira*: while some demonstrate a negative correlation between these two parameters (Dzulaikha et al., 2018), others demonstrate an increase between cases of leptospirosis and slight increase in rainfall (Joshi et al., 2017a), sometimes with a delay in response between these phenomena (Dhewantara et al., 2019). The analysis of *Leptospira* and rainfall seemed to be linked to local hydrological phenomena nearby sampling point: proximity to a wastewater discharge area or a release of storm basins.

Correlation matrices established that the link between *Leptospira* concentration and rainfall was only true for few sampling points. In the bathing area, positive correlation existed between rainfall and the

data from two sampling area (SP22 and SP23, p=0.85). For pathogenic strains, no significant correlation could be observed, may be partly due to the lack of detection data in this area.

High frequency, and the number of taken sample, along the watercourses of the river and in the bathing area could allow detection specific area of contamination. But in the Parisian urban area any specific contaminated neighborhood were identified; contrary to what can be observed in tropical regions where measurements were made in still water (puddles, etc.) after floods or climatic events (Casanovas-Massana et al., 2018a). Any *Leptospira* excretion hotspot along the Seine or in the bathing area could be identified, In accordance with the general low concentration of *Leptospira* in our monitored area. Along the watercourses of the river and the bathing area, no considerable variation was identified during 2018 and 2019 campaigns; contrary to what can be observed in tropical regions where measurements were made in still water (puddles, etc.) after floods or climatic events (Casanovas-Massana et al., 2018a). No real *Leptospira* excretion hotspot along the Seine or in the bathing area could be identified.

PCA did not show a correlation between the presence of *Leptospira* and the indicators of faecal contamination (*Escherichia coli* and intestinal enterococci). In their study, Dadon and colleagues used these standard faecal contamination indicators to evaluate the environmental risk during leptospirosis outbreak (Dadon et al., 2018). Infection with the Pomona serovar coupled with faecal contamination of water bodies (wild boar and cattle origin) would promote human infection after exposure to animal excretions during recreational activity, in particular climatic conditions (drought and water stagnation). However, many sporting events occurring in cleaned surface water (devoid of fecal contamination) have often been associated with outbreaks of leptospirosis (Sejvar et al., 2003).

In the bathing area, a slight decrease in the indicators of faecal contamination was observed. This may suggest that *E. coli* and intestinal enterococci may not be good indicators to prevent the risk of leptospirosis (Morgan et al., 2002) but the two parameters had a similar downward trend in recent years.

The microbiological criteria quality thresholds for bathing arear did not consider *Leptospira* exposure risk and only existing recommendations to prevent infection. *Leptospira* monitoring could be implemented in the swimming profile establishment, to emphasize *Leptospira* exposition awareness. This preventive measure consisted in identifying sources of pollution prone to affect bathing water and health bather's qualities. In a health protection approach, the identification and the control of the *Leptospira* contaminant sources are essentials to set up an effective bacterial removal and to gain insight on the mechanism of human contamination, especially resulting from water sport practices.

The rat capture technique plays a major role in the detection of *Leptospira*. In the Ekomille® traps, rodents, attracted by feed were captured after falling into a tank containing alcohol isopropyl solution which causes loss of consciousness and quick death. This technique was in line with European Directives 86/609 and considered the index of human killing. Nevertheless, the capture with ferret was more conservative and a more ethically acceptable trapping technique than the destructive ethanol trap where rats can remain for long time in these conditions. Organ preservation allowed a better bacterial detection and therefore stronger carriage in those caught with ferrets. The low carriage in ethanol-captured animals may therefore be inaccurate and greatly underestimated.

A study carried out on the brown rat in the Chanteraines park (Hauts-de-Seine, France) provided initial data on the prevalence of *Leptospira* (Desvars-Larrive et al., 2017). Twenty-one percent (18/84) of brown rat population were carriers of pathogenic *Leptospira*. Various species were identified mainly *L. interrogans* (8/18) and *L. borgpetersenii* (6/18). Further study may be necessary to determine the actual proportion of rats carrying pathogenic *Leptospira*. It was noted that the rat is commonly regarded as a potential reservoir. However, it is essential to also consider the other potential reservoirs (mouse, hedgehog, etc.); and a study on them could provide additional knowledge to inform or confirm the rat as the main disseminator.

Leptospira concentration in the environment and the carriage of rats are mainly dependent on human activities and their effects. Their development as part of recreational activities near or in bathing areas would increase the attraction and proliferation of rats in these areas, including the wild dumping of food or garbage.

The year 2020, due to its specific health and societal impact, may have an influence on all bacteria concentration due to the decrease of human activities (lockdown periods). Additional studies in this direction would confirm or deny the impact of the interruption of population circulation and activities during this period on the presence of pathogens in the environment.

Genome sequencing enables advances in knowledge about the environmental composition in pathogens. The use of 16S widens the detection field. However, the great conservation of this gene is also a major drawback in obtaining an accurate identification of circulating species. In order to obtain more details on the pathogenic strains circulating in the environment, additional sequencing based on a specific gene for the pathogens could be considered. While most of studies on isolated strains were based on whole genome sequencing (Jorge et al., 2018; Lata et al., 2020; Xu et al., 2016), Sato and colleagues (Sato et al., 2019) used primers specific for pathogenic *Leptospira* to sequence environmental strains. But the sequencing was carried out on the 16S gene whose primers were

designated in this project, because the ones cited which seem to target pathogens have never worked on environmental analyzes.

These results make it possible for the first time to know the *Leptospira* environmental contamination in swimming areas in Paris and to better understand the dangers associated with nautical activities in dense urban areas.

In order to complete the triad specific to the One Health concept linking the environment, humans and animals, it would be interesting to collect information on cases of human contamination. However, retrieving patient data is tedious and sometimes difficult to relate to aquatic exposure. This complex collection of information from users of aquatic recreational spaces and population movements complicates the monitoring of cases.

ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDING STATEMENT

We are very grateful to the sampling department of Eau de Paris for providing samples to the laboratory and Jacques Geslin, from the R&D-process department, for helping the statistical analysis.

We thank the staff of the Reference Center for Leptospirosis for support this project. We also thank the National Natural History Museum and the Parisian Environmental Health Service for processing of the rat samples.

This work is part of the PhD thesis of E.R., who received financial support from the DIM 1Health 2017 scientific project from Ile-de-France region.

Table S1. Summary of all surface water samples from 2018 to 2020. Positivity and median concentration (eq.bacteria/L) of each sampling point were mentioned for total Leptospira (16S gene) and pathogenic Leptospira (LipL32 gene). ND: not determined

	Sampling point identification																								
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	
Number of positives samples to *Leptospira spp* (16S)																										**Total**
2018	3	36	47	3	15	13	0	13	12	12	14	74	12	3	0	2	41	23	1	6	5	6	6	6	2	355
2019	13	69	26	10	0	0	25	23	0	0	24	81	0	12	0	9	30	19	4	9	9	10	10	13	9	407
2020	17	31	11	6	0	0	16	17	0	0	16	24	0	16	15	6	0	1	1	11	11	11	11	14	6	255
Total	33	136	84	19	15	13	41	53	12	12	54	179	12	31	17	17	71	43	6	26	25	27	27	33	17	1031
Median concentration of *Leptospira spp* (16S)																										
2018	9,1E+04	2,1E+04	2,6E+03	2,6E+03	3,3E+03	2,3E+03	ND	1,9E+03	8,6E+02	1,1E+03	7,1E+03	2,3E+03	4,1E+03	2,2E+06	ND	3,8E+02	2,7E+03	5,4E+03	1,1E+03	2,5E+03	5,8E+02	7,7E+02	8,2E+02	8,1E+02	2,8E+03	2,56E+03
2019	1,3E+04	7,0E+03	7,1E+03	1,4E+03	ND	ND	3,4E+03	6,2E+03	ND	ND	4,4E+03	4,6E+03	ND	7,0E+03	ND	4,2E+03	5,8E+03	2,22E+04	4,3E+03	1,1E+04	6,8E+03	1,0E+04	1,0E+04	7,2E+03	1,1E+03	6,10E+03
2020	1,5E+04	8,5E+03	4,1E+03	1,8E+03	ND	ND	1,1E+04	5,5E+03	ND	ND	1,1E+04	1,2E+04	ND	6,3E+03	3,1E+03	2,7E+03	ND	ND	ND	2,9E+04	1,7E+04	1,1E+04	6,5E+03	1,2E+04	1,3E+03	8,27E+03
Total point	1,4E+04	8,0E+03	3,6E+03	1,6E+03	3,3E+03	2,3E+03	4,4E+03	5,5E+03	8,6E+02	1,1E+03	7,1E+03	4,9E+03	4,1E+03	7,0E+03	3,1E+03	3,0E+03	4,5E+03	5,4E+03	2,7E+03	1,1E+04	7,2E+03	1,0E+04	6,5E+03	7,3E+03	1,4E+03	5,98E+03
Number of positives samples to pathogenic *Leptospira* (LipL32)																										
2018	0	16	18	0	7	8	0	5	6	8	4	25	6	0	0	0	19	9	1	4	3	5	2	4	1	153
2019	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
2020	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	17	18	0	7	8	0	5	6	8	4	26	6	0	0	1	19	9	1	4	3	5	2	4	1	156
Median concentration of pathogenic *Leptospira* (LipL32)																										
2018	ND	3,3E+03	2,2E+03	ND	2,0E+03	1,5E+03	ND	1,5E+03	7,5E+03	5,1E+03	3,4E+03	1,6E+03	4,4E+03	ND	ND	ND	4,6E+03	1,0E+04	1,6E+03	1,2E+03	2,5E+03	3,4E+03	1,4E+03	5,4E+03	1,2E+03	2,8E+03
2019	ND	2,0E+03	ND	ND	ND	0,0E+00	ND	ND	ND	ND	ND	6,7E+02	ND	ND	ND	5,1E+02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6,7E+02
2020	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total point	ND	3,0E+03	2,2E+03	ND	2,0E+03	1,5E+03	ND	1,5E+03	7,5E+03	5,1E+03	3,4E+03	1,5E+03	4,4E+03	ND	ND	5,1E+02	4,6E+03	1,0E+04	1,6E+03	1,2E+03	2,5E+03	3,4E+03	1,4E+03	5,4E+03	1,2E+03	2,7E+03

Table S2. Summary about species identified during sequencing and clustered into P1, P2, S1 and S2 subgroups.

***Leptospira* group - acronym**	**Specie**	**Serovar**
Pathogen – P1	*L. interrogans*	Manilae
	L. interrogans	Hardjo-prajitno
	L. interrogans	Lai
	L. interrogans	Copenhageni
	L. interrogans	Ballum
	L. interrogans	ND
	L. borgpetersenii	ND
	L. santarosai	ND
	L. kirschneri	ND
	L. tipperaryensis	ND
Pathogen – P2	*L. johnsonii*	ND
	L. perolatii	ND
Saprophyte – S1	*L. biflexa*	Andamana
	L. biflexa	Patoc
	L. biflexa	ND
	L. wolbachii	ND
	L. meyeri	ND
Saprophyte – S2	*L. kobayashii*	ND
	L. ilyithenensis	ND
	L. ryugenii	ND
	L. ognonensis	ND
	L. idonii	ND

REFERENCES

1. Bultman MW, Fisher FS, Pappagianis D. The Ecology of Soil-Borne Human Pathogens. In: Selinus O, editor. Essentials of Medical Geology: Revised Edition [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2013 [cited 2021 Feb 17]. p. 477–504. Available from: https://doi.org/10.1007/978-94-007-4375-5_20

2. Flores - Castro R. [Current situation of the most frequent zoonosis in the world]. Gaceta médica de México. 2010 Nov 1;146:423–9.

3. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. Small PLC, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Sep 17;9(9):e0003898.

4. Pijnacker R, Goris MGA, te Wierik MJM, Broens EM, van der Giessen JWB, de Rosa M, et al. Marked increase in leptospirosis infections in humans and dogs in the Netherlands, 2014. Eurosurveillance [Internet]. 2016 Apr 28 [cited 2021 Apr 7];21(17). Available from: https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30211

5. Vincent AT, Schiettekatte O, Goarant C, Neela VK, Bernet E, Thibeaux R, et al. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus Leptospira through the prism of genomics. Martins EAL, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2019 May 23;13(5):e0007270.

6. Thibeaux R, Geroult S, Benezech C, Chabaud S, Soupé-Gilbert M-E, Girault D, et al. Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. Munoz-Zanzi C, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Feb 27;11(2):e0005414.

7. Thibeaux R, Girault D, Bierque E, Soupé-Gilbert M-E, Rettinger A, Douyère A, et al. Biodiversity of Environmental Leptospira: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. Front Microbiol. 2018 May 1;9:816.

8. Goarant C. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. RRTM. 2016 Sep;Volume 7:49–62.

9. Bierque E, Thibeaux R, Girault D, Soupé-Gilbert M-E, Goarant C. A systematic review of Leptospira in water and soil environments. Dellagostin OA, editor. PLoS ONE. 2020 Jan 27;15(1):e0227055.

10. Soo ZMP, Khan NA, Siddiqui R. Leptospirosis: Increasing importance in developing countries. Acta Tropica. 2020 Jan;201:105183.

11. Lall C, Kumar KV, Raj RV, Vedhagiri K, Vijayachari P. Prevalence and Diversity of Leptospires in Different Ecological Niches of Urban and Rural Areas of South Andaman Island. Microbes and environments. 2016;31(1):79–82.

12. SEROPOSITIVITY TO LEPTOSPIROSIS IN DOMESTIC RESERVOIRS AND DETECTION OF Leptospira spp. 2011;5.

13. Pui CF, Bilung LM, Apun K, Su'ut L. Diversity of Leptospira spp. in Rats and Environment from Urban Areas of Sarawak, Malaysia. Journal of Tropical Medicine. 2017;2017:1–8.

14. Klement-Frutos E, Tarantola A, Gourinat A-C, Floury L, Goarant C. Age-specific epidemiology of human leptospirosis in New Caledonia, 2006-2016. Calderaro A, editor. PLoS ONE. 2020 Nov 30;15(11):e0242886.

15. Gay N, Soupé-Gilbert M-E, Goarant C. Though not Reservoirs, Dogs might Transmit Leptospira in New Caledonia. IJERPH. 2014 Apr 17;11(4):4316–25.

16. Thayaparan S, Robertson I, Fairuz A, Suut L, Gunasekera C, Abdullah MT. Seroepidemiological study of leptospirosis among the communities living in periurban areas of Sarawak, Malaysia. 2015;70(5):8.

17. Mwachui MA, Crump L, Hartskeerl R, Zinsstag J, Hattendorf J. Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. Small PLC, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Sep 17;9(9):e0003843.

18. Miller E, Barragan V, Chiriboga J, Weddell C, Luna L, Jiménez DJ, et al. Leptospira in river and soil in a highly endemic area of Ecuador. BMC Microbiol. 2021 Dec;21(1):17.

19. Chadsuthi S, Chalvet-Monfray K, Wiratsudakul A, Modchang C. The effects of flooding and weather conditions on leptospirosis transmission in Thailand. Sci Rep. 2021 Dec;11(1):1486.

20. Karande S. An observational study to detect leptospirosis in Mumbai, India, 2000. Archives of Disease in Childhood. 2003 Dec 1;88(12):1070–5.

21. Kouadio IK, Aljunid S, Kamigaki T, Hammad K, Oshitani H. Infectious diseases following natural disasters: prevention and control measures. Expert Review of Anti-infective Therapy. 2012 Jan;10(1):95–104.

22. Gelman SS, Gundlapalli AV, Hale D, Croft A, Hindiyeh M, Carroll KC. Spotting the Spirochete: Rapid Diagnosis of Leptospirosis in Two Returned Travelers. Journal of Travel Medicine. 2006 Mar 8;9(3):165–7.

23. Boland M, Sayers G, Coleman T, Bergin C, Sheehan N, Creamer E, et al. A cluster of leptospirosis cases in canoeists following a competition on the River Liffey. Epidemiol Infect. 2004 Apr;132(2):195–200.

24. Agampodi SB, Karunarathna D, Jayathilala N, Rathnayaka H, Agampodi TC, Karunanayaka L. Outbreak of leptospirosis after white-water rafting: sign of a shift from rural to recreational leptospirosis in Sri Lanka? Epidemiol Infect. 2014 Apr;142(4):843–6.

25. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. The Lancet Infectious Diseases. 2003 Dec;3(12):757–71.

26. Morgan J, Bornstein SL, Karpati AM, Bruce M, Bolin CA, Austin CC, et al. Outbreak of Leptospirosis among Triathlon Participants and Community Residents in Springfield, Illinois, 1998. CLIN INFECT DIS. 2002 Jun 15;34(12):1593–9.

27. Tilahun Z, Reta D, Simenew K. Global Epidemiological Overview of Leptospirosis. 2013;8.

28. Jansen A, Schöneberg I, Frank C, Alpers K, Schneider T, Stark K. Leptospirosis in Germany, 1962–2003. Emerg Infect Dis. 2005 Jul;11(7):1048–54.

29. Abgueguen P, Delbos V, Blanvillain J, Chennebault JM, Cottin J, Fanello S, et al. Clinical aspects and prognostic factors of leptospirosis in adults. Retrospective study in France. Journal of Infection. 2008 Sep;57(3):171–8.

30. Taseva E, Christova I, Gladnishka T. P1052 Epidemiological, clinical and serological features of human leptospirosis in Bulgaria in 2005. International Journal of Antimicrobial Agents. 2007 Mar;29:S282.

31. Guillois Y, Bourhy P, Ayral F, Pivette M, Decors A, Aranda Grau JH, et al. An outbreak of leptospirosis among kayakers in Brittany, North-West France, 2016. Eurosurveillance [Internet]. 2018 Nov 29 [cited 2020 Aug 10];23(48). Available from: https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.48.1700848

32. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. "Leptospira" and leptospirosis [Internet]. MediSci; 1999 [cited 2020 Oct 13]. Available from: https://research.monash.edu/en/publications/leptospira-and-leptospirosis

33. Sejvar J, Bancroft E, Winthrop K, Bettinger J, Bajani M, Bragg S, et al. Leptospirosis in "Eco-Challenge" Athletes, Malaysian Borneo, 2000. Emerg Infect Dis. 2003 Jun;9(6):702–7.

34. Trueba G, Zapata S, Madrid K, Cullen P, Haake D. INTERNATIONAL MICROBIOLOGY (2004) 7:35–40. 2004;7:6.

35. Vinod Kumar K, Lall C, Raj RV, Vedhagiri K, Vijayachari P. Coexistence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with Azospirillum. Olson J, editor. FEMS Microbiology Ecology. 2015 Jun;91(6):fiv051.

36. Dzulaikha K, Nurul Yuziana MY, Maizatulriah JJ, Marfiah AW. Association of Rainfall and the Occurrence of Pathogenic Leptospira spp. in Recreational Stream Water, Hulu Langat, Selangor. In: Ibrahim F, Usman J, Ahmad MY, Hamzah N, Teh SJ, editors. 2nd International Conference for Innovation in Biomedical Engineering and Life Sciences [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2018 [cited 2021 Apr 7]. p. 119–24. (IFMBE Proceedings; vol. 67). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-7554-4_20

37. Barragan VA, Mejia ME, Trávez A, Zapata S, Hartskeerl RA, Haake DA, et al. Interactions of Leptospira with Environmental Bacteria from Surface Water. Curr Microbiol. 2011 Jun;62(6):1802–6.

38. Thibeaux R, Soupé-Gilbert M-E, Kainiu M, Girault D, Bierque E, Fernandes J, et al. The zoonotic pathogen Leptospira interrogans mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production. npj Biofilms Microbiomes. 2020 Dec;6(1):24.

39. Bouscaren N, Benoit de Coignac C, Lastère S, Musso D, Teissier Y, Formont J, et al. Leptospirosis in French Polynesia: 11 years of surveillance data, 2007–2017. New Microbes and New Infections. 2019 May;29:100518.

40. Joshi YP, Kim E-H, Cheong H-K. The influence of climatic factors on the development of hemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis during the peak season in Korea: an ecologic study. BMC Infect Dis. 2017 Dec;17(1):406.

41. Petrakovsky J, Bianchi A, Fisun H, Nájera-Aguilar P, Pereira M. Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries: Reported Outbreaks and Literature Review (2002–2014). IJERPH. 2014 Oct 16;11(10):10770–89.

42. Richard E, Bourhy P, Picardeau M, Moulin L, Wurtzer S. Effect of disinfection agents and quantification of potentially viable Leptospira in fresh water samples using a highly sensitive integrity-qPCR assay. Dellagostin OA, editor. PLoS ONE. 2021 May 26;16(5):e0251901.

43. Hochedez P. Epidémiologie de la leptospirose aux Antilles françaises: apports du diagnostic par biologie moléculaire dans l'étude des facteurs de risques, des facteurs pronostiques et de l'incidence. :129.

44. Pagès F, Larrieu S, Simoes J, Lenabat P, Kurtkowiak B, Guernier V, et al. Investigation of a leptospirosis outbreak in triathlon participants, Réunion Island, 2013. Epidemiol Infect. 2016 Feb;144(3):661–9.

45. Dhewantara PW, Hu W, Zhang W, Yin W, Ding F, Mamun A, et al. Leptospirosis, Climate and Satellite-based Environmental Factors: A Temporal Modeling. OJPHI [Internet]. 2019 May 30 [cited 2021 Apr 7];11(1). Available from: https://journals.uic.edu/ojs/index.php/ojphi/article/view/9879

46. Casanovas-Massana A, Costa F, Riediger IN, Cunha M, de Oliveira D, Mota DC, et al. Spatial and temporal dynamics of pathogenic Leptospira in surface waters from the urban slum environment. Water Research. 2018 Mar;130:176–84.

47. Dadon Y, Haas EJ, Kaliner E, Anis E, Singer SR, Atiya-Nasagi Y, et al. Outbreak of human leptospirosis linked to contaminated water bodies in Northern Israel, June to August 2018. Eurosurveillance [Internet]. 2018 Sep 20 [cited 2021 Apr 7];23(38). Available from: https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.38.1800486

48. Desvars-Larrive A, Pascal M, Gasqui P, Cosson J-F, Benoît E, Lattard V, et al. Population genetics, community of parasites, and resistance to rodenticides in an urban brown rat (Rattus norvegicus) population. Lutermann H, editor. PLoS ONE. 2017 Sep 8;12(9):e0184015.

49. Lata KS, Vaghasia V, Bhairappanavar SB, Kumar S, Ayachit G, Patel S, et al. Whole genome sequencing and de novo assembly of three virulent Indian isolates of Leptospira. Infection, Genetics and Evolution. 2020 Nov;85:104579.

