

Rapport annuel d'activité

2013

**Centre de national de
référence des
Leishmanioses**

**Année d'exercice
2012**

SOMMAIRE

1. MISSION ET ORGANISATION DU CNR	10
1.1. RAPPEL DES MISSIONS ET OBJECTIFS DU CNR	10
1.2. ORGANISATION ACTUELLE DU CNR (DEPUIS LE 1 ^{ER} JANVIER 2012).....	10
1.3. DESCRIPTION DE L'EQUIPE : PERSONNELS DEVOLUS DANS LES ACTIVITES.....	10
1.4. LOCAUX ET EQUIPEMENTS (CNR ET LABORATOIRES ASSOCIES):.....	10
1.5. DESCRIPTION DE LA DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE.....	10
<i>Dr F.Pratlong /P.Lami / L. Talignani</i>	11
<i>Dr F.Pratlong /Dr C. Ravel / L. Talignani / P. Lami</i>	11
2. ACTIVITES D'EXPERTISE	12
2.1. CAPACITES TECHNIQUES DU CNR	12
2.1.1. <i>Liste des techniques de référence</i>	12
2.1.2. <i>Collections de matériels biologiques</i>	12
2.2. ACTIVITES D'EXPERTISE EN 2012	12
2.2.1. <i>Expertise diagnostique</i>	12
2.2.2. <i>Réception de souches de Leishmania</i>	13
2.2.3. <i>Identification isoenzymatique</i>	15
2.2.4. <i>Identification moléculaire</i>	15
2.2.5. <i>Distribution de souches de Leishmania</i>	18
2.2.6. <i>Maintien et dynamique de la Collection de souches du CNR</i>	18
2.2.7. <i>Evolution des tendances</i>	19
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE	19
3.1. SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DE L'INFECTION.....	20
3.1.1. <i>Réseau de partenaires</i>	20
3.1.2. <i>Analyse de la distribution des cas</i>	20
3.1.3. <i>Cas particulier de la Guyane Française</i>	21
3.1.4. <i>Collaboration avec les structures de santé animale pour la surveillance des leishmanioses animales</i>	23
3.2. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES <i>LEISHMANIA</i> AUX PRODUITS ANTI-LEISHMANIENS	24
3.3. CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX.....	24
4. ALERTE	24
5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	25
5.1. FORMATION – ENSEIGNEMENTS - STAGIAIRES.....	25
5.2.1. <i>Enseignements</i>	25
5.2.2. <i>Stagiaires</i>	25
5.2.3. <i>Organisation d'un Workshop pour l'O.M.S. : « Molecular diagnosis of leishmanioses » du 19 au 23 Mars 2012</i>	25
5.2. INFORMATION, DIFFUSION	26
5.3. CONSEIL AUX PROFESSIONNELS DE SANTE.....	26
5.4. LISTE DES ACTIVITES D'EXPERTISES AUPRES DU MINISTERE CHARGE DE LA SANTE, DE L'INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE, DES AGENCES DE SECURITE SANITAIRE, DE LA HAUTE AUTORITE EN SANTE OU DE STRUCTURE EUROPEENNE (ECDC...) OU INTERNATIONALE (OMS...).....	27

6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.	28
6.1. ACTIVITES DE RECHERCHE.....	28
6.1.1. <i>Etude des caractéristiques épidémiologiques et du polymorphisme iso-enzymatique des souches de la Collection</i>	28
6.1.2. <i>Essai thérapeutique de la paromomycine-onguent dans le traitement de la leishmaniose cutanée à L. major en Tunisie</i>	28
6.1.3. <i>Projet DGRST "Eco-épidémiologie de la leishmaniose cutanée à Leishmania killicki en Tunisie"</i>	28
6.1.4. <i>Projet européen FP7 "EDENext" (Biology and control of vector-borne infections in Europe)</i>	29
6.1.5. <i>Projet européen LeishMan « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation ».</i>	29
6.1.6. <i>Travaux de recherche en santé humaine avec les Centres Collaborateurs de Marseille et Nice</i>	30
6.1.7. <i>Travaux collaboratifs concernant le typage des Leishmania</i>	30
6.1.8. <i>Programme de collaboration avec l'université de Kohat (Pakistan)</i>	30
6.1.9. <i>Autres travaux collaboratifs en recherche</i>	31
6.2. LISTE DES PUBLICATIONS.....	31
6.2.1. <i>Publications nationales</i>	31
6.2.2. <i>Publications internationales</i>	31
6.2.3. <i>Communications à congrès nationaux</i>	33
6.2.4. <i>Communications à congrès internationaux</i>	33
7. PROGRAMME D'ACTIVITE 2012-2013	34
7.1. ACTIVITES D'EXPERTISE	34
7.1.1. <i>Maintien et dynamique de la Collection de souches du CNR</i>	34
7.1.2. <i>Participation à l'évaluation et à l'amélioration du diagnostic moléculaire des leishmanioses</i>	34
7.1.3. <i>Participation au développement et à l'évaluation des techniques d'identification (CNR de Montpellier, CC de Marseille)</i>	34
7.2. CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE DES LEISHMANIOSES	35
7.2.1. <i>Surveillance des leishmanioses humaines</i>	35
7.2.2. <i>Collaboration avec les structures en santé animale pour la surveillance de la leishmaniose animale</i>	37
7.3. CONSEIL, INFORMATION, FORMATION	38
7.4. RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.....	38
7.4.1. <i>Projet européen EDENext</i>	38
7.4.2. <i>Projet européen LeishMan « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation ».</i>	38
7.4.3. <i>Recherche en santé humaine en collaboration avec les Centres Collaborateurs du CNR</i>	38
7.4.4. <i>Recherche en collaboration avec les structures travaillant en santé animale et en entomologie médicale</i>	39
7.4.5. <i>Autres projets de recherche en collaboration</i>	40
7.4.6. <i>Projets internes au CNR directement adossés à la Collection</i>	40
7.5. ACTIVITÉS DE PUBLICATION	41
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES CONTENUS DANS CE DOCUMENT.....	42

1. MISSION ET ORGANISATION DU CNR..... ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

1.1. RAPPEL DES MISSIONS ET OBJECTIFS DU CNR **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

1.2. ORGANISATION ACTUELLE DU CNR (DEPUIS LE 1^{ER} JANVIER 2012)..... **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

1.3. DESCRIPTION DE L'EQUIPE : PERSONNELS DEVOLUS DANS LES ACTIVITES DU CNR ET LABORATOIRES ASSOCIES **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

1.3.1. Montpellier..... *Erreur ! Signet non défini.*

1.3.2. Cayenne..... *Erreur ! Signet non défini.*

1.4. LOCAUX ET EQUIPEMENTS (CNR ET LABORATOIRES ASSOCIES):... **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

1.4.1. CNR Montpellier *Erreur ! Signet non défini.*

1.4.2. Laboratoire Associé de Cayenne..... *Erreur ! Signet non défini.*

1.5. DESCRIPTION DE LA DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE..... **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

Dr F.Pratlong /Dr C. Ravel / L. Talignani / P. Lami..... *Erreur ! Signet non défini.*

Dr F.Pratlong /P.Lami / L. Talignani *Erreur ! Signet non défini.*

2. ACTIVITES D'EXPERTISE ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

2.1. CAPACITES TECHNIQUES DU CNR **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

2.1.1. Liste des techniques de référence..... *Erreur ! Signet non défini.*

2.1.2. Collections de matériels biologiques *Erreur ! Signet non défini.*

Résumé analytique

Le Sud de la France représente depuis les années 1920 une **zone d'endémie stable de leishmaniose** viscérale (LV) à *L. infantum*. La **maladie humaine**, bien qu'à un niveau faible, y est régulièrement entretenue grâce à l'existence d'une **enzootie canine très active**. La progression de la leishmaniose canine, tant au plan numérique que territorial, crée une situation épidémiologique **d'autant plus préoccupante que le réchauffement climatique** fait craindre une multiplication des populations de phlébotomes vecteurs et/ou l'extension de leur territoire géographique. Aucun programme de lutte contre la leishmaniose canine n'est actuellement envisageable, et il n'existe pas actuellement de vaccin, même si des recherches sur ce sujet sont en cours de développement. De plus, autant chez l'homme que chez l'animal, la présence d'une importante population de porteurs sains est maintenant avérée. Dans ce contexte, la multiplication des causes d'immunodépression d'origine infectieuse (VIH) ou iatrogène représente un facteur de risque pour la population humaine. C'est pourquoi, la **surveillance des leishmanioses humaine et anormale en France métropolitaine s'impose**. De même dans le **département de la Guyane**, le niveau d'endémie de leishmaniose cutanée (LC), ainsi que l'épidémiologie totalement différente de celle du territoire métropolitain, nécessite une surveillance régulière. La contamination humaine y résulte de la pénétration en forêt pour des activités professionnelles ou de loisir. *L. guyanensis* y est l'espèce prédominante. *L. braziliensis*, responsable d'une forme grave, avec évolution possible vers une atteinte des muqueuses de la face (LCM) pouvant être mutilante, a tendance à devenir plus prévalente.

Le CNR des Leishmanioses a été créé en 1998 avec pour missions principales de surveiller l'endémie leishmanienne en France (incl. la Guyane), de développer une expertise en diagnostic et en typage dans le domaine, d'informer et conseiller les professionnels à cette pathologie et de collecter les souches de *Leishmania* au sein de sa collection. Sa situation au sein de la zone d'endémie, sa longue expertise dans le domaine, sa collection de plus de 6000 souches de *Leishmania* et ses capacités techniques contribuent à ce que ces missions soient menées à bien. Les leishmanioses ne sont pas en France des maladies à déclaration obligatoire. Pourtant, le CNR des *Leishmania* a réussi à obtenir, depuis sa création en 1998, que les cas de leishmaniose autochtones ou importés, diagnostiqués sur son territoire lui soient signalés, ce qui permet de disposer de statistiques régulières. Le CNR s'est adjoint en 2012 le Laboratoire-Associé de Cayenne et est entouré de 6 centres collaborateurs en santé humaine et animale dans le domaine. Depuis 2006, une **démarche Qualité** a été entreprise en vue de la certification de la Collection de souches du CNR-L selon la norme NF 96.900. Freinée en 2009-2010 par le déménagement du Laboratoire, la démarche Qualité a été reprise en 2012 et confiée au Dr C. Ravel, MCU-PH, et à L. Talignani, Technicien, afin de coordonner et accélérer le travail en vue de la certification.

Les principales missions du CNR-L ont continué d'être remplies en 2012.

1°) Une large place a été accordée aux missions d' **expertise**.

L'offre d'**expertise diagnostique** s'est stabilisée en 2012 : 361 échantillons ont été reçus pour diagnostic moléculaire de leishmaniose, en provenance de nombreux Centres hospitaliers français (47 CH ou CHU). Au Laboratoire-Associé de Cayenne, 215 demandes de recherche de Leishmanies (à partir de frottis et/ou de biopsies) ont été enregistrées, issues du CH de Cayenne, des CH de Kourou et de Saint-Laurent-du-Maroni et des 21 centres et postes de santé disséminés sur le territoire guyanais.

La **Collection de souches** de *Leishmania* reste dynamique. En 2012, 152 souches de *Leishmania* ont été isolées ou reçues, dont 76 d'hôpitaux, centres de soins ou instituts de recherche français, et 76 également de centres de soins ou de recherche à l'étranger. Les souches ont été isolées à partir de contaminations de 21 pays différents, dont 4 pays d'Europe, 6 pays d'Afrique, 5 pays d'Amérique et 6 pays d'Asie (11 souches).

Par ailleurs, toujours en 2012, 242 souches de *Leishmania* ont été fournies à divers laboratoires et institutions en France et à l'étranger, dont 186 en France.

Le CNR-L s'emploie à faire vivre et progresser cette Collection, devenue essentielle à de nombreux centres hospitaliers et de recherche. Depuis 2011, un travail d'**enrichissement des renseignements** relatifs aux souches de la Collection a été entrepris par le curateur de la cryobanque (Dr F. Pratlong), un technicien (L. Talignani), et un Assistant-Ingénieur (Y. Balard), de façon rétrospective et selon des critères spécifiques (souches provenant d'un même patient, souches clonées, souches provenant d'expérimentations...). De plus, dans la cadre d'un projet financé par le GIS IBiSA, le CNR s'est investi de façon importante dans la mise en place d'un outil de gestion des échantillons commun à plusieurs CRB microbiologiques.

L'activité d'**identification de souches** a continué d'être importante. En 2012, 113 identifications moléculaires ont été réalisées, pour 7 espèces de *Leishmania* identifiées. La prévalence de *L. major* (21 %), cas importés d'Afrique du Nord, a continué à diminuer par rapport aux années précédentes. *L. infantum*, espèce du sud de la France et du Bassin Méditerranéen, reste bien représentée (37 %). Au Laboratoire-Associé de Cayenne, une identification d'espèce a été réalisée sur 104 échantillons (80% des cas), révélant l'espèce *L. guyanensis* dans 85% des cas mais montrant que *L. braziliensis* continue lentement à augmenter.

Le nombre d'identifications biochimiques (technique de référence pour l'O.M.S., réservée à des projets précis en épidémiologie) est en augmentation. En 2012, sur les 152 souches isolées ou reçues, 124 ont été identifiées par électrophorèse des isoenzymes.

2°) Les activités de **surveillance** continuent de constituer une grosse activité du CNRL. Durant l'année 2012, 248 déclarations de cas sont parvenues au CNRL, dont 20 cas de leishmaniose viscérale et 224 de leishmaniose cutanée; 67 cas provenaient de structures de santé de France métropolitaine, 142 du Laboratoire Associé au CNRL à Cayenne et 39 du Département d'Epidémiologie et Santé Publique de l'Institut de Médecine tropicale et du Service de Santé des Armées. Tous les cas autochtones de LV provenaient de départements du Sud de la France situés dans la zone d'endémie leishmanienne connue. A noter une augmentation des cas déclarés en Guyane, d'autant que près de 230 diagnostics y ont été répertoriés au total.

Enfin, la **collaboration avec les structures de santé animale** (essentiellement le Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES) s'est poursuivie, avec essentiellement la surveillance de cas groupés de leishmaniose canine dans des zones considérées comme non-endémiques (donc possibles foyers "ectopiques"), et des enquêtes canines et entomologiques précisant l'étude du rôle respectif des voies de transmission non-vectorielle et vectorielle de la leishmaniose canine dans la dynamique de ces foyers.

Le CNR-L a continué d'être impliqué dans les réseaux de surveillance internationaux, en particulier à l'O.M.S. pour les notifications de co-infections leishmaniose-SIDA. Enfin, un avis sur le risque d'introduction et de diffusion en France de Leishmanies du Nouveau Monde ont été demandés par la DGAL (Ministère de l'Agriculture) au LSA de l'ANSES avant délivrance d'autorisation administrative d'importation de tamanoirs et de fourmiliers géants à partir du Brésil.

