

**CENTRE NATIONAL
DE REFERENCE DES *LEISHMANIA***

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2006

**Laboratoire de Parasitologie-Mycologie
CHU de Montpellier
163, rue Auguste Broussonet
34090 MONTPELLIER**

**Responsable :
Professeur Jean-Pierre DEDET**

1. INTRODUCTION

1. 1. Rappel des missions et objectifs :

Le Centre National de Référence des *Leishmania* (CNRL) a été créé en mars 1998 (arrêté du 17 mars 1998). Il a été renouvelé le 26 avril 2002, puis le 6 janvier 2006, pour la période 2006-2009.

Depuis sa création, il développe les différentes missions imparties aux Centres nationaux de référence : missions d'**expertise**, de **surveillance**, d'**alerte** et de **conseil**. Il participe en particulier depuis plusieurs années :

- la collecte et la conservation de souches de *Leishmania* et leur identification isoenzymatique et moléculaire,
- la surveillance des différentes formes de leishmanioses humaines, avec un registre des cas autochtones et importés en France métropolitaine. La surveillance de la leishmaniose cutanée en Guyane française est réalisée par le laboratoire collaborateur du Centre hospitalier général de Cayenne (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Pr B. Carne),
- l'alerte et le conseil.

De nouvelles missions ont été ajoutées au CNRL lors de son renouvellement en janvier 2006 :

- la collaboration avec le Service de Santé des Armées, pour la surveillance de la leishmaniose cutanée en Guyane,
- la surveillance de la leishmaniose canine, en collaboration avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (Pr. G. Bourdoiseau),
- le conseil thérapeutique téléphonique, en collaboration avec le Centre de Santé de l'Institut Pasteur (Dr P. Buffet).

1.2. Résumé des activités de l'année :

Durant l'année 2006, les principales missions du CNRL ont été accomplies, et les recommandations nouvelles définies lors du renouvellement ont été prises en compte.

Sur 235 souches reçues au CNRL, 200 ont été identifiées par électrophorèse des isoenzymes. Dans cet échantillon, deux souches de Côte-d'Ivoire correspondent à une *Leishmania* nouvelle, dont l'étude taxonomique reste à faire. Quarante-trois identifications moléculaires ont également été réalisées. Cent trois souches ont été expédiées à des laboratoires ou institutions en France ou à l'étranger.

La surveillance des leishmanioses humaines a été poursuivie tant en France métropolitaine qu'en Guyane (172 fiches de déclaration de cas reçues). En France continentale, ont été déclarés en 2006 :

- 16 cas de leishmaniose viscérale (LV) et 3 cas de leishmaniose cutanée (LC) autochtones,
- 7 cas de LV et 51 cas de LC importés.

En Guyane, pour la première fois le Service de Santé des Armées nous a déclaré les cas de LC contractés par ses personnels militaires. Au total, 103 cas de leishmaniose cutanée ont été contractés en Guyane, chiffre très en retrait par rapport à ceux des années précédentes.

Pour la première année, et comme il nous l'avait été recommandé par l'Institut de Veille sanitaire, nous avons abordé la surveillance de la leishmaniose canine, en collaboration avec le Laboratoire de Parasitologie et maladies parasitaires de l'Ecole Nationale vétérinaire

(ENV) de Lyon (Pr G. Bourdoiseau). Les trois actions réalisées (i. réalisation d'une base de données rétrospective, ii. enquête par questionnaire auprès des vétérinaires praticiens, et iii. enquêtes sérologiques de prévalence) seront discutées plus bas.

En 2006, le CNRL a poursuivi sa participation au Réseau international de surveillance de la co-infection *Leishmania*/VIH coordonné par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Le site internet du laboratoire a fait l'objet d'une amélioration avec une meilleure individualisation des pages du CNRL, assurant une meilleure information des usagers et une meilleure lisibilité. La version espagnole du site a été réalisée. Sept stagiaires ont été reçus en 2006.

Un conseil thérapeutique téléphonique a été créé, en collaboration avec le Centre médical de l'Institut Pasteur, destiné à guider les praticiens dans leurs choix thérapeutiques

Dans plusieurs programmes de recherche développés dans le laboratoire et l'Unité de recherche (FRE 1093 CNRS-Université Montpellier 1), le CNRL joue un rôle majeur du fait de sa disponibilité en isolats du monde entier, et de sa technique d'identification de référence.

Les projets terminés, mais dont les retombées continuent à être perçues, et les projets de recherche en cours (dont un projet européen) sont décrits dans le chapitre 6.

Durant l'année 2006, 8 publications dans des revues internationales avec comité de lecture ont été réalisées ; l'activité du CNRL a généré une communication orale dans un congrès national, 5 communications orales dans des congrès internationaux ; deux conférences invitées ont été données.

La démarche qualité a été particulièrement développée durant l'année écoulée : l'informatisation du processus de traitement des souches, depuis leur isolement, ou leur réception, jusqu'à leur stockage dans l'azote liquide est entièrement fonctionnel et utilisé. Une intensification de la démarche qualité a été décidée, avec l'objectif d'une certification dans les trois ans à venir (norme ISO 9001).

Pour ses activités d'expertise et de conseil, le Laboratoire est Centre Collaborateur de l'Organisation Mondiale de la Santé pour les leishmanioses.

Le CNRL a reçu de l'Institut de Veille sanitaire une subvention annuelle s'élevant à 36.000 euros pour l'année 2006.

1. 3. Equipe :

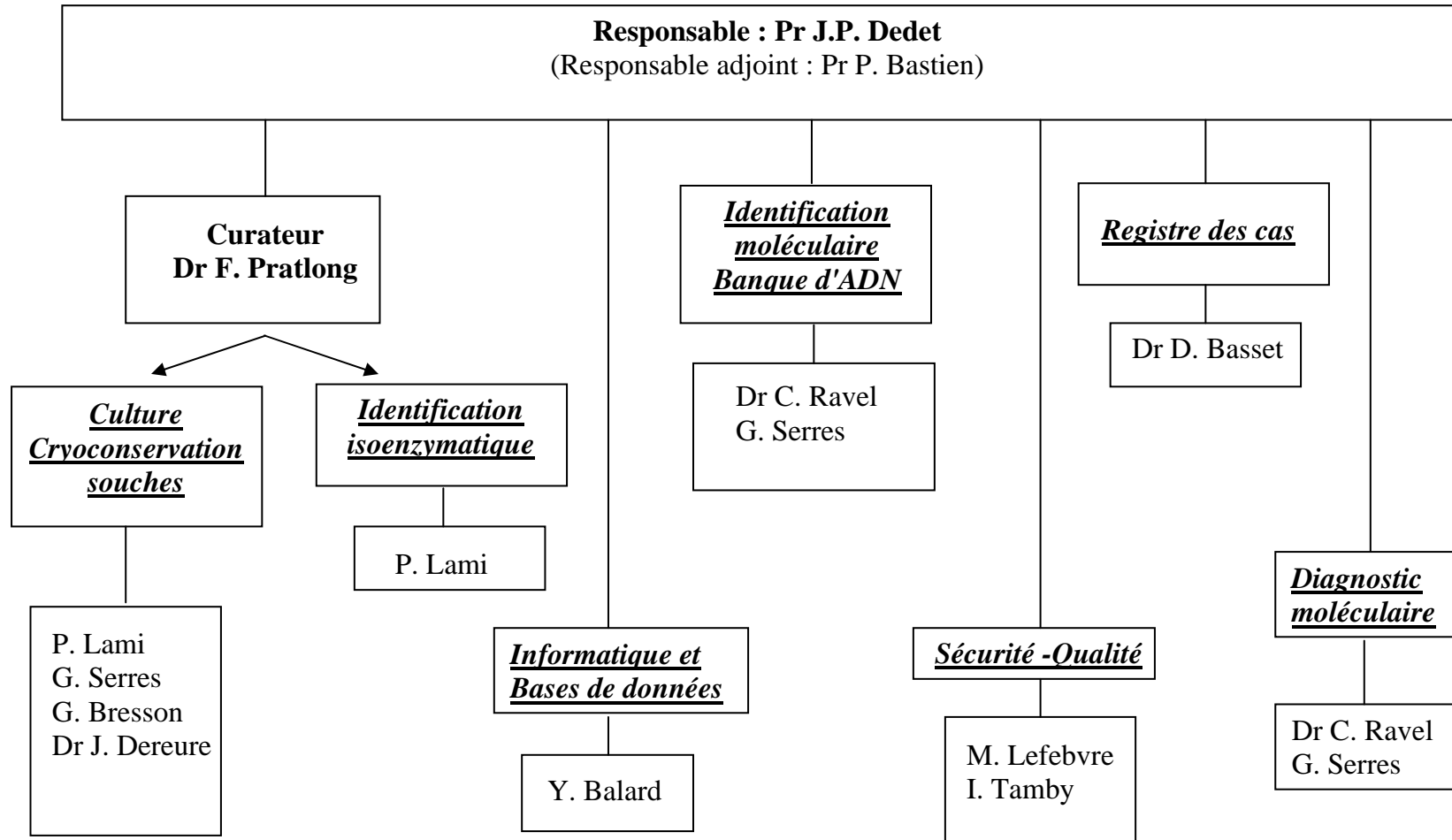
a. Personnel :

Les divers personnels médicaux et non médicaux du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier qui sont, pour partie de leur temps, impliqués dans les activités et le fonctionnement du CNRL sont listés ci-dessous. Leurs tâches respectives au sein du CNRL figurent sur l'organigramme fonctionnel présenté sur la figure 1.

