

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2009

**Laboratoire de Parasitologie-Mycologie
CHU de Montpellier
39, Avenue Charles Flahault
34295 MONTPELLIER CEDEX 5**

**Responsable :
Professeur Jean-Pierre DEDET**

1. INTRODUCTION

1. 1. Rappel des missions et objectifs :

Le Centre National de Référence des *Leishmania* (CNRL) a été créé en mars 1998 (arrêté du 17 mars 1998). Il a été renouvelé le 26 avril 2002, puis le 6 janvier 2006, pour la période 2006-2009. Cette dernière période a été récemment prolongée jusqu'à fin 2011.

Depuis sa création, le CNRL développe les différentes missions imparties aux Centres nationaux de référence : missions d'expertise, de surveillance, d'alerte et de conseil. Dans ce cadre, il effectue depuis sa création :

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

Le conseil thérapeutique téléphonique, en collaboration avec le Centre de Santé de l'Institut Pasteur (Dr P. Buffet), s'est ajouté en 2006 aux activités du CNRL.

1.2. Résumé des activités de l'année :

L'année sous revue a été marquée par le déménagement du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie et du CNRL, intervenu en juillet 2009, pour rejoindre l'un des sites du CHU de Montpellier, le site de La Colombière. Nos structures sont désormais installées dans un bâtiment modulaire de 1330 m², dont la construction a été entièrement prise en charge par le CHU, et qui comprend un rez-de-chaussée et un étage. Dans ces locaux sont installés à la fois le laboratoire hospitalier de diagnostic, le Centre National de Référence des *Leishmania* et les équipes de recherche incluses dans l'UMR 2724 « Génétique et évolution des maladies infectieuses » (CNRS / IRD / Université Montpellier 1). Dans ce bâtiment, le CNRL dispose de pièces spécifiques et partage des pièces techniques communes à diverses activités. La grande surface du laboratoire a permis une adéquation des locaux avec les missions de CNR.

Durant l'année 2009, les principales missions du CNRL ont été remplies, et les recommandations du Comité scientifique des CNR ont été prises en compte.

Sur 179 souches de *Leishmania* isolées ou reçues au CNRL, 129 ont été identifiées par électrophorèse des isoenzymes. Par ailleurs, 151 identifications moléculaires ont également été réalisées au CNRL.

Le nombre de souches de *Leishmania* entrées dans la collection en 2009 a été de 179. Le nombre de souches distribuées à la communauté scientifique a été particulièrement élevé (n = 352). Ces données sont analysées en détail plus bas.

La surveillance des leishmanioses humaines a été poursuivie tant en France métropolitaine qu'en Guyane (243 fiches de déclaration de cas reçues en 2009). En France métropolitaine, ont été déclarés en 2009 :

- 14 cas de leishmaniose viscérale (LV), 2 cas de leishmaniose cutanée (LC) et 3 cas de leishmaniose muqueuse (LM) autochtones,
- 8 cas de LV, 55 cas de LC et 1 cas de LM importés.

Un total de 152 cas de LC ont été contractés en Guyane, chiffre en léger retrait par rapport à celui de l'année précédente. Ce chiffre comprend les déclarations du laboratoire collaborateur du CHG de Cayenne, les chiffres rapportés par le Service de Santé des Armées et les cas de contamination en Guyane déclarés en France métropolitaine.

Un cas de leishmaniose cutanée a été déclaré en Martinique en 2009.

En terme de formation, 10 stagiaires ont été reçus au CNRL en 2009, parmi lesquels une doctorante en co-tutelle de thèse.

Le conseil thérapeutique téléphonique créé en 2006 a poursuivi son activité, avec 22 appels en 2009.

En 2009, l'activité de publication et communication a été très élevée. Les projets de recherche en lien avec l'activité du CNRL ont favorisé une forte activité de publications (11 publications dans des revues internationales avec comité de lecture et 2 chapitres de livres publiés en 2009). L'activité du CNRL a généré 1 communication orale dans un congrès national et 13 communications, dont 7 orales, dans des congrès internationaux, ainsi que 6 conférences sur invitation, dont 3 dans des congrès internationaux.

L'effort de la démarche qualité a particulièrement porté durant l'année écoulée sur le processus du typage moléculaire pour lequel une certification selon la norme AFNOR S96-900 est visée.

