

Rapport annuel d'activité

2018

Centre national de référence
des Leishmanioses

Année d'exercice
2017

Pr Patrick BASTIEN
Coordonnateur du CNR des Leishmanioses
Département de Parasitologie-Mycologie
CHRU de Montpellier / Faculté de Médecine
39, Avenue Charles Flahault
34295 MONTPELLIER CEDEX 5



Résumé analytique (en français et en anglais)

Les leishmanioses sont essentiellement des zoonoses dues à un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*, affectant de nombreuses espèces de mammifères, y compris l'homme, transmises par la piqûre d'un phlébotome. Elles affectent entre 1,5 et 2 millions de personnes chaque année dans 98 pays, avec une mortalité estimée à 50000 morts par an. Les leishmanioses sont endémiques dans tout le bassin méditerranéen et en particulier dans le Sud de la France et toute l'Europe du Sud. Par ailleurs, en raison de l'accentuation des échanges avec les zones endémiques, il existe de nombreux cas importés de leishmaniose viscérale (LV) ou cutanée (LC) en France. En Guyane Française, la forte endémie de LC représente un problème de santé publique, avec un nombre élevé de cas annuels (180 cas déclarés en moyenne) et une épidémiologie totalement différente de ce qui se passe en France métropolitaine. Le Centre National de Référence des Leishmanioses (CNR-L), créé en 1998 à Montpellier, et le Laboratoire Associé de Cayenne (Parasitologie-Mycologie, C.H. Andrée Rosemon) développent les différentes missions imparties aux CNR : expertise, surveillance, alerte et conseil; l'un en métropole, l'autre sur le territoire guyanais.

En 2017, l'offre d'**expertise** diagnostique s'est intensifiée, avec 677 demandes de diagnostic moléculaire à Montpellier (augmentation de 30,6% par rapport à 2016) et 344 demandes de diagnostic à Cayenne.

La Collection internationale de souches de *Leishmania* a continué à faire l'objet d'un "curage" important, à la fois des données et des stocks. Le Catalogue de souches a été réduit pour une plus grande efficacité. 109 souches ont été reçues ou isolées à Montpellier et 119 à Cayenne.

Le typage de souches est soit moléculaire, soit, et de plus en plus, basé sur le MALDI-TOF (spectrométrie de masse) : 96 et 95 souches ont été typées par la première et la deuxième méthode, respectivement, à Montpellier, et 70 et 76 à Cayenne. Les demandes d'identification moléculaire (297) ont augmenté de 30% à Montpellier par rapport à 2016.

La surveillance est basée sur la déclaration volontaire des cas. Celle-ci provient chaque année d'une soixantaine d'établissements de santé en métropole (CHU et CH surtout, au total environ 120 sur les années) et de plusieurs établissements et nombreux Centres de Santé en Guyane. En 2017, 368 cas au total ont été déclarés au CNR-L : 184 fiches de déclaration de cas ont été reçues directement au CNR-L, provenant de structures de France métropolitaine (169 déclarations) et des Services de Santé des Armées (15 cas); le L-A de Cayenne a également déclaré 184 cas de leishmanioses cutanées (diagnostiqués en Guyane Française). Ceci représente une baisse globale de 15% par rapport à 2016 (435 cas), expliquée par une diminution des déclarations en Guyane de plus d'un tiers, mais compensée par une hausse des cas déclarés en Métropole de 45%.

Les LC restent très majoritaires. Le nombre de LV demeure stable avec toujours une prédominance de sujets adultes non immunodéprimés. Les leishmanioses autochtones de métropole restent rares; mais les contaminations en Guyane constituent 61% des cas totaux. La proportion de LC à *L. braziliensis* revient à un niveau stable autour de 12% des cas guyanais. Les cas importés, y compris de Guyane, représentent au minimum 75% des cas de métropole. Les cas en provenance du Maghreb continuent de progresser, avec des formes cutanées à localisations multiples qui répondent souvent mal au traitement.

Aucune **alerte** ni aucun événement de cas groupés n'ont été signalés durant cette période.

En raison de l'arrêt de l'activité "Leishmanioses" à l'ANSES (Dr Mohamed Kasbari, Laboratoire de Santé Animale), avec qui une collaboration forte s'était établie depuis 2009 sur la surveillance des **leishmanioses animales** et des souches susceptibles de passer du réservoir animal à l'homme, aucune activité n'a eu lieu cette année au CNR-L concernant la leishmaniose animale.

Le site Internet du CNR évolue, avec la décision d'individualiser les deux sites du CNRL et du CRB du site du Laboratoire. Les deux sites seront hébergés sur la plateforme de l'Université de Montpellier, et seront disponibles dans le courant de l'année 2018

Comme chaque année, le CNR a publié et communiqué des travaux de recherche. Plusieurs projets de recherche collaboratifs sont en cours (Pitié-Salpêtrière, Nice, Liban, Israël, Barcelone, Rabat, Tunis).

Leishmanioses are essentially zoonoses caused by a flagellated protozoon of the genus *Leishmania*, affecting numerous mammalian species, including humans, transmitted by the bite of a sand fly. They affect between 1.5 and 2 million people each year in 98 countries, provoking about 50 000 deaths a year. Leishmanioses are endemic in the whole Mediterranean Basin, in particular in the South of France and all Southern Europe. Moreover, due to increasing exchanges with endemic countries, many cases of visceral (VL) and cutaneous (CL) leishmaniosis are imported into France every year. In French Guiana, the high endemicity of CL represents a true public health problem, with a high number of cases each year (mean notification 180 cases) and an epidemiology entirely different of that observed in mainland France. The French National Reference Centre for Leishmanioses (NRCL), created in 1998 in Montpellier, and the 'Associated Laboratory' of Cayenne (Parasitology-Mycology, Hospital Centre Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana), both develop the missions attributed to the NRCs: expertise, surveillance, alert and counsel; one in mainland France and the other one in French Guiana. In 2017, the diagnostic **expertise** was intensified, counting 677 requests for molecular diagnosis in Montpellier – an increase of 30.6% as compared with 2016 – and 344 requests in Cayenne. The international Collection of *Leishmania* strains continued being 'curated' intensively, at both the stock and data levels. The strain catalogue was reduced for a greater efficacy. 109 strains were received or isolated in Montpellier and 119 in Cayenne.

Strain typing is based either on molecular biology or, increasingly, on MALDI-TOF (mass spectrometry): 96 and 95 strains were typed by the first and the second method, respectively, in Montpellier, and 70 and 76 in Cayenne. The requests for molecular typing (297) increased by 30% in Montpellier as compared with 2016.

Surveillance is based on voluntary case notification. Each year, about 60 diverse health institutions - mainly public hospitals, and 120 in total over the years – notify cases to the NRCL, together with several hospitals and numerous 'Health centres' in French Guiana. In 2017, 368 cases were notified to the NRCL: 184 notification forms were received directly in Montpellier from health structures in mainland France (169 cases) and from the Army Health Services (15 cases); the 'Associated Laboratory' of Cayenne also notified 184 cases of CL from French Guiana. This represents a global decrease of 15% as compared with 2016 (435 cases), which is correlated with a reduction of notifications in French Guiana by a third, compensated by a 45% increase in notified cases in mainland France.

CL still constitutes the large majority of cases. VL remains stable, still with a predominance of non-immunocompromised adult patients. Autochthonous leishmanioses remain rare in mainland France; but contaminations in French Guiana constitute 61% of total cases. The proportion of *L. braziliensis* comes back to its previous levels of 12% of the Guianese cases. Imported cases, including from Guiana, represent a minimum of 75% of the mainland cases. Cases from Maghreb continue progressing, with cutaneous forms with multiple localisations often refractory to treatment.

No **alert** or grouped cases events were notified during this period.

Due to the arrest of the leishmaniosis-related activity at the ANSES (Dr Mohamed Kasbari, Laboratoire de Santé Animale), with whom a strong collaboration had been established since 2009 about the surveillance of **animal leishmanioses** and *Leishmania* strains likely to pass from the animal reservoir to human, no activity took place this year at the NRCL about animal leishmaniosis.

The Internet website of the NRC is evolving, with the decision to individualize both the sites of the NRC and the CRB from the main laboratory website. Both sites will be hosted by a platform at the University of Montpellier, and will become available during 2018.

Like every year, the NRCL has published and communicated about its research works. Several collaborative research projects are currently developed (Pitié-Salpêtrière, Nice, Liban, Israel, Barcelone, Rabat, Tunis).

SOMMAIRE

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....	9
2. ACTIVITES D'EXPERTISE EN 2017.....	13
2.1. EVOLUTION DES TECHNIQUES	13
2.2. TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, RÉACTIFS ET TROUSSES : MÉTHODE, ÉTAT D'AVANCEMENT, PRINCIPAUX RÉSULTATS.....	13
2.3. TECHNIQUES TRANSFÉRÉES VERS D'AUTRES LABORATOIRES.....	13
2.4. COLLECTION DE MATÉRIEL BIOLOGIQUE.....	14
2.4.1. Réception de souches de <i>Leishmania</i>	14
2.4.2. Distribution de souches de <i>Leishmania</i>	15
2.4.3. Maintien et dynamique de la Collection de souches (Montpellier)	16
2.5. ACTIVITÉS D'EXPERTISE.....	17
2.5.1. Expertise diagnostique	17
2.5.2. Identification moléculaire	18
2.5.3. Identification par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)	19
2.5.4. Sensibilité <i>in vitro</i> des souches de <i>Leishmania</i> aux produits anti-leishmaniens...	20
2.5.5. Activités de séquençage.....	20
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....	21
3.1. DESCRIPTION DU RÉSEAU DE PARTENAIRES	21
3.2. SURVEILLANCE DE L'INFECTION ET DES CARACTÉRISTIQUES DES LEISHMANIOSES.....	23
3.2.2. Déclaration des cas.....	23
3.2.3. Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances	24
3.2.3.1. France métropolitaine.....	24
3.2.3.2. Guyane Française (synthèse).....	26
3.3. SURVEILLANCE DE LA RÉSISTANCE DES AGENTS PATHOGÈNES AUX ANTI-INFECTIEUX ...	28
3.4. INTERFACES AVEC LES RÉSEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX	28
3.4.1. Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France (échanges de données, périodicité, analyse commune).....	28
3.4.2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux	28
3.5. ENQUÊTES OU ÉTUDES PONCTUELLES CONCOURANT À LA SURVEILLANCE	29
4. ALERTE : DÉTECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPÉS ET DES PHÉNOMÈNES ANORMAUX	29
5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	29
5.1. CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTÉ.....	29
5.1.1. Enseignements et formations.....	29
5.1.2. Accueil de stagiaires	30
5.1.3. Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion)	30
5.1.4. Diffusion des données de surveillance et des productions du CNR.....	30
5.1.5. Conseils aux professionnels de santé	30
5.2. CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITÉS SANITAIRES.....	31
5.3. CONSEIL ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (GRAND PUBLIC...)	31

6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.....	33
6.1. ACTIVITÉS DE RECHERCHE EN 2017	33
6.1.1. PROJET EUROPÉEN LEISHMAN « IMPROVING TREATMENT OF LEISHMANIASIS BASED ON SPECIES DIFFERENTIATION »	33
6.1.2. IDENTIFICATION DES <i>LEISHMANIA</i> PAR LA TECHNIQUE DU MALDI-TOF	33
6.1.3. AUTRES TRAVAUX COLLABORATIFS EN RECHERCHE.....	34
6.2. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DE 2017.....	35
6.2.1. PUBLICATIONS NATIONALES	35
6.2.2. PUBLICATIONS INTERNATIONALES.....	35
6.2.3. CHAPITRES DE LIVRES	35
6.2.4. COMMUNICATIONS À CONGRÈS NATIONAUX.....	35
6.2.5. COMMUNICATIONS À CONGRÈS INTERNATIONAUX	36
6.2.6. CONFÉRENCES SUR INVITATION DANS CONGRÈS ET RÉUNIONS	36
7. COOPÉRATION AVEC LES STRUCTURES DE SANTÉ ANIMALE POUR LA SURVEILLANCE DES LEISHMANIOSES ANIMALES	37
8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR 2018-2019	39
8.1. ACTIVITÉS D'EXPERTISE	39
8.1.1. Réseau de partenaires	39
8.1.2. Evaluation de techniques de détection des <i>Leishmania</i>	39
8.1.3. Identification des <i>Leishmania</i>	39
8.1.4. Maintien et dynamique de la Collection de souches (Montpellier)	40
8.1.5. Activités d'expertise du L-A de Cayenne.....	42
8.1.6. Recherche en lien direct avec l'activité du CNR.....	43
8.1.6.1. Projet européen LeishMan « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation »	43
8.1.6.2. Recherche en collaboration avec les structures travaillant en santé animale....	43
8.1.6.3. Autres projets de recherche en collaboration.....	43
8.1.6.4. Projets de recherche du CNR-LA de Cayenne	44
8.2. CONSEIL, INFORMATION, FORMATION	44
8.2.1. Conseil.....	44
8.2.2. Information.....	45
8.2.3. Formation.....	45
8.3. CONTRIBUTION À LA SURVEILLANCE DES LEISHMANIOSES HUMAINES.....	46
8.4. CONTRIBUTION À L'ALERTE.....	47
ANNEXES.....	51

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

Evolutions notables en 2017 :

1.1. Personnel

A Montpellier, Laurence Lachaud a été nommée PU-PH en Septembre 2017.

Au Laboratoire Associé de Cayenne, après 9 mois de vacance, le recrutement d'un ingénieur de recherche a été effectué en novembre 2017 pour l'année 2017-2018. Il s'agit de Mr Stéphane Simon qui a contribué à la mise en place du CNR dans les années 2010-2011.

2.2. Démarche Qualité

* Laboratoire coordonnateur : Le Laboratoire a accredité le diagnostic moléculaire de la Leishmaniose en 2017 (visite du COFRAC en novembre 2016, et notification officielle en juillet 2017).

Le dossier déposé en 2018 comprend la sérologie Toxoplasme, la recherche d'antigènes aspergillaires et la recherche de paludisme.

* Laboratoire Associé de Cayenne : Au décours de la visite initiale du COFRAC en décembre 2016, le laboratoire a été accredité en novembre 2017 sur une partie de ses examens, notamment la sérologie Maladie de Chagas en technique TDR et Immuno-analyse.

Le dossier déposé en 2018 comprend la sérologie toxoplasme et la recherche du paludisme (FS/GE et recherche d'antigènes parasitaires).

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

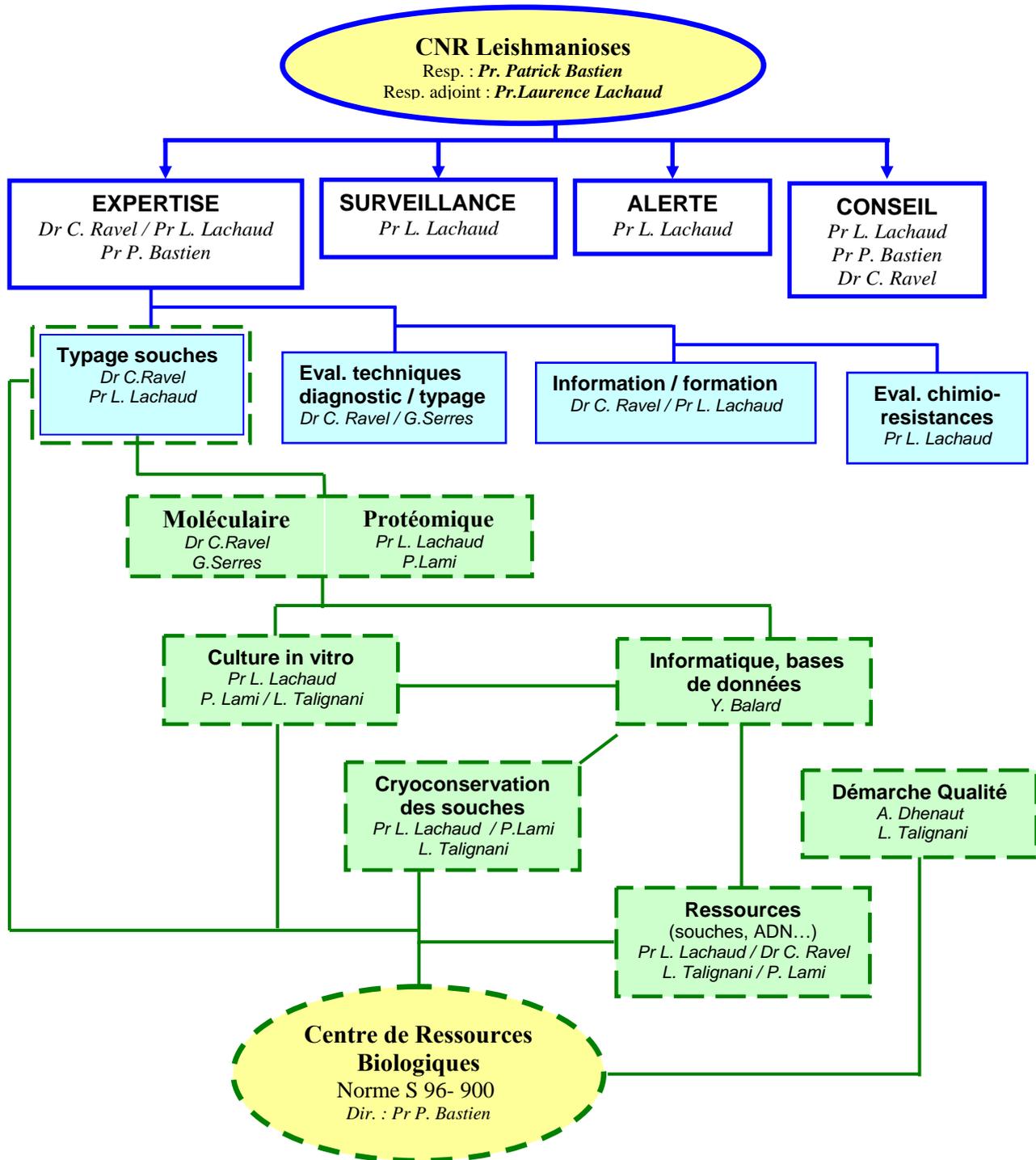
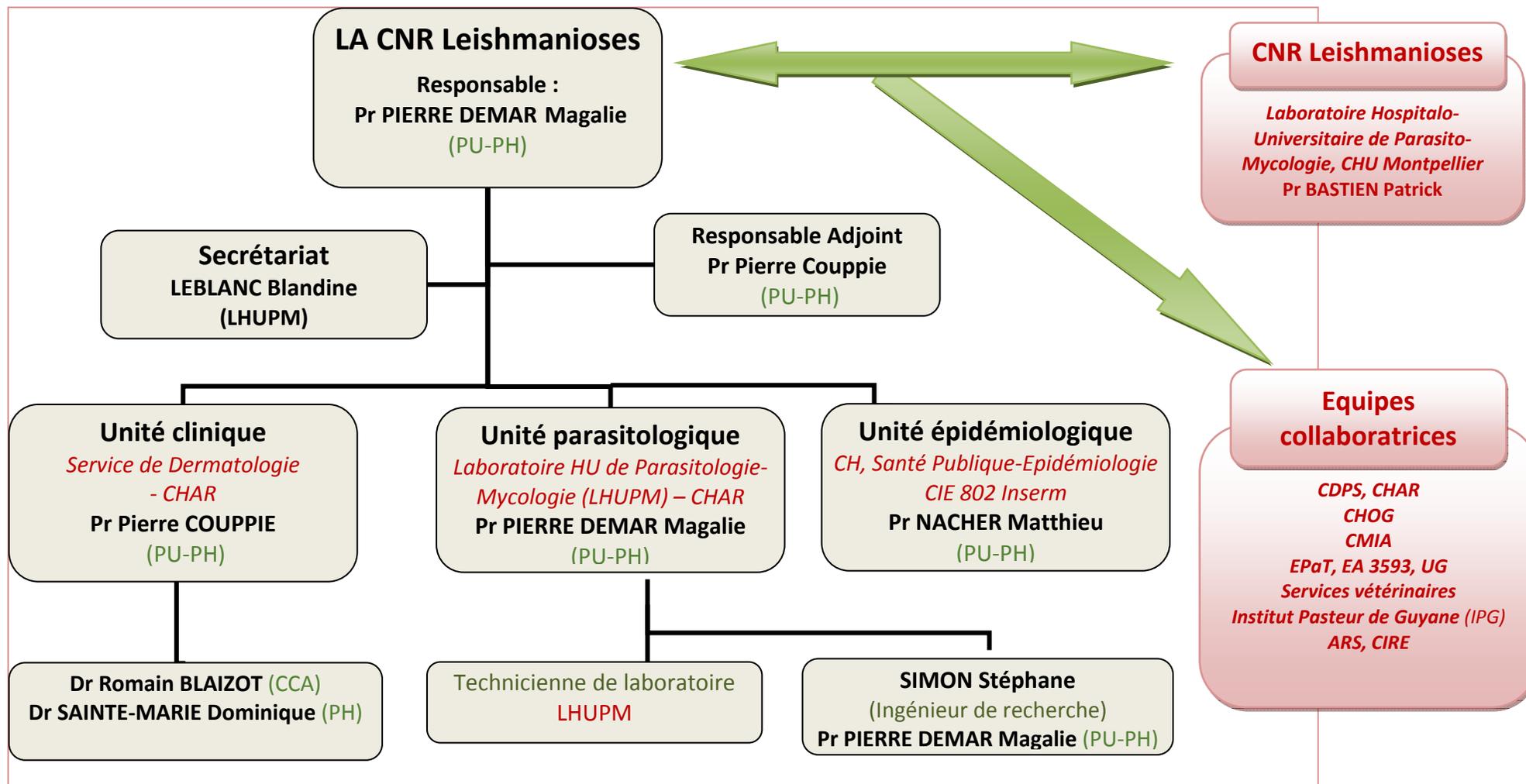
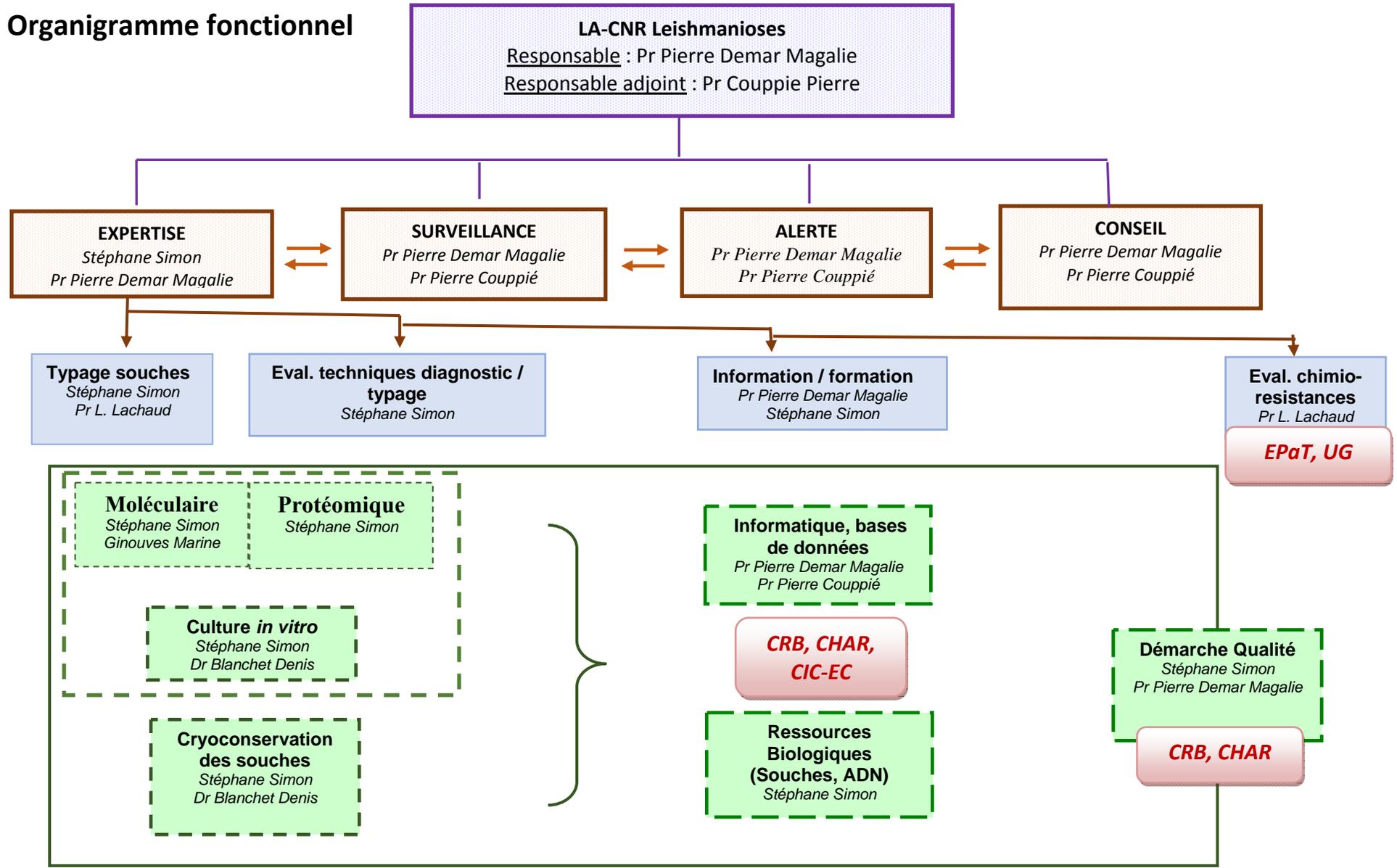