Personnel médical : L'ensemble des personnels médicaux impliqués correspond à 1,5 ETP.

- **DEDET Jean-Pierre**, Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Chef de service (UM1/CHU) : 0,2 ETP
- **BASTIEN Patrick**, Professeur des Universités-Praticien hospitalier (UM1/CHU) : 0,1 ETP
- **PRATLONG Francine**, Maître de conférence des Universités-Praticien hospitalier (UM1/CHU) : 0,4 ETP

Figure 1. Organigramme du CNRL



10/05/2007

- **DEREURE Jacques**, Maître de conférence des Universités, Médecin attaché consultant (UM1/CHU) : 0,1 ETP
- **BASSET Didier**, Praticien hospitalier (CHU) : 0,1 ETP
- **RAVEL Christophe**, Maître de conférence des Universités- Praticien hospitalier (UM1/CHU) : 0,6 ETP

Personnel technique : L'ensemble des personnels techniques impliqués correspond à 4,7 ETP.

- **BALARD Yves**, technicien (Université Montpellier 1) : 0,6 ETP
- **BRESSON Guillaume**, technicien (CHU de Montpellier) : 0,4 ETP
- **BOUADI Fathia**, adjoint technique (CHU de Montpellier) : 0,4 ETP
- **LAMI Patrick**, adjoint technique (Université Montpellier 1) : 1 ETP
- **LEFEBVRE Michèle**, technicienne (Université Montpellier 1) : 1 ETP
- **SERRES Ghislaine**, technicienne (CHU de Montpellier) : 0,8 ETP
- **TALIGNANI Loïc**, adjoint technique, Université Montpellier 1) : 0,5 ETP

Secrétariat :

- **LAMI Joelle**, secrétaire médicale (CHU de Montpellier) : 0,2 ETP

b. Démarche qualité :

L'ensemble des activités développées au CNRL sont réalisées selon le référentiel « Guide des bonnes pratiques d'exécution des analyses » (GBEA, arrêté du 26/11/1999), référentiel qualité adopté depuis plusieurs années pour le laboratoire du CHU. Procédures et modes opératoires sont appliquées aux activités d'isolement, de culture, d'identification et de diagnostic et pour la gestion de la collection de souches du CNRL.

Dans le domaine de la traçabilité, l'année 2006 a été déterminante, car le programme d'informatisation de l'ensemble des opérations, depuis la réception jusqu'au stockage des souches, est en fonction (cf. la partie collection de souches de *Leishmania*).

La réglementation actuelle sur les transports des matières infectieuses est appliquée tant pour les souches envoyées au CNRL que pour celles expédiées par le CNRL. L'envoi des souches au CNRL a été codifié en 2006, un transporteur agréé sélectionné par le CNRL qui prend en charge les frais de transport.

Fin 2006, le développement de la démarche qualité a été accéléré, avec pour objectif de faire évoluer l'organisation de la collection de souches de *Leishmania* vers la certification (Norme ISO 9001), et sa reconnaissance comme Centre de Ressources biologiques.

Le CNRL bénéficie de l'Agent Chargé de la Mise en Œuvre de l'Hygiène et de la Sécurité (ACMO) de l'Unité de recherche (FRE 1093, CNRS-Université Montpellier 1) et du laboratoire universitaire (Mme M. Lefebvre).

1. 4. Locaux et équipements :

Le CNRL est localisé au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier, installé sur 1500 m². Il comporte les équipements courants d'un laboratoire hospitalo-universitaire de diagnostic et de recherche, et en particulier un **plateau technique performant**, en adéquation avec les missions de CNR :

- une **unité de culture**, avec une **enceinte confinée de niveau P3**, équipée de 4 enceintes de sécurité, une chambre chaude pour la croissance des cultures de *Leishmania* (24-26° C). En effet, parmi les espèces de *Leishmania*, celles responsables

de LV et de LCM (*L. donovani*, *L. infantum* et *L. braziliensis*) ont été classées en L3. Toutes les espèces responsables de LC sont classées en L2.

- une **unité de cryoconservation** avec un local spécifique aux normes de sécurité pour la manipulation de l'azote liquide et contenant 28 containers de 40 litres (GT 40), 4 containers de 140 litres (Arpège 140) et un container de répartition (TP100). Un contrat de livraison hebdomadaire d'azote liquide existe avec Air Liquide Santé (livraison hebdomadaire de 350 litres). La mise à niveau des containers est assurée chaque semaine par un technicien (P. Lami).
- des **équipements courants** généraux : deux autoclaves (dont un consacré à la décontamination), diverses étuves, centrifugeuses, balances, pH-mètres, microscopes, appareils à électrophorèse en champ pulsé, appareils d'amplification génique (PCR), sécheurs de gels, bain sec, équipement polaroid, plaque UV, cuves à électrophorèse et électrofocalisation, générateurs divers, systèmes de refroidissement des cuves, congélateurs divers (- 20° et - 80° C).

Concernant les moyens logistiques, le CNRL bénéficie des infrastructures, fournitures de fluides et logistique mises à la disposition du laboratoire de Parasitologie-Mycologie par le CHU de Montpellier et l'Université Montpellier I.

2. ACTIVITES D'EXPERTISE :

2.1 Capacités techniques

L'identification des *Leishmania* est réalisée dans notre laboratoire depuis 1979 selon la technique de référence d'identification biochimique par électrophorèse des isoenzymes. A cette technique s'ajoutent l'identification moléculaire par séquençage d'un gène de la RNA polymérase II. D'autres techniques d'identification sont en cours de développement et d'évaluation.

a. Technique de référence : Identification iso-enzymatique

L'analyse isoenzymatique des souches est réalisée par électrophorèse en gel épais d'amidon utilisant les 15 systèmes enzymatiques suivants (Rioux et coll., *Ann. Parasitol. hum. Comp.*, 1990, 65 : 111-115) : malate déshydrogénase, MDH, EC 1.1.1.37 ; enzyme malique, ME, EC 1.1.1.40 ; isocitrate déshydrogénase, ICD, EC 1.1.1.42 ; 6-phosphogluconate déshydrogénase, PGD, EC 1.1.1.44 ; glucose-6-phosphate déshydrogénase, G6PD, EC 1.1.1.49 ; glutamate déshydrogénase, GLUD, EC 1.4.1.3 ; NADH diaphorase, DIA, EC 1.6.2.2 ; purine nucléoside phosphorylase, NP 1, EC 2.4.2.1 ; purine nucléoside phosphorylase, NP 2, EC 2.4.2.* ; glutamate-oxaloacétate transaminase, GOT 1, EC 2.6.1.1 ; glutamate-oxaloacétate transaminase, GOT 2, EC 2.6.1.1 ; phosphoglucomutase, PGM, EC 5.4.2.2 ; fumarate hydratase, FH, EC 4.2.1.2 ; mannose phosphate isomérase, MPI, EC 5.3.1.8 ; glucose phosphate isomérase, GPI, EC 5.3.1.9.

La technique d'isoélectrofocalisation plus résolutive est utilisée en complément pour certaines enzymes (Piarroux et coll., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1994, 86 : 475-478).

b. Autres techniques utilisées

- Identification moléculaire

L'identification moléculaire est réalisée depuis fin 1998 sur tout prélèvement ou culture provenant de leishmanioses tégumentaires. Elle est basée sur le séquençage du locus RNA Pol II. L'identification moléculaire permet notamment la différenciation rapide des espèces *L. guyanensis* et *L. braziliensis* à partir de lésions de patients contaminés en Amérique du Sud, en particulier en Guyane française. Elle est appliquée non seulement sur les souches en culture, mais également sur les prélèvements, en particulier biopsiques.

