



Université de La REUNION

UFR SANTE

**UMR PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical)
UMR ASTRE (Animal- Santé- Territoire- Risques- Ecosystèmes)**

Master 2 biologie santé parcours infectiologie tropicale

Thème :

Survie des leptospires pathogènes dans l'environnement

Interreg
Océan Indien



Cofinancé par
L'UNION EUROPÉENNE

PRERISK-OI



Présenté par : **Ouarda KEROU**

Encadré par : **Pablo TORTOSA**, Professeur à l'université de La Réunion

Année :2023/2024

Résumé.

La leptospirose est une zoonose d'importance médicale majeure en zone tropicale. La transmission des leptospires se fait essentiellement de manière indirecte, au contact d'un environnement contaminé par l'urine issue d'animaux réservoirs. L'étude des traits d'histoire de vie des leptospires dans l'environnement est par conséquent un élément clé pour estimer le risque d'infection. Nous avons mesuré la survie des leptospires dans différentes conditions d'humidité et de température, en utilisant des isolats représentant la diversité de leptospires pathogènes d'intérêt médical à La Réunion : deux isolats cliniques des espèces *Leptospira borgpetersenii* et *Leptospira interrogans*, ainsi d'un isolat de *L. interrogans* de chien. Nos résultats indiquent que *L. borgpetersenii* résiste mieux à des températures élevées que *L. interrogans*. Lorsque les bactéries sont exposées pendant 1h à des températures comprises entre 30 et 40°C, les deux espèces présentent des profils de survie significativement différents, la T_{50} (température à laquelle 50 % des bactéries meurent après 1h d'exposition) étant supérieure de plus de 2 degrés pour *L. borgpetersenii*. Dans un milieu minimum, *L. borgpetersenii* peut survivre plus de dix jours à 37°C alors que *L. interrogans* n'est plus observable ni cultivable au-delà de sept jours. En revanche, *L. interrogans* survit plus longtemps que *L. borgpetersenii* en absence d'eau. Ces données sont mises en perspective avec l'évolution apparente que connaît l'épidémiologie de la leptospirose à La Réunion dans un contexte de changement climatique mesuré sur l'île à l'échelle des dix dernières années.

Summary.

Leptospirosis is a zoonosis of major medical concern in tropical regions, including in the French islands of the Indian Ocean. Transmission of bacteria occurs indirectly through contact with environments contaminated by urine from reservoir animals. Therefore, measuring the survival of leptospires under different environmental conditions is key for estimating infection risk. We measured the survival of leptospires under different humidity and temperature conditions using isolates of medical importance on Réunion Island. We studied the survival of two clinical isolates of *Leptospira borgpetersenii* and *Leptospira interrogans*, as well as of a *L. interrogans* isolate obtained from dog urine. Our results indicate that *L. borgpetersenii* can survive at higher temperature than *L. interrogans*. When incubated for 1 hour at temperatures ranging from 30 to 40°C : both species display significantly different survival profiles, with the median lethal temperature (T_{50}) being more than 2 degrees higher for *L. borgpetersenii*. In minimal medium, *L. borgpetersenii* could survive for over ten days at 37°C while *L. interrogans* was neither observable nor culturable beyond seven days. Lastly, we show that *L. interrogans* can survive longer than *L. borgpetersenii* in the absence of water. These data are analyzed in the context of climate change and of the current dynamics of human leptospirosis epidemiology in Réunion Island.

Sommaire

Résumé.....	1
Introduction.....	4
<i>Leptospira</i> et leptospirose.	4
Epidémiologie de la leptospirose.	4
Cycles de transmission.....	4
Diagnostic et symptomatologie de la maladie.....	5
Survie des leptospires dans l'environnement.....	5
La leptospirose dans l'océan indien.....	7
Matériel et méthodes.	8
Souches de leptospires et milieux de culture :	8
Mesure de la survie des leptospires par V-PCR.	9
Mesure de la survie des leptospires par microscopie :	9
Mesure de l'effet de la température sur la survie des leptospires :	10
Survie des leptospires à sec.....	10
Détection et purification d'ADN de leptospire environnemental.....	10
Analyses statistiques :	11
Résultats.....	11
Survie des leptospires à différentes conditions de températures.	11
Etude de survie de leptospires à 28°C et 37°C.....	12
Survie des leptospires à sec.....	13
Détection de leptospires dans les échantillons environnementaux :	14
Discussion.....	15
Conclusion.	17
Références	18
Annexe 1.....	20

Abréviations :

SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë.

ECG : Electrocardiogramme.

MAT : Test de Micro Agglutination.

ELISA : Test d'Immuno-absorption -enzymatique.

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne.

PFGE : Electrophorèse sur gel en champ pulsé.

PMA : Monoazide de Propidium.

EMJH : Milieu Ellinghausen McCullough, Johnson and Harris

V-PCR. : Viability-PCR.

PSM : Poste de sécurité microbiologique.

MM : Milieu Minimum

Introduction.

***Leptospira* et leptospirose.**

Les leptospires pathogènes sont l'agent causal de la leptospirose, une zoonose également connue sous le nom de maladie de Weil. Les bactéries du genre *Leptospira* appartiennent à l'ordre des spirochètes, à la famille des Leptospiraceae, et ont une forme spiralée caractéristique qui leur confère une mobilité particulière (1). La maladie a une distribution mondiale mais l'incidence est maximale dans les environnements chauds et humides typiques des milieux tropicaux, propices à leur survie dans l'environnement. Le cycle de vie des leptospires pathogènes implique un hôte réservoir, généralement un animal porteur asymptomatique (1). Historiquement le genre *Leptospira* était divisé en deux espèces : *Leptospira interrogans* « *sensu lato* », contenant toutes les souches pathogènes pour l'homme et/ou l'animal, et *Leptospira biflexa* « *sensu lato* », contenant toutes les souches saprophytes isolées de l'environnement et non pathogènes pour l'homme ni pour l'animal (2). Plus récemment, une nouvelle classification issue notamment de données génomiques, tend à s'imposer et sépare les leptospires en 2 clades pathogènes P1 et P2, et deux clades saprophytes S1 et S2. 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 et le sous-groupe S2 comprend des espèces saprophytes détectées notamment par des approches de metabarcoding à partir d'échantillons environnementaux (3).

Epidémiologie de la leptospirose.

Si l'incidence de la maladie est plus élevée dans les régions tropicales et subtropicales (4), des cas sporadiques voire des épidémies peuvent également survenir en zone tempérée. Au niveau mondial, la morbidité et la mortalité annuelles attribuées à la leptospirose sont respectivement estimées à 15 cas et 1 décès, pour 100 000 habitants (5). Dans certaines régions, la leptospirose présente une variabilité saisonnière, avec un pic d'incidence pendant la saison des pluies (5). Les variations climatiques, telles que les inondations et les phénomènes météorologiques extrêmes, peuvent également influencer l'incidence de la leptospirose en créant des conditions favorables à la survie des leptospires dans l'environnement et à leur transmission à l'homme. Les personnes exerçant des métiers liés à l'agriculture, à l'élevage, à la pêche, ou encore travaillant dans des environnements aquatiques sont plus exposées en raison du contact fréquent avec des animaux porteurs ou avec un environnement contaminé (6).

Cycles de transmission.