Figure 2. Organigrammes du Laboratoire Associé au CNR des Leishmanioses (Cayenne)



Organigramme fonctionnel



2. ACTIVITES D'EXPERTISE EN 2017

- Les demandes de diagnostic se sont élevées à 677 à Montpellier (+ 30,6% par rapport à 2016) et 344 à Cayenne.
- 109 souches ont été reçues ou isolées à Montpellier et 119 à Cayenne.
- Le typage de souches est soit moléculaire, soit, et de plus en plus, basé sur le MALDI-TOF (spectrométrie de masse), et ce dans les deux centres : 96 et 95 souches ont été typées par la première et la deuxième méthode, respectivement, à Montpellier, et 70 et 76 à Cayenne.
- Les demandes d'identification moléculaire (297) ont augmenté de 30% par rapport à 2016.
- Le CNR a aujourd'hui optimisé l'identification des souches de *Leishmania* par la technique du MALDI-TOF. La banque de "spectres" est maintenant disponible en ligne via l'application MSI (<https://biological-mass-spectrometry-identification.com/msi/>). Le CNR-L est le gestionnaire de cette banque en association avec la Pitié Salpêtrière (Pr Piarroux).
- Le catalogue de la Collection de souches de *Leishmania* a été entièrement revu et mis à jour; et l'identification des souches vérifiée par le MALDI-TOF. La sécurisation des cryostabilats des isolats rares ou marqueurs de zymodèmes est terminée (cryostabilats dans deux conteneurs différents).

Description des techniques disponibles présentée en Annexe 1.

2.1. Evolution des techniques

- Techniques développées ou en développement

Le CNR a aujourd'hui optimisé l'identification des souches de *Leishmania* par la technologie du MALDI-TOF (spectrométrie de masse). La première partie du projet de validation de la méthode en collaboration entre le CNR de Montpellier (Dr Lachaud), le Centre collaborateur de Marseille (Pr Piarroux) et le LA de Cayenne (Pr Demar) a été menée à bien. La banque de données est maintenant disponible en ligne et accessible via l'application MSI (<https://biological-mass-spectrometry-identification.com/msi/>). Le CNRL est le gestionnaire de la banque en association avec la Pitié Salpêtrière (Pr Piarroux). De nouveaux développements sont en cours.

Au LA de Cayenne, une réflexion a été menée pour améliorer l'identification par PCR-RFLP avec la volonté de passer en PCR temps réel. Divers essais ont été tentés avec une technique SYBRGreen sur le gène HSP70.

2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse : méthode, état d'avancement, principaux résultats

2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

La technique du MALDI-TOF a été développée en parallèle dans le Laboratoire Coordonnateur et le Laboratoire Associé du CNR.

2.4. Collection de matériel biologique

Organisation, conditions de stockage et de mise à disposition, gestion informatique etc. : cf. Annexe 1.

Le catalogue de la Collection de souches de *Leishmania* a été entièrement revu et mis à jour; et l'identification des souches vérifiée avec la méthode de MALDI-TOF. L'ensemble du stock a été vérifié.

109 souches ont été reçues en 2017 et 6 souches distribuées à l'extérieur. Toutes les souches sont typées en MALDI-TOF, et pour les espèces plus rares, l'identification est établie par séquençage de l'ADN. La sécurisation des cryostabilats des isolats rares ou marqueurs de zymodèmes est terminée (cryostabilats dans deux conteneurs différents).

2.4.1. Réception de souches de *Leishmania*

• Origine des souches selon le centre de soins

En 2017, 109 souches de *Leishmania* ont été isolées ou reçues à Montpellier, majoritairement d'établissements hospitaliers et particulièrement du CH de Cayenne. Pour la première fois cette année, aucune souche n'a été reçue de l'étranger.

Tableau I. Origine, selon le centre de soins, des 109 souches de *Leishmania* traitées par le Laboratoire Coordonnateur en 2017.

France (109 souches)			
Établissements	Nb	Établissements	Nb
APHP Cochin	2	H.I.A. Desgenettes	1
APHP Bichat Claude Bernard	2		
APHP Bobigny	2		
CH Cayenne	87		
CHU Montpellier	1		
CHU Nice	7		
CHU Rennes	6		
CHU Tours	1		

• Origine géographique des souches par pays de contamination.

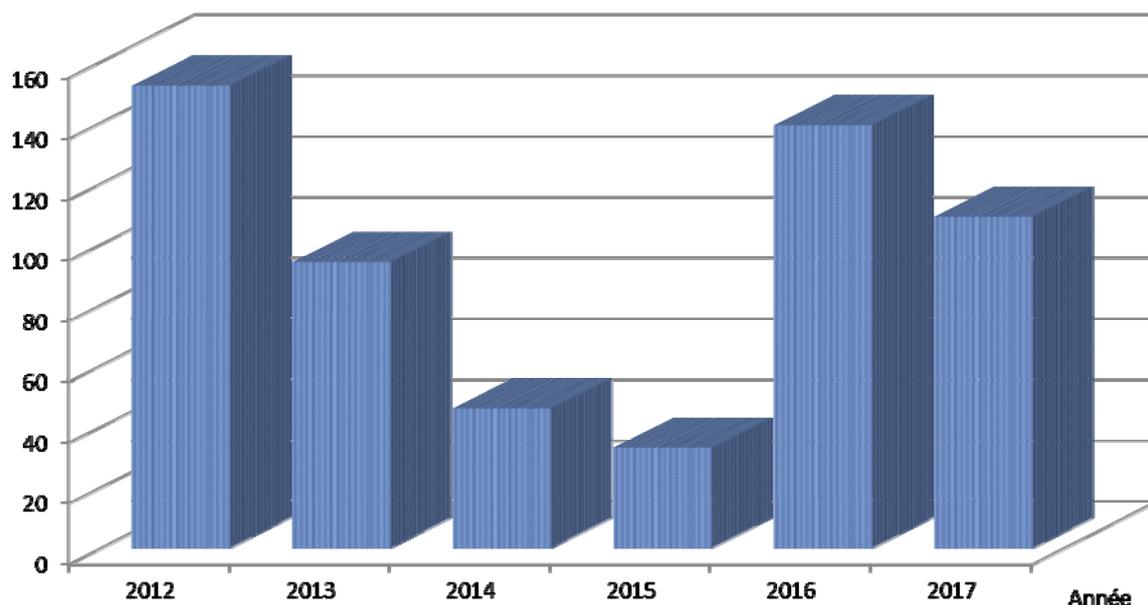
L'origine géographique des souches par pays où la contamination a eu lieu en 2017 figure sur le Tableau II : les souches ont été obtenues avec une contamination dans 8 pays différents, dont 3 pays d'Afrique, 2 pays d'Europe et 4 pays d'Amérique (en considérant la Guyane française comme un "pays").

Tableau II. Origine géographique, par pays de contamination, des 109 souches traitées par le CNRL (Montpellier) en 2017

Continents	Pays	Nb	Continents	Pays	Nb
Afrique (n = 8)	Maroc	3	Amérique (n = 94)	Brésil	2
	Sénégal	1		Guyane française	68
	Tunisie	4		Mexique	1
		Suriname		9	
			Guatemala	1	
Origine géographique inconnue		5	Europe (n = 2)	Espagne	1
				Italie	1

N.B. Ces chiffres sont différents des chiffres de déclaration de cas.

Figure 3. Nombre de souches stockées annuellement au Laboratoire coordonnateur de Montpellier entre 2012 et 2017.



En Guyane, 119 souches de *Leishmania* ont été isolées en 2017, dont 55 souches (46,2%) provenant des hôpitaux de Cayenne et de Saint-Laurent-Du-Maroni (42,5% en 2016), 57 souches (48%) des CDPS (53,3% en 2016), et 3 souches (2,5%) du Centre Médical du Service des Armées (CMIA) (9% en 2016). On note que sur les souches isolées de patients vivant près des Centres de santé, 41 souches, soit 74.5%, provenaient du CDPS de Maripasoula. Cette situation est stable par rapport à 2015 et 2016, mais l'augmentation est très nette par rapport aux années précédentes (seulement 47 souches isolées en 2013 et 104 en 2014).

Tableau III. Origine selon le centre de soins, des souches de *Leishmania* traitées par le LA à Cayenne entre 2014 et 2017.

	Hôpitaux (SLM+CHAR)	Armée (CMIA)	Centre /Postes de santé (CDPS)	Total
Nombre de souches isolées en 2017	55 (46.2%)	7 (5.8)	57 (48%)	119
Nombre de souches isolées en 2016	74 (42%)	9 (5%)	91 (53%)	174
Nombre de souches isolées en 2015	90 (54,5%)	7 (4,2%)	68 (41,2,%)	165
Nombre de souches isolées en 2014	53 (51%)	27 (26%)	20 (19,3%)	104

2.4.2. Distribution de souches de *Leishmania*

En 2017, 6 souches de *Leishmania* ont été fournies à divers laboratoires et institutions, dont la liste figure ci-dessous :

- 3 souches à American University of Beirut – Liban (Dr Hiba El Hajj),

- 3 souches à l'IHU Méditerranée Infection – Marseille.

Par ailleurs, 160 souches ont été distribuées en interne pour des projets propres au CNR (158 au Pr Laurence Lachaud et 2 au Dr Christophe Ravel).

2.4.3. Maintien et dynamique de la Collection de souches (Montpellier)

Le maintien de la Collection de souches du CNR fait appel à une logistique lourde, à une rigueur éprouvée et à une collaboration suivie avec de nombreuses équipes nationales et internationales. Le CNR-L s'emploie à faire vivre et progresser cette collection, devenue importante pour 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 que souhaitent les chercheurs.

En 2017, le travail de "**curage**" de la Collection entamé par le Pr Laurence Lachaud a été poursuivi.

- Le **catalogue des souches** en ligne sur le site Internet du Laboratoire a été revisité avec, avant mise sur le site, un contrôle rigoureux de tous les renseignements relatifs à ces souches. Un certain nombre de souches a dû être enlevé du catalogue en raison de l'absence de certains renseignements, aujourd'hui considérés comme nécessaires par le Comité scientifique du CNR. D'autres souches ont été ajoutées. Le nombre actuel de souches sur le catalogue reste aux environs de 245 (chiffre approximatif car en évolution). Toutes les souches conservées ou mises au catalogue ont été typées en MALDI-TOF et sont représentatives de l'ensemble de la Collection.

- **Enrichissement des données** associées aux souches à partir de travaux réalisés avec des 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.
- typage systématique par MALDI-TOF
- données cliniques plus précises pour les leishmanioses cutanées (nombre de lésions, aspect des lésions, localisations)

Ces données, avec les références correspondantes, sont intégrées à la fiche électronique de chaque souche concernée. Ce travail long et minutieux est encore en cours, encadré par le nouveau curateur, Dr Laurence Lachaud, avec l'aide de l'ancien curateur Dr Francine Pralong. Il constitue une valorisation importante des souches de la Collection.

- Les souches référencées comme marqueurs OMS et marqueurs de zymodèmes ont été sécurisées au CNR-L en plusieurs aliquotes.

- Les doublons ont été repérés et fusionnés lorsque c'était possible.

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.

2.5. Activités d'expertise

Activité d'expertise		Nombre
Expertise diagnostique (nombre d'échantillons réceptionnés)	Laboratoire Coordonnateur (Montpellier). Origine : CHU et CH essentiellement	677
	Laboratoire Associé (Cayenne). Origine: CH Cayenne et CDPS essentiellement	344
Identification moléculaire	Identification/demandes; Laboratoire Coordonnateur (Montpellier)	96/297
	Identification/demandes Laboratoire Associé (Cayenne)	70/200
Identification par MALDI-TOF	Laboratoire Coordonnateur (Montpellier)	95
	Laboratoire Associé (Cayenne)	76
Nombre de souches réceptionnées ou isolées	Laboratoire Coordonnateur (Montpellier). Origine : CHU et CH (essentiellement Cayenne) + HIA	109
	Laboratoire Associé (Cayenne). Origine : CH Cayenne et CDPS essentiellement + CMIA	119

2.5.1. 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

Au Laboratoire coordonnateur :

En 2017, 677 échantillons pour diagnostic moléculaire de leishmaniose ont été analysés (59% pour des formes viscérales, 41% pour des lésions cutanées), ce qui représente une augmentation de 30,6% par rapport à 2016. Les demandes provenaient du CHRU de Montpellier (26 %) mais également de 64 Centres hospitaliers français (CH ou CHU). 17 % des prélèvements se sont avérés positifs, dont environ 81 % pour des formes cutanées.

Le délai moyen de rendu de l'identification est de 4,4 jours + ou - 2

Il est à noter que ces demandes diagnostiques sont une source essentielle d'informations pour la surveillance, et fournissent une réelle capacité d'alerte, ainsi que des occasions répétées de conseil aux professionnels de santé (Dr C. Ravel).

Au Laboratoire Associé (L-A) de Cayenne :

En 2017, 344 demandes de diagnostic de leishmaniose cutanée ou cutanéomuqueuse ont été enregistrées, avec 212 recherches microscopiques, 303 recherches en culture et 198 recherches par biologie moléculaire. De plus, 13 autres demandes concernant 12 patients concernaient la recherche de leishmaniose viscérale avec recherche spécifique d'ADN de *L. infantum* (2), examen direct dans la moelle osseuse (3), culture à partir de moelle osseuse (4) ou à partir de sang (6).

Les demandes correspondent à 323 patients (22 patients ont eu au moins 2 demandes de recherche de leishmaniose).

Ces demandes sont issues de :

- CH de Cayenne : 97 (soit 28,1% contre 31% en 2016)
- CH de Saint Laurent du Maroni : 66 (19,1% contre 10% en 2016)
- Centre Medical InterArmée (CMIA) : 11 (3,1% contre 4% en 2016)

- Centres Délocalisés de Prévention et de Soins (CDPS) : 171 (soit 49,7% contre 53,5% en 2016), répartis entre :

Maripasoula :	110/171 (64.3% contre 63% en 2016)
Camopi :	15/171 (8.7%)
Saint Georges :	11/171 (6.4%)
Papaïchton :	9/171 (5.2%)
Grand Santi :	8/171 (4.6%)
Cacao :	6/171 (3.5%)
Trois Sauts :	5/171 (2.9%)
Regina :	4/171 (2.3%)
Saül :	2/171 (1.2%)
Antecum Pata :	1/171 (0.6%)

Cette répartition est relativement proche de celle de 2016 avec une forte demande en provenance des CDPS (Centre délocalisés de soins et prévention), majoritaire.

Sur ces 344 demandes, **le nombre de cas positifs toutes techniques confondues est de 187.**

Tableau IV. Synthèse de l'activité diagnostique du L-A de Cayenne de 2012 à 2017

	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Nombre de demandes de LC	215	409	669	809	461	344
Nombre de patients toutes techniques confondues	142 (66%)	140 (34%)	249 (37%)	358 (44%)	308 (67%)	187 (54%)
Nombre de souches isolées		47	102	165	174	119

Le nombre de demandes est en diminution par rapport à l'année 2016 (près de 25% en moins), avec une nette diminution des cas (Tableau V). La diminution est globale et ne concerne pas un centre particulièrement. Cette tendance doit être confirmée dans le temps et dans l'espace.

- Diagnostic immunologique

En 2017, 228 sérologies leishmaniennes ont été réalisées. Ces chiffres sont en légère augmentation par rapport à 2017.

2.5.2. Identification moléculaire

2.5.2.1. Laboratoire coordonnateur

Le typage moléculaire est réalisé en routine depuis 2006.