Validation de la technique :

Une étude comparative entre les deux techniques isoenzymatique et moléculaire a été réalisée sur une période de deux ans, et a porté sur 346 échantillons cliniques. La corrélation entre les deux techniques était totale. Par ailleurs 94 échantillons ont pu être typés uniquement par la technique moléculaire (culture négative ou contaminée), ce qui constitue un avantage du typage moléculaire (Ravel et coll., en préparation)

c. Techniques en développement

- Approche MLST

Le développement d'une approche d'identification et de typage de type MLST est en cours. Au cours de l'année 2006, 10 loci génomiques ont été validés pour différentes espèces de *Leishmania* de l'Ancien Monde. Ce travail s'intègre dans le cadre d'une collaboration avec le « plateau technique séquençage » des CNR de l'Institut Pasteur (Responsable S. Brisse). Ce typage pourrait être étendu aux espèces du Nouveau Monde sur quatre loci génomiques sur les dix étudiés.

- Identification des repas sanguins de Phlébotomes par technique moléculaire

Cette étude représente la première tentative d'utilisation d'une technique moléculaire pour l'identification des repas sanguins pris par les phlébotomes. Elle est de plus couplée à l'identification spécifique du phlébotome par analyse du locus ribosomal.

La sensibilité de cette double méthode d'identification et sa spécificité ont été évaluées de façon systématique.

Cette technique, qui a été appliquée à des phlébotomes capturés dans des foyers tunisiens de leishmaniose, pourrait représenter un outil précieux d'appoint aux études épidémiologiques .

Ce travail est l'objet d'une collaboration entre le CNRL, le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de la Faculté de Pharmacie de Monastir, Tunisie, (thèse en cours, direction Pr H. Babba) et le Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg (Pr B. Pesson).

d. Collections de souches

- Collection de souches de *Leishmania* (Cryobanque)

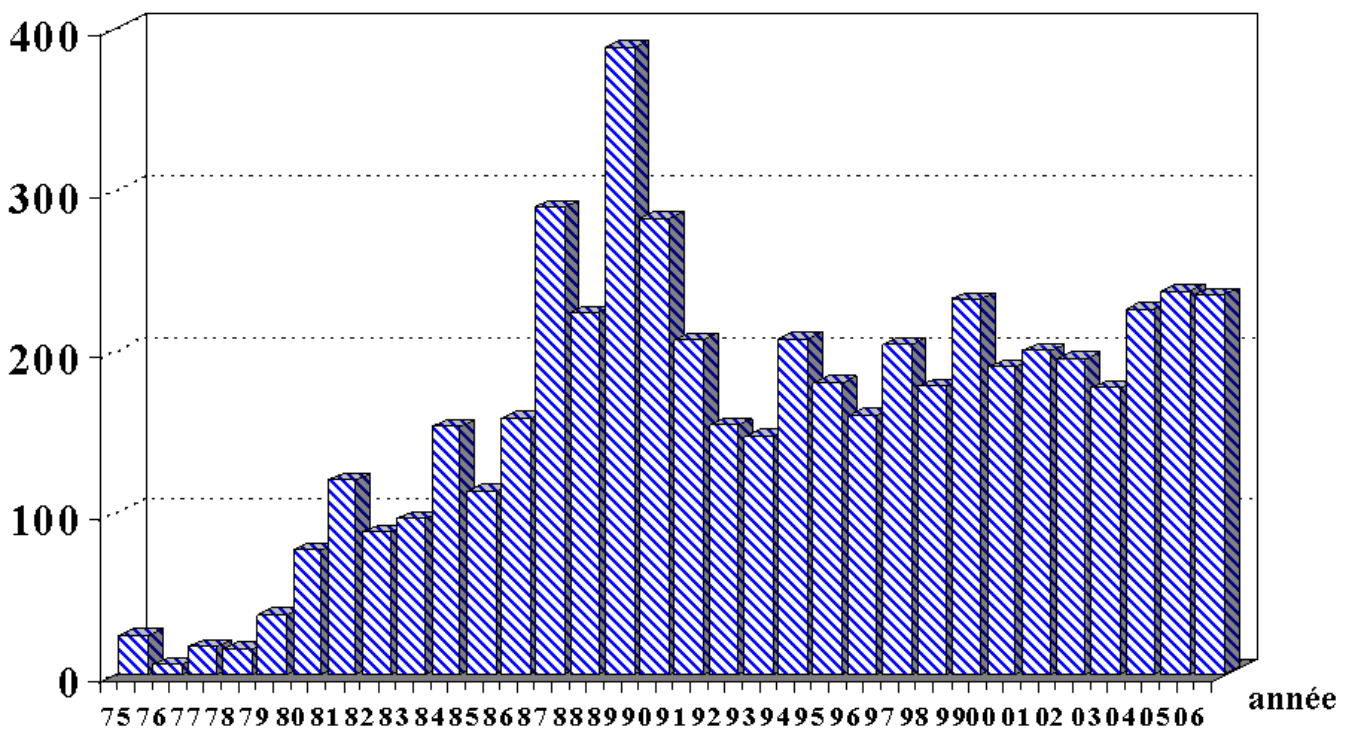
Débutée en 1971, elle s'est régulièrement enrichie. Depuis une dizaine d'années, le nombre de nouvelles souches annuellement cryoconservées dans la collection est d'environ 200 (figure 2). Elle comporte actuellement 5.350 souches provenant de 47 pays, sur 5 continents. Les souches proviennent principalement de cas humains de leishmanioses (69,5 %), mais également de chiens (18,3 %), de rongeurs (4,6 %), d'autres mammifères (0,4 %), et de phlébotomes (7,2 %). Du point de vue géographique, les souches proviennent

principalement d'Europe (45,5 %) et d'Afrique (30,7 %), mais également d'Asie (12,1 %) et d'Amérique (11,7 %).

Toutes les souches sont conservées en azote liquide. Le process des échantillons biologiques et des souches, depuis leur arrivée jusqu'à leur stockage est géré informatiquement grâce à un programme spécifiquement développé pour la collection (base de données sécurisée sous Oracle).

La collection est référencée sur le World Data Centre for Microorganisms de la World Federation for Culture Collections (depuis le 08/04/2005, n° 879) et sur le site internet des Centres de Ressources Biologiques-France : www.crb-france.org (depuis le 27/07/2005).

Figure 2. - Nombres de souches annuellement stockées dans la collection du CNRL de 1975 à 2006.



Conditions de mise à disposition de la collection :

Un catalogue de 443 souches est présenté sur le site internet du laboratoire : www.parasitologie.univ-montp1.fr/cryobanque.htm (*cf infra*).

Les souches sont envoyées aux personnes qui les sollicitent après signature d'un accord de Transfert de Matériel biologique (MTA) destiné à fixer la responsabilité des receveurs et les modalités d'utilisation par le centre receveur des souches dans le respect des réglementations et de la propriété intellectuelle.

- Collection d'ADN de Leishmania

Depuis 2003, une collection d'ADN a été constituée. Elle renferme 1.500 ADN obtenus à partir de cas humains ou de souches de culture. Tous les ADN sont cryoconservés à - 30°C.

e. Techniques de diagnostic utilisées

- **Diagnostic moléculaire par PCR** basé sur l'amplification du locus ribosomal.

- Diagnostic immunologique :

Le diagnostic immunologique de la leishmaniose viscérale est basé sur l'utilisation de deux techniques de dépistage (immunofluorescence indirecte et ELISA). La technique de western blot est utilisée comme technique de confirmation.

2.2. Activités d'expertises en 2006

a. Souches reçues

En 2006, 235 souches de *Leishmania* ont été isolées ou reçues, dont 91 d'hôpitaux et centres de soins français, 42 de centres de soins ou de recherche à l'étranger. Enfin, 102 souches faisaient partie de projets de recherche. Le détail de l'origine des souches figure sur le tableau I.

Sur les 235 souches isolées ou reçues, 8 (3,4 %) ont été obtenues de patients présentant une co-infection leishmaniose viscérale/Sida.

L'origine géographique des souches (pays d'isolement) figure sur le tableau II.

Les fluctuations annuelles des nombres de souches traitées au laboratoire sont assez faibles. Depuis plus d'une dizaine d'années, le nombre de souches se situe aux environs de 200 par an. Depuis 2004, les nombres de souches entrées dans la banque ont été les plus élevés, dépassant 220 par an (figure 2).

Toutes les souches ont été congelées en azote liquide et sont conservées dans la Cryobanque de *Leishmania*.