4°) En matière de **formation**, le CNR-L continue d'attirer des stagiaires en quête de formation sur les leishmanioses. Un "workshop" de formation en diagnostic moléculaire a été réalisé à Montpellier à la demande de l'O.M.S. et destinée à des médecins d'Asie Centrale.

Le CNRL a également poursuivi l'activité de conseil thérapeutique téléphonique destinée aux médecins. Ce conseil thérapeutique est basé sur une collaboration entre le CNRL et les Drs. Pierre Buffet (AP-HP, Pitié-Salpêtrière) et Gloria Morizot (Institut Pasteur, Paris). En 2012, 30 conseils thérapeutiques ont été donnés, dont 23 pour des cas de LC, 5 pour des LV, 1 pour des lésions de type "PKDL" et 1 pour leishmaniose cutanéomuqueuse. Le CNR donne également de nombreux conseils en matière de diagnostic moléculaire ou d'interprétation des données de typage.

6°) Enfin, le CNR-L participe à plusieurs projets de **recherche**, en collaboration avec des équipes françaises (en particulier avec les Centres collaborateurs des CHU de Marseille et Nice) ou étrangères.

Le CNR participe aussi au projet européen EDENext (*Biology and control of vector-borne infections in Europe*), financé dans le cadre du programme européen FP7. Ses objectifs sont de comprendre les processus biologiques et éco-épidémiologiques menant à l'établissement, au maintien et à l'extension des maladies transmises par vecteurs, dont les leishmanioses; à moyen terme, il vise à mettre en place de meilleurs outils de surveillance et de prévention de ces maladies. Notons également un projet d'essai thérapeutique en collaboration avec le Walter Reed Army Institute à Washington, un projet ANR avec la Guyane, un projet DGRST avec la Tunisie, des projets de génomique avec le N.I.H. aux Etats-Unis et l'Université de Lausanne, des travaux en lien avec les Centres collaborateurs (Marseille et Nice, l'ANSES, l'Université de Reims), ainsi qu'avec d'autres équipes à l'étranger...

Par ailleurs, en interne, un travail rétrospectif d'analyse des souches de leishmaniose présentes dans la Collection a été réalisé, portant à la fois sur les aspects épidémiologiques, noso-géographiques et taxonomiques.

6°) L'ensemble de ces activités a fait l'objet de **publications et de communications** à congrès : 3 publications au niveau national et 17 publications dans des revues internationales (à comité de lecture), et 8 communications dans des congrès et réunions scientifiques, nationaux ou internationaux.

1. MISSION ET ORGANISATION DU CNR

1.1. Rappel des missions et objectifs du CNR

Cf. ANNEXES

1.2. Organisation actuelle du CNR (depuis le 1^{er} janvier 2012)

Cf. ANNEXES

1.3. Description de l'équipe : personnels dévolus dans les activités

Cf. ANNEXES

1.4. Locaux et équipements (CNR et laboratoires associés):

Cf. ANNEXES

1.5. Description de la démarche Qualité du laboratoire

Depuis 2006, une démarche Qualité a été entreprise en vue d'une certification de la collection de *Leishmania* du CNR-L. La traçabilité du processus de réception, suivi et expédition des souches est totale, grâce à un logiciel spécifiquement conçu pour le CNR par la société ModulBio. La réglementation en vigueur sur les transports des matières infectieuses est appliquée tant pour les souches envoyées au CNR-L que pour celles expédiées par le CNR-L. L'envoi des souches au CNR-L a été codifié en 2006, avec un transporteur agréé sélectionné par le CNR-L qui prend en charge les frais de transport.

Dans l'objectif de la certification selon la norme NF S96-900, à la suite des difficultés de mise en place détaillées dans le rapport précédent, le Pr Bastien a demandé au **Dr Christophe Ravel** et à **Loïc Talignani**, tous deux membres de l'équipe du CNR-L, de reprendre en main la démarche Qualité. C. Ravel est impliqué dans la démarche vers l'accréditation norme ISO 15189 du Laboratoire du CHU de Montpellier. L. Talignani suit la formation proposée par l'INSERM à tous les CRB membres du projet "BioBanques" financé dans le cadre du plan Investissements d'Avenir.

Un gros travail é été effectué en 2012, en préparation du premier audit pré-certification prévu par le réseau "Biobanques" Inserm en 2013.

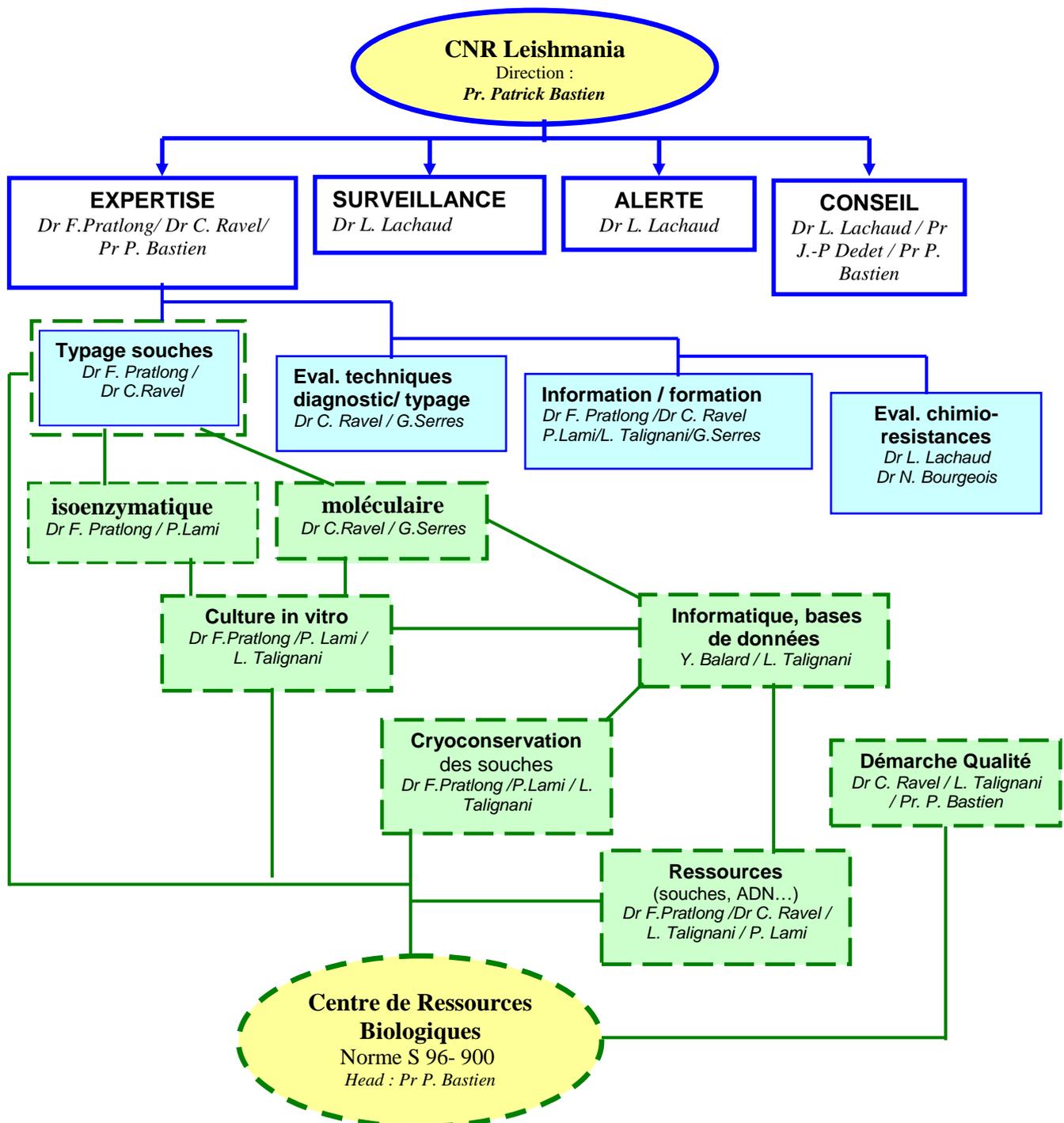
Les bases du Système de Management de la Qualité (SMQ) ont été établies :

- Mise en place d'un Conseil Scientifique et d'un Comité Technique
- Rédaction du manuel Qualité qui décrit le SMQ du CRB,
- Rédaction de la charte du CRB qui régit les rapports entre le CRB et les personnes utilisant ses services dans le respect des dispositions législatives et réglementaires
- Définition des moyens définissant la surveillance des ressources biologiques (création d'accusé-réception de dépôt de souches, formulaire d'accord de cession de souches...)
- Définition des indicateurs Qualité permettant de surveiller les processus et de dégager des axes d'amélioration en revue de Direction.
- Validation d'un certain nombre de procédures opérationnelles.

Des réunions mensuelles de suivi de la mise en place de la Qualité ont permis de maintenir une dynamique tout au long de l'année. La mise en place du Système de Management de la Qualité est devenue un projet fédérateur au sein du CNRL. Ces efforts se poursuivront en 2013.

Une visite d'évaluation a été récemment effectuée les 4-5 février 2013 par une consultante-qualité désignée par l'INSERM (Anne-Catherine EDELMAN) dans le cadre du projet Investissements d'Avenir "BIOBANQUES". L'évaluation a montré une majorité de points conformes aux exigences de la norme, ainsi qu'un certain nombre de points critiques qui devront être corrigés.

Figure 1. Organigramme du Laboratoire Coordonnateur du Centre National de Référence des Leishmanioses



2. ACTIVITES D'EXPERTISE

2.1. Capacités techniques du CNR

2.1.1. Liste des techniques de référence

Cf. ANNEXES

2.1.1.1. Diagnostic

2.1.1.2. Typage biochimique : Identification iso-enzymatique

2.1.1.3. Typage moléculaire

2.1.1.4. Autres techniques de typage utilisées

2.1.1.5. Etude in vitro de la chimiosensibilité des souches de *Leishmania*

2.1.2. Collections de matériels biologiques

Cf. ANNEXES

2.1.2.1. Collection de souches de *Leishmania* (Centre de Ressources Biologiques)

2.1.2.2. Application informatique de gestion de la collection du CNR

2.1.2.3. Conditions de mise à disposition de la collection

2.1.2.4. Collection d'ADN de *Leishmania*

2.2. ACTIVITES D'EXPERTISE en 2012

2.2.1. Expertise diagnostique

Les diagnostics spécialisés ci-dessous ont été effectués sur des prélèvements reçus de divers centres hospitaliers ou structures de soins français.

- Diagnostic moléculaire

En 2012, 361 échantillons reçus pour diagnostic moléculaire de leishmaniose ont été analysés au Centre coordonnateur de Montpellier, soit une diminution par rapport à 2011 (-12 %), après une progression continue de 2007 à 2011. Les demandes proviennent largement du CHRU de Montpellier (51 %) mais également de nombreux Centres hospitaliers français (42 CH ou CHU). 10% des prélèvements se sont avérés positifs, dont plus de la moitié pour des formes cutanées.

Au Laboratoire-Associé de Cayenne, 233 demandes de recherche de Leishmanies (à partir de frottis et/ou de biopsies) ont été enregistrées, issues du CH de Cayenne, des CH de Kourou et de Saint-Laurent-du-Maroni et des 21 centres et postes de santé disséminés sur le territoire guyanais.

Ce chiffre est en augmentation par rapport à 2011. 145 se sont révélés positives (62,2%). Le seul examen direct n'aurait dépisté que 101 cas, soit 69.6% des 145 positifs

- Participation à l'évaluation et à l'amélioration du diagnostic moléculaire des leishmanioses

Dans le cadre de la mise en place d'un Contrôle de Qualité inter-laboratoires (CIL) pour le diagnostic PCR des Leishmanioses, une étude comparative sur la quantification de la charge parasitaire sur le sang a été initiée en 2011 entre les Laboratoires de Montpellier, Marseille et Nice, laboratoires du Sud de la France qui reçoivent le plus de demandes de diagnostic de leishmanioses. La méthodologie de détection est globalement la même pour les trois Laboratoires (PCR en temps réel avec sonde TaqMan, d'après le protocole de Mary et al. 2004). La sensibilité de la technique actuelle de diagnostic est très bonne (en pratique inférieure à 1 parasite/ 5 mL de sang) et il ne semble pas qu'elle puisse être beaucoup améliorée. Cependant, différentes étapes (extraction d'ADN, définition de calibrateurs, etc.) restent à comparer et à uniformiser. Ce CIL a été étendu à une dizaine d'autres centres français en 2012.

- Diagnostic immunologique

En 2012, 244 sérologies leishmaniennes ont été réalisées, soit une activité proche des deux années précédentes (275, 271 pour 2010, 2011 respectivement).

2.2.2. Réception de souches de *Leishmania*

• Origine des souches selon le centre de soins

En 2012, **152 souches** de *Leishmania* ont été isolées ou reçues, dont **76** d'hôpitaux, centres de soins ou instituts de recherche français, et **76** de centres de soins ou de recherche à l'étranger. Le détail de l'origine des souches par centre d'isolement en 2012 figure sur le tableau I ci-dessous.

• Origine géographique des souches par lieu de contamination.

L'origine géographique des souches reçues en 2012 figure sur le tableau II selon le pays où la contamination a eu lieu : les souches ont été isolées à partir de contaminations de 21 pays différents, dont 4 pays d'Europe (18 souches), 6 pays d'Afrique (48 souches), 5 pays d'Amérique (49 souches) et 6 pays d'Asie (33 souches). On note une augmentation cette année des souches provenant d'infections contractées en Amérique et en Asie.