La leptospirose affecte un large éventail d'animaux, tant domestiques que sauvages dont certaines espèces peuvent servir de réservoirs pour la bactérie. Les espèces animales sauvages impliquées dans la maintenance et la transmission des leptospires comprennent les rongeurs dont les rats

(e.g. *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*, *Rattus tanezumi*) et les souris (*Mus musculus*) qui jouent un rôle essentiel dans la transmission de la maladie, en particulier dans les zones urbaines où ces espèces sont abondantes (7). Au-delà des rongeurs, les cervidés, les renards et les marsupiaux peuvent également être porteurs de leptospires, contribuant ainsi à la circulation de la bactérie dans l'environnement (8). Les animaux domestiques, tels que les chiens, les bovins, les porcs et les chevaux peuvent également être infectés par des leptospires et servir de source d'infection pour les humains, même si l'importance de leur rôle en tant que réservoirs reste débattue (7). Enfin, les chauve-souris sont des réservoirs reconnus de leptospires pathogènes, mais l'importance de ce réservoir dans l'épidémiologie de la leptospirose humaine reste également à établir (9).

Diagnostic et symptomatologie de la maladie.

L'infection aiguë (<15 jr) peut être diagnostiquée efficacement à l'aide de méthodes de diagnostic moléculaire telles que la PCR sur sang ou urine, ou encore l'isolement par hémoculture (même si la croissance lente des leptospires limite l'utilisation de la culture pour le diagnostic). Le diagnostic sérologique, notamment le test de micro-agglutination (MAT) et le test immuno-enzymatique (ELISA), peuvent déterminer une infection au cours de la phase immunitaire (>7jr) (4). L'évolution clinique de la leptospirose chez l'homme est variable. La plupart des cas sont bénins et spontanément résolutifs ou asymptomatiques, tandis que certains sont graves et peuvent conduire à la mort. Les syndromes provoqués par la leptospirose sont souvent divisés en deux catégories : la leptospirose anictérique et la leptospirose ictérique. La première est la forme majoritaire de la maladie avec une phase aiguë et une phase immunitaire ; cette forme est caractérisée par un état fébrile avec des myalgies, des céphalées et de la fatigue (5 à 14 jours après l'exposition) (2). La leptospirose ictérique est la forme la plus grave de la maladie. C'est une maladie multi systémique à évolution rapide se manifestant par de la fièvre, un ictère et une insuffisance rénale. Elle engendre également une hémorragie pulmonaire avec un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), provoque une myocardite avec des anomalies de l'électrocardiogramme (ECG) et peut entraîner des méningites ainsi que des atteintes oculaires (uvéites) (10).

Survie des leptospires dans l'environnement.

La leptospirose étant une maladie à transmission essentiellement environnementale, des approches visant à détecter et caractériser l'infection dans l'environnement sont de plus en plus développées. Les études de la Professeure Geneviève André-Fontaine en 2015 ont mis en évidence la capacité de survie des leptospires pathogènes dans des eaux douces pendant des périodes extrêmement longues, avec conservation de leur virulence. Ces résultats montrent que les échantillons d'eau expérimentalement infectés par le serovar *Icterohemorrhagiae* au laboratoire permettent une survie bactérienne moyenne de 130 jours à 4 °C ; 263 jours à 20 °C et 316 jours à 30 °C. Les conditions de pH ont une influence importante sur la survie des bactéries, la survie

moyenne des leptospires est de 344 jours à pH < 7 et de 129 jours à pH ≥ 7 tout en conservant leur virulence pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois (11). Selon Bierque et al, malgré des conditions d'entreposage défavorables telles que des eaux froides et acides pauvres en nutriments, la survie et la virulence des espèces pathogènes du genre *L. interrogans* sont préservées pendant au moins 20 mois (12). L'étude de la survie de *L. interrogans* dans les microcosmes de sol a révélé que l'humidité et les caractéristiques physico-chimiques intrinsèques du sol, telles que le pH, la teneur en matières organiques et la texture, affectent la persistance de *Leptospira* (13). L'analyse épidémiologique des isolats environnementaux (eau et sol) de leptospires aux Philippines et au Japon a montré que la teneur en humidité du sol influençait grandement le succès d'isolement à partir d'échantillons de sol. Il a été suggéré que les leptospires survivent difficilement dans un sol avec une teneur en humidité <20 % (14). Il faut noter que Saito et al ont démontré, à l'aide d'une analyse par électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE), que *Leptospira* survivait dans le sol humide les jours secs et apparaissait dans les eaux de surface durant les jours de pluie (14). Ces données permettent de confirmer que les leptospires pourraient avoir un cycle de vie en dehors des hôtes animaux d'une part, et d'autre part que le sol environnemental est un réservoir potentiel de leptospires. Les leptospires, en tant que spirochètes pathogènes, présentent certaines caractéristiques qui contribuent à leur résistance dans l'environnement. Un mécanisme permettant à ces bactéries de survivre en eau douce est l'agrégation cellulaire, cette dernière est le résultat d'une attraction chimiotactique des leptospires les unes vers les autres ; favorisée par la viscosité qui maintient une structure en matrice (les cellules ensemble); et facilite la motilité multidirectionnelle des spirochètes (15). Des études *in vitro* ont montré également que les Leptospires ont la capacité de former des biofilms sur les surfaces abiotiques (tube à essai) : les bactéries saprophytes forment des biofilms en 2 à 5 jours, une moyenne de 20 jours est nécessaire pour la formation de biofilms par leurs homologues pathogènes. Les chercheurs notent que cette capacité de ces micro-organismes à synthétiser des biofilms est l'un des principaux facteurs de résistance face à différentes conditions de stress environnemental (température, pH ...etc.) (16). Le séquençage des génomes d'isolats représentant la diversité mondiale de leptospires d'intérêt médical a confirmé une grande variabilité et plasticité génomique, cette variation génétique a été attribuée à des événements de gain et de perte massifs de gènes permettant l'acquisition progressive de facteurs de virulence (protéines spécifiques) chez les leptospires pathogènes ce qui explique leur pouvoir d'adaptation à des conditions changeantes et défavorables (17) . De plus, des études *in vitro* ont montré des changements transcriptomiques importants en fonction des températures de cultures (20°C, 30°C, 37°C et 39°C), notamment dans l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la chimiotaxie, la motilité, les systèmes de transduction de signal ou encore dans l'altération de la membrane externe. Ces

résultats indiquent que la température est un facteur important régulant l'expression des protéines qui facilitent l'invasion des hôtes vertébrés ou la survie dans l'environnement (18).

La leptospirose dans l'océan indien.

La leptospirose est un problème de santé publique majeur dans les îles de l'océan Indien où la maladie a été signalée dans plusieurs régions et lles-Etats, notamment la Réunion (19), Mayotte (20), les Seychelles (21) et Madagascar (9). Des études menées dans un cadre One Health ont révélé des cycles de transmission distincts sur les différentes îles de l'océan Indien, composés d'espèces de leptospires et de réservoirs animaux différents : à Madagascar, *Leptospira mayottensis* est spécifiquement associée à des réservoirs particuliers qui sont les Tenrecidae, une famille de petits mammifères terrestres endémiques de Madagascar. En parallèle, l'espèce *Leptospira borgpetersenii* se distingue par une diversité remarquable de lignées pathogènes, chacune étant strictement liée à des hôtes mammifères endémiques spécifiques tel que les chauves-souris, les tenrecs ou les rongeurs endémiques de Madagascar (24). Une grande diversité de leptospires est responsable de la leptospirose sur l'île de Mayotte, cette diversité résulte pour partie au moins, de leptospires endémiques de Madagascar due à *L. mayottensis*, qui ont été introduits par l'homme à partir de tangles de Madagascar pour y être utilisés comme gibier (23). A la Réunion, bien que les chauves-souris soient fortement infectées par *L. borgpetersenii*, elles ne contribuent pas à la leptospirose humaine (9,19). D'autre part, les souris et les bovins excrètent également *L. borgpetersenii*, dont le génotype est commun à celui retrouvé chez 3% des cas humains graves (19). Enfin, les chiens sont infectés par *L. interrogans*, et les deux génotypes identifiés chez ces animaux correspondent précisément à ceux retrouvés dans l'ensemble des cas humains graves de leptospirose. En outre, l'une des conclusions significatives de cette étude souligne que les chiens ne doivent pas être négligés en tant que réservoirs anecdotiques, mais au contraire nécessitent une investigation approfondie (19).