Tableau I - Origine des 235 souches de *Leishmania* traitées par le Centre National de Référence des *Leishmania* en 2006

<u>FRANCE</u> (91 souches)		<u>CENTRES A L'ETRANGER</u> (42 souches)	
Hôpitaux et Laboratoires français		ALLEMAGNE	
CHU Grenoble	1	Ludwig Maximilians University, <i>Munich</i>	2
CHU Montpellier-Nîmes	5	MAROC	
CHU Nice	42	Institut National d'Hygiène, <i>Rabat</i>	16
CHU Paris		PAYS BAS	
* St Antoine	2	Koninklijk Instituut voor de Tropen, Royal Tropical Inst. <i>Amsterdam</i>	2
* St Louis	11	Université d' Amsterdam, <i>Amsterdam</i>	3
* Pitié-Salpêtrière	3	SICILE	
CHU Marseille	6	Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, <i>Palerme</i>	4
CHU Rennes	4	U.S.A.	
		Walter Reed Army Institute of Research, <i>Silver Spring</i>	10
CHG Martinique	1	National Institut Health, <i>Bethesda</i>	3
		VENEZUELA	
CHG Pau	1	Institut de Biomédecine, <i>Caracas</i>	2
Hôpital militaire (Bordeaux)	1		
Hôpital militaire Legouest (Metz)	1	<u>PROJETS DE RECHERCHE</u>	
Hôpital militaire (Brest)	1	(102 souches)	
Hôpital militaire Laveran (Marseille)	1		
Institut Pasteur (Paris)	7	ALGERIE	
Ecole Vétérinaire Lyon	3	Ecole Vétérinaire d'Alger, <i>Alger</i>	16
Dr. Domerq (Pau)	1	GRECE	
		Faculty of Medicine, University, <i>Heraklion</i> , Crète	47
		PORTUGAL	
		Instituto de Higiene e Medicina Tropical, <i>Lisbonne</i>	4
		CLONES Dr Ravel, Mme Lefebvre	35

Liste des correspondants du CNRL qui ont envoyé des souches en 2006 :

M. ANTONIOU (*Grèce*), G. BELKADI (*St Antoine, Paris*), G. BOURDOISEAU (*Lyon*), N. BOURGEOIS (*Nîmes*), BRENIER-PINCHART (*Grenoble*), P. BUFFET (*Institut Pasteur, Paris*), L. CAMPINO (*Portugal*), E. CAUMES (*Pitié-Salpêtrière, Paris*), A. CHAN (*USA*), J. CHENE (*Lyon*), J. CONVIT (*Vénézuéla*), A. DATRY (*Pitié-Salpêtrière, Paris*), J. DEREURE (*Montpellier*), N. DESBOIS (*Martinique*), B. DOMERQ (*Pau*), F. FARAUT (*Marseille*), FLEISCHMAN (*Allemagne*), J.P. GANGNEUX (*Rennes*), E. GARNOTEL (*Laveran, Marseille*), D. HADDAD (*Amsterdam, Pays-Bas*), S. HAMANE (*St Louis, Paris*), M. LEFEBVRE (*Montpellier*), A. LEGUERN (*Institut Pasteur, Paris*), MARTIN-DANIS (*Pitié-Salpêtrière, Paris*), P. MARTY (*Nice*), A. OUDHIA (*Algérie*), J. PUYHARDY (*Legouest, Metz*), M. RHAJAOUI (*Maroc*), C. RAVEL (*Montpellier*), J. REYNES (*Montpellier*), D. SACKS (*USA*), C. SARFATI (*St Louis, Paris*), P. SCHOENLAUB (*Brest*), B. SOULLIE (*Bordeaux*), W. VAN DER MEIDE (*Amsterdam, Pays Bas*), F. VITALE (*Sicile*), M. VITALE (*Sicile*).

Tableau II - Origine géographique des 200 souches de *Leishmania* isolées ou reçues en 2006 (clones exclus).

<p><u>AFRIQUE</u> (58 SOUCHES)</p> <p>Algérie 22</p> <p>Burkina Faso 3</p> <p>Côte d'Ivoire 3</p> <p>Mali 1</p> <p>Maroc 17</p> <p>Mauritanie 1</p> <p>Tunisie 11</p>		<p><u>ASIE</u> (21 SOUCHES)</p> <p>Afghanistan 7</p> <p>Iraq 2</p> <p>Israël 2</p> <p>Jordanie 1</p> <p>Syrie 1</p> <p>Turquie 7</p> <p>Israël/ Turquie/ Liban/ Jordanie/Egypte 1</p>	
<p><u>EUROPE</u> (104 SOUCHES)</p> <p>Espagne 5</p> <p>France 40</p> <p>Alpes Maritimes (14), Ardèche (2)</p> <p>Aude (1), Bouche du Rhône (3),</p> <p>Corse (1), Gard (1), Hérault (14),</p> <p>Var (3), Non précisé (1)</p> <p>Grèce 47</p> <p>Italie 3</p> <p>Portugal 4</p> <p>Sicile 4</p>		<p><u>AMERIQUE</u> (16 SOUCHES)</p> <p>Brésil 2</p> <p>Costa Rica 1</p> <p>Equateur 1</p> <p>Guyane française 5</p> <p>Guyane française/Brésil 1</p> <p>Martinique 1</p> <p>Mexique 1</p> <p>Surinam 2</p> <p>Vénézuela 2</p>	
		<p><u>DIVERS</u> (1 SOUCHE)</p> <p>Origine inconnue 1</p>	

b. Identification isoenzymatique

Sur les 235 souches isolées ou reçues, 200 ont été identifiées par électrophorèse des isoenzymes. Le détail des identifications figure sur le tableau III.

Au total 9 espèces de *Leishmania* ont été identifiées. Parmi les souches de l'Ancien Monde prédominantes dans notre échantillon (86,5 %), c'est essentiellement *L. infantum* (123 souches) qui domine, espèce présente dans le sud de la France et dans le Bassin méditerranéen, suivi par *L. major* (29 souches identifiées, provenant principalement d'Afrique du nord et d'Afrique sud-saharienne). Dans le Nouveau Monde, *L. guyanensis* a été l'espèce la plus représentée (7 souches).

Les originalités rencontrées au cours de l'année 2006 sont les suivantes : i. trois zymodèmes nouveaux, dans les espèces *L. infantum*, *L. aethiopica* et *L. amazonensis*, et ii. Deux nouvelles souches de Côte-d'Ivoire correspondant à une *Leishmania* nouvelle, dont nous avons déjà identifié une souche en 2005.

Un accord scientifique a été signé en 2006 avec le Walter Reed Army Institute for Research de Washington (USA) pour l'identification isoenzymatique de souches .

c. Identification moléculaire

En 2006, 83 identifications ont été réalisées selon cette méthode, à partir de souches ou d'ADN, mais également à partir de divers types de prélèvements (biopsies, produits de grattage, sang, moelle osseuse). L'identification moléculaire a permis l'identification de 26 souches de *L. major*, 29 souches de *L. infantum*, 4 souches de *L. tropica*, 11 souches de *L. guyanensis*, 7 souches de *L. braziliensis*, 2 souches de *L. mexicana* et 2 souches de *L. amazonensis*. A noter que le typage moléculaire a permis le typage de 19 prélèvements ou cultures négatives ou contaminées.

d. Souches de *Leishmania* issues de la collection du CNRL distribuées :

Cent trois souches de *Leishmania* ont été expédiées en 2006 à la demande de divers laboratoires et institutions en France et à l'étranger, dont la liste figure ci-dessous :

⇔ En France, 14 souches ont été fournies :

- 6 souche UMR 2724 (CNRS/IRD), Centre IRD de Montpellier
- 2 souches au Laboratoire de Parasitologie, CHU de Marseille
- 6 souches au Laboratoire de Parasitologie, CHG de Cayenne

⇔ A l'étranger, 89 souches ont été expédiées :

- 11 souches : Walter Reed Army Institute for Research, Washington (USA)
- 1 souche : Karolinski Institute, Stockholm, Suède
- 22 souches : Instituto Nacional de Salud, Bogota, Colombie
- 2 souches : Instituto de Medicina tropical, Lisbonne, Portugal
- 30 souches : London School of Tropical Medicine and Hygiene, Londres, Grande-Bretagne
- 1 souche : Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Palerme, Sicile, Italie
- 6 souches : National Reference Centre for Parasitology Montreal, Canada
- 4 souches : CHU Laval, Québec, Canada
- 13 souches : Department of Biochemistry, Université de Lausanne, Epalinges, Suisse

**Tableau III - Identification iso-enzymatique des 200 souches
traitées en 2006 (clones exclus)**

ESPECE	ZYMODEME	NB	ESPECE	ZYMODEME	NB	
Ancien Monde			Nouveau Monde			
<i>L. infantum</i>	MON-1	106	<i>L. guyanensis</i>	MON-45	7	
	MON-24	5		<i>L. mexicana</i>	MON-121	1
	MON-78	1	<i>L. amazonensis</i>		MON-41	1
	MON-80	1			Nouveau	2
	MON-98	6			<i>L. braziliensis</i>	MON-43
	MON-nouveau	3	MON-44			2
	En cours	1				
<i>L. donovani</i>	MON-37	3				
	TOTAL	126		TOTAL Nouveau Monde	14	
<i>L. major</i>	MON-25	16				
	MON-26	4				
	MON-67	2				
	MON-74	7				
TOTAL	29					
<i>L. tropica</i>	MON-76	1				
	MON-102	3				
	MON-113	10				
	MON-304	3				
<i>L. aethiopica</i>	Nouveau	1				
	TOTAL	18				
	TOTAL	173				
	Ancien Monde					

Divers :	
<i>L. sp.</i> Côte d'Ivoire	2
NT (non typées)	10
Erreur	1
TOTAL	13

e. Evolution des tendances

Les tendances concernant les souches reçues et identifiées varient suivant le marqueur et l'échelle de temps considérée.