En 2017, 297 demandes de typage moléculaire ont été reçues (soit 30% de plus qu'en 2016), dont 96 qui ont donné lieu à une identification. Au total, 8 espèces de *Leishmania* ont été identifiées, avec toujours une prédominance de *L. major* (48 %). Les espèces impliquées pour 25 cas du Nouveau Monde ont été également identifiées, dont 14 *L. guyanensis*, 7 *L. braziliensis*, 2 *L. naiffi*, 1 *L. amazonensis* et 1 *L. mexicana*.

Par rapport à l'année précédente, les identifications faites par le Laboratoire coordonnateur ne confirment pas la relativement forte représentation de *L. braziliensis* observée en 2016 en Guyane.

2.5.2.2. Laboratoire-Associé de Cayenne

L'identification de l'espèce est réalisée en routine à Cayenne par PCR-RFLP depuis 2006. Depuis 2009, elle est appliquée à la grande majorité des cas vus en Dermatologie à Cayenne (90% en 2015), et, de plus en plus, aux cas des patients vivant dans les Centres de santé de la Guyane en zone isolée. En 2017, 200 demandes de typage moléculaire ont été faites, avec 90 détections positives et 70 identifications d'espèce rendues. Dans de nombreux cas, la quantité d'ADN étant trop faible, la détermination de l'espèce par RFLP n'a pas pu être faite.

	Nombre	Pourcentage
<i>L. guyanensis</i>	62	68,9%
<i>L. braziliensis</i>	8	8,9%
<i>L. lainsoni</i>	0	0%
<i>L. naiffi</i>	0	0%
<i>L. amazonensis</i>	0	0%
Indéterminée	20	22,2%

Ces demandes d'identification proviennent en majorité des CDPS (47,5%) puis du CH de Cayenne (29,5%), du CH de Saint Laurent du Maroni (20%) et du Centre Medical InterArmées (3%).

Le délai entre l'enregistrement du prélèvement au laboratoire et la restitution des résultats varie entre 18 et 41 jours. Le délai moyen de restitution se situant autour de 29 jours. Ce délai élevé s'explique par le fait qu'en l'absence d'équipement et d'un personnel dédié à cette activité au sein du CHAR, les identifications d'espèce par PCR-RFLP se font sur le site de l'Université de Guyane.

Avec la création et livraison de la plate-forme de biologie moléculaire sur le site de l'hôpital, et le recrutement d'un ingénieur de recherche en décembre 2017, le LA devrait être en mesure d'effectuer l'identification sur place et donc de réduire le délai de restitution.

2.5.3. Identification par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

Au Laboratoire Coordonnateur, la banque de données d'identification des *Leishmania* construite en collaboration avec l'équipe du Pr R. Piarroux (initialement à La Timone, Marseille et actuellement à La Pitié Salpêtrière, Paris) a été mise en ligne. Actuellement, toutes les souches qui arrivent au CNR sont typées avec cette méthode. Des développements pour l'amélioration de la base de données sont en cours.

La technique de MALDI-TOF permet de rendre un résultat d'identification en moyenne 4 à 5 jours après la réception de la souche.

Tableau V.- Détail des 95 identifications par MALDI-TOF des souches reçues par le CNRL (Montpellier) en 2017

Espèces	Nombre
<i>L. amazonensis</i>	3
<i>L. braziliensis</i>	1
<i>L. garnhami</i>	1
<i>L. guyanensis</i>	74
<i>L. infantum</i>	3
<i>L. killicki</i>	1
<i>L. lainsoni</i>	1
<i>L. major</i>	9

<i>L. mexicana</i>	1
<i>L. naiffi</i>	1
<i>L. panamensis</i>	8
<i>L. peruviana</i>	3
<i>L. tropica</i>	2

Le **LA de Cayenne** a débuté la mise en place de cette technique en mai 2016, en parallèle avec la technique de PCR-RFLP et en collaboration avec Marseille et le Laboratoire Coordonnateur. Durant l'année 2017, l'identification par MALDI-TOF s'est mise progressivement en place en routine au CNL-LA et tend à devenir le diagnostic à réaliser en systématique dès lors que la culture le permet.

Sur les 303 demandes de **culture** enregistrées en 2017, 121 (39.8%) ont été positives, 66 négatives (21.7%) et 117 (38.5%) ont révélé la présence d'un contaminant (levures et/ou bactéries). La contamination des cultures reste problématique puisque pour seulement 45 cultures sur 117 (soit dans 38,5% des cas), un autre examen (microscopie et/ou PCR) a donné un résultat positif. Sur les 121 cultures positives en 2017, le MALDI-TOF a permis l'identification d'espèces sur 76 demandes réparties comme suit :

	Nombre	Pourcentage
<i>L. guyanensis (complexe)</i>	64	84,2%
<i>L. braziliensis (complexe)</i>	6	7,9%
<i>L. amazonensis</i>	5	6,6%
<i>L. lainsoni</i>	1	1,3%
<i>L. naiffi</i>	0	0%

Le délai entre l'enregistrement du prélèvement au laboratoire et la restitution des résultats varie entre 12 et 30 jours. Le délai moyen de restitution se situe autour de 24 jours.

La combinaison en 2017 des **résultats du MALDI-TOF et la PCR-RFLP au LA de Cayenne** a permis de rendre le diagnostic d'espèce dans 146 des 185 positifs (78.4%) (cf. § 3.2.3.2).

2.5.4. Sensibilité in vitro des souches de *Leishmania* aux produits anti-leishmaniens

Devant l'absence de centre expert en France dans ce domaine, le CNR-L a mis en place depuis 2007 des tests de chimiosensibilité des *Leishmania* aux anti-leishmaniens.

Les tests de chimiosensibilité sont exceptionnellement demandés chez ce parasite, et posent un problème d'interprétation en raison des différences notables observées entre amastigotes et promastigotes de la même souche. Aucune demande n'a été enregistrée en 2017.

2.5.5. Activités de séquençage

Le CNR-L n'a effectué aucune activité de séquençage à haut-débit cette année. Sa seule activité de séquençage est réservée au séquençage des produits de PCR à des fins de typage. Le CNR aurait accès à une plate-forme de séquençage externe au CNR (MGX-Montpellier) où les technologies les plus avancées sont proposées.

Malgré l'intérêt pour ce type d'approche, plusieurs obstacles en limitent la réalisation :

- la limitation la plus flagrante est celle du coût;
- la seconde est celle du temps disponible, pris en bonne partie par les exigences de l'accréditation des laboratoires (environ 1,4 ETP biologiste du CNR);
- la troisième est l'absence d'expertise en bio-informatique.

3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

- Augmentation du nombre de cas déclarés au CNR-L en France métropolitaine. Les cas en provenance du Maghreb continuent de progresser, avec des formes cutanées à localisations multiples qui répondent mal au traitement dans un certain nombre de cas. Le nombre de cas à contamination autochtone restent stables. Le nombre de LV demeure stable avec toujours une prédominance de sujets adultes non immunodéprimés
- Diminution du nombre de cas diagnostiqués ou contaminés en Guyane, qui constituent néanmoins 61% des cas déclarés. La proportion de LC à *L. braziliensis* revient à un niveau antérieur autour de 12% des cas.

La surveillance a pour but d'évaluer la persistance et la dynamique des foyers autochtones d'endémie leishmanienne, et d'essayer d'anticiper les implications de cette affection au plan de la santé publique, en particulier 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'éventuels cas groupés ou 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, qui a été récemment modifiée afin d'en faciliter l'usage.*

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 demandes de diagnostic, de même que les envois 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. Description du réseau de partenaires

Le **réseau** de partenaires mis en place au fil des ans par le CNR reste fort. Il constitue un maillage sur l'ensemble du territoire métropolitain pour Montpellier et sur l'ensemble du territoire guyanais pour Cayenne. Il comprend essentiellement des laboratoires de CHU pour Montpellier et des laboratoires des CH et des CDPS (centres de santé) pour Cayenne. Les Centres de Santé des Armées constituent également des partenaires importants, plus ou moins réguliers selon les années. Le réseau se montre stable au fil des ans. Tous les CHUs reçoivent annuellement une sollicitation via le réseau ANOFEL pour déclarer les cas diagnostiqués.

Par ailleurs, depuis 2015, des relations plus fortes ont été établies entre Montpellier et le **L-A de Cayenne**; les relations sont fluides et des collaborations plus étroites ont été initiées. La visite de Patrick Bastien à Cayenne à l'automne 2016 a permis d'apprécier les fortes contraintes imposées au L-A par le contexte local et les potentialités offertes dans ce Département où la leishmaniose est un problème de santé publique particulièrement important.

*** Centre coordonnateur (Montpellier) :**

La liste des Services ayant déclaré au CNR-L des cas de leishmanioses en 2017 figure ci-dessous.

Pour les CHU : les Laboratoires de Parasitologie-Mycologie des CHU suivants : Amiens, (80), Angers (49), Bordeaux (33), Caen (14), Dijon (21), Grenoble (38), Lille (59), Lyon (69), Marseille (13), Montpellier (34), Nancy (54), Nantes (44), Nice (06), Nîmes (30), Reims (51), Rennes (35), Rouen (76), Tours (37), divers établissements de l'AP-HP à Paris (75) (Bichat, Cochin-St Vincent de Paul, St-Antoine, St-Louis, Pitié-Salpêtrière, Necker). Avicenne à Bobigny (93).

Pour les CHG : CH Alpes-Léman, CH Annecy (74), CH Avignon (84), CH Carcassonne (11), CH Métropole Savoie (74), CH Metz (57), CH Pau (64) CH de Perpignan (66), CH Montreuil (93), CH Orléans (45), CHD de Tourcoing (59), CH de Valenciennes (59), et CH St Luc Bruxelles.

Pour les Hôpitaux d'Instruction des Armées : HIA Legouest à Metz (57), HIA Bégin à Saint Mandé (94) et HIA Desgenettes à Lyon (69), Toulon (83), Brest (29).

Pour le Service de Santé des Armées : Département d'Epidémiologie et Santé publique.

Le réseau de partenaires, regroupant quasiment l'ensemble des CHU, est estimé couvrir de façon pratiquement exhaustive les cas diagnostiqués en métropole. Cependant, l'étude de l'exhaustivité qui était prévue n'a pas pu être mise en place.

*** Laboratoire Associé (Cayenne) :**

Le Laboratoire-Associé (LHUPM) de Cayenne a établi un réseau important de partenaires sur le territoire. Le L-A reçoit un certain nombre de prélèvements, accompagnés de données cliniques et épidémiologiques dans environ deux-tiers des cas (entre 65 et 73%), adressés par les divers laboratoires et centres de soins de la Guyane :

- **Cayenne :** CH Andrée Rosemon, Institut Pasteur de Cayenne, CMIA (Service de Santé des Armées)
- **Saint-Laurent-Du-Maroni :** laboratoire du CH de Saint-Laurent-Du-Maroni, CMIA (Service de Santé des Armées)
- **Kourou :** Laboratoire du CH de Kourou, CMIA
- Autres **CDPS** (centres de santé) de la Guyane.

Le service de Dermatologie, du fait de son ancienneté et de sa renommée, draine la majorité des cas pour les personnes pouvant se rendre à Cayenne. Le diagnostic est réalisé par l'examen parasitologique direct, mais aussi par culture et PCR. La démarche hospitalière (CH de Cayenne) est étendue aux postes et Centres de Santé de l'intérieur de la Guyane (qui sont sous son autorité administrative et médicale).

La transmission au CNR (Montpellier) des informations sur les cas de leishmaniose diagnostiqués se fait de façon annuelle sous forme d'un fichier Excel après anonymisation selon les fiches de déclaration fournies : conservation sur micro-ordinateurs (2 endroits différents) avec accès par mot de passe.

Le réseau de partenaires mis en place par le L-A permet d'apprécier de façon pratiquement exhaustive les cas diagnostiqués au CH de Cayenne, dans les CDPS et sur le reste du territoire. Au fil des années, le réseau reste stable mais relativement fluctuant en terme d'activités de diagnostic de la leishmaniose cutanée.

3.2. Surveillance de l'infection et des caractéristiques des leishmanioses

3.2.2. Déclaration des cas

En 2017, 368 cas au total ont été déclarés au CNR-L : 184 fiches de déclaration de cas ont été reçues directement au CNR-L, provenant de structures de France métropolitaine (169 déclarations) et des Services de Santé des Armées (15 cas); le L-A de Cayenne a déclaré 184 cas de LC diagnostiqués en Guyane Française. Ceci représente une baisse globale de 15% par rapport à 2016 (435 cas), expliquée par une diminution des déclarations en Guyane de plus d'un tiers, compensée par une hausse des déclarations en Métropole de 45%.

La répartition de ces cas **selon la forme clinique** pour l'année 2017 se fait de la façon suivante (toutes structures confondues) :

- 24 cas de leishmanioses viscérales, dont 7 cas d'autochtones, 8 dont l'origine était indéterminée, et 9 où la contamination avait eu lieu hors de France.
- 352 cas de leishmanioses cutanées (dont 3 autochtones de France métropolitaine),
- 2 cas de leishmaniose cutanéomuqueuse (avec une contamination en Guyane et une en France).

N.B. 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.

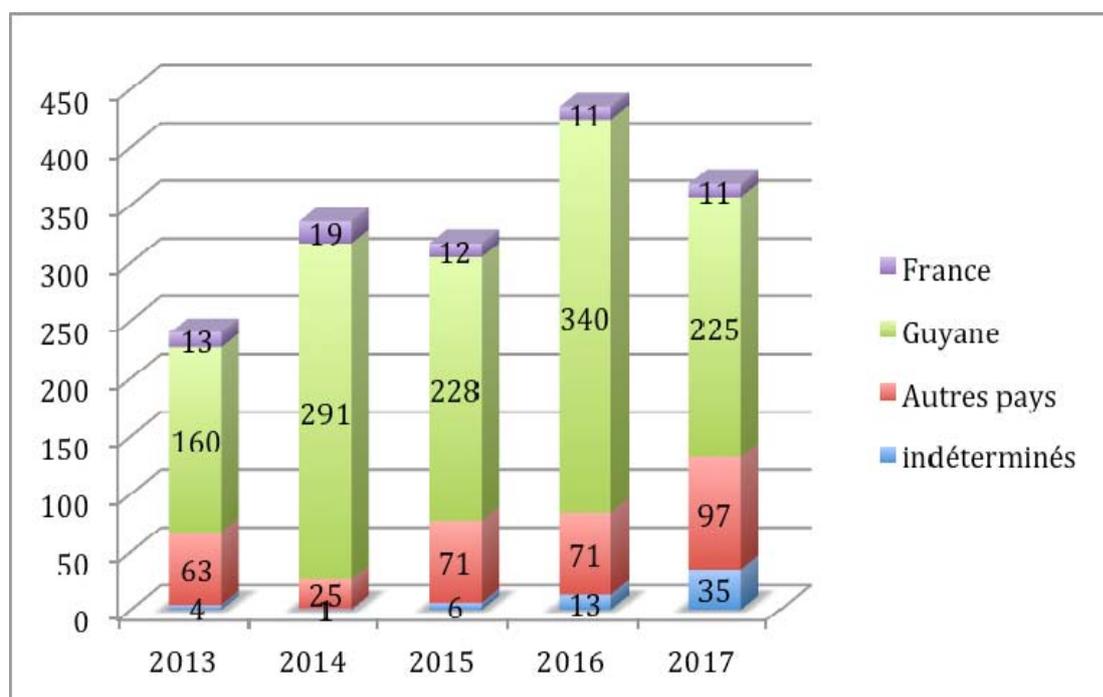
Le Tableau VI et la Figure 4 montrent la répartition de ces cas **selon l'origine géographique** des contaminations.

Les principaux changements observés par rapport à 2016 sont une nette diminution des cas de Guyane Française, ne représentant plus que 61% au lieu de 78% des cas, une légère augmentation des cas du Maghreb (15% versus 11%) et une augmentation notable des cas non renseignés ou indéterminés (9% versus 3%).

Tableau VI. Lieux de contamination pour l'ensemble des cas de leishmanioses déclarés au CNR-L en 2017.

Forme clinique	Origine de la contamination							Total
	France métropolitaine	Maghreb (Algérie, Tunisie, Maroc)	Guyane et pays limitrophes	Antilles	Autre pays (ou plusieurs pays possibles)	Indéterminée ou non renseignée		
L. viscérale	7	0	0	0	9	8	24	
L. cutanée	3	57	224	0	31	27	342	
L. muqueuse	1	0	1	0	0	0	2	
Total	11 (3%)	57 (15%)	225 (61%)	0	40 (11%)	35 (9%)	368	

Figure 4. Nombre de cas de leishmaniose déclarés au CNR-L de 2013 à 2017 en fonction du lieu de contamination



3.2.3. Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances

3.2.3.1. France métropolitaine

Leishmanioses autochtones/importées : en 2017, 11 cas de leishmanioses autochtones (7 viscérales, 3 cutanées et 1 muqueuse) ont été déclarés. Le nombre de cas importés est beaucoup plus élevé (138 cas dont 9 LV, 128 LC et 1 LCM). Pour environ 35 cas, il n'a pas été possible de déterminer l'origine de la contamination (voyages ou résidences multiples en particulier).

Evolution : Le nombre de cas de leishmanioses déclarés au CNR-L par des structures de santé en France métropolitaine a augmenté par rapport à 2016 (Tableau VII), et cela peut être mis sur le compte des cas de LC importées. Lissés sur 5 ans, la moyenne annuelle des cas a augmenté de 114 sur 2012-2016 à 130 sur 2013-2017.

Les cas autochtones restent à leur niveau le plus bas depuis au moins 2006, même si les chiffres soient toujours faibles (min. 11, max. 31).

Le nombre de contaminations ayant eu lieu dans les pays du Maghreb a continué de monter à un niveau relativement élevé avec 57 cas (*versus* 16 en 2014). De plus, de nombreux cas de LC dues à *L. major* nous ont été signalés comme des localisations cutanées multiples présentant des difficultés de prise en charge thérapeutique. Une enquête est en cours auprès de nos collègues marocaines et des discussions sont menées pour définir une prise en charge thérapeutique efficace.

Tableau VII. Evolution du nombre de déclarations annuelles des cas faites au CNR-L (hors CH Cayenne) entre 2013 et 2017.

Années		2013	2014	2015	2016	2017	Total	Moyenne annuelle 2013-2017
Cas autochtones (France métropolitaine)	LV	8	11	8	8	7	42	8,4
	LC	4	6	5	3	3	21	4,2
	LM	1	2	0	0	1	4	<1
	Total	13	19	13	11	11	67	13,4
Cas importés (en France métropolitaine)	LV	9	5	9	6	9	38	7,8
	LC	63	25	71	64	88	311	62,2
	LC Guyane	22	49	29	31	40	171	34,2
	LM	0	1	0	2	1	4	<1
	Total	94	79	109	103	138	523	104,6
Origine indéterminée (LV + LC)		4	1	6	13	35	59	11,8
Total		111	99	128	127	184	649	129,8

Pathologie :

En 2017, le nombre de formes viscérales est stable, par contre le nombre de cutanées importées est en augmentation.

Sur l'ensemble des 128 cas de LC diagnostiqués en France métropolitaine, autochtones ou importés et associés à des données fiables, 65 étaient des formes cutanées multiples.

Deux cas étaient des leishmanioses cutanéomuqueuses.

Autres données patients :

Pour les 24 cas de LV, le facteur immunodépression était renseigné dans 18 cas : seulement 5 patients présentaient une immunodépression, (données identiques à 2015 où 6 cas étaient rapportés versus 0 en 2016).

Trois cas seulement sont survenus chez des enfants âgés de moins de 10 ans. Ainsi, en France, la LV continue de toucher plus souvent des adultes relativement jeunes (moyenne d'âge de 40,5 ans [1-76 ans]).

On notera également comme retrouvé précédemment un sex ratio très biaisé (H/F = 2,4/1), avec seulement 7/24 cas chez des femmes.

Distribution géographique :

* En 2017, comme les autres années, la majorité des cas déclarés avaient été contaminés en Guyane (224/368, 61%). La seconde région grande pourvoyeuse de cas reste le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie), avec 36% (57/159) des cas de formes cutanées diagnostiqués en métropole.

* Pour les **leishmanioses autochtones**, comme en 2016, les cas avec un lieu de contamination précis (5 LV, 1 LCM et 1 LC) provenaient de trois départements du sud de la France (Alpes-Maritimes, Bouches-du-Rhône, et Pyrénées orientales), situés dans la zone d'endémie leishmanienne connue, et les autres du Sud de la France sans précision.

3.2.3.2. Guyane Française (synthèse)

La situation en Guyane Française a été détaillée dans le dossier de demande de renouvellement du CNR.