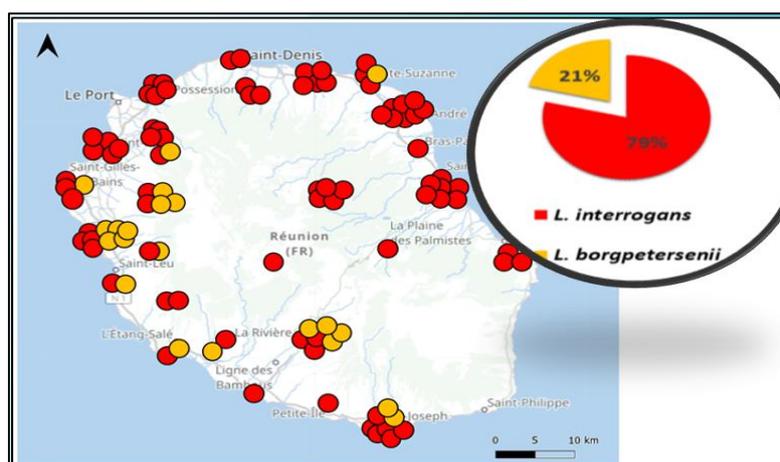


Figure 1: Distribution géographique des cas de leptospirose humaine et espèces bactériennes impliquées (24).

Une étude récente utilisant des échantillons cliniques de 2018-2020 suggère que l'épidémiologie de la leptospirose à La Réunion serait en train d'évoluer : cette étude rapporte que les infections à *L. borgpetersenii* représentaient près de 20% des cas humains à La Réunion, concentrés quasi exclusivement dans l'ouest et le sud (figure1) (24). Selon les données de la ARS de l'année 2024 ; les cas sont déclarés majoritairement au Sud (55%), et à l'Ouest (21%). Cette distribution géographique des 2 espèces de leptospires pourrait résulter de différentes propriétés des deux espèces bactériennes, notamment des réservoirs animaux distincts ayant des distributions géographiques particulières à l'échelle de l'île. Les études antérieures montrent que les rats et les chiens sont les réservoirs majeurs de *L. interrogans*, et ces réservoirs sont retrouvés sur l'ensemble de l'île, en cohérence avec une distribution homogène des cas humains à *L. interrogans*. Les investigations antérieures suggèrent également que les bovins sont excréteurs de *L. borgpetersenii*, et ces élevages sont majoritairement présents dans l'Ouest, le Sud de l'île et au centre de l'île, ce qui pourrait être cohérent avec la distribution des cas humains de leptospirose à *L. borgpetersenii*. Néanmoins, la distribution de ces élevages n'a pas fondamentalement changé durant les 10 à 20 dernières années. Nous proposons une deuxième hypothèse qui pourrait rendre compte de l'évolution épidémiologique : les 2 espèces répondent différemment aux conditions de température et d'humidité qui ont significativement évolué ces dernières années, avec notamment un raccourcissement de la saison des pluies et une augmentation de la température. Pour tester cette 2ème hypothèse, nous mesurerons dans notre étude la survie de ces deux espèces bactériennes à différentes conditions de température et d'humidité.

Matériel et méthodes.

Souches de leptospires et milieux de culture :

Les mesures ont été réalisées en utilisant trois isolats représentant l'essentiel de la diversité des leptospires d'intérêt médical à La Réunion. L'isolat L-interrogans-C237 a été obtenu à partir de l'urine d'un chien asymptomatique dans le cadre d'une étude menée en collaboration entre les UMR PIMIT et ASTRE en 2023. Les isolats L-borgpetersenii-CHU et L-interrogans-CHU ont été isolés à partir de sérums de patients hospitalisés au CHU de La Réunion en 2023 et 2024, respectivement. Les isolats nommés ici L-borgpetersenii-CHU et L-interrogans-CHU correspondent, dans la nomenclature du CHU, aux isolats CHU 2023214 (07_12_23) et CHU 2024_12. Les 3 isolats sont donc récents et n'ont pas subi plus de 10 repiquages. Les leptospires sont cultivés en milieu EMJH, obtenu en ajoutant à 445mL de milieu EMJH-base stérile, 50mL d'AFAS (Albumin Fatty Acid Supplement ; Royal Tropical Institute, Amsterdam, Pays-Bas) et 5mL de sérum de veau fœtal décomplémenté. Le milieu est de nouveau stérilisé par filtration à 0,2µm. Pour chaque isolat, un volume de 20 µl de culture mère est utilisé pour ensemercer un volume de 4 ml de milieu EMJH. Les tubes sont ensuite incubés à 28°C sans agitation et à l'abri de la

lumière pendant une période allant jusqu'à 20 jours. Par ailleurs, la survie des leptospires est mesurée dans un milieu EMJH non supplémenté, que nous appellerons Milieu Minimum - ou MM - et dans lequel les conditions de pH et de salinité sont optimales pour la survie des leptospires mais l'absence de source de carbone empêche leur croissance.

Mesure de la survie des leptospires par V-PCR.

La première approche utilisée pour déterminer le nombre de cellules vivantes après traitement en conditions contrôlées est une méthode indirecte appelée Viability-PCR, ou V-PCR. Cette technique utilise un traitement au Monoazide de Propidium (PMA) qui permet d'amplifier spécifiquement l'ADN des cellules vivantes ou dont la paroi n'est pas compromise. Le PMA est un colorant se liant à l'ADN de manière irréversible lorsque l'échantillon est excité par une source lumineuse de longueur d'onde 475nm. Le PMA interagit avec l'ADN accessible, à savoir extracellulaire ou intracellulaire lorsque les membranes sont compromises, et sa photo-activation entraîne la formation de liaisons covalentes avec l'ADN qui interfèrent avec la PCR. Par conséquent, le traitement au PMA permet une détection sélective de l'ADN issu de cellules viables et permet ainsi de mesurer le ratio cellules vivantes/cellules mortes. Le PMA est dilué (10 μ M ; 20 μ M ; 50 μ M ; 100 μ M) dans de l'eau de qualité moléculaire afin de déterminer la concentration finale optimale de PMA pour chaque espèce (*L. interrogans*, *L. borgpetersenii* et *L. biflexa*). Les suspensions bactériennes sont incubées pendant 10min à 90°C ou à température ambiante, représentant respectivement les contrôles de cellules mortes et vivantes. Les échantillons sont ensuite traités au PMA, incubés pendant 10min à l'obscurité et enfin exposés 15 min à la lumière dans un équipement PMA lite (PMA-Lite™ 2.0 LED Photolysis Device, Biotium). L'ADN est ensuite extrait pour chaque échantillon à l'aide du kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. Parallèlement, une gamme de dilution est préparée à partir d'une préparation d'ADN de l'isolat L-borgpetersenii-CHU dont la concentration est mesurée en utilisant la technologie Qbit (Invitrogen, France). En utilisant une taille de génome de 3,9M, nous évaluons la concentration de génome dans notre solution mère et préparons des dilutions en cascade de molarité connue. Cette gamme est été testée en qPCR (25) et nous permet de déterminer le nombre de génomes de *Leptospira* par μ L d'échantillon et donc, par V-PCR, le nombre de génomes viables.