Les nombres de souches annuellement reçues, qui oscillaient autour de 200 depuis environs 10 ans, sont nettement supérieurs à ce chiffre depuis 2004, et ont atteint les 230 en 2005 et 2006. Une tendance que l'on peut donc globalement considérer comme ascendante. Un chiffre intéressant à noter est le chiffre des souches reçues d'hôpitaux français, qui se situe stable à 92 et 91 respectivement en 2005 et 2006.

L'augmentation du nombre de souches identifiées par isoenzymes est parallèle, puisque, jusqu'à présent, la presque totalité des souches reçues sont caractérisées par isoenzymes.

Le nombre de souches distribuées a été particulièrement élevé en 2006 (n = 103), par rapport à l'année précédente (n = 24). Cette forte augmentation est liée à un renforcement des collaborations avec des centres de recherche à l'étranger (London School of tropical Medicine of Hygiene, Londres, Grande-Bretagne ; Institut de Médecine tropicale, Lisbonne, Portugal ; CHU Laval, Québec, Canada), ou à des activités d'expertise (Walter Reed Army Institute for Research, Washington, USA ; Université de Lausanne, Suisse).

3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

3.1. Surveillance des leishmanioses humaines

Depuis 1998, les leishmanioses humaines font l'objet d'un recensement annuel de la part du CNR des *Leishmania*, d'après les déclarations volontaires qui lui sont effectuées. Ce recensement a porté d'abord sur la France métropolitaine, puis a été étendu à la Guyane, en 2003. Lors du renouvellement du CNR en janvier 2006, une nouvelle mission nous a été confiée, celle d'entreprendre la surveillance de la leishmaniose canine.

a. Réseau de partenaires

Le CNRL effectue depuis 1998 le recensement des cas de leishmanioses humaines autochtones et importées diagnostiqués en France. En effet, bien que les leishmanioses ne soient pas des maladies à déclaration obligatoire, une des missions attribuées au CNR de *Leishmania* dès sa création a été la surveillance des cas humains de leishmanioses. Celle-ci, originellement limitée aux déclarations de cas de leishmanioses viscérales ou cutanées, autochtones ou importées, diagnostiqués sur le territoire métropolitain, a été élargie à la surveillance de la leishmaniose cutanée en Guyane Française.

En France métropolitaine, les services déclarants sont représentés principalement par les laboratoires de Parasitologie-Mycologie et les services de maladies infectieuses et les services de dermatologie des Centres hospitaliers universitaires et des Centres hospitaliers généraux du territoire national. Pour la leishmaniose viscérale, ce réseau est vraisemblablement exhaustif, les cas de LV étant pris en charge dans les structures hospitalières. En revanche, pour la LC, il est vraisemblable que des cas vus par des praticiens libéraux échappent à notre détection, sauf en Guyane, où les déclarations sont effectuées grâce à la collaboration du Laboratoire de Parasitologie du CHG de Cayenne (Pr B. Carme), et concernent les cas hospitaliers et ceux vus dans les dispensaires de l'intérieur. En 2006, pour

la première fois, a été obtenue la collaboration du Service de Santé des Armées, pour la prise en compte des cas contractés en forêt guyanaise par les militaires.

[Liste des personnes et services ayant déclaré au CNRL des cas de leishmanioses en 2006 : Pr B. Carme (CHG Cayenne), Dr V. Pommier de Santi (IMTSSA, Marseille), Dr P. Marty (CHU Nice), Dr C. Sarfati (CHU St Louis, Paris), Dr P. Buffet (Institut Pasteur, Paris), Dr L. Lachaud et Dr N. Bourgeois (CHU Nîmes), Pr M. Danis et Pr E. Caumes (CHU Pitié-Salpêtrière, Paris), Dr M. Develoux (CHU St-antoine-Tenon, Paris), Dr Puyhardy (HIA, Metz), Dr Bonnefoy et Dr Riata (CH Angoulême), Dr Halle (Alès), Laboratoire Aubenas, Dr M. Fouad (CHU Créteil), Pr Lepape (CHU Nantes), Dr Duong (CHU Tours), Dr Guglielminotti (Bagnols), CHI Annemasse-Bonneville, Pr JP Gangneux (CHU Rennes), Dr A. Izri (CHU Avicenne, Paris), CH Tourcoing, Dr Martinaud (HIA Ste Anne, Toulon), Dr Garrabe (HIA Begin, Paris), CH F. Quesnay, Mantes-la-jolie, Dr Garnotel (HIA Laveran, Marseille), Pr Pelloux (CHU Grenoble), Dr Domecq (Pau), Dr Barthelme (Pau), Pr Dardé (CHU Limoges)].

Pour la surveillance de la leishmaniose canine, nous collaborons avec le Laboratoire de Parasitologie et maladies Parasitaires de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (Pr G. Bourdoiseau) (cf. *infra*).

b. Cas humains déclarés en 2006

En 2006, 172 fiches de déclaration de cas ont été reçues, dont 23 cas de leishmaniose viscérale et 149 cas de leishmaniose cutanée.

En France continentale, ont été déclarés en 2006 :

- 16 cas de leishmaniose viscérale et 3 cas de leishmaniose cutanée autochtones,
- 7 cas de leishmaniose viscérale et 51 cas de leishmaniose cutanée importés.

Les nombres de cas autochtones déclarés en France continentale sont sensiblement identiques à ceux des années précédentes (Tableau IV). En particulier, les cas de leishmaniose viscérale sont comparables à ceux des années précédentes (18 en 2002, 20 en 2003, 18 en 2004 ou 19 en 2005). Ces cas proviennent principalement des régions d'endémie leishmanienne du sud de la France et ont été diagnostiqués principalement dans les CHU de Marseille, Montpellier et Nice, ainsi que dans les CHU de Paris ou de la région parisienne.

Les cas de co-infection LV/Sida ont tendance à décroître en France depuis 2004 : ils sont passés d'environ 8 à 10 par an jusqu'en 2003 à 4 en 2004 et 3 en 2005 et en 2006). Les LV consécutives à d'autres types de co-infections sont stables (2 en 2006).

La leishmaniose cutanée autochtone est en nombre tout aussi restreint que les années précédentes (3 en 2006).

L'année 2006 a encore vu la contribution parfaite du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (Professeur Bernard Carme) et du Service de Dermatologie (docteur Pierre Couppié) du Centre Hospitalier de Cayenne qui nous ont adressé 88 déclarations de cas de leishmaniose cutanée diagnostiqués en Guyane. Cette année pour la première fois, le Service de Santé des Armées nous a déclarés les cas de LC contractés par les militaires en Guyane (7 cas), ce qui, ajouté aux cas guyanais qui nous ont été rapportés par d'autres structures de soins, porte à 103 le nombre de cas de leishmaniose cutanée contractés en Guyane Française en 2006. Ce chiffre est très en retrait par rapport à ceux des années précédentes (248 en 2003, 339 en 2004 et 261 en 2005). La méthode de recensement et déclaration étant identique à celle des années précédentes, cette chute de l'incidence annuelle est à rattacher à des causes externes. Deux peuvent être évoquées en particulier : la fermeture du Centre de Santé de Saint Elie, commune de l'intérieur où plus de 100 cas de LC avaient été comptabilisés de 2003 à

mi-2005, parmi la population d'orpailleurs étrangers en situation illégale (cf. à ce propos la communication de B. Rotureau aux Journées de Veille sanitaire, en novembre 2006) ; ii. Un fort déficit pluviométrique en 2006.