50. Jorge S, Kremer FS, Oliveira NR de, Navarro G de OSV, Guimarães AM, Sanchez CD, et al. Whole-genome sequencing of Leptospira interrogans from southern Brazil: genetic features of a highly virulent strain. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2018 Feb;113(2):80–6.

51. Xu Y, Zhu Y, Wang Y, Chang Y-F, Zhang Y, Jiang X, et al. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic Leptospira. Sci Rep. 2016 Apr;6(1):20020.

52. Sato Y, Mizuyama M, Sato M, Minamoto T, Kimura R, Toma C. Environmental DNA metabarcoding to detect pathogenic Leptospira and associated organisms in leptospirosis-endemic areas of Japan. Sci Rep. 2019 Dec;9(1):6575.

Conclusion du chapitre 2

Ce deuxième chapitre a permis d'obtenir une première évaluation de la présence des leptospires dans un environnement urbain très dense, sous un climat tempéré ; les eaux de surface parisiennes, étude encore jamais réalisée jusqu'à maintenant. Assez bien renseignée dans les zones endémiques (Casanovas-Massana et al., 2018a), ces bactéries peuvent avoir un impact important sur la santé de la population et de nombreuses zones d'ombres restent encore à être éclaircies concernant leur concentration environnementale dans les régions européennes.

Ces analyses ont été effectuées en continu de Juin 2018 à Septembre 2020, dans deux environnements hydriques : le long de la Seine ainsi que dans une zone de baignade contrôlée (bassin de la Villette – Canal de l'Ourcq). Ce canal est alimenté par une rivière de faible importance, l'Ourcq, complété par un pompage issu de la Marne lors des épisodes de faible débit. Le faible débit du canal est fortement influencé par les tirages d'eau (réseau dit « eau non potable » pour le nettoyage des rues de la ville de Paris) ainsi que les ouvertures et fermetures des nombreuses écluses.

Les leptospires *spp*. ont été identifiées dans l'ensemble des échantillons, contrairement aux pathogènes retrouvées dans de rares échantillons. En 2018, la concentration médiane en saprophytes était de $2{,}56.10^3$ eq.bactérie/L, contre $6{,}10.10^3$ eq.bactérie/L en 2019 et $8{,}27.10^3$ eq.bactérie/L en 2020 dans les eaux de surface. Les part des pathogènes est passée de $2{,}8.10^3$ eq.bactérie/L en 2018 à indétectable en 2020. Entre la première et la dernière année de l'étude, la diminution de la part de pathogènes peut s'expliquer par l'association de différents facteurs. Une explication possible de cette diminution est peut-être due à l'intensification des campagnes de dératisation ces dernières années à Paris, limitant la prolifération des rongeurs, suspectés d'être les principaux vecteurs de leptospires pathogènes dans l'environnement.

Par ailleurs, dans le cadre de l'ouverture de zones de baignade en eaux de surface, les autorités de la ville ont engagé de nombreux changements dans la gestion des eaux usées dans ces zones. L'objectif est de réduire les rejets d'eaux usées qui pourraient attirer les rats vers ces lieux : interdiction aux péniches de rejeter les eaux usées dans le canal de l'Ourcq, diminution des rejets d'eaux usées non traitées au niveau des sorties d'eaux pluviales. Dans ce contexte, en plus de la diminution des leptospires pathogènes, une légère diminution des indicateurs de contamination fécale a été observée lors du suivi par le laboratoire, les deux paramètres ayant une tendance à la baisse similaire.

La mise en relation entre les concentrations en leptospires dans les eaux et différents paramètres environnementaux a pu être étudiée à l'aide de matrices de corrélation. Seuls quelques points d'échantillonnage présentaient une corrélation positive avec la pluviométrie, et notamment dans la zone de baignade, au niveau des zones de rétention. Ce résultat semble évident en raison de la faible

hauteur d'eau au niveau de ces points de prélèvements, et dont le lessivage des sols environnants peut impacter considérablement les concentrations en pathogènes. Cependant, aucun lien direct avec la pluie n'a été établi, même en considérant les précipitations sur les 5 jours précédant l'échantillonnage de l'environnement. Actuellement, aucun consensus n'a émergé à travers les études sur le lien entre les précipitations et la présence de leptospires. Quand certains montrent une corrélation négative entre ces deux paramètres (Dzulaikha et al., 2018), d'autres observent une augmentation du nombre de cas de leptospirose coïncidant avec une légère augmentation des précipitations (Joshi et al., 2017a), avec parfois un retard dans la réponse entre ces deux phénomènes (Dhewantara et al., 2019). L'analyse de *Leptospira* et des pluies semble liée à des phénomènes hydrologiques locaux à proximité du point de prélèvement : proximité d'une zone d'évacuation des eaux usées ou rejet de bassins pluviaux.

La présence de leptospires dans l'environnement a ensuite été comparée à celle des indicateurs de contamination fécale (*Escherichia coli* et entérocoques intestinaux) et aucune corrélation n'a été établie par l'ACP. Malgré une étude montrant un léger lien entre les leptospires et ces indicateurs (Dadon et al., 2018), la survenue de nombreux cas de leptospiroses à la suite d'évènements sportifs dans des zones « propres » suggère qu' *E. coli* et les entérocoques intestinaux ne sont peut-être pas de bons indicateurs pour prévenir le risque de leptospirose (Morgan et al., 2002).

Dans le cadre d'une analyse globale des leptospires dans le milieu naturel, le portage de leptospires chez le rat a été étudié. La technique de capture du rat joue un rôle majeur dans l'efficacité de la détection des leptospires (Figure 36**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). La préservation des organes a permis une meilleure détection bactérienne et donc un portage plus élevé chez ceux capturés au furet. Le faible portage chez les animaux capturés à l'éthanol peut donc être inexact et largement sous-estimé. En effet, l'éthanol peut abimer, voire détruire en partie les organes, mais également avoir un effet inhibiteur lors de la PCR.

Des études précédentes réalisées dans les Hauts-de-Seine (Desvars-Larrive et al., 2017) et à Lyon (Ayral et al., 2015), ont fourni des données sur la prévalence des leptospires chez l'espèce *Rattus norvegicus* : respectivement 21% et 44% de la population de rats bruns était porteuse d'espèces pathogènes. Une étude plus approfondie peut être nécessaire pour déterminer la proportion réelle de rats porteurs de leptospires pathogènes. Cependant, il est essentiel de considérer également d'autres réservoirs potentiels (souris, hérisson, etc.) ; et une étude sur eux pourrait infirmer ou confirmer le rat en tant que principal diffuseur. De plus l'impact des comportements humains (déversement sauvage de nourriture ou d'ordures) sur l'environnement pourrait indirectement participer à la prolifération des rats à proximité des zones d'activités et ainsi augmenter la multiplication des bactéries pathogènes.

L’analyse de la diversité des espèces de leptospires dans l’environnement et chez les rats a été réalisée par séquençage NGS.

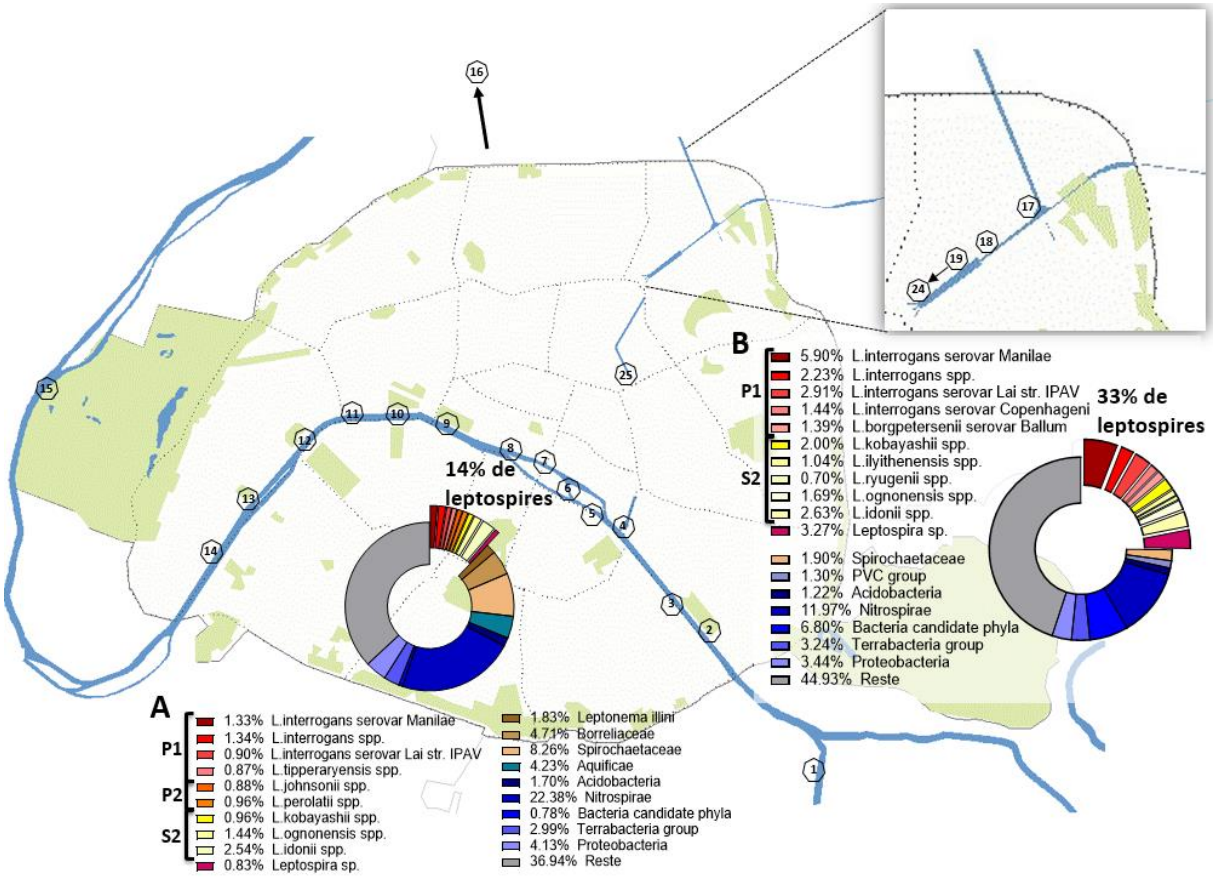


Figure 35. Diversité des leptospires identifiées dans les échantillons d'eau de surface, le long de la Seine (A) et dans la zone de baignade du canal de l'Ourcq (B).

Les échantillons d’eau de surface (Figure 35**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) présentaient une forte diversité de leptospires (saprophytes et pathogènes), tandis que les rats semblent être porteurs d’espèces pathogènes uniquement, comme attendu (Figure 36**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

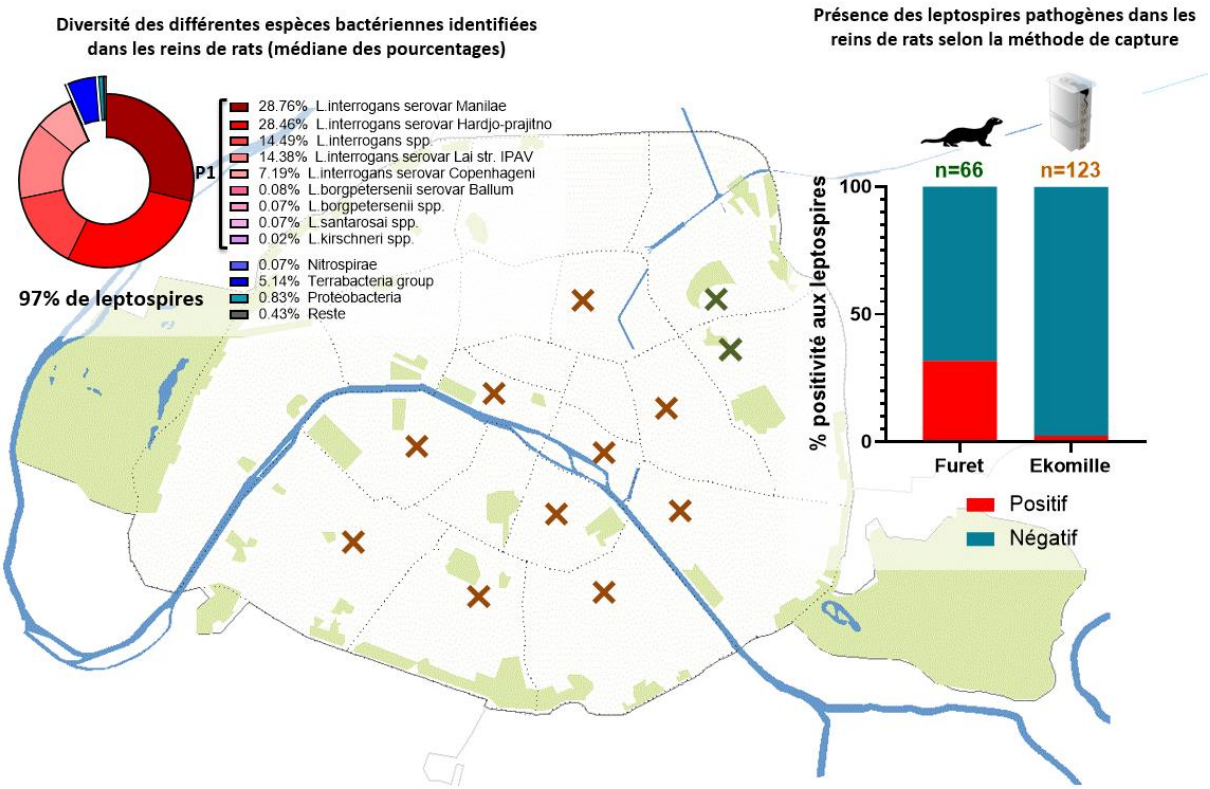


Figure 36. Localisation des points de capture des rats, de leur positivé aux leptospires pathogènes et de la diversité des espèces bactériennes identifiées dans les reins.

La grande diversité du gène *rrs* utilisé dans le séquençage empêche l'identification précise des espèces en circulation. Afin d'obtenir plus de détails sur les espèces pathogènes circulant dans l'environnement, un séquençage supplémentaire basé sur un gène spécifique des pathogènes pourrait être envisagé (Sato et al., 2019). Dans cette étude, le séquençage a été réalisé sur le gène 16S dont les amorces ont été entièrement redesignées, car celles citées dans la littérature et ciblant les espèces pathogènes n'ont jamais fonctionnées sur des analyses environnementales. En effet, les amorces de Sato et coll. (Sato et al., 2019) ont été testées sur des souches connues de leptospires fournies par le CNR. Ces amorces sensées amplifier les espèces pathogènes n'ont pas permis d'obtenir une identification correcte des échantillons testés.

Ces résultats permettent pour la première fois de connaître la contamination environnementale par les leptospires à Paris et de mieux appréhender les risques liés aux activités nautiques dans les zones urbaines denses. Afin de compléter la triade propre au concept One Health reliant l'environnement, l'homme et l'animal, il serait intéressant de collecter des informations sur les cas de contamination humaine.

Discussion générale et conclusion

L'objectif général de cette thèse est d'acquérir des données sur la présence des leptospires dans l'environnement hydrique en zone urbaine dense, en prenant l'exemple de Paris. Elle a également pour but d'expliquer la dynamique de l'éventuelle contamination des cours d'eaux parisiens, à partir du rat, hypothétique réservoir principal. Enfin, des recoupements d'espèces ont pour but d'établir les interactions entre ces matrices.

Dans ce projet, différentes méthodes de concentration ont été testées afin d'analyser de manière optimale les leptospires. Dans des matrices environnementales, la méthode de concentration par centrifugation permet de récupérer une quantité plus importante de bactéries que lors de la filtration sur membranes. Les différentes optimisations sur les volumes d'échantillonnage, les vitesses et temps de centrifugation ont permis d'obtenir la méthode décrite dans cette étude. Par ailleurs, il a été mis en évidence que les méthodes de biologie moléculaire sont des méthodes rapides, sensibles et plus adaptées à l'étude de ces bactéries à croissance lente, dans un contexte d'analyses environnementales. L'utilisation de qPCR en multiplex permet une analyse de l'ensemble des leptospires, mais également de connaître la proportion de pathogènes présents dans ces échantillons. Les analyses des bactéries totales et pathogènes ont été effectuées sur les gènes *rss* et *LipL32*. Contrairement aux leptospires pathogènes identifiées de façon ponctuelle dans les eaux de surface, les leptospires saprophytes sont ubiquitaires dans l'environnement. Lors des campagnes dans les eaux de surface, la charge globale en leptospires totales a augmenté légèrement au cours des trois années. La part incombant aux pathogènes ayant drastiquement diminuée, voire disparue en 2020, cette augmentation est donc due à l'augmentation des saprophytes dans les cours d'eau. Cependant, l'efficacité de la PCR n'a pas été mise en cause car de nombreux tests ont été effectués (gamme de plasmide *LipL32* avec des résultats satisfaisants) et l'analyse des reins de rats a permis de mettre en évidence ces pathogènes.

L'utilisation de la PCR d'intégrité fourni des informations supplémentaires sur la part de bactéries intègres et donc potentiellement viables et infectieuses au sein de ces matrices, et permet de limiter la surestimation induite par l'ADN libre. En parallèle de la quantification des leptospires dans les échantillons, il serait intéressant d'inclure une détection d'ADN de rat afin d'établir des corrélations entre la présence des leptospires et celle du potentiel réservoir principal. De nouvelles méthodes, telle que la digital droplet PCR ont été envisagées pour le diagnostic de la leptospirose (Techawiwattanaboon and Patarakul, 2019). Encore peu de données n'ont été à ce jour publiées et des études sur l'application environnementale de cette technique pourrait permettre de détecter les

faibles concentrations de leptospires dans les eaux, mais aussi de se soustraire d'une partie de l'inhibition due aux matrices.

Les méthodes de séquençage peut représenter une avancée majeure dans la détection de l'ensemble des espèces présentes dans ces matrices complexes (Gamage et al., 2020). Dans notre étude, l'analyse par métagénomique des eaux de surface a permis d'identifier les leptospires pathogènes et saprophytes dans les eaux de surface le long de la Seine, mais également dans la zone de baignade du canal de l'Ourcq. Cette analyse basée sur le gène *rss* a aussi mis en évidence des espèces bactériennes autres que celles appartenant au genre *Leptospira*. Couplé ce séquençage global avec un séquençage spécifique des pathogènes pourrait être judicieux afin d'identifier la totalité des espèces circulantes. Ce deuxième séquençage avait été envisagé dans notre étude mais n'a malheureusement pas pu être mis en place à temps (problèmes techniques du séquenceur et délais courts).

L'analyse de ces eaux renseigne sur la charge globale de bactéries circulantes et aucun véritable hotspot d'excrétion de leptospires le long de la Seine ou dans la zone de baignade n'a pu être identifié. Les leptospires étant également présentes en forte quantité dans les sols, il pourrait être intéressant de coupler cette analyse des eaux avec une analyse des sols à proximité des zones d'intérêt majeur (ex : zones de baignade ou le long des quais fortement fréquentés).

Les deux principaux axes de contamination de l'eau par les leptospires peuvent être : le lessivage des sols et les rejets des bassins pluviaux (déversoirs d'orage). Cependant, aucune corrélation entre la survenue des pluies et la présence des leptospires n'a pu être identifiée dans notre étude. Cette hypothèse est donc avérée dans les pays tropicaux (dans lesquelles les plus sont considérables) mais ne semble pas être transposable en France, où les pluies ne sont pas suffisamment intenses pour jouer un rôle dans la dissémination des leptospires des sols vers les cours d'eau. Les résultats environnementaux permettent d'obtenir un premier aperçu du danger que pourrait représenter la présence des leptospires pathogènes dans les zones de baignade. Ces pathogènes semblent moins présents que dans les eaux de surface de la Seine. Ceci peut s'expliquer par de plus faibles sources de pollution dans le canal de l'Ourcq : absence de déversoirs d'orage rejetant des eaux usées, ces eaux ayant traversées les égouts dans lesquels séjournent les rats (Figure 37). A l'avenir, il serait intéressant d'analyser la présence de leptospires aux abords des bassins d'orage, lieu de collecte des eaux dégouts, potentiellement chargées en urine de rats.

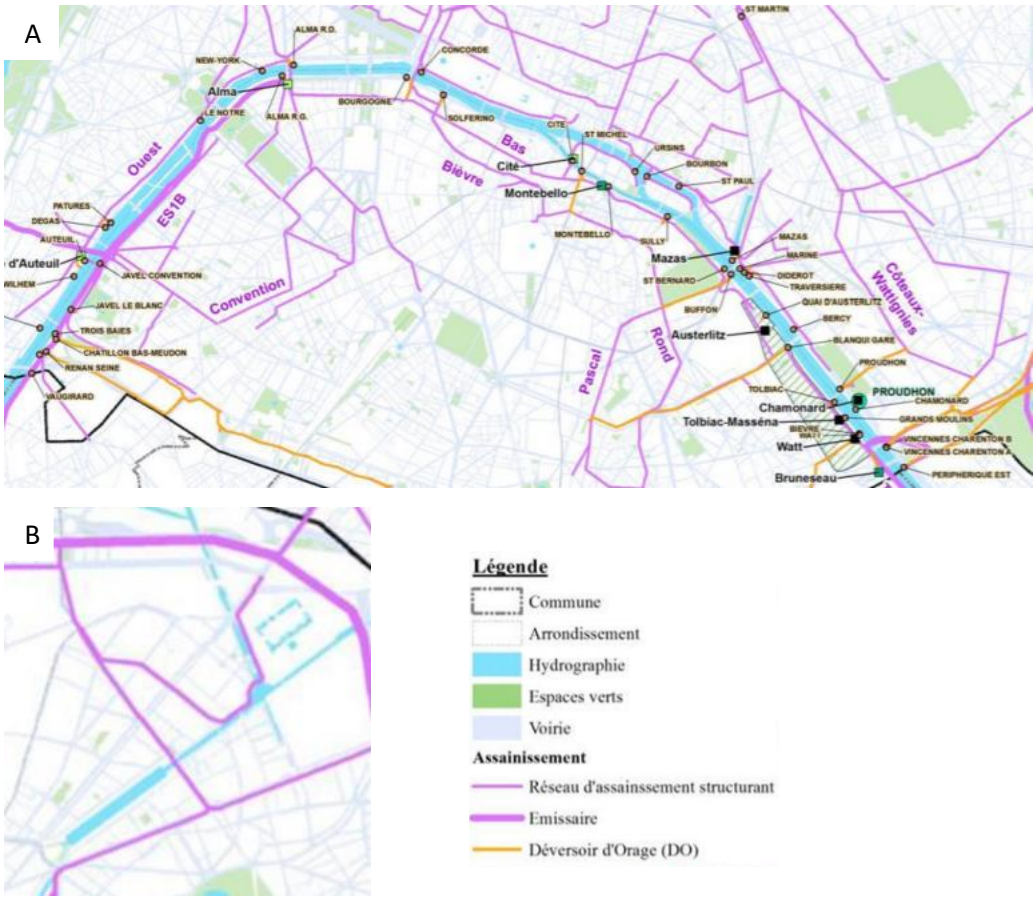


Figure 37. Localisation des déversoirs d'orage du réseau parisien le long de la Seine (A) et au niveau du bassin de la Villette (B) (ville de Paris).

