

# **ANNEXES**

**au rapport annuel d'activité**

**2013**

**Centre de national de  
référence des  
Leishmanioses**

**Année d'exercice  
2012**

# 1. MISSION ET ORGANISATION DU CNR

## 1.1. Rappel des missions et objectifs du CNR

Cf. ANNEXES Le Centre National de Référence des Leishmanioses (CNR-L) a été créé en mars 1998 (arrêté du 17 mars 1998). Il a été renouvelé en 2002, en 2006, et au 1<sup>er</sup> janvier 2012.

Depuis sa création, il développe les différentes missions imparties aux CNR : expertise, surveillance, alerte et conseil. Dans ce cadre, il effectue depuis sa création :

- la collecte et la conservation de souches de *Leishmania* et leur identification biochimique et moléculaire,
- l'expertise en matière de diagnostic et d'identification de souches pour de nombreux centres de santé ou laboratoires sur le territoire national,
- la surveillance des différentes formes de leishmanioses humaines, avec un registre des cas autochtones et importés en France métropolitaine, ainsi qu'en Guyane française, avec l'aide du C.H. de Cayenne (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Pr B. Carne), et du Service de Santé des Armées,
- l'alerte, le conseil et la formation dans le domaine de cette pathologie.

Par ailleurs, le CNR des Leishmanioses collabore activement avec des structures de santé animale afin de mieux décrire, surveiller et circonscrire les nombreux foyers de leishmaniose canine présents en France.

## 1.2. Organisation actuelle du CNR (depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2012)

Le CNR-L est dirigé depuis 2010 par le Pr. Patrick Bastien au **Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (CHRU / UFR Médecine) de Montpellier (LPMM)**.

Le **Laboratoire H-U de Parasitologie-Mycologie (LHUPM) du CH de Cayenne** (Pr Bernard Carne) est devenu Laboratoire-Associé au 1<sup>er</sup> janvier 2012. Il a été "Centre collaborateur" du CNR-L pendant le dernier quinquennal (2006-2011). Le LHUPM de Cayenne a une longue expérience de recherche en matière de diagnostic et d'épidémiologie des leishmanioses sud-américaines : niveau d'endémie, facteurs d'exposition, facteurs de risque d'origine environnementale et selon les particularités des souches parasitaires incriminées. Il est également compétent en matière de culture, de cryoconservation et de typage de souches.

**Trois Laboratoires hospitaliers français reconnus pour leurs compétences en matière de leishmanioses** depuis de nombreuses années (comme en attestent leurs publications) sont devenus **Centres collaborateurs pour ce qui concerne la santé humaine** au 1<sup>er</sup> janvier 2012 : (i) le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du l'AP-HP de Marseille (Pr Renaud Piarroux) est en train de développer un projet sur l'étude des chimiorésistances de *Leishmania infantum*, ainsi que sur le typage par spectrométrie de masse; (ii) le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nice (Pr Pierre Marty) ainsi que celui de Marseille collaborent avec le CNR dans le domaine de l'épidémiologie des leishmanioses humaines; (iii) enfin, le Dr Pierre Buffet (AP-HP, Pitié-Salpêtrière) continuera à collaborer avec le CNR sur le conseil thérapeutique destiné aux médecins; le CNR souhaite aussi développer une collaboration à la base de données clinico-épidémiologiques qu'il a constituée depuis des années et qu'il étend au niveau européen.

Par ailleurs, **trois structures expertes en santé animale** poursuivent leur collaboration avec le CNR en vue d'une meilleure concertation des systèmes de surveillance et de contrôle des leishmanioses humaines et animales (surtout canine sur le territoire métropolitain): (i) le Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses, ANSES (Drs. Mohamed Kasbari et P. Boireau); (ii) le Laboratoire de Parasitologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (Pr. G. Bourdoiseau); (iii) l'Unité sous Contrat de l'ANSES "VECPAR" ("Transmission

vectorielle et épidémiosurveillance des maladies parasitaires"), également JE 2533, du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Reims (Pr. J. Depaquit). Ces trois laboratoires présentent une expertise complémentaire, le premier concernant l'épidémiologie et la surveillance de la leishmaniose canine, le second concernant le contrôle de la maladie, à la fois sur le plan vaccinal et sur le plan de la lutte médicamenteuse, et le troisième sur les aspects vectoriels (Phlébotome).