Tableau I.- Origine, selon le centre de soins, des 152 souches de *Leishmania* traitées par le CNRL en 2012

France (76 souches)				Etranger (76 souches)		
Etablissements	Nb	Etablissements	Nb	Pays	Etablissements	Nb
CHU Cayenne	29	CHU Croix-Rousse Lyon	2	ESPAGNE	Departamento de parasitologia, Facultat de Farmacia - Granada	1
CHU Nice	10	CHU Grenoble	2	ITALIE	Laboratorio Centrale de Parasitologia Fondazione IRCCS - MILANO	3
AP – HP Pitié Salpêtrière	6	CHU Montpellier	1	GRECE	Faculté de Médecine, Université de Crète, Héraklion	6
AP – HP Bichat	3	CHU Rennes	2		Parasitology Hellenic Pasteur Institute - Athènes	2
AP – HP Cochin	3	CHU Rouen	1	ROYAUME UNI	Liverpool School of Tropical Medicine ; Pembroke Place - Liverpool	6
AP – HP Saint Louis	3	CH Mantes-La-Jolie	1	ISRAEL	Department of Parasitology, Hadassah Medical School – Jerusalem	1
AP – HP Avicenne	2	HIA Bégin	2	TUNISIE	Institut Pasteur de Tunis – Tunis	30
AP – HP Saint Antoine	1	HIA Lavéran	5		Faculté de Monastir – Monastir	2
Agence Nationale de Sécurité Sanitaire – Maisons Alfort	1	HIA Desgenettes	1	TURQUIE	Department of Parasitology, Faculty of Medicine - Ege University, BORNOVA, IZMIR	24
		HIA Legouest	1	ALGÉRIE	Institut Pasteur d'Alger - Alger	1

Tableau II.- Origine géographique, par pays d'isolement, des 152 souches de *Leishmania* traitées par le CNRL en 2012

Continents	Pays	Nb	Continents	Pays	Nb
Afrique (n = 48)	Algérie	4	Asie (n = 33)	Israël	1
	Mauritanie	1		Jordanie	1
	Mali	1		Turkmenistan	2
	Maroc	1		Thaïlande	1
	Sénégal	3		Syrie	1
	Tunisie	38		Turquie	27
Amérique (n = 49)	Bolivie	4	Europe (n = 18)		
	Brésil	4		Espagne	2
	Costa Rica	1		France	7
	Guyane française	37		Portugal	1
	Panama	1		Grèce	6
	Amérique du Sud (sans précision)	2		Europe du Sud (sans précision)	2
Origine géographique inconnue		4			

• Isolement de souches au LA de Guyane Française.

Les souches obtenues en culture au LHUPM sont conservées en azote liquide. En 2012, seules 29 des 69 souches isolées ont été adressées à Montpellier car les envois groupés sont privilégiés.

Par ailleurs, l'ADN est conservé pour la totalité des cas identifiés par PCR, soit 119 ADN pour 2012.

2.2.3. Identification isoenzymatique

Le typage biochimique iso-enzymatique, qui est toujours une technique de référence reconnue par la communauté scientifique et par l'OMS, est réservé essentiellement aux enquêtes et études épidémiologiques. Cette technique permet également de placer une espèce dans la classification existante lorsqu'une *Leishmania* nouvelle est mise en évidence.

En 2012, sur les 152 souches isolées ou reçues, 124 ont été identifiées par électrophorèse des isoenzymes, et 28 n'ont pas fait l'objet d'un typage biochimique. Comme en 2010 et 2011, le typage biochimique a été concentré sur l'espèce *L. infantum* présente dans le sud de la France et dans le Bassin méditerranéen, et sur *L. major*, dans le cadre du suivi d'un essai thérapeutique de la paromomycine en onguent dans la LC à *L. major* en Tunisie. Le détail des identifications des souches figure sur le tableau III ci-dessous.

2.2.4. Identification moléculaire

Au Centre coordonnateur de Montpellier, le typage moléculaire est effectué en priorité (par rapport au typage iso-enzymatique) en routine depuis 2006. Les identifications sont réalisées à partir de souches ou d'ADN, mais également directement à partir de divers types de prélèvements (biopsies, produits de grattage, sang, moelle osseuse).

En 2012 : 113 identifications ont été réalisées, et au total, 7 espèces de *Leishmania* ont été identifiées. *L. infantum* (37%) et *L. major* (21 %) restent les deux espèces les plus fréquemment trouvées dans l'Ancien Monde ; sont également retrouvés *L. tropica* (n=11) et *L. donovani* (n=1).

Dans le Nouveau Monde, la prédominance de *L. guyanensis* est très nette (37 identifications, 42%), en relation avec les contingents de militaires. Huit *L. braziliensis* (12%) ont été également identifiés. Cette année encore, une souche de "MAR1" a été identifiée, espèce de *Leishmania* décrite en Martinique depuis seulement quelques années (Noyes H. et al. 2002, Parasitology, 124, p.17-24) et régulièrement observée depuis.

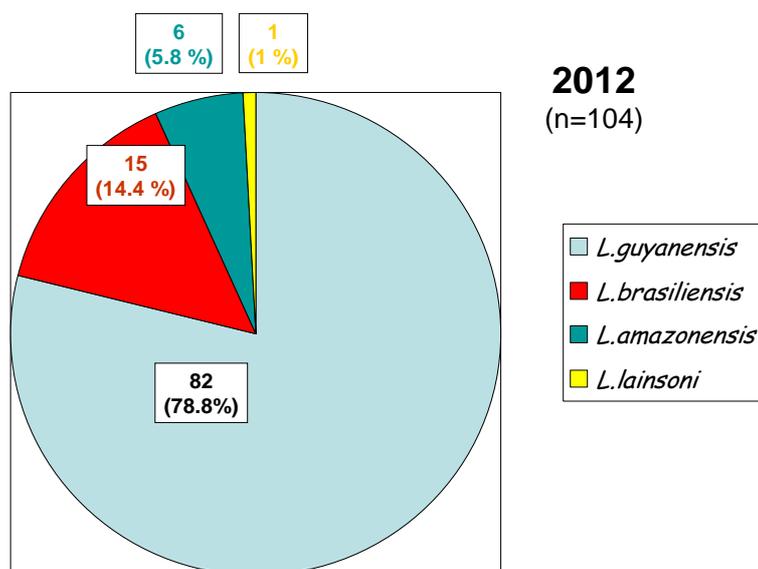
Trente identifications ont été faites à partir de prélèvements en provenance du Nouveau Monde, avec une prédominance de *L. guyanensis* (20 identifications), mais aussi 8 *L. braziliensis*, une *L. panamensis* et une "MAR1", nouvelle espèce de *Leishmania* décrite en Martinique depuis seulement quelques années (Noyes H. et al. 2002, Parasitology, 124, p.17-24) et régulièrement observée depuis.

Tableau III.- Détails des identifications enzymatiques de 124 souches réalisées en 2012.

Espèces	Zymodèmes	Nombre
<i>L. infantum</i> (n=41)	MON-1	25
	MON-33	3
	MON-80	3
	MON-281	7
	MON-319	3
<i>L. donovani</i> (n=3)	MON-37	2
	MON-277	1
<i>L. archibaldi</i> (n=2)	zymodème nouveau	2
<i>L. aethiopica hybride</i> (n=4)	MON-106	4
<i>L. major</i> (n=34)	MON-25	31
	MON-26	1
	MON-103	2
<i>L. tropica</i> (n=23)	zymodème nouveau	2
	MON-7	10
	MON-54	3
	MON-112	1
	MON-275	1
	MON-312	3
	MON-313	2
	MON-318	1
<i>L. killicki</i> (n=8)	MON-8	6
	MON-301	1
	MON-317	1
<i>L. braziliensis</i> (n=2)	MON-204	1
	MON-205	1
<i>Leishmania siamensis</i> (n=2)	espèce nouvelle, zymodème nouveau	2

Au **Laboratoire-Associé de Cayenne (LHUPM)**, une identification d'espèce a été réalisée sur 104 échantillons, ce qui correspond à 72% de l'ensemble des diagnostics portés au LHUPM et à plus de 80% pour les cas vus à Cayenne (service de Dermatologie). Les espèces étaient réparties comme indiqué sur la Figure 2, avec toujours une large prédominance de *L. guyanensis*, la poussée confirmée de *L. braziliensis* et l'apparition (par rapport à 2011) de cas de *L. amazonensis*.

Figure 2. Répartition des différentes espèces identifiées par biologie moléculaire au LA de Cayenne (LHUPM).



L'évolution de ces identifications au LA de Guyane au cours des sept dernières années est indiqué dans le Tableau 4. A priori exceptionnelle au cours des années 70 et 80, la leishmaniose à *L. braziliensis* est désormais bien implantée en Guyane avec une prévalence de l'ordre de 10% des cas. Le taux obtenu en 2010, étonnamment bas sans que l'on puisse proposer une explication particulière masque la tendance à la progression qui semble toutefois se confirmer (X2 limite à $p \sim 0.05$). Les identifications étant désormais (presque) systématiques, le biais d'une sélection par des caractéristiques clinico-thérapeutiques particulières des cas à identifier, qui se ferait en faveur de *L. braziliensis*, n'existe plus. L'absence cette année (2012) ou l'extrême rareté (dernières années) des formes muqueuses va également dans le sens d'une implantation récente de cette espèce en Guyane dans la mesure où ces atteintes surviennent habituellement de façon retardée après un premier épisode d'aspect classique donc habituellement bénin.

Tableau IV.- Evolution de la proportion des différentes espèces identifiées en Guyane Française de 2006 à 2012

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Total identifications (nombre)	45	82	80	93	144	96	104
<i>L.guyanensis</i> (%)	84,4	85,4	81,2	88,2	94,4	85,4	78,8
<i>L. braziliensis</i> (%)	8,9	8,5	10	10,8	2,8	13,5	14,4
<i>L.amazonensis</i> (%)	2,2	4,9	6,2	1	1,4	0	5,8
<i>L. lansonii</i> (%)	4,4	1,2	2,5	0	1,4	1	1
<i>L. naiffii</i> (%)	0	0	0	0	0	0	0

A noter que les cas de leishmanioses cutanéomuqueuses (moins de 10 cas depuis 20 ans observés dans le service de Dermatologie) se répartissent pour moitié entre *L. guyanensis* et *L. braziliensis*. Sachant que la prévalence de cette dernière espèce est 9 fois plus faible, cela suggère que son potentiel de métastase muqueuse serait grossièrement 9 fois plus élevé que celui de *L. guyanensis*.

2.2.5. Distribution de souches de *Leishmania*

En 2012, **242 souches** de *Leishmania* ont été fournies à divers laboratoires et institutions en France et à l'étranger, dont la liste figure ci-dessous :

➤ **En France, 186 souches ont été distribuées :**

- 106 souches à l'UMR MIVEGEC 5290 CNRS-IRD-UM1 à Montpellier
- 71 souches à l'UMR-MD3, Université Aix-Marseille, CHU La Timone, Marseille,
- 6 souches à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086 CNRS-Université de Lyon,
- 3 souches à la Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud 11,

➤ **A l'étranger, 56 souches ont été distribuées :**

- 17 souches au Center of Diseases Control d'Atlanta – Etats Unis,
- 16 souches à l'Université de Lausanne – Suisse,
- 6 souches au National Reference Centre for Parasitology de Montréal – Canada,
- 6 souches à la Faculté des Sciences de Prague – République Tchèque,
- 5 souches au Kuvim Centre for Study of Infectious and Tropical Diseases Jerusalem – Israël,
- 4 souches au Smittskyddinstitut de Solna – Suède
- 1 souche à la Faculty of Medical Sciences, University of Sri Jayewardenapura - Sri Lanka
- 1 souche à Faculté des Sciences de Ténérife – Espagne.

Par ailleurs, **137 souches ont été décongelées et recongelées** dans le cadre de l'entretien de la collection de souches du CNRL.

2.2.6. Maintien et dynamique de la Collection de souches du CNR

La Collection internationale de souches de *Leishmania* du CNRL est unique au monde, avec plus de 6500 souches originaires de 67 pays, représentant toutes les espèces connues, et isolées sur une grande variété d'hôtes et de vecteurs dans des foyers et des situations épidémiologiques très divers. Son maintien fait appel à une logistique lourde, à une rigueur éprouvée et à une collaboration sans failles avec de nombreuses équipes nationales et internationales.

Le CNR-L s'emploie à faire vivre et progresser cette Collection, devenue essentielle à de nombreux centres hospitaliers et de recherche.

La richesse des renseignements relatifs à chaque souche nécessite un travail de contrôle et de synthèse pour faire apparaître certains groupes ou catégories de souches et rendre ainsi plus accessible la Collection en fonction de ce qui est recherché.

Le curateur de la Collection (Dr Francine Pralong), connaissant et pratiquant cette collection depuis sa création, a entrepris depuis 2011, avec un technicien, Loïc Talignani, et un Assistant-Ingénieur, Yves Balard, un travail rétrospectif permettant d'enrichir la base de données associées aux souches de *Leishmania* et de mieux identifier certaines souches selon des critères habituellement non renseignés.

En 2012 :

- Un enrichissement progressif du catalogue des souches en ligne (site internet du Laboratoire) a été réalisé. Cela représente un total de 250 souches pour l'année 2012, avec, avant la mise sur le site, un contrôle rigoureux de tous les renseignements relatifs à ces souches.

- Les souches reçues et conservées au CNRL en plusieurs exemplaires ont fait l'objet d'un codage spécifique dans le code OMS.

- Un travail d'enrichissement des données a été réalisé à partir de travaux réalisés avec certaines souches de la collection (travaux de thèse ou articles scientifiques), comme par exemple :

- la sensibilité du parasite aux anti-leishmaniens,

- la virulence et l'infectivité des souches,
- la ré-émergence de foyers de leishmaniose dans le Bassin Méditerranéen,
- la découverte d'un nouveau réservoir de leishmaniose.

Ces données sont intégrées à la fiche électronique de chaque souche concernée.

- Enfin, un travail de plus grande ampleur incluant les références bibliographiques des articles ayant utilisé et mentionnant telle ou telle souche de la collection a été entrepris.

L'ensemble de ces travaux permet à la Collection de proposer aux équipes de recherche des souches bien documentées, indispensables pour les travaux de recherche.

Ceci constitue une **valorisation supplémentaire** importante de la Collection.

2.2.7. Evolution des tendances

Les échantillons reçus au CNR-L pour diagnostic moléculaire sont en légère diminution.

Le nombre de souches reçues au CNR-L a baissé dans les deux dernières années, après une période d'une dizaine d'années aux environs de 180 par an. Les chiffres de 2012 sont stables par rapport à 2011 (n = 152).

A l'inverse, le nombre de souches distribuées continue à être élevé (n = 379), malgré une petite baisse après l'année exceptionnellement chargée de 2011. Comme chaque année depuis 2007, la proportion de centres demandeurs français ou étrangers s'est inversée: ce sont surtout des équipes françaises qui en ont bénéficié.

Ces données témoignent de l'**intérêt de la Collection pour les équipes nationales et internationales**. De plus en plus, ces équipes recherchent des souches parfaitement caractérisées, conservées dans des conditions de rigueur maximales, avec des renseignements associés le plus complets possibles. De même, en ce qui concerne leurs propres isolats, elles sont intéressées par les conditions de conservation rigoureuses et sûres de la Collection du CNR-L.

En ce qui concerne l'**identification de souches**, l'activité de typage moléculaire est restée stable, tandis que le typage iso-enzymatique, technique de référence mais réservée à certains taxons (*L. infantum*, *L. major*) ou à des études épidémiologiques précises, a fortement augmenté.