Mesure de la survie des leptospires par microscopie :

Nous avons par ailleurs mesuré la survie des bactéries vivantes de manière directe à l'aide d'une cellule de Mallassez et d'un microscope optique à fond noir, en estimant la densité bactérienne dans un échantillon donné en fonction de la motilité des bactéries. La cellule de Malassez est un dispositif gravé de 100 rectangles, chaque rectangle lui-même subdivisé en 10 rectangles de 0,01 μ L qui sont à leur tour subdivisés en 10 petits carrés de 0,001 μ L. Le volume correspondant au quadrillage total est de 1 μ L. Chaque échantillon est analysé en triplicat préparé et dilué de

manière à limiter le nombre de bactéries à compter dans chaque carré. Le nombre de bactéries est calculé comme suit :

$$\text{Nombre de cellules}/\mu\text{L} = \frac{[(\text{Nombre moyen de cellules comptés dans 5 carrés} \times 10)] \times 100 \times \text{Facteur de dilution}}{0,01\mu\text{L}}$$

Mesure de l'effet de la température sur la survie des leptospires :

Dans une première série d'expérimentations, les leptospires sont placés pendant une heure à des températures croissantes, la mesure de la survie après traitement permet d'obtenir une courbe de survie en fonction de la température. Ces données permettent également de déterminer une T_{50} pour chaque souche, à savoir la température à laquelle la moitié des bactéries meurt après 1h de traitement. Pour cela, les cultures bactériennes sont observées en microscopie et ajustées à une concentration finale d'environ 10^4 leptospires/ μL en milieu EMHJ. Pour chaque échantillon un triplicat est incubé pendant 1 h à différentes températures ($28^\circ, 37^\circ, 40^\circ, 45^\circ, 50^\circ, 60^\circ, 90^\circ\text{C}$) dans des bains chauffants à sec. Les échantillons testés à 4°C sont conservés au réfrigérateur.

Dans une deuxième série d'expérimentations, les isolats en concentration identique sont centrifugés 10 min à $6000g$, les culots sont repris dans un volume (1mL) de MM et incubés à 28°C ou 37°C pendant des périodes allant de 24h à plusieurs semaines. La mesure des bactéries survivantes permet alors de mesurer la demi-vie de chaque isolat aux 2 températures choisies.

Survie des leptospires à sec.

Pour évaluer la capacité de survie des leptospires en absence d'eau, 100 μl de chaque culture bactérienne sont déposés en microplaques (un triplicat pour chaque isolat). Après évaporation pendant 24 heures sous un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM), une partie des cellules est immédiatement remise en suspension dans du milieu EMJH (100 μl) constituant nos échantillons de référence (T_0). Les autres puits sont incubés à sec à 28°C pendant différents temps, puis les cellules dans chaque puits sont resuspendues dans $50\mu\text{L}$ d'EMJH et les cellules vivantes sont comptées. Pour certains temps de séchage, la survie observée en microscopie est confirmée par mise en culture à 28°C en EMJH supplémenté.

Détection et purification d'ADN de leptospire environnemental.

Afin de mettre en évidence de l'ADN de leptospire pathogène dans le sol, un échantillonnage de sol a été effectué autour de la Rivière des Roches, un site connu pour abriter des rongeurs montrant des prévalences d'infection élevées (27). Les échantillons ont été prélevés sur 3 transects perpendiculaires à la rivière, en amont, en aval et le long d'un site que notre laboratoire a déjà échantillonné (27). Chacun des 3 transects comporte 3 points situés à des distances croissantes de la berge. A chaque point ($N=9$), environ 50 g de sol ont été prélevés pour chaque point, stockés dans un tube Falcon et transportés en glacière au laboratoire où ils ont été tamisés, aliquotés et conservés à 4°C . Après tamisage, l'extraction de l'ADN a été faite à partir de 250 mg

de terre à l'aide du kit Qiagen PowerSoil en suivant les recommandations du fournisseur. Les échantillons, de même qu'une gamme étalon contenant des génomes de *L. borgpetersenii*, sont soumis à des PCR en temps réel utilisant une sonde ciblant le gène *rrs* (25). Le nombre de molécules cibles détecté est évalué à partir des données de Ct des échantillons et de la gamme étalon. Parallèlement, des PCR en point final sont réalisées pour amplifier les loci *secY* (26), *rrs* (26), *glm U* (27), *LA/LB* (28) à partir de l'ADN environnemental. Enfin, ces amplicons sont séquencés à l'aide d'un séquenceur MinION pour identifier les espèces de leptospires détectées dans les sols.

Analyses statistiques :

Afin d'analyser et visualiser les données obtenues lors de notre recherche, nous avons utilisé le logiciel statistique RStudio. Le test ANOVA et Tukey ont été exploités pour l'analyse de variance et les différences significatives des résultats des souches étudiées. La T_{50} est calculé en utilisant le package « drc » avec la formule suivante : $T_{50} = n_{\text{cellules}_{T_0}} / (1 + (n_{\text{Cellules}_{T_1}})^{\text{Hill slope}})$, où Hill Slope est le coefficient de pente. La demi-vie est calculé en utilisant le package « DecayModel » avec la formule suivante : $T_{1/2} = \ln(2) / K$, où K est la constante de vitesse de dégradation de premier ordre.

Résultats.

Survie des leptospires à différentes conditions de températures.

La survie des leptospires après les différents traitements a été mesurée indirectement par V-PCR et directement par microscopie. La V-PCR a produit des résultats peu robustes car très variables en fonction des réplicats, et ce malgré d'importants efforts de mise au point. Par conséquent, nous ne présenterons ici que les résultats obtenus par comptage direct en microscopie optique à fond noir. Pour chaque condition, le nombre de bactéries mobiles a été mesuré à l'aide d'une cellule de Malassez. Les données, présentées sur la figure 2, montrent un profil de survie similaire pour les deux souches *L. interrogans*.

En revanche, la souche *L. borgpetersenii* montre une survie supérieure à des températures plus élevées que *L. interrogans*. Cette différence est maximale à 37°C, avec plus de 50% des bactéries *L. interrogans* mortes tandis que la souche *L. borgpetersenii* ne montre qu'une légère mortalité à cette température. Ces données nous permettent de mesurer la T_{50} , à savoir la température à laquelle 50 % des cellules sont mortes après 1h de traitement. Cette T_{50} est de 35,5°C pour *L. interrogans*-CHU, 35,6°C pour *L. interrogans*-C237 et enfin 38°C pour *L. borgpetersenii*-CHU. Lorsque la survie des souches aux différentes températures est comparée deux à deux, le test ANOVA en combinaison avec le package « drc » montre que la survie des différents isolats n'est significativement différente qu'à 37°C, et uniquement lorsqu'on compare *L. borgpetersenii*-CHU à

l'une ou l'autre des souches *L. interrogans* (p-value <0,001). Les deux souches *L. interrogans* ne montrent pas de survie significativement différente (p-value=0,52).