### 1.3. Description de l'équipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés

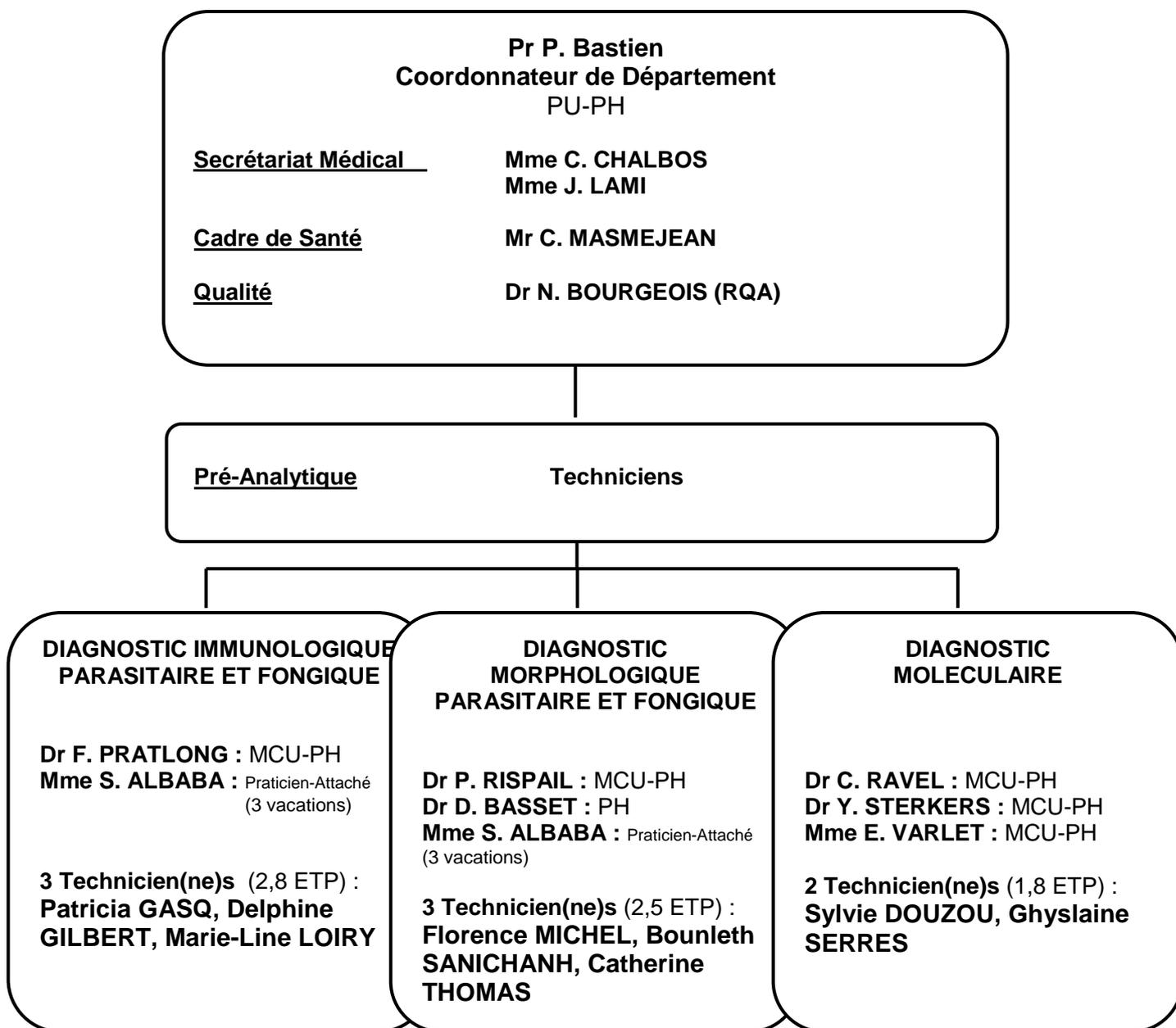
#### 1.3.1. Montpellier

Les personnels scientifiques et techniques du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Montpellier et de la Faculté de Médecine (Université Montpellier 1), qui sont, pour partie de leur temps, impliqués dans les activités et le fonctionnement du CNR-L, sont listés dans le tableau ci-dessous. Leurs tâches respectives au sein du Laboratoire figurent sur l'organigramme fonctionnel présenté en page suivante.

Noms et Prénoms	Qualifications	ETP	Appartenance administrative (pour l'activité au CNR-L)
Bastien Patrick	Médecin (PU-PH)	0,2	CHU-Univ. (50%-50%)
Bourgeois Nathalie	Médecin (PHU)	0,05	Univ. Montpellier 1
Dedet Jean-Pierre	Médecin (Professeur émérite)	0,05	Univ. Montpellier 1
Lachaud Laurence	Médecin (MCU-PH)	0,1	Univ. Montpellier 1
Pratlong Francine	Pharmacien (MCU-PH)	0,4	CHU-Univ. (50%-50%)
Ravel Christophe	Médecin (MCU-PH)	0,2	CHU-Univ. (50%-50%)
Balard Yves	Assistant-Ingénieur	0,3	Univ. Montpellier 1
Colombero Nadia	adjoint-technique	0,05	CHU Montpellier
Lami Patrick	technicien	0,5	Univ. Montpellier 1
Serres Ghislaine	technicien	0,1	CHU Montpellier
Talignani Loïc	adjoint-technique	0,5	Univ. Montpellier 1
Lami Joelle	secrétaire	0,05	CHU Montpellier

L'implication de ces personnels dans le CNR-L représente 3,6 ETP : 1 ETP pour le personnel médico-scientifique, 1,4 ETP pour le personnel technique et 0,05 ETP pour le secrétariat.

**ORGANIGRAMME FONCTIONNEL**  
du DEPARTEMENT DE PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE, MONTPELLIER



N.B. Un organigramme spécifique au CNR-L est présenté au chapitre 1.4.3.