3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

La surveillance a pour but d'évaluer les foyers autochtones d'endémie leishmanienne, leur dynamique et d'essayer d'anticiper les implications de cette affection au plan de la santé publique, et tout particulièrement au cours de l'infection VIH et chez les sujets subissant des transplantations d'organes. Elle vise également à surveiller les cas d'importation et détecter d'éventuelles augmentations d'incidence dans des foyers endémiques à l'étranger, permettant ainsi d'actualiser les recommandations aux voyageurs dans ces zones d'endémie.

Les leishmanioses ne sont pas en France des maladies à déclaration obligatoire.

Le **recensement annuel des cas de leishmanioses autochtones et importées** diagnostiqués en France a été instauré par le CNR-L en 1998, d'après les **déclarations volontaires de cas autochtones ou importés** qui lui sont envoyées. Les déclarations sont faites par les établissements publics ou privés de santé, voire par des praticiens libéraux, ainsi que par les Services de Santé des Armées. Ce recensement a porté initialement sur la France métropolitaine, puis a été étendu à la Guyane en 2003. Il continue à être effectué grâce à une fiche de déclaration de cas, téléchargeable sur le site du CNR-L.

La surveillance des leishmanioses s'effectue davantage à partir de ces déclarations de cas que de l'isolement des souches, ce dernier étant techniquement difficile et donc aléatoire. A

l'inverse, les isolements et adressages de souches au CNR sont autant que possible suivis d'une enquête visant à faire établir une déclaration de cas si elle n'a pas été faite.

3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques de l'infection

Durant l'année 2012, 248 déclarations de cas sont parvenues au CNRL, dont 67 de structures de santé de France métropolitaine, 142 du Laboratoire Associé au CNRL à Cayenne et 39 du Département d'Epidémiologie et Santé Publique de l'Institut de Médecine tropicale du Service de Santé des Armées ou des Services de Santé des Armées. Ces résultats (à la date du 31 mars 2013) sont détaillés ci-dessous.

Par rapport à 2011, le nombre est en très légère diminution, avec surtout une diminution des cas provenant de France métropolitaine et des Armées (-28% dans les deux cas) mais une augmentation des cas de Guyane (+19%).

3.1.1. Réseau de partenaires

La liste des services ayant déclaré au CNRL des cas de leishmanioses en 2012 figure ci-dessous.

Pour les CHU : les Laboratoires de Parasitologie-Mycologie des CHU suivants : Amiens (80), Caen (14), Dijon (21), Grenoble (38), Lille (59), Lyon (69), Montpellier (34), Nantes (44), Nice (06), Poitiers (86), Rennes (35), Rouen (76), divers établissements de l'AP-HP à Paris (75) Cochin-St Vincent de Paul, St-Louis, Pitié-Salpêtrière.

Pour les CH et CHG : CH Avicenne (93), CH Cayenne (973), CH Perpignan (66), CH Tourcoing (59), CH Villefranche sur Saône (69), CH Metz-Thionville (57), CH Mantes la Jolie (78)

Pour les Hôpitaux d'Instruction des Armées : HIA Laveran à Marseille (13), HIA Bégin à Saint Mandé (94), HIA Legouest Metz (54), HIA Sainte Anne Toulon (83), HIA Clermont Tonnerre Brest (29)

Pour le Service de Santé des Armées : Département d'Epidémiologie et Santé publique de l'Institut de Médecine tropicale du Pharo, Marseille (13).

Par ailleurs, un **réseau de partenaires spécifique à la Guyane Française** a été mis en place par le Pr B. Carmes, du Laboratoire-Associé de Cayenne : en premier lieu le service de Dermatologie du CH de Cayenne et les Centres de Santé répartis dans les différentes communes de Guyane; mais aussi les 2 autres hôpitaux de Guyane (Saint-Laurent-du-Maroni et Kourou) et de façon ponctuelle les Laboratoires d'analyses médicales privés, et l'Institut Pasteur. Ce réseau permet d'apprécier de façon pratiquement exhaustive les cas diagnostiqués au Centre Hospitalier de Cayenne, dans les Centres et Postes de Santé du territoire.

3.1.2. Analyse de la distribution des cas

En 2012, un total de **248 cas** a été déclaré au CNRL : **105 fiches** de déclaration de cas ont été **reçues directement au CNRL**, provenant de structures de France métropolitaine (67 déclarations) et des Services de Santé des armées (39 cas). Le Laboratoire Associé (Professeur Bernard Carme) du **Centre Hospitalier de Cayenne** nous a adressé **142 déclarations** de cas de LC diagnostiqués en Guyane

Ces chiffres sont susceptibles d'être légèrement augmentés ou modifiés par la suite, certaines déclarations étant encore en suspens, et d'autres déclarations pouvant nous parvenir en retard.

La **répartition de ces cas** pour l'année 2012 se fait de la façon suivante toutes structures confondues :

- 20 cas de leishmanioses viscérales,
- 3 cas de leishmanioses cutanéomuqueuses ou muqueuses
- 224 cas de leishmanioses cutanées.

Le nombre de cas de **leishmaniose viscérale** (LV) est légèrement inférieur à la moyenne des cas déclarés au cours des années passées (moyenne du nombre de cas par an entre 2006 et 2011 : 24.6). Sur les 20 cas de leishmaniose viscérale, 7 patients étaient immunodéprimés, dont 4 infectés par le VIH. On note que 10 patients sont de sexe féminin et 10 de sexe masculin et que seulement 6 cas sont des enfants de moins de 16 ans. Ainsi, en France, la LV continue de toucher essentiellement des patients adultes (moyenne d'âge de 51.7 ans [28-74 ans] pour l'année 2012).

Tous **les cas autochtones** de LV (10 cas) proviennent de départements du Sud de la France situés dans la zone d'endémie leishmanienne connue : 3 des Alpes Maritimes, 2 de Corse, 2 du Gard, 1 de l'Hérault, 1 des Pyrénées Orientales et 1 du Sud-Ouest. Parmi ces cas, 4 patients avaient des facteurs d'immuno-dépression (2 étaient infectés par le VIH).

Le nombre de cas de **leishmaniose cutanée** (LC) reste relativement stable. Le nombre de cas de contamination ayant eu lieu dans les pays du Maghreb est en baisse (18 cas versus 35 en 2011). En ce qui concerne les contaminations en Guyane (cas du LA + cas diagnostiqués en métropole: 142 +34 = 176), ils sont légèrement inférieurs à la moyenne des 6 dernières années (201.8 cas/an [165-288] pour 2007-2012). Pour l'année 2012, 3 cas de leishmaniose muqueuse ont été rapportés avec une contamination dans les Alpes Maritimes et deux en Italie du Nord.

L'origine des contaminations en fonction des formes cliniques pour l'ensemble des cas recensés est détaillée dans le tableau V ci-dessous.

Tableau V.- Lieux de contamination pour l'ensemble des cas de leishmanioses recensées en 2012

Forme clinique	Origine de la contamination							Total
	France métropolitaine	Antilles	Guyane	Maghreb (Algérie, Tunisie, Maroc)	Autre	Indéterminée ou non renseignée		
L. viscérale	10	0	0	2	8	0	20	
L. cutanée	4	1	176	18	22	3	224	
L. muqueuse	1	0	0	0	2	0	3	
Total	15	1	176	20	32	3	247	

3.1.3. Cas particulier de la Guyane Française

Durant l'année 2012 :

- le Laboratoire-Associé du **Centre Hospitalier de Cayenne** (CHAR)(Laboratoire H-U de Parasitologie-Mycologie, Professeur Bernard Carme) a adressé au LPMM 142 déclarations de cas de LC diagnostiqués en Guyane. Parmi les cas pour lesquels le lieu de contamination était renseigné, on retrouve 70 cas en Guyane et 72 cas pour lesquels le lieu n'a pas pu être déterminé avec précision.
- le **Centre Hospitalier de Saint-Laurent du Maroni** (Dr R. Boukari) a donné des indications précises au CH de Cayenne sur les cas diagnostiqués, mais sans toutefois remplir de déclaration de cas. Pour 2012, il a relevé 50 cas confirmés "parasitologiquement" dont 15 ont été comptabilisés au CHAR du fait d'une culture avec identification d'espèce. C'est donc 35 cas supplémentaires qui doivent être retenus, ce qui porte le total à 180 cas.
- Pour les autres Laboratoires, y compris le LAM de l'Institut Pasteur, le nombre de cas reste faible (moins d'une vingtaine de cas pour l'ensemble des structures), le CHAR drainant largement les demandes de diagnostic ou plus exactement les demandes de confirmation avec détermination de l'espèce.

- **les Hôpitaux d'instruction des Armées** (HIA Bégin, Lavéran, Legouest et Sainte Anne) et le Service de Santé des Armées (Département d'Epidémiologie et Santé publique de l'Institut de Médecine tropicale du Pharo) ont déclarés 39 cas dont **2 cas de LV** avec une contamination à Djibouti et une contamination en Guyane pour **31 des 37 cas de LC**.
- de plus, parmi les déclarations envoyées par les diverses **structures sanitaires métropolitaines**, **3** concernaient des cas de LC avec une contamination en Guyane.

Ainsi, en 2012, on retrouve un total de 104 cas de LC déclarés contractés de façon certaine en Guyane toutes structures confondues, ce qui semble une diminution par rapport à 2011 (130 cas). Cependant, le nombre élevé de contaminations dont l'origine est non déterminée mais sud-américaine et probablement guyanaise infirme cette impression. Le détail figure sur le tableau ci-dessous.

A noter qu'aucun cas de LV n'a été répertorié en Guyane cette année.

Tableau VI. - Cas de leishmaniose cutanée contractés en Guyane en 2012, en fonction de la source de déclaration.

Déclarations	Nb total	Sexe		Statut		
		H	F	militaire	civil	inconnu
France métropolitaine	3	2	1			
CH Cayenne	70	64	6	0	44	26
HIA et SS des Armées	31	31	0	31	0	0
Total	104	117	13			
<i>Cas déclarés par Cayenne mais lieu de contamination non déterminé</i>	72					
<i>Cas diagnostiqués à St-Laurent du Maroni mais non déclarés</i>	35					
<i>Cas signalés à l'Institut Pasteur de Cayenne mais non déclarés</i>	<20					
<i>Grand total</i>	231					

Ainsi avec de l'ordre de **230 cas estimés pour 2012, l'incidence annuelle de la LC** en Guyane serait de **0.9 p. 1000** (sur la base de 250.000 habitants), ce qui apparaît bien plus faible que la valeur souvent citée de 2 p.1000.

Il faut rappeler que l'aire d'endémie de la leishmaniose cutanée en Guyane correspond à l'ensemble du territoire mais avec une plus faible exposition pour les citoyens de la région côtière qui représente désormais près de 75% de la population en retenant Saint-Laurent du Maroni.

Toutefois, le LA de Cayenne souligne que l'évaluation de l'incidence est extrêmement difficile, pour ne pas dire impossible du fait :

- de l'importance de la leishmaniose cutanée parmi les orpailleurs dont beaucoup sont des clandestins, surtout de nationalité brésilienne, dont on ne voit qu'une partie et qui représentent pourtant la moitié des cas recensés;
- de la variation des vagues de migration soutenues par le cours de l'or mais contrées par les opérations de lutte Gendarmerie / Forces Armées
- des difficultés de diagnostic et de déclarations des cas suffisamment étayés dans les régions de l'intérieur de la Guyane.

Ainsi tant le numérateur (nombre de cas) que le dénominateur (population exposée) est d'appréciation difficile, et même impossible si on cherche à avoir des indications précises par région.

3.1.4. Collaboration avec les structures de santé animale pour la surveillance des leishmanioses animales

Dans le contexte actuel d'avancée de la leishmaniose canine rapportée sur des positions de plus en plus septentrionales et dans un contexte plus général d'émergence de maladies vectorielles animales, en lien ou non avec le réchauffement climatique, la surveillance de la leishmaniose animale, de ses différents vecteurs et de ses réservoirs paraît primordiale tant pour la santé animale que pour la santé publique.

Au cours de l'année 2012, le Centre collaborateur **Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES de Maisons-Alfort (Dr M. Kasbari/Dr P. Boireau)** a poursuivi ses activités relatives à la leishmaniose animale et à son vecteur, en collaboration avec le CNR-L et l'Unité de recherche Vecpar ("Transmission vectorielle et Epidémiologie des maladies parasitaires" - JE 2533, Faculté de Pharmacie, Univ. Reims) .

Ces activités ont concerné les points suivants :

1) La **surveillance de cas groupés de leishmaniose canine** dans des zones considérées comme non-endémiques, et donc **possibles foyers "ectopiques"**.

Un foyer, initialement de leishmaniose humaine autochtone, dans le Jura a fait l'objet d'une enquête épidémiologique et entomologique :

L'enquête épidémiologique menée auprès de vétérinaires du Jura a permis de montrer qu'entre 2007 et 2011, au moins 31 cas de leishmaniose canine ont été diagnostiqués sur des chiens habitant ce département. Ces cas avaient été initialement supposés liés à un éventuel voyage en zone d'endémie. Néanmoins, le cas humain autochtone rapporté en 2012 à Clairvaux-les-Lacs (Faber et al., Emerg. Inf. Dis., 2012) contraint à reconsidérer l'origine de ces foyers canins qui ne peuvent pas être tous reliés de manière certaine à un voyage dans le Sud de la France.

Cette étude préalable a fait l'objet d'une courte communication (Kasbari et al., Emerg. Inf. Dis., 2012).

2) L'**étude du rôle respectif des voies de transmission non-vectorielle et vectorielle** de la leishmaniose canine dans la dynamique de ces foyers "ectopiques" s'est poursuivie. A été en particulier étudiée au Laboratoire de Santé Animale (ANSES, Maisons-Alfort) et en animalerie de niveau de sécurité A2 (CRBM, Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort), l'efficacité des voies de transmission transplacentaire et vénérienne de la leishmaniose chez le réservoir canin. Ces travaux doivent faire l'objet d'une publication en cours et d'une présentation au prochain congrès international quadriennal WorldLeish 5 au Brésil en 2013. Une proportion sans doute non négligeable des cas de leishmaniose canine, tant en zone d'endémie que hors zone d'endémie sont imputables à la transmission de l'infection de la mère infectée aux chiots ou lors d'accouplements entre animaux sains et porteurs asymptomatiques. Les animaux de plusieurs élevages professionnels canins infectés ont été et demeurent actuellement suivis sur plusieurs générations.