Aux cas diagnostiqués et déclarés par le L-A de Cayenne s'ajoutent les cas diagnostiqués et déclarés par divers établissements de santé en France métropolitaine. Les chiffres donnés ci-dessous s'appuient sur ces deux types de notifications.

Pour l'année 2017: on retrouve un total de 229 (228 LC et 1 LCM) cas de contamination en Guyane ou dans les pays limitrophes (voir Tableau VI), soit une diminution d'environ 1/3 des cas.

- Le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (Pr. M. Demar) du Centre Hospitalier de Cayenne nous a adressé 184 déclarations de cas de LC diagnostiqués en Guyane Française, soit 40% de moins qu'en 2016. Sur 32 fiches renseignées sur ce paramètre, le lieu de contamination retrouvé correspondait dans 75% des cas à des sites situés en Guyane. Les autres lieux de contamination correspondaient aux pays limitrophes (Surinam et Brésil). On notera que le niveau de remplissage des fiches est très variable selon le paramètre et 37 fiches n'ont pas été remplies (aucun renseignement clinique autre que l'état-civil du patient). Le niveau de remplissage des fiches pour le paramètre "Profession" est de 59%, celui de "Lésion cutanée" de 43%, celui du "Siège des lésions" de 53%, en diminution sur ces trois paramètres.
- 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 déclaré 12 cas de LC avec une contamination en Guyane.
- De plus, parmi les déclarations de cas de LC et LCM envoyées par les diverses structures sanitaires métropolitaines, 29 concernaient une contamination en Guyane.

Le nombre de cas originaires de Guyane est ainsi **en diminution cette année** sans qu'une explication pertinente n'apparaisse à l'évidence. Avec 184 cas déclarés en Guyane et 229 cas déclarés au total, l'incidence annuelle de la LC en Guyane Française en 2017 serait identique à 2015, soit 0,91 p.1000 (sur la base de 250.000 habitants), alors qu'elle était de 1,36 p.1000 en 2016, et un peu inférieure à 1 p.1000 en 2015 et 2014.

Tableau VIII. Cas de leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse contractés en Guyane en 2017, en fonction de la source de déclaration.

Déclarations	Nb total	Sexe		Statut		
		H	F	militaire	civil	non rens.
Centres de Santé de France métropolitaine	29	25	4	8	21	-
CH Cayenne	184	121	45	9	-	175
HIA et SS des Armées	12	12	-	12	-	-
Total	225	158	49	29	21	175

Pathologie :

Tous les cas de contamination en Guyane Française étaient des LC, excepté 1 cas de leishmaniose cutanéomuqueuse. Aucune leishmaniose viscérale n'a été détectée.

Autres données patients :

L'infection est survenue chez 3 patients VIH-positifs dont deux ayant développé une infection à *L. guyanensis*.

En 2017, le **sex-ratio** H/F pour les cas où cette donnée était connue était de 2,75 (110 hommes pour 40 femmes). Il était de 3,9 (595 hommes pour 152 femmes) durant la période 2011-2015. Ceci est à mettre en relation avec les activités forestières (orpaillage, bucheron..), essentiellement masculines.

Agents pathogènes en cause :

En Guyane, *L. guyanensis* reste l'espèce prépondérante en 2017, à un niveau équivalent à celui des années antérieures. Le CH de Cayenne rapporte environ 10% des cas à *L. braziliensis*; mais, en cumulant les identifications réalisées au LA de Cayenne et au Laboratoire Coordonnateur, on obtient 12,4% des cas à *L. braziliensis*, espèce qui maintient donc une visibilité et une présence constante depuis plusieurs années, après s'être maintenue autour de 13% jusqu'à 2015, et une baisse inexplicable en 2014 et 2016.

Un examen de l'évolution depuis 2011 (Tableau IX) montre des fluctuations relativement importantes de la répartition des différentes espèces, mais sur le moyen terme une situation globalement stable. Les chiffres confirment donc l'implantation réelle de *L. braziliensis* en Guyane avec une prévalence qui peut être évaluée en moyenne à 10% des cas.

Les espèces telles que *L. lainsoni*, *L. naïffi* ou *L. amazonensis*, bien que minoritaires (environ 5% des cas), sont de répartition plus diversifiée.

Tableau IX. Identifications des espèces de Leishmania en cause en Guyane de 2011 à 2017.

	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Nombre d'identifications	96	104	92	222	198	270	170
<i>L. guyanensis</i> (%)	85,4	78,8	83,7	92,2	67	89,3	82,4
<i>L. braziliensis</i> (%)	13,5	14,4	13	5	12,6	3,2	12,4
<i>L. amazonensis</i> (%)	0	5,8	2,2	2,3	5,5	0,7	3,5
<i>L. lainsoni</i> (%)	1	1	1,1	0,4	2	2,5	0,6
<i>L. naïffi</i> (%)	0	0	0	0	0,05	0,7	1,2

N.B. Les résultats de 2017 ont été obtenus en combinant les résultats du MALDI-TOF et la PCR-RFLP au LA de Cayenne.

Distribution géographique et temporelle :

On note que l'augmentation des diagnostics portés pour les patients des **Centres de santé (CDPS)**, passée de 20% à 46,5% entre 2014 et 2015, s'est stabilisée en 2016 et 2017, avec respectivement 59% et 52% des cas rapportés.

Tableau X. Origine des cas de leishmaniose en Guyane par centre de santé

Cas déclarés	2014	2015	2016	2017
CDPS	20 (20%)	93 (46,5%)	180 (59%)	96 (51,9%)
Hôpitaux	53 (53%)	95 (47,5%)	114 (37%)	79 (42,7%)
CMIA	27 (27%)	12 (6%)	13 (4%)	10 (5,4%)
	sur 100 cas	sur 200 cas	sur 308 cas	sur 184 cas

Sur les 14 cas de *L. braziliensis* détectés cette année, 10 (71,4%) proviennent des CDPS, contre 44% en 2016 et 48% en 2015. Et 7 cas sur ces 10 ont été diagnostiqués dans l'Ouest

(Maripasoula) contre 3 cas à l'Est. Ceci pourrait être en rapport avec l'immigration en provenance du Brésil dans les zones forestières.

La distribution temporelle des cas de leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses en Guyane suit toujours une certaine saisonnalité avec un grand nombre de cas durant la saison des pluies de décembre à mai (77,3% des cas) puis une baisse des cas durant la saison sèche de juin à novembre (22,7%).

Tableau XI. Répartition des cas en fonction de la date de prélèvement.

Mois	Janv.	Fev.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juil.	Aout	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.
Cas	45	30	27	11	16	17	6	3	3	5	8	14

3.3. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Des tests *in vitro* de sensibilité des Leishmanies aux drogues, en particulier à l'amphotéricine B, ont été mis au point au CNR depuis 2005. Cependant, (1) les résistances documentées à la fois *in vivo* et *in vitro* sont rarissimes et (2) les demandes sont également très rares. Aucune demande n'a été enregistrée en 2017.

3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

3.4.1. Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France (échanges de données, périodicité, analyse commune)

En Guyane française, une demande émanant de l'ARS visait à préparer et diffuser une maquette d'information sur la leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse à l'ensemble de la population. Le L-A du CNR a contribué à la rédaction du texte. L'étape d'édition et de diffusion est en cours.

Le recrutement d'une PH en Infectiologie affectée à mi-temps aux CDPS a contribué à la déclaration et surveillance des cas, de même qu'à la sensibilisation de la pathologie auprès des personnels. La forte demande émanant des CDPS en est la preuve. Des formations dispensées par le service de Dermatologie sont proposées aux personnels se rendant dans les CDPS portant sur la confection de frottis et de biopsies cutanées.

3.4.2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux

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 2017, 5 cas de co-infection VIH/*Leishmania* ont été rapportés :

- 2 cas de LV chez des patients VIH+ sur le territoire métropolitain (1 cas de contamination en Georgie et 1 en France métropolitaine);
- 3 cas de LC chez des patients VIH+ en Guyane (dont deux à *L. guyanensis*, typage de souche infructueux pour le 3^{ème} patient), sans critères de sévérité.

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

4. ALERTE : DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES ET DES PHENOMENES ANORMAUX

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.

Les cas importés d'Algérie, Maroc et Tunisie, ainsi que ceux de Guyane Française, font l'objet d'une surveillance particulière : le nombre de cas importés d'Afrique du Nord est de 57 cas en 2017, ce qui est en augmentation par rapport à l'incidence annuelle moyenne calculée sur les 6 dernières années; 36 cas provenaient du Maroc (63%), et environ la moitié des patients présentaient des localisations multiples. De plus, le traitement classique s'étant révélée inefficace pour plusieurs patients, une concertation entre différents médecins est en cours pour améliorer la prise en charge thérapeutique.

L'endémicité en Guyane Française apparaît difficile à estimer car les lieux de contamination ne sont pas toujours précisés. En 2017, l'incidence de la leishmaniose a baissé mais demeure relativement élevée, au même niveau que 2015 (soit 0,91 p. 1000). Lissée sur les 7 dernières années, la situation en Guyane apparaît relativement stable.

Aucun événement de cas groupés n'a été signalé durant cette période.

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

5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé

5.1.1. Enseignements et formations

Dans les deux Laboratoires du CNR, une formation est dispensée aux Internes concernant les prélèvements de leishmaniose cutanée.

En Guyane :

- Le LHUPM accueille des Internes de spécialités de biologie médicale et des internes de spécialité de DESC de Pathologie Infectieuse et Tropicale. Il veille à les sensibiliser sur la surveillance épidémiologique et les outils diagnostics.
- Il en est de même pour le service universitaire de Dermatologie tropicale. Le service accueille 3 internes de spécialité DES de Dermatologie de même que des internes de spécialité de DESC de Pathologie Infectieuse et Tropicale. Ils participent à la prise en charge clinique, diagnostique et thérapeutique des patients et effectuent les prélèvements des frottis cutanés et cutanéomuqueux de même que les biopsies.
- Une formation pour les prélèvements de lésions cutanées et/ou muqueuses suspectes de leishmaniose est réalisée pour les médecins affectés dans les Postes et Centres de Santé.

- Des fiches de protocole établies avec le service de Dermatologie et le LHUPM (L-A au CNR) sont aussi mises à disposition auprès des différents services et systèmes de soins, hospitaliers comme libéraux.

5.1.2. Accueil de stagiaires

En 2017 :

- Anna Fernandez et le Pr Montserrat Gallego, de l'Université de Barcelone (Facultat de Farmacia) sont venu effectuer un stage de 10 jours au CNR en mars 2017.

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

5.1.3. Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

5.1.4. Diffusion des données de surveillance et des productions du CNR

* Rétro-information aux partenaires : les rapports du CNR sont diffusés grâce au site Internet du CNR-L.

* Le **site Internet** du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, mis en ligne fin 2004 inclut les pages spécifiques au CNR-L (<http://www.parasitologie.univ-montp1.fr/cnrl.htm>). Il existe également en une version en langue anglaise, qui est à actualiser. 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 aux documents disponibles en ligne. Les pages du site incluent toute l'information sur la réglementation et les conditions d'expédition des souches, les démarches pour les demandes d'expertise ainsi que pour les déclarations de cas. Les activités du CNR-L y sont diffusées grâce à la mise en ligne des rapports d'activité (dernier rapport mis en ligne : rapport d'activité 2016 et demande de renouvellement 2017-2021).

Depuis 2011, le site Internet a fait l'objet de mises à jour régulières, en particulier pour introduire le Laboratoire-Associé de Cayenne, les nouvelles modalités d'envoi des souches, ainsi que l'actualisation des documents de demande de diagnostic, demande de souches et déclaration de cas.

En fin d'année **2017**, il a décidé d'individualiser les deux sites du CNRL et du CRB. Les deux sites seront hébergés sur la plateforme de l'Université de Montpellier, et seront disponibles dans le courant de l'année 2018 (cf. § 7.2.2).

5.1.5. Conseils aux professionnels de santé

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

Un conseil pour l'expertise diagnostique et thérapeutique est assuré par plusieurs praticiens du CNR-L. Les numéros de téléphone des praticiens concernés sont inscrits sur le site web du CNR. Les personnes référentes seront le Pr. Laurence Lachaud (leishmaniose viscérale) et le Pr Pierre Buffet (leishmanioses cutanées), ainsi que le Pr. Patrick Bastien.

Par ailleurs, une adresse mail commune (cnr-leishmania@chu-montpellier.fr) a été mise en place afin d'offrir une accessibilité plus simple et une possibilité de réponse plus rapide aux différentes requêtes.

Des conseils sont également donnés par le Dr Christophe Ravel à de nombreux praticiens de diverses structures de santé en France à propos de la prise en charge diagnostique, des diagnostics réalisés et des identifications d'espèces.

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. C'est pourquoi le CNR-L a mis en place depuis 2006 une structure de conseil thérapeutique téléphonique destinée aux médecins.

Ce conseil thérapeutique a été basé sur une collaboration entre le CNR-L à Montpellier et le Pr Pierre Buffet et le Dr Gloria Morizot, au départ au Centre Médical de l'Institut Pasteur de Paris, aujourd'hui à l'INTS/CHU Necker-Enfants Malades. Un numéro téléphonique est accessible aux médecins aux heures ouvrables, permettant de proposer 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. Le conseil est donné soit en direct soit dans les 48 h pour les cas complexes. 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 2017, 52 conseils thérapeutiques ont été donnés par l'équipe de Necker-Pasteur et 13 par celle de Montpellier.

En Guyane française, le Service de Dermatologie du CHAR est le service référent pour la prise en charge clinique et thérapeutique de la leishmaniose cutanée avec comme responsable référent, le Pr Pierre Couppié.

b) Conseil en matière de diagnostic et typage

Le Dr Christophe Ravel, responsable du diagnostic moléculaire des leishmanioses et de l'identification moléculaire des *Leishmania*, reçoit de nombreux appels téléphoniques provenant de praticiens de diverses structures de santé en France, à propos de la prise en charge diagnostique, des diagnostics réalisés et de l'interprétation des données de typage. Ces appels ne sont toutefois pas tracés.

Ils constituent une source importante de conseil aux professionnels de santé, mais aussi en retour, d'informations concernant d'éventuels regroupements anormaux de cas de leishmaniose ou d'augmentation d'incidence localisée.

5.2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires

- 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 CNR-L a été consulté fin 2016 et début 2017 par la **H.A.S.** pour expertise concernant les examens biologiques relatifs au diagnostic conventionnel, sérologique et moléculaire, des différentes formes de leishmanioses dans différents contextes cliniques. A la suite de cette concertation, l'HAS a publié des recommandations pour le diagnostic des leishmanioses (https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2751691/fr/actualisation-des-actes-de-biologie-medicale-relatifs-au-diagnostic-de-la-leishmaniose).

5.3. Conseil et expertise pour d'autres cibles (grand public...)

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

6.1. ACTIVITES DE RECHERCHE EN 2017

Le CNR-L participe à plusieurs programmes de recherche conduits dans le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie et dans l'unité labellisée "**Maladies infectieuses et vecteurs : écologie, génétique, évolution et contrôle**" ou "MiVEGEC" (UMR CNRS 5290/ IRD 224 / Université Montpellier, dir. F. Simard), à laquelle nous sommes rattachés depuis 2008.

Dans ce cadre, le CNR-L développe des projets spécifiques, orientés vers l'épidémiologie et la surveillance des leishmanioses.

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

Développé à l'initiative du Pr Johannes Blum (Université de Bâle), le groupe LeishMan (pour Leishmaniasis Management) travail à harmoniser les pratiques de prise en charge thérapeutique des patients atteints de leishmaniose. Il s'est réuni pour la première fois en janvier 2010 à Bâle et plusieurs fois depuis, avec la contribution 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, Suède, Portugal, Italie) ainsi que de Turquie, d'Israël et d'Australie. Associée à la prise en charge et au conseil thérapeutique, une base compilant les données cliniques, épidémiologiques et biologiques a été développée par le Pr Pierre Buffet. Elle a entre autres l'originalité de recueillir les options thérapeutiques qu'auraient choisies le clinicien sollicitant s'il n'avait pas eu accès au conseil (mesure de l'impact tangible de l'activité de conseil).

Au sein du groupe, le Dr C. Ravel participe en particulier à la réflexion sur l'identification moléculaire et les éléments de taxonomie du parasite, 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.

Depuis 2014, avec le soutien de l'ESCMID et la participation de UKNEQAS, une évaluation externe de la qualité (EEQ) portant sur l'identification moléculaire des différentes espèces de *Leishmania* a été mise en place entre 16 laboratoires européens; les résultats issus de ce travail ont été publiés en 2016 :

VAN DER AUWERA G, BART A, CHICHARRO C, CORTES S, DAVIDSSON L, DI MUCCIO T, DUJARDIN JC, FELGER I, PAGLIA MG, GRIMM F, HARMS G, JAFFE CL, MANSER M, RAVEL C, ROBERT-GANGNEUX F, ROELFSEMA J, TÖZ S, VERWEIJ JJ, CHIODINI PL. Comparison of *Leishmania* typing results obtained from 16 European clinical laboratories in 2014. *Euro Surveill.* 2016; 21(49).

Depuis 2016, un autre membre du CNR-L (L. Lachaud) à rejoint le groupe sur la thématique "Mise en place de recommandations thérapeutiques".

6.1.2. Identification des *Leishmania* par la technique du MALDI-TOF

Une nouvelle approche de typage des *Leishmania*, basée sur l'analyse de spectres de masse obtenus par la technique de Maldi-Tof (Matrix assisted laser desorption/ionization-Time of

flight) avait été initiée en 2015 en parallèle dans deux Centres collaborateurs du CNR, Marseille (Pr R. Piarroux) et Pitié-Salpêtrière (Pr P. Buffet), en collaboration avec le CNR.

Les premiers résultats montraient que cette technique permet de faire une pré-identification de l'espèce dans un délai extrêmement court à partir de parasites en culture. Un échantillonnage de 121 souches formellement identifiées par le CNR-L et couvrant 32 taxons différents a été utilisé pour la mise au point d'une technique d'obtention d'empreintes ("spectres") et pour la création d'une banque de spectres de référence. Cependant, la base de données n'était pas assez fournie. En collaboration avec le Centre Collaborateur de Marseille, le L.-A. de Cayenne et l'équipe du Pr Montserrat Gallego à Barcelone, une base de données beaucoup plus complète a été construite et testée. Sa validation a été effectuée par les 4 centres (Montpellier, Marseille, Cayenne et Barcelone) à partir de 268 isolats. Une application gratuite permettant l'identification en ligne à partir de fichiers bruts générés par l'automate de MALDI-TOF Bruker® a été conçue et validée. Cette étude a fait l'objet d'une publication en 2017 :

Lachaud L, Fernández-Arévalo A, Normand AC, Lami P, Nabet C, Donnadieu JL, Piarroux M, Djenad F, Cassagne C, Ravel C, Tebar S, Llovet T, Blanchet D, Demar M, Harrat Z, Aoun K, Bastien P, Muñoz C, Gállego M, Piarroux R. Identification of *Leishmania* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Using a Free Web-Based Application and a Dedicated Mass-Spectral Library. *J. Clin. Microbiol.* 2017 Oct;55(10):2924-2933.

La banque de spectres constituée est mise en ligne gratuitement avec des conditions d'accessibilité liées à la demande d'identifiant et de mot de passe. A notre connaissance, il s'agit de la seule banque de données de spectres aussi complète disponible dans le monde. Nous avons communiqué à différentes reprises sur ce sujet afin de faire connaître cet outil.

6.1.3. Autres travaux collaboratifs en recherche

En 2017, un travail collaboratif a été initié avec l'équipe du Pr Pierre Antoine Bonnet (Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier) et l'équipe du Dr Hiba El Hajj, (Department of Experimental Pathology, Immunology and Microbiology, Faculty of Medicine, **American University of Beirut**). L'objectif est de tester l'efficacité in vitro de nouvelles molécules candidates sur diverses souches et espèces de *Leishmania* dans des modèles promastigotes, amastigotes et murins.

La collaboration pour développer l'identification des *Leishmania* par MALDI-TOF avec l'équipe du Pr Renaud Piarroux (**AP-HP, Pitié-Salpêtrière**) continue. De nouveaux travaux menés devraient permettre d'affiner l'identification des espèces au sein des complexes *guyanensis* et *braziliensis* et *donovani*.

La collaboration avec l'équipe du Pr Montserrat Gallego (Facultat de Farmacia, **Universitat de Barcelona**) s'est poursuivie dans le cadre de la thèse d'université d'Anna Fernández-Arévalo. Elle concerne le typage de souches et l'épidémiologie des leishmanioses en pays catalan.