Cette faible charge en pathogènes dans le canal de l'Ourcq peut également s'expliquer par une circulation maritime limitée depuis l'ouverture de la zone de baignade, ainsi qu'un faible débit d'eau qui entraient une absence de brassage des eaux et donc une tendance à la sédimentation des bactéries. Dans ces conditions, ces bactéries sont capables de former des biofilms pour se protéger des facteurs de stress environnementaux (Thibeaux et al., 2020, 2017b). Cependant, il est important de souligner que lors de la déstabilisation structurale de ces biofilms, un relargage important est possible en entrainant une charge bactérienne considérable et un risque élevé d'infection.

L'année 2020, en raison de son impact sanitaire et sociétal spécifique, peut avoir une influence sur la concentration de toutes les bactéries en raison de la diminution des activités humaines (périodes de confinement). Des études complémentaires dans ce sens pourraient confirmer ou infirmer l'impact de l'interruption de la circulation et des activités de la population pendant cette période sur la présence d'agents pathogènes dans l'environnement.

En vue de l'ouverture de la Seine à la baignade ou de l'organisation d'épreuves des JO de 2024 dans les eaux de surface parisiennes, un suivi des leptospires pourrait être envisagé en routine dans ces

zones afin d'anticiper la survenue de potentielles d'épidémies. A l'image de ce qui est déjà mis en place pour le suivi des indicateurs de contamination fécale dans le canal de l'Ourcq, la période d'analyse des leptospires dans ces zones peut se faire 15 jours avant l'ouverture de la zone et jusqu'à 15 jours après la fermeture. La métagénomique étant relativement chère et longue à mettre en place, l'analyse des leptospires par multiplex semble être une des techniques les plus appropriées. La multiplex a aussi l'avantage de distinguer la part des pathogènes et donc d'anticiper un risque potentiel pour les usagers de ces zones.

Ce travail a également souligné la présence de ces bactéries, uniquement pathogènes, chez les rats. Cette prévalence varie considérablement en fonction de la méthode de capture utilisée : 2% des rats capturés dans les pièges à l'éthanol (Ekomille®) étaient porteurs de leptospires pathogènes contre 32% pour ceux capturés à l'aide des furets. Dans le cadre d'analyses scientifiques, le choix de la méthode de capture est donc essentiel et déterminant pour obtenir des résultats exploitables. L'existence de réservoirs secondaires (ex : souris, hérissons, vison, chauves-souris, etc.) producteurs de leptospires doit également être envisagées, et pourraient apporter des réponses supplémentaires sur la prépondérance des leptospires saprophytes dans l'environnement, mais également sur la présence des pathogènes dans certaines zones.

Il est nécessaire de compléter ce projet avec une véritable analyse de risques. Evaluer, gérer et communiquer sur les risques sont les trois axes d'étude dont l'objectif global est la protection de la santé publique. Cependant, dans le cadre des leptospires, de nombreuses données permettant cette analyse sont encore méconnues comme par exemple la dose infectieuse et la virulence variable entre serovars impliqués dans la maladie. Ces données pourraient être utiles pour les approches d'évaluation quantitative des risques microbiologiques (EQRM). Retrouvées au sein des rats de rats, les leptospires pathogènes sont excrétées dans l'environnement via les urines mais ne sont que très rarement retrouvées dans les eaux de surface. Des études supplémentaires sur l'avenir des leptospires pathogènes (en particulier celle du rat : Icterohaemorrhagiae) pourraient être menées afin de comprendre ce qu'il advient de ces bactéries une fois relarguées dans l'environnement. Ces données de survie permettraient également d'obtenir de plus amples informations sur l'impact sanitaire de ces souches pathogènes, et établir des mesures en cas de forte augmentation dans les eaux : décision de fermeture d'un site, durée de fermeture, etc ; informations aujourd'hui non prises en compte dans le suivi de la qualité de l'eau.

Dans les zones de baignade et plus généralement dans les cours d'eau de surface, la décontamination de l'eau ne peut pas être envisagée avec une telle envergure. Ainsi, à défaut d'éliminer les différents pathogènes présents dans l'eau, une solution possible est d'endiguer le problème à la source en

agissant sur les sources de production de ces pathogènes. Cette démarche a déjà été appliquée dans le cadre de l'amélioration de la qualité de l'eau vis à vis de la contamination fécale, en améliorant les rejets des eaux usées. Dans le cas des leptospires, il s'agit d'agir sur les populations de rongeurs et plus particulièrement les rats. D'après les résultats de ce projet, la diminution de la part de leptospires pathogènes dans les eaux de surface parisiennes suggère une élimination ou une diminution des populations de rats dans ces zones. En régulant ce réservoir animal, cela permettrait également de réguler l'ensemble des autres pathogènes hébergés par les rongeurs, sans se limiter uniquement aux leptospires.

Les pathogènes du rat

La présence des rongeurs représente une problématique sanitaire majeure et une sérieuse menace pour la santé publique internationale. A travers le monde, les rongeurs constituent l'ordre de mammifères vivants le plus abondant et le plus diversifié. Cependant, en raison de leur adaptabilité comportementale, de leurs caractéristiques biologiques et de leur potentiel de reproduction élevé, le contrôle des rongeurs est particulièrement difficile (Capizzi et al., 2014) et leur prolifération reste dans la plupart du temps incontrôlée. Depuis le Moyen Âge, ces animaux sont vecteurs de nombreux pathogènes, plus ou moins dangereux pour l'homme et l'animal (Meerburg et al., 2009).

Dans ce travail, la destruction des organes par l'éthanol lors de la capture des rats représente un frein considérable à l'analyse des leptospires portées par les rongeurs. Le choix dans la méthode de capture est donc essentiel afin de mener à bien des études scientifiques pertinentes dans l'évaluation des pathogènes. Des études complémentaires sur la prévalence des leptospires pourraient être développées plus largement sur le territoire pour confirmer le portage réel des rongeurs. L'analyse de leur présence chez d'autres rongeurs que le rat doit également être envisagé. Enjeu politique et sanitaire, la présence des rats et leur rôle dans la prolifération de pathogènes doivent être clairement établis et scientifiquement argumentés.

Dans les environnements urbains les espèces de rongeurs *Rattus rattus* et *Rattus norvegicus* sont majoritairement associées à une forte diversité microbienne, ainsi qu'à des zoonoses multi-hôtes capables de transmission environnementale (Blasdell et al., 2021). Transmises par la puce endémique (*Synopsyllus fonquerniei*) par l'intermédiaire de ces rongeurs, la peste est l'une des zoonoses les plus marquantes (Meerburg et al., 2009). Virus, bactérie, parasites, une multitude de maladies peuvent être transmises par ces rongeurs. Parmi les virus les plus répandus, on trouve les hantavirus à l'origine du syndrome pulmonaire à hantavirus (SPH) (Nichol et al., 1993) et de la fièvre hémorragique avec syndrome rénal (FHSR) (Schmaljohn, 1997), mais également les virus du genre Nairovirus entraînant la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (Scarlatescu and Lance, 2019). Les bactéries les plus fréquentes

sont les leptospires (Adler, 2015), les borrélies à l'origine de la maladie de Lyme (Shih and Chao, 1998) et de la fièvre récurrente transmise par les tiques (TBRF) (Schwan, 1998), *Rickettsia mooseri* provoquant le typhus des broussailles et murin (Gray et al., 2007), ou encore les salmonelles (Meerburg and Kijlstra, 2007) et le bacille *Francisella tularensis* (Friedl et al., 2005). Des parasites sont également très présents chez les rongeurs : le protozoaire *Toxoplasma gondii* pour la toxoplasmose (Grzybek et al., 2021), *Babesia divergens* (Homer, 2000), les parasites protozoaires du genre *Cryptosporidium* (WHO), mais également les parasites des genres *Giardia* (Adam, 1991) et *Taenia* (Hoberg, 2002). Une première étude sur l'analyse du SARS-Cov2 chez les rongeurs n'a pas permis de mettre en évidence de corrélation entre ce pathogène et ce réservoir potentiel (Colombo et al., 2021).

La lutte contre la prolifération des rongeurs doit permettre également de réduire leur abondance et ainsi diminuer la transmission des maladies. Différentes méthodes sont mises en place pour atteindre cet objectif, dont l'utilisation de pièges vivants, de pièges à pression et de rodenticides. Ces techniques présentent des efficacités différentes et ne permettraient pas de réduire durablement les populations de rongeurs (Rahelinirina et al., 2021). Cependant, dans le cas de l'Ile-de-France, il serrait pertinent d'étudier l'impact de l'intensification de la dératisation sur les populations de rongeurs.

Le manque de connaissances sur l'écologie des rats entrave les programmes de gestion et compromet l'évaluation et la gestion des risques sanitaires associés à ces rongeurs. Pour cela, il est nécessaire de mettre en place des stratégies de prévention intégrées. Une surveillance accrue des populations de rongeurs, une meilleure compréhension des changements démographiques et l'impact du climat sur la densité de ces populations sont fondamentaux afin d'anticiper les fréquences des maladies actuelles ou à venir. Dans ce but, des projets sont actuellement menés afin de répondre à ces nombreuses problématiques soulevées par la forte présence des rongeurs dans les zones urbaines (Meerburg et al., 2009) et ainsi identifier clairement l'ensemble des paramètres relatifs aux rats (écologie, maladies, etc.) (projet ANR ARMAGUEDON).

Des modèles statistiques utilisant des données passées liées à une maladie, des facteurs abiotiques et biotiques permettent de construire des modèles épidémiologiques afin d'analyser et d'interrompre les cycles de transmission (Baca-Carrasco et al., 2015; Davis et al., 2008; Ulrich et al., 2009). Bien que le contrôle des populations de rongeurs permette en partie de réduire l'impact des maladies transmises par les rongeurs, les programmes de lutte doivent considérer avec précaution l'épidémiologie locale des zoonoses et la dynamique des populations de rongeurs (Rahelinirina et al., 2021).

Dans les zones urbaines, les stratégies de prévention ont pour but de limiter et contrôler la prolifération des rongeurs, avec notamment la mise en place de campagnes de dératisation. Dans les

zones rurales, l'éducation et la sensibilisation des populations semblent être les principaux leviers d'action contre les contaminations et l'application de comportements à risque.

Dans certains cas, les mesures de lutte contre les rongeurs peuvent avoir un effet inverse et augmenter la prévalence des maladies. Ces moyens d'action ont des effets sur les déplacements des rongeurs et sur les interactions entre l'homme et l'animal comme il a été constaté pour la tuberculose bovine (bTB) chez les blaireaux (Bielby et al., 2016; Smith and Delahay, 2018) et la leptospirose chez les rats bruns en zone urbaine (Lee et al., 2018). Les rongeurs parviennent à échapper à cette élimination en migrant dans les zones environnantes (initialement exempts de pathogènes) (Krebs et al., 2011; Sullivan et al., 2003, 2001), en augmentant leur reproduction et en accélérant leur maturation (Singleton, 1997).

Les adaptations anthropiques

L'identification de la source de production de leptospires est essentielle pour maitriser l'impact de ces bactéries sur la santé publique. Cependant, il serait nécessaire d'obtenir des informations sur les cas de leptospiroses humaines au sein de l'Ile de France. Cette collecte d'information était initialement intégrée dans le projet. Cependant, elle n'a pas pu être réalisée en raison de difficultés liées à la récupération des données médicales auprès des hôpitaux. De même, le personnel médical et les médecins généralistes ne sont pas toujours bien sensibilisés au sujet de cette maladie, ce qui complique également la remontée des informations. L'amélioration du diagnostic et de l'isolement chez l'homme, ainsi qu'une meilleure information du personnel soignant pourraient faciliter la prise en compte de cette maladie. A l'avenir, une telle étude permettrait de compléter les données entre les rats, l'environnements et les hommes, et ainsi de finaliser le troisième maillon du triptyque OneHealth. Par manque de données humaines, le projet a été orienté sur les analyses environnementale et animale.

En cas de confirmation du rat en tant que réservoir principal avéré de leptospires, des mesures de prévention et la limitation de prolifération de ces pathogènes doivent être envisagées. Un des axes majeurs repose sur la modification des habitudes anthropiques et la maitrise de l'impact des activités humaines sur l'environnement. Avec les changements sociaux en cours, les activités liées à l'eau se sont multipliées, avec l'installation de plages urbaines, de zones de baignade et d'activités aquatiques dans les zones aux eaux de surface non traitées, augmentant ainsi l'exposition. Ce contrôle de prolifération des rongeurs passe par des mesures de gestion des déchets limitant l'attrait des zones d'activités par ces animaux. Ces mesures passent par des solutions de salubrité telles que l'utilisation de poubelles hermétiques, le raccourcissement du délai avant ramassage des ordures et la limitation du rejet de nourriture ; afin de restreindre l'attrait des rats pour ces zones fortement fréquentées,

surtout en période estivale ou d'autres paramètres peuvent accroitre le risque (température, etc.) (Adler 2015 ; Joshi 2017).

Ces améliorations dans les comportements humains devraient avoir un impact sur la prolifération des rongeurs ce qui pourrait entrainer une diminution du nombre de cas de leptospirose humaine liées aux activités aquatiques. Dans ces zones de baignade ou d'activités, la prévention des usagers reste primordiale par différents moyens (affichage, dépliant, sensibilisation) (Jittimanee and Wongbutdee, 2019). Des campagnes d'informations dans les zones à risque semblent être un bon moyen de prévention pour lutter contre les épidémies et doivent être envisagées dans les zones décrites dans cette étude : canal de l'Ourcq pour la baignade surveillée mais également le long de la Seine pour la baignade sauvage. L'information aux usagers pourrait également permettre une meilleure remontée des informations en cas d'infection par les leptospires, auprès des médecins généralistes et des services hospitaliers.

Actuellement, seuls deux paramètres microbiologiques (Escherichia coli et les entérocoques intestinaux) sont pris en compte dans la réglementation relative à l'ouverture des zones de baignade et n'inclut pas encore d'autres pathogènes, probablement en raison de l'absence de méthodes de mesure fiables (Code de la santé publique-D. 1332-15D1332-15). Pour certaines municipalités, les coûts élevés des prélèvements et des analyses ajoutés à de longs délais des laboratoires (48-72 h) rendent également difficiles cette surveillance ainsi que la fermeture des zones en temps réel (Sanborn, 2013). Cependant, au vu de la grande diversité des pathogènes présents dans l'environnement et des potentiels risques qu'ils font encourir à l'homme ou l'animal, il semblerait judicieux d'intégrer le suivi d'une partie de ces pathogènes dans les contrôles sanitaires (ex : *Campylobacter*, *Salmonella*, *Giardia*, *Leptospira*, virus et amibes). Bien que les maladies gastro-intestinales dues aux norovirus et aux rotavirus soient les maladies les plus fréquentes lors de l'utilisation des eaux de surface à des fins récréatives, d'autres pathogènes se retrouvent aussi dans l'eau de baignade et causent des maladies estivales (Yoder, 2008). Le spectre de ces maladies est large. Il fluctue entre des problèmes mineurs comme la dermatite des nageurs causée par des schistosomes, à des maladies respiratoires avec les adénovirus ou encore la leptospirose et dans de rares cas, la méningoencéphalite amibienne primitive causée par l'amibe *Naegleria fowleri* (Yoder, 2008).

Le risque de leptospirose dans les eaux de baignade est connu dans la communauté scientifique. Cette question peut également être transposée à d'autres types d'eau ayant des usages bien différents. En plus des données déjà existantes dans la littérature, les données présentées ici sur les traitements d'inactivation donnent une première idée du peu de résistance des leptospires vis-à-vis des techniques utilisées dans les filières d'eau potable (UV, chlore, etc.) (Andre-Fontaine et al., 2015).

Les eaux de surface, potentiellement contaminées par des leptospires, sont utilisées dans la production d'eau non potable, dans les zones urbaines. Dans ces zones, les populations peuvent également entrer en contact direct avec cette eau, lors de l'arrosage des parcs et jardins ou encore lors du lavage de la voierie. L'analyse de risque liée à l'utilisation de ce type est donc essentielle dans le cadre de l'amélioration des conditions sanitaires.

Références

Abdulmawjood, A., Roth, S., Bülte, M., 2002. Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of Escherichia coli O157 by polymerase chain reaction. Molecular and Cellular Probes 16, 335–339. https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0431

Abgueguen, P., Delbos, V., Blanvillain, J., Chennebault, J.M., Cottin, J., Fanello, S., Pichard, E., 2008. Clinical aspects and prognostic factors of leptospirosis in adults. Retrospective study in France. Journal of Infection 57, 171–178. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2008.06.010

Adam, R.D., 1991. The biology of Giardia spp. Microbiol Rev 55, 706–732. https://doi.org/10.1128/mr.55.4.706-732.1991

Adler, B. (Ed.), 2015. Leptospira and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8

Adler, B., Moctezuma, A.D.L.P., 2010. Leptospira. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals: Fourth Edition 527–547. https://doi.org/10.1002/9780470958209.ch28

Agampodi, S.B., Karunarathna, D., Jayathilala, N., Rathnayaka, H., Agampodi, T.C., Karunanayaka, L., 2014. Outbreak of leptospirosis after white-water rafting: sign of a shift from rural to recreational leptospirosis in Sri Lanka? Epidemiol. Infect. 142, 843–846. https://doi.org/10.1017/S0950268813001465

Agampodi, S.B., Matthias, M.A., Moreno, A.C., Vinetz, J.M., 2012. Utility of quantitative polymerase chain reaction in leptospirosis diagnosis: association of level of leptospiremia and clinical manifestations in Sri Lanka. Clin Infect Dis 54, 1249–1255. https://doi.org/10.1093/cid/cis035

Ahmed, A., Engelberts, M.F.M., Boer, K.R., Ahmed, N., Hartskeerl, R.A., 2009. Development and Validation of a Real-Time PCR for Detection of Pathogenic Leptospira Species in Clinical Materials. PLoS ONE 4, e7093. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007093

Ahmed, A., Thaipadungpanit, J., Boonsilp, S., Wuthiekanun, V., Nalam, K., Spratt, B.G., Aanensen, D.M., Smythe, L.D., Ahmed, N., Feil, E.J., Hartskeerl, R.A., Peacock, S.J., 2011. Comparison of Two Multilocus Sequence Based Genotyping Schemes for Leptospira Species. PLoS Negl Trop Dis 5, e1374. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001374

Al Hariri, Y.K., Sulaiman, S.A.S., Khan, A.H., Adnan, A.S., Al Ebrahem, S.Q., 2019. Mortality of leptospirosis associated acute kidney injury (LAKI) & predictors for its development in adults: A systematic review. Journal of Infection and Public Health 12, 751–759. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.014

Alexander, A.D., Evans, L.B., Baker, M.F., Baker, H.J., Ellison, D., Marriapan, M., 1975. Pathogenic Leptospiras Isolated from Malaysian Surface Waters 29, 4.

Allan, K.J., Biggs, H.M., Halliday, J.E.B., Kazwala, R.R., Maro, V.P., Cleaveland, S., Crump, J.A., 2015. Epidemiology of Leptospirosis in Africa: A Systematic Review of a Neglected Zoonosis and a Paradigm for 'One Health' in Africa. PLoS Negl Trop Dis 9, e0003899. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003899

Allen, H.A., 2015. Characterizing zoonotic disease detection in the United States: Who detects zoonotic disease outbreaks & how fast are they detected? Journal of Infection and Public Health 8, 194–201. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2014.09.009

Allocati, N., 2016. Bat–man disease transmission: zoonotic pathogens from wildlife reservoirs to human populations. Nature.