3) Des **enquêtes entomologiques** ont également été poursuivies dans des départements situés en dehors de la zone d'endémie habituelle de la leishmaniose afin de poursuivre la détermination de la distribution, la nature et la densité des espèces de phlébotomes compétents. Des captures de phlébotomes de l'espèce *P. mascitti* ont notamment été réalisées en Bretagne et en Ile-de-France. Elles permettront à terme de compléter les données manquantes indispensables pour l'évaluation du risque et de son évolution temporelle et spatiale et de confirmer ou infirmer les modèles prédictifs existants de progression de la leishmaniose en France.

Enfin, **en Guyane Française**, le LA sensibilise régulièrement les vétérinaires pour qu'ils leur adressent les cas de suspicion de leishmaniose.

3.2. Surveillance de la résistance des *Leishmania* aux produits anti-leishmaniens

Cet item est peu applicable aux *Leishmania*, surtout en raison du faible niveau de résistance actuellement observé en France (où les dérivés antimoniés sont peu utilisés). La sensibilité des souches de *Leishmania infantum* vis-à-vis des drogues anti-leishmaniennes de première ligne que sont l'amphotéricine B et les dérivés antimoniés peut être étudiée au CNR selon trois systèmes *in vitro*. Cette activité demeure essentiellement liée à des projets de recherche plus qu'à une activité de routine. En 2012, un travail lié à cette activité a été publié :

Aït-Oudhia K, Gazanion E, Sereno D, Oury B, Dedet JP, Pratlong F, Lachaud L. In vitro susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. *Vet. Parasitol.* 2012; 187(3-4):386-93.

3.3. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux

Le Laboratoire a été Centre Collaborateur de l'O.M.S. pour les Leishmanioses de 2004 à 2008. Le dossier n'a pas été renouvelé en 2008 en raison d'un manque de notification. Un nouveau dossier a été déposé par le Pr P. Bastien en 2010. Cependant, en 2012, un courrier de l'O.M.S. expliquait que les règles avaient changé et qu'un nouveau dossier devait être déposé. Il n'a pas été donné suite à ce courrier.

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

En 2012, les cas de co-infections avec le VIH signalés sur le territoire national sont au nombre de 5 (4 cas de LV et 1 cas de LC). Parmi les cas de LV, 2 cas étaient autochtones, 2 étaient des cas d'importation (1 Algérie et 1 Géorgie). Le cas de LC était un cas d'importation avec une contamination au Sénégal.

Par ailleurs, le CNR-L a organisé un Workshop international à la demande de l'O.M.S. en 2012 (voir ci-dessous Formation).

4. ALERTE

En cas de détection de phénomène anormal concernant une augmentation du nombre de cas, ou l'existence de cas groupés, ou une modification éventuelle des formes cliniques, sur le plan local, Le Laboratoire Coordonnateur, aidé du Laboratoire-Associé, se met en contact avec la CIRE Languedoc-Roussillon, ou avec la CIRE Antilles-Guyane pour la Guyane Française.

Si le phénomène concerne le reste du territoire national, les DOM-TOM ou l'étranger, le CNR contacte également le Département des maladies Infectieuses de l'InVS.

Les informations concernant des événements de même nature survenant dans des pays étrangers, en particulier dans les pays européens limitrophes ou au Maghreb, doivent également être signalées à la DGS et au RNSP.

A la suite des cas groupés observés en 2009-2010, une surveillance des cas provenant du Maghreb a été mise en place au CNR-L. Depuis 2011, aucun phénomène particulier n'a été observé. La baisse du nombre de cas importés d'Algérie, Maroc et Tunisie amorcée en 2011 (38 cas) se poursuit de façon notable avec seulement 20 cas cette année (2 LV et 18 LC).

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

5.1. Formation – Enseignements - Stagiaires

5.2.1. Enseignements

Des cours sur les leishmanioses sont régulièrement donnés par les membres des deux Laboratoires dans le cadre d'enseignements du Second et du Troisième Cycle des Etudes Médicales.

En Guyane, la leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse est largement enseignée dans le cadre des DU (Université Antilles Guyane) se déroulant en Guyane : "Pathologie Tropicale" (Pr. B. Carme), "Dermatologie Infectieuse et Tropicale" (Pr. P. Couppié), ainsi qu'au cours de la Capacité de Médecine Tropicale. Une mini-formation sur les aspects cliniques, les modes de prélèvements des lésions, le diagnostic et le traitement est délivrée aux médecins affectés dans les Postes et Centres de Santé.

5.2.2. Stagiaires

Le CNR-L continue d'attirer des stagiaires en quête de formation sur les leishmanioses, et, dans les faits, en refuse régulièrement.

De fin 2011 à fin 2012 : trois stagiaires ont été reçus mais sur plusieurs périodes de stage.

N.B. Ces chiffres ne prennent pas en compte les autres stagiaires admis au sein du Laboratoire pour des activités autres que celles du CNR-L.

Tableau VII.- Liste des stagiaires reçus au CNR-L entre fin 2011 et fin 2012

NOM	PRENOM	FORMATION / AFFILIATION	DATES DU STAGE
EL BAIDOURI	Fouad	Thèse Sciences 3 ^{ème} Année, Montpellier	Janv-Déc 2012
HAOUAS	Najoua	Projet collaboration, Univ. Monastir, Tunisie	02/01/12 - 21/01/12
KASBARI	Mohamed	Thèse Sciences 2 ^{ème} Année, Médecin-Inspecteur Vétérinaire, ANSES, Maisons-Alfort	Plusieurs séjours d'une semaine au cours de l'année 2012

5.2.3. Organisation d'un Workshop pour l'O.M.S. : « Molecular diagnosis of leishmanioses » du 19 au 23 Mars 2012

Ce séminaire a été organisé à la demande du Dr Jorge Alvar (Medical Officer) du Service Leishmaniasis Control, Neglected Tropical Diseases (HTM/NTD/IDM) de l'O.M.S. pour des participants venant d'Asie Centrale. Douze participants ont assisté à cette formation, en provenance des pays suivants : Arménie, Azerbaïdjan, Bulgarie, Géorgie, Kazakhstan, Kirgizstan, Ouzbékistan, Tadjikistan, Turkménistan et Turquie.

Le programme de la semaine s'est déroulé en 2 parties :

- une première partie théorique avec 3 séminaires (i) Leishmaniasis epidemiology; focus on Old World visceral and cutaneous leishmaniasis. (Pr Jean-Pierre Dedet) ; (ii) Visceral leishmaniasis in clinical practice: diagnosis, treatment and PCR follow up (Dr Alain Makinson & Dr Nathalie Bourgeois) ; (iii) Presentation of the National Reference Centre for Leishmaniasis (Pr Patrick Bastien)

- une deuxième partie pratique sous forme de 8 modules (Dr Laurence Lachaud & Dr Christophe Ravel): 1 : In vitro cultivation of Leishmania and cell counts for seeded samples and positive controls; 2 : DNA extraction methods and negative controls; 3 : Conventional PCR; 4 : Real time PCR; 5 : Interpreting PCR results [validation of methods, sensibility, specificity, internal quality control and external quality assessment] ; 6 : PCR results: clinical relevance and impact on therapeutic decision-making; 7 : Molecular identification of Leishmania strains (focus on RFLP); 8 : Bioinformatics : primers, probe design NCBI...

5.2. Information, diffusion

Le site Internet du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (www.parasitologie.univ-montp1.fr) inclut les pages spécifiques au CNR-L. Ce site permet une présentation des leishmanioses, du CNR, du CRB et de son organisation, du catalogue des souches disponibles pour la communauté scientifique, et facilite la mise à disposition des souches grâce à des documents concernant la demande et disponibles en ligne. Les pages du site 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 CNR-L. Ce site est présenté en version française, anglaise et espagnole de façon à permettre son accès à une audience internationale. Il est régulièrement revisité pour mieux individualiser et cibler les pages spécifiques au CNR-L dès la page d'accueil. De même le catalogue de la Collection est accessible dès la page d'accès. A noter que le site ne permet pas la notification directe en ligne des cas de leishmaniose par les services ou les laboratoires.

5.3. Conseil aux professionnels de santé

Le CNR assure une veille téléphonique pour répondre aux appels concernant la pathologie, le traitement et le diagnostic.

Les numéros de téléphone des praticiens concernés sont inscrits sur le site web du CNR.

Par ailleurs, une adresse mail commune (cnr-leish@univ-montp1.fr) a été mise en place en 2011 afin d'offrir une accessibilité plus simple et une possibilité de réponse plus rapide à d'éventuelles requêtes.

a) Conseil thérapeutique

Le traitement des leishmanioses est un problème difficile pour plusieurs raisons. Les produits disponibles ont une efficacité limitée, dépendante de l'espèce de *Leishmania* en cause. Ils peuvent exposer à des effets indésirables sévères et requièrent de ce fait des modalités de suivi spécifiques. Il n'existe pas à ce jour d'algorithme décisionnel simple. La complexité du sujet cantonne le savoir-faire thérapeutique à de rares spécialistes. Or, dermatologues, infectiologues, internistes et généralistes français sont confrontés de façon sporadique au traitement de ces maladies. Par ailleurs, sauf situation exceptionnelle, aucune des formes cliniques ne requiert de décision urgente.

C'est pourquoi, le CNRL a mis en place en 2006 une structure de conseil thérapeutique téléphonique destinée aux médecins. Ce conseil thérapeutique est basé sur une collaboration entre le CNR-L (essentiellement Dr Laurence Lachaud, également Prs. P. Bastien et J.P. Dedet) et les Drs. Pierre Buffet (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Pitié-Salpêtrière) et Gloria Morizot (Institut Pasteur, Paris). Un numéro téléphonique est accessible aux médecins aux heures ouvrables, permettant de proposer dans les 48 heures au sollicitant (médecin français confronté à un cas et fournissant les informations cliniques nécessaires) une solution thérapeutique au cas par cas, reposant sur une connaissance précise de la littérature et sur l'expérience personnelle des intervenants. La responsabilité de prescription demeure toutefois entre les mains du médecin directement en charge du patient. Ce conseil doit en outre permettre d'améliorer le recueil et la

déclaration des effets indésirables graves des médicaments anti-leishmaniens en relation avec les services de pharmacovigilance.

En 2012, 30 conseils thérapeutiques ont été donnés, dont 23 pour des cas de LC, 5 pour des LV, 1 pour des lésions cutanées de type PKDL et 1 pour LCM.

Ce conseil thérapeutique rentre également dans un projet à plus large échelle initié par le Dr Pierre Buffet à Paris Pitié-Salpêtrière et Gloria Morizot (Institut Pasteur). Dans ce projet, les informations médicales nécessaires à la formulation d'un conseil thérapeutique incluent la forme clinique et l'espèce de *Leishmania* suspectée, ainsi que les caractéristiques du patient. Le recueil de l'option thérapeutique qu'aurait choisi le clinicien sollicitant s'il n'avait pas eu accès au conseil cherche à déterminer l'impact tangible de l'activité de conseil (hospitalisations et traitement systémiques non indispensables évités). Enfin, on cherche à savoir si le conseil a été effectivement suivi et quelle a été l'évolution sous traitement. Une base de données gérée par Pierre Buffet et Gloria Morizot recense toutes les données épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques recueillies lors des entretiens téléphoniques pour ce conseil thérapeutique. Cette base de données est maintenant maintenant intégrée dans le projet européen « LeishMan » (*Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation*). Il est envisagé que le CNR puisse incrémenter partiellement des données, malgré la non-acceptation par l'InVS de ce Laboratoire en tant que Laboratoire-Associé en 2011. Un article a été soumis en 2012 à ce sujet (*Travellers with Cutaneous Leishmaniasis Cured Without Systemic Therapy*).

b) Conseil en matière de diagnostic et typage

Le Dr Christophe Ravel, responsable du diagnostic moléculaire des leishmanioses et du typage des *Leishmania*, reçoit de nombreux appels téléphoniques provenant de professionnels concernant du conseil en matière de diagnostic moléculaire ou d'interprétation des données de typage. Ces appels ne sont toutefois pas tracés.

5.4. Liste des activités d'expertises auprès du Ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)

- Le CNR-L participe au réseau international de Surveillance de la co-infection *Leishmania*/VIH coordonné par l'**Organisation Mondiale de la Santé** (WHO/UNAIDS Surveillance Network), auquel il déclare les cas autochtones de co-infection signalés sur le territoire national.
- Le Pr P. Bastien a effectué une mission d'expertise et d'évaluation des activités de recherche auprès de l'**ANSES** en juillet 2012.
- Un avis (hors saisine) sur le risque d'introduction et de diffusion en France de leishmanies du Nouveau monde a été demandé par la **DGAL (Ministère de l'Agriculture) au Centre Collaborateur Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES** avant délivrance d'autorisation administrative d'importation de fourmiliers géants (*Myrmecophaga tridactyla*) à partir de zoo de Singapour vers des parcs zoologiques français qui en ont fait l'acquisition. Singapour est indemne de leishmaniose autochtone. Néanmoins, ces animaux connus pour être des réservoirs naturels potentiels de leishmanies, notamment *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, ou *L. amazonensis* étaient originaires d'Amérique Latine avant leur venue à Singapour, d'où la question légitime posée par la DGAL avant introduction sur le territoire national. Cependant, ces espèces de leishmanies étant

transmises par des vecteurs du genre *Lutzomyia* absents hors Amérique, et les phlébotomes européens n'étant pas permissifs pour la transmission des leishmanies du Nouveau Monde, un avis favorable a été émis pour l'autorisation d'importation (sous condition du respect des conditions sanitaires et réglementaires habituelles).

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

Le CNR-L a participé à plusieurs programmes de recherche conduits dans le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie et dans l'unité labellisée "MiVEGEC" : "**Maladies infectieuses et vecteurs : écologie, génétique, évolution et contrôle**" (UMR 5290 CNRS / 224 IRD / UM1/UM2; dir. D. Fontenille), ainsi que directement en collaboration avec des équipes françaises ou étrangères. Dans ce cadre, le CNR-L développe des programmes spécifiques, orientés vers l'épidémiologie et la surveillance des leishmanioses.

6.1. Activités de recherche

6.1.1. Etude des caractéristiques épidémiologiques et du polymorphisme iso-enzymatique des souches de la Collection

Un travail rétrospectif d'analyse des souches présentes dans la Collection est réalisé à intervalles réguliers, portant à la fois sur les aspects épidémiologiques, noso-géographiques et taxonomiques. Ainsi : Le polymorphisme enzymatique d'une série de **2277 souches de *Leishmania* de notre collection** responsables de leishmaniose viscérale dans l'Ancien Monde (38 pays) a fait l'objet d'un article de synthèse qui a été publié en 2012.

Pratlong F, Lami P, Ravel C, Balard Y, Dereure J, Serres G, Baidouri FE, Dedet JP.
Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. *Parasitology*. 2012, 12:1-12.