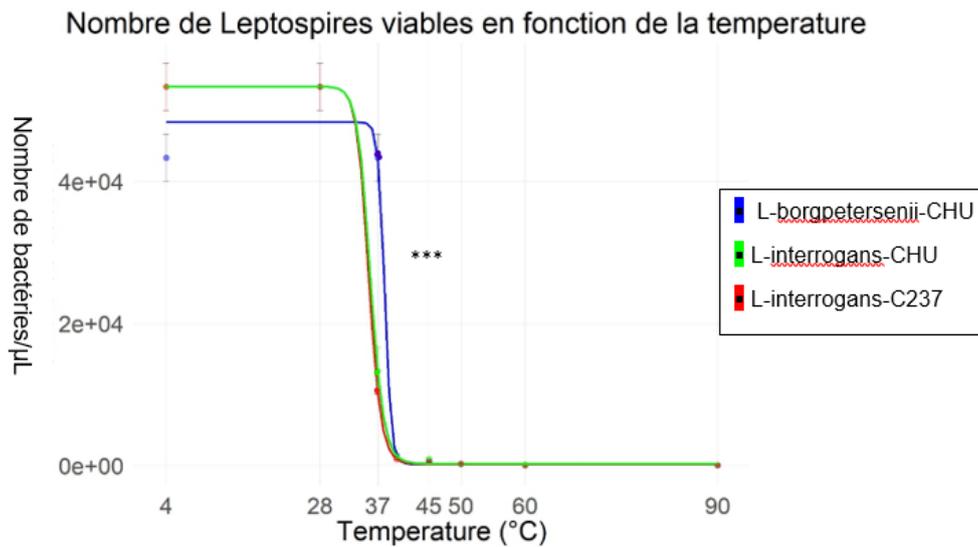


Figure 2 : effet de la température sur la viabilité des leptospires pendant 1h.

Etude de survie de leptospires à 28°C et 37°C.

Dans cette série d'expériences, nous avons sélectionné les températures de 28°C et 37°C, correspondant dans l'expérience précédente aux températures auxquelles les différentes souches montrent des survies comparables ou distinctes. Les profils de survie obtenus à 28°C (figure 3) sont comparables pour les trois souches étudiées. Les demi-vies, à savoir le temps nécessaire pour tuer 50 % des cellules à 28°C, sont de 3,52 jours pour *L. borqpetersenii-CHU*, 3,62 jours pour *L. interrogans-CHU* et de 3,39 jours pour *L. interrogans-C237*. Le test ANOVA indique que ces différences ne sont pas significativement différentes (p-value = 0.077).

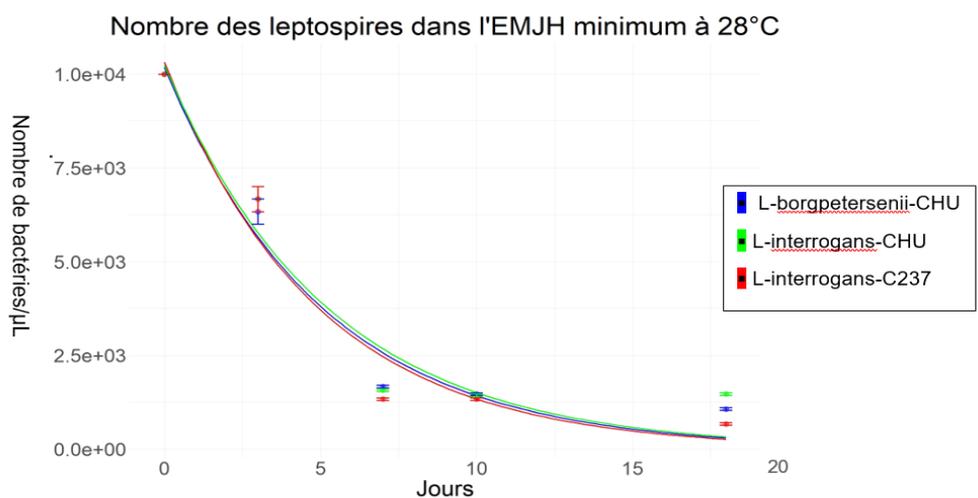


Figure 3 : viabilité des leptospires dans un milieu liquide non enrichi à 28°C.

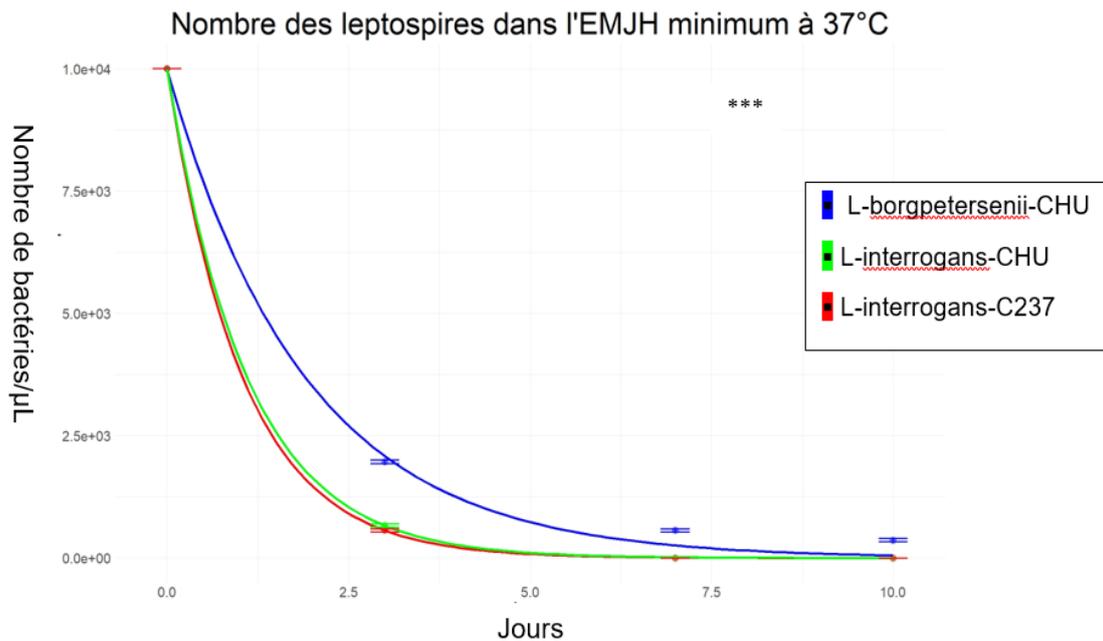


Figure 4 : viabilité des leptospires dans un milieu liquide non enrichi à 28°C et 37°C.

En revanche, les profils de survie à 37°C (figure 4) montrent une diminution rapide du nombre de bactéries vivantes à partir de 3ème jour pour les deux isolats de *L. interrogans* avec une disparition totale de cellules vivantes pour l'isolat clinique L-interrogans-CHU après 10 jours. En revanche, la survie de la souche L-borgpetersenii-CHU excède le 10ème jour. Ces résultats sont confirmés par la mise en culture de ces isolats après 10 jours d'incubation. Un volume de 20 µL de chaque échantillon est utilisé pour incuber 4mL d'EMJH stérile à 28°C. Dans ces conditions, une culture positive n'est observée que pour *L. borgpetersenii* (culture positive observée après 22 jours). Les demi-vies sont de 1,33 jour pour L-borgpetersenii-CHU, 0,76 jour pour L-interrogans-CHU et 0,72 jour pour L-interrogans-C237. L'ANOVA montre que ces différences sont significatives (p-value<2e-16).

Survie des leptospires à sec.

Enfin, nous avons mesuré la survie des leptospires à sec. Les données, présentées sur la figure, montrent une survie limitée de l'isolat L-borgpetersenii-CHU en comparaison avec la souche L-interrogans-C237. En absence d'eau, L- interrogans-C237 peut survivre jusqu'à 48h tandis que la souche L-borgpetersenii-CHU ne résiste que 24h dans les mêmes conditions.