6.2. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DE 2017

Les publications et communications sont détaillées ci-dessous (en souligné les membres du CNR-L, en souligné pointillé les membres des Centres collaborateurs ou les doctorants).

6.2.1. Publications nationales

6.2.2. Publications internationales

LACHAUD L, FERNANDEZ-AREVALO A, NORMAND AC, LAMI P, NABET C, DONNADIEU JL, PIARROUX M, DJENAD F, CASSAGNE C, RAVEL C, TEBAR S, LLOVET T, BLANCHET D, DEMAR M, HARRAT Z, AOUN K, BASTIEN P, MUÑOZ C, GALLEGO M, PIARROUX R. Identification of *Leishmania* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Using a Free Web-Based Application and a Dedicated Mass-Spectral Library. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55(10):2924-2933.

SIMON S, NACHER M, CARME B, BASURKO C, ROGER A, ADENIS A, GINOUVES M, DEMAR M, COUPPIE P. [Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: revising epidemiology with PCR-RFLP](#). *Trop Med Health.* 2017; 45:5.

GINOUVES M, SIMON S, NACHER M, DEMAR M, CARME B, COUPPIE P, PREVOT G. [In Vitro Sensitivity of Cutaneous *Leishmania* Promastigote Isolates Circulating in French Guiana to a Set of Drugs](#). *Am J Trop Med Hyg.* 2017; 96(5):1143-1150.

TIRERA S, GINOUVES M, DONATO D, CABALLERO IS, BOUCHIER C, LAVERGNE A, BOURREAU E, MOSNIER E, VANTILCKE V, COUPPIÉ P, PREVOT G, LACOSTE V. [Unraveling the genetic diversity and phylogeny of *Leishmania* RNA virus 1 strains of infected *Leishmania* isolates circulating in French Guiana](#). *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(7):e0005764.

AKHOUNDI M, DOWNING T, VOTÝPKA J, KUHLS K, LUKES J, CANNET A, RAVEL C, MARTY P, DELAUNAY P, KASBARI M, GRANOUILAC B, GRADONI L, SERENO D. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med.* 2017; 57:1-29.

6.2.3. Chapitres de livres

6.2.4. Communications à congrès nationaux

LACHAUD L, FERNANDEZ-AREVALO A, NORMAND A C, LAMI P, NABET C, DONNADIEU J.L., PIARROUX M, CASSAGNE C, DJENAD F, BLANCHET D, DEMAR M, BASTIEN P, MUÑOZ C, GALLEGO M, PIARROUX R. Identification des *Leishmania* par spectrométrie de masse MALDI-TOF: validation d'une banque de données disponible via une application internet gratuite (Communication orale). Congrès de la Société Française de Parasitologie, Toulouse, Mars 2017.

6.2.5. Communications à congrès internationaux

LACHAUD L., FERNANDEZ-AREVALO A., NORMAND A.C., LAMI P., NABET C., DONADIEU J.L., PIARROUX M., DJENAD F., CASSAGNE C., RAVEL C., TEBAR S., LLOVET T., BLANCHET D., DEMAR M., HARRAT Z., AOUN K., BASTIEN P., MUÑOZ C., GALLEGO M., PIARROUX R. Identification of *Leishmania* by MALDI-TOF mass spectrometry: validation of a library for free web-application. (Communication affichée). Sixième Congrès Mondial sur les Leishmanioses (WorldLeish 6), Tolède, Mai 2017.

6.2.6. Conférences sur invitation dans congrès et réunions

LACHAUD L. Qu'attendre de la spectrométrie de masse en parasitologie: Exemple de *Leishmania*. Conférence aux 3èmes Journées Franco-maghrébines de Parasitologie-Mycologie, Alger, Octobre 2017.

7. COOPERATION AVEC LES STRUCTURES DE SANTE 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. Cette surveillance est fortement contributive à celle des leishmanioses humaines dans la mesure où le chien joue un rôle de "sentinelle" dans les foyers endémiques à *L. infantum*.

Rappelons que la leishmaniose canine n'est pas une maladie à déclaration obligatoire en France. Les diagnostics établis par les vétérinaires praticiens ne sont pas centralisés. Aucune activité de surveillance n'est vraiment formalisée.

Le Centre Collaborateur **Laboratoire Santé Animale (LSA) de l'ANSES à Maisons-Alfort (Dr Mohamed Kasbari / Dr Pascal Boireau)**, en raison de ses missions de diagnostic, de recherche, d'appui scientifique et technique auprès des tutelles, de veille et surveillance et de son expertise dans le domaine des maladies animales et zoonotiques, contribuait depuis 2009 à la surveillance de la progression des leishmanioses et des souches de leishmanies susceptibles de passer du réservoir animal à l'homme.

Pour des raisons indépendantes de notre volonté, l'ANSES a décidé d'arrêter cette activité, mettant un terme à la coopération en matière de surveillance et de veille entre le LSA de l'ANSES et le CNR, qui s'était traduite tant par des échanges d'informations sur les souches circulantes dans la faune, que de matériel biologique ou méthodologique.

En conséquence, aucune activité n'a eu lieu cette année au CNR-L concernant la leishmaniose animale.

8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR 2018-2019

Le programme d'activité pour 2018-2019 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.

8.1. Activités d'Expertise

8.1.1. Réseau de partenaires

Le CNR-L a un réseau de partenaires étendus, autant en métropole qu'en Guyane Française. Environ 120 établissements de santé au total, publics, privés ou des Armées, envoient des échantillons à Montpellier pour un diagnostic de leishmaniose.

De même, le L-A de Cayenne draine l'ensemble des diagnostics et des déclarations de cas pour cette forte zone d'endémie. Le L-A a le souci constant de veiller au maintien des contacts avec les prescripteurs, en particulier ceux des CDPS. Il continuera ses actions de sensibilisation et de formation qui ont porté leurs fruits au cours du quinquennal précédent. Il cherchera aussi à améliorer le recueil de données épidémiologiques et cliniques concernant les cas de leishmaniose

Par ailleurs, les liens continueront à être stimulés entre Montpellier et le L-A de Cayenne, dans le but de fluidifier les relations et d'entretenir des collaborations plus étroites. Des réunions téléphoniques sont prévues sur une base régulière. Des réunions en métropole pourraient avoir lieu à l'occasion du passage du Pr Magalie Demar. Des formations en biologie moléculaire sur le site de Montpellier pourraient être organisées pour l'ingénieur de recherche de Cayenne.

8.1.2. Evaluation de techniques de détection des *Leishmania*

D'assez nombreux kits de détection commerciaux sont maintenant proposés à travers le monde. Les cibles moléculaires visées sont peu nombreuses (gène kinétoplastique du cytochrome B en particulier) ou non décrites. Une évaluation comparative d'un certain nombre de ces kits devrait permettre d'établir s'il existe des différences significatives de sensibilité de détection entre eux. Le système non commercialisé actuellement utilisé au CNR (basé sur la technique développée par C. Mary et al., J Clin Microbiol. 2004, 42, 5249-55) pourra être comparé. Le CNR a accès à une collection importante d'ADN extraits à partir de prélèvements cliniques, cette collection sera un très bon matériel pour établir ces comparaisons.

D'autre part, le CNR envisage la constitution d'échantillons de sang artificiels lyophilisés destinés à permettre des comparaisons stables dans le temps au sein du CNR et entre Centres désirant comparer leurs techniques respectives.

8.1.3. Identification des *Leishmania*

L'évaluation de l'identification des souches de *Leishmania* sera poursuivie, avec maintien de deux approches :

- l'identification moléculaire, devenu le typage de référence dans le Laboratoire coordonnateur ; à noter que seule cette méthode autorise un typage des *Leishmania* in situ dans les échantillons humains.
- le typage par MALDI-TOF qui sera évalué de façon exhaustive (voir ci-dessous). Pour les souches, cette technique rapide et bon marché pourrait remplacer en partie l'identification moléculaire. Par contre, si sa facilité d'utilisation pour le typage rapide de souche ne

semble pas faire de doute, il sera indispensable d'évaluer la capacité de cette méthode à être utilisée pour des études épidémiologiques.

8.1.3.1. Développement de l'identification moléculaire

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 et se poursuit. Cette méthodologie s'avère très résolutive.

Elle contribue depuis plusieurs années aux projets du groupe de travail européen "*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.

Le LA de Cayenne envisage d'optimiser sa détection de la PCR-RFLP par l'usage du RNA biotyper disponible au CHAR et qui standardiserait la lecture des profils de PCR.

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

a) Laboratoire coordonnateur : La phase de mise au point est terminée et la technique validée. Les premiers résultats ont montré que cette technique permettra à terme de faire une identification au niveau du complexe dans un délai extrêmement court à partir de parasites en culture. Un échantillonnage de 121 souches formellement identifiées par le CNR-L et couvrant 33 espèces différentes de *Leishmanias* a permis la création d'une banque d'empreintes ("spectres") permettant l'identification de nouvelles souches isolées de prélèvements humains. Des améliorations sont en cours afin d'obtenir une meilleure fiabilité de l'identification des espèces au sein d'un même complexe (en particulier pour *L. braziliensis*, *L. guyanensis* et *L. donovani*); l'algorithme de la base de données doit être revu. Ce projet est poursuivi avec le Pr R. Piarroux, qui a créé un nouveau Centre Collaborateur à Paris (Pitié-Salpêtrière) où il a pris ses fonctions au 1^{er} Janvier 2017.

La technique, utilisée au quotidien à Montpellier, permet un contrôle sur l'ensemble des souches stockées ou reçues au laboratoire dans le cadre du CNR. Ainsi, l'identification systématique des >6000 souches existantes peut être envisagée afin de détecter d'éventuelles erreurs anciennes de manipulations, déjà mises en évidence lors de la mise au point de ce typage (à ce jour plus de 600 souches typées, dont l'ensemble des souches du catalogue).

Le progrès enregistré sur ce plan technique sera amplifié et partagé au titre du CNR.

b) Laboratoire Associé : Le déploiement de la technique doit se poursuivre avec l'application d'un logigramme décisionnel positionnant le MALDI-TOF en première intention d'outil d'identification dans le cas de culture exploitable, avec un relais de la PCR-RFLP. Le travail de collaboration avec l'équipe du Pr R. Piarroux et le CNR de Montpellier (L. Lachaud), entrepris depuis 2016, permettra de corréliser les rendus entre les techniques de séquençage, du MALDI-TOF et de la RFLP-PCR.

8.1.4. Maintien et dynamique de la Collection de souches (Montpellier)

La Collection internationale de souches de *Leishmania* du CNR-L est décrite au § 2.4. Son maintien fait appel à une logistique lourde, à une rigueur éprouvée et à une collaboration suivie avec de nombreuses équipes nationales et internationales.

Le CNR-L s'emploiera à continuer à faire vivre et progresser cette Collection, qui reste importante pour de nombreux centres hospitaliers et de recherche.

8.1.4.1. Amélioration des données associées aux souches

La richesse et la précision des renseignements relatifs à chaque souche nécessitent un travail constant de contrôle et de synthèse au vu de l'énorme masse de données engrangée au fil des 40 années de l'existence de la Collection. Depuis le travail de l'ancien curateur de la Collection, Dr Francine Pratlong, en 2014-2015, il est apparu essentiel d'améliorer la précision et l'exactitude de ces renseignements. Il s'agit d'un travail long et minutieux consistant à comparer les renseignements présents dans la base de données avec ceux issus des documents originaux accompagnant les souches, et éventuellement des publications ayant utilisé ces souches.

Le Dr Laurence Lachaud poursuivra cette entreprise avec l'aide de Patrick Lami, technicien, et de l'Assistant-Ingénieur responsable de l'informatique, Yves Balard. Le Dr Francine Pratlong, MCU-PH émérite, qui connaît et pratique cette collection depuis sa création, sera sollicitée régulièrement pour son expertise. Les souches vérifiées seront étiquetées comme telles et seront susceptibles de passer au catalogue.

De plus, lorsqu'un travail de thèse ou un article utilisant les souches de la Collection apportent des données intéressantes comme par exemple **la sensibilité du parasite aux anti-leishmaniens** ou bien **la virulence et l'infektivité des souches**, ces données sont intégrées à la fiche électronique de chaque souche concernée.

Enfin, un travail de plus grande ampleur pourra inclure, dans les données associées à chaque souche, d'éventuelles **références bibliographiques** des articles ayant utilisé et mentionnant telle ou telle souche.

L'ensemble de ces travaux permettra à la Collection de proposer aux équipes de recherche des souches particulières, qui sont souvent l'objet d'un intérêt spécifique pour les travaux des chercheurs. Ceci constitue une **valorisation supplémentaire** importante de la Collection.

8.1.4.2. Curage des données d'identification de souches

A la suite de la reprise du travail de curateur de la Collection par Laurence Lachaud en 2016 et 2017, il est également apparu qu'un certain nombre d'autres erreurs pouvaient être présentes. Ces erreurs sont inévitables au vu de l'importance de la collection, du nombre d'années de son existence et de la multiplicité des acteurs qui s'y sont succédés depuis sa création. Suivant une approche différente de celle de Francine Pratlong, et profitant de sa mise au point du MALDI-TOF dans le Laboratoire, L. Lachaud, assistée de Patrick Lami et Yves Balard, doit donc continuer à identifier des erreurs éventuelles concernant le code O.M.S., le stock de cryotubes existant, voire l'identification d'espèce ou de zymodème.

Le MALDI-TOF, qui autorise un typage simple et rapide, sera ainsi utilisé pour vérifier l'identité des souches de façon systématique, en particulier avant tout envoi de souches vers l'extérieur, mais également à l'aveugle ou en cas de doutes sur toute donnée associée à une souche. Cette technique améliorera sans aucun doute la souplesse de la gestion de la Collection.

8.1.4.3. Réception des souches

Les souches reçues durant les années à venir continueront à alimenter la Collection internationale. Le CNR pourra également, comme il l'a fait par le passé, accepter en dépôt pour conservation les collections de diverses équipes confiées pour sauvegarde dans une structure de référence. Sur recommandation de l'Organisation Mondiale de la Santé, nous recevrons également en dépôt les souches correspondant aux différentes espèces décrites, ainsi que les souches objets de recherches approfondies et servant de modèles, en particulier pour les études de séquençage à haut débit.

Le dépôt de souches s'accompagnera à l'avenir d'un contrat de cession.

8.1.4.5. Mise à disposition des ressources de la collection

Le CNR continuera à assurer une diffusion des souches à la demande, selon les modalités éprouvées, respectant les règles déontologiques édictées par l'OMS en 1984 et adaptées aux évolutions actuelles :

- la règle suivante sera appliquée dans la mesure du possible : toute souche reste la propriété de la personne qui l'a isolée pendant trois ans, délai au-delà duquel elle peut être fournie, sans accord avec l'isoleur, à toute équipe la demandant (recommandations de l'OMS) ;
- toutefois, le CNR-L laissera la possibilité au donneur de demander un "embargo" pendant une période de 5 ans, renouvelable une fois, pour qu'il puisse continuer à effectuer ses recherches sur ces souches pendant la période impartie.
- toute mise à disposition de souche est assortie d'un contrat de mise à disposition de matériel biologique (MTA : material transfer agreement).

8.1.4.6. Démarche Qualité

La démarche Qualité sera poursuivie, avec pour objectif au cours du quinquennal la certification selon la norme NF 96.900 pour le CRB et l'accréditation selon la norme ISO 15189 pour l'ensemble du Département de Parasitologie-Mycologie.

Toutes les structures et ressources humaines sont aujourd'hui en place pour mener à bien cette démarche à son terme. En particulier, la présence d'un Ingénieur Qualité (Andreia Dhenaut) au sein du CRB du CHU de Montpellier est a priori un gage de succès. Une vacation "Qualité" pourrait être obtenue pour un technicien Qualité afin de terminer ce qui reste à faire pour la Collection de souches.

8.1.5. Activités d'expertise du L-A de Cayenne

Le programme d'activités d'expertise du L-A de Cayenne peut se décliner comme suit :

- **Optimisation des identifications de *Leishmania* par outil MALDI-TOF.** Cf. § 8.1.3.2 ci-dessus.
- **Mise en place d'un outil moléculaire de type qPCR** pour assurer un diagnostic en routine des leishmanioses cutanées adaptées aux souches circulantes de Guyane. La pratique de la PCR-RFLP reste une pratique peu adaptée à de la routine de laboratoire, nécessitant un temps technicien non négligeable et des contraintes majeures en terme de pratique de biologie moléculaire. La mise en place d'une qPCR sur des souches de *L. braziliensis* ou *L. guyanensis* en uniplex ou biplex est en cours de réflexion par le L-A.
- **Mise en place d'un Contrôle inter-Laboratoires (CIL)** pour le diagnostic direct de *Leishmania* avec certains laboratoires privés et publics effectuant le diagnostic par cette technique en Guyane.
- **Accompagnement de certains pays limitrophes (Guyana, Surinam)** sur la mise en place d'un **diagnostic direct** de leishmaniose cutanée. Une discussion avec le Surinam et le Guyana est en cours pour mettre à disposition l'expertise microbiologique du LA-CNR sur le diagnostic des *Leishmania* d'origine cutanéomuqueuses : prélèvements de biopsies cutanées, étalement de lames, coloration des lames et lecture.
- **Amélioration du recueil de données épidémiocliniques.** La secrétaire affectée au LA est chargée de vérifier l'ensemble des renseignements notifiés sur les fiches de déclaration en terme de richesse et pertinence des informations (appels des praticiens, ..).
- **Mise en place d'un Centre de Ressources Biologiques au CHAR incluant les collections du L-A.** Une étude de faisabilité a été effectuée en mars 2016 ayant entraîné le montage d'un dossier et une demande de financement FEDER dans ce

cadre. Cette structure permettra d'optimiser la conservation des souches de *Leishmania* circulant en Guyane française et accentuera la démarche Qualité du L-A.

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

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

Ce projet se poursuit depuis plusieurs années avec l'objectif d'harmoniser les techniques d'identification moléculaires des parasites, étape clé dans la prise en charge thérapeutique, et de mettre en place une base de données intégrant des données cliniques, épidémiologiques, thérapeutiques et d'identification des parasites qui permet une prise en charge mieux standardisée des patients. Des guidelines pour l'identification moléculaire des espèces ont été définies et publiées en 2014. La méthodologie d'identification par MLST développée ces dernières années par le CNR-L (Dr C. Ravel) sert de référence dans ces comparaisons. L'objectif pour les années à venir est de renforcer la base de données cliniques et biologiques pour augmenter encore l'exhaustivité des données et évaluer en particulier la corrélation entre type génétique, présentation clinique et évolution (spontanée vs. sous traitement) des lésions.

8.1.6.2. Recherche en collaboration avec les structures travaillant en santé animale

Prévalence de la leishmaniose canine en Languedoc-Roussillon

Une collaboration au niveau local entre le Centre coordonnateur de Montpellier et le LVD sera développée avec pour objectif **l'étude de la prévalence de la leishmaniose canine en Languedoc.**

Des observations très indirectes font penser que l'incidence de la leishmaniose canine a fortement diminué dans la région. Une enquête de prévalence sera menée dans le foyer Cévenol afin d'évaluer l'endémicité canine dans un foyer particulièrement bien décrit et connu par le passé. La dernière enquête date de 1997-98 et il n'existe pas de données actualisées sur cette endémie, alors que des changements importants sont intervenus en termes de moyens préventifs : port de collier à la deltaméthrine (type Scalibor®) et introduction du vaccin depuis plusieurs années. Ce travail sera mené en collaboration avec le LDV et portera sur environ 200-300 chiens dispersés sur une zone géographique représentative. Les méthodes utilisées reposeront sur la détection d'anticorps spécifiques et la recherche d'ADN circulant ; par ailleurs, les données éco-épidémiologiques seront recueillies. Autant que possible, les localités ciblées seront celles étudiées il y a 20 ans, de façon à pouvoir réellement apprécier l'évolution de la prévalence dans le réservoir animal et d'en déduire l'effet des mesures préventives.

8.1.6.3. Autres projets de recherche en collaboration

La collaboration de longue date avec l'équipe du Pr Charles Jaffe (National Center for Leishmaniasis, **Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem**) sur les souches responsables de PKDL (*post-kala azar dermal leishmaniosis*) sera également poursuivie à la lumière de nouvelles données obtenues grâce au NGS.

Le travail collaboratif avec l'équipe du Pr Pierre Antoine Bonnet (**Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier**) et l'équipe du Dr Hiba El Hajj, (Department of Experimental Pathology, Immunology and Microbiology, **Faculty of Medicine, American University of Beirut**) visant à tester l'efficacité in vitro de nouvelles molécules candidates sur diverses souches et espèces de *Leishmania* sera également poursuivi.