Tableau IV. Nombres de cas de leishmanioses déclarés annuellement au CNRL de 1999 à 2006

		1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Cas autochtones (France métropolitaine)	LV	22	30	31	18	20	18	19	16
	LC	1	0	4	4	2	0	0	3
	LM	1	0	0	1	1	0	0	0
Cas importés (en France métropolitaines)	LV	3	6	3	5	5	8	6	7
	LC	17	22	33	34	50	60	60	43
	LC Guyane	62	9	3	9	21	32	17	8
	LM	2	0	0	0	0	1	2	0
Total cas déclarés en France métrop.		108	67	74	71	99	119	102	77
LC: cas déclarés en Guyane		0	0	0	0	248	339	261	95
Total général des cas déclarés		108	67	74	71	347	458	365	172

Afin d'améliorer la surveillance de la LC en Guyane, le Département international et tropical de l'INVS a réalisé une base de données Epidata, destinée à faciliter l'analyse des données de déclaration, et une éventuelle cartographie. Le masque de saisie a été réalisé (MM Brice Rotureau et Arnaud Tarentola) et un dossier d'autorisation soumis à la CNIL.

c. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

Il n'a pas été observé de cas groupés ou de phénomènes anormaux en 2006.

3. 2. Surveillance de la leishmaniose canine

La leishmaniose canine n'est pas une maladie à déclaration obligatoire. Les diagnostics établis par les vétérinaires praticiens ne sont pas centralisés. Aucune activité de surveillance n'est actuellement réalisée. C'est pourquoi, afin de tenter de mieux cerner le niveau de l'enzootie canine en France, nous avons engagé en 2006 plusieurs types d'actions : i. réalisation d'une base de données rétrospective, ii. enquête par questionnaire auprès des vétérinaires praticiens, et iii. enquêtes sérologiques de prévalence.

a. Base de données rétrospective sur la leishmaniose canine

Nous avons réalisé une base de données rétrospectives prenant en compte les données disponibles sur la leishmaniose canine en France entre 1972 et 2005. Ont été collectés les cas autochtones rapportés ou les enquêtes de dépistage, rencontrés dans des articles publiés, des

thèses, les registres de divers laboratoires ou de diverses structures. Les localités des cas ou des enquêtes ont été géo-référencées, par utilisation d'un système d'information géographique (SIG). Ainsi, 478 sources de données ont été incluses dans la base de données. L'exploitation de cette base de données est en cours. Elle permettra de positionner géographiquement chaque cas, ou chaque enquête, et de générer une carte de répartition de la leishmaniose canine en France. Ce travail sera poursuivi dans le cadre du projet de recherche européen EDEN (*cf. infra*), avec des comparaisons de cartographies thématiques multiples (occupation des sols, climats, végétation) permettant la recherche des limites de la leishmaniose canine en relation avec les facteurs environnementaux et, à terme, la réalisation d'une carte de risque pour la leishmaniose canine.

b. Enquêtes par questionnaires auprès des vétérinaires praticiens

En collaboration avec le Laboratoire de Parasitologie et maladies parasitaires de l'Ecole Vétérinaire de Lyon, nous avons réalisé une enquête préliminaire par questionnaire auprès de vétérinaires praticiens destinée à évaluer la fiabilité de la méthode. Cette enquête a été conduite chez les vétérinaires de cinq départements (Ariège, Aude, Aveyron, Haute-Garonne et Gers). Sur 360 questionnaires envoyés en juillet aux vétérinaires exerçant dans ces départements (associations et vétérinaires exerçant seuls), 100 réponses ont été reçues (43,5 %). Cette enquête, dont l'exploitation complète est en cours, permet d'évaluer les nombres de cas suspectés, et les nombres de cas confirmés par cabinet vétérinaire, ainsi que les modes et lieux de confirmation des cas.

Les résultats font globalement apparaître des différences significatives entre une zone où le maladie est bien présente (Aude et Ariège) et une zone où la maladie est rare (Gers et Haute-Garonne).

Afin de valider les résultats de cette enquête, nous avons réalisé parallèlement deux enquêtes sérologiques des prévalence dans trois des cinq départements concernés (*cf. infra*).

c. Enquêtes sérologiques de prévalence :

Durant l'année 2006, nous avons réalisé deux enquêtes sérologiques de prévalence sur la leishmaniose canine dans les départements de l'Aude, du Gers et de la Haute-Garonne. Les prélèvements ont été effectués au cours de missions de terrain ; les sérums obtenus ont été testés par immunofluorescence indirecte (seuil de positivité : 1/80).

Aucun chien ne s'est révélé positif sur 102 chiens testés dans la Haute-Garonne et le Gers, alors que le taux de positivité dans l'Aude était de 6,4 % (échantillon de 109 chiens).

Au vu de la bonne correspondance observée, l'enquête par questionnaire auprès des vétérinaires sera étendue en 2007 à vingt départements supplémentaires du sud de la France.

3. 3. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux

Le CNR des *Leishmania* participe au réseau international de Surveillance de la co-infection *Leishmania*/VIH coordonné par l'Organisation Mondiale de la Santé, auquel il déclare les cas autochtones de co-infection signalés sur le territoire national (WHO/UNAIDS Surveillance Network).

Durant l'année 2006, a été préparée la participation de J.P. Dedet au Fifth Informal Consultative Meeting on *Leishmania* / HIV Co-infection, qui s'est déroulé du 20 au 22 mars 2007, à Addis Abeba, et qui sera détaillé dans le rapport annuel 2007.

4. ALERTE

En cas d'apparition de cas groupés ou apparition de phénomènes anormaux, ou de souches nouvelles, trois procédures d'alerte ont été définies :

- pour la France métropolitaine : alerte au niveau local (DDASS), régional (Cellule Interrégionale d'Epidémiologie du Languedoc-Roussillon), et au niveau national (Institut de Veille sanitaire),
- pour les cas militaires : alerte de l'Unité de surveillance épidémiologique, Institut de Médecine tropicale, Service de Santé des Armées, Marseille,
- pour l'étranger : alerte de l'expéditeur de la souche.

En 2006, nous avons déclenché une alerte auprès du Service de Santé des Armées, pour l'apparition de deux cas de leishmaniose cutanée par une *Leishmania* nouvelle dans le personnel militaire basé en Côte d'Ivoire. Un cas identique avait déjà été rencontré en 2005 dans les forces françaises basées dans ce même pays. Une enquête épidémiologique est en cours par le Service de Santé des Armées en collaboration avec le CNRL ; la détermination de la position taxonomique de cette *Leishmania* sera un objectif du CNRL pour 2007.

5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

5.1. Information

Le site internet du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (www.parasitologie.univ-montp1.fr) mis en ligne fin 2004 inclut les pages spécifiques du CNRL. D'abord seulement en langue française, il a fait l'objet d'une version en langue anglaise (en 2005) puis en langue espagnole (en 2006). En 2006 également, les pages spécifiques du CNRL ont été mieux individualisées et ciblées dès la page d'accueil du site, pour une meilleure lisibilité. De même le catalogue de la collection est accessible dès la page d'accès.

Une rétro-information des déclarations de cas de leishmanioses sera effectuée en mai 2007 par lettre auprès de tous les déclarants 2006.

Les pages du CNR incluent toute l'information sur la réglementation et les conditions d'expédition des souches, la démarche pour les déclarations de cas, ainsi que les activités du CNRL (rapports d'activité en ligne). Assurant une meilleure communication, il devrait permettre une meilleure exhaustivité des déclarations des cas de leishmanioses et une optimisation des activités du CNRL.

5.2. Formation

En 2006, sept stagiaires ont été reçus au CNRL, dont quatre tunisiens, un algérien, un italien et un hongrois (*cf.* tableau ci-dessous).

NOM – PRENOM	LABORATOIRE D'ORIGINE	DATE(S) DU (DES) STAGE(S)
AIT OUDHIA Khatima	Ecole Nationale Vétérinaire d'El Harrach <i>ALGER (ALGERIE)</i>	22 décembre 2005 au 5 janvier 2006 19 décembre 2006 au 11 janvier 2007
PIAZZA Mariella	Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, <i>PALERME (ITALIE)</i>	15 au 28 janvier 2006
HAOUAS Najoua	Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, <i>MONASTIR (TUNISIE)</i>	28 mars au 11 mai 2006 et 6 septembre au 19 octobre 2006
CHARGUI Najla	Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, <i>MONASTIR (TUNISIE)</i>	14 avril au 6 juin 2006 et 1 au 14 juillet 2006
BABBA Hamouda	Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, <i>MONASTIR (TUNISIE)</i>	4 au 11 juin 2006
GARRAB Selma	Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, <i>MONASTIR (TUNISIE)</i>	12 au 19 octobre 2006
FARKAS Robert	<i>BUDAPEST (HONGRIE)</i>	4 au 8 décembre 2006

5.3. Conseil thérapeutique :

Dans le cadre du CNRL, une structure de conseil thérapeutique téléphonique destinée aux médecins a été mise en place durant l'année 2006. Ce Conseil thérapeutique des leishmanioses proposé, est basé sur une collaboration entre le CNRL et le Centre Médical de l'Institut Pasteur.