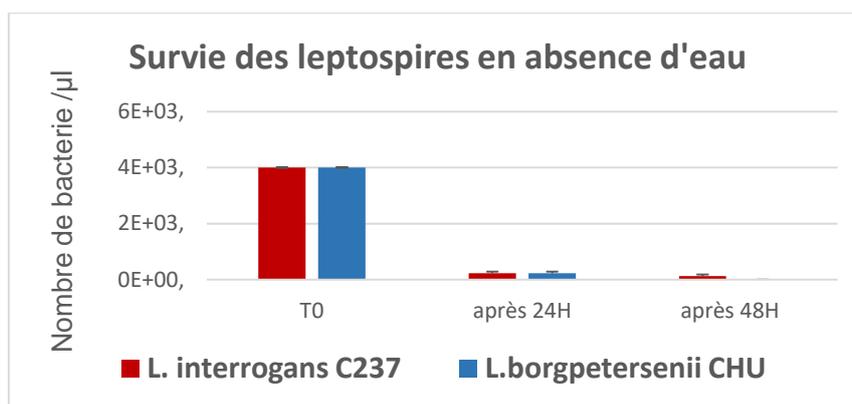


Figure 4 : survie des leptospires à sec.

Détection de leptospires dans les échantillons environnementaux :

Afin de tester la possibilité de détection d'ADN de leptospire pathogène dans l'environnement, pour le développement ultérieur d'une méthode de diagnostic environnemental, 9 échantillons de sol ont été prélevés le 14 mars 2024 sur les berges de la rivière des roches, entre le Bassin la Paix et l'embouchure. Ces échantillons ont été extraits et soumis à une PCR en temps réel (25), les échantillons d'une gamme étalon étant soumis à une PCR sur la même plaque. Tous les échantillons se révèlent positifs. En considérant un rendement d'extraction de 100 %, nous pouvons évaluer le nombre de molécules d'ADN cible (*rrs*) pour chaque échantillon, les résultats sont reportés sur le tableau 1. Ces données suggèrent que les sols analysés contiennent de l'ADN de leptospires, vraisemblablement pathogènes car la PCR utilisée est spécifique des clades pathogènes (25). Ces résultats sont en cours de confirmation par séquençage Minlon.

Tableau 1. Données PCR en temps réel pour l'ADN extrait à partir de 250mg d'échantillon de sol.

Echantillons		CT	Log génomes	n génomes/ 5µL	n molécules ADN cible/g de sol
Gamme d'étalonnage	10-1	22,55	5,39	243457,4	7,79E+06
	10-2	26,24	4,42	26483,57	8,47E+05
	10-3	30,15	3,4	2524	8,08E+04
	10-4	34,03	2,39	244,93	7,84E+03
Echantillons de sol	Paix 1 SOL	35,31	2,06	113,66	3,64E+03
	Paix 2 SOL	36,74	1,68	48	1,54E+03
	Paix 3 SOL	32,05	2,91	804,69	2,57E+04
	Paix 4 SOL	31	3,18	1518,37	4,86E+04
	RDR 1 bagnan	31,1	3,16	1430,02	4,58E+04
	RDR 1 piknik	33,18	2,61	407,44	1,30E+04
	Radier 1 tronc	31,79	2,97	943,71	3,02E+04
Radier 1 berge	32,23	2,86	722,5	2,31E+04	

Discussion.

La leptospirose a fait l'objet dans l'océan Indien de nombreuses études visant à éclairer les chaînes de transmission, notamment par l'identification des espèces réservoirs vertébrées. Ces études révèlent que l'épidémiologie de cette maladie est différente selon les îles, notamment dans les deux îles françaises de l'océan Indien (21). En effet La Réunion se caractérise par une maladie impliquant deux espèces bactériennes, *L. borgpetersenii* et *L. interrogans*, dont la dernière, largement majoritaire, est excrétée par les rats et les chiens (19). Des études cliniques ont récemment révélé que ces différences dans les chaînes de transmission (e.g. espèces bactériennes et réservoirs) sont associées à des différences dans les tableaux cliniques, la leptospirose à La Réunion étant globalement plus sévère qu'à Mayotte où *L. interrogans* est une espèce minoritaire (24). La transmission des leptospires aux vertébrés sensibles se fait essentiellement de manière indirecte, et on peut donc considérer que la leptospirose est une zoonose à transmission environnementale. Pour autant, le volet environnemental a été jusqu'ici peu investigué dans la région. Les expérimentations mises en place dans le cadre de ce stage visent à combler en partie ces lacunes en produisant des données qui permettront d'une part de mieux comprendre l'épidémiologie de la leptospirose à La Réunion dans la globalité de ses chaînes de transmission, et d'autre part de développer des outils de surveillance environnementale.

Les investigations récentes réalisées à La Réunion suggèrent une évolution de l'épidémiologie de la leptospirose humaine. En effet, on note une augmentation significative de l'incidence de la leptospirose ces dernières années, que l'on peut attribuer à des biais tels qu'un passage récent de cette zoonose à un statut de maladie à déclaration obligatoire. Néanmoins, l'augmentation de l'incidence est antérieure à ce changement de statut (2023). Par ailleurs, on note une augmentation des cas de leptospiroses à *L. borgpetersenii* : cette espèce représentait moins de 4 % des cas en 2012-2013 (19) pour atteindre 21 % en 2018-2020 (Desmoulin, in press) (24). Cette dernière étude révèle également une structuration géographique particulière : les cas humains de leptospirose à *L. borgpetersenii* se concentrent sur l'Ouest et le Sud alors que les cas humains à *L. interrogans* sont distribués de manière homogène (24). Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour rendre compte de cette évolution récente. La distribution de *L. borgpetersenii* est à superposer avec la distribution des élevages bovins qui se concentrent dans ces mêmes régions et dont il a été précédemment démontré qu'ils pouvaient constituer des réservoirs à *L. borgpetersenii* (19). Pour autant, la distribution des élevages bovins n'a pas fondamentalement changé ces dernières années et ne semble donc pas pouvoir expliquer l'évolution de la leptospirose à La Réunion. Nous ne pouvons pas exclure non plus que l'évolution apparente de l'épidémiologie résulte de biais d'échantillonnage, l'étude princeps de Guernier et al. se basant uniquement sur des échantillons du CHU nord alors que l'étude de Desmoulin utilise

une cohorte, CoLept dont le recrutement des cas se veut exhaustif. Néanmoins, s'agissant d'une zoonose environnementale, nous avons testé une hypothèse alternative selon laquelle cette évolution épidémiologique, en termes d'incidence augmentée et d'augmentation des cas humains à *L. borgpetersenii*, est liée aux changements climatiques auxquels les systèmes insulaires sont particulièrement exposés.