Le CNRL a reçu de l'Institut de Veille sanitaire une subvention annuelle s'élevant à 38.950 euros pour l'année 2009.

1. 3. Equipe :

a. Personnels :

Les divers personnels médicaux et non médicaux du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier et de l'Université Montpellier 1, qui sont, pour partie de leur temps, impliqués dans les activités et le fonctionnement du CNRL, sont listés ci-dessous. Leurs tâches respectives au sein du CNRL figurent sur l'organigramme fonctionnel présenté sur la figure 1. En 2009, leur implication dans le CNRL a représenté : 1,7 ETP pour le personnel médical, 4,1 ETP pour le personnel technique et 0,2 ETP pour le secrétariat.

Personnel médical : L'ensemble des personnels médicaux impliqués correspond à 1,7 ETP.

- **DEDET Jean-Pierre**, Professeur des Universités-Praticien hospitalier (UM1/CHU) : 0,2 ETP. J.P. Dedet est le responsable du CNR des *Leishmania*.
- **BASTIEN Patrick**, Professeur des Universités-Praticien hospitalier (UM1/CHU) : 0,1 ETP. P. Bastien est responsable adjoint du CNR des *Leishmania*.

- **PRATLONG Francine**, Maître de conférences des Universités-Praticien hospitalier (UM1/CHU) : 0,5 ETP. F. Pratlong est la Curatrice de la collection de *Leishmania*, et responsable du secteur d'identification isoenzymatique.
- **DEREURE Jacques**, Maître de conférence des Universités, Médecin attaché consultant (UM1/CHU) : 0,1 ETP
- **RAVEL Christophe**, Maître de conférences des Universités- Praticien hospitalier (UM1/CHU) : 0,5 ETP. C Ravel est responsable du Secteur d'identification moléculaire.
- **LACHAUD Laurence**, Maître de conférences des Universités-Praticien hospitalier (UM1) : 0,2 ETP. L. Lachaud assure le registre des cas et l'étude de la sensibilité des souches aux antileishmaniens.
- **BOURGEOIS Nathalie**, Assistant hospitalo-universitaire (UM1) : 0,1 ETP

Personnel technique : L'ensemble des personnels techniques impliqués correspond à 4,1 ETP.

- **BALARD Yves**, assistant-ingénieur (Université Montpellier 1) : 0,6 ETP
- **BRESSON Guillaume**, technicien (CHU de Montpellier) : 0,2 ETP
- **BOUADI Fathia**, adjoint technique (CHU de Montpellier) : 0,4 ETP
- **LAMI Patrick**, technicien (Université Montpellier 1) : 1 ETP
- **LEFEBVRE Michèle**, technicienne (Université Montpellier 1) : 0,1 ETP
- **SERRES Ghislaine**, technicienne (CHU de Montpellier) : 0,8 ETP
- **TALIGNIANI Loïc**, adjoint technique, Université Montpellier 1) : 1 ETP

Secrétariat :