6.1.2. Essai thérapeutique de la paromomycine-onguent dans le traitement de la leishmaniose cutanée à *L. major* en Tunisie

Depuis 2008, le CNR-L est partenaire d'un essai thérapeutique portant sur la paromomycine-onguent dans le traitement de la leishmaniose cutanée à *L. major* en Tunisie. Ce projet se fait en collaboration avec le Walter Reed Army Institute of Research à Washington (Dr M. Grogil), l'Institut Pasteur de Tunis (Pr A. Ben Salah), l'Institut Pasteur de Paris (G. Morizot) et le Service de Parasitologie-Mycologie de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière (Dr P. Buffet). Dans cet essai, le CNR-L est chargé de l'identification de 70 à 100 souches qui sont isolées chaque année à partir de patients par l'équipe Tunisienne. Dans un but de contrôle, environ 20% de ces souches sont également typées par la technique de référence basée sur les isoenzymes. Ces souches sont par ailleurs cryoconservées dans la cryobanque de Montpellier et pourront servir de référence, en particulier pour d'éventuelles études longitudinales de résistance des parasites aux drogues anti-leishmaniennes.

6.1.3. Projet DGRST "Eco-épidémiologie de la leishmaniose cutanée à *Leishmania killicki* en Tunisie"

Ce projet collaboratif avec le Pr. H. Babba, de la Faculté de Pharmacie de Monastir en Tunisie, n'est plus financé actuellement. Néanmoins, la collaboration de longue date que le

Laboratoire entretient avec cette équipe se poursuit, en particulier avec l'encadrement de deux thèses en co-tutelle (l'une par le Dr Pratlong, CNR-L, à Montpellier, l'autre par le Dr Depaquit, Centre collaborateur du CNR, à Reims). Ces deux thèses portent sur les aspects épidémiologiques et noso-géographiques des leishmanioses au Maghreb.

Plusieurs articles ont été publiés en collaboration avec ces deux équipes en 2012 :

- Haouas N, Chaker E, Chargui N, Gorcii M, Belhadj S, Kallel K, Aoun K, Akrouit FM, Ben Said M, Pratlong F, Dedet JP, Mezhoud H, Lami P, Zribi M, Azaiez R, Babba H. Geographical distribution updating of Tunisian leishmaniasis foci: about the isoenzymatic analysis of 694 strains. *Acta Trop*. 2012 Dec;124(3):221-8.
- Jaouadi K, Depaquit J, Haouas N, Chaara D, Gorcii M, Chargui N, Dedet JP, Pratlong F, Boubabous R, Babba H. Twenty-four new human cases of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania killicki* in Metlaoui, southwestern Tunisia: probable role of *Phlebotomus sergenti* in the transmission. *Acta Trop*. 2012;122(3):276-83.
- Chargui N, Haouas N, Jaouadi K, Gorcii M, Pratlong F, Dedet JP, Mezhoud H, Babba H. Usefulness of a PCR-based method in the detection and species identification of *Leishmania* from clinical samples. *Pathol Biol (Paris)*. 2012; 60(6):e75-9.

6.1.4. Projet européen FP7 "EDENext" (Biology and control of vector-borne infections in Europe)

Le Laboratoire Coordonnateur est partenaire dans un projet européen qui a débuté en 2011 pour 4 ans, et dont les thèmes entrent parfaitement dans la mission de surveillance du CNR-L; ils répondent en effet à plusieurs des recommandations spécifiques faites par le Comité des CNR pour le CNR-L : suivi de l'évolution des zones d'endémie dans le monde, et contribution aux systèmes de surveillance internationaux, en particulier européen. Le projet EDENext (*Biology and control of vector-borne infections in Europe*), financé dans le cadre du programme européen FP7, regroupe un consortium de 42 partenaires de 22 pays européens et pays associés. Ses objectifs sont de comprendre les processus biologiques et éco-épidémiologiques menant à l'établissement, au maintien et à l'extension des maladies transmises par vecteurs, dont les leishmanioses; à moyen terme, il vise à mettre en place de meilleurs outils de surveillance et de prévention de ces maladies. Les risques d'épidémies seront particulièrement étudiés. L'étude des taux d'infection chez les vecteurs et les réservoirs permettra de mettre à jour les cartes de risques des leishmanioses en Europe.

Le Laboratoire est impliqué dans le sous-programme PhBD (*Phlebotomus-Borne Diseases*) par l'une des équipes de recherche qui y sont rattachées (Dr C. Ravel, équipe GeneSys, dir. A.L. Banuls, UMR "MiVEGEC" 5290 CNRS /224 IRD /UM1). Son rôle spécifique est d'étudier la diversité génétique des souches de *Leishmania* transmises dans les foyers étudiés en France et au Maroc. L'un des Laboratoires Collaborateurs (USC VECPAR, JE 2533, J. Depaquit, Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Reims) est également largement impliqué dans ce sous-programme.

6.1.5. Projet européen LeishMan « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation ».

Un groupe de travail destiné à harmoniser les pratiques de prise en charge thérapeutique des patients atteints de leishmaniose s'est réuni pour la première fois en janvier 2010 à Bâle et plusieurs fois depuis, avec la participation d'un membre du CNR-L (C. Ravel). Ce groupe rassemble des biologistes et cliniciens de plusieurs pays Européens (UK, Suisse, France, Espagne, Allemagne, Pays Bas, Belgique, Portugal).

Le Dr C. Ravel contribue en particulier à ce projet (i) en étant responsable de la partie typage moléculaire; (ii) en mettant à disposition de toutes les équipes des échantillons d'ADN de toutes les espèces de *Leishmania*, avec l'objectif d'harmoniser les techniques d'identification moléculaires des parasites, étape clé dans la prise en charge thérapeutique. Des analyses

comparatives ont été faites entre différents systèmes de typage pour déterminer leur résolutivité et leur valeur pratique.

6.1.6. Travaux de recherche en santé humaine avec les Centres Collaborateurs de Marseille et Nice

Plusieurs études sont en cours avec le Centre Collaborateur du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Marseille (Pr. R. PIARROUX) qui porte actuellement 2 projets en collaboration :

- 1- Identification de souches de *Leishmania* par spectrométrie de masse (cf. Projets 8.1.3).
- 2- Etude de la chimiorésistance des *Leishmania* provenant d'isolats des rives de la Méditerranée

Cette collaboration déjà bien engagée en 2011 avec cession de 142 souches de notre collection, s'est poursuivie avec cession de 71 nouvelles souches en 2012 permettant de réaliser ces travaux de recherche qui se poursuivent en 2013.

Par ailleurs, une collaboration avec le Centre Collaborateur du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nice (Pr. P. MARTY) porte sur la caractérisation par microsatellites de souches de *Leishmania* des foyers du Sud de la France.

La collaboration sur ce thème a donné lieu à la cession de 202 souches de notre collection du foyer des Alpes-Maritimes depuis 2009.

6.1.7. Travaux collaboratifs concernant le typage des *Leishmania*

Plusieurs collaborations menées avec des groupes français ou étrangers (Cameroun, Ecuador, Grèce, Mali, Palestine, Sri Lanka, Thaïlande) ont donné lieu à publication en 2012 (cf. Liste des Publications), témoignant du rayonnement international du CNR-L.

6.1.8. Programme de collaboration avec l'université de Kohat (Pakistan)

La collaboration initiée en 2011 avec le Dr vétérinaire M. Hussain, enseignant-chercheur au Département de Microbiologie de l'université de Kohat (Kohat, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan) dans le cadre d'un programme conjoint de bourse franco-pakistanaise (Ambassade de France au Pakistan) et à la suite d'une demande d'appui scientifique et technique de l'université de Kohat, s'est poursuivi en 2012 avec le CNR-L et le Dr vétérinaire M. Kasbari de l'ANSES, Laboratoire de Santé animale.

Ces travaux ont permis 1) de mettre en évidence l'extension rapide de foyers de leishmaniose cutanée de manière transfrontalière (de l'Afghanistan vers le Pakistan) suite au déplacement massif de population des zones de conflits vers les camps de réfugiés de la province du KPK au Pakistan; ils montrent que la maladie gagne dorénavant les villages autochtones périphériques aux camps de réfugiés; 2) de montrer par typage moléculaire l'implication de l'espèce *Leishmania tropica* (97%), et plus rarement de *Leishmania major* (3%).

Ces études feront l'objet d'une publication et d'une communication orale au congrès WorldLeish 5 en 2013 et seront poursuivies en 2013 dans le cadre d'un post-doctorat visant à identifier les réservoirs et les vecteurs impliqués localement afin d'aider à la mise en place d'un programme de lutte intégré contre la maladie dans cette région reculée du Pakistan.

6.1.9. Autres travaux collaboratifs en recherche

La collaboration avec l'**UMR 5086 CNRS-Université Lyon 1** (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Pr. Sylvie Ricard-Blum) s'est poursuivie en 2012; le projet porte sur la physiopathologie des leishmanioses, plus précisément sur les interactions entre le parasite et la matrice extra-cellulaire. Cette collaboration déjà bien engagée depuis 2009 (cession de 21 souches en 2009, 23 en 2010, 2 en 2011) s'est poursuivie avec la cession de 6 nouvelles souches en 2012 permettant d'accroître les investigations. Ce projet devrait donner lieu à publication.

La collaboration avec l'**Université de Lausanne (Department of Biochemistry, Pr. N. Fasel et Dr C. Ronet)**, déjà bien engagée depuis 2010 (cession de 13 en 2010, 97 en 2011) s'est poursuivie avec la cession de 16 nouvelles souches en 2012. Elle concerne la mise en évidence de virus chez les *Leishmania* du Nouveau Monde qui semblent en rapport avec une pathogénicité accrue du parasite, en particulier avec la production de métastases à distance. Un article scientifique auquel le CNR est associé a été soumis en 2012.

Une collaboration s'est mise en place en 2011 **avec le N.I.H.** aux Etats-Unis, pour un programme de séquençage "à haut débit" de nombreux isolats de toutes les espèces de *Leishmania*. L'investigateur principal est le Pr. Stephen Beverley (Dept. of Molecular Microbiology, Center for Infectious Disease Research, Washington University School of Medicine, St-Louis, USA).

6.2. Liste des publications

6.2.1. Publications nationales

Chargui N, Haouas N, Jaouadi K, Gorcii M, Pratlong F, Dedet JP, Mezhoud H, Babba H. Usefulness of a PCR-based method in the detection and species identification of *Leishmania* from clinical samples. *Pathol Biol (Paris)* 2012 ;60(6):e75-9.

Couppié P. What's new in clinical dermatology?]. *Ann Dermatol Venereol*. 2011 Dec;138 Suppl 4:S223-32.

Couppié P. Thérapeutique dermatologique. Chapitre : Leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses. Ouvrage Fondation René Touraine. Masson Eds. 2012.

6.2.2. Publications internationales

Aït-Oudhia K, Gazanion E, Sereno D, Oury B, Dedet JP, Pratlong F, Lachaud L. In vitro susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. *Vet Parasitol*. 2012 Jul 6;187(3-4):386-93.

Azmi K, Schnur L, Schonian G, Nasereddin A, Pratlong F, El Baidouri F, Ravel C, Dedet JP, Erekat S, Abdeen Z. Genetic, serological and biochemical characterization of *Leishmania tropica* from foci in northern Palestine and discovery of zymodeme MON-307. *Parasit Vectors*. 2012; 5:121.

Berdjane-Brouk Z, Koné AK, Djimdé AA, Charrel RN, Ravel C, Delaunay P, del Giudice P, Diarra AZ, Doumbo S, Goita S, Thera MA, Depaquit J, Marty P, Doumbo OK, Izri A. First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia (Spelaemyia) darlingi* from cutaneous leishmaniasis foci in Mali. *PLoS One*. 2012;7(1):e28266.

- Bualert L, Charungkiattikul W, Thongsuksai P, Mungthin M, Siripattanapipong S, Khositnithikul R, Naaglor T, Ravel C, El Baidouri F, Leelayoova S. Autochthonous disseminated dermal and visceral leishmaniasis in an AIDS patient, southern Thailand, caused by *Leishmania siamensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86(5):821-4.
- Christodoulou V, Antoniou M, Ntais P, Messaritakis I, Ivovic V, Dedet JP, Pratlong F, Dvorak V, Tselentis Y. Re-emergence of visceral and cutaneous leishmaniasis in the Greek Island of Crete. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012 Mar;12(3):214-22.
- Cojean S, Houzé S, Haouchine D, Huteau F, Lariven S, Hubert V, Michard F, Bories C, Pratlong F, Le Bras J, Loiseau PM, Matheron S. *Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(4):704-6.
- Gouzelou E, Haralambous C, Amro A, Mentis A, Pratlong F, Dedet JP, Votycka J, Volf P, Toz SO, Kuhls K, Schönian G, Soteriadou K. Multilocus microsatellite typing (MLMT) of strains from Turkey and Cyprus reveals a novel monophyletic *L. donovani sensu lato* group. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(2):e1507.
- Haouas N, Chaker E, Chargui N, Gorcii M, Belhadj S, Kallel K, Aoun K, Akrouit FM, Ben Said M, Pratlong F, Dedet JP, Mezhoud H, Lami P, Zribi M, Azaiez R, Babba H. Geographical distribution updating of Tunisian leishmaniasis foci: about the isoenzymatic analysis of 694 strains. *Acta Trop.* 2012;124(3):221-8.
- Jaouadi K, Depaquit J, Haouas N, Chaara D, Gorcii M, Chargui N, Dedet JP, Pratlong F, Boubabous R, Babba H. Twenty-four new human cases of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania killicki* in Metlaoui, southwestern Tunisia: probable role of *Phlebotomus sergenti* in the transmission. *Acta Trop.* 2012 Jun;122(3):276-83.
- Kasbari M, Ravel C, Harold N, Pesson B, Schaffner F, Depaquit J. Possibility of leishmaniasis transmission in Jura, France. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(6):1030.
- Libert C, Ravel C, Pratlong F, Lami P, Dereure J, Keck N. *Leishmania infantum* infection in two captive barbary lions (*Panthera leo leo*). *J Zoo Wildl Med.* 2012;43(3):685-8.
- Mansouri R, Pratlong F, Bachi F, Hamrioui B, Dedet JP. The first isoenzymatic characterizations of the *Leishmania* strains responsible for cutaneous leishmaniasis in the area of Annaba (eastern Algeria). *Open Conf. Proc. J*, 2012, 3 (suppl 2-M2) 6-11.
- Ngouateu OB, Kollo P, Ravel C, Dereure J, Kamtchouing P, Same-Ekobo A, von Stebut E, Maurer M, Dondji B. Clinical features and epidemiology of cutaneous leishmaniasis and *Leishmania major*/HIV co-infection in Cameroon: results of a large cross-sectional study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106(3):137-42.
- Pratlong F, Lami P, Ravel C, Balard Y, Dereure J, Serres G, Baidouri FE, Dedet JP. Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. *Parasitology* 2012, 12:1-12.
- Ranasinghe S, Zhang WW, Wickremasinghe R, Abeygunasekera P, Chandrasekharan V, Athauda S, Mendis S, Hulangamuwa S, Matlashewski G, Pratlong F. *Leishmania donovani* zymodeme MON-37 isolated from an autochthonous visceral leishmaniasis patient in Sri Lanka. *Pathog Glob Health.* 2012; 106(7):421-4.
- Vase MØ, Hellberg YK, Larsen CS, Petersen E, Schaumburg H, Bendix K, Ravel C, Bastien P, Christensen M, d'Amore F. Development of splenic marginal zone lymphoma in a HIV-negative patient with visceral leishmaniasis. *Acta Haematol.* 2012;128(1):20-2.
- Zapata S, Mejía L, Le Pont F, León R, Pesson B, Ravel C, Bichaud L, Charrel R, Cruaud C, Trueba G, Depaquit J. A study of a population of *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador. *Parasit Vectors.* 2012;5:144.