Nous avons étudié les effets de la température et de l'humidité sur la survie des deux espèces *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* en utilisant précisément des isolats réunionnais, dont un isolat clinique pour chacune des deux espèces bactériennes. L'exposition des 3 isolats pendant 1h à des températures croissantes révèle des profils différents qui semblent liés à l'espèce bactérienne. En effet, les deux isolats de *L. interrogans* se comportent de manière comparable alors que l'isolat *L. borgpetersenii*-CHU montre une résistance augmentée à 37°C. Les T₅₀ (température tuant 50 % des bactéries en 1h) ne sont pas statistiquement différents lorsque l'on compare les deux souches de *L. interrogans*. En revanche, l'isolat *L. borgpetersenii*-CHU a une T₅₀ plus de 2 degrés supérieure à celle des deux isolats *L. interrogans*, et cette différence est significative. Dans une deuxième série d'expérience, nous avons soumis les 3 isolats à des expositions prolongées à 28°C ou 37°C. Les données présentées permettent de mesurer une demi-vie pour chaque isolat aux 2 températures. A 28°C, les demi-vies s'étalent de 3,4 à 3,6 jours pour les 3 isolats. A 37°C, cette demi-vie s'effondre à 0,7-0,8 jour pour les 2 isolats de *L. interrogans*, et diminue à 1,3 jour pour l'isolat *L. borgpetersenii*-CHU. La plupart des espèces mammifères ont une température corporelle de 37 °C qui pendant la fièvre, peut atteindre 39 °C voire davantage. Cette sensibilité à une température de 37°C est d'autant plus inattendue s'agissant de l'isolat *L. interrogans*-C237 isolé d'un chien dont la température moyenne est supérieure à celle des humains (38°C). Ce patron est à mettre en perspective avec le cycle des leptospires pathogènes, qui alternent une forme de parasitisme chez leurs hôtes vertébrés à une forme libre dans l'environnement. Plusieurs études ont montré une transcription différentielle des gènes chez les leptospires qui passent de conditions environnementales à des conditions simulées par l'hôte impliquant des changements de température (18). Il a été notamment montré que l'expression des gènes de virulence est contrôlée par la température de croissance (30°C et 37°C) (29). Ces études suggèrent une capacité des leptospires à s'adapter aux différentes conditions rencontrées lors de la l'infection et de la survie dans l'environnement. Des approches moléculaires, microscopiques et microbiologiques ont été précédemment utilisées pour examiner la survie des leptospires dans différentes conditions (30). Il a été notamment montré qu'à 30°C dans l'eau déminéralisée, *L. interrogans* et l'espèce saprophyte *L. biflexa* peuvent survivre respectivement 12 et 15 mois. En revanche, après inoculation dans des microcosmes aquatiques une souche de l'espèce *L. borgpeterseni* n'est pas détectée dans l'eau 2 jours après inoculation (12).

Si l'on considère que les milieu synthétiques EMJH ou MM miment des conditions de survie environnementale, alors nos résultats suggèrent que l'isolat réunionnais *L. borgpetersenii*-CHU

résiste mieux à un environnement en réchauffement, ce qui a été le cas à La Réunion lors de ces 10 dernières années, comme le montre la figure S1 préparée par Kevin LAMI, de l'Observatoire des Sciences de l'Univers. Cette analyse montre une augmentation constante à l'échelle de La Réunion, sans différence marquée entre les micro régions. Nous avons également mesuré la survie des leptospires à sec, et nos données révèlent que les leptospires, contrairement à ce qui est généralement admis, peuvent survivre plusieurs heures en absence d'eau. Nos données révèlent une survie supérieure pour *L. interrogans*, mais cette différence n'est pas significative, potentiellement en raison du faible nombre de points de lecture. Dans l'ensemble, nos données montrent une survie augmentée pour *L. borgpetersenii* à 37°C, ce qui est contradictoire avec les rares études publiées. Ces données contradictoires pourraient résulter de la grande diversité, y compris intra-spécifique, des leptospires pathogènes, en particulier chez *L. borgpetersenii* (22), et suggèrent que les études doivent être menées dans chaque écosystème en utilisant des souches prévalentes dans cet écosystème et représentatives de l'épidémiologie locale. Enfin, l'épidémiologie de la leptospirose à La Réunion, si elle est inquiétante d'un point de vue de l'incidence, présente un faciès particulièrement adapté au développement d'approches innovantes. Pour comprendre la structuration géographique des deux espèces de leptospires sur l'île, nous avons initié la détection et l'identification de l'ADN de leptospire dans l'environnement. Si ces études en cours, confirment la pertinence de cette approche, nous pourrions développer des outils moléculaires de détection pour chacune espèce permettant de suivre dans le temps et l'espace, des habitats et périodes à risque pour chacune des deux espèces. Ces travaux sont en cours.

Conclusion.

Cette étude avait pour but d'initier l'étude de la biologie des leptospires dans leur environnement, un compartiment peu étudié et pourtant central dans la transmission de ces bactéries. Nous avons mesuré la survie des leptospires pathogènes à différentes conditions de températures et d'humidité afin de mieux comprendre le dynamique des bactéries *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* dans l'environnement à La Réunion, et d'explorer les conditions responsables de l'évolution récente de l'épidémiologie de la leptospirose sur l'île. Les résultats obtenus indiquent que l'augmentation de l'incidences des cas humains à *L. borgpetersenii* pourrait en partie au moins résulter d'une meilleure résistance de cette espèce à l'augmentation de température mesurée ces 10 dernières années. Par ailleurs, la détection d'ADN de leptospire dans l'environnement permet d'envisager le développement d'approches moléculaires permettant de suivre dans le temps et dans l'espace les dynamiques de *L. interrogans* et *L. borgpetersenii* dans leur environnement.

Références

1. H. Mohammed, C. Nozha, K. Hakim, F. Abdelaziz. *Leptospira*: morphology, classification and pathogenesis. *Bacteriol parasitol* 02 (2011).
2. P. N. Levett. Leptospirosis, *clin. microbiol. rev.*, vol. 14, no 2, p. 296-326, avr. 2001, doi: 10.1128/CMR.14.2.296-326 (2001).
3. A. T. Vincent, *et al.* Revisiting the taxonomy and evolution of pathogenicity of the genus *Leptospira* through the prism of genomics. *Plos negl trop dis* 13, e0007270 (2019).
4. M. Picardeau. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses* 43, 1–9 (2013).
5. F. Costa, *et al.* Global morbidity and mortality of leptospirosis: a systematic review. *Plos neglected trop. Dis.* 9, e0003898 (2015).
6. C. Goarant. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. *Res. Rep. Trop. Med.*, vol. 7, p. 49-62, sept. 2016, doi: 10.2147/RRTM.S102543.
7. V. Guernier, C. Goarant, J. Benschop, C. L. Lau. Systematic review of human and animal leptospirosis in the pacific islands reveals pathogen and reservoir diversity ». *Plos neglected tropical diseases* 12 (5): e0006503.(2018).
8. DA. Haake, PN. Levett. Leptospirosis in humans. *Curr top microbiol immunol* 2015;387:65–97.
9. M. Dietrich, K. Mühldorfer, P. Tortosa, W. Markotter. *Leptospira* and bats: story of an emerging friendship. *Plos pathog* 11, e1005176 (2015).
10. T. D. Brito, A. M. G. da Silva, et P. A. E. Abreu. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, vol. 60, no 23, p. 10, doi: 10.1590/s1678-9946201860023 (2018).
11. G. Andre-Fontaine, F. Aviat, C. Thorin. Waterborne leptospirosis: survival and preservation of the virulence of pathogenic *Leptospira* spp. in fresh water. *Current microbiology* 71, 136–142 (2015).
12. E. Bierque, *et al.* *Leptospira interrogans* retains direct virulence after long starvation in water. *Current microbiology* 77, 3035–3043 (2020).
13. A. Casanovas-Massana, *et al.* Quantification of *Leptospira Interrogans*; survival in soil and water microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e00507-18 (2018).
14. M. Saito, *et al.*, comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and Water in the Philippines and Japan. *Appl environ microbiol* 79, 601–609 (2013).
15. G. Trueba, S. Zapata, K. Madrid, P. Cullen, D. Haake, *international microbiology* (2004) 7:35–40. 7 (2004).
16. P. Ristow, *et al.*, biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. *Microbiology* 154, 1309–1317 (2008).
17. Y. Xu, *et al.*, whole genome sequencing revealed host adaptation-focused genomic plasticity of pathogenic *Leptospira*. *Sci rep* 6, 20020 (2016).
18. M. Lo, *et al.*, effects of temperature on gene expression patterns in *Leptospira interrogans* serovar Lai as assessed by whole-genome microarrays. *Infect immun* 74, 5848–5859 (2006).
19. V. Guernier, *et al.*, human leptospirosis on Reunion island, Indian Ocean: are rodents the (only) ones to blame?. *Plos negl trop dis* 10, e0004733 (2016).
20. J. A. Rajaonarivelo, *et al.*, clinical manifestations of human leptospirosis: bacteria matter. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1259599 (2023).
21. L. Biscornet, *et al.* Human leptospirosis in Seychelles : a prospective study confirms the heavy burden of the disease but suggests that rats are not the main reservoir. *Plos negl trop dis* 11, e0005831 (2017).
22. M. Dietrich, *et al.* 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 (2018).
23. E. Lagadec, *et al.* Identification of *Tenrec ecaudatus*, a wild mammal introduced to Mayotte island, as a reservoir of the newly identified human pathogenic *Leptospira mayottensis*. *Plos negl trop dis* 10, e0004933 (2016).