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

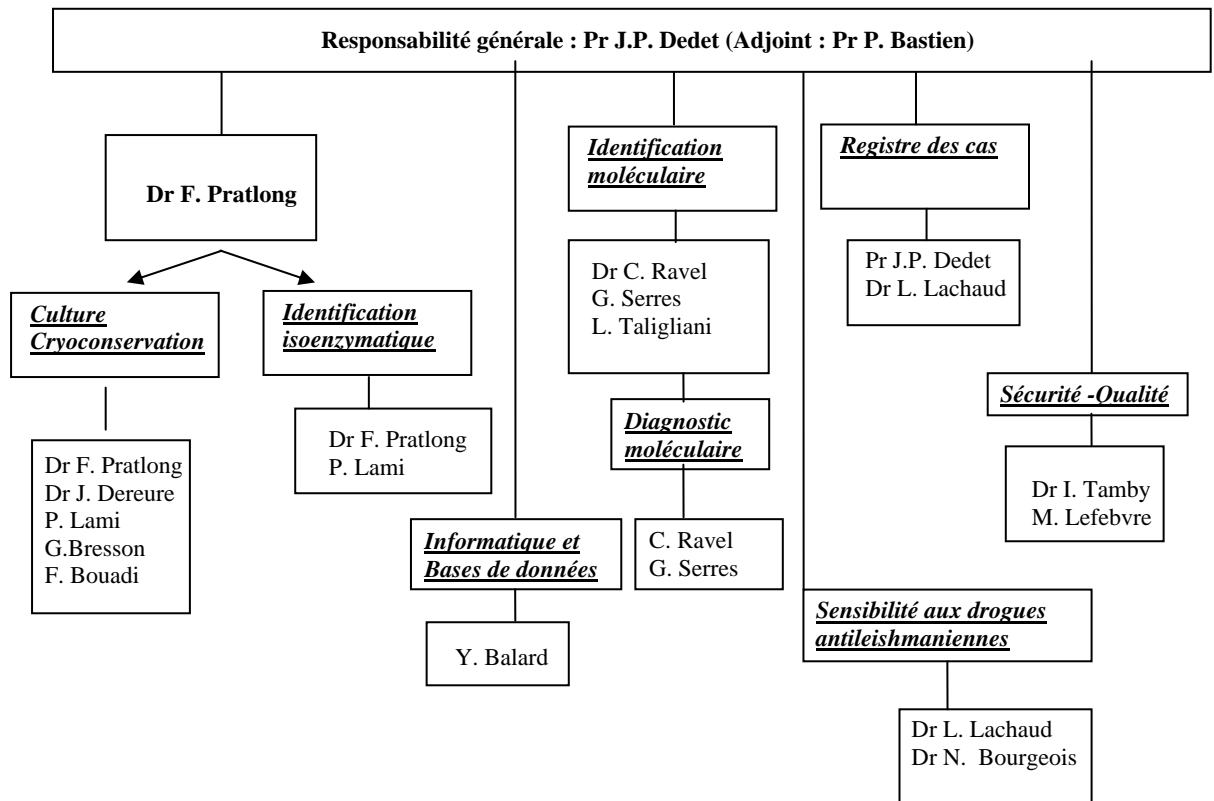
b. Démarche Qualité

Depuis 2006, une démarche Qualité a été entreprise en vue d'une certification pour la collection de *Leishmania* du CNRL. La traçabilité du processus de réception, suivi et expédition des souches est réalisée et l'acheminement des échantillons est conforme à la réglementation.

En 2009, le déménagement du laboratoire et l'installation dans de nouveaux locaux a nécessité une nouvelle organisation des processus, en particulier de réception et de culture. Ce déménagement a également été l'occasion de mettre en conformité les locaux et les équipements.

Dans le cadre de l'obtention de la certification selon la norme NF S96-900 et du label IBISA, une visite d'évaluation a été effectuée le 8 décembre 2009 par une consultante-qualité désignée par l'INSERM. La grille d'auto-évaluation a montré un taux de réponse aux exigences de la norme de 42 %. Les points d'amélioration proposés sont en cours de réalisation.

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



1. 4. Locaux et équipements :

Le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier, installé jusqu'à présent en centre ville, à l'Institut de Botanique, 163 rue Auguste Broussonet, a déménagé en juillet 2009, pour rejoindre l'un des sites du CHU, le site de La Colombière.

Il est désormais installé dans un bâtiment modulaire de 1330 m², dont la construction a été entièrement prise en charge par le CHU, et qui comprend un rez-de-chaussée et un étage. Dans ces locaux sont installés à la fois le laboratoire hospitalier de diagnostic, le Centre National de Référence des *Leishmania* et les équipes de recherche incluses dans l'UMR 2724 « Génétique et évolution des maladies infectieuses » (CNRS / IRD / Université Montpellier 1).

Dans ce bâtiment, le CNRL dispose de pièces spécifiques et partage des pièces techniques communes à diverses activités. La grande surface du laboratoire a permis une adéquation des locaux avec les missions de CNR. Un plan est fourni en annexe.

Les grandes zones d'activité où s'exercent les activités du CNRL 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). A cette unité de culture, s'ajoute une enceinte confinée de niveau P3, pour la culture des espèces de *Leishmania* classées en L3 (*L. donovani* et *L. braziliensis*) ;
- une unité de cryoconservation avec un local spécifique aux normes de sécurité pour la manipulation de l'azote liquide et contenant, 1 container de 351 litres (Espace 351), 1 container de 151 litres (Espace 151), 5 containers de 140 litres (Arpège 140), 23 containers de 40 litres (GT 40) et un container de répartition (TP100). Un contrat de livraison hebdomadaire d'azote liquide existe avec Air Liquide Santé, avec mise à niveau des containers. Seul le remplissage des GT40 est encore assuré chaque semaine par le technicien du laboratoire (P. Lami) ;
- un laboratoire de biochimie pour l'électrophorèse des isoenzymes ;
- un plateau technique partagé avec l'équipe de recherche et l'équipe hospitalière ; ces locaux comportent entre autres quatre pièces en pression négative dédiées à la "préamplification" et une pièce en pression positive dédiée à la "post-amplification" ; les différentes pièces de "pré-amplification" permettent de séparer les activités dites de routine (sécurisation maximum) des activités dites de mise au point, accessibles à un personnel plus large ;
- un bureau spécifique dévolu au CNRL.