Un projet d'évaluation de différentes techniques sérologiques dans le cadre du diagnostic de la leishmaniose viscérale va être mené en collaboration avec le **CHU de Nice** et deux partenaires du Maghreb : l'**Institut Pasteur de Tunis** (Pr Karim Aoun) et Pr Badre Lmimouni (**Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V, Rabat, Maroc**). Pour cela, 200 sérums issus de patients ayant une LV confirmée seront inclus dans l'étude ainsi que 50 sérums témoins provenant de patients n'ayant pas de LV.

8.1.6.4. Projets de recherche du CNR-LA de Cayenne

Des projets de recherche en collaboration avec d'autres laboratoires ou entreprises de Guyane ou de métropole (IPG, Guyarômes, Mivegec, EDB, ...) permettent de contribuer à une meilleure connaissance de la leishmaniose en Guyane française.

Les sujets de recherche dans lesquels est impliqué directement ou non le L-A sont :

- L'étude de **corrélation in vivo/in vitro** dans le cadre de collaboration avec le Centre Médical Inter-Armées (CMIA), le service de dermatologie et le LHUPM. Il s'agit de décrire les aspects cliniques particuliers ou non en rapport ou non avec la circulation des différentes souches de *Leishmania*.
- **Etudes épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques.** Il s'agit d'actualiser les données de nature épidémiologique mais aussi relatifs 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 l'aide méthodologique apportée par le CIC-EC (Pr. Mathieu Nacher). Ces études permettront 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).
- Etude de la **sensibilité des souches de *Leishmania*** (i) aux composés issus de la pharmacopée traditionnelle ou des extraits d'huiles essentielles (projet en cours de financement); (ii) aux drogues habituellement utilisées pour le traitement.
- **Détection et phylogénie moléculaire des *Leishmania* RNA Virus.** Ces virus ont en effet été montrés comme jouant un rôle dans la virulence des espèces présentes en Guyane (*L. guyanensis* et *L. braziliensis*). L'objectif avec Cayenne sera d'évaluer la prévalence des *Leishmania* RNA virus chez *L. guyanensis* et déterminer leur diversité génétique. Il s'agit d'un projet dont le promoteur à Cayenne est l'EPaT ou EA3593 (Université Guyane), en partenariat avec l'Unité Immunologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Cayenne (Eliane Bourreau), le Department of Biochemistry à Lausanne (Suisse) (Pr. N. Fasel et Dr C. Ronet) et le L-A pour les composantes clinique et parasitologique.
- Etude de la **prévalence des différentes espèces de *Leishmania* présentes dans les vecteurs** sur différentes communes de Guyane (Cayenne, Cacao et Saint-Georges) ; projet en collaboration avec l'Institut Pasteur de Cayenne.
- **Epidémiologie moléculaire des plateaux** de Guyane avec typage moléculaire des *Leishmania* isolés dans la région des plateaux.

8.2. Conseil, Information, Formation

8.2.1. Conseil

Les membres du CNR-L répondront aux **demandes d'expertise** de l'administration en accord avec le Ministère chargé de la Santé. Ils participeront à l'élaboration de mesures de lutte

contre la maladie. Ils joueront un rôle de conseil auprès des organismes administratifs décentralisés (ARS) et auprès des professionnels.

L'activité de conseil sera poursuivie et mieux tracée, car beaucoup d'activités de conseil réalisées ne sont pas répertoriées.

Le **conseil thérapeutique** téléphonique sera poursuivi. En effet, la complexité du sujet cantonne le savoir-faire thérapeutique à de rares spécialistes. Par ailleurs, sauf situation exceptionnelle, aucune des formes cliniques ne requiert de décision urgente.

Au niveau du LA-CNR, le service de Dermatologie du CHAR est le service référent de la prise en charge de la leishmaniose cutanée. La personne référente par rapport au conseil thérapeutique est le Pr Pierre Couppié.

8.2.2. Information

La **veille d'information** (Internet, bibliographie) sera améliorée par le CNR, par des données actualisées sur l'évolution de la maladie dans les zones d'endémie leishmanienne dans le monde, avec mise à jour annuelle des **recommandations aux voyageurs (publication dans le BEH)**. Le point sera également fait de façon régulière comme actuellement à propos des leishmanioses importées, d'après le système de surveillance du CNR.

En ce qui concerne le **site Internet du CNR-L**, il sera entièrement revu en 2018 dans un souci de clarté. Deux sites indépendants seront créés, un pour le CNR, et un pour le CRB proprement dit. Le mode de fonctionnement des deux sites permettra de garder des fiches spécifiques pour les demandes de diagnostic, de typage, de dépôt de souche ou les déclarations de cas, téléchargeables directement sur le site avec les procédures d'envoi des échantillons. De même, le catalogue de la Collection de souches sera accessible dès la page d'accès. A noter que le site ne permettra toujours pas la notification directe en ligne des cas de leishmaniose par les services ou les laboratoires afin de respecter les normes de sécurité des données patients. Cette évolution permettra une meilleure visibilité du CNR, ainsi qu'un accès plus clair des utilisateurs aux prestations de conseil et expertise.

Il nous semble intéressant aussi de développer une politique d'information et de sensibilisation pour les personnes se rendant au Maghreb durant la saison de transmission de *Leishmania major* afin de limiter l'incidence des cas de leishmaniose cutanée importées du Maghreb (cf. Alerte 2010).

Pour ce qui concerne le **L-A de Cayenne**, une information sur les missions et cahiers des charges du L-A est mise sur le site intranet du CHAR. Des pages spécifiques au L-A seront rédigées et mises en forme par le L-A pour être mises en ligne sur le site du CNR à Montpellier, ce qui lui assurerait une meilleure visibilité.

8.2.3. Formation

Le CNR-L continuera d'accueillir des **stagiaires** français et étrangers pour leur formation en matière d'épidémiologie des leishmanioses, de diagnostic moléculaire, d'isolement et de culture in vitro, de typage de souches, et de cryoconservation et stockage.

Au **L-A de Cayenne**, une sensibilisation est faite auprès de tout **professionnel de santé amené à exercer en zones isolées** ou en Centres de santé (CDPS) : formation sur une journée au Service de Dermatologie pour la confection des frottis et biopsies, connaissance du protocole de confection en vigueur.

Le L-A souhaite poursuivre l'accueil de stagiaires au sein du laboratoire pour la réalisation de la RFLP-PCR, de la culture, de l'identification par MALDI-TOF.

8.3. Contribution à la surveillance des leishmanioses humaines

8.3.1. 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. Le Laboratoire-Associé "Guyane" de Cayenne centralisera les déclarations de cas pour la Guyane Française qui continueront à être transmises au Laboratoire Coordonnateur.

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.

8.3.2. En Guyane (L-A : LHUPM du CH de Cayenne)

Le projet du L-A de Guyane se décline selon 3 objectifs.

a) Meilleure couverture du recensement des cas

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 Laboratoire Central de Montpellier se feront selon les mêmes règles qu'actuellement.

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

Nous chercherons à obtenir systématiquement une confirmation en essayant de se rapprocher de l'exhaustivité des cas ayant abouti à une consultation en milieu médical. Pour ce faire, nous avons généralisé 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 (quantité de biopsie suffisante), les techniques de PCR-RLFP sont réalisées à partir de la biopsie elle-même (culture négative, contaminée ou non réalisée).

c) 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 peut être 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.

8.4. Contribution à l'alerte

Le Laboratoire Coordonnateur, aidé en cela par le Laboratoire-Associé, centralisera et signalera à l'Institut de Veille sanitaire tout événement anormal concernant l'augmentation du nombre de cas, l'existence de cas groupés, ou une modification éventuelle des formes cliniques, en France métropolitaine, dans les DROM ou à l'étranger.

Les contacts avec les CIRE régionales de chacun des quatre centres seront maintenus de façon régulière (Languedoc-Roussillon-Midi-Pyrénées et Antilles-Guyane).

Le CNR-L est bien entendu prêt à collaborer, comme il l'a fait les années précédentes, à toutes les enquêtes proposées par le Ministère de la Santé, les Agences Régionales de Santé ou les organismes compétents décentralisés.

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

* * *

Remerciements

Je souhaite remercier **l'ensemble des personnels du CNR-L**, autant du Laboratoire Coordonnateur que du Laboratoire Associé, pour le travail fourni ainsi que pour la rédaction de ce rapport. Je remercie également les Laboratoires collaborateurs et leurs responsables (Pr Pierre Buffet, à l'Hôpital Pitié-Salpêtrière, à Paris, ainsi que Dr Gloria Morizot à l'Institut Pasteur ; Pr Renaud Piarroux, AP-HP Pitié-Salpêtrière; Pr Pierre Marty, CHU de Nice ; Drs Mohamed Kasbari et Pascal Boireau, ANSES ; Pr Jérôme Depaquit, Université de Reims ; Pr Gilles Bourdoiseau, ENV de Lyon).

Au nom du CNR-L, je remercie également **tous les Centres hospitaliers et tous les praticiens et professionnels de santé**, que ce soit en France métropolitaine ou en Guyane française, qui ont effectué des déclarations de cas, et/ou qui ont adressé prélèvements et souches à Montpellier ou à Cayenne.

ANNEXES

Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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 avril 2002, puis en janvier 2006 et janvier 2011. Depuis sa création, il développe les différentes missions imparties aux CNR : expertise, surveillance, alerte et conseil.

Dans ce cadre, il effectue depuis sa création :

- l'expertise en matière de diagnostic et d'identification de souches pour de nombreux laboratoires sur le territoire national, et plus rarement de chimio-sensibilité des souches de *Leishmania*,
- la collecte et la conservation de souches de *Leishmania* et leur identification biochimique et moléculaire,
- le conseil et la formation dans le domaine de cette pathologie, en particulier en matière de diagnostic et de thérapeutique (conseil thérapeutique téléphonique, en collaboration avec le Pr P. Buffet du Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur).
- 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 Laboratoire-Associé (L-A) de Cayenne, et une participation importante du Service de Santé des Armées.
- l'alerte en cas de phénomènes anormaux observés au cours des activités de surveillance.

Le CNR-Laboratoire-Associé de Cayenne (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, C.H. Andrée Rosemon, Pr Magalie Demar) remplit effectivement les mêmes missions sur le territoire guyanais.

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 du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Fournir une description détaillée de l'équipe en renseignant notamment les items suivants :

- *Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés*
- *Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur*

1.2.1. Organisation générale du CNR

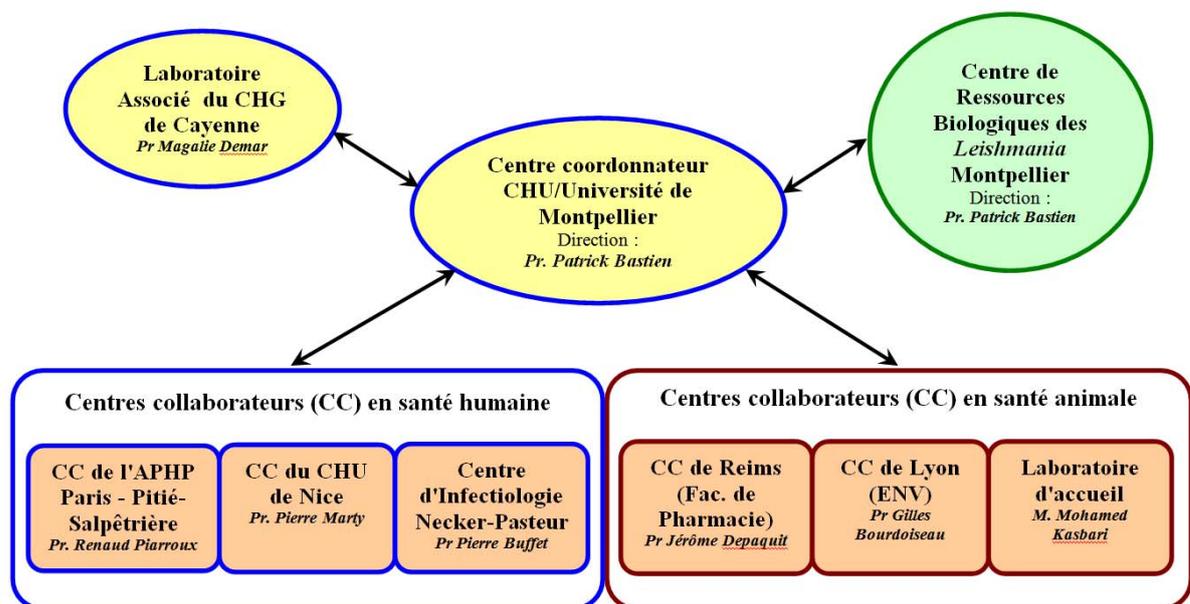
Le CNR-L est dirigé depuis 2010 par le Pr. Patrick Bastien au **Département de Parasitologie-Mycologie (CHRU / UFR Médecine) de Montpellier (DPM)**.

Depuis 2012, le Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie Mycologie (LHUPM) du Centre Hospitalier de Cayenne (CHAR) a été inclus dans le CNR comme le **Laboratoire Associé (L-A) de Cayenne**, avec le Service de Dermatologie comme composante clinique (Pr. Pierre Couppié). Le LHUPM avait été "Centre collaborateur" du CNR-L pendant le dernier quinquennal (2006-2011). L'inclusion de Cayenne comme L-A apparaissait non seulement logique mais nécessaire si l'on considère le fait que ce département est de loin le plus touché par la leishmaniose autochtone, et que plus de la moitié des cas de leishmaniose déclarés en France proviennent de Guyane Française. Le L-A 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 de Leishmanies. Enfin, il est en relation avec un réseau de Centres de santé lui permettant une vue complète et une compréhension intime de cette endémie en Guyane.

Le LHUPM a été dirigé par le Pr B. Carme jusqu'en décembre 2013 et est aujourd'hui dirigé par le Pr Magalie Demar. Le responsable du L-A depuis le 1^{er} janvier 2014, désigné par consensus entre les différents membres du CNR, a été le Pr P. Couppié, du fait de son expertise de longue date sur les leishmanioses. Dans ce prochain quinquennal, il est proposé que le Pr Magalie Demar coordonne ce L.-A. En effet, le LHUPM est de fait au centre de la plupart des activités concernant le diagnostic et le typage nécessaires à la surveillance de la leishmaniose en Guyane. Il draine les échantillons du réseau de Centres de santé évoqué ci-dessus. Le Pr P. Couppié, désigné comme co-responsable du L-A apportera le support de son activité clinique et thérapeutique, et de plus mènera une activité de prévention auprès des populations.

Structuration du CNR des Leishmanioses



Trois Laboratoires hospitaliers français reconnus pour leurs compétences en matière de leishmanioses depuis de nombreuses années (attestées par leurs publications) sont devenus Centres collaborateurs pour ce qui concerne la santé humaine au 1^{er} janvier 2012 :

(i) le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nice (Pr Pierre Marty) pour l'épidémiologie des leishmanioses humaine et canine;

(ii) le Pr Pierre Buffet (auparavant AP-HP Pitié-Salpêtrière, aujourd'hui au Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur) continue 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.

(iii) le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'AP-HP de Marseille (Pr Renaud Piarroux) pour ses études sur l'épidémiologie et les chimiorésistances de *Leishmania infantum*, ainsi que sur le typage par spectrométrie de masse; cependant, la mutation du Pr Renaud Piarroux vers la Pitié-Salpêtrière en 2017 et l'arrêt des thématiques concernant le CNR à Marseille nous ont conduit à proposer le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de la Pitié-Salpêtrière comme Centre Collaborateur du CNR pour la période à venir, toujours avec le Pr Renaud Piarroux.

Par ailleurs, **des 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 Dr Mohamed Kasbari, inspecteur vétérinaire qui travaille depuis plusieurs années sur les leishmanioses animales et a récemment obtenu sa thèse d'Université sur ce sujet, devrait continuer à travailler sur les leishmanioses, mais ne sera plus rattaché à l'ANSES, cette dernière ne souhaitant plus soutenir ce programme;

(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 épidémiologie des maladies parasitaires"), également JE 2533, du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Reims (Pr. J. Depaquit).

Ces trois équipes présentent une expertise complémentaire, la première concernant l'épidémiologie et la surveillance de la leishmaniose canine, la seconde concernant le contrôle de la maladie, à la fois sur le plan vaccinal et sur le plan de la lutte médicamenteuse, et la troisième sur les aspects vectoriels (Phlébotome), qui concerne autant la leishmaniose humaine que l'endémie canine.

1.2.2. Département de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier

Les personnels scientifiques et techniques du Département 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 (prévisions 2017-2021).

Leurs tâches respectives au sein du Département figurent sur l'organigramme fonctionnel présenté en page suivante.

Un organigramme spécifique au Laboratoire Coordonnateur du CNR-L est ensuite présenté au-dessous.

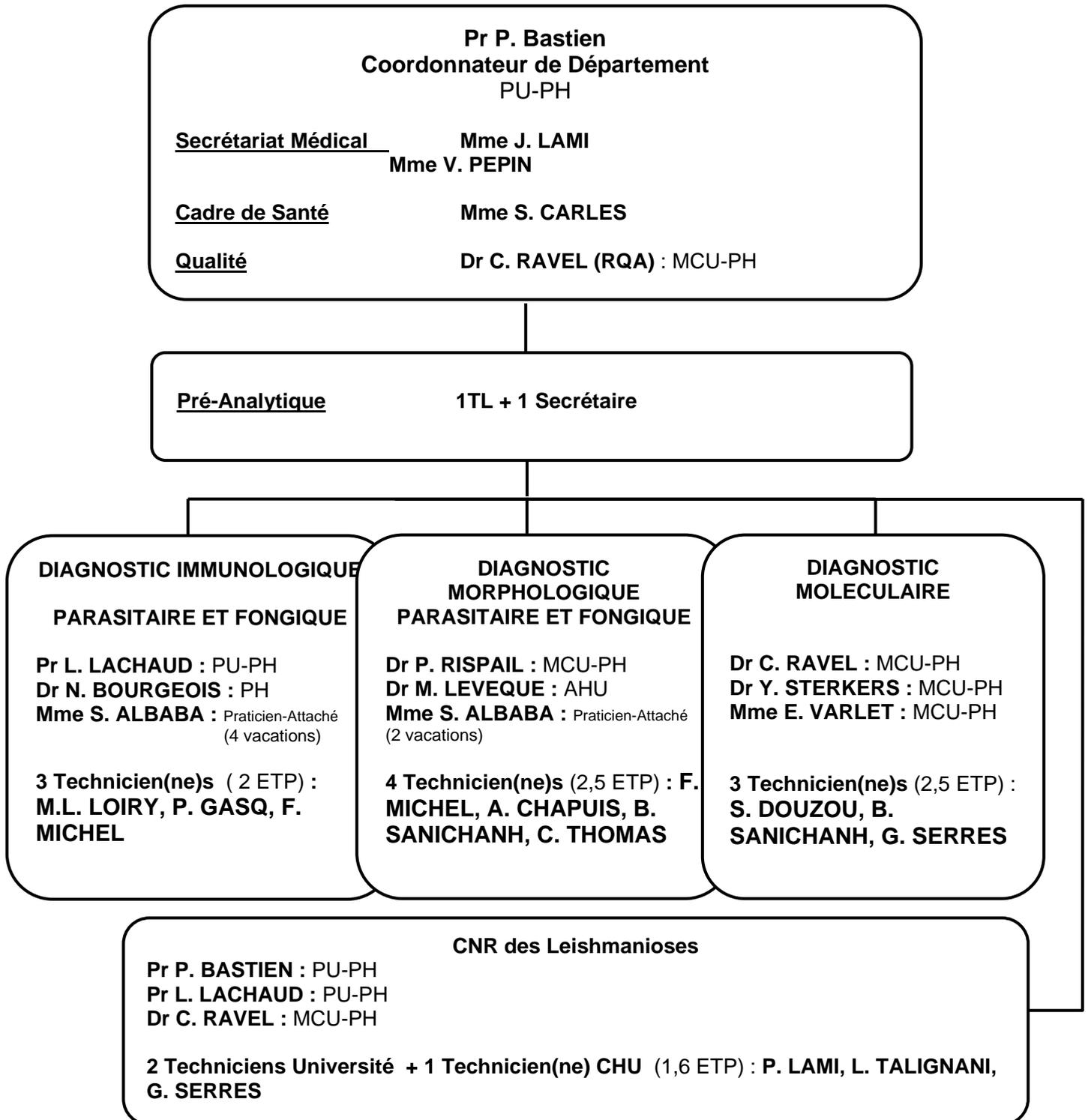
Tableau 1. Etat des emplois du Laboratoire coordonnateur du CNR-Leishmaniose (Montpellier)