Andre-Fontaine, G., Aviat, F., Thorin, C., 2015. Waterborne Leptospirosis: Survival and Preservation of the Virulence of Pathogenic Leptospira spp. in Fresh Water. Curr Microbiol 71, 136–142. https://doi.org/10.1007/s00284-015-0836-4

Andreoli, 2014. Leptospira spp. infection in wild ruminants: a survey in Central Italian Alps. Veterinaria Italiana 50, 285–291. https://doi.org/10.12834/VetIt.1309.06

Avalos-Téllez, R., Carrillo-Casas, E.M., Atilano-López, D., Godínez-Reyes, C.R., Díaz-Aparicio, E., Ramírez-Delgado, D., Ramírez-Echenique, M.F., Leyva-Leyva, M., Suzán, G., Suárez-Güemes, F., 2016. PATHOGENIC *LEPTOSPIRA* SEROVARS IN FREE-LIVING SEA LIONS IN THE GULF OF

CALIFORNIA AND ALONG THE BAJA CALIFORNIA COAST OF MEXICO. Journal of Wildlife Diseases 52, 199–208. https://doi.org/10.7589/2015-06-133
Aviat, F., Rochereau-Roulet, S., Branger, C., Estavoyer, J.M., Chatrenet, B., Orsonneau, J.L., Thorin, C., Andre-Fontaine, G., 2010. Synthetic peptide issued from Hap1/LipL32 for new early serodiagnosis of human leptospirosis. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 33, 375–387. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2009.01.001
Ayral, F., Zilber, A.-L., Bicout, D.J., Kodjo, A., Artois, M., Djelouadji, Z., 2015. Distribution of Leptospira interrogans by Multispacer Sequence Typing in Urban Norway Rats (Rattus norvegicus): A Survey in France in 2011-2013. PLoS ONE 10, e0139604. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139604
Azali, M.A., Yean Yean, C., Harun, A., Aminuddin Baki, N.N., Ismail, N., 2016. Molecular Characterization of *Leptospira* spp. in Environmental Samples from North-Eastern Malaysia Revealed a Pathogenic Strain, *Leptospira alstonii*. Journal of Tropical Medicine 2016, 1–7. https://doi.org/10.1155/2016/2060241
Azhari, M.E., Picardeau, M., Cherkaoui, I., Sadat, M.A., Moumni, H., Filali, K.M.E., Ghazal, H., Maaroufi, A., Hamdi, S., Mdaghri, N.E., Bourhy, P., 2020. Seroprevalence of Leptospirosis among High-Risk Individuals in Morocco. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases 8.
Azócar-Aedo, L., Monti, G., Jara, R., 2014. Leptospira spp. in Domestic Cats from Different Environments: Prevalence of Antibodies and Risk Factors Associated with the Seropositivity. Animals 4, 612–626. https://doi.org/10.3390/ani4040612
Babudieri, B., 1971. Proposed Standardization of the Agglutination-Adsorption Test for Leptospira 16.
Baca-Carrasco, D., Olmos, D., Barradas, I., 2015. A mathematical model for human and animal leptospirosis. J. Biol. Syst. 23, S55–S65. https://doi.org/10.1142/S0218339015400057
Bajani, M.D., Ashford, D.A., Bragg, S.L., Woods, C.W., Aye, T., Spiegel, R.A., Plikaytis, B.D., Perkins, B.A., Phelan, M., Levett, P.N., Weyant, R.S., 2003. Evaluation of Four Commercially Available Rapid Serologic Tests for Diagnosis of Leptospirosis. Journal of Clinical Microbiology 41, 803–809. https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.803-809.2003
Baker, M.F., Baker, H.J., 1970. Pathogenic Leptospira in Malaysian Surface Waters: I. A Method of Survey for Leptospira in Natural Waters and Soils. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 19, 485–492. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1970.19.485
Bandara, M., Ananda, M., Wickramage, K., Berger, E., Agampodi, S., 2014. Globalization of leptospirosis through travel and migration. Global Health 10, 61. https://doi.org/10.1186/s12992-014-0061-0
Barbour, A.G., Adeolu, M., Gupta, R.S., 2017. Division of the genus Borrelia into two genera (corresponding to Lyme disease and relapsing fever groups) reflects their genetic and phenotypic distinctiveness and will lead to a better understanding of these two groups of microbes (Margos et al. (2016) There is inadequate evidence to support the division of the genus Borrelia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. doi: 10.1099/ijsem.0.001717). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 67, 2058–2067. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001815
Barragan, V., Chiriboga, J., Miller, E., Olivas, S., Birdsell, D., Hepp, C., Hornstra, H., Schupp, J.M., Morales, M., Gonzalez, M., Reyes, S., de la Cruz, C., Keim, P., Hartskeerl, R., Trueba, G., Pearson, T., 2016. High Leptospira Diversity in Animals and Humans Complicates the Search for Common Reservoirs of Human Disease in Rural Ecuador. PLoS Negl Trop Dis 10, e0004990. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004990
Barragan, V., Nieto, N., Keim, P., Pearson, T., 2017. Meta-analysis to estimate the load of Leptospira excreted in urine: beyond rats as important sources of transmission in low-income rural communities. BMC Res Notes 10, 71. https://doi.org/10.1186/s13104-017-2384-4
Barragan, V.A., Mejia, M.E., Trávez, A., Zapata, S., Hartskeerl, R.A., Haake, D.A., Trueba, G.A., 2011a. Interactions of Leptospira with Environmental Bacteria from Surface Water. Curr Microbiol 62, 1802–1806. https://doi.org/10.1007/s00284-011-9931-3

Barragan, V.A., Mejia, M.E., Trávez, A., Zapata, S., Hartskeerl, R.A., Haake, D.A., Trueba, G.A., 2011b. Interactions of Leptospira with Environmental Bacteria from Surface Water. Curr Microbiol 62, 1802–1806. https://doi.org/10.1007/s00284-011-9931-3

Beaudu-Lange, C., Lange, E., 2014. Unusual clinical presentation of leptospirosis in a cat. Revue Vétérinaire Clinique 49, 115–122. https://doi.org/10.1016/j.anicom.2014.05.001

Bedir, O., Kilic, A., Atabek, E., Kuskucu, A.M., Turhan, V., Basustaoglu, A.C., 2010. Simultaneous Detection and Differentiation of Pathogenic and Nonpathogenic Leptospira spp. by Multiplex Real-Time PCR (TaqMan) Assay. Pol J Microbiol 59, 167–173. https://doi.org/10.33073/pjm-2010-026

Belum, G.R., Belum, V.R., Chaitanya Arudra, S.K., Reddy, B.S.N., 2013. The Jarisch–Herxheimer reaction: Revisited. Travel Medicine and Infectious Disease 11, 231–237. https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2013.04.001

Benacer, D., Woh, P.Y., Mohd Zain, S.N., Amran, F., Thong, K.L., 2013. Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Species in Water and Soils from Selected Urban Sites in Peninsular Malaysia. Microb. Environ. 28, 135–140. https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12154

Benacer, D., Zain, S.N.M., Lewis, J.W., Khalid, M.K.N.M., Thong, K.L., 2017. A duplex endpoint PCR assay for rapid detection and differentiation of Leptospira strains. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 50, 239–242. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0364-2016

Bertasio, C., Boniotti, M.B., Lucchese, L., Ceglie, L., Bellinati, L., Mazzucato, M., Furlanello, T., D'Incau, M., Natale, A., 2020. Detection of New Leptospira Genotypes Infecting Symptomatic Dogs: Is a New Vaccine Formulation Needed? Pathogens 9, 484. https://doi.org/10.3390/pathogens9060484

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. The Lancet Infectious Diseases 3, 757–771. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00830-2

Bielby, J., Vial, F., Woodroffe, R., Donnelly, C.A., 2016. Localised Badger Culling Increases Risk of Herd Breakdown on Nearby, Not Focal, Land. PLoS ONE 11, e0164618. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164618

Bierque, E., Soupé-Gilbert, M.-E., Thibeaux, R., Girault, D., Guentas, L., Goarant, C., 2020a. Leptospira interrogans Retains Direct Virulence After Long Starvation in Water. Curr Microbiol 77, 3035–3043. https://doi.org/10.1007/s00284-020-02128-7

Bierque, E., Thibeaux, R., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.-E., Goarant, C., 2020b. A systematic review of Leptospira in water and soil environments. PLoS ONE 15, e0227055. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227055

Biscornet, L., 2020. Leptospirosis in the Seychelles: geographic, molecular and epidemiological investigations of a zoonotic disease in a tropical insular environment 227.

Biscornet, L., de Comarmond, J., Bibi, J., Mavingui, P., Dellagi, K., Tortosa, P., 2020. An Observational Study of Human Leptospirosis in Seychelles 10.

Blasdell, K.R., Morand, S., Laurance, S.G.W., Doggett, S.L., Hahs, A., Perera, D., Firth, C., 2021. Rats in the city: implications for zoonotic disease risk in an urbanizing world (preprint). Ecology. https://doi.org/10.1101/2021.03.18.436089

Boey, K., Shiokawa, K., Rajeev, S., 2019. Leptospira infection in rats: A literature review of global prevalence and distribution. PLoS Negl Trop Dis 13, e0007499. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007499

Boland, M., Sayers, G., Coleman, T., Bergin, C., Sheehan, N., Creamer, E., O'Connell, M., Jones, L., Zochowski, W., 2004. A cluster of leptospirosis cases in canoeists following a competition on the River Liffey. Epidemiol. Infect. 132, 195–200. https://doi.org/10.1017/S0950268803001596

Bourhy, P., 2016. DIAGNOSTIC, SURVEILLANCE ET EPIDEMIOLOGIE DE LA LEPTOSPIROSE EN FRANCE / DIAGNOSIS, SURVEILLANCE, AND EPIDEMIOLOGY OF LEPTOSPIROSIS IN FRANCE 7.

Bourhy, P., Collet, L., Brisse, S., Picardeau, M., 2014. Leptospira mayottensis sp. nov., a pathogenic species of the genus Leptospira isolated from humans. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 64, 4061–4067. https://doi.org/10.1099/ijs.0.066597-0

Bourhy, P., Hochedez, P., Picardeau, M., 2012. Leptospirose. EMC - Maladies infectieuses 9, 1–12. https://doi.org/10.1016/S1166-8598(12)56976-0

Bouscaren, N., Benoit de Coignac, C., Lastère, S., Musso, D., Teissier, Y., Formont, J., Chaix, F., Giard, M., 2019a. Leptospirosis in French Polynesia: 11 years of surveillance data, 2007–2017. New Microbes and New Infections 29, 100518. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100518

Bouscaren, N., Benoit de Coignac, C., Lastère, S., Musso, D., Teissier, Y., Formont, J., Chaix, F., Giard, M., 2019b. Leptospirosis in French Polynesia: 11 years of surveillance data, 2007–2017. New Microbes and New Infections 29, 100518. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100518

Bragg, S.L., Plikaytis, B., Perkins, B.A., Kaiser, R.M., Weyant, R.S., Spiegel, R.A., Amador, J.J., Jarquin, C., Ashford, D.A., De Lose Reyes, J.O., 2000. Asymptomatic infection and risk factors for leptospirosis in Nicaragua. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 63, 249–254. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.63.249

Brandt, J., Albertsen, M., 2018. Investigation of Detection Limits and the Influence of DNA Extraction and Primer Choice on the Observed Microbial Communities in Drinking Water Samples Using 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing. Front. Microbiol. 9, 2140. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02140

Brenner, D.J., Kaufmann, A.F., Sulzer, K.R., Steigerwalt, A.G., Rogers, F.C., Weyant, R.S., 1999. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for Leptospira alexanderi sp. nov. and four new Leptospira genomospecies. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 2, 839–858. https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-839

Bridges, D.F., Lacombe, A., Wu, V.C.H., 2020. Integrity of the Escherichia coli O157:H7 Cell Wall and Membranes After Chlorine Dioxide Treatment. Front. Microbiol. 11, 888. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00888

Brightman, C., 2018. Leptospirosis: a leisure and occupational hazard. Trends Urology & Men Health 9, 29–31. https://doi.org/10.1002/tre.619

Brinker, A.J., Blazes, D.L., 2017. An outbreak of Leptospirosis among United States military personnel in Guam 5.

Brockmann, S., Piechotowski, I., Bock-Hensley, O., Winter, C., Oehme, R., Zimmermann, S., Hartelt, K., Luge, E., Nöckler, K., Schneider, T., Stark, K., Jansen, A., 2010. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants in Germany, 2006. BMC Infect Dis 10, 91. https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-91

Brown, P.D., Gravekamp, C., Carrington, D.G., van de Kemp, H., Hartskeerl, R.A., Edwards, C.N., Everard, C.O., Terpstra, W.J., Levett, P.N., 1995. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. J Med Microbiol 43, 110–114. https://doi.org/10.1099/00222615-43-2-110

Budihal, S.V., 2014. Leptospirosis Diagnosis: Competancy of Various Laboratory Tests. JCDR. https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/6593.3950

Bulach, D., Adler, B., 2018. Leptospiral Genomics and Pathogenesis, in: Adler, B. (Ed.), Spirochete Biology: The Post Genomic Era, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer International Publishing, Cham, pp. 189–214. https://doi.org/10.1007/82_2018_87

Bulach, D.M., Zuerner, 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., Davies, J.K., Adler, B., 2006. Genome reduction in Leptospira borgpetersenii reflects limited transmission potential. Proceedings of the National Academy of Sciences 103, 14560–14565. https://doi.org/10.1073/pnas.0603979103

Bultman, M.W., Fisher, F.S., Pappagianis, D., 2013. The Ecology of Soil-Borne Human Pathogens, in: Selinus, O. (Ed.), Essentials of Medical Geology: Revised Edition. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 477–504. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4375-5_20

Burt, F.J., Rolph, M.S., Rulli, N.E., Mahalingam, S., Heise, M.T., 2012. Chikungunya: a re-emerging virus. The Lancet 379, 662–671. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60281-X

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clinical Chemistry 55, 611–622. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797

Byers, K.A., Lee, M.J., Patrick, D.M., Himsworth, C.G., 2019. Rats About Town: A Systematic Review of Rat Movement in Urban Ecosystems. Front. Ecol. Evol. 7. https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00013

Cabral Pires, B., Berzin Grapiglia, J., Moreira, L., Jaeger, L.H., Carvalho-Costa, F.A., Lilenbaum, W., 2018. Occurrence of uterine carriers for Leptospira interrogans on slaughtered cows. Microbial Pathogenesis 114, 163–165. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.056

Cacciapuoti, B., Ciceroni, L., Maffei, C., Stanislao, F.D., Strusi, P., Calegari, L., Lupidi, R., Scalise, G., Cagnoni, G., Renga, G., 1987. A WATERBORNE OUTBREAK OF LEPTOSPIROSIS. American Journal of Epidemiology 126, 535–545. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114686

Cagliero, J., Villanueva, S.Y.A.M., Matsui, M., 2018. Leptospirosis Pathophysiology: Into the Storm of Cytokines. Front. Cell. Infect. Microbiol. 8, 204. https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00204

Caimi, K., Ruybal, P., 2020. Leptospira spp., a genus in the stage of diversity and genomic data expansion. Infection, Genetics and Evolution 81, 104241. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104241

Calderón, A., Rodríguez, V., Máttar, S., Arrieta, G., 2014. Leptospirosis in pigs, dogs, rodents, humans, and water in an area of the Colombian tropics. Trop Anim Health Prod 46, 427–432. https://doi.org/10.1007/s11250-013-0508-y

Cameron, C.E., 2015. Leptospiral Structure, Physiology, and Metabolism, in: Adler, B. (Ed.), Leptospira and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 21–41. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_3

Capizzi, D., Bertolino, S., Mortelliti, A., 2014. Rating the rat: global patterns and research priorities in impacts and management of rodent pests: Rating the rat. Mammal Review 44, 148–162. https://doi.org/10.1111/mam.12019

Carles, G., Montoya, E., Joly, F., Peneau, C., 1995. [Leptospirosis and pregnancy. Eleven cases in French Guyana]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 24, 418–421.

Casanovas-Massana, A., Costa, F., Riediger, I.N., Cunha, M., de Oliveira, D., Mota, D.C., Sousa, E., Querino, V.A., Nery, N., Reis, M.G., Wunder, E.A., Diggle, P.J., Ko, A.I., 2018a. Spatial and temporal dynamics of pathogenic Leptospira in surface waters from the urban slum environment. Water Research 130, 176–184. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.068

Casanovas-Massana, A., Hamond, C., Santos, L.A., de Oliveira, D., Hacker, K.P., Balassiano, I., Costa, F., Medeiros, M.A., Reis, M.G., Ko, A.I., Wunder, E.A., 2020. Leptospira yasudae sp. nov. and Leptospira stimsonii sp. nov., two new species of the pathogenic group isolated from environmental sources. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 70, 1450–1456. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003480

Casanovas-Massana, A., Pedra, G.G., Wunder, E.A., Diggle, P.J., Begon, M., Ko, A.I., 2018b. Quantification of Leptospira interrogans Survival in Soil and Water Microcosms. Appl Environ Microbiol 84. https://doi.org/10.1128/AEM.00507-18

Casanovas-Massana, A., Pedra, G.G., Wunder, E.A., Diggle, P.J., Begon, M., Ko, A.I., 2018c. Quantification of Leptospira interrogans Survival in Soil and Water Microcosms. Appl Environ Microbiol 84. https://doi.org/10.1128/AEM.00507-18

Cassadou, S., Rosine, J., Flamand, C., Ledrans, M., Bourhy, P., Quénel, P., 2011. Incidence de la leptospirose aux Antilles.

Cerqueira, G.M., Picardeau, M., 2009. A century of Leptospira strain typing. Infection, Genetics and Evolution 9, 760–768. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.009

Cerri, D., Nuvoloni, R., Ebani, V., Pedrini, A., Mani, P., Andreani, E., Farina, R., 1996. Leptospira interrogans serovar hardjo in the kidneys and genital tracts of naturally infected sheep. New Microbiol 19, 175–178.

CFSPH, 2013. Leptospirosis.

Chadsuthi, S., Chalvet-Monfray, K., Wiratsudakul, A., Modchang, C., 2021. The effects of flooding and weather conditions on leptospirosis transmission in Thailand. Sci Rep 11, 1486. https://doi.org/10.1038/s41598-020-79546-x

Chaiwattanarungruengpaisan, S., Suwanpakdee, S., Sangkachai, N., Chamsai, T., Taruyanon, K., Thongdee, M., 2018. Potentially Pathogenic *Leptospira* Species Isolated from a Waterfall in Thailand. Jpn J Infect Dis 71, 65–67. https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2017.363

Chakraborty, A., Miyahara, S., Villanueva, S.Y.A.M., Saito, M., Gloriani, N.G., Yoshida, S., 2011. A novel combination of selective agents for isolation of Leptospira species: Selective medium for Leptospira. Microbiology and Immunology 55, 494–501. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2011.00347.x

Chang, S.L., Buckingham, M., Taylor, M.P., 1948a. Studies on Leptospira Icterohaemorrhagiae: IV. Survival in Water and Sewage: Destruction in Water by Halogen Compounds, Synthetic Detergents, and Heat. Journal of Infectious Diseases 82, 256–266. https://doi.org/10.1093/infdis/82.3.256

Chang, S.L., Buckingham, M., Taylor, M.P., 1948b. Studies on Leptospira Icterohaemorrhagiae: IV. Survival in Water and Sewage: Destruction in Water by Halogen Compounds, Synthetic Detergents, and Heat. Journal of Infectious Diseases 82, 256–266. https://doi.org/10.1093/infdis/82.3.256

Chaturongkasumrit, Y., Techaruvichit, P., Takahashi, H., Kimura, B., Keeratipibul, S., 2013. Microbiological evaluation of water during the 2011 flood crisis in Thailand. Science of The Total Environment 463–464, 959–967. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.071

Chawla, V., Trivedi, T., Yeolekar, M., 2004. Epidemic of leptospirosis: An ICU experience. The Journal of the Association of Physicians of India 52, 619–22.

Cheng, Y., Chen, H., Sánchez Basurto, L.A., Protasenko, V.V., Bharadwaj, S., Islam, M., Moraru, C.I., 2020. Inactivation of Listeria and E. coli by Deep-UV LED: effect of substrate conditions on inactivation kinetics. Sci Rep 10, 3411. https://doi.org/10.1038/s41598-020-60459-8

Cho, M., Kim, J., Kim, J.Y., Yoon, J., Kim, J.-H., 2010. Mechanisms of Escherichia coli inactivation by several disinfectants. Water Research 44, 3410–3418. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.03.017

Cilia, G., Fratini, F., Buona, E. della, Bertelloni, F., 2020. Preliminary Evaluation of In Vitro Bacteriostatic and Bactericidal Effect of Salt on Leptospira spp. Veterinary Sciences 7, 154. https://doi.org/10.3390/vetsci7040154

Cinco, M., Banfi, E., Schonberg, A., Everard, C.O.R., 1987. Classification of Seven Leptospira Water Strains by Classical Methods and Identification of Three New Serovars. International Journal of Systematic Bacteriology 37, 296–297. https://doi.org/10.1099/00207713-37-3-296

CNR de la leptospirose, 2019. Rapport annuel d'activité.

CNR de la leptospirose, 2018. Rapport annuel d'activité.

Coghlan, J.D., Kmety, E., 1987. A new serovar *mogdeni* of serogroup Tarassovi of *Leptospira interrogans* isolated from a sewage plant in England. Epidemiol. Infect. 99, 373–377. https://doi.org/10.1017/S0950268800067856

Colombo, V.C., Sluydts, V., Mariën, J., Broecke, B.V., Van Houtte, N., Leirs, W., Jacobs, L., Iserbyt, A., Hubert, M., Heyndrickx, L., Goris, H., Delputte, P., De Roeck, N., Elst, J., Boudewijns, R., Ariën, K.K., Leirs, H., Gryseels, S., 2021. SARS-CoV-2 surveillance in Norway rats (*Rattus norvegicus*) from Antwerp sewer system, Belgium (preprint). Ecology. https://doi.org/10.1101/2021.03.06.433708

Concepción-Acevedo, J., Patel, A., Luna-Pinto, C., Peña, R.G., Cuevas Ruiz, R.I., Arbolay, H.R., Toro, M., Deseda, C., De Jesus, V.R., Ribot, E., Gonzalez, J.-Q., Rao, G., De Leon Salazar, A., Ansbro, M., White, B.B., Hardy, M.C., Georgi, J.C., Stinnett, R., Mercante, A.M., Lowe, D., Martin, H.,

Starks, A., Metchock, B., Johnston, S., Dalton, T., Joglar, O., Stafford, C., Youngblood, M., Klein, K., Lindstrom, S., Berman, L., Galloway, R., Schafer, I.J., Walke, H., Stoddard, R., Connelly, R., McCaffery, E., Rowlinson, M.-C., Soroka, S., Tranquillo, D.T., Gaynor, A., Mangal, C., Wroblewski, K., Muehlenbachs, A., Salerno, R.M., Lozier, M., Sunshine, B., Shapiro, C., Rose, D., Funk, R., Pillai, S.K., O'Neill, E., 2018. Initial Public Health Laboratory Response After Hurricane Maria — Puerto Rico, 2017. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 67, 333–336. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6711a5

Cordonin, C., Turpin, M., Bringart, M., Bascands, J.-L., Flores, O., Dellagi, K., Mavingui, P., Roche, M., Tortosa, P., 2020. Pathogenic Leptospira and their animal reservoirs: testing host specificity through experimental infection. Sci Rep 10, 7239. https://doi.org/10.1038/s41598-020-64172-4

Costa, F., Hagan, J.E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M.S., Stein, C., Abela-Ridder, B., Ko, A.I., 2015. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis 9, e0003898. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898

Coudray-Meunier, C., Fraisse, A., Martin-Latil, S., Guillier, L., Perelle, S., 2013. Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR. BMC Microbiol 13, 216. https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-216

Dadon, Y., Haas, E.J., Kaliner, E., Anis, E., Singer, S.R., Atiya-Nasagi, Y., Cohen-Dar, M., Avramovich, E., King, R., Sued, O., Goshen, T., Amit, S., Miskin, I., Gino, E., Yishai, R., Sheffer, R., Grotto, I., Moran-Gilad, J., 2018. Outbreak of human leptospirosis linked to contaminated water bodies in Northern Israel, June to August 2018. Eurosurveillance 23. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.38.1800486

Davey, M.E., O'toole, G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev 64, 847–867. https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000