Les activités du CNRL bénéficient également de locaux généralistes partagés (pièce de réception des échantillons, pièce informatique, secrétariat)

Le déménagement du laboratoire a été l'occasion pour le CHU de renouveler totalement les équipements courants généraux du laboratoire : autoclave, diverses étuves, centrifugeuses, balances, pH-mètres, microscopes, appareils à électrophorèse en champ pulsé, appareils d'amplification génique (PCR), appareil de PCR en temps réel de type LightCycler 480, sécheurs de gels, bain sec, équipement polaroid, plaque UV, cuves à électrophorèse et électrofocalisation, générateurs divers, systèmes de refroidissement des cuves, congélateurs divers (- 20° et - 80° C).

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

2. ACTIVITES D'EXPERTISE :

2.1 Capacités techniques

L'identification des *Leishmania* est réalisée dans notre laboratoire depuis 1979 selon la technique de référence d'identification biochimique par électrophorèse des isoenzymes. A cette technique s'ajoute l'identification moléculaire par séquençage d'un gène de la RNA polymérase II. Un typage multilocus (MLST) est en cours de développement, qui porte sur l'analyse simultanée de 7 loci génomiques indépendants. D'autre part le typage par analyse des caryotypes moléculaires (électrophorèse en champ pulsé) est réalisé ponctuellement sur des souches isolées de patients immunodéprimés (infection VIH) souffrant d'une infection leishmanienne au long cours.

a. Technique de référence : Identification iso-enzymatique

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

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

b. Identification moléculaire au CNRL (Montpellier)

L'identification moléculaire est réalisée depuis fin 1998 sur tout prélèvement ou culture provenant de leishmanioses tégumentaires. Elle est basée sur le séquençage du locus RNA Pol II. L'identification moléculaire permet notamment la différenciation rapide de toutes les espèces de *Leishmania*. Elle est appliquée non seulement sur les souches en culture, mais également sur les prélèvements, en particulier biopsiques, ce qui permet un typage même en cas de culture négative ou contaminée.

Cette technique a été validée par une étude comparative entre les deux techniques isoenzymatique et moléculaire, réalisée sur une période de deux ans sur un total de 200 souches. Actuellement, l'identification à partir de prélèvements cliniques est réalisée de façon systématique par technique moléculaire.

c. Identification moléculaire au laboratoire collaborateur de Cayenne (Pr B. Carne)

Avec le même souci qu'en 2008, à savoir celui de la surveillance des leishmanioses cutanées en Guyane, ainsi que celui d'apporter une réponse individuelle rapide au clinicien, le laboratoire collaborateur du CNRL à Cayenne (Laboratoire hospitalo-universitaire de Parasitologie-Mycologie et EA 3593) dirigé par le Pr B. Carne, a poursuivi en 2009 la détermination en quasi routine des espèces de *Leishmania* isolées (*cf. infra*). La nouvelle technique PCR – RLFP mise au point en 2007 - 2008 donne entière satisfaction (Simon S, Veron V, Carne B. *Leishmania spp.* identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 66: 175-80).

d. Autres techniques utilisées

- Typage par analyse des caryotypes en champ pulsé :

Les caryotypes moléculaires des *Leishmania* présentent une grande variabilité. Cette caractéristique permet d'envisager une différenciation entre souches génétiquement très proches. Cette méthode, que nous utilisons depuis 2007 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.

- Etude in vitro de la sensibilité des souches de *Leishmania* aux anti-leishmaniens :

La résistance des souches de *Leishmania infantum* vis-à-vis des drogues antileishmaniennes de première ligne que sont les antimoniés, l'amphotéricine B et la miltéfosine est étudiée. Plusieurs systèmes d'étude in vitro sont disponibles au CNRL : Modèle promastigote/milieu axénique, modèle amastigote/milieu axénique et modèle amastigote/macrophage THP1.