### 1.3.2. Cayenne

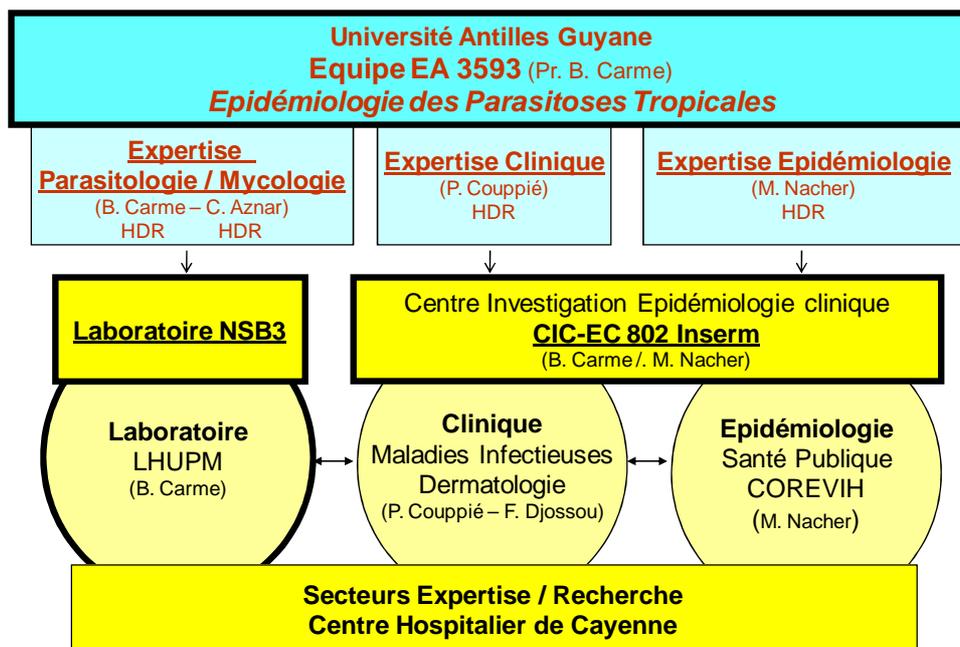
Les personnels scientifiques et techniques du LHUPM du Centre Hospitalier de Cayenne (CHAR) et de la Faculté de Médecine (Université Antilles Guyane) qui, pour partie de leur temps, sont impliqués dans les activités Leishmanioses en tant que Laboratoire Associé au CNR, sont listés dans le tableau ci-dessous. Leur implication dans ce cadre est indiquée en valeur ETP.

Nom et Prénom	Qualification	ETP	Appartenance administrative (pour l'activité au CNR-L)
Carme Bernard	Médecin (PU-PH CE2 : Parasitologie)	0,1	CH, LHUPM – UAG/ EA 3593 et CIE 802 Inserm
Couppié Pierre	Médecin (PU-PH C2 : Dermatologie)	0,1	CH, Dermato – UAG/ EA 3593
Mathieu Nacher	Médecin (PU-PH C2 : Santé Publique)	0,1	CH, Santé Publique-Épidémiologie – CIE 802 Inserm
Simon Stéphane	Technicien Supérieur	0,3	Univ. Antilles Guyane (EA 3593) et par convention CH, LHUPM
Grillon Marilyne	Technicien	0.2	CH, LHUPM

Une aide ponctuelle complémentaire pour les aspects analyse et expertise épidémiologique peut être apportée par l'équipe INSERM CIC-EC Antilles Guyane (fiche de présentation non fournie). Ces 3 structures sont dirigées par la même personne (B. Carme) facilitant d'autant les collaborations.

Le schéma suivant illustre cette organisation, source de synergie.

### Complémentarité des équipes hospitalières et universitaires



Les structures LHUPM et EpaT (EA 3593) sont détaillées dans les deux fiches ci-après.

# Présentation LHUPM du Centre Hospitalier de Cayenne



## Centre Hospitalier de Cayenne Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie et Mycologie LHUPM



**Chef de Service :** Pr. Bernard Carne [bernard.carne@wanadoo.fr](mailto:bernard.carne@wanadoo.fr)

**Contacts** [sabrina.arnaud@ch-cayenne.fr](mailto:sabrina.arnaud@ch-cayenne.fr)

- **Secrétariat :** Tél. : 0594 39 50 84 Fax : 0594 39 50 51  
- **Laboratoire :** Tél. : 0594 39 50 54

### Personnels

**Biologistes spécialistes hospitalo-universitaires :** 3

- PU-PH : 1, MCU-PH : 1, PH : 1

PU-PH = Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, MCU-PH = Maître de Conférence – Praticien Hospitalier, AHU : Assistant hospitalo-universitaire

**Surveillance :** 1+ **Techniciens :** 5 **Agent Service Hospitalier :** 1+  
\* mutualisation avec Laboratoire de Biologie Polyvalente

**Secrétaire médicale :** 1

### Heures d'ouverture

Du lundi au vendredi de 8 h 00 à 17 h 00

Samedi et jour fériés en semaine de 8 h 00 à 15 h 00

Astreintes des Biologistes : tous les jours

### Activités

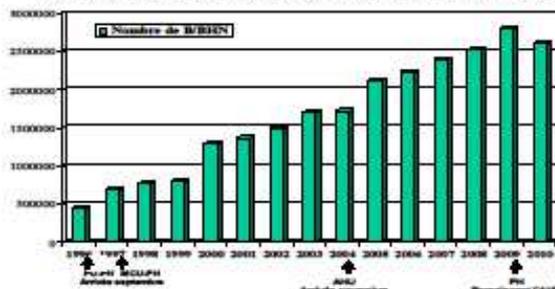
**Diagnostic des infections parasitaires et mycosiques**