En effet, les leishmanioses tégumentaires et viscérales sont des maladies auxquelles les médecins français sont parfois confrontés. Les antiparasitaires disponibles, dont l'efficacité dépend de l'espèce leishmanienne infectante, peuvent exposer à des effets indésirables sévères et requièrent de ce fait des modalités de suivi spécifiques. Plus de 100 essais comparatifs ont évalué les différents produits anti-leishmaniens disponibles sans aboutir à un algorithme décisionnel simple. Par ailleurs, sauf situation exceptionnelle, aucune des formes cliniques ne requiert de décision urgente.

Le Conseil thérapeutique mis en place permet de proposer au corps médical, soit en direct, soit pour les cas plus complexes dans les 48 heures, une option thérapeutique au cas par cas, la responsabilité de prescription demeurant toutefois entre les mains du médecin directement en charge du patient. Il permettra en outre d'améliorer le recueil et la déclaration des effets indésirables graves des médicaments antileishmaniens en relation avec les services de pharmacovigilance.

Durant l'année 2006, 31 appels téléphoniques pour conseil thérapeutique ont été reçus et traités, dont 26 à Paris et 5 à Montpellier. Ils concernaient 24 cas de leishmaniose cutanée (LC) et 7 cas de leishmaniose viscérale (LV), dont 4 chez des patients présentant un co-

infection par le VIH. Tous les appels pour des cas de LV provenaient de centres hospitaliers universitaires. Sur les 24 appels pour cas de LC, quatre provenaient de praticiens libéraux, et 20 de centres hospitaliers, dont 17 CHU. L'espèce de parasite responsable était connue dans 12 cas, seulement suspectée dans 19.

La comparaison entre le traitement que l'auteur de l'appel pensait instaurer et le traitement proposé par le conseiller a permis de mettre en évidence que le conseil thérapeutique avait évité 5 hospitalisations et 5 traitements systémiques.

6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR

Le CNRL participe à plusieurs programmes de recherche conduits dans le Laboratoire, et développe des programmes spécifiques.

6. 1. Projet européen : Quality of life and Management of Living Resources

Ce projet (QLK2-CT-2001-01810) : "Diagnostic and epidemiological markers for tracking of endemic and resurgent European leishmaniasis" comprenait divers partenaires européens : M. Miles, Londres, UK; J.C. Dujardin, Anvers, Belgique; G. Schönian, Berlin, Allemagne; J. Lukes, Ceske Budejovice, Tchéquie; L. Campino, Lisbonne Portugal; J. Alvar, Madrid, Espagne; J.P. Dedet, Montpellier, France; K. Soteriadou, Athènes, Grèce. (2001-2005).

Dans le cadre de ce programme, le CNRL a fourni aux différents participants souches de *Leishmania*, extraits d'ADN, et effectué l'identification de 180 souches adressées par les participants. Bien que terminé en novembre 2005, ce programme donne actuellement lieu à la rédaction de divers articles. La gestion de la base de données et du site internet du programme (www.leishdomus.org) est poursuivie par notre équipe (Y. Balard).

6. 2. Programme du Ministère de la Recherche/CNRS/IFREMER pour les Centres de Ressources Biologiques (n° 02 G 0557)

Dans le cadre de ce programme un financement a été obtenu en fin 2002 et pour une durée de 3 ans. Ce programme est à présent terminé. Le rapport d'activité terminal été finalisé en mars 2006.

Dans la continuité de ce programme, nous avons présenté une lettre d'intention pour participer au réseau européen « European Research Infrastructure for Biobanking and Biomolecular Resources ».

6.3. Projet Européen EDEN

Le projet EDEN, pour “Emerging Diseases in changing European environment” . (6ème PCRD; Contrat n° 010284) comprend un consortium de 46 participants des pays européens et pays associés hors Europe. Ce programme a débuté en novembre 2004 et se poursuivra jusqu’en 2009.

Notre laboratoire participe à la composante « Leishmanioses » (acronyme EDEN-LEISH) du projet. L’objectif global de cette composante est d’identifier, évaluer et catégoriser les écosystèmes européens et les conditions environnementales liées aux changements globaux, qui peuvent influencer la distribution spatiale et l’évolution et la dynamique des foyers leishmaniens en Europe.

Le CNRL est partie prenante de ce projet auquel il apporte l’appui de ses données de référence (souches identifiées, registres de cas humains). Nous avons ainsi réalisé une base de données rétrospective sur la leishmaniose canine en France (*cf. supra*) et une base de données rétrospective sur la leishmaniose humaine en France est en cours d’établissement. L’exploitation écologique et cartographique de ces travaux est en cours.

6.4. Structuration génétique des populations de *L. tropica* sur l’ensemble de l’aire de répartition de l’espèce.

Le projet de recherche clinique A.O.I.2003 (PHRC local du CHU de Montpellier) a donné lieu au développement d’une approche de typage moléculaire par MLST dans le cadre du CNRL, et a été l’occasion de mettre en place une analyse de la structuration génétique des populations d’une espèce de *Leishmania* responsable principalement de leishmanioses cutanées dans l’Ancien Monde, *L. tropica*.

Ce travail met évidence, pour la première fois, la grande fréquence de souches de génotypes hybrides dans les foyers naturels d’infection. Il permet de mieux comprendre l’évolution génomique du parasite et les modalités des échanges génétiques dans ce groupe.

7. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Les publications et communications générées par l’activité du CNRL sont listées ci-dessous.

7.1. Publications internationales

Rotureau B, **Ravel C**, Couppie P, **Pratlong F**, Nacher M, **Dedet JP**, Carme B. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *J Clin Microbiol.*, 2006 , 44 : 459-67.

Rotureau B, **Ravel C**, Nacher M, Couppié P, Curtet L, **Dedet JP**, Carme B. Molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in French Guiana. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44 : 468-473.

Rotureau B, **Ravel C**, Aznar C, Carme B, **Dedet JP**. First report of *Leishmania infantum* in French Guiana : canine visceral leishmaniasis imported from the Old world. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44 : 1120-1122.

Mauricio IL, Yeo M, Baghaei M, Doto D, **Pratlong F**, Zemanova E, **Dedet JP**, Miles MA. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex : resolving genotypes and haplotypes for five polymorphis metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *International Journal of Parasitology*, 2006, 36 : 757-769.

Ravel C, Cortes S, **Pratlong F**, **Morio F**, **Dedet JP**, Campino L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species : *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *International Journal of Parasitology*, 2006, 36 : in press.

Cortes S, Mauricio I, Almeida A, Cristovao JM, **Pratlong F**, **Dedet JP**, Campino L. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitology International*, 2006, 55 : 277-283.

Campino L, **Pratlong F**, Abranches P, Rioux JA, Santos-Gomes G, Alves-Pires C, Cortes S, Ramada J, Cristovao JM, Afonso MO, **Dedet JP**. Leishmaniasis in Portugal : enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health*, 2006, 11 : 1708-1714.

Schwenkenbecher JM, Wirth T, Schnur LF, Jaffe CL, Schallig H, Al-Jawabreh A, Hamarsheh O, Azmi K, **Pratlong F**, Schonian G. Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *Int J Parasitol.*, 2006 , 36 : 237-46.

7.2. Communications nationales :

Rotureau B., Couppié P., Nacher M., Tarentola A., Djossou F., Pradinaud R., **Dedet J.P.**, Carme B. Leishmanioses cutanées en Guyane française de 1986 à 2005. **Journées de Veille Sanitaire, Paris, 29-30 novembre 2006.** (Communication orale).

7.3. Communications internationales :

Dedet J.P., Pratlong F., Ravel C., Balard Y., Rioux J.A. Le Centre de référence de *Leishmania* de Montpellier (France) : structure et évolution (1975-2006). **Premières Journées Algéro-Françaises de Parasitologie-Mycologie, Alger, 15-16 novembre 2006.** (Communication orale).

Pratlong F., Rioux J.A., Lanotte G., Lami P., Serres G., Dedet J.P. Contribution de l'analyse isoenzymatique à la connaissance des foyers de leishmaniose cutanée d'Afrique, du Proche et du Moyen-Orient ». **Premières Journées Algéro-Françaises de Parasitologie-Mycologie, Alger, 15-16 novembre 2006.** (Communication orale).

Harrat Z., Boubidi S., **Pratlong F., Benikhlef R., Selt, Dedet J.P., Belkaid M.** Première description de *Leishmania killicki* en Algérie. **Premières Journées Algéro-Françaises de Parasitologie-Mycologie, Alger, 15-16 novembre 2006.** (Communication orale).