- Approche MLST

Le développement d'une approche d'identification et de typage par Multilocus Sequence Typing (MLST) se poursuit. La très forte divergence génétique au sein du genre *Leishmania* a nécessité de très nombreuses mises au point et l'essai de différentes amorces pour analyser les génotypes des souches du Nouveau Monde. Actuellement, des données sur 7 loci génomiques ont été obtenues sur environ 370 souches de références, représentant l'ensemble des espèces du genre *Leishmania*. Un important travail d'analyse bioinformatique va être engagé en 2010.

e. Collections de souches

- Collection de souches de *Leishmania* (Cryobanque)

Débutée en 1971, elle s'est régulièrement enrichie. Depuis une dizaine d'années, le nombre de nouvelles souches annuellement cryoconservées dans la collection est d'environ 200. En 2009, le nombre de souches entrées dans la collection a été de 179 (figure 2).

La collection comporte actuellement 5.900 souches provenant de 67 pays, sur 5 continents. Les souches proviennent principalement de cas humains de leishmanioses, mais également de chiens et d'autres hôtes mammifères, ainsi que de phlébotomes vecteurs. Du point de vue géographique, les souches proviennent principalement d'Europe (45,5 %) et d'Afrique (30,7 %), mais également d'Asie (12,1 %) et d'Amérique (11,7 %).

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

La collection est Centre de Ressources Biologiques en émergence. Je fais d'ailleurs partie du Comité sectoriel Microorganismes du Comité Consultatif des Centres de Ressources Biologiques, au Ministère de l'Enseignement supérieur et Recherche.

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

Depuis 2006 nous participons au réseau européen « European Research Infrastructure for Biobanking and Biomolecular Resources », ainsi qu'au Réseau français des Biobanques.

- Conditions de mise à disposition de la collection :

Un catalogue de 443 souches disponibles dans la collection est présenté sur le site internet du laboratoire : www.parasitologie.univ-montp1.fr/cryobanque.htm

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

- Collection d'ADN de *Leishmania*

Depuis 2003, une collection d'ADN a été constituée. Elle renferme des ADN obtenus à partir de cas humains (environ 1900) ou à partir de souches de culture (environ 700). Tous

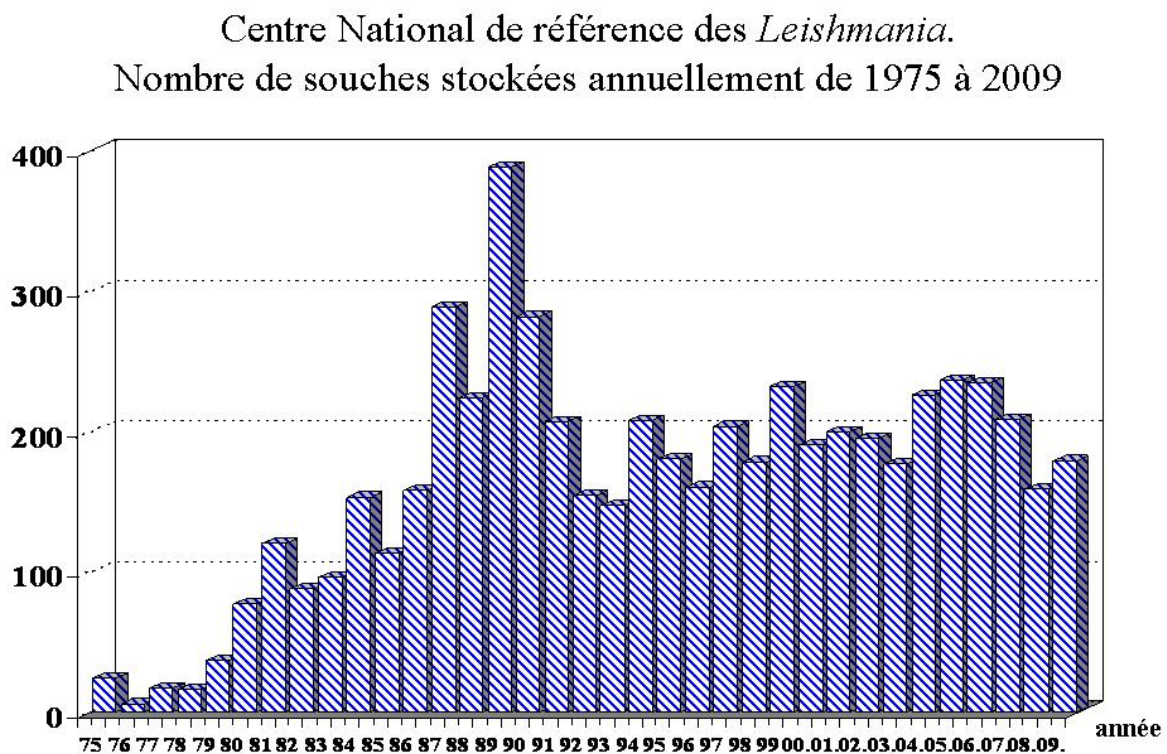
les ADN sont cryoconservés à -30°C et en 2008 un logiciel de gestion de cette collection a été développé au sein du Laboratoire. Cette collection a été déclarée dans le cadre du Centre des Collections Biologiques hospitalières du CHU de Montpellier.