Noms et Prénoms	Qualifications	ETP	Appartenance administrative (pour l'activité au CNR-L)
Bastien Patrick	Médecin (PU-PH)	0,10	CHU-Univ. (50%-50%)
Lachaud Laurence	Médecin (PU-PH)	0,20	CHU-Univ. (50%-50%)
Ravel Christophe	Médecin (MCU-PH)	0,20	CHU-Univ. (50%-50%)
Balard Yves	Assistant-Ingénieur	0,30	Univ. Montpellier
Lami Patrick	technicien	0,50	Univ. Montpellier
Serres Ghislaine	technicien	0,10	CHU Montpellier
Talignani Loïc	technicien	0,20	Univ. Montpellier
Lami Joelle	secrétaire	0,05	CHU Montpellier

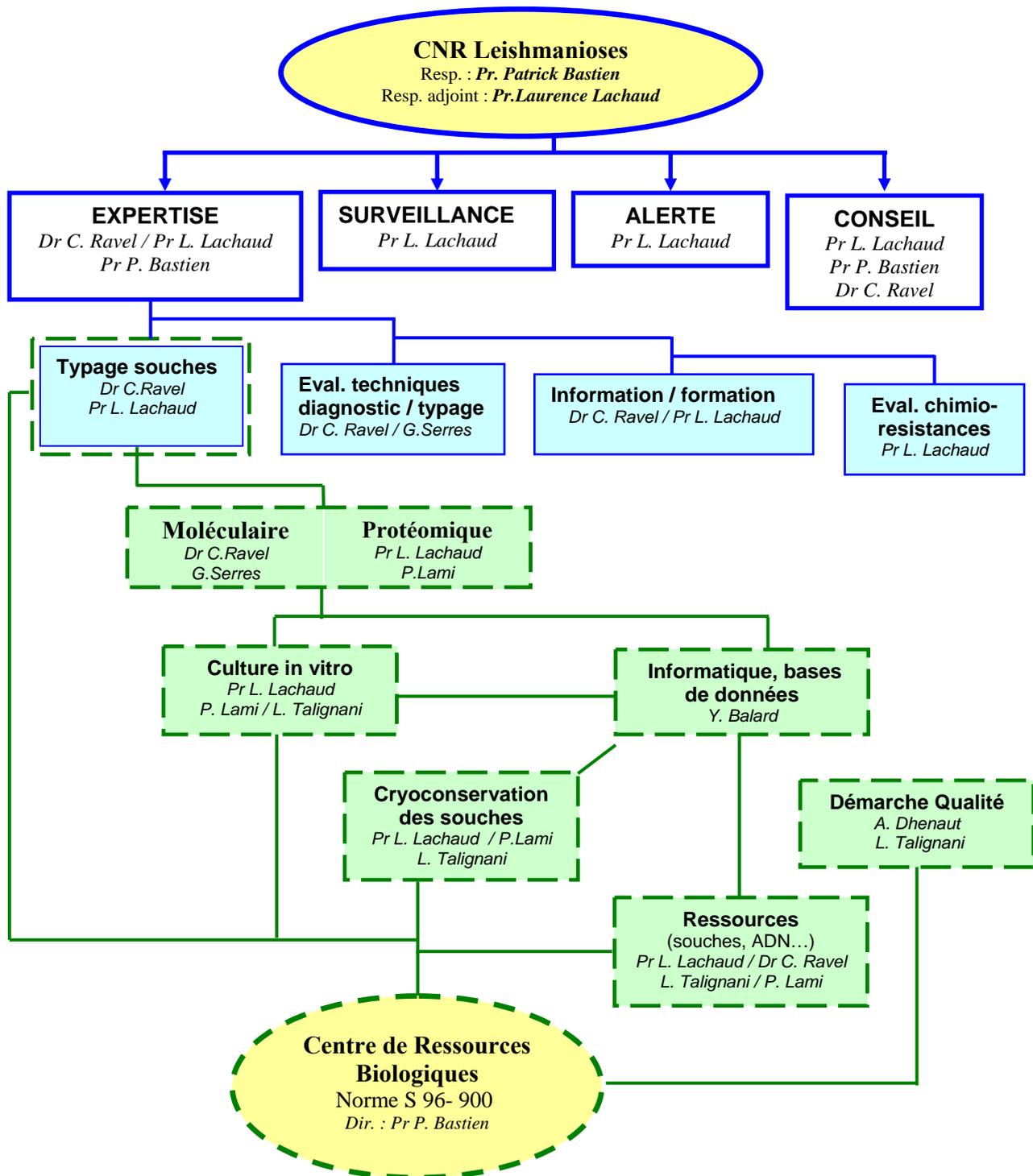
L'implication de ces personnels dans le CNR-L représente 1,75 ETP : 0,8 ETP pour le personnel médico-scientifique (incluant un ingénieur informaticien), 0,8 ETP pour le personnel technique et 0,05 ETP pour le secrétariat. Par ailleurs, le Pr Jean-Pierre Dedet et le Dr Francine

Pratlong, tous deux émérites de la Faculté, continuent d'apporter ponctuellement leur expertise au CNR.

ORGANIGRAMME FONCTIONNEL du DEPARTEMENT DE PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE, CHU de MONTPELLIER



Organigramme du Laboratoire Coordonnateur du Centre National de Référence des Leishmanioses



1.2.3. Laboratoire-Associé de 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.

Tableau 2. Etat des emplois du L-A au CNR Leishmanioses (Cayenne, Guyane Française)

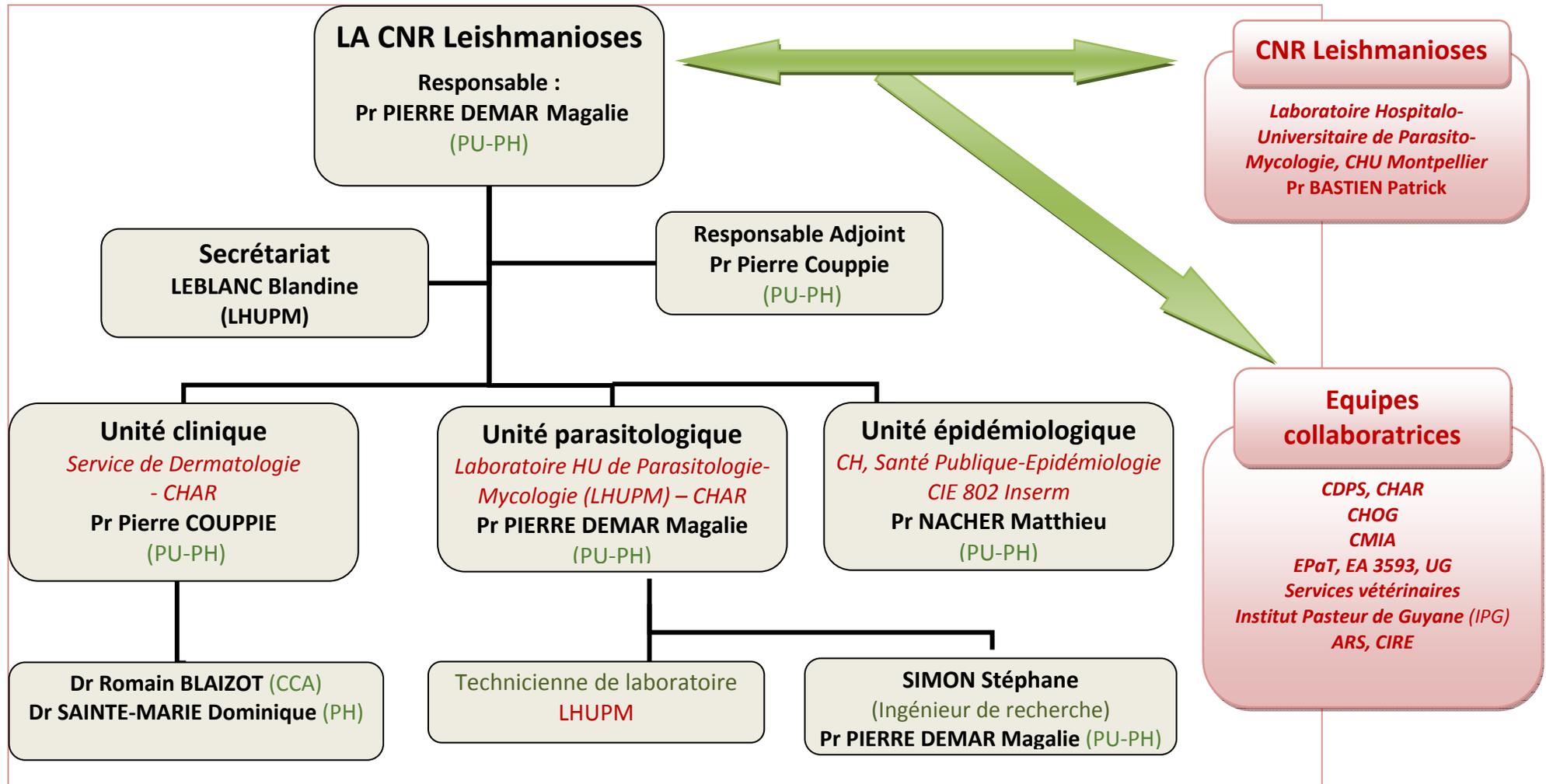
Nom et Prénom	Qualification	ETP	Appartenance administrative (pour l'activité au CNR-L)
Pierre Demar Magalie	Médecin (PU-PH: Parasitologie)	0,25	CH, LHUPM – UAG/ EA 3593 et CIE 802 Inserm
Couppié Pierre	Médecin (PU-PH : Dermatologie)	0,1	CH, Dermato – UAG/ EA 3593
Mathieu Nacher	Médecin (PU-PH : Santé Publique)	0,1	CH, Santé Publique-Epidémiologie – CIE 802 Inserm
Ginouves Marine	Assistant Ingénieur	0,8	Univ. Antilles Guyane (EA 3593) et par convention CH, LHUPM
Blandine Leblanc	Adjoint administratif	0,2	Centre Hospitalier Andrée Rosemon (CHAR)
Technicien de laboratoire (selon le planning)	Technicien	0,3	Centre Hospitalier Andrée Rosemon (CHAR)

L'implication de ces personnels dans le CNR-L représente 1,75 ETP avec (i) une activité quasiment dédiée pour ce qui est du personnel scientifique (0,8 ETP), (ii) 0,5 ETP pour le personnel médico-scientifique effectuant des activités d'épidémiologie, de diagnostic clinique et biologique, et de thérapeutique; (iii) 0,2 ETP pour le secrétariat amené à gérer le réseau de correspondants, notamment les Centres de santé.

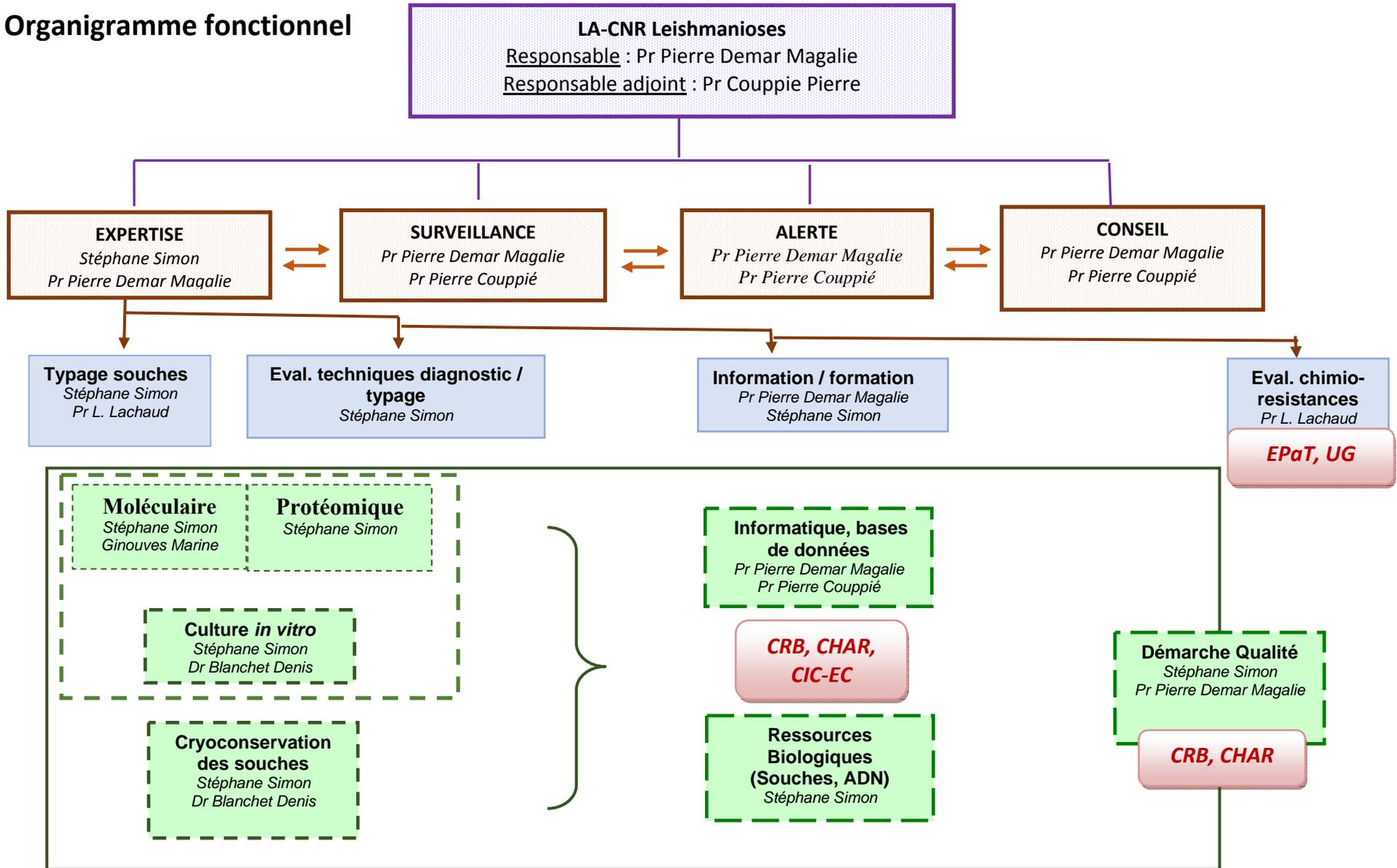
Une aide ponctuelle complémentaire pour les aspects analyse et expertise épidémiologique peut être apportée par l'équipe Inserm CIC-EC Antilles Guyane.

Les schémas suivants illustrent l'organisation du LA-CNR-L.

Organigrammes du Laboratoire Associé au CNR des Leishmanioses (Cayenne)



Organigramme fonctionnel



1.3 Locaux et équipements (CNR et laboratoires associés)

1.3.1. CNR Montpellier

Locaux : Les locaux n'ont en rien changé par rapport au dossier de 2010.

Le Département de Parasitologie-Mycologie 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 m², 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 Centre National de Référence des *Leishmania* et tout ou partie de 3 équipes de recherche faisant partie de l'UMR "MiVEGEC" ("Maladies infectieuses et vecteurs : écologie, génétique, évolution, contrôle") (CNRS / IRD / Université Montpellier), 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. Un plan est fourni en annexe.

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), 2 containers de 220 litres (LO-2200), 1 container de 151 litres (Espace 151), 5 containers de 140 litres et 1 de 110 litres (Arpège 140 et 110), 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. La pièce est aux normes de sécurité avec alarme centralisée en cas de baisse du niveau d'oxygène liée à une fuite d'azote.
- 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 m² ; ces locaux sont en voie d'accréditation selon la norme ISO 15189 propre aux laboratoires de biologie médicale 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 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. Au cours du dernier quinquennal, le Laboratoire a acquis un container Arpège 110 (Air Liquide®) et deux conteneurs LO-220 (Cryo-Diffusion®).

Le déménagement du laboratoire en 2009 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 Département 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, 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.

1.3.2. Laboratoire Associé de Cayenne

Locaux : Les zones d'activité où s'exercent les activités du LA-CNR-L se répartissent en 2 secteurs : le secteur hospitalier situé sur le site du Centre Hospitalier de Cayenne au sein duquel est situé le LHUPM, et le secteur universitaire situé sur le campus universitaire de la Faculté de Médecine.

* **Le LHUPM** est installé dans le secteur des laboratoires. Dans ces locaux, sont installés à la fois le laboratoire hospitalier de diagnostic en Parasitologie-Mycologie et le L-A au CNR-L. Ces locaux comprennent :

- une unité de culture de niveau P3 destinée aux cultures d'agents parasites tels que *Trypanosoma sp*, *Toxoplasma*... C'est aussi dans cette unité équipée d'un PSM et d'une enceinte à 24-26° C que sont effectuées les cultures de *Leishmania* classées au niveau L3 (*L. braziliensis*).
- une unité de culture de niveau P2 située au sein du secteur Mycologie dotée d'une enceinte de sécurité et d'une chambre chaude (24-26°C) et au sein de laquelle s'effectuent la plupart des cultures de *Leishmania sp*.
- un lieu de cryoconservation aux normes de sécurité pour la manipulation de l'azote liquide. Un contrat de livraison mensuel d'azote liquide existe avec Air Liquide Santé, avec mise à niveau des containers. Le remplissage du container est assuré 1x/mois par un des membres affecté au LA du CNR-L.
- un secteur partagé avec le secteur de bactériologie contenant le spectromètre de masse, MALDI-TOF permettant l'identification des espèces de *Leishmania sp*.
- un secteur de lecteur sur microscope inversé situé en salle de parasitologie directe.

* **Le secteur universitaire** est installé sur le campus dans les locaux de la Faculté de Médecine. Il comporte un plateau technique réservé à la biologie moléculaire, conforme aux recommandations classiques pour cette activité avec l'organisation en trois locaux géographiquement séparés : un secteur de prétraitement des échantillons, un secteur de préparation des mix et un secteur d'amplification/post-amplification.

Equipements : le Laboratoire possède les équipements courants de laboratoire (PSM, étuves, centrifugeuses, microscopes optiques,...) de même que ceux indispensables à l'activité : 2 containers de 80 litres d'azote liquide, appareil de PCR en temps réel de type Applied, thermocycleurs conventionnels, automate d'extraction d'ADN, microscope inversé...

1.4 Collections de matériel biologique

1.4.1. Collection de souches de *Leishmania* (Centre de Ressources Biologiques) :

La Collection internationale de souches de *Leishmania* du CNR-L est unique au monde. Elle comporte aujourd'hui plus de 6000 souches provenant de 67 pays, sur 4 continents, représentant quasiment toutes les espèces connues, et isolées sur une grande variété d'hôtes et de vecteurs dans des foyers et des situations épidémiologiques très divers. 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 (41, 7 %) et d'Afrique (31, 8 %), mais également d'Asie (10,5 %) 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.

Débutée en 1971, elle s'est régulièrement enrichie. Depuis 1998, 100 à 150 nouvelles souches sont cryoconservées chaque année dans la Collection (en moyenne).

Toutes les souches sont conservées en azote liquide (cf. Equipements).

Toutes les souches sont également répertoriées dans une base de données. De 2006 à Juin 2013, le process des échantillons biologiques et des souches, depuis leur arrivée jusqu'à leur stockage, était entièrement tracé et géré informatiquement grâce à un logiciel spécifiquement développé pour la Collection (base de données Modulbio, sécurisée sous Oracle).

En 2011, a débuté un gros travail collaboratif en vue de l'adoption en 2013 par le réseau des CRB français en Microbiologie (FBRM) d'un logiciel commun de gestion des échantillons et de saisie des données dénommé BRC-LIMS. Ce projet, financé par le GIS IBSA et auquel le CNR-L a largement contribué, a été coordonné par Chantal Bizet, Institut Pasteur ¹. Ce logiciel a remplacé ModulBio et a définitivement été adopté en routine en 2014 (cf. plus bas).

La collection est fortement engagée dans une démarche Qualité visant à la certification selon la norme NF S96-900 avec le CRB du CHU de Montpellier.

La collection est référéncée sur le *World Data Centre for Microorganisms* de la *World Federation for Culture Collections* (depuis le 08/04/2005) sous l'acronyme LeishCryoBank et le numéro WDCM 879.

Le CNR-L participe au réseau européen BBMRI ("*Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure*"), à l'organisation européenne ECCO ("*European Culture Collections Organisation*", <https://www.eccosite.org/>), au Réseau français des CRB de Microorganismes (<http://www.fbrm.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".