#### Application

- Examens directs, après colorations, après enrichissements,
- Examen par fluorescence,
- Cultures fongiques et parasitaires,
- Sérologie et autres immuno-diagnostic parasitaires et fongiques
- Biologie moléculaire : détection d'ADN par PCR (temps réel),
- Identification ectoparasites contexte médical

**Volume d'examen :** B + BHN : 2.700.000 en 2010

Activité du Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie Mycologie



### Expertise et surveillance épidémiologique

- Surveillance, contrôle qualité diagnostic paludisme Centres de Santé (Microscopie et Test de Diagnostic Rapide - immunochromatographie)
- Relevé des cas et transferts des informations (DSDS et/ou réseaux français) pour surveillance paludisme (et dengue), leishmaniose (LC du CNR), Maladie de Chagas (convention InVS, projet CNR), Toxoplasmose congénitale (LC CNR), Cryptosporidiose,
- Mycoses exotiques, ...
- Diagnostic par télé-médecine (Centres de Santé)

### Valorisation MIGAS et MERRI

**Recherche médicale hospitalière et universitaire** issue de l'expertise et de la surveillance épidémiologique :

- Observations bio-cliniques remarquables
- Constitution de bases de données et de collections biologiques
- Améliorations des techniques de diagnostic et d'identification
- Association étroite avec Equipes de recherche (cf. colonne de droite)

### Valorisation MERRI



### Mots clés

- Diagnostic, Expertise, Epidémiologie
- Parasitoses, Mycoses
- Expertise en Paludisme, Leishmanioses, Maladies de Chagas, Toxoplasmose, Histoplasmoses et autres Mycoses Exotiques

### Equipements

- Secteur L3 (niveau haute sécurité)
- Cryoconservation Azote liquide
- Appareillage PCR temps réel
- Hottes Flux Laminaires
- Congélateur – 80°C
- Micromanipulateurs
- Automate pour sérologie
- Centrifugeuses réfrigérées
- Microscope à fluorescence

### Associations

- ° Equipe Universitaire UPRES EA 3593
- ° Service Dermato – Maladies infectieuses °
- Département Centres de Santé
- ° CIC-EC Antilles Guyane 802 Inserm

Organisation du secteur expertise, surveillance épidémiologique et recherche



### Partenariats (liste non limitative)

- CH de l'Ouest guyanais F. Joly
- Institut Pasteur Guyane
- CNR leishmaniose, Toxoplasmose, Chimiorésistance Paludisme, Mycoses
- CIRE (InVS) Antilles – Guyane
- University of Tulane (Nile Orléans)
- Réseau International Maladies Chagas (9 pays d'Amérique du Sud)

## Présentation EPaT (EA 3593) (notation AERES 2010: A)



Université Antilles Guyane – UFR Médecine  
Equipe EPaT - UPRES : EA 3593  
Epidémiologie des Parasitoses Tropicales



**Directeur:**  
Pr. Bernard Carme  
Tél. : 0594 39 53 09 Fax : 0594 28 72 63  
E mail : [carme.bernard@wsmadoo.fr](mailto:carme.bernard@wsmadoo.fr)

**Effectifs :**  
- Enseignants-chercheurs (UAG) : 4 dont 3 HDR : PU-PH : 2, MCU-PH : 1, MCF : 1  
PU-PH = Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, MCU-PH = Maître de Conférence – Praticien Hospitalier, MCF = Maître de Conférence  
- Autres Universitaires : 3  
AHU : 1 (Assistant Hospitalo-Universitaire)  
Ingénieur d'étude : 1, Technicien : 1  
Doctorants (2009 – 2010) : 4  
- Collaborateurs Hospitaliers : 6 PH (Praticien Hospitalier) 1 HDR

**Thèmes de recherche :**  
Parasitoses tropicales à transmission vectorielle ou zoonotique et/ou associées aux migrations et à la précarité  
Connaissance facteurs d'exposition, de risque et de gravité, surveillance et alerte des phénomènes épidémiques, études du retentissement clinique adaptées au contexte et aux populations locales et orientées en vue de l'amélioration des diagnostics, des thérapeutiques et de la prévention

**Paludisme**

- Incidence, facteurs d'exposition, facteurs de risques de survenue des accès palustres de nature environnementale et génétique
- Etude diversité génétique souches locales de *Plasmodium vivax*
- Modalités et efficacité diagnostiques et thérapeutiques

**Leishmanioses cutanées**

- Description actualisée et surveillance épidémiologie en Guyane
- Développement techniques de diagnostic et d'identification
- Aspects cliniques, immunologiques et thérapeutiques
- Pharmacopée traditionnelle

**Toxoplasme**

- Description du cycle sauvage néotropical et du cycle domestique
- Caractérisation génomique et virulence des souches impliquées
- Etude des traductions cliniques

**Réduves et Maladie de Chagas**

- Inventaire, biotopes et taux d'infection des vecteurs (réduves) et du réservoir de parasite animal
- Amélioration des techniques de diagnostic et évaluation du niveau d'endémicité chez l'homme

**Histoplasme et contexte épidémiologique des infections à VIH**

- Facteurs d'exposition, et de risque de survenue des H disséminées
- Amélioration diagnostique par PCR
- Conséquences infectieuses Syndrome Restitution Immunitaire