f. Techniques de diagnostic utilisées

- **Le diagnostic moléculaire par PCR** est basé sur l'amplification du locus de l'ARN ribosomal. Au cours de l'année 2009, le laboratoire s'est équipé d'un appareil de PCR en temps réel (LightCycler LC480) et la quantification de la charge parasitaire dans le sang pour les leishmanioses viscérales a été mise au point et fonctionne en routine. Le développement de cibles moléculaires sur l'ADN kinétoplastique a été initié et devrait permettre un gain important de sensibilité.

- **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.

Figure 2.



2.2. Activités d'expertises en 2009

a. Activité diagnostique

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

- Diagnostic moléculaire

Durant l'année 2009, 242 échantillons pour diagnostic moléculaire de leishmanioses ont été analysés.

- Diagnostic immunologique

En 2009, 192 sérologies leishmaniennes ont été réalisées (soit 20 de plus qu'en 2008), parmi lesquelles ont été positives 12 immunofluorescences, 9 ELISA et 4 immuno-empreintes.

b. Souches reçues

En 2009, 179 souches de *Leishmania* ont été isolées ou reçues, dont 55 d'hôpitaux, centres de soins ou instituts de recherche français, et 124 de centres de soins ou de recherche à l'étranger. Le détail de l'origine des souches par centre d'isolement figure sur le tableau I. Toutes les souches ont été congelées en azote liquide et sont conservées dans la Cryobanque de *Leishmania*.

Tableau I.- Origine selon le centre de soin, des 179 souches de *Leishmania* traitées par le CNRL en 2009.

France (55 souches)				Etranger (124 souches)		
Etablissements	Nb	Etablissements	Nb	Pays	Etablissements	Nb
CH Avignon	1	AP – HP Bichat	6	Grèce	Faculté de Médecine - Université de Crète - Héraklion	65
CHU Grenoble	2	AP – HP Bobigny	1	Portugal	Universidade Nove de Lisboa-Medicina Tropical - Lisbonne	2
CHRU Limoges	1	AP – HP Cochin	3	Tchéquie	Charles University - Faculty of Science - Prague	3
CH Le Mans	1	AP – HP Pitié Salpêtrière	1	Tunisie	Institut Pasteur de Tunis	37
CHU Montpellier	4	AP – HP Saint Antoine	2		Laboratoire de parasitologie - Faculté de Pharmacie de Monastir	12
CHU Nice	14	AP – HP Saint Louis	3	Turquie	Trakya University - Edirne	1
Hôpital La Timone Marseille	5	Ecole Vétérinaire de Lyon	1	Syrie	Institut de Recherche pour le Développement – UMR 177 – Montpellier	4
CHU Rennes	1	HIA Laveran	4			
CHRU Tours	2					
Institut Pasteur Paris	3					

Depuis plus d'une dizaine d'années, les nombres annuels de souches traitées au CNRL se situaient aux environs de 200 par an, avec des fluctuations annuelles assez faibles. Le chiffre de 2008 avait été nettement inférieur (n = 152) ; celui de 2009 connaît une nette remontée (n = 179) (figure 2).