24. A. Desmoulin, *et al.* A comparative study of human leptospirosis between Mayotte and Reunion islands highlights clinical and microbial features arising from distinct inter-island bacterial ecology. *American journal of tropical medicine and hygiene* (sous presse).
25. L. D. Smythe, *et al.* A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC infect dis* 2, 13 (2002).
26. N. Ahmed, S. M. Devi, R. S. Machang'u, W. A. Ellis, R. A. Hartskeerl. Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* (2006).
27. D. A. Wilkinson, M. Edwards, J. Benschop, S. Nisa, identification of pathogenic *Leptospira* species and serovars in New Zealand using metabarcoding. *Plos one* 16, e0257971 (2021).
28. F. Mérien, P. Amouriaux, P. Perolat, G. Baranton, I. Saint Girons. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *J clin microbiol* 30, 2219–2224 (1992).
29. T. Fraser, P. D. Brown. Temperature and oxidative stress as triggers for virulence gene expression in pathogenic *Leptospira* spp. *Front. Microbiol.* 8, 783 (2017).
30. A. Casanovas-Massana, *et al.* Spatial and temporal dynamics of pathogenic *Leptospira* in surface waters from the urban slum environment. *Water Res.* 130, 176 (2018).

Remerciements.

*Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet **PRERISK-OI** (Prévenir les Risques infectieux dans l'océan Indien) financé par la Région Réunion et l'Union Européenne et qui contribuera à développer un modèle permettant de prédire l'évolution de la leptospirose dans un contexte de changement climatique.*

*Je remercie mon encadrant Professeur **Pablo Tortosa**, je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude pour son dévouement, son soutien et son expertise tout au long de notre collaboration. Votre capacité à encourager le développement de mes idées tout en offrant une guidance précise m'a permis de progresser de manière significative dans mes travaux. Je voudrais exprimer mes sincères remerciements pour la confiance que vous avez placée en moi et pour l'opportunité que vous m'avez offerte de travailler à vos côtés. Cela a été une expérience enrichissante et formatrice dont je garderai des souvenirs précieux.*

Annexe 1 : (d'après K.Lamy).

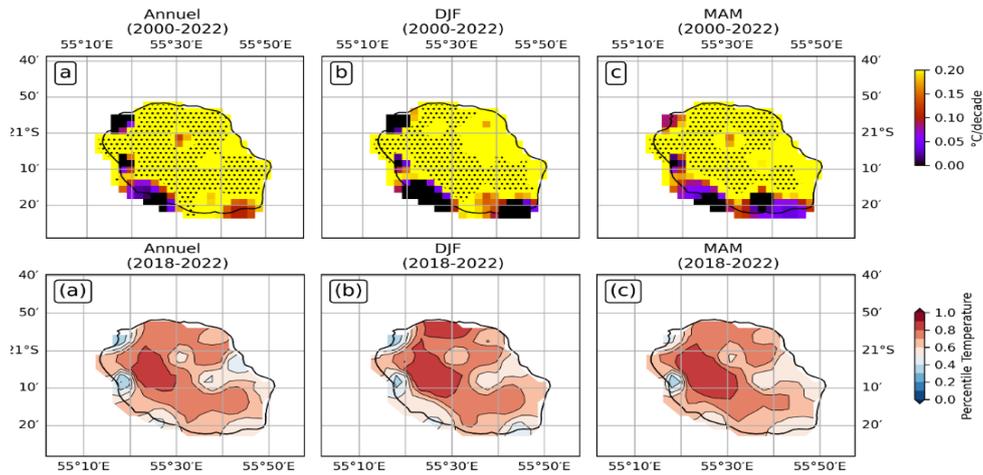


Figure S1 : Evolution moyenne des températures de 2000 à 2022 à La Réunion.

DJF : Décembre-Janvier-Février ; MAM : Mars Avril Mai.

La première ligne représente les tendances d'évolution des températures sur la période 2000–2022, les pointillés indiquent des tendances statistiquement significatives. La seconde ligne, présente l'analyse en percentile des cinq dernières années. Une valeur de 0.5 indique une année "moyenne" sur toute la période, une valeur proche de 1 indique une année parmi les plus chaudes, et la valeur proche de 0 indique une année parmi les plus froides

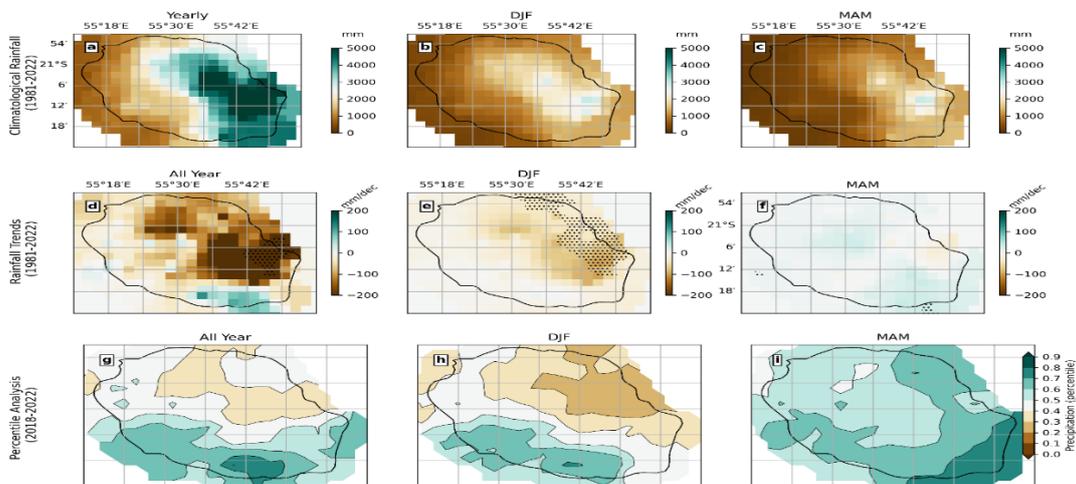


Figure S2 : Evolution moyenne des précipitations au fil des années 2000-2022 à La Réunion.

DJF : Décembre-Janvier-Février ; MAM : Mars Avril Mai.

La première ligne représente la climatologie du cumul de pluie sur la période 1981-2022, c'est-à-dire le cumul de pluie moyen annuel, en DJF ou en MAM, la seconde ligne représente les tendances d'évolution des cumuls de pluies, la troisième ligne représente l'analyse en percentile des cinq dernières années : une valeur proche de 1.0 indique année plus humide, une valeur proche de 0 indique une année sèche.