Davis, S., Trapman, P., Leirs, H., Begon, M., Heesterbeek, J. a. P., 2008. The abundance threshold for plague as a critical percolation phenomenon. Nature 454, 634–637. https://doi.org/10.1038/nature07053

de Freitas, T.P.T., Keuroghlian, A., Eaton, D.P., de Freitas, E.B., Figueiredo, A., Nakazato, L., de Oliveira, J.M., Miranda, F., Paes, R.C.S., Monteiro, L.A.R.C., Lima, J.V.B., da C. Neto, A.A., Dutra, V., de Freitas, J.C., 2010. Prevalence of Leptospira interrogans antibodies in free-ranging Tayassu pecari of the Southern Pantanal, Brazil, an ecosystem where wildlife and cattle interact. Trop Anim Health Prod 42, 1695–1703. https://doi.org/10.1007/s11250-010-9622-2

Delafont, V., Bouchon, D., Héchard, Y., Moulin, L., 2016. Environmental factors shaping cultured free-living amoebae and their associated bacterial community within drinking water network. Water Research 100, 382–392. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.044

Destoumieux-Garzón, D., Mavingui, P., Boetsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., Fritsch, C., Giraudoux, P., Le Roux, F., Morand, S., Paillard, C., Pontier, D., Sueur, C., Voituron, Y., 2018. The One Health Concept: 10 Years Old and a Long Road Ahead. Front. Vet. Sci. 5, 14. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00014

Desvars-Larrive, A., Pascal, M., Gasqui, P., Cosson, J.-F., Benoît, E., Lattard, V., Crespin, L., Lorvelec, O., Pisanu, B., Teynié, A., Vayssier-Taussat, M., Bonnet, S., Marianneau, P., Lacôte, S., Bourhy, P., Berny, P., Pavio, N., Le Poder, S., Gilot-Fromont, E., Jourdain, E., Hammed, A., Fourel, I., Chikh, F., Vourc'h, G., 2017. Population genetics, community of parasites, and resistance to rodenticides in an urban brown rat (Rattus norvegicus) population. PLoS ONE 12, e0184015. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184015

Desvars-Larrive, A., Smith, S., Munimanda, G., Bourhy, P., Waigner, T., Odom, M., Gliga, D.S., Walzer, C., 2020. Prevalence and risk factors of Leptospira infection in urban brown rats (Rattus norvegicus), Vienna, Austria. Urban Ecosyst 23, 775–784. https://doi.org/10.1007/s11252-020-00957-9

Dhewantara, P.W., Hu, W., Zhang, W., Yin, W., Ding, F., Mamun, A., Soares Magalhaes, R.J., 2019. Leptospirosis, Climate and Satellite-based Environmental Factors: A Temporal Modeling. OJPHI 11. https://doi.org/10.5210/ojphi.v11i1.9879

DICEROS BICORNIS MICHAELI), 2001. . Journal of Zoo and Wildlife Medicine 32, 476–486. https://doi.org/10.1638/1042-7260(2001)032[0476:LIITBR]2.0.CO;2

Dierks, J., Servies, T., Do, T., 2018. A Study on the Leptospirosis Outbreak Among US Marine Trainees in Okinawa, Japan☆. Military Medicine 183, e208–e212. https://doi.org/10.1093/milmed/usx013

Diesch, S.L., McCulloch, W.F., 1966. Isolation of Pathogenic Leptospires from Waters Used for Recreation. Public Health Reports (1896-1970) 81, 299. https://doi.org/10.2307/4592702

Dietrich, M., Gomard, Y., Lagadec, E., Ramasindrazana, B., Le Minter, G., Guernier, V., Benlali, A., Rocamora, G., Markotter, W., Goodman, S.M., Dellagi, K., Tortosa, P., 2018. Biogeography of *Leptospira* in wild animal communities inhabiting the insular ecosystem of the western Indian Ocean islands and neighboring Africa. Emerging Microbes & Infections 7, 1–12. https://doi.org/10.1038/s41426-018-0059-4

Dietrich, M., Mühldorfer, K., Tortosa, P., Markotter, W., 2015. Leptospira and Bats: Story of an Emerging Friendship. PLoS Pathog 11, e1005176. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005176

Dos Santos, L.F., Guimarães, M.F., de Souza, G.O., da Silva, I.W.G., Santos, J.R., Azevedo, S.S., Labruna, M.B., Heinemann, M.B., Horta, M.C., 2017. Seroepidemiological survey on Leptospira spp. infection in wild and domestic mammals in two distinct areas of the semi-arid region of northeastern Brazil. Trop Anim Health Prod 49, 1715–1722. https://doi.org/10.1007/s11250-017-1382-9

Dzulaikha, K., Nurul Yuziana, M.Y., Maizatulriah, J.J., Marfiah, A.W., 2018. Association of Rainfall and the Occurrence of Pathogenic Leptospira spp. in Recreational Stream Water, Hulu Langat, Selangor, in: Ibrahim, F., Usman, J., Ahmad, M.Y., Hamzah, N., Teh, S.J. (Eds.), 2nd International Conference for Innovation in Biomedical Engineering and Life Sciences, IFMBE Proceedings. Springer Singapore, Singapore, pp. 119–124. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7554-4_20

Ellinghausen, H.C., 1973. GROWTH TEMPERATURES, VIRULENCE, SURVIVAL, AND NUTRITION OF LEPTOSPIRES. Journal of Medical Microbiology 6, 487–497. https://doi.org/10.1099/00222615-6-4-487

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., 2015. Animal leptospirosis. Curr Top Microbiol Immunol 387, 99–137. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_6

Ellis, W.A., McParland, P.J., Bryson, D.G., Cassells, J.A., 1986. Boars as carriers of leptospires of the Australis serogroup on farms with an abortion problem. Vet Rec 118, 563. https://doi.org/10.1136/vr.118.20.563

Ensuncho-Hoyos, C., Rodríguez-Rodríguez, V., Pérez-Doria, A., Vergara, O., Calderón-Rangel, A., 2017. Epidemiology behavior of leptospirosis in Ciénaga de Oro, Córdoba (Colombia). Trop Anim Health Prod 49, 1345–1351. https://doi.org/10.1007/s11250-017-1332-6

Escobedo-Hinojosa, W., Pardo-López, L., 2017. Analysis of bacterial metagenomes from the Southwestern Gulf of Mexico for pathogens detection. Pathogens and Disease 75. https://doi.org/10.1093/femspd/ftx058

Esfandiari, B., Pourshafie, M.R., Gouya, M.M., Khaki, P., Mostafavi, E., Darvish, J., Bidhendi, S.M., Hanifi, H., Nahrevanian, H., 2015. An epidemiological comparative study on diagnosis of rodent leptospirosis in Mazandaran Province, northern Iran. Epidemiol Health 37, e2015012. https://doi.org/10.4178/epih/e2015012

Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Iii, F.R.C., Smith, T.F., 2006. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. CLIN. MICROBIOL. REV. 19, 92.

Evangelista, K.V., Coburn, J., 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. Future Microbiology 5, 1413–1425. https://doi.org/10.2217/fmb.10.102

Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P., 1999. "Leptospira" and leptospirosis. MediSci.

Faria, M.T. de, Calderwood, M.S., Athanazio, D.A., McBride, A.J.A., Hartskeerl, R.A., Pereira, M.M., Ko, A.I., Reis, M.G., 2008. Carriage of Leptospira interrogans among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. Acta Tropica 108, 1–5. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.07.005

Fávero, J.F., de Araújo, H.L., Lilenbaum, W., Machado, G., Tonin, A.A., Baldissera, M.D., Stefani, L.M., Da Silva, A.S., 2017. Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation. Microbial Pathogenesis 107, 149–154. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.032

Figueiredo da Costa, D., Cristiny Rodrigues Silva, M.L., Martins, G., Medeiros Dantas, A.F., Almeida de Melo, M., Santos de Azevedo, S., Lilenbaum, W., Alves, C.J., 2018. Susceptibility among breeds of sheep experimentally infected with Leptospira interrogans Pomona serogroup. Microbial Pathogenesis 122, 79–83. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.06.017

Flores - Castro, R., 2010. [Current situation of the most frequent zoonosis in the world]. Gaceta médica de México 146, 423–9.

Forster, K.M., Hartwig, D.D., Seixas, F.K., McBride, A.J.A., Monte, L.G., Recuero, A.L.C., Brod, C.S., Hartleben, C.P., Amaral, M., Dellagostin, O.A., 2013. Characterization of a virulent Leptospira interrogans strain isolated from an abandoned swimming pool. Braz. J. Microbiol. 44, 165–170. https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000029

Fouts, D.E., Matthias, M.A., Adhikarla, H., Adler, B., Amorim-Santos, L., Berg, D.E., Bulach, D., Buschiazzo, A., Chang, Y.-F., Galloway, R.L., Haake, D.A., Haft, D.H., Hartskeerl, R., Ko, A.I., Levett, P.N., Matsunaga, J., Mechaly, A.E., Monk, J.M., Nascimento, A.L.T., Nelson, K.E., Palsson, B., Peacock, S.J., Picardeau, M., Ricaldi, J.N., Thaipandungpanit, J., Wunder, E.A., Yang, X.F., Zhang, J.-J., Vinetz, J.M., 2016. What Makes a Bacterial Species Pathogenic?:Comparative Genomic Analysis of the Genus Leptospira. PLoS Negl Trop Dis 10, e0004403. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004403

Friedl, A., Heinzer, I., Fankhauser, H., 2005. Tularemia after a dormouse bite in Switzerland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 24, 352–354. https://doi.org/10.1007/s10096-005-1322-x

Fukunaga, M., Mifuchi, I., 1989. Unique organization of Leptospira interrogans rRNA genes. Journal of Bacteriology 171, 5763–5767. https://doi.org/10.1128/JB.171.11.5763-5767.1989

Gamage, C.D., Sato, Y., Kimura, R., Yamashiro, T., Toma, C., 2020. Understanding leptospirosis eco-epidemiology by environmental DNA metabarcoding of irrigation water from two agro-ecological regions of Sri Lanka. PLoS Negl Trop Dis 14, e0008437. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008437

Ganoza, C.A., Matthias, M.A., Collins-Richards, D., Brouwer, K.C., Cunningham, C.B., Segura, E.R., Gilman, R.H., Gotuzzo, E., Vinetz, J.M., 2006. Determining Risk for Severe Leptospirosis by Molecular Analysis of Environmental Surface Waters for Pathogenic Leptospira. PLoS Med 3, e308. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030308

Ganoza, C.A., Matthias, M.A., Saito, M., Cespedes, M., Gotuzzo, E., Vinetz, J.M., 2010. Asymptomatic Renal Colonization of Humans in the Peruvian Amazon by Leptospira. PLoS Negl Trop Dis 4, e612. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000612

Garba, B., Bahaman, A.R., Khairani-Bejo, S., Zakaria, Z., Mutalib, A.R., 2017. Retrospective Study of Leptospirosis in Malaysia. EcoHealth 14, 389–398. https://doi.org/10.1007/s10393-017-1234-0

Gay, N., Soupé-Gilbert, M.-E., Goarant, C., 2014. Though not Reservoirs, Dogs might Transmit Leptospira in New Caledonia. IJERPH 11, 4316–4325. https://doi.org/10.3390/ijerph110404316
Gelling, M., Zochowski, W., Macdonald, D.W., Johnson, A., Palmer, M., Mathews, F., 2015. Leptospirosis acquisition following the reintroduction of wildlife. Veterinary Record 177, 440–440. https://doi.org/10.1136/vr.103160
Gelman, S.S., Gundlapalli, A.V., Hale, D., Croft, A., Hindiyeh, M., Carroll, K.C., 2006. Spotting the Spirochete: Rapid Diagnosis of Leptospirosis in Two Returned Travelers. Journal of Travel Medicine 9, 165–167. https://doi.org/10.2310/7060.2002.23165
Gensberger, E.T., Polt, M., Konrad-Köszler, M., Kinner, P., Sessitsch, A., Kostić, T., 2014a. Evaluation of quantitative PCR combined with PMA treatment for molecular assessment of microbial water quality. Water Research 67, 367–376. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.022
Gensberger, E.T., Polt, M., Konrad-Köszler, M., Kinner, P., Sessitsch, A., Kostić, T., 2014b. Evaluation of quantitative PCR combined with PMA treatment for molecular assessment of microbial water quality. Water Research 67, 367–376. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.022
Geroult, S., Teurlai, M., Goarant, C., Soupé-Gilbert, M.-E., Bierque, E., 2017. Continuous Excretion of Leptospira borgpetersenii Ballum in Mice Assessed by Viability Quantitative Polymerase Chain Reaction. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 97, 1088–1093. https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0114
Gibbs, E.P.J., 2014. The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. Vet Rec 174, 85–91. https://doi.org/10.1136/vr.g143
Gillespie, R.W.H., 1963. EPIDEMIOLOGY OF LEPTOSPIROSIS 6.
GLEAN, 2013. 3rd Global Leptospirosis Environmental Action Network (GLEAN) Meeting. Brazilia.
Goarant, C., 2016. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. RRTM Volume 7, 49–62. https://doi.org/10.2147/RRTM.S102543
Goarant, C., Laumond-Barny, S., Perez, J., Vernel-Pauillac, F., Chanteau, S., Guigon, A., 2009. Outbreak of leptospirosis in New Caledonia: diagnosis issues and burden of disease. Tropical Medicine & International Health 14, 926–929. https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02310.x
Goarant, C., Trueba, G., Bierque, E., Thibeaux, R., Davis, B., de la Pena-Moctezuma, A., 2019. Leptospira and Leptospirosis, in: Michigan State University, Rose, J.B., Jiménez Cisneros, B., UNESCO - International Hydrological Programme (Eds.), Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project). Michigan State University. https://doi.org/10.14321/waterpathogens.26
Gökmen, T.G., Soyal, A., Kalayci, Y., Önlen, C., Köksal, F., 2016. COMPARISON OF 16S rRNA-PCR-RFLP, LipL32-PCR AND OmpL1-PCR METHODS IN THE DIAGNOSIS OF LEPTOSPIROSIS. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo 58. https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658064
Goldstein, S.F., Charon, N.W., 1990. Multiple-exposure photographic analysis of a motile spirochete. Proceedings of the National Academy of Sciences 87, 4895–4899. https://doi.org/10.1073/pnas.87.13.4895
Golpayegani, A., Douraghi, M., Rezaei, F., Alimohammadi, M., Nodehi, R.N., 2019. Propidium monoazide–quantitative polymerase chain reaction (PMA-qPCR) assay for rapid detection of viable and viable but non-culturable (VBNC) Pseudomonas aeruginosa in swimming pools. J Environ Health Sci Engineer 17, 407–416. https://doi.org/10.1007/s40201-019-00359-w
Grassmann, A.A., Souza, J.D., McBride, A.J.A., 2017. A Universal Vaccine against Leptospirosis: Are We Going in the Right Direction? Front. Immunol. 8. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00256
Gray, E., Atatoa-Carr, P., Bell, A., Roberts, S., Al Mudallal, D., Mills, G.D., 2007. Murine typhus: a newly recognised problem in the Waikato region of New Zealand. N Z Med J 120, U2661.

Greger, M., 2007. The Human/Animal Interface: Emergence and Resurgence of Zoonotic Infectious Diseases. Critical Reviews in Microbiology 33, 243–299. https://doi.org/10.1080/10408410701647594
Grune Loffler, S., Rago, V., Martínez, M., Uhart, M., Florin-Christensen, M., Romero, G., Brihuega, B., 2015. Isolation of a Seawater Tolerant Leptospira spp. from a Southern Right Whale (Eubalaena australis). PLoS ONE 10, e0144974. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144974
Grzybek, M., Antolová, D., Tołkacz, K., Alsarraf, M., Behnke-Borowczyk, J., Nowicka, J., Paleolog, J., Biernat, B., Behnke, J.M., Bajer, A., 2021. Seroprevalence of Toxoplasma gondii among Sylvatic Rodents in Poland. Animals 11, 1048. https://doi.org/10.3390/ani11041048
Guernier, V., Allan, K.J., Goarant, C., 2018. Advances and challenges in barcoding pathogenic and environmental *Leptospira*. Parasitology 145, 595–607. https://doi.org/10.1017/S0031182017001147
Guerrier, G., Lefèvre, P., Chouvin, C., D'Ortenzio, E., 2017. Jarisch–Herxheimer Reaction Among Patients with Leptospirosis: Incidence and Risk Factors. Am J Trop Med Hyg 16–0457. https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0457
Guglielmini, J., Bourhy, P., Schiettekatte, O., Zinini, F., Brisse, S., Picardeau, M., 2019. Genus-wide Leptospira core genome multilocus sequence typing for strain taxonomy and global surveillance. PLoS Negl Trop Dis 13, e0007374. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007374
Guillois, Y., Bourhy, P., Ayral, F., Pivette, M., Decors, A., Aranda Grau, J.H., Champenois, B., Malhère, C., Combes, B., Richomme, C., Le Guyader, M., King, L.A., Septfons, A., 2018. An outbreak of leptospirosis among kayakers in Brittany, North-West France, 2016. Eurosurveillance 23. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.48.1700848
Gupta, R.S., Mahmood, S., Adeolu, M., 2013. A phylogenomic and molecular signature based approach for characterization of the phylum Spirochaetes and its major clades: proposal for a taxonomic revision of the phylum. Front. Microbiol. 4. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00217
Haake, D.A., Levett, P.N., 2015. Leptospirosis in Humans, in: Adler, B. (Ed.), Leptospira and Leptospirosis, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 65–97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_5
Haapala, D.K., Rogul, M., Evans, L.B., Alexander, A.D., 1969. Deoxyribonucleic Acid Base Composition and Homology Studies of Leptospira. Journal of Bacteriology 98, 421–428. https://doi.org/10.1128/JB.98.2.421-428.1969
Han, B.A., Schmidt, J.P., Bowden, S.E., Drake, J.M., 2015. Rodent reservoirs of future zoonotic diseases. Proc Natl Acad Sci U S A 112, 7039–7044. https://doi.org/10.1073/pnas.1501598112
HAS, 2011. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA LEPTOSPIROSE - Note de cadrage.
Henneberry, R.C., Cox, C.D., 2011. β-Oxidation of fatty acids by Leptospira. Canadian Journal of Microbiology. https://doi.org/10.1139/m70-007
Henry, R.A., Johnson, R.C., 1978. Distribution of the Genus Leptospira in Soil and Water. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 35, 8.
Herrera, J.P., Wickenkamp, N.R., Turpin, M., Baudino, F., Tortosa, P., Goodman, S.M., Soarimalala, V., Ranaivoson, T.N., Nunn, C.L., 2020. Effects of land use, habitat characteristics, and small mammal community composition on Leptospira prevalence in northeast Madagascar. PLoS Negl Trop Dis 14, e0008946. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008946
Hoberg, E.P., 2002. Taenia tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. Microbes Infect 4, 859–866. https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01606-4
Hochedez, P., 2015. Epidémiologie de la leptospirose aux Antilles françaises: apports du diagnostic par biologie moléculaire dans l'étude des facteurs de risques, des facteurs pronostiques et de l'incidence 129.
Homer, 2000. Babesiosis.

Hori, K., Matsumoto, S., 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. Biochemical Engineering Journal 48, 424–434. https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.014
Hovind-Hougen, K., 1979. Leptospzraceae, a New Family to Include Leptospira Noguchi 1917 and Leptonema gen. nov. 7.
Hu, W.-L., Pappas, C.J., Zhang, J.-J., Yang, Y.-Y., Yan, J., Picardeau, M., Yang, X.F., 2017. The EbpA-RpoN Regulatory Pathway of the Pathogen Leptospira interrogans Is Essential for Survival in the Environment. Appl Environ Microbiol 83, e02377-16, e02377-16. https://doi.org/10.1128/AEM.02377-16
Huang, K., 2014. A comprehensive insight into bacterial virulence in drinking water using 454 pyrosequencing and Illumina high-throughput sequencing. Ecotoxicology and Environmental Safety 8.
Hui, D.S., Peiris, M., 2019. Severe acute respiratory syndrome and other emerging severe respiratory viral infections. Respirology 24, 410–412. https://doi.org/10.1111/resp.13501
Humberd, C.M., Murray, C.K., Stuart, S.K., Reeb, B.A., Hospenthal, D.R., 2005. SHORT REPORT: ENUMERATING LEPTOSPIRES USING THE COULTER COUNTER 2.
Ido, Y., 1916. THE PROPHYLAXIS OF WEIL'S DISEASE (SPIROCHE- TOSIS ICTEROHiEMORRHAGICA). 13.
Inada, R., Kaneko, R., 1915. THE ETIOLOGY, MODE OF INFECTION, AND SPECIFIC THERAPY OF WELL'S DISEASE (SPIROCHgETOSIS ICTEROH/EMORRHAGICA). 34.
Izurieta, R., Galwankar, S., Clem, A., 2008. Leptospirosis: The "mysterious" mimic. Journal of Emergencies, Trauma, and Shock 1, 21. https://doi.org/10.4103/0974-2700.40573
Jansen, A., Schöneberg, I., Frank, C., Alpers, K., Schneider, T., Stark, K., 2005. Leptospirosis in Germany, 1962–2003. Emerg. Infect. Dis. 11, 1048–1054. https://doi.org/10.3201/eid1107.041172
Jittimanee, J., Wongbutdee, J., 2019. Prevention and control of leptospirosis in people and surveillance of the pathogenic Leptospira in rats and in surface water found at villages. Journal of Infection and Public Health 12, 705–711. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.03.019
Johnson, R., Faine, S., Krieg, N., Holt, J., 1984. Order I. Spirochaetales: family II. Leptospiraceae" 1, 62.
Johnson, R.C., Harris, V.G., 1967. Differentiation of Pathogenic and Saprophytic Leptospires I. Growth at Low Temperatures. Journal of Bacteriology 94, 27–31. https://doi.org/10.1128/JB.94.1.27-31.1967
Jones, P.W., Rennison, L.M., Matthews, P.R.J., Collins, P., Brown, A., 1981. The occurrence and significance to animal health of Leptospira, Mycobacterium, Escherichia coli, Irucella abortus and Bacillus anthracis in sewage and sewage sludges 9.
Jorge, S., Kremer, F.S., Oliveira, N.R. de, Navarro, G. de O.S.V., Guimarães, A.M., Sanchez, C.D., Woloski, R.D. dos S., Ridieri, K.F., Campos, V.F., Pinto, L. da S., Dellagostin, O.A., 2018. Whole-genome sequencing of Leptospira interrogans from southern Brazil: genetic features of a highly virulent strain. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 113, 80–86. https://doi.org/10.1590/0074-02760170130
José, E.M., Oudou, N., 2013. L'Enquête CAP (Connaissances, Attitudes, Pratiques) en Recherche Médicale. 14, 3.
Joshi, Y.P., Kim, E.-H., Cheong, H.-K., 2017a. The influence of climatic factors on the development of hemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis during the peak season in Korea: an ecologic study. BMC Infect Dis 17, 406. https://doi.org/10.1186/s12879-017-2506-6
Joshi, Y.P., Kim, E.-H., Cheong, H.-K., 2017b. The influence of climatic factors on the development of hemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis during the peak season in Korea: an ecologic study. BMC Infect Dis 17, 406. https://doi.org/10.1186/s12879-017-2506-6
Kaboosi, H., Razavi, M.R., 2010. Efficiency of filtration technique for isolation of leptospires from surface waters: Role of different membranes with different pore size and materials. Afr. J. Microbiol. Res. 6.
Karande, S., 2003. An observational study to detect leptospirosis in Mumbai, India, 2000. Archives of Disease in Childhood 88, 1070–1075. https://doi.org/10.1136/adc.88.12.1070

Karim, A.J., Abbas, Z.M., 2021. Histopathology of the kidney and seroprevalence of leptospirosis in wild rats in Baghdad Province, Iraq. Int J One Health 7, 19–30. https://doi.org/10.14202/IJOH.2021.19-30

Karim, M.R., Fout, G.S., Johnson, C.H., White, K.M., Parshionikar, S.U., 2015. Propidium monoazide reverse transcriptase PCR and RT-qPCR for detecting infectious enterovirus and norovirus. Journal of Virological Methods 219, 51–61. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.02.020

Kazama, S., Otaki, M., 2013. Quantitative Analysis of the Inactivation Mechanisms of Escherichia coli by a Newly Developed Method Using Propidium Monoazide. J. of Wat. ^|^ Envir. Tech. 11, 507–517. https://doi.org/10.2965/jwet.2013.507

Kefford, B., Marshall, K.C., 1984. Adhesion of Leptospira at a solid-liquid interface: a model. Arch. Microbiol. 138, 84–88. https://doi.org/10.1007/BF00425413

Khisamov, G.Z., Morozova, N.K., 1992. Phospholipid catabolism enzymes of leptospires. Zentralblatt für Bakteriologie 276, 347–355. https://doi.org/10.1016/S0934-8840(11)80541-4

Klement-Frutos, E., Tarantola, A., Gourinat, A.-C., Floury, L., Goarant, C., 2020. Age-specific epidemiology of human leptospirosis in New Caledonia, 2006-2016. PLoS ONE 15, e0242886. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242886

Kmety, E., Dikken, H., 1993. Classification of the species Leptospira interrogans and history of its serovars.