6.2.3. Communications à congrès nationaux

El Baidouri F., Morelle C., Marty P., Ravel C. Structure génétique et évolution du genre *Leishmania* : validité de l'approche MLSA (Comm. orale). Société Française de Parasitologie, Rennes, 9-11 mai 2012.

Bourgeois N., Touzet O., Sterkers Y., Lachaud L., Pagès M., Bastien P. Aneuploïdie mosaïque et adaptation chez *Leishmania* (Comm. orale). Société Française de Parasitologie, Rennes, 9-11 mai 2012.

Morelle C., Ceballos P., Amigues L., Fegueux N., Bastien P., Sterkers Y. Leishmaniose viscérale après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (Comm. affichée). Société Française de Parasitologie, Rennes, 9-11 mai 2012.

Morelle C., Portales P., Crobu L., Bastien P., Pagès M. Identification et caractérisation de nucléoporines chez *Leishmania major* (Comm. orale). Société Française de Parasitologie, Rennes, 9-11 Mai 2012.

Couppié P., Sainte Marie D, Dufour J. Leishmaniose cutanée – infection à *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli) : rappels et actualités 2012. Journées Dermatologiques, 2012, Paris.

6.2.4. Communications à congrès internationaux

Beverley S.M., Lye L.F., Owens K., Hickerson S.M., Kuhlmann F.M., Acino E., Dobson D.E., Akopyants N., Pratlong F., Bastien P., Ronet C., Zangger H., Fasel N. Genomic studies of *Leishmania* and RNA Viruses in South America. British Society for Parasitology, 2-3 Avril 2012, Glasgow, Royaume-Uni

Beverley S.M. and the Trypanosomatid Genome Sequencing Consortium. Genomic studies of *Leishmania* focusing on virulence and RNA interference. *Infectious Disease Genomics and Global Health*. Cold Spring Harbor Asia, Suzhou, China, 7-11 Mai 2012

Samanta K., Kebe N.M, Apicella V., Lisowski V., Kajava A., Payrot N., Pagès M., Martinez J., Bastien P., Coux O., Hernandez J.F. HslVU, an ancestral form of the 26S proteasome as a potential target for the treatment of parasitoses due to protozoa (*Leishmania*, *Trypanosoma*) (Comm. affichée). 32nd European Peptide Symposium, Athènes, 2-7 Sept. 2012.

7. PROGRAMME D'ACTIVITE 2012-2013

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, le CNR-L s'efforcera d'améliorer ses performances et d'accroître ses activités, comme il l'a fait depuis sa création.

7.1. Activités d'Expertise

7.1.1. Maintien et dynamique de la Collection de souches du CNR

7.1.1.1. Enrichissement des renseignements relatifs aux souches

La richesse des renseignements relatifs à chaque souche nécessite un travail de contrôle et de synthèse pour faire apparaître certains groupes ou catégories de souches et rendre ainsi plus accessible la Collection en fonction de ce qu'on recherche.

En 2013-2014, les renseignements relatifs à chaque souche continueront à être revus de façon à préciser un certain nombre de points : souches issues d'un même patient, souches reçues plusieurs fois, souches issues d'expérimentations, clones et sous-clones etc... Par ailleurs, le travail d'inclusion de renseignements complémentaires utiles aux équipes de recherche sera poursuivi (cf. 2.2.8), en particulier avec le rajout d'éventuelles références bibliographiques concernant telle ou telle souche.

7.1.1.2. Enrichissement du catalogue de souches en ligne

Le travail d'incrémentation de souches dans le catalogue en ligne (cf. 2.1.2.3), qui nécessite un contrôle minutieux de tous les renseignements accompagnant les souches, sera poursuivi en 2013 et 2014.

7.1.1.3. Projet d'évolution du logiciel et de la base de données du CNR

Le laboratoire achèvera de mettre en place en 2013 le projet commun de base de données, BRC-LIMS, initié dans la cadre du réseau national des CRB micro-organismes (FBRCMi). La gestion de la Collection sera alors entièrement assurée par BRC-LIMS qui remplacera l'ancien logiciel de gestion des souches.

7.1.2. Participation à l'évaluation et à l'amélioration du diagnostic moléculaire des leishmanioses

La mise en place d'un Contrôle de Qualité inter-laboratoires (CIL) pour le diagnostic PCR des Leishmanioses, devrait se poursuivre en 2013, les Laboratoires participants ayant montré leur intérêt pour cette initiative.

7.1.3. Participation au développement et à l'évaluation des techniques d'identification (CNR de Montpellier, CC de Marseille)

7.1.3.1. Développement de l'identification moléculaire (Montpellier)

Ces dernières années un travail systématique d'analyse par MLST (MultiLocus Sequence Typing) de toutes les espèces de *Leishmania* a été engagé dans le Laboratoire. Cette méthodologie s'avère très résolutive.

Elle doit contribuer aux projets du groupe de travail européen LeishMan « *Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation* », destiné à harmoniser les pratiques de prise en charge thérapeutique des patients atteints de leishmaniose, et dans lequel le Laboratoire Coordonnateur est impliqué.

Parallèlement, le Laboratoire proposera, en s'appuyant sur les analyses bioinformatiques des données MLST déjà produites, de choisir un locus génomique ayant une efficacité maximale pour l'identification spécifique et utilisable en pratique quotidienne par d'autres laboratoires.

En parallèle, il sera important de poursuivre la constitution d'une base de données MLST appliquée à toutes les souches de la Cryobanque de Montpellier. Des données sont actuellement disponibles pour environ 400 souches sur les 6000 cryoconservées.

7.1.3.2. Application de la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) à l'identification et à la caractérisation des isolats de *Leishmania* (CC de Marseille)

Ce projet a été entrepris par le **Centre Collaborateur de Marseille (Pr. R. Piarroux)**, en collaboration avec le LPMM à Montpellier.

Une nouvelle approche de typage, basée sur l'analyse de spectres de masse obtenus par la technique de Maldi-Tof (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight) est en cours de mise au point dans ce CC. Les premiers résultats sont très encourageants et montrent que cette technique permettra à terme de faire une pré-identification de l'espèce dans un délai extrêmement court à partir de parasites en culture. Un nombre important de souches formellement identifiées par le CNR-L et couvrant diverses espèces différentes de Leishmanies a été envoyé pour la mise au point d'une technique d'obtention d'empreintes et pour la création d'une banque d'empreinte de référence. Cette banque d'empreintes permet l'identification et le typage de nouvelles souches isolées de prélèvements humains. L'application de cette technique aux souches de *Leishmania* devrait indubitablement réduire les délais d'identification et de typage par rapport aux autres techniques utilisées à l'heure actuelle comme l'analyse iso-enzymatique, l'identification moléculaire ou le MLST.

7.2. Contribution à la surveillance des leishmanioses

7.2.1. Surveillance des leishmanioses humaines

7.2.1.1. En France métropolitaine (Montpellier)

Le Laboratoire coordonnateur à Montpellier continuera à assurer le **recensement des cas de leishmanioses diagnostiqués sur le territoire métropolitain**, qu'ils soient autochtones ou importés. Dans le département de la Guyane, le Laboratoire-Associé "Guyane" du **Centre Hospitalier de Cayenne** (Pr. B. Carme) centralisera les déclarations de cas pour la Guyane qui continueront à être transmises au CNR des *Leishmania* (cf. § 8.2.2.)

Les statistiques seront mises sur le site internet du CNRL, et annuellement mises à jour. Un **retour d'information** sera fait auprès des Laboratoires et Services ayant déclaré des cas durant l'année écoulée.

Notre laboratoire continuera à **participer au Réseau sur la surveillance de la co-infection leishmaniose/SIDA** mis en place par l'Organisation Mondiale de la Santé, et au registre des cas de co-infection dans le sud de l'Europe.

Dans les années à venir, nous poursuivrons notre effort **d'amélioration de l'exhaustivité des déclarations de cas**. A cet effet, nous intensifierons les contacts avec les déclarants réguliers et nous entrerons en contact avec les hôpitaux des structures des zones endémiques qui ne nous déclarent pas de cas.

Le système envisagé prévoit dans sa structuration des relances périodiques par voie de mail ou courrier (voire d'appels téléphoniques pour mieux renseigner certaines questions spécifiques). Ces envois ainsi que leurs réponses sont tracées. Une adresse mail sera mise à la disposition de tous les laboratoires (à partir du site Internet du Laboratoire) pour toutes questions relatives à la déclaration des cas, permettant ainsi une réponse rapide; l'ensemble des mails sera tracé et conservé par le Laboratoire Coordonnateur.

Enfin, un travail rétrospectif des données nationales du PMSI qui recueille tous les séjours hospitaliers publics ou privés sera réalisé avec l'aide du Département d'Informatique Médicale du CHRU de Montpellier, portant sur la période 2003-2012. L'**exhaustivité** de la surveillance sera estimée en réalisant la comparaison des résultats des déclarations de cas faites au CNR-L avec la base de données

En ce qui concerne les cas de leishmanioses à *L. guyanensis* du personnel des Armées, le CNR s'efforce d'intensifier sa collaboration avec les **Services de Santé des Armées** afin d'obtenir des données épidémiologiques, cliniques et de suivi thérapeutique plus complètes et ainsi d'établir des protocoles de prévention et de prise en charge (contact avec le Dr Thierry Boyé, dermatologue, HIA Sainte Anne de Toulon).

Ces différentes actions permettront de mettre en place un véritable **réseau d'épidémiologie et de surveillance des leishmanioses** en France.

7.2.1.2. En Guyane Française (L-A de Cayenne)

a) Amélioration de l'exhaustivité de la surveillance

Un effort d'organisation et de motivation des différents partenaires sera mené afin de mieux connaître le véritable niveau d'endémie. Y a-t-il sous-estimation des cas et si oui dans quelle proportion ? Ces dernières années, l'incidence (difficilement) évaluée est nettement inférieure aux estimations anciennes.

Les difficultés à résoudre sont connues et demandent :

- Motivation des acteurs et bonne mise en application des instructions fournies aux personnels soignants des Postes et Centres de Santé avec l'objectif de réduire les difficultés comme celles liées au « turn over » élevé du personnel, à une orientation et une sensibilité plus diagnostic individuel que santé publique.
- Connaissance et prise en compte d'événements extérieurs source de biais : fermeture d'un centre de santé pour des raisons de sécurité, variation du nombre de consultants selon les opérations de lutte contre l'orpaillage, etc ...
- Nécessité d'unifier les relevés de cas en tendant vers l'exhaustivité Une organisation avec la CIRE Antilles-Guyane sera recherchée avec au mieux l'intégration de la leishmaniose cutanée dans les pathologies officiellement surveillées par cet organisme. Le LHUPM est déjà en relation avec cette CIRE, site Guyane / ARS Guyane, pour la transmission des données de paludisme du CH de Cayenne.

Les règles de recueil des données et les modalités de transmission au Centre Coordonnateur de Montpellier se feront selon les mêmes règles qu'actuellement.

b) Surveillance des possibles cas de leishmaniose viscérale humaine et animale

Chez l'homme :

La leishmaniose viscérale n'est pas endémique en Guyane contrairement à d'autres pays de la région (Brésil, Venezuela). Son implantation est favorisée par la forte prévalence de l'infection à VIH en Guyane mais aussi par l'importance des migrants en provenance du Brésil. Cela impose

une surveillance du fait des mouvements migratoires (homme et animaux). La recherche sera systématique par PCR en temps réel en cas de suspicion clinique, associée à la sérologie classique, avec des indications élargies chez les sujets immunodéprimés.

Chez l'animal :

Recherche et/ou identification d'espèces à la demande des services et des praticiens vétérinaires suspectant une infection à *L. infantum*, chez le chien en premier lieu.

c) Optimisation de la confirmation parasitologique, détermination des espèces et recueil des souches

Nous chercherons à obtenir une confirmation parasitologique le plus souvent possible en essayons de se rapprocher de l'exhaustivité des cas ayant abouti à une consultation en milieu médical. Pour ce faire, nous préconisons la réalisation systématique d'une mini-biopsie type "punch", associée au recueil des prélèvements de sécrétions dermiques des lésions. La biopsie permettant la mise en culture facilite d'autant l'identification de l'espèce et permet d'isoler et de conserver les souches. Dans certains cas, les techniques de PCR-RLFP pourront être réalisées à partir de la biopsie elle-même (culture négative, contaminée ou non réalisée).

Les données recueillies permettront entre autres de surveiller l'émergence de *L. braziliensis* dans ce département.

d) Etudes épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques

Le dernier objectif est d'actualiser les données de nature épidémiologique (en particulier l'influence des paramètres climatiques) mais aussi relatives aux présentations cliniques et aux aspects thérapeutiques.

Il implique la participation du service de Dermatologie avec lequel nous avons une étroite et ancienne collaboration (Pr. Pierre Couppié) et avec l'aide méthodologique apportée par le CIC-EC (Pr. Mathieu Nacher).

Il s'agit de :

- parfaire nos connaissances concernant la leishmaniose à *L. guyanensis*.
- préciser les aspects particuliers des atteintes dues aux autres espèces, tout particulièrement *L. braziliensis*.
- décrire les spécificités en cas de déficit immunitaire (infection rétrovirale VIH, HTLV1).