L'origine géographique des souches par pays où la contamination des cas a eu lieu figure sur le tableau II. A noter les particularités suivantes sur les souches reçues en 2008 :

- les souches ont été obtenues de 18 pays ou territoires différents, dont 7 pays d'Afrique, 4 pays d'Amérique, 2 pays d'Asie et 5 pays d'Europe ;
- les échantillons les plus importants provenaient de travaux collaboratifs de recherche avec plusieurs pays étrangers, dont la Grèce dans le cadre du Projet de recherche EDEN (62 souches), la Tunisie dans le cadre d'un essai thérapeutique (53 souches) et le Maroc (12 souches) ;
- l'isolement de 15 souches à partir de cas de leishmanioses observés en France.

Tableau II.- Origine géographique, par pays d'isolement, des 179 souches traitées par le CNRL en 2009.

Continents	Pays	Nb	Continents	Pays	Nb
Afrique (n = 71)	Algérie	1	Asie (n = 11)	Syrie	7
	Burkina Faso	1		Turquie	4
	Djibouti	1			
	Mali	1	Europe (n = 85)	Chypre	3
	Maroc	12		Espagne	2
	Sénégal	2		France	15
	Tunisie	53		Grèce	62
Amérique (n = 7)	Bolivie	1	Portugal	2	
	Costa Rica	1	Pays indéterminé	1	
	Guyane française	4			
	Mexique / Panama	1			
Origine géographique inconnue					5

c. Identification moléculaire

En 2009, 151 identifications ont été réalisées selon cette méthode (en progression par rapport à 2008), à partir de souches ou d'ADN, mais également à partir de divers types de prélèvements (biopsies, produits de grattage, sang, moelle osseuse).

Au total 10 espèces de *Leishmania* ont été identifiées. Parmi les souches de l'Ancien Monde prédominantes dans notre échantillon (85,9 %), c'est essentiellement *L. major* (79 souches, soit 53%) qui domine, espèce présente en Afrique du Nord, Afrique Sud saharienne, Proche et Moyen-Orient. Ce chiffre est à rapprocher du nombre important de cas d'importation déclarés (*cf. infra*). *L. infantum*, espèce du sud de la France et du bassin méditerranéen, est également bien représentée (33 souches, soit 22%).

Vingt et une souches du Nouveau Monde ont été également identifiées, dont une prédominance de *L. guyanensis* (17 souches).

d. Identification isoenzymatique

Sur les 179 souches isolées ou reçues en 2009, 129 ont été identifiées par électrophorèse des isoenzymes, ou sont en cours d'identification, et 50 n'ont pas fait l'objet d'un typage

enzymatique. Le typage enzymatique, qui est toujours une technique de référence reconnue par la communauté scientifique, n'est plus utilisé en routine, mais est réservé essentiellement aux enquêtes et études épidémiologiques. Cette technique permet également de réaliser une classification lorsqu'une Leishmanie nouvelle est mise en évidence.

Tableau III.- Détails des identifications enzymatiques de 129 souches réalisées en 2009.

Espèces	Zymodèmes	Nombres
<i>L. infantum</i>	MON-1	71
	MON-24	1
	MON-98	8
	En cours de typage	6
<i>L. archibaldi</i>	En cours de typage	1
<i>L. donovani</i>	MON-309	3
<i>L. major</i>	MON-25	32
<i>L. tropica</i>	MON-76	4
	En cours de typage	2
Typage en cours		1

Le typage durant l'année 2009 a été concentré sur l'espèce *L. infantum* présente dans le sud de la France et dans le Bassin méditerranéen, et sur *L. major*, dans le cadre du suivi d'un essai thérapeutique de la paromomycine onguent dans la LC à *L. major* en Tunisie. Le détail des identifications des souches figure sur le tableau III.

e. Identifications moléculaires effectuées à Cayenne sur les souches locales

L'émergence de *Leishmania braziliensis* s'est confirmée en Guyane sans pouvoir affirmer le caractère récent ou non de ce phénomène, faute de surveillance précise antérieure. Ce qui est certain c'est la rareté des cas au cours des années 80, époque où les premières observations de cette espèce furent mentionnées. Entre janvier 2006 et décembre 2008, pour 199 identifications effectuées chez des patients contaminés en Guyane, les prévalences étaient de 84.4 % pour *L. guyanensis*; 8.0 % pour *L. braziliensis* (10 des 16 souches ont été contrôlées par séquençage); 5.0 % pour *L. amazonensis* et 1.9% pour *L. lainsoni*. Aucun cas de *L. naiffi* n'a été identifié au cours de cette étude (Carme B, Couppié P. La leishmaniose cutanée en Guyane : émergence de *Leishmania V brasiliensis*. Med Trop (Marseille) 2009 ; 69 : COP 09).