Facteurs exposition, risque dépistage tardif et mauvais suivi VIH+

**Publications Période 2005 – 2010 (au 15 avril 2010)**  
91 articles dans revues avec Comité Lecture (limités à ceux où le 1<sup>er</sup> et/ou 2<sup>ème</sup> et/ou dernier auteur appartient à l'Equipe EA 3593)

**Projets de Recherche financés en cours (avril 2010)**  
9 dont 4 en Responsabilité (1 ANR, 2 PO-Feder, 1 SEOM) et 5 en Equipe Associée (3 ANR, 1 PHRC, 1 MIE-CNRS)



### Mots clés :

- Parasitoses, Mycoses, Epidémiologie
- Pathologie, Paludisme, Leishmanioses
- Maladies de Chagas, Toxoplasme
- Histoplasme, Infection à VIH

### Equipements :

- Secteur Labo L3 (convention Hôpital)
- Cryoconservation Azote liquide
- Appareillage PCR temps réel
- Hottes Flux Laminaires
- Congélateur – 80°C
- Micromanipulateur
- Automate pour sérologie
- Centrifugeuses réfrigérées
- Microscope à fluorescence

### Association étroite avec CH de Cayenne

- ° Laboratoire HU Parasitologie Mycologie
- ° Services Dermato – Maladies infectieuses
- ° Département Centres de Santé
- ° CIC-EC Antilles Guyane 802 Inserm



### Partenariats (liste non limitative)

- Institut Pasteur Guyane
- Unité ESPACE S140-IRD Guyane
- UMR Qualitrop
- UMR 2724 IRD-CNRS Montpellier
- CNR Leishmaniose Montpellier
- CNR Toxo : Limoges, Reims
- CNR Mycoses IP Paris
- IMTSSA – URBEP Pharo Marseille
- Réseau International Maladies Chagas (9 pays d'Amérique du Sud)

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

### 1.4.1. CNR Montpellier

**Locaux :** Le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de Montpellier (LPMM) a déménagé en juillet 2009 pour rejoindre l'un des sites du CHRU, entre l'Hôpital Lapeyronie et La Colombière. Il est installé dans un bâtiment modulaire de 1300 m<sup>2</sup>, répartis sur deux étages, dont la construction a été entièrement prise en charge par le CHRU. Dans ces locaux sont installés à la fois le laboratoire hospitalier de diagnostic, le CNR-L et deux équipes de recherche incluses dans l'UMR "MIVegec" ("Maladies infectieuses et vecteurs : épidémiologie, génétique, évolution et contrôle") (CNRS / IRD / Universités Montpellier 1 et 2), dont le Pr. Patrick Bastien est également Directeur-Adjoint.

Dans ce bâtiment, le CNR-L dispose de pièces spécifiques et partage des pièces techniques communes à diverses activités, ce qui permet une excellente adéquation avec les missions de CNR.

Les grandes zones d'activité où s'exercent les activités du CNR-L comprennent :

- une unité de culture de niveau P2, équipée de 3 enceintes de sécurité et d'une chambre chaude pour la croissance des cultures de *Leishmania* (24-26° C) ;
- à cette unité de culture, s'ajoute une enceinte confinée de niveau P3, pour la culture des espèces de *Leishmania* classées en L3 (*L. donovani* et *L. braziliensis*).
- une unité de cryoconservation avec un local spécifique, aux normes de sécurité pour la manipulation de l'azote liquide, et contenant : 1 container de 351 litres (Espace 351), 1 container de 151 litres (Espace 151), 5 containers de 140 litres (Arpège 140), 23 containers de 40 litres (GT 40) et un container de répartition (TP100). Un contrat de livraison hebdomadaire d'azote liquide existe avec Air Liquide Santé, avec mise à niveau des containers. Seul le remplissage des GT40 est encore assuré chaque semaine par un technicien du CNR-L.
- un laboratoire de biochimie pour l'électrophorèse des isoenzymes ;
- un plateau technique réservé à la biologie moléculaire, partagé avec l'équipe de recherche et l'équipe hospitalière, occupant environ 70 m<sup>2</sup> ; ces locaux sont conformes au GBEA et aux recommandations classiques pour cette activité, et même davantage. Des mesures très strictes de confinement et de séparation y sont imposées : organisation en trois locaux géographiquement séparés (préparation des ADN, préparation des mélanges réactionnels, étape post-amplification) avec sas d'entrée ; pression positive dans les pièces "pré-amplification" et négative dans les pièces "post-amplification" ; respect du sens du flux ; personnel autorisé ; séparation complète des matériels, blouses, consommables et réactifs ; sur-blouses, sur-chaussures ; autres mesures classiques de prévention des contaminations. De plus, en "pré-amplification" ont été physiquement séparées les activités de diagnostic en routine (sécurisation maximum) et les activités dites de développement (en particulier les activités du CNR).
- un bureau spécifique dévolu au CNR-L, ainsi que des bureaux réservés aux différents acteurs scientifiques du CNR.

Les activités du CNR-L bénéficient également de locaux généralistes partagés (salle de réunion, archives, pièce de réception des échantillons, pièce informatique, secrétariat...).

**Equipements :** Dans le domaine particulier des activités de référence, objet du présent dossier de candidature, le laboratoire possède les locaux et équipements en adéquation avec les missions proposées.