Pratlong F., Rioux J.A., Lanotte G., Lami P., Serres G., Dedet J.P. Contribution de l'analyse isoenzymatique à la connaissance des foyers de leishmaniose cutanée d'Afrique, du Proche et du Moyen-Orient ». **44ème Colloque du Groupement des Protistologues de Langue Française et Congrès International de Parasitologie de la Société Ouest Africaine de Parasitologie, Dakar, Sénégal, 22-26 mai, 2006.** (Communication orale)

7.4. Conférences sur invitation

Dedet J.P., Pratlong F. La collection et le centre d'identification de *Leishmania* de Montpellier (France) : évolution vers un Centre de Ressources biologiques (1975-2006). **44ème Colloque du Groupement des Protistologues de Langue Française et Congrès International de Parasitologie de la Société Ouest Africaine de Parasitologie, Dakar, Sénégal, 22-26 mai, 2006.** (Conférence invitée).

Dedet J.P., Pratlong F. Point épidémiologique sur les foyers d'endémie leishmanienne en Europe. **Troisième Journée d'actualités Leishmanioses 2006. (Réseau d'Epidémiologie-surveillance franco-italien des Zoonoses. Nice, France, 23 septembre 2006.** (Conférence invitée).

8. PROGRAMME D'ACTIVITE

Le programme d'activité pour les deux années à venir comporte la poursuite des activités d'expertise, de surveillance, d'alerte et de conseil. Dans chacun de ces domaines nous nous efforcerons d'améliorer nos performances et d'accroître nos activités.

Au point de vue organisationnel, la démarche qualité sera poursuivie intensivement, l'objectif de la certification que nous nous sommes fixés constituant une de nos priorités.

8. 1. Expertise

Dans les deux années à venir, nous avons l'intention d'investir un thème que nous n'avons pas développé jusqu'à présent, celui de la surveillance de la résistance médicamenteuse des souches de *Leishmania* circulantes.

Le Dr Laurence Lachaud, MCU-PH dans notre laboratoire, est actuellement en post-doc au Centre de Recherche en Maladie Infectieuses (équipe de M. Ouellette) au CHU Laval à Québec, où elle est en train de mettre au point et de comparer plusieurs méthodes d'étude de la chimio-sensibilité de *L. infantum* à l'amphotéricine B (AmB), traitement de base actuel de la leishmaniose viscérale en Europe. La méthode choisie sera ensuite validée par l'étude de souches isolées de patients. L'originalité de cette étude est de s'appuyer sur 25 souches isolées de 10 patients immuno-déprimés ayant développé des résistances cliniques à l'AmB, et non sur des souches rendues artificiellement résistantes in vitro. Au retour du Québec, le Dr Lachaud introduira cette technique au CNRL, et dirigera une doctorante sur le sujet, pour lequel un financement spécifique a été obtenu (PHRC, Appel d'offre interne 2006, CHU de Montpellier).

8. 2. Surveillance

a. Leishmanioses humaines

Nous nous efforcerons de vérifier l'exhaustivité des déclarations que nous recevons. A cet effet, nous avons le projet, avec l'aide du Département d'Informatique Médicale du CHU de Montpellier, de croiser nos fiches des années 2005 et 2006 avec la base de données hospitalière PMSI pour les années correspondantes. L'objectif est double : i. vérifier si les nombres de cas de ces deux systèmes d'enregistrement sont cohérents entre eux, et ii. pouvoir contacter les établissements rapportant une codification PMSI et qui ne déclareraient pas les cas au CNRL.

Afin d'augmenter l'exhaustivité des déclarations de cas, nous proposerons à l'INVs la création sur son site internet d'un « dossier thématique » sur les leishmanioses susceptible d'inciter les praticiens à déclarer au CNRL.

Dès le retour de l'autorisation de la CNIL, la base de données EpiData réalisée sera utilisée pour le traitement des données de la Guyane.

b. Leishmaniose canine

Les actions entreprises en 2006 seront complétées et étendues. La collaboration avec le Laboratoire de Parasitologie et maladies parasitaires de l'ENV de Lyon sera intensifiée.

La base de données rétrospective sera exploitée et une cartographie est prévue. L'enquête par questionnaire auprès des vétérinaires sera étendue à vingt départements du sud de la France. Les enquêtes de prévalences sérologiques seront poursuivies.

Une surveillance des souches de leishmaniose canine sera initiée, grâce à un réseau de vétérinaires que l'ENV de Lyon prévoit de constituer avec l'aide d'un partenaire industriel. Ce réseau pourrait être un axe important de la surveillance de la leishmaniose canine en France métropolitaine. Il pourrait également permettre l'étude de la leishmaniose féline, dont une progression importante du nombre de cas est rapportée dans certains pays d'Europe, en particulier en Italie.

8. 3. Conseil

Afin de développer le conseil thérapeutique téléphonique créé en collaboration avec l'Institut Pasteur en 2006, nous prévoyons d'organiser début 2008 une conférence de consensus sur la thérapeutique des leishmanioses. Celle-ci serait une opportunité pour les praticiens hospitaliers et les dermatologues libéraux de faire le point avec les membres du CNRL et du Centre de santé de l'Institut Pasteur sur le thème. Un consensus sur les conduites à tenir et les produits à utiliser selon les formes de leishmanioses et selon les espèces en cause pourrait être dégagé qui permettrait d'unifier les conduites thérapeutiques.

8.4. Recherche

Les projets de recherche en cours seront développés particulièrement dans leur interface avec le CNRL (projet européen EDEN et les deux PHRC).

Une étude de taxonomie numérique seront effectuées pour déterminer la position taxonomique de la *Leishmania* nouvelle de Côte d'Ivoire,

Dans le domaine de l'épidémiologie génétique, l'étude sur la génétique des populations de *L. tropica* sera poursuivie.

8. 5. Publications

Dans les deux années à venir, nous prévoyons la réalisation de plusieurs articles de synthèse que permettent à la fois notre expertise dans le domaine des leishmanioses et l'accumulation de très nombreuses données. En effet, trente années d'activité de la cryobanque, avec toute la richesse d'une collection de plus de 5300 souches conservées et identifiées, et toutes les données cliniques et épidémiologiques associées, nous donnent une vision globale des leishmanioses sur quatre continents, notamment dans le domaine épidémiologique.

La contribution de l'analyse isoenzymatique à la connaissance des foyers de leishmaniose cutanée d'Afrique, du Proche et du Moyen-Orient, présentée à des congrès au cours de l'année 2006, fait l'objet d'un article en préparation qui sera soumis en 2007.

Un travail similaire sera réalisé pour la leishmaniose viscérale du Bassin méditerranéen.

Dans le cas de la co-infection *Leishmania*/VIH, nous avons entrepris la mise en commun des données des centres d'identification de Montpellier, Madrid et Rome, portant sur souches isolées de cas de co-infection. Cette étude totalise l'identification, selon la même technique d'électrophorèse des isoenzymes, de 924 souches collectées entre 1986 et 2005 dans cinq pays du sud de l'Europe (Espagne, France, Grèce, Italie et Portugal). Cette synthèse que nous avons présentée au Symposium sur la co-infection *Leishmania*/VIH, organisé par l'OMS à Addis Abeba en mars 2007, sera l'objet d'une article collaboratif.

Enfin, la cryobanque de Montpellier avait fait l'objet en 1985, après 10 ans de fonctionnement, d'un article descriptif précisant les quatre unités fonctionnelles, étroitement interconnectées qui la composaient (unité des cultures, Banque de cryostabilats [889 souches dont 750 provenant de l'Ancien Monde et 139 du Nouveau Monde], service d'identification enzymatique, unité de taxonomie). Cette cryobanque s'est considérablement enrichie au point de devenir une référence internationale au service de la communauté scientifique, et sa structure s'est profondément transformée. Nous ressentons la nécessité de traduire dans un document à large diffusion l'état actuel de sa structure, de sa richesse et de présenter les services qu'elle peut rendre. Cette diffusion se fait à l'occasion de congrès nationaux ou internationaux. Nous souhaitons le formaliser en 2007 sous forme d'un article scientifique.

Remerciements

Je souhaite remercier l'ensemble des personnels du CNRL pour le travail qu'ils ont fourni en 2006, les laboratoires collaborateurs et leurs responsables (Pr Bernard Carne, CHG de Cayenne, Pr Gilles Bourdoiseau, à l'ENV de Lyon et Dr Pierre Buffet, à l'Institut Pasteur, à Paris).

Je voudrais également remercier l'Institut de Veille sanitaire pour son appui efficace aux actions du CNRL, et tout particulièrement les correspondants du CNRL, Mme Christine Saura au Secrétariat des CNR, Mme Dominique Jeannel et MM Arnaud Tarentola et Brice Rotureau au Département international et tropical.

A Montpellier, le 10 mai 2007

Professeur Jean-Pierre Dedet