Ko, A.I., Goarant, C., Picardeau, M., 2009. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. Nat Rev Microbiol 7, 736–747. https://doi.org/10.1038/nrmicro2208

Koizumi, N., Muto, M., Tanikawa, T., Mizutani, H., Sohmura, Y., Hayashi, E., Akao, N., Hoshino, M., Kawabata, H., Watanabe, H., 2009. Human leptospirosis cases and the prevalence of rats harbouring Leptospira interrogans in urban areas of Tokyo, Japan. Journal of Medical Microbiology 58, 1227–1230. https://doi.org/10.1099/jmm.0.011528-0

Koizumi, N., Nakajima, C., Harunari, T., Tanikawa, T., Tokiwa, T., Uchimura, E., Furuya, T., Mingala, C.N., Villanueva, M.A., Ohnishi, M., Suzuki, Y., 2012. A New Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid, Simple, and Sensitive Detection of Leptospira spp. in Urine. J. Clin. Microbiol. 50, 2072–2074. https://doi.org/10.1128/JCM.00481-12

Kouadio, I.K., Aljunid, S., Kamigaki, T., Hammad, K., Oshitani, H., 2012. Infectious diseases following natural disasters: prevention and control measures. Expert Review of Anti-infective Therapy 10, 95–104. https://doi.org/10.1586/eri.11.155

Krebs, C.J., Redfield, J.A., Taitt, M.J., 2011. A pulsed-removal experiment on the vole Microtus townsendii. Canadian Journal of Zoology. https://doi.org/10.1139/z78-308

Kurilung, A., Chanchaithong, P., Lugsomya, K., Niyomtham, W., Wuthiekanun, V., Prapasarakul, N., 2017. Molecular detection and isolation of pathogenic Leptospira from asymptomatic humans, domestic animals and water sources in Nan province, a rural area of Thailand. Research in Veterinary Science 115, 146–154. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.017

Lall, C., Kumar, K.V., Raj, R.V., Vedhagiri, K., Vijayachari, P., 2016. Prevalence and Diversity of Leptospires in Different Ecological Niches of Urban and Rural Areas of South Andaman Island. Microbes and environments 31, 79–82. https://doi.org/10.1264/jsme2.ME15149

Lambert, A., Takahashi, N., Charon, N.W., Picardeau, M., 2012. Chemotactic Behavior of Pathogenic and Nonpathogenic Leptospira Species. Appl. Environ. Microbiol. 78, 8467–8469. https://doi.org/10.1128/AEM.02288-12

Lata, K.S., Vaghasia, V., Bhairappanavar, S.B., Kumar, S., Ayachit, G., Patel, S., Das, J., 2020. Whole genome sequencing and de novo assembly of three virulent Indian isolates of Leptospira. Infection, Genetics and Evolution 85, 104579. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104579

Lau, C.L., Skelly, C., Smythe, L.D., Craig, S.B., Weinstein, P., 2012. Emergence of new leptospiral serovars in American Samoa - ascertainment or ecological change? BMC Infect Dis 12, 19. https://doi.org/10.1186/1471-2334-12-19

Lau, C.L., Smythe, L.D., Craig, S.B., Weinstein, P., 2010. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 104, 631–638. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.07.002

Lau, C.L., Watson, C.H., Lowry, J.H., David, M.C., Craig, S.B., Wynwood, S.J., Kama, M., Nilles, E.J., 2016. Human Leptospirosis Infection in Fiji: An Eco-epidemiological Approach to Identifying Risk Factors and Environmental Drivers for Transmission. PLoS Negl Trop Dis 10, e0004405. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004405

Lee, H.S., Khong, N.V., Xuan, H.N., Nghia, V.B., Nguyen-Viet, H., Grace, D., 2017. Sero-prevalence of specific Leptospira serovars in fattening pigs from 5 provinces in Vietnam. BMC Vet Res 13, 125. https://doi.org/10.1186/s12917-017-1044-1

Lee, H.S., Levine, M., Guptill-Yoran, C., Johnson, A.J., 2014. Regional and Temporal Variations of Leptospira Seropositivity in Dogs in the United States, 20002010 10.

Lee, H.S., Levine, M., Guptill-Yoran, C., Johnson, A.J., von Kamecke, P., Moore, G.E., 2014. Regional and Temporal Variations of *Leptospira* Seropositivity in Dogs in the United States, 2000-2010. J Vet Intern Med 28, 779–788. https://doi.org/10.1111/jvim.12335

Lee, M.J., Byers, K.A., Donovan, C.M., Bidulka, J.J., Stephen, C., Patrick, D.M., Himsworth, C.G., 2018. Effects of Culling on *Leptospira interrogans* Carriage by Rats. Emerg. Infect. Dis. 24, 356–360. https://doi.org/10.3201/eid2402.171371

Levett, P.N., 2005. Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. Journal of Medical Microbiology 54, 45–49. https://doi.org/10.1099/jmm.0.45860-0

Levett, P.N., 2001. Leptospirosis. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS 14, 296–326. https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296–326.2001

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., Faucher, S.P., 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. Front. Microbiol. 5. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258

Lilenbaum, W., Martins, G., 2014. Leptospirosis in Cattle: A Challenging Scenario for the Understanding of the Epidemiology. Transboundary and emerging diseases 61 Suppl 1, 63–8. https://doi.org/10.1111/tbed.12233

Lilenbaum, W., Varges, R., Ristow, P., Cortez, A., Souza, S.O., Richtzenhain, L.J., Vasconcellos, S.A., 2009. Identification of Leptospira spp. carriers among seroreactive goats and sheep by polymerase chain reaction. Research in Veterinary Science 87, 16–19. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.12.014

Limmathurotsakul, D., Turner, E.L., Wuthiekanun, V., Thaipadungpanit, J., Suputtamongkol, Y., Chierakul, W., Smythe, L.D., Day, N.P.J., Cooper, B., Peacock, S.J., 2012. Fool's Gold: Why Imperfect Reference Tests Are Undermining the Evaluation of Novel Diagnostics: A Reevaluation of 5 Diagnostic Tests for Leptospirosis. Clinical Infectious Diseases 55, 322–331. https://doi.org/10.1093/cid/cis403

Loh, S.-M., Gofton, A.W., Lo, N., Gillett, A., Ryan, U.M., Irwin, P.J., Oskam, C.L., 2016. Novel Borrelia species detected in echidna ticks, Bothriocroton concolor, in Australia. Parasites Vectors 9, 339. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1627-x

Loureiro, A.P., Martins, G., Pinto, P., Narduche, L., Teixeira, R.C., Lilenbaum, W., 2015. Usage of a selective media (EMJH-STAFF) in primary culturing of pathogenic leptospires from bovine clinical samples. Lett Appl Microbiol 61, 603–606. https://doi.org/10.1111/lam.12501

Lozano, R., 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 380, 34.

Marquez, A., 2019. Gestion de populations de rongeurs dans un contexte leptospirosique.

Martínez, R., Pérez, A., Quiñones, M. del C., Cruz, R., Álvarez, Á., Armesto, M., Fernández, C., Menéndez, J., Rodríguez, I., Baró, M., Díaz, M., Rodríguez, J., Sierra, G., Obregón, A.M., Toledo, M.E., Fernández, N., 2004. Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba. Rev Panam Salud Publica 15. https://doi.org/10.1590/S1020-49892004000400005

Mason, M.R., Encina, C., Sreevatsan, S., Muñoz-Zanzi, C., 2016. Distribution and Diversity of Pathogenic Leptospira Species in Peri-domestic Surface Waters from South Central Chile. PLoS Negl Trop Dis 10, e0004895. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004895

Masuzawa, T., Uno, R., Matsuhashi, N., Yamaguchi, M., Xu, J., Nakamura, S., 2019. Comparison of *Leptospira* species isolated from environmental water and soil in Japan. Microbiol Immunol 63, 469–473. https://doi.org/10.1111/1348-0421.12741

McGarry, M.G., Stainforth, J., 1978. Compost, fertilizer, and biogas production from human and farm wastes in the People's Republic of China. IDRC, Ottawa, ON, CA.

Meerburg, B.G., Kijlstra, A., 2007. Role of rodents in transmission ofSalmonella andCampylobacter. J. Sci. Food Agric. 87, 2774–2781. https://doi.org/10.1002/jsfa.3004

Meerburg, B.G., Singleton, G.R., Kijlstra, A., 2009. Rodent-borne diseases and their risks for public health. Critical Reviews in Microbiology 35, 221–270. https://doi.org/10.1080/10408410902989837

Mehand, M.S., Al-Shorbaji, F., Millett, P., Murgue, B., 2018. The WHO R&D Blueprint: 2018 review of emerging infectious diseases requiring urgent research and development efforts. Antiviral Research 159, 63–67. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.09.009

Mérien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., Saint Girons, I., 1992. Polymerase chain reaction for detection of Leptospira spp. in clinical samples. Journal of Clinical Microbiology 30, 2219–2224. https://doi.org/10.1128/JCM.30.9.2219-2224.1992

Miller, E., Barragan, V., Chiriboga, J., Weddell, C., Luna, L., Jiménez, D.J., Aleman, J., Mihaljevic, J.R., Olivas, S., Marks, J., Izurieta, R., Nieto, N., Keim, P., Trueba, G., Caporaso, J.G., Pearson, T., 2021. Leptospira in river and soil in a highly endemic area of Ecuador. BMC Microbiol 21, 17. https://doi.org/10.1186/s12866-020-02069-y

Mizozoe, Otaki, Aikawa, 2019. The Mechanism of Chlorine Damage Using Enhanced Green Fluorescent Protein-Expressing Escherichia coli. Water 11, 2156. https://doi.org/10.3390/w11102156

Mohammed, H., Nozha, C., Hakim, K., Abdelaziz, F., 2011. LEPTOSPIRA: Morphology, Classification and Pathogenesis. J Bacteriol Parasitol 02. https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000120

Mohd Ali, M.R., Mohd Safee, A.W., Ismail, N.H., Abu Sapian, R., Mat Hussin, H., Ismail, N., Yean Yean, C., 2018. Development and validation of pan- Leptospira Taqman qPCR for the detection of Leptospira spp. in clinical specimens. Molecular and Cellular Probes 38, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2018.03.001

Mohd Radi, M.F., Hashim, J.H., Jaafar, M.H., Hod, R., Ahmad, N., Mohammed Nawi, A., Baloch, G.M., Ismail, R., Farakhin Ayub, N.I., 2018. Leptospirosis Outbreak After the 2014 Major Flooding Event in Kelantan, Malaysia: A Spatial-Temporal Analysis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 98, 1281–1295. https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0922

Moinet, M., Fournier-Chambrillon, C., André-Fontaine, G., Aulagnier, S., Mesplède, A., Blanchard, B., Descarsin, V., Dumas, P., Dumas, Y., Coïc, C., Couzi, L., Fournier, P., 2010. LEPTOSPIROSIS IN FREE-RANGING ENDANGERED EUROPEAN MINK (MUSTELA LUTREOLA) AND OTHER SMALL CARNIVORES (MUSTELIDAE, VIVERRIDAE) FROM SOUTHWESTERN FRANCE. Journal of Wildlife Diseases 46, 1141–1151. https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.4.1141

Moore, W.E.C., Stackebrandt, E., Kandler, O., Colwell, R.R., Krichevsky, M.I., Truper, H.G., Murray, R.G.E., Wayne, L.G., Grimont, P.A.D., Brenner, D.J., Starr, M.P., Moore, L.H., 1987. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 37, 463–464. https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-463

Morgan, J., Bornstein, S.L., Karpati, A.M., Bruce, M., Bolin, C.A., Austin, C.C., Woods, C.W., Lingappa, J., Langkop, C., Davis, B., Graham, D.R., Proctor, M., Ashford, D.A., Bajani, M., Bragg, S.L., Shutt, K., Perkins, B.A., Tappero, J.W., Leptospirosis Working Group, 2002. Outbreak of Leptospirosis among Triathlon Participants and Community Residents in Springfield, Illinois, 1998. CLIN INFECT DIS 34, 1593–1599. https://doi.org/10.1086/340615

Mori, M., Bourhy, P., Le Guyader, M., Van Esbroeck, M., Djelouadji, Z., Septfons, A., Kodjo, A., Picardeau, M., 2017. Pet rodents as possible risk for leptospirosis, Belgium and France, 2009 to 2016. Eurosurveillance 22. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.43.16-00792

Morrison, W.I., Wright, N.G., 1976. Canine leptospirosis: an immunopathological study of interstitial nephritis due to Leptospira canicola. J Pathol 120, 83–89. https://doi.org/10.1002/path.1711200204

Moseley, M., Naidoo, K., Bastos, A., Retief, L., Frean, J., Telfer, S., Rossouw, J., 2020. Multi-locus sequence analyses reveal a clonal L. borgpetersenii genotype in a heterogeneous invasive Rattus spp. community across the City of Johannesburg, South Africa. Parasites Vectors 13, 570. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04444-0

Munoz-Zanzi, C., Groene, E., Morawski, B.M., Bonner, K., Costa, F., Bertherat, E., Schneider, M.C., 2020. A systematic literature review of leptospirosis outbreaks worldwide, 1970–2012. Revista Panamericana de Salud Pública 44, 1. https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.78

Muñoz-Zanzi, C., Mason, M., Encina, C., Astroza, A., Romero, A., 2014. Leptospira Contamination in Household and Environmental Water in Rural Communities in Southern Chile. IJERPH 11, 6666–6680. https://doi.org/10.3390/ijerph110706666

Murray, C.K., Hospenthal, D.R., 2004. Determination of Susceptibilities of 26 *Leptospira* sp. Serovars to 24 Antimicrobial Agents by a Broth Microdilution Technique. Antimicrob Agents Chemother 48, 4002–4005. https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.4002-4005.2004

Murray, G.L., Srikram, A., Henry, R., Hartskeerl, R.A., Sermswan, R.W., Adler, B., 2010. Mutations affecting Leptospira interrogans lipopolysaccharide attenuate virulence: Leptospiral LPS and virulence. Molecular Microbiology 78, 701–709. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07360.x

Musso, D., La Scola, B., 2013. Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 46, 245–252. https://doi.org/10.1016/j.jmii.2013.03.001

Mwachui, M.A., Crump, L., Hartskeerl, R., Zinsstag, J., Hattendorf, J., 2015. Environmental and Behavioural Determinants of Leptospirosis Transmission: A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis 9, e0003843. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003843

Nahori, M.-A., Fournié-Amazouz, E., Que-Gewirth, N.S., Balloy, V., Chignard, M., Raetz, C.R.H., Saint Girons, I., Werts, C., 2005. Differential TLR Recognition of Leptospiral Lipid A and Lipopolysaccharide in Murine and Human Cells. J Immunol 175, 6022–6031. https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.6022

Nardone, A., Capek, I., Baranton, G., 2004. Risk Factors for Leptospirosis in Metropolitan France: Results of a National Case-Control Study, 3.

Narrod, C., Zinsstag, J., Tiongco, M., 2012. A One Health Framework for Estimating the Economic Costs of Zoonotic Diseases on Society. EcoHealth 9, 150–162. https://doi.org/10.1007/s10393-012-0747-9

Neela, V.K., Azhari, N.N., Joseph, N., Mimie, N.P., Ramli, S.N.A., Mustapha, N.F., Ishak, S.N., Mohd-Taib, F.S., Yusof, M.A., Desa, M.N.M., Bashiru, G., Sekawi, Z., 2019. An outbreak of leptospirosis among reserve military recruits, Hulu Perdik, Malaysia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 38, 523–528. https://doi.org/10.1007/s10096-018-03450-6

Nichol, S.T., Spiropoulou, C.F., Morzunov, S., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Feldmann, H., Sanchez, A., Childs, J., Zaki, S., Peters, C.J., 1993. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. Science 262, 914–917. https://doi.org/10.1126/science.8235615

Nicola, M., Alsafi, Z., Sohrabi, C., Kerwan, A., Al-Jabir, A., Iosifidis, C., Agha, M., Agha, R., 2020. The socio-economic implications of the coronavirus pandemic (COVID-19): A review. International Journal of Surgery 78, 185–193. https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2020.04.018

Nieves, C., Ferrés, I., Díaz-Viraqué, F., Buschiazzo, A., Zarantonelli, L., Iraola, G., 2019. Draft Genome Sequences of 40 Pathogenic Leptospira Strains Isolated from Cattle in Uruguay. Microbiol Resour Announc 8, MRA.00893-19, e00893-19. https://doi.org/10.1128/MRA.00893-19

Nocker, A., Sossa-Fernandez, P., Burr, M.D., Camper, A.K., 2007. Use of Propidium Monoazide for Live/Dead Distinction in Microbial Ecology. AEM 73, 5111–5117. https://doi.org/10.1128/AEM.02987-06

Noda, A.A., Grillová, L., Mariet, J.-F., Paiffer, N.B., Ruiz, Y.C., Rodríguez, I., Echevarría, E., Obregón, A.M., Lienhard, R., Picardeau, M., 2020. A first insight into the genomic diversity of Leptospira strains isolated from patients in Cuba. PLoS ONE 15, e0229673. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229673

Noguchi, H., 1919. ETIOLOGY OF YELLOW FEVER. J Exp Med 30, 87–93.

Nozmi, N., Samsudin, S., Sukeri, S., Shafei, M., Wan Mohd, W., Idris, Z., Arifin, W., Idris, N., Saudi, S., Abdullah, N., Abdul Wahab, Z., Tengku Jamaluddin, T., Abd Rahman, H., Masri, S., Daud, A., Osman, M., Awang Hamat, R., 2018. Low Levels of Knowledge, Attitudes and Preventive Practices on Leptospirosis among a Rural Community in Hulu Langat District, Selangor, Malaysia. IJERPH 15, 693. https://doi.org/10.3390/ijerph15040693

Okazaki, W., Ringen, L.M., 1957. Some effects of various environmental conditions on the survival of Leptospira pomona. Am J Vet Res 18, 219–223.