7.2.2. Collaboration avec les structures en santé animale pour la surveillance de la leishmaniose animale

Les projets de collaboration dans ce domaine concernent surtout le **Centre collaborateur situé à l'ANSES (Dr M. Kasbari) et l'Unité de recherche Vecpar de l'Université de Reims (Pr. J. Depaquit)**. Ils seront poursuivis selon principalement trois axes :

- 1) l'étude de la dynamique des foyers d'extension possible (dits "ectopiques") de leishmaniose canine dans différents départements considérés comme non endémiques (cf. 3.1.4)
- 2) les enquêtes entomologiques en zone de non endémie, notamment au nord de la Loire, afin de compléter progressivement la carte de distribution des phlébotomes en France en collaboration étroite avec l'UMR Vecpar.
- 3) la surveillance des nouvelles espèces émergentes de leishmanies (ex : *L. siamensis*), de leur propagation, ainsi que la veille relative aux réservoirs animaux (domestiques et sauvages).

7.3. Conseil, Information, Formation

Le CNR-L contribuera à la mise à jour annuelle des **recommandations aux voyageurs** par l'InVS, d'une part par des données actualisées sur les leishmanioses importées et d'autre part le suivi des zones d'endémie dans le monde. Les données concerneront surtout le Maghreb et la Guyane Française.

Il nous semble aussi intéressant de développer une politique d'information pour les personnes se rendant au Maghreb pour une longue durée (1 à 2 mois) durant la saison de transmission de *Leishmania major* afin d'éviter une recrudescence de cas de leishmaniose cutanée à *L. major* importées du Maghreb (cf. Alerte 2009-2010). Ceci se fera en collaboration avec la CIRE Languedoc-Roussillon.

7.4. Recherche en lien direct avec l'activité du CNR

Les projets de recherche en cours seront développés particulièrement dans leur interface avec le CNR-L, à la fois dans et entre le Laboratoire Coordonnateur, le Laboratoire-Associé et les Centres Collaborateurs.

7.4.1. Projet européen EDENext

Le projet EDENext (*Biology and control of vector-borne infections in Europe*), financé dans le cadre du programme européen FP7, s'efforce de comprendre les processus biologiques et éco-épidémiologiques menant à l'établissement, au maintien et à l'extension des maladies transmises par vecteurs, dont les leishmanioses; à moyen terme, il vise à mettre en place de meilleurs outils de surveillance et de prévention de ces maladies. Le CNR continuera de s'impliquer dans le sous-programme PhBD (*Plebotomus-Borne Diseases*) par l'une des équipes de recherche qui y sont rattachées (Dr C. Ravel, équipe GeneSys, dir. A.L. Banuls, UMR "MiVEGEC" 5290 CNRS /224 IRD /UM1). Son rôle spécifique est d'étudier la diversité génétique des souches de *Leishmania* transmises dans les foyers étudiés en France et au Maroc

7.4.2. Projet européen LeishMan « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation ».

Ce projet se poursuit dans les années à venir et le Dr C. Ravel y est responsable de la partie typage moléculaire, avec l'objectif d'harmoniser les techniques d'identification moléculaires des parasites, étape clé dans la prise en charge thérapeutique. Des guidelines pour l'identification moléculaire des espèces devraient être publiées en 2013 par le groupe de travail.

7.4.3. Recherche en santé humaine en collaboration avec les Centres Collaborateurs du CNR

Le **Centre Collaborateur de Marseille**, outre l'identification des espèces de *Leishmania* par spectrométrie de masse (cf. § 8.1.3), poursuit deux projets de recherche en collaboration avec le CNR-L :

- **Etude des chimio-résistances de *Leishmania infantum* (Dr Ch. Mary)**
- **Epidémiologie et géographie de la leishmaniose viscérale autochtone** dans les deux régions les plus touchées par cette maladie en France (PACA, puis Languedoc-Roussillon) (**Pr. R. Piarroux**). Le CC de Marseille utilise de manière systématique les Systèmes d'Informations Géographiques associés aux logiciels de modélisation afin de représenter et d'analyser l'épidémiologie de la leishmaniose autochtone. Ce travail, particulièrement nécessaire dans le contexte actuel d'extension du territoire touché par la maladie, porte sur la région Provence-Alpes Côte d'Azur et notamment sur le foyer provençal; il sera généralisé à tout le pourtour

méditerranéen français. Il permettra d'évaluer l'impact des mesures de lutte comme celles ciblant le réservoir canin, ce qui est particulièrement important dans le contexte actuel de diffusion de colliers à la deltaméthrine et d'arrivée sur le marché d'un vaccin anti-leishmanien destiné à ce réservoir domestique.

La collaboration avec le **Centre Collaborateur de Nice** sur le typage des souches par microsatellites va se poursuivre avec la cession d'au moins 70 nouvelles souches en 2013, permettant de réaliser ces travaux sur d'autres foyers de leishmaniose du Sud de la France : Provence, Cévennes, Pyrénées Orientales.

7.4.4. Recherche en collaboration avec les structures travaillant en santé animale et en entomologie médicale

7.4.4.1. Evaluation de l'exposition des populations humaines et animales aux phlébotomes vecteurs, en zone et hors-zone d'endémie en France

Le projet "**PhlebExpo**" est un projet de recherche regroupant le LSA de l'**ANSES de Maisons-Alfort (Dr M. Kasbari)**, le CNR des Leishmanioses et l'Unité de recherche Vecpar (Univ. Reims) et financé par l'ANSES (appel d'offres Environnement-Santé-Travail, 2012-2015). Son objectif général est d'évaluer le niveau d'exposition réelle, sur le terrain, des populations humaine et animale aux piqûres de phlébotomes en zone d'endémie de leishmaniose, mais également hors zone d'endémie, et ce, à l'aide de tests ELISA et Western blot à développer, basés sur les antigènes salivaires de phlébotomes, et capable de détecter chez l'homme et le chien, les anticorps anti-salive du vecteur, biomarqueurs reconnus d'exposition aux piqûres.

En 2012, le projet est rentré dans sa première phase d'exécution avec la mise en place d'élevage de phlébotomes d'intérêt qui devra se poursuivre en 2013, afin d'obtenir une quantité de phlébotomes suffisante pour permettre la production d'antigènes salivaires nécessaires au développement du kit ELISA.

Ces futures données d'exposition, corrélées aux données de séroprévalence de la leishmaniose canine et humaine ainsi qu'aux données entomologiques des piégeages, devraient permettre une meilleure évaluation du risque d'infection et une mise à jour de son inscription spatiale en France.

7.4.4.2. Surveillance de possibles foyers de leishmaniose "ectopiques" en France

Il s'agit là encore d'une collaboration avec le Laboratoire Santé Animale de l'**ANSES de Maisons-Alfort (Dr M. Kasbari)** et l'unité Vecpar (Univ. Reims).

Le foyer de leishmaniose cutané humaine autochtone rapporté dans le Jura au début de l'année 2012 et qui a fait l'objet d'une première enquête infructueuse lors de la saison estivale 2012, fera l'objet d'une seconde enquête entomologique durant l'été 2013 afin d'objectiver la présence ou non de phlébotomes transmetteurs, notamment *P. perniciosus*. En effet, les températures ayant été défavorables au piégeage, et la présence de phlébotomes ayant néanmoins déjà été rapportée par le passé dans les départements voisins de la Côte d'or et de la Saône et Loire, il est nécessaire d'infirmer (ou de mettre en évidence) le risque de transmission autochtone dans ce département considéré jusqu'alors comme indemne.

De même, deux autres nouveaux foyers autochtones déclarés en 2012, l'un de leishmaniose canine en Bretagne et l'autre de leishmaniose humaine en Auvergne feront également l'objet d'enquêtes épidémiologiques vétérinaires et entomologiques.

7.4.4.3. Etude de réservoirs animaux non conventionnels

Suite (i) à l'apparition en Allemagne et en Suisse de cas de leishmaniose animale cutanée dus à une espèce exotique inconnue jusqu'alors (*L. siamensis*), sur des espèces animales habituellement non cibles (cheval, vache), et (ii) à l'épidémie de leishmaniose humaine en

Espagne (Madrid) concomitante à une prolifération de lapins de garenne infectés par la leishmaniose, un travail d'évaluation de l'infection chez différents réservoirs animaux non conventionnels est en cours au Center collaborateur sis à l'ANSES.

7.4.5. Autres projets de recherche en collaboration

a) En France

Plusieurs collaborations sont en cours avec **I'UMR 5290 CNRS-IRD-Université Montpellier 1** (Dr D. Fontenille) au sujet de l'épidémiologie du portage sain de la leishmaniose viscérale méditerranéenne (A.L. Banuls), de la résistance de *L. infantum* aux antimoniés (D. Sereno) et de l'identification moléculaire des *Leishmania* (C. Ravel).

La collaboration avec **I'UMR 5086 CNRS-Université Lyon 1** (Pr. Sylvie Ricard-Blum) au sujet des interactions entre le parasite et la matrice extra-cellulaire sera poursuivie en 2013.

b) A l'étranger

Les **collaborations avec la Tunisie** (Pr. H. Babba, Faculté de Pharmacie de Monastir) **et l'Algérie** (Pr. Z. Harrat, Institut Pasteur d'Algérie; Dr K. Aït-Oudhia, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger) seront poursuivies. Elles visent à étudier l'épidémiologie des leishmanioses viscérales et cutanées, et la caractérisation biochimique et moléculaire des agents pathogènes. L'extension du complexe *Leishmania killicki* dans tout le Sud du Maghreb fera l'objet de collaborations transnationales, grâce à l'installation d'un membre de l'Unité de recherche "MiVEGEC" à Casablanca (Dr D. Sereno, IRD). Les réservoirs et phlébotomes vecteurs de cette espèce seront activement recherchés.

La collaboration impliquant **I'Université de Kohat au Pakistan**, le LSA (ANSES), l'Unité VECPAR (Univ. Reims), et le CNR-L sera poursuivie. Le Dr vétérinaire M. Hussain, enseignant chercheur au Département de Microbiologie (Kohat, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan), de retour en France pour un post-doc, doit démarrer des enquêtes épidémiologiques et entomologiques visant à déterminer les réservoirs et les vecteurs de Leishmanies présents dans ce foyer mal connu. Les prélèvements collectés à partir de l'animal seront mis en culture et la souche typée au LSA de l'ANSES et par MLST et typage iso-enzymatique au CNR de Montpellier. Les phlébotomes recueillis dans la vallée de Kohat seront identifiés et analysés dans l'unité de recherche VECPAR. Cette collaboration permettra ainsi de mettre en place des outils de diagnostic de la leishmaniose animale au Pakistan, et d'évaluer l'impact de la leishmaniose en santé publique humaine et animale.

Enfin, en collaboration avec le **Sanger Centre à Cambridge** (Dr James Cotton) et l'Université de Berlin (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Dr G. Schönian), le Dr C. Ravel participe à un projet de séquençage génome entier de différentes souches de *Leishmania tropica*. Le choix des souches s'appuie sur la connaissance particulière que nous avons au CNR-L sur la diversité génétique de *L. tropica*.

7.4.6. Projets internes au CNR directement adossés à la Collection

Un vaste travail d'**identification et de taxonomie** de la majorité des espèces de *Leishmania*, basé sur la technique de MLST (C. Ravel) est en cours depuis plusieurs années au sein du Laboratoire. Plus de 200 souches représentant toutes les espèces pathogènes d'Afrique et d'Eurasie ont été analysées d'un point de vue génétique ; en collaboration avec le Laboratoire d'Informatique, de Robotique et de Microélectronique de Montpellier (LIRMM, V. Berry), une analyse bio-informatique de la congruence des groupes ainsi obtenues avec ceux définis par

l'analyse isoenzymatique a été réalisé et montre une très bonne corrélation. Une Thèse d'Université (F. El Baidouri) a été soutenue sur ce sujet en décembre 2012 et un article sur ces résultats est soumis

Le travail rétrospectif d'analyse des souches présentes dans la Collection, portant à la fois sur les aspects épidémiologiques, noso-géographiques et taxonomiques, sera poursuivi (F. Pratlong/L. Talignani).

7.5. Activités de Publication

L'effort sera poursuivi pour publier les résultats obtenus par le CNR-L. Il nous semble en effet essentiel que le CNR soit visible sur les plans national et international. Les publications scientifiques ou de vulgarisation, de même que les communications à congrès et les conférences, permettent de diffuser les acquis, les connaissances et l'expertise des membres du CNR.

* * *

Remerciements

Ce rapport a été réalisé par Patrick BASTIEN, avec l'aide indispensable de Francine PRATLONG, Laurence LACHAUD et Christophe RAVEL, ainsi que de Loïc TALIGNANI et Yves BALARD.

Je souhaite remercier l'ensemble des personnels du CNR-L pour leur travail œuvrant au développement du CNR, et en particulier F. Pratlong pour le gros travail de "curation" entrepris cette année, C. Ravel pour la mise en œuvre de la démarche Qualité, Yves Balard pour son investissement dans la mise en place du logiciel de gestion commun aux CRB-microbiologie «BRC-LIMS », L. Talignani pour son investissement dans les trois domaines sus-cités (!), P. Lami pour son expertise croissante dans l'identification isoenzymatique et L. Lachaud pour son travail de suivi épidémiologique.

Je remercie également les Centres collaborateurs et leurs responsables, autant en santé humaine (Pr Renaud Piarroux, AP-HM Marseille, Pr Pierre Marty, CHU de Nice, et Dr Pierre Buffet, Hôpital Pitié-Salpêtrière à Paris, ainsi que le Dr Gloria Morizot à l'Institut Pasteur) qu'en santé animale (Drs Mohamed Kasbari et Pascal Boireau, ANSES, Laboratoire de Santé Animale, Maisons-Alfort, Pr Gilles Bourdoiseau, ENVL, Lyon, et Pr Jérôme Depaquit, Université de Reims).

Au nom du CNR-L, je remercie également tous les Centres hospitaliers et tous les praticiens qui ont effectué des déclarations de cas, et/ou qui nous ont adressé prélèvements ou souches.

Je remercie enfin l'Institut de Veille sanitaire pour son appui efficace aux actions du CNR.



Liste des Tableaux et des figures contenus dans ce document

Tableau I.- Origine, selon le centre de soins, des 131 souches de *Leishmania* traitées par le CNRL en 2012

Tableau II.- Origine géographique, par pays d'isolement, des 131 souches traitées par le CNRL en 2012

Tableau III.- Détails des identifications enzymatiques de 70 souches réalisées en 2012.

Tableau IV.- Evolution de la proportion des différentes espèces identifiées en Guyane Française de 2006 à 2012

Tableau V. Lieux de contamination pour l'ensemble des cas de leishmanioses recensées en 2012.

Tableau VI.- Cas de leishmaniose cutanée contractés en Guyane en 2012, en fonction de la source de déclaration.

Tableau VII.- Liste des stagiaires reçus au CNR-L en 2012.

Figure 1. Organigramme du Laboratoire Coordonnateur du Centre National de Référence des *Leishmania*

Figure 2. Répartition des différentes espèces identifiées par biologie moléculaire au LA de Cayenne (LHUPM).