En 2009 ce profil se retrouve (Tableau IV). Si l'on compare ces résultats avec ceux publiés en 1989 (Desjeux & Dedet, 1989) pour 91 isolats obtenus entre 1982 et 1987, qui ne comportait aucun cas de *Leishmania braziliensis*, l'émergence se trouve confirmée (Yate's chi²: 6.22, p= 0.013). La technique d'identification utilisée à l'époque faisait et fait toujours références (technique des isoenzymes).

Tableau IV.- Identification moléculaires des souches de *Leishmania* isolées en Guyane. Comparaison 2008 / 2009.

Espèces	2008		2009	
	nombre	%	nombre*	%
Nombre total	80		60	
<i>L. guyanensis</i>	65	81,2	50	83,3
<i>L. braziliensis</i>	8	10,0	9	15,5
<i>L. amazonensis</i>	5	6,2	1	1,7
<i>L. lainsoni</i>	2	2,5	0	0

* les identifications de décembre sont en cours et ne sont pas comptabilisées.

Parallèlement la recherche de leishmaniose viscérale par PCR en temps réel pour tous les patients VIH+ présentant un tableau infectieux avec localisation viscérale vus au Centre Hospitalier de Cayenne s'est poursuivie en 2009, tout comme la surveillance vétérinaire chez les chiens suspectés d'être atteints de leishmaniose par nos correspondants vétérinaires. Aucun cas, ni humain, ni vétérinaire, n'a été confirmé.

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

Durant l'année sous revue, 21 souches de *L. infantum* obtenues chez des patients atteints de co-infection avec le VIH ont été testées vis-à-vis du SbIII et du SbV, et ont montré clairement la présence de résistance aux divers antimoniés. Vis-à-vis de la miltéfosine, une étude préliminaire sur 10 souches de *L. infantum* responsables de leishmaniose viscérale ne met pas en évidence de résistance à cette molécule.

g. Souches de *Leishmania* issues de la collection du CNRL distribuées en 2009

En 2009, 352 souches de *Leishmania* ont été fournies à divers laboratoires et institutions en France et à l'étranger, dont la liste figure ci-dessous :

➤ **En France, 304 souches ont été fournies :**

- 29 souches à l' UMR 2724 CNRS-IRD-UM1, Centre IRD de Montpellier
- 21 souches à l'UMR 5086 CNRS-Université de Lyon 1
- 202 souches au Laboratoire de Parasitologie, CHU de Nice
- 1 souche à la Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud 11
- 4 souches au Laboratoire de Parasitologie, UMR-MD 3, Marseille
- 47 souches ont été fournies en interne, aux chercheurs de notre laboratoire

➤ **A l'étranger, 48 souches ont été fournies :**

- 12 souches à l'Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Maroc
- 5 souches au Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, Monastir, Tunisie
- 4 souches au Centre de Recherche en Infectiologie, Université Laval, Quebec, Canada
- 12 souches à l'Université d'Anvers, Belgique
- 11 souches à l'Institut de Médecine tropicale d'Anvers, Belgique
- 1 souche à l'Instituto de Bioquímica, Hospital Vargas, Caracas, Venezuela
- 3 souches au Département de Dermatologie, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Allemagne

h. Evolution des tendances

Durant l'année 2009, nous avons privilégié en routine le typage moléculaire (passé de 97 en 2007 et 126 en 2008 à 151 en 2009), réservant l'identification enzymatique, technique de référence, à certains taxons (*L. infantum*) ou à des travaux de recherche précis. De même, à Cayenne, au laboratoire du Pr B. Carmes, le typage moléculaire des souches isolées a été réalisé en routine (60 souches typées sur les 10 premiers mois de 2009).

La collection de souches s'est enrichie de 179 exemplaires en 2009, un nombre d'entrées en progression par rapport à l'année précédente.

3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

Depuis 1998, les **leishmanioses humaines** font l'objet d'un recensement annuel de la part du CNRL, 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. Ce recensement a porté initialement sur la France métropolitaine, puis a été étendu à la Guyane, en 2003.

3.1. Surveillance des leishmanioses humaines

Durant l'année 2009, 243 déclarations de cas sont parvenues au CNRL, dont 100 de structures de santé de France métropolitaine, 1 du CHU de Martinique, 119 