Pagès, F., Larrieu, S., Simoes, J., Lenabat, P., Kurtkowiak, B., Guernier, V., Le Minter, G., Lagadec, E., Gomard, Y., Michault, A., Jaffar-Bandjee, M.C., Dellagi, K., Picardeau, M., Tortosa, P., Filleul, L., 2016. Investigation of a leptospirosis outbreak in triathlon participants, Réunion Island, 2013. Epidemiol. Infect. 144, 661–669. https://doi.org/10.1017/S0950268815001740

Pagès, F., Polycarpe, D., Dehecq, J.-S., Picardeau, M., Caillère, N., Jaffar-Bandjee, M.-C., Michault, A., Filleul, L., 2014. Human Leptospirosis on Reunion Island: Past and Current Burden. IJERPH 11, 968–982. https://doi.org/10.3390/ijerph110100968

Palaniappan, R.U.M., Chang, Y.-F., Chang, C.-F., Pan, M.J., Yang, C.W., Harpending, P., McDonough, S.P., Dubovi, E., Divers, T., Qu, J., Roe, B., 2005. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. Molecular and Cellular Probes 19, 111–117. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.10.002

Panti-May, J.A., Carvalho-Pereira, T.S.A., Serrano, S., Pedra, G.G., Taylor, J., Pertile, A.C., Minter, A., Airam, V., Carvalho, M., Júnior, N.N., Rodrigues, G., Reis, M.G., Ko, A.I., Childs, J.E., Begon, M., Costa, F., 2016. A Two-Year Ecological Study of Norway Rats (Rattus norvegicus) in a Brazilian Urban Slum. PLoS ONE 11, e0152511. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152511

Pappas, G., Papadimitriou, P., Siozopoulou, V., Christou, L., Akritidis, N., 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. International Journal of Infectious Diseases 12, 351–357. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2007.09.011

Patra, K.P., Choudhury, B., Matthias, M.M., Baga, S., Bandyopadhya, K., Vinetz, J.M., 2015. Comparative analysis of lipopolysaccharides of pathogenic and intermediately pathogenic Leptospira species. BMC Microbiol 15, 244. https://doi.org/10.1186/s12866-015-0581-7

Pérez, L.J., Lanka, S., DeShambo, V.J., Fredrickson, R.L., Maddox, C.W., 2020. A Validated Multiplex Real-Time PCR Assay for the Diagnosis of Infectious Leptospira spp.: A Novel Assay for the Detection and Differentiation of Strains From Both Pathogenic Groups I and II. Front. Microbiol. 11, 457. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00457

Perolat, P., Chappel, R.J., Adler, B., Baranton, G., Bulach, D.M., Billinghurst, M.L., Letocart, M., Merien, F., Serrano, M.S., 1998. Leptospira fainei sp. nov., isolated from pigs in Australia. International Journal of Systematic Bacteriology 48, 851–858. https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-851

Petrakovsky, J., Bianchi, A., Fisun, H., Nájera-Aguilar, P., Pereira, M., 2014. Animal Leptospirosis in Latin America and the Caribbean Countries: Reported Outbreaks and Literature Review (2002–2014). IJERPH 11, 10770–10789. https://doi.org/10.3390/ijerph111010770

Philip, N., Bahtiar Affendy, N., Ramli, S.N.A., Arif, M., Raja, P., Nagandran, E., Renganathan, P., Taib, N.M., Masri, S.N., Yuhana, M.Y., Than, L.T.L., Seganathirajah, M., Goarant, C., Goris, M.G.A., Sekawi, Z., Neela, V.K., 2020. Leptospira interrogans and Leptospira kirschneri are the

dominant Leptospira species causing human leptospirosis in Central Malaysia. PLoS Negl Trop Dis 14, e0008197. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008197

Phimda, K., Hoontrakul, S., Suttinont, C., Chareonwat, S., Losuwanaluk, K., Chueasuwanchai, S., Chierakul, W., Suwancharoen, D., Silpasakorn, S., Saisongkorh, W., Peacock, S.J., Day, N.P.J., Suputtamongkol, Y., 2007. Doxycycline versus Azithromycin for Treatment of Leptospirosis and Scrub Typhus. AAC 51, 3259–3263. https://doi.org/10.1128/AAC.00508-07

Phraisuwan, P., Whitney, E.A.S., Tharmaphornpilas, P., Guharat, S., Thongkamsamut, S., Aresagig, S., Liangphongphanthu, J., Junthima, K., Sokampang, A., Ashford, D.A., 2002. Leptospirosis: Skin Wounds and Control Strategies, Thailand, 1999. Emerg. Infect. Dis. 8, 1455–1459. https://doi.org/10.3201/eid0812.020180

Picardeau, M., 2017. Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? Nat Rev Microbiol 15, 297–307. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5

Picardeau, M., 2015a. Leptospirosis: Updating the Global Picture of an Emerging Neglected Disease. PLoS Negl Trop Dis 9, e0004039. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004039

Picardeau, M., 2015b. Genomics, proteomics, and genetics of leptospira. Curr Top Microbiol Immunol 387, 43–63. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_4

Picardeau, M., 2013. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. Médecine et Maladies Infectieuses 43, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.11.005

Picardeau, M., Bertherat, E., Jancloes, M., Skouloudis, A.N., Durski, K., Hartskeerl, R.A., 2014. Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: Current tools and emerging technologies. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 78, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.012

Pijnacker, R., Goris, M.G.A., te Wierik, M.J.M., Broens, E.M., van der Giessen, J.W.B., de Rosa, M., Wagenaar, J.A., Hartskeerl, R.A., Notermans, D.W., Maassen, K., Schimmer, B., 2016. Marked increase in leptospirosis infections in humans and dogs in the Netherlands, 2014. Eurosurveillance 21. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30211

Pinna, M.H., Martins, G., Loureiro, A.P., Lilenbaum, W., 2018. Detection of bovine carriers of Leptospira by serological, bacteriological, and molecular tools. Trop Anim Health Prod 50, 883–888. https://doi.org/10.1007/s11250-018-1512-z

Podgoršek, D., Ružić-Sabljić, E., Logar, M., Pavlović, A., Remec, T., Baklan, Z., Pal, E., Cerar, T., 2020a. Evaluation of real-time PCR targeting the lipL32 gene for diagnosis of Leptospira infection. BMC Microbiol 20, 59. https://doi.org/10.1186/s12866-020-01744-4

Podgoršek, D., Ružić-Sabljić, E., Logar, M., Pavlović, A., Remec, T., Baklan, Z., Pal, E., Cerar, T., 2020b. Evaluation of real-time PCR targeting the lipL32 gene for diagnosis of Leptospira infection. BMC Microbiol 20, 59. https://doi.org/10.1186/s12866-020-01744-4

Polo, N., Machado, G., Rodrigues, R., Nájera Hamrick, P., Munoz-Zanzi, C., Pereira, M., Bercini, M., Timm, L., Schneider, M., 2019. A One Health Approach to Investigating Leptospira Serogroups and Their Spatial Distributions among Humans and Animals in Rio Grande do Sul, Brazil, 2013–2015. TropicalMed 4, 42. https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010042

Prevost, B., Goulet, M., Lucas, F.S., Joyeux, M., Moulin, L., Wurtzer, S., 2016. Viral persistence in surface and drinking water: Suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. Water Research 91, 68–76. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.049

Prevost, B., Lucas, F.S., Goncalves, A., Richard, F., Moulin, L., Wurtzer, S., 2015. Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. Environment International 79, 42–50. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.03.004

Puche, R., Ferrés, I., Caraballo, L., Rangel, Y., Picardeau, M., Takiff, H., Iraola, G., 2018. Leptospira venezuelensis sp. nov., a new member of the intermediate group isolated from rodents, cattle and humans. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 68, 513–517. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002528

Pui, C.F., Bilung, L.M., Apun, K., Su'ut, L., 2017. Diversity of *Leptospira* spp. in Rats and Environment from Urban Areas of Sarawak, Malaysia. Journal of Tropical Medicine 2017, 1–8. https://doi.org/10.1155/2017/3760674

Rahelinirina, S., Scobie, K., Ramasindrazana, B., Andrianaivoarimanana, V., Rasoamalala, F., Randriantseheno, L.N., Rakotoniaina, J.S., Gorgé, O., Lambin, X., Valade, E., Telfer, S., Rajerison, M., 2021. Rodent control to fight plague: field assessment of methods based on rat density reduction. Integr. Zool. 1749-4877.12529. https://doi.org/10.1111/1749-4877.12529

Rajala, E.L., Sattorov, N., Boqvist, S., Magnusson, U., 2017. Bovine leptospirosis in urban and peri-urban dairy farming in low-income countries: a "One Health" issue? Acta Vet Scand 59, 83. https://doi.org/10.1186/s13028-017-0352-6

Rajapakse, S., Rodrigo, C., Handunnetti, S.M., Fernando, S., 2015. Current immunological and molecular tools for leptospirosis: diagnostics, vaccine design, and biomarkers for predicting severity. Ann Clin Microbiol Antimicrob 14, 2. https://doi.org/10.1186/s12941-014-0060-2

Rajeev, S., Shiokawa, K., Llanes, A., Rajeev, M., Restrepo, C.M., Chin, R., Cedeño, E., Ellis, E., 2020. Detection and Characterization of Leptospira Infection and Exposure in Rats on the Caribbean Island of Saint Kitts. Animals 10, 350. https://doi.org/10.3390/ani10020350

Ramadass, P., Jarvis, B.D.W., Corner, R.J., Penny, D., Marshall, R.B., 1992. Genetic Characterization of Pathogenic Leptospira Species by DNA Hybridization. International Journal of Systematic Bacteriology 42, 215–219. https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-215

Ramakrishnan, R., Patel, M.S., Gupte, M.D., Manickam, P., Venkataraghavan, S., 2003. An institutional outbreak of leptospirosis in Chennai, South India. J Commun Dis 35, 1–8.

Rawlins, J., Portanova, A., Zuckerman, I., Loftis, A., Ceccato, P., Willingham, A., Verma, A., 2014. Molecular Detection of Leptospiral DNA in Environmental Water on St. Kitts. IJERPH 11, 7953–7960. https://doi.org/10.3390/ijerph110807953

Ren, S.-X., Fu, G., Jiang, X.-G., Zeng, R., Miao, Y.-G., Xu, H., Zhang, Y.-X., Xiong, H., Lu, G., Lu, L.-F., Jiang, H.-Q., Jia, J., Tu, Y.-F., Jiang, J.-X., Gu, W.-Y., Zhang, Y.-Q., Cai, Z., Sheng, H.-H., Yin, H.-F., Zhang, Y., Zhu, G.-F., Wan, M., Huang, H.-L., Qian, Z., Wang, S.-Y., Ma, W., Yao, Z.-J., Shen, Y., Qiang, B.-Q., Xia, Q.-C., Guo, X.-K., Danchin, A., Saint Girons, I., Somerville, R.L., Wen, Y.-M., Shi, M.-H., Chen, Z., Xu, J.-G., Zhao, G.-P., 2003. Unique physiological and pathogenic features of Leptospira interrogans revealed by whole-genome sequencing. Nature 422, 888–893. https://doi.org/10.1038/nature01597

Ricaldi, J.N., Swancutt, M.A., Matthias, M.A., 2013. Current trends in translational research in leptospirosis. Curr Opin Infect Dis 26, 399–403. https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000001

Richard, E., Bourhy, P., Picardeau, M., Moulin, L., Wurtzer, S., 2021. Effect of disinfection agents and quantification of potentially viable Leptospira in fresh water samples using a highly sensitive integrity-qPCR assay. PLoS ONE 16, e0251901. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251901

Richard, M., Graaf, M. de, Herfst, S., 2014. Avian influenza A viruses: from zoonosis to pandemic. Future Virology 9, 513–524. https://doi.org/10.2217/fvl.14.30

Riediger, I.N., Hoffmaster, A.R., Casanovas-Massana, A., Biondo, A.W., Ko, A.I., Stoddard, R.A., 2016. An Optimized Method for Quantification of Pathogenic Leptospira in Environmental Water Samples. PLoS ONE 11, e0160523. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160523

Ristow, P., Bourhy, P., Kerneis, S., Schmitt, C., Prevost, M.-C., Lilenbaum, W., Picardeau, M., 2008. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires 9.

Roqueplo, C., Kodjo, A., Demoncheaux, J., Scandola, P., Bassene, H., Diatta, G., Sokhna, C., Raoult, D., Davoust, B., Mediannikov, O., 2019. Leptospirosis, one neglected disease in rural Senegal. Vet Med Sci 5, 536–544. https://doi.org/10.1002/vms3.186

Rosa, M.I., Reis, M.F. dos, Simon, C., Dondossola, E., Alexandre, M.C., Colonetti, T., Meller, F.O., 2017. IgM ELISA for leptospirosis diagnosis: a systematic review and meta-analysis. Ciênc. saúde coletiva 22, 4001–4012. https://doi.org/10.1590/1413-812320172212.14112016

Rose, L.J., O'Connell, H., 2009. UV Light Inactivation of Bacterial Biothreat Agents. AEM 75, 2987–2990. https://doi.org/10.1128/AEM.02180-08

Rossati, A., 2017. Global Warming and Its Health Impact. Int J Occup Environ Med 8, 7–20. https://doi.org/10.15171/ijoem.2017.963

Roussel, C., Galia, W., Leriche, F., Chalancon, S., Denis, S., Van de Wiele, T., Blanquet-Diot, S., 2018. Comparison of conventional plating, PMA-qPCR, and flow cytometry for the determination of viable enterotoxigenic Escherichia coli along a gastrointestinal in vitro model. Appl Microbiol Biotechnol 102, 9793–9802. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9380-z

Ryu, S., Lau, C.L., Chun, B.C., 2017. The impact of Livestock Manure Control Policy on human leptospirosis in Republic of Korea using interrupted time series analysis. Epidemiol. Infect. 145, 1320–1325. https://doi.org/10.1017/S0950268817000218

Saito, M., Miyahara, S., Villanueva, S.Y.A.M., Aramaki, N., Ikejiri, M., Kobayashi, Y., Guevarra, J.P., Masuzawa, T., Gloriani, N.G., Yanagihara, Y., Yoshida, S., 2014. PCR and Culture Identification of Pathogenic Leptospira spp. from Coastal Soil in Leyte, Philippines, after a Storm Surge during Super Typhoon Haiyan (Yolanda). Appl. Environ. Microbiol. 80, 6926–6932. https://doi.org/10.1128/AEM.02568-14

Saito, M., Villanueva, S.Y.A.M., Chakraborty, A., Miyahara, S., Segawa, T., Asoh, T., Ozuru, R., Gloriani, N.G., Yanagihara, Y., Yoshida, S., 2013. Comparative Analysis of Leptospira Strains Isolated from Environmental Soil and Water in the Philippines and Japan. Appl. Environ. Microbiol. 79, 601–609. https://doi.org/10.1128/AEM.02728-12

Samrot, A.V., Sean, T.C., Bhavya, K.S., Sahithya, C.S., Chan-drasekaran, S., Palanisamy, R., Robinson, E.R., Subbiah, S.K., Mok, P.L., 2021. Leptospiral Infection, Pathogenesis and Its Diagnosis—A Review. Pathogens 10, 145. https://doi.org/10.3390/pathogens10020145

Sanborn, M., 2013. Maladies reliées aux loisirs aquatiques.

Sant'Anna, R., Vieira, A.S., Grapiglia, J., Lilenbaum, W., 2017. High number of asymptomatic dogs as leptospiral carriers in an endemic area indicates a serious public health concern. Epidemiol. Infect. 145, 1852–1854. https://doi.org/10.1017/S0950268817000632

Sato, Y., Mizuyama, M., Sato, M., Minamoto, T., Kimura, R., Toma, C., 2019. Environmental DNA metabarcoding to detect pathogenic Leptospira and associated organisms in leptospirosis-endemic areas of Japan. Sci Rep 9, 6575. https://doi.org/10.1038/s41598-019-42978-1

Satou, K., Shimoji, M., Tamotsu, H., Juan, A., Ashimine, N., Shinzato, M., Toma, C., Nohara, T., Shiroma, A., Nakano, K., Teruya, K., Terabayashi, Y., Ohki, S., Koizumi, N., Okano, S., Suzuki, T., Hirano, T., 2015. Complete Genome Sequences of Low-Passage Virulent and High-Passage Avirulent Variants of Pathogenic *Leptospira interrogans* Serovar Manilae Strain UP-MMC-NIID, Originally Isolated from a Patient with Severe Leptospirosis, Determined Using PacBio Single-Molecule Real-Time Technology: TABLE 1. Genome Announc. 3, e00882-15, /ga/3/4/e00882-15.atom. https://doi.org/10.1128/genomeA.00882-15

Scarlatescu, E., Lance, M.D., 2019. Crimean–Congo haemorrhagic fever: test early with ROTEM? The Lancet Infectious Diseases 19, 796–797. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30298-1

Schaechter, M., 2001. Escherichia coli and Salmonella 2000: the View From Here. Microbiol Mol Biol Rev 65, 119–130. https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.119-130.2001

Schiettekatte, O., 2018. Rôle des phages dans l'évolution des leptospires 229.

Schmaljohn, C., 1997. Hantaviruses: A Global Disease Problem. Emerg. Infect. Dis. 3, 95–104. https://doi.org/10.3201/eid0302.970202

Schneider, A.G., Casanovas-Massana, A., Hacker, K.P., Wunder, E.A., Begon, M., Reis, M.G., Childs, J.E., Costa, F., Lindow, J.C., Ko, A.I., 2018. Quantification of pathogenic Leptospira in the soils of a Brazilian urban slum. PLoS Negl Trop Dis 12, e0006415. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006415

Schneider, M.C., Najera, P., Pereira, M.M., Machado, G., dos Anjos, C.B., Rodrigues, R.O., Cavagni, G.M., Muñoz-Zanzi, C., Corbellini, L.G., Leone, M., Buss, D.F., Aldighieri, S., Espinal, M.A., 2015. Leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: An Ecosystem Approach in the Animal-Human Interface. PLoS Negl Trop Dis 9, e0004095. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004095

Schuller, S., Arent, Z., Gilmore, C., Nally, J., 2015. Prevalence of antileptospiral serum antibodies in dogs in Ireland. The Veterinary record 177. https://doi.org/10.1136/vr.102916
Schultz, M., 2008. Rudolf Virchow. https://doi.org/10.3201/eid1409.080667
Schwan, T.G., 1998. Bloodstream- Versus Tick-Associated Variants of a Relapsing Fever Bacterium. Science 280, 1938–1940. https://doi.org/10.1126/science.280.5371.1938
Scialfa, E., Grune, S., Brihuega, B., Aguirre, P., Rivero, M., 2018. Isolation of saprophytic Leptospira spp. from a selected environmental water source of Argentina. Revista Argentina de Microbiología 50, 323–326. https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.08.003
Seguel, M., Muñoz, F., Paredes, E., Navarrete, M.J., Gottdenker, N.L., 2017. Pathological Findings in Wild Rats (Rattus rattus) Captured at Guafo Island, Northern Chilean Patagonia. Journal of Comparative Pathology 157, 163–173. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2017.07.006
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., Vinetz, J.M., Peru-United States Leptospirosis Consortium, 2005. Clinical Spectrum of Pulmonary Involvement in Leptospirosis in a Region of Endemicity, with Quantification of Leptospiral Burden. Clinical Infectious Diseases 40, 343–351. https://doi.org/10.1086/427110
Sejvar, J., Bancroft, E., Winthrop, K., Bettinger, J., Bajani, M., Bragg, S., Shutt, K., Kaiser, R., Marano, N., Popovic, T., Tappero, J., Ashford, D., Mascola, L., Vugia, D., Perkins, B., Rosenstein, N., the Eco-Challenge Investigation Team, 2003. Leptospirosis in “Eco-Challenge” Athletes, Malaysian Borneo, 2000. Emerg. Infect. Dis. 9, 702–707. https://doi.org/10.3201/eid0906.020751
SEROPOSITIVITY TO LEPTOSPIROSIS IN DOMESTIC RESERVOIRS AND DETECTION OF Leptospira spp, 2011. 5.
Shenberg, E., 1967. Growth of pathogenic Leptospira in chemically defined media. J Bacteriol 93, 1598–1606. https://doi.org/10.1128/jb.93.5.1598-1606.1967
Shih, C.M., Chao, L.L., 1998. Lyme disease in Taiwan: primary isolation of Borrelia burgdorferi-like spirochetes from rodents in the Taiwan area. Am J Trop Med Hyg 59, 687–692. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.687
Singleton, G.R., 1997. The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. Current Biology 7, R126. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(97)70976-X
Slack, A.T., Khairani-Bejo, S., Symonds, M.L., Dohnt, M.F., Galloway, R.L., Steigerwalt, A.G., Bahaman, A.R., Craig, S., Harrower, B.J., Smythe, L.D., 2009. Leptospira kmetyi sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY 59, 705–708. https://doi.org/10.1099/ijs.0.002766-0
Slack, A.T., Symonds, M.L., Dohnt, M.F., Smythe, L.D., 2006. [No title found]. BMC Microbiol 6, 95. https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-95
Slamti, L., Picardeau, M., 2012. Construction of a library of random mutants in the spirochete Leptospira biflexa using a mariner transposon. Methods Mol Biol 859, 169–176. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-603-6_9
Šmajs, D., Strouhal, M., Knauf, S., 2018. Genetics of human and animal uncultivable treponemal pathogens. Infection, Genetics and Evolution 61, 92–107. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.015
Smith, C.E.G., Turner, L.H., 1961. TABLE I SURVIVAL TIMES (IN DAYS) OF LEPTOSPIRA STRAINS IN BUFFERED DISTILLED WATER AT VARYING pH 9.
Smith, G.C., Delahay, R.J., 2018. Modeling as a Decision Support Tool for Bovine TB Control Programs in Wildlife. Front Vet Sci 5, 276. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00276
Song, A.T.W., Abas, L., Andrade, L.C., Andraus, W., D’Albuquerque, L. a. C., Abdala, E., 2016. A first report of leptospirosis after liver transplantation. Transplant Infectious Disease 18, 137–140. https://doi.org/10.1111/tid.12490
Soo, Z.M.P., Khan, N.A., Siddiqui, R., 2020. Leptospirosis: Increasing importance in developing countries. Acta Tropica 201, 105183. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105183

Spiri, A.M., Rodriguez-Campos, S., Matos, J.M., Glaus, T.M., Riond, B., Reusch, C.E., Hofmann-Lehmann, R., Willi, B., 2017. Clinical, serological and echocardiographic examination of healthy field dogs before and after vaccination with a commercial tetravalent leptospirosis vaccine 11.

Stackebrandt, E., Chertkov, O., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N., Deshpande, S., Cheng, J.-F., Tapia, R., Goodwin, L.A., Pitluck, S., Liolios, K., Pagani, I., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Huntemann, M., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Pan, C., Rohde, M., Gronow, S., Göker, M., Detter, J.C., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Woyke, T., Kyrpides, N.C., Klenk, H.-P., 2013. Genome sequence of the free-living aerobic spirochete Turneriella parva type strain (HT), and emendation of the species Turneriella parva. Stand. Genomic Sci. 8, 228–238. https://doi.org/10.4056/sigs.3617113

Stamm, L.V., Charon, N.W., 1988. Sensitivity of pathogenic and free-living Leptospira spp. to UV radiation and mitomycin C. Applied and Environmental Microbiology 54, 728–733. https://doi.org/10.1128/AEM.54.3.728-733.1988

Stern, E.J., Galloway, R., Shadomy, S.V., Wannemuehler, K., Atrubin, D., Blackmore, C., Wofford, T., Wilkins, P.P., Ari, M.D., Harris, L., Clark, T.A., 2010. Outbreak of Leptospirosis among Adventure Race Participants in Florida, 2005. CLIN INFECT DIS 50, 843–849. https://doi.org/10.1086/650578

Stoddard, R.A., Gee, J.E., Wilkins, P.P., McCaustland, K., Hoffmaster, A.R., 2009. Detection of pathogenic Leptospira spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the LipL32 gene. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 9.

Strand, T., Lõhmus, M., Persson Vinnersten, T., Råsbäck, T., Sundström, K., Bergström, T., Lundkvist, Å., 2015. Highly Pathogenic Leptospira Found in Urban Brown Rats (Rattus norvegicus) in the Largest Cities of Sweden. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.) 15. https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1800

Sullivan, T.P., Sullivan, D.S., Hogue, E.J., 2001. Reinvasion dynamics of northern pocket gopher (Thomomys talpoides) populations in removal areas. Crop Protection 20, 189–198. https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00126-5

Sullivan, T.P., Sullivan, D.S., Ransome, D.B., Lindgren, P.M.F., 2003. Impact of Removal-Trapping on Abundance and Diversity Attributes in Small-Mammal Communities. Wildlife Society Bulletin (1973-2006) 31, 464–474.