Le déménagement du laboratoire a été l'occasion pour le CHRU de renouveler de nombreux équipements courants généraux du laboratoire âgés de plus de 15 ans : autoclave, postes de sécurité microbiologiques (PSM), étuves, centrifugeuses, balances, microscopes, générateurs, cuves d'électrophorèse et d'électrofocalisation, systèmes de refroidissement des

cuves, sécheur de gels, bains secs, plaques UV, fours à hybridation, pH-mètres, congélateurs divers (- 20° et - 80° C).

Par ailleurs, le Laboratoire possède d'autres équipements indispensables à l'activité : containers d'azote liquide (cf. supra), appareil de PCR en temps réel de type LightCycler 480, thermocycleurs conventionnels, automate d'extraction d'ADN, appareils à électrophorèse en champ pulsé, équipement Polaroid (pour gels d'électrophorèse des isoenzymes), station de prises de vues numériques avec analyseur d'images,...

Concernant les moyens logistiques, le CNR-L bénéficie d'une implantation au cœur du CHRU de Montpellier, et donc, de toute la logistique (infrastructures, fluides, nettoyage, déchets...) mise à la disposition du Département de Parasitologie-Mycologie par le CHRU.

### **1.4.2. Laboratoire Associé de Cayenne**

Une présentation synthétique du LHUPM, ainsi que de l'équipe universitaire qui lui est étroitement associée : équipe Epidémiologie des Parasitoses Tropicales (EPaT) (EA 3593), a été fournie ci-dessus sous forme d'une fiche poster (**chapitre 1.3.2**)..

## **2. ACTIVITES D'EXPERTISE**

### **2.1. Capacités techniques du CNR**

#### **2.1.1. Liste des techniques de référence**

Le LPMM du CHRU de Montpellier a développé au cours des dernières décennies des capacités techniques dans de nombreux domaines concernant les *Leishmania* et les leishmanioses : cultures *in vitro*, diagnostic conventionnel et moléculaire, typage et identification, cryoconservation, stockage et distribution de souches, et évaluation de la chimiosensibilité du parasite.

De par sa longue expérience en région d'endémicité élevée, le Laboratoire-Associé (LHUPM) de Cayenne possède également une expertise sur les leishmanioses dans les mêmes domaines et constitue donc un complément idéal pour l'activité outre-mer concernant cette pathologie.

L'identification (typage) des souches *Leishmania* est réalisée au LPMM depuis 1979 selon la technique d'électrophorèse des isoenzymes, qui reste aujourd'hui, malgré l'essor des techniques moléculaires, la technique de référence d'identification biochimique (recommandation de l'O.M.S.). A cette technique s'ajoute l'identification moléculaire par séquençage multilocus (MLST), qui peut porter sur l'analyse simultanée de 7 loci génomiques indépendants. D'autre part, le typage par analyse des caryotypes moléculaires (électrophorèse en champ pulsé) est réalisé ponctuellement sur des souches isolées de patients immunodéprimés (infection VIH) souffrant d'une infection leishmanienne au long cours.

Au LHUPM, la technique réalisée depuis 2006 a été mise au point dans le Laboratoire. Il s'agit d'une technique PCR-RFLP avec comme enzyme HgA1 et TSPR1 (Simon et al., *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 66(2):175-80). Les contrôles de qualité des identifications réalisées chaque année montrent une parfaite correspondance avec les résultats obtenus au Laboratoire coordonnateur du CNR (Montpellier).

### 2.1.1.1. Diagnostic

- Le **LPMM** réalise le diagnostic moléculaire des leishmanioses par PCR en temps réel (LightCycler LC480). La technique est basée les travaux de C. Mary et al. (J Clin Microbiol. 2004, 42: 5249-55) et repose sur l'amplification par PCR de l'ADN du kinétoplaste (ADN mitochondrial hautement répété) et la détection par sonde TaqMan. La sensibilité obtenue est très élevée, autour de 0.01 équivalents-génome par mL de sang. La quantification de la charge parasitaire dans le sang pour les leishmanioses viscérales a été mise au point et fonctionne en routine.

- Le diagnostic immunologique de la LV est basé sur l'utilisation de deux techniques de dépistage (immunofluorescence indirecte et ELISA). La technique de Western blot est utilisée comme technique de confirmation. Le sérodiagnostic est également utilisé dans certaines formes tégumentaires. Par ailleurs, le LPMM conserve la maîtrise du test d'IFI qui est plutôt réservé à la leishmaniose canine.

- De par sa longue expérience en région d'endémicité élevée, le **LHUPM de Cayenne** possède également une expertise en diagnostic des leishmanioses, que ce soit par microscopie, en culture *in vitro*, par techniques sérologiques classiques (microscopie à fluorescence, ELISA, Western Blot...) ou par techniques de biologie moléculaire (PCR conventionnelle et PCR en temps réel). Sa technique de diagnostic moléculaire repose sur l'amplification du gène de l'ARN polymérase II.

### 2.1.1.2. Typage biochimique : Identification iso-enzymatique

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

Elle reste la technique de référence en épidémiologie et continue à être demandée par de nombreuses équipes.