- Conditions de mise à disposition de la collection

Toutes les souches de la collection sont cessibles après accord du comité scientifique du CRB et du donneur de la souche. **Un catalogue réduit de 242 souches** disponibles dans la collection est présenté sur le site Internet du laboratoire : www.parasitologie.univ-montp1.fr/cryobanque.htm (qui doit être transformé en 2018 en crb-leish.edu.montpellier.fr). **Le choix a été fait de mettre au catalogue un seul échantillon représentatif par espèce, pays de**

¹ Demey, S., Begaud, E., Chaïbi, N., Gallais, J., Raynal-Melchy, E., Clermont, D., Talignani, L., Helloin, E., Casaregola, S., Favel, A., Briand, M., Valence-Bertel, F., Darde, M.-L., Villena, I., Guyonneaud, R., Pressigout, M., Bizet, C. (2014). *BRC-LIMS : applications for the management of French Biological Resource Centres of Microorganisms*. Presented at the International Network "Paving the way for Research on Global Health and One Health", Paris, 10-13 Sept. 2014.

contamination et hôte d'origine de la souche (insecte vecteur ou mammifère réservoir). Les autres souches sont aussi disponibles à la demande mais après avoir contactés le CNR. 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.

En accord avec les personnels travaillant au sein du CNR et selon les différents projets en cours, le L-A a défini ses critères de mise à disposition des souches auprès du CNR de Montpellier au travers de documents d'autorisation et de cession de souches.

- Distribution des souches par le CNR

L'option choisie pour une meilleure diffusion du matériel conservé dans notre collection a consisté dans la réalisation d'un catalogue sous forme d'une base de données interrogeable et accessible sur Internet.

Ceci nous a conduits à réaliser un **site Internet** pour notre laboratoire et ses différentes composantes (UMR5290, Centre National de Référence des Leishmania, Laboratoire hospitalier, etc...). Ce site est en ligne depuis 2004 à l'adresse suivante : www.parasitologie.univ-montpl.fr.

Ce site permet une présentation 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 Rapports annuels d'activités sont mis en ligne sur le site une fois validés par l'InVS. Ce site est présenté en version française et anglaise de façon à permettre son accès à une audience internationale.

A noter que le site ne permet pas la notification directe en ligne des cas de leishmaniose par les services ou les laboratoires.

Pour des raisons logistiques indépendantes de notre volonté, ainsi que pour être en conformité avec les exigences de la norme de certification NF S96-900, ce site Internet doit évoluer vers une simplification. Ainsi, deux nouveaux sites Internet verront le jour en 2018, hébergés par l'Université de Montpellier : un dédié au CNR (cnr-leish.edu.montpellier.fr) et un spécifiquement dédié au CRB-*Leishmania* (crb-leish.edu.montpellier.fr)

- 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 2300) ou à partir de souches de culture (environ 750). En 2008, un logiciel de gestion de cette collection a été développé au sein du Département. 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.

- Description de l'infrastructure informatique

-Environnement informatique du CNR de Montpellier

Le CNR-L se place essentiellement dans un environnement informatique dépendant de l'Université de Montpellier. Il bénéficie de la sécurité et de la surveillance de base liées à cet environnement. Une personne ressource de l'UM aide à la mise en place des deux sites cités ci-dessus et veillera aux futures mises à jour.

Le Laboratoire hospitalier est lui dans un environnement purement C.H.R.U., comprenant des règles de sécurité maximales en matière de contact avec l'extérieur. Seule l'activité d'expertise

diagnostique du CNR-L est en interface avec cet environnement qui gère les analyses médicales du Laboratoire par le logiciel DxLab, de la société MEDASYS, conforme à la fois aux exigences de l'accréditation ISO 15189 et aux recommandations de la CNIL.

-Application informatique de gestion de la collection du CNR

En 2013, la Collection a effectué le basculement vers une nouvelle application de gestion des souches appelée BRC-LIMS. Ce projet initié par l'institut Pasteur et soutenu par le GIS IBiSA (Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie) a été testé et validé durant 4 mois avant de remplacer totalement l'ancienne application ModulBio (sous Oracle). Toutes les données présentes sur l'ancienne base ont été reprises. Cette application présente toutes les garanties de sécurité avec davantage de souplesse et de possibilités.

Elle s'articule essentiellement autour d'une base de données sécurisée utilisant le SGBD Posgresql et fonctionnant sur un serveur d'application avec un système d'exploitation LINUX et un contrôleur de stockage RAID 1, assurant la protection des données sur deux disques durs en miroir (Mirroring). Toutes les 24h, une sauvegarde est réalisée automatiquement sur un serveur NAS (Network Attached Storage) situé dans une autre pièce.

L'accès à la base, contrôlé par login et mot de passe, accessible uniquement sur l'intranet, se fait directement à chaque stade du traitement avec un navigateur à partir des différents postes informatiques répartis dans le laboratoire. Cette communication utilisant des clients légers (ordinateurs 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 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 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 informatique et réseaux) 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 de Montpellier.

1.4.2. L-A de Guyane (CH de Cayenne)

Le LHUPM possède également une collection importante de souches de *Leishmania* isolées à partir de patients évoluant sur l'ensemble du territoire guyanais. A ce jour, depuis 2012, plus de 300 souches ont été cryoconservées, dont un certain nombre ont été transférées au Laboratoire coordonnateur à Montpellier. Toutes les souches sont conservées en azote liquide en duplicata de la Collection de Montpellier.

Il possède également une collection importante d'ADN de *Leishmania* isolées en Guyane. Elle renferme des ADN obtenus à partir de produits pathologiques ou à partir de souches de culture. Tous les ADN sont cryoconservés à – 80°C.

A signaler la demande de création d'un Centre de Ressources Biologiques au Centre Hospitalier de Cayenne par le CIC-EC /Inserm (pré-visite de faisabilité par Mme Di Donato en mars 2016, montage de dossier et demande de financement en cours), ce centre étant disposé dans les locaux du laboratoire et étant prévu de fonctionner en co-gestion avec le CIC-EC (Pr Mathieu Nacher). Les collections de *Leishmania* devraient constituer une bonne partie des collections prévues de ce CRB et cette mise en place devrait contribuer à améliorer les conditions de stockage et de gestion de la collection de souches existantes au LHUPM.

Le LHUPM / LA-CNR bénéficie de la sécurité et de la surveillance de base liées à l'environnement hospitalier avec des règles de sécurité en matière d'accès aux données et d'identitovigilance. Les examens de diagnostic des leishmanioses sont gérés par le logiciel HEXALIS.

Les collections biologiques du LHUPM sont déclarées de façon anonyme par le CH de Cayenne selon les procédures officielles (ADN et leishmanies formes promastigotes de cultures). La gestion des souches est informatisée.

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Rappeler ici l'organisation mise en place par le CNR en termes de démarche qualité du laboratoire (GBEA, participation à un contrôle qualité externe, accréditation, certification, ...).

Les techniques du CNR étant spécifiquement accréditées à échéance de l'année N doivent être mentionnées dans l'annexe 2.

1.5.1. Centre Coordonnateur du CHRU de Montpellier

Deux démarches d'accréditation/certification sont en cours en parallèle au CNR-L.

Les activités du CNR s'appuient largement sur une infrastructure et une logistique internes au CHU de Montpellier. Certaines activités comme le diagnostic moléculaire sont même partie intégrante de l'activité du CHU. Le Département de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier est engagé dans la démarche Qualité nécessaire à l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (certification ISO 15189). Christophe Ravel (membre du CNR-L) est d'ailleurs RQA suppléant dans ce cadre. Un audit externe et plusieurs audits internes ont accompagné ce processus depuis 2014. Un dépôt de dossier au COFRAC a eu lieu en 2015, incluant toutes les analyses de diagnostic moléculaire, en particulier le diagnostic moléculaire des leishmanioses. La première visite du COFRAC est prévue en 2016.

Pour ce qui concerne le CNR-L proprement dit, une démarche Qualité a été entreprise depuis plusieurs années en vue d'une certification de la collection de *Leishmania* du CNR-L selon la norme NF S96-900. Au cours du dernier quinquennal, le Système de Management de la Qualité a été amélioré selon les recommandations d'audits pré-certification assuré dans le cadre du projet Investissements d'Avenir "BIOBANQUES" en 2013 et 2014. En 2015, le CRB-*Leishmania* a rejoint le Centre de Ressources Biologiques du CHU de Montpellier, bénéficiant ainsi de la dynamique à l'œuvre dans ce domaine dans l'ensemble du CRB. **Loïc Talignani, RQA pour la Collection de *Leishmania*, a considérablement avancé le travail aux côtés d'Andreia Dhenaut, Ingénieur Qualité pour le CRB du CHU; cependant, en 2017, son affectation partielle dans une**

autre structure a notablement freiné la démarche Qualité. Le dépôt de dossier de certification de la Collection de souches de *Leishmania* a été reporté dans l'attente d'un personnel dédié.

A ce jour :

La traçabilité des processus de réception, suivi et expédition des souches, est totale, aujourd'hui assurée grâce au logiciel BRC-Lims, spécifiquement conçu pour les CRB microbiens dans le cadre d'un projet coordonné par Chantal Bizet (CRB de l'Institut Pasteur) et financé par IbISA. Ce logiciel a été adopté en routine en 2014.

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.

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

- Définition d'indicateurs Qualité d'évaluation des différentes étapes des processus de réception, de conservation et de mise à disposition des ressources biologiques,
- Définition des compétences, qualifications et habilitations des différents personnels du CRB, permettant un meilleur suivi des remplacements de personnels et des besoins en formation,
- Homogénéisation des procédures de gestion des non-conformités et des axes d'améliorations avec ceux déjà existants au niveau du CRB du CHU,
- Convention avec le service informatique permettant d'assurer la sauvegarde des données, la maintenance des logiciels et de l'infrastructure,
- Identification et validation des méthodes critiques,
- Vérification de la qualité des renseignements sur les ressources biologiques (cohérence, justesse) saisis dans la base de données par rapport au stock réel et aux fiches de renseignements papier des déposants,
- Création d'un fichier informatique de centralisation des autorisations de distribution des souches,
- Mise en place d'un outil informatique d'évaluation des fournisseurs et des produits critiques,
- Mise en place d'un questionnaire de satisfaction clients.

1.5.2. LHUPM du CH de Cayenne

En conformité avec les exigences nationales, le L-A, au travers du LHUPM, s'est engagé avec le laboratoire de Biologie polyvalente du centre Hospitalier de Cayenne dans le processus de mise en place de la démarche Qualité nécessaire à l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (certification ISO 15189) dans chacun de ses secteurs avec dépôt de dossier au COFRAC en mai 2015. Cette exigence est indispensable au L-A du fait de son implication dans la démarche diagnostique et thérapeutique auprès des praticiens de Guyane Française.

L'ensemble des examens réalisés au L-A devra répondre aux exigences de l'accréditation en 2020 (analyse de sensibilité/spécificité, de répétabilité et de reproductibilité). Une aide est apportée par ANOFEL, l'association française des enseignants de Parasitologie-Mycologie. Il s'agit d'une aide technique avec :

- mise à disposition sur un site Internet dédié de documents référents,
- conseils personnalisés par le Dr Christine Roques, évaluatrice COFRAC et PH dans le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse.

Des réunions hebdomadaires axées sur l'accréditation ont été initiées depuis fin 2015 de même que des groupes de travail notamment sur les CNR (Maladie de Chagas et leishmaniose)

Certaines activités du CNR comme le diagnostic direct font partie intégrante de l'activité du CHAR. Un dépôt de dossier au COFRAC a été fait en 2015 incluant pour le LHUPM, la sérologie Chagas, avec une visite du COFRAC prévue fin 2016.

Pour ce qui concerne les activités en rapport avec le secteur du NSB3, une démarche Qualité a été entreprise depuis 2014 avec remise à plat, réévaluation et réécriture de l'ensemble des procédures qualité, hygiène et sécurité.

La traçabilité du processus de mise en cryoconservation et des expéditions des souches, est totale, aujourd'hui assurée grâce au logiciel BRC-Lims,

A noter que les contrôles de qualité des typages de souches réalisés chaque année montrent une parfaite concordance avec les résultats obtenus au Laboratoire coordonnateur du CNR (Montpellier).

Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

Rappeler ici les informations suivantes (pour la plupart déjà disponibles dans votre dossier de candidature) en les mettant si nécessaire à jour :

2.1 Liste des techniques de référence

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

Le diagnostic des leishmanioses repose presque exclusivement aujourd'hui sur la détection par PCR en temps réel.

L'identification des *Leishmania* est actuellement réalisée dans notre laboratoire **en première intention par MALDI-TOF, et si nécessaire en seconde intention** par des techniques moléculaires basées sur le séquençage d'un ou plusieurs gènes uniques. Ces gènes sont intégrés à un schéma MLST (Multi Locus Sequence Typing) développé sur 7 loci indépendants. **En raison de sa rapidité et de son coût, l'identification par MALDI-TOF a aujourd'hui remplacé en routine la biologie moléculaire.**

Les tests de chimiosensibilité du parasite sont également réalisés de façon ponctuelle, en général à la demande de cliniciens.

De par sa longue expérience en région d'endémicité élevée, **le LHUPM de Cayenne** possède une expertise en diagnostic des leishmanioses, que ce soit par microscopie, par techniques de culture axénique des parasites ou par techniques de biologie moléculaire (PCR conventionnelle et PCR en temps réel).

Il a également développé une technique **d'identification moléculaire** par RFLP spécifique pour le diagnostic d'espèce des *Leishmania* du Nouveau Monde. Le L-A a aussi la possibilité d'optimiser ses capacités d'identifications des souches à travers la technologie du MALDI-TOF (spectrométrie de masse). Le projet de validation de la méthode est en cours en collaboration avec le CNR de Montpellier (Dr Lachaud) et le Centre collaborateur de Marseille (Pr Piarroux)

Le LHUPM a une capacité de **stockage des souches** de *Leishmania* isolées à - 80°C et/ou en azote liquide pour une période limitée (maximum deux ans) avant transfert des souches au Laboratoire coordonnateur pour stockage à long terme et mise à disposition des collections selon les conditions du CNR (autorisations etc.). Les collections biologiques sont déclarées par le CH de Cayenne selon les procédures officielles (ADN et leishmanies formes promastigotes issues des cultures).

2.1.2. Expertise diagnostique

- **Le Laboratoire coordonnateur** réalise le diagnostic moléculaire des leishmanioses par PCR en temps réel (LightCycler LC480). La technique est basée les travaux de Ch. 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.

La méthode a été accréditée par le COFRAC en 2017 (visite du COFRAC en novembre 2016, et notification officielle en juillet 2017).

- 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.

- Le **LHUPM de Cayenne** possède également une expertise en diagnostic des leishmanioses, que ce soit par microscopie, en culture in vitro, 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 (bande à 615 pb).

- La plupart des laboratoires de la **Guyane** (Saint-Laurent-Du-Maroni, Institut Pasteur de Cayenne et CH de Kourou) réalisent le diagnostic direct sur frottis cutané du fait de l'implication thérapeutique qui en découle. La situation est différente au niveau des Centres de Santé de la Guyane qui ne disposent pas de possibilités diagnostiques sur site et qui envoient lames et biopsies au LHUPM.

2.1.3. Identification moléculaire

Au **Laboratoire coordonnateur**, l'identification moléculaire est réalisée depuis fin 1998 sur tout prélèvement ou culture 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 (El Baidouri et al. 2013) 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. L'identification moléculaire est appliquée non seulement aux souches en culture, mais également, dans environ 70% des cas, à des échantillons biologiques de patients, en particulier biopsiques, ce qui permet un typage même en cas de culture négative ou contaminée par des éléments fongiques ou bactériens.

Actuellement cette technique permet également la vérification systématique des souches distribuées avant l'envoi.

- Le **LHUPM de Cayenne** a également développé depuis 2006 une technique d'identification moléculaire par PCR-RFLP (Hgal et TspRI) 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 cutanées². L'identification moléculaire permet notamment la différenciation rapide de toutes les espèces de *Leishmania* et a été intégrée dans le management thérapeutique des patients à la demande du Service de Dermatologie (Pr Couppié). Elle est appliquée à partir de prélèvements cliniques (biopsies cutanées ou muqueuses, produits de grattage, sang, moelle osseuse) et aussi sur les biopsies en culture n'ayant pas poussé (en cas de négativité ou de contamination).

Les contrôles de qualité des identifications réalisées chaque année montrent une parfaite correspondance avec les résultats obtenus au Laboratoire coordonnateur du CNR (Montpellier).

² Simon et coll., *Leishmania* species identification by PCR-RFLP analysis and its applications in French Guiana. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2010

2.1.4. Identification par protéomique

Une nouvelle approche de typage des *Leishmania*, basée sur l'analyse de spectres de masse obtenus par la technique de MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption/ionization-Time of flight) a été mise au point en parallèle dans deux Centres collaborateurs du CNR, Marseille (Pr R. Piarroux) et Pitié-Salpêtrière (Pr P. Buffet) en collaboration avec le CNR. Toutes deux ont donné lieu à publication ³.

Le niveau de résolution obtenu par cette méthode d'identification est excellent jusqu'au niveau de l'espèce. Le CNR, toujours avec la collaboration de Renaud Piarroux, travaille à la création et la mise en ligne d'une banque de spectres plus étendue.

2.1.5. Identification biochimique (iso-enzymatique)

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

Elle reste une technique de référence en épidémiologie des leishmanioses mais est de plus en plus rarement demandée, par des équipes françaises ou ailleurs dans le monde.

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).

2.1.6. 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 (Lachaud et al., *Clin. Infect. Dis.*, 2009).

2.1.7. Evaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

³ Cassagne C, Pratlong F, Jeddi F, Benikhlef R, Aoun K, Normand AC, Faraut F, Bastien P, Piarroux R. Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20(6):551-557.

Mouri O, Morizot G, Van der Auwera G, Ravel C, Passet M, Chartrel N, Joly I, Thellier M, Jauréguiberry S, Caumes E, Mazier D, Marinach-Patrice C, Buffet P. Easy identification of *Leishmania* species by mass spectrometry. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(6):e2841.

Des techniques d'étude de la résistance des souches de *Leishmania infantum* aux drogues anti-leishmaniennes de première ligne que sont les antimoniés, l'amphotéricine B et la miltéfosine ont été mises en place au Département en 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. Les tests de chimiosensibilité du parasite sont réalisés de façon ponctuelle au CNR, en général à la demande de cliniciens, qui restent cependant exceptionnelles.

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

1) Diagnostic

En France et dans les pays développés, le diagnostic moléculaire est aujourd'hui devenu la méthode de référence pour les leishmanioses. Cependant, peu de kits commerciaux sont disponibles, et aucun n'a été correctement évalué avec des méthodes de référence fiables. En conséquence, la plupart des laboratoires continuent à réaliser ce diagnostic avec des méthodes de PCR dites "maison".

Le CNR recommande l'utilisation de systèmes de PCR "fermés" type PCR en temps réel.

Par contre, il ne peut pas recommander à l'heure actuelle de méthode d'amplification (cibles, amorces...) en raison du manque d'études scientifiques comparatives.

2) Typage

Le typage est là encore aujourd'hui prioritairement moléculaire. Ce typage est très peu répandu et réservé à des centres experts.

La méthode de référence de typage moléculaire est le MultiLocus Sequence Typing (MLST) développée par le CNR, avec amplifications et séquençage de 7 gènes (El Baidouri et al. PLoS NTD 2013). Une étude comparative multicentrique européenne plus récente a comparé plusieurs méthodes de typage moléculaire (Van der Auwera et al, EuroSurv. 2016) et a adopté cette méthode comme le gold standard; toutefois, elle a conclu à une bonne efficacité du typage par séquençage du gène hsp70 .

Les autres méthodes publiées ne sont pas recommandées.

Au cours des 2 dernières années, le CNR a mis au point, avec le centre collaborateur de Marseille, la méthode de typage par MALDI-TOF pour *Leishmania* (cf. § 6.1.3). Le nombre important de souches typées à ce jour a permis d'établir une base de données ("banque de spectres") fiable qui est disponible via une application Internet (MSI) et accessible après obtention de login et mot de passe auprès du webmaster. En Mars 2017, seuls quatre centres ont la possibilité de se connecter. Pour les autres centres, l'accès se fait via le CNRL.

3) Sensibilité aux anti-infectieux

Il est très difficile pour le CNR de recommander une méthode pour les tests de chimiosensibilité, d'une part en raison de la rareté des demandes, d'autre part du fait qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode standardisée ; de plus, des contradictions ont été observées entre les différentes méthodes utilisées dans la littérature.