Tahara, H., Takabe, K., Sasaki, Y., Kasuga, K., Kawamoto, A., Koizumi, N., Nakamura, S., 2018. The mechanism of two-phase motility in the spirochete *Leptospira* : Swimming and crawling. Sci. Adv. 4, eaar7975. https://doi.org/10.1126/sciadv.aar7975

Tajadini, M., Panjehpour, M., Javanmard, S.H., 2014. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. Adv Biomed Res 3. https://doi.org/10.4103/2277-9175.127998

Takabe, K., Nakamura, S., Ashihara, M., Kudo, S., 2013. Effect of osmolarity and viscosity on the motility of pathogenic and saprophytic *Leptospira*: Motility of pathogenic *Leptospira*. Microbiol Immunol 57, 236–239. https://doi.org/10.1111/1348-0421.12018

Takhampunya, R., Korkusol, A., Pongpichit, C., Yodin, K., Rungrojn, A., Chanarat, N., Promsathaporn, S., Monkanna, T., Thaloengsok, S., Tippayachai, B., Kumfao, N., Richards, A.L., Davidson, S.A., 2019. Metagenomic Approach to Characterizing Disease Epidemiology in a Disease-Endemic Environment in Northern Thailand. Front. Microbiol. 10, 319. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00319

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28, 2731–2739. https://doi.org/10.1093/molbev/msr121

Tansuphasiri, U., Thipsuk, C., Phulsuksombati, D., Chanyasanha, C., 2006. DUPLEX PCR-HYBRIDIZATION BASED DETECTION OF PATHOGENIC LEPTOSPIRA IN ENVIRONMENTAL

WATER SAMPLES OBTAINED FROM ENDEMIC AREAS IN NORTHEAST REGION OF THAILAND. SOUTHEAST ASIAN J TROP MED PUBLIC HEALTH 37, 13.
Taseva, E., Christova, I., Gladnishka, T., 2007. P1052 Epidemiological, clinical and serological features of human leptospirosis in Bulgaria in 2005. International Journal of Antimicrobial Agents 29, S282. https://doi.org/10.1016/S0924-8579(07)70892-0
Taylor, A.J., Paris, D.H., Newton, P.N., 2015. A Systematic Review of the Mortality from Untreated Leptospirosis. PLoS Negl Trop Dis 9, e0003866. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003866
Taylor, L.H., Latham, S.M., woolhouse, M.E.J., 2001. Risk factors for human disease emergence. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 356, 983–989. https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0888
Techawiwattanaboon, T., Patarakul, K., 2019. Update on molecular diagnosis of human leptospirosis. Asian Biomedicine 13, 207–216. https://doi.org/10.1515/abm-2019-0063
Thaipadungpanit, J., Wuthiekanun, V., Chantratita, N., Yimsamran, S., Amornchai, P., Boonsilp, S., Maneeboonyang, W., Tharnpoophasiam, P., Saiprom, N., Mahakunkijcharoen, Y., Day, N.P.J., Singhasivanon, P., Peacock, S.J., Limmathurotsakul, D., 2013. Leptospira Species in Floodwater during the 2011 Floods in the Bangkok Metropolitan Region, Thailand. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 89, 794–796. https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0124
Thayaparan, S., Robertson, I., Fairuz, A., Suut, L., Gunasekera, C., Abdullah, M.T., 2015. Seroepidemiological study of leptospirosis among the communities living in periurban areas of Sarawak, Malaysia 70, 8.
Thibeaux, R., Geroult, S., Benezech, C., Chabaud, S., Soupé-Gilbert, M.-E., Girault, D., Bierque, E., Goarant, C., 2017a. Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. PLoS Negl Trop Dis 11, e0005414. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005414
Thibeaux, R., Geroult, S., Benezech, C., Chabaud, S., Soupé-Gilbert, M.-E., Girault, D., Bierque, E., Goarant, C., 2017b. Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. PLoS Negl Trop Dis 11, e0005414. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005414
Thibeaux, R., Girault, D., Bierque, E., Soupé-Gilbert, M.-E., Rettinger, A., Douyère, A., Meyer, M., Iraola, G., Picardeau, M., Goarant, C., 2018a. Biodiversity of Environmental Leptospira: Improving Identification and Revisiting the Diagnosis. Front. Microbiol. 9, 816. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00816
Thibeaux, R., Iraola, G., Ferrés, I., Bierque, E., Girault, D., Soupé-Gilbert, M.-E., Picardeau, M., Goarant, C., 2018b. Deciphering the unexplored Leptospira diversity from soils uncovers genomic evolution to virulence. Microbial Genomics 4. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000144
Thibeaux, R., Soupé-Gilbert, M.-E., Kainiu, M., Girault, D., Bierque, E., Fernandes, J., Bähre, H., Douyère, A., Eskenazi, N., Vinh, J., Picardeau, M., Goarant, C., 2020. The zoonotic pathogen Leptospira interrogans mitigates environmental stress through cyclic-di-GMP-controlled biofilm production. npj Biofilms Microbiomes 6, 24. https://doi.org/10.1038/s41522-020-0134-1
Thornley, C.N., Baker, M.G., Weinstein, P., Maas, E.W., 2002. Changing Epidemiology of Human Leptospirosis in New Zealand. Epidemiology and Infection 128, 29–36.
Tilahun, Z., Reta, D., Simenew, K., 2013. Global Epidemiological Overview of Leptospirosis 8.
Timoney, J.F., Kalimuthusamy, N., Velineni, S., Donahue, J.M., Artiushin, S.C., Fettinger, M., 2011. A unique genotype of Leptospira interrogans serovar Pomona type kennewicki is associated with equine abortion. Veterinary Microbiology 150, 349–353. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.02.049
Tique, V., Mattar, S., Miranda, J., Oviedo, M., Noda, A., Montes, E., Rodriguez, V., 2018. Clinical and Epidemiological Status of Leptospirosis in a Tropical Caribbean Area of Colombia. BioMed Research International 2018, 1–8. https://doi.org/10.1155/2018/6473851

Torgerson, P.R., Hagan, J.E., Costa, F., Calcagno, J., Kane, M., Martinez-Silveira, M.S., Goris, M.G.A., Stein, C., Ko, A.I., Abela-Ridder, B., 2015. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. PLoS Negl Trop Dis 9, e0004122. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004122

Truccolo, J., Serais, O., Merien, F., Perolat, P., 2001. Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. FEMS Microbiol Lett 204, 317–321. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10904.x

Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., Cullen, P., Haake, D., 2004. INTERNATIONAL MICROBIOLOGY (2004) 7:35–40 7, 6.

Tsuha, S., Taniguchi, T., Shiiki, S., Narita, M., Leung, D., 2016. Clinical characteristics of laboratory-confirmed leptospirosis in Okinawa, Japan, 1974-2015: High incidence of Jarisch-Herxheimer reaction. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 110. https://doi.org/10.1093/trstmh/trw061

Ulrich, R.G., Heckel, G., Pelz, H.-J., Wieler, L.H., Nordhoff, M., Dobler, G., Freise, J., Matuschka, F.-R., Jacob, J., Schmidt-Chanasit, J., Gerstengarbe, F.W., Jäkel, T., Süss, J., Ehlers, B., Nitsche, A., Kallies, R., Johne, R., Günther, S., Henning, K., Grunow, R., Wenk, M., Maul, L.C., Hunfeld, K.-P., Wölfel, R., Schares, G., Scholz, H.C., Brockmann, S.O., Pfeffer, M., Essbauer, S.S., 2009. [Rodents and rodent associated disease vectors: the network of "rodent carrying pathogens" introduces itself]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 52, 352–369. https://doi.org/10.1007/s00103-009-0798-4

Urban, L., Holzer, A., Baronas, J.J., Hall, M.B., Braeuninger-Weimer, P., Scherm, M.J., Kunz, D.J., Perera, S.N., Martin-Herranz, D.E., Tipper, E.T., Salter, S.J., Stammnitz, M.R., 2021. Freshwater monitoring by nanopore sequencing. eLife 10, e61504. https://doi.org/10.7554/eLife.61504

USEPA, 1999. Wastewater technology fact sheet - Chlorine disinfection.

Vanasco, N.B., Schmeling, M.F., Lottersberger, J., Costa, F., Ko, A.I., Tarabla, H.D., 2008. Clinical characteristics and risk factors of human leptospirosis in Argentina (1999–2005). Acta Tropica 107, 255–258. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.06.007

Vein, J., Perrin, A., Berny, P.J., Benoit, E., Leblond, A., Kodjo, A., 2012. Adaptation of a real-time PCR method for the detection and quantification of pathogenic leptospires in environmental water. Can. J. Microbiol. 58, 828–835. https://doi.org/10.1139/w2012-060

Verma, A., Stevenson, B., Adler, B., 2013. Leptospirosis in horses. Veterinary microbiology 167. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.012

Viau, E.J., Boehm, A.B., 2011. Quantitative PCR-based detection of pathogenic Leptospira in Hawai'ian coastal streams. Journal of Water and Health 9, 637–646. https://doi.org/10.2166/wh.2011.064

Villanueva, S.Y.A.M., Saito, M., Baterna, R.A., Estrada, C.A.M., Rivera, A.K.B., Dato, M.C., Zamora, P.R.F.C., Segawa, T., Cavinta, L.L., Fukui, T., Masuzawa, T., Yanagihara, Y., Gloriani, N.G., Yoshida, S., 2014. Leptospira-rat-human relationship in Luzon, Philippines. Microbes and Infection 16, 902–910. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.07.001

Vincent, A.T., Schiettekatte, O., Goarant, C., Neela, V.K., Bernet, E., Thibeaux, R., Ismail, N., Mohd Khalid, M.K.N., Amran, F., Masuzawa, T., Nakao, R., Amara Korba, A., Bourhy, P., Veyrier, F.J., Picardeau, M., 2019. Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus Leptospira through the prism of genomics. PLoS Negl Trop Dis 13, e0007270. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007270

Vinetz, J.M., Matthias, M.A., Fernandez, C., Lubar, A.A., 2018. Experimental Infection of Rattus norvegicus by the Group II Intermediate Pathogen, Leptospira licerasiae. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 99, 275–280. https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0844

Vinod Kumar, K., Lall, C., Raj, R.V., Vedhagiri, K., Vijayachari, P., 2015. Coexistence and survival of pathogenic leptospires by formation of biofilm with *Azospirillum*. FEMS Microbiology Ecology 91, fiv051. https://doi.org/10.1093/femsec/fiv051

Virto, R., Mañas, P., Álvarez, I., Condon, S., Raso, J., 2005. Membrane Damage and Microbial Inactivation by Chlorine in the Absence and Presence of a Chlorine-Demanding Substrate. AEM 71, 5022–5028. https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5022-5028.2005

Vital-Brazil, J.M., Balassiano, I.T., Oliveira, F.S. de, Costa, A.D. de S., Hillen, L., Pereira, M.M., 2010. Multiplex PCR-based detection of Leptospira in environmental water samples obtained from a slum settlement. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105, 353–355. https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000300020

Vokaty, A., Thomas, R., Ahmed, S., van Sauers, A., Peters, L.L., Louison, B., Da Silva, J., Gikonyo, K., Rahaman, S., Pradel, J., 2016. Leptospirosis in the Caribbean: A One Health approach. International Journal of Infectious Diseases 53, 63–64. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.160

W, Z., L, L., B, Y., W, F., T, J., J, Y., L, Jiandong, L, Jianming, Z, R., N, P., J, H., X, L., H, W., M, J., Liu, Y., 2017. A Severe Leptospira interrogans Serovar Copenhageni Infection Diagnosed by Next-Generation Sequencing and Treated with Corticosteroids. Arch Clin Microbiol 08. https://doi.org/10.4172/1989-8436.100043

Waggoner, J.J., Balassiano, I., Abeynayake, J., Sahoo, M.K., Mohamed-Hadley, A., Liu, Y., Vital-Brazil, J.M., Pinsky, B.A., 2014. Sensitive Real-Time PCR Detection of Pathogenic Leptospira spp. and a Comparison of Nucleic Acid Amplification Methods for the Diagnosis of Leptospirosis. PLoS ONE 9, e112356. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112356

Wasiński, B., Dutkiewicz, J., 2013. Leptospirosis – current risk factors connected with human activity and the environment. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 20, 7.

Weinberger, D., Baroux, N., Grangeon, J.-P., Ko, A.I., Goarant, C., 2014. El Niño Southern Oscillation and Leptospirosis Outbreaks in New Caledonia. PLoS Negl Trop Dis 8, e2798. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002798

Werts, C., 2017. Interaction of Leptospira with the Innate Immune System, in: Adler, B. (Ed.), Spirochete Biology: The Post Genomic Era, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer International Publishing, Cham, pp. 163–187. https://doi.org/10.1007/82_2017_46

WHO, n.d. Guideline for drinkin water quality.

Wilson, M.R., Naccache, S.N., Samayoa, E., Biagtan, M., Bashir, H., Yu, G., Salamat, S.M., Somasekar, S., Federman, S., Miller, S., Sokolic, R., Garabedian, E., Candotti, F., Buckley, R.H., Reed, K.D., Meyer, T.L., Seroogy, C.M., Galloway, R., Henderson, S.L., Gern, J.E., DeRisi, J.L., Chiu, C.Y., 2014. Actionable Diagnosis of Neuroleptospirosis by Next-Generation Sequencing. N Engl J Med 370, 2408–2417. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1401268

Wilson, R., Fujioka, R., 1995. Development of a method to selectively isolate pathogenic Leptospira from environmental samples 8.

Wirth, R., Ugele, M., Wanner, G., 2016. Motility and Ultrastructure of Spirochaeta thermophila. Front. Microbiol. 7. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01609

Wójcik-Fatla, A., Zając, V., Wasiński, B., Sroka, J., Cisak, E., Sawczyn, A., Dutkiewicz, J., 2014. Occurrence of Leptospira DNA in water and soil samples collected in eastern Poland 4.

Wolgemuth, C.W., 2015. Flagellar motility of the pathogenic spirochetes. Seminars in Cell & Developmental Biology 46, 104–112. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.015

Woods, K., Nic-Fhogartaigh, C., Arnold, C., Boutthasavong, L., Phuklia, W., Lim, C., Chanthongthip, A., Tulsiani, S.M., Craig, S.B., Burns, M.-A., Weier, S.L., Davong, V., Sihalath, S., Limmathurotsakul, D., Dance, D.A.B., Shetty, N., Zambon, M., Newton, P.N., Dittrich, S., 2018. A comparison of two molecular methods for diagnosing leptospirosis from three different sample types in patients presenting with fever in Laos. Clinical Microbiology and Infection 24, 1017.e1-1017.e7. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.017

Wurtzer, S., Prevost, B., Lucas, F., Moulin, L., 2014. Detection of enterovirus in environmental waters: A new optimized method compared to commercial real-time RT-qPCR kits. Journal of virological methods 209. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.08.016

Xu, L., Zhang, C., Xu, P., Wang, X.C., 2018. Mechanisms of ultraviolet disinfection and chlorination of Escherichia coli: Culturability, membrane permeability, metabolism, and genetic damage. Journal of Environmental Sciences 65, 356–366. https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.07.006

Xu, Y., Zhu, Yongzhang, Wang, Y., Chang, Y.-F., Zhang, Y., Jiang, X., Zhuang, X., Zhu, Yongqiang, Zhang, J., Zeng, L., Yang, M., Li, S., Wang, S., Ye, Q., Xin, X., Zhao, G., Zheng, H., Guo, X., Wang, J., 2016. Whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic Leptospira. Sci Rep 6, 20020. https://doi.org/10.1038/srep20020

Yasuda, P.H., Steigerwalt, A.G., Sulzer, K.R., Kaufmann, A.F., Rogers, F., Brenner, D.J., 1987. Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New Leptospira Species. International Journal of Systematic Bacteriology 37, 407–415. https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-407

Yoder, J., 2008. Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events--United States, 2005-2006.

Zakharova, O.I., Korennoy, F.I., Toropova, N.N., Burova, O.A., Blokhin, A.A., 2020. Environmental Risk of Leptospirosis in Animals: The Case of the Republic of Sakha (Yakutia), Russian Federation. Pathogens 9, 504. https://doi.org/10.3390/pathogens9060504

Zaki, S.A., Shanbag, P., 2010. Clinical manifestations of dengue and leptospirosis in children in Mumbai: an observational study. Infection 38, 285–291. https://doi.org/10.1007/s15010-010-0030-3

Zamora, J., Enrique, K., Boué, R., Torres, F., Airado, J., Hernández, D., 2005. [Scale-up of the fermentation of Leptospira interrogans canicola canicola for the production of vax-SPIRAL vaccine]. Revista cubana de medicina tropical 57, 71–2.

Zhang, Y., Kitajima, M., Whittle, A.J., Liu, W.-T., 2017. Benefits of Genomic Insights and CRISPR-Cas Signatures to Monitor Potential Pathogens across Drinking Water Production and Distribution Systems. Front. Microbiol. 8, 2036. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02036

Zilber, A.-L., Belli, P., Artois, M., Kodjo, A., Djelouadji, Z., 2016. First Observation of *Leptospira interrogans* in the Lungs of *Rattus norvegicus*. BioMed Research International 2016, 1–8. https://doi.org/10.1155/2016/9656274

Zinsstag, J., Meisser, A., Schelling, E., Bonfoh, B., Tanner, M., 2012. From 'two medicines' to 'One Health' and beyond. Onderstepoort J Vet Res 79, 5 pages. https://doi.org/10.4102/ojvr.v79i2.492

Zuerner, R.L., 2015. Host response to leptospira infection. Curr Top Microbiol Immunol 387, 223–250. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45059-8_9

Zuerner, R.L., Cameron, C.E., Raverty, S., Robinson, J., Colegrove, K.M., Norman, S.A., Lambourn, D., Jeffries, S., Alt, D.P., Gulland, F., 2009. Geographical dissemination of Leptospira interrogans serovar Pomona during seasonal migration of California sea lions. Veterinary Microbiology 137, 105–110. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.017

Zuerner, R.L., Herrmann, J.L., Saint Girons, I., 1993. Comparison of genetic maps for two Leptospira interrogans serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. Journal of Bacteriology 175, 5445–5451. https://doi.org/10.1128/JB.175.17.5445-5451.1993

Résumé

Les leptospires pathogènes sont responsables d'une zoonose de répartition mondiale, la leptospirose, où l'homme peut être un hôte occasionnel. Le réservoir animal, principalement les rongeurs, excrète les leptospires dans ses urines et contamine ainsi l'environnement hydrique. Depuis 2015, près de 600 cas de leptospirose ont été recensés en Métropole. L'augmentation du nombre de cas pourrait être due à plusieurs facteurs dont l'augmentation des comportements à risques (ex : sports aquatiques). L'étude de l'écologie des leptospires en milieu aquatique se développe ces dernières années, mais ces bactéries ne sont toujours pas intégrées dans le contrôle sanitaire des eaux. Les activités nautiques en milieu urbain sont de plus en plus fréquentes et pourraient augmenter l'exposition des usagers à ce pathogène.

Dans ces travaux nous avons tenté d'obtenir un premier aperçu de la présence des leptospires dans les eaux de surface parisiennes. Pour ce faire, une qPCR d'intégrité fonctionnant en multiplex a été mise au point. Basée sur deux gènes spécifiques et éprouvée lors de tests d'inactivation (UV, chlore, etc.), elle permet la détection de l'ensemble des leptospires (gène rrs) mais également la distinction de la part de pathogènes (gène *lipL32*). De juin 2018 à septembre 2020, cette méthode a été appliquée sur la recherche des leptospires pathogènes chez les rats (plus de 190 reins analysés) et sur plusieurs sites d'eau douce (plus de 1000 prélèvements), susceptibles d'accueillir des lieux de baignades. Dans un second temps, une comparaison de la diversité des souches circulantes dans les eaux et celles présentes chez le rat (réservoir principal potentiel) a également pu être étudiée par séquençage NGS. L'analyse des reins de rats a révélé la présence d'une seule OTU, regroupant des espèces pathogènes. Du fait de la grande diversité de leptospires et de bactéries dans les eaux de surface, la diversité au sein des échantillons environnementaux est plus grande mais comprend parfois des leptospires pathogènes. La concentration de ces espèces semble diminuer ces dernières années.

Ces résultats permettent pour la première fois de connaitre la contamination environnementale dans les zones de baignade urbaine, au sein d'une grande agglomération (sous climat tempéré), en utilisant Paris comme région « témoin » dans un contexte d'ouverture programmée d'espaces de baignade dans des eaux de surface. Inscrit dans l'approche One Health, ce projet a pour objectif de sensibiliser la communauté médicale, la population et les services de contrôles sanitaires de l'eau sur le risque potentiel lié à ces bactéries ; et si cela est justifié, de mettre en place des mesures de prévention.

Abstract

Pathogenic *Leptospira* are responsible for a worldwide zoonosis, leptospirosis, where humans can be an occasional host whose infection involves both wild and domestic animals. The animal reservoir, mainly rodents that are asymptomatics, excrete *Leptospira* through urine and contaminate surface water. Since 2015, nearly 600 cases of leptospirosis have been identified in Metropolitan France area. The increase in the number of cases could be due to several factors, including the increase in risky behavior (eg: water sports). The study of *Leptospira* ecology in aquatic environments has been developed in recent years, but these bacteria are still not included in the water sanitary monitoring. Water activities in densely populated urban areas are increasingly used and could increase users' exposure to pathogens, including *Leptospira*.

In this work we have tried to obtain a first glance of the *Leptospira* presence in Parisian surface waters. An integrity multiplex qPCR has been developed to this purpose. Based on two specific genes and tested in several bacterial inactivation tests (UV, chlorination, etc.), it allows the detection of all *Leptospira* (rrs gene) but also the distinction of pathogens (*lipL32* gene). From June 2018 to September 2020, this method was applied to the investigation of pathogenic *Leptospira* in rats (more than 190 kidneys analyzed) and on several surface water sites (more than 1000 samples), predisposed to accommodate swimming areas. Secondly, a diversity comparison of strains circulating in water and those identified in rats (potential main reservoir) had also been studied by NGS sequencing. Analysis of rat kidneys revealed the classification of a single OTU, grouping together with pathogenic species. Due to the great diversity of *Leptospira* and bacteria in surface waters, the diversity within environmental samples is more important but could sometimes include pathogenic *Leptospira*. Pathogenics strains seem to decrease in the recent years.

For the first time, these results make it possible to know the environmental contamination in the bathing areas, using Paris as a "pilot" region in the context of the programmed opening of bathing areas in surface water. As part of the One Health approach, this project aims to help the medical community, the population and the water health control services to know the potential risk associated with these bacteria; and if justified, to put in place preventive measures.