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

### 2.1.1.3. Typage moléculaire

L'identification moléculaire est réalisée au **LPMM** depuis fin 1998 sur tout prélèvement ou culture positifs provenant de leishmanioses tégumentaires ou viscérales. Elle est basée sur le séquençage de différents loci correspondant à des séquences codantes en copie unique intégrées dans un schéma MLST. Actuellement, des données sur 7 loci génomiques ont été obtenues sur environ 400 souches de référence, représentant l'ensemble des espèces du genre *Leishmania*. Un important travail d'analyse bioinformatique a été réalisé depuis deux ans et met en évidence une grande robustesse de cette approche pour l'identification spécifique et une très bonne cohérence avec les techniques d'identification isoenzymatique. Une publication utilisant cette approche et portant sur l'analyse de 220 souches d'Afrique et d'Eurasie a été soumise.

L'identification moléculaire permet notamment la différenciation rapide de toutes les espèces de *Leishmania*. Elle est appliquée non seulement sur les souches en culture, mais

également, dans environ 70% des cas, sur les prélèvements, en particulier biopsiques, ce qui permet un typage même en cas de culture négative ou contaminée.

Actuellement, l'identification à partir de prélèvements cliniques, ainsi que la vérification des souches distribuées avant l'envoi, est réalisée de façon systématique par technique moléculaire.

Le **LHUPM de Cayenne** a également développé une technique d'identification moléculaire par PCR-RFLP spécifique pour le diagnostic d'espèce des *Leishmania* du Nouveau Monde. Cette technique peut être réalisée à partir des cultures et, le cas échéant, directement à partir de biopsies de lésions cutanées (Simon S, Veron V, Carme B. *Leishmania* species identification by PCR-RFLP analysis and its applications in French Guiana. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 2010; 66, 175-180).

#### **2.1.1.4. Autres techniques de typage utilisées**

##### **- Typage par microsatellites :**

Les approches de typage par les microsatellites ont été développées pour *Leishmania* dans l'Unité de recherche à laquelle appartient le CNR. Elles ont fait l'objet de nombreuses publications.

##### **- Typage par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) :**

Les caryotypes moléculaires des *Leishmania* (obtenus par PFGE) présentent un extrême polymorphisme. Cette caractéristique permet d'envisager une différenciation entre souches génétiquement très proches. Cette méthode, mise au point dans le Laboratoire depuis 1989, est utilisée à des fins d'identification depuis 2007. Elle s'applique principalement à l'étude de souches isolées de façon répétitives de patients co-infectés par *Leishmania* et VIH et permet de distinguer les rechutes des réinfections.

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

Des techniques d'étude de la résistance des souches de *Leishmania infantum* vis-à-vis des drogues anti-leishmaniennes de première ligne que sont les antimoniés, l'amphotéricine B et la miltéfosine ont été mises en place au Laboratoire depuis 2007. Plusieurs systèmes d'étude in vitro sont disponibles au CNR-L : modèle promastigote /milieu axénique, modèle amastigote /milieu axénique et modèle amastigote /macrophage THP1.

#### **2.1.2. Collections de matériels biologiques**

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

Débutée en 1971, elle s'est régulièrement enrichie. Depuis la création du CNR en 1998, le nombre de nouvelles souches cryoconservées chaque année dans la collection se situe en moyenne autour de 180.

**La Collection comporte aujourd'hui précisément près de 6500 souches** provenant de 67 pays, sur 4 continents. Les souches proviennent principalement de cas humains de leishmanioses, mais également de chiens et d'autres hôtes mammifères, ainsi que de phlébotomes vecteurs. Du point de vue géographique, les souches proviennent principalement d'Europe (42 %) et d'Afrique (32 %), mais également d'Asie (10 %) et d'Amérique (16 %). La présence de souches non seulement échantillonnées de foyers bien identifiés mais provenant en plus de tous les acteurs du cycle épidémiologique de l'espèce de *Leishmania* en cause, confère une richesse exceptionnelle à cette Collection.

Toutes les souches sont conservées en azote liquide (cf. Equipements). Le process des échantillons biologiques et des souches, depuis leur arrivée jusqu'à leur stockage, est entièrement tracé et géré informatiquement grâce à un logiciel spécifiquement développé pour la Collection (base de données Modulbio, sécurisée sous Oracle, cf. ci-dessous). Fin 2012, un gros travail collaboratif a été effectué par le CNR-L en vue de l'adoption en 2013 par le réseau des CRB français en Microbiologie (FBRCMi) d'un logiciel commun de gestion des échantillons et de saisie des données.

La Collection est reconnue Centre de Ressources Biologiques par le GIS IBiSA.

Elle est référencée sur le World Data Centre for Microorganisms de la World Federation for Culture Collections (depuis le 08/04/2005, n° 879).

Le CNR-L participe au réseau européen BBMRI ("Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure"), au Réseau français des CRB de Microorganismes (<http://www.fbrcmi.fr/>), ainsi qu'au réseau de CRBs français en santé "Biobanques" qui a été lauréat de l'appel à projets "Infrastructures nationales en biologie et santé". De plus, P. Bastien fait partie du Conseil Scientifique du GIS IBiSA.

**Le Laboratoire-Associé de Cayenne a également une capacité de stockage des souches** de *Leishmania* isolées à - 80°C et/ou en azote liquide (deux aliquotes par souche) pour une période limitée (un an) avant transfert des souches au Centre coordonnateur de Montpellier pour stockage à long terme et mise à disposition des collections selon les conditions habituelles des CNR. Les souches de Cayenne sont envoyées par lots au CRB de Montpellier.

Les collections biologiques sont déclarées par le CH de Cayenne selon les procédures officielles (ADN et leishmanies formes promastigotes).

### **2.1.2.2. Application informatique de gestion de la collection du CNR**

L'application utilisée en 2012 (ModulBio) s'articule essentiellement autour d'une base de données sécurisée utilisant le SGBD Oracle et fonctionnant sur un serveur SUN microsysteme avec contrôleur de stockage RAID 1, assurant la protection des données sur deux disques durs en miroir (Mirroring) et un système d'exploitation LINUX. Toutes les 24h, une sauvegarde en back-up est réalisée sur un autre serveur situé dans une autre pièce.

L'accès à la base, contrôlé par login et mot de passe, se fait directement à chaque stade du traitement avec un navigateur intranet sur différents postes Windows répartis dans le laboratoire. Cette communication utilisant des clients légers (ordinateur de faible puissance) et aucune application spécifique est possible grâce à l'utilisation d'une interface originale en langage JAVA.

Le système de gestion créé prend en compte la totalité des différentes étapes du process avec le maximum d'efficacité et de sécurité grâce en partie à l'utilisation d'étiquettes avec "code-barre" utilisées dès la réception des échantillons, lors des mises en cultures et également à l'étape de congélation dans l'azote liquide. Cet étiquetage, ainsi que la saisie automatique et manuelle d'informations à tous les stades des manipulations, permet d'atteindre un niveau de sécurité important et une traçabilité totale du maniement des souches depuis la réception du prélèvement ou de la culture d'origine, jusqu'au cryo-stabilat et à l'extraction d'ADN, ainsi que dans l'expédition vers les laboratoires demandeurs.

Cet outil intègre aussi un module de gestion des stocks de la collection, nous permettant de connaître la quantité et la position de chaque aliquote de chaque souche/isolat, ainsi qu'un module d'analyse de l'ensemble des données contenues dans la base. Enfin, les données épidémiologiques sont exportables vers d'autres systèmes de bases de données internes au CNR afin d'en simplifier les traitements statistiques.

L'ensemble de ces fonctions réunies au sein d'une même application nous permet de répondre aux exigences les plus strictes.

Par ailleurs, une seule personne (Yves Balard, Assistant-Ingénieur en électronique et informatique) est responsable de la gestion de l'informatique du CNR et de la collection. Il assure la maintenance de l'application et du serveur.

Les frais de cette maintenance et d'hébergement du site et du logiciel sont pris en charge par l'Université Montpellier 1.

En 2012-2013, le laboratoire s'est engagé au sein du réseau national des CRB micro-organismes (FBRCMi) dans un projet commun de base de données ("BRC-LIMS"), qui prévoit la prise en charge totale de la gestion de la collection. Ce projet initié en 2009 par l'institut Pasteur et soutenu par le GIS IBiSA (Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie) a, après une pause en 2010, été finalisé cette année par la société Ajilon IT Consulting. Cette application présente toutes les garanties de sécurité offertes par notre application actuelle, ModulBio, avec d'ailleurs de souplesse et de possibilités. Les différentes évolutions projetées pour ModulBio ont donc été reportées et tout notre intérêt s'est concentré sur le développement de BRC-LIMS. Le déploiement dans les différents CRB ainsi que les différentes phases de tests se sont déroulés durant toute l'année 2012. Toutes les données présentes sur l'ancienne application ont été reprises. La phase de validation a débuté en fin d'année et devrait se prolonger jusqu'à mi-2013, date à laquelle la gestion de la Collection basculera totalement vers BRC-LIMS.

### **2.1.2.3. Conditions de mise à disposition de la collection**

Toutes les souches de la collection sont cessibles après accord du Conseil Scientifique du CRB et du donneur de la souche.

L'option choisie pour une meilleure diffusion du matériel conservé dans notre collection a consisté dans la réalisation d'un catalogue de souches sous forme d'une base de données interrogeable et accessible sur le site Internet du laboratoire ([www.parasitologie.univ-montp1.fr/cryobanque.htm](http://www.parasitologie.univ-montp1.fr/cryobanque.htm)). Jusqu'en 2010, un échantillon de 419 souches représentatives de la diversité des hôtes, réservoirs, vecteurs, origine géographique, et aspects cliniques chez l'homme, figurait sur notre site. Depuis 2011, un travail constant d'enrichissement de ce catalogue a été entrepris et celui-ci a été augmenté à près de 670 souches.

Les souches distribuées à la communauté scientifique sont destinées à des projets scientifiques. Le déstockage des souches est contrôlé par le logiciel de la Collection permettant la traçabilité de la sortie des aliquotes cédées.

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

### **2.1.2.4. Collection d'ADN de *Leishmania***

Depuis 2003, une collection d'ADN a été constituée. Elle renferme des ADN obtenus à partir de produits pathologiques (environ 2600) ou à partir de souches de culture (environ 750). Tous les ADN sont cryoconservés à  $-30^{\circ}\text{C}$  dans un congélateur sécurisé (alarme de température). Cette collection a été déclarée dans le cadre du Centre des Collections Biologiques hospitalières du CHRU de Montpellier (CCBH-M) conformément au décret n°2007-1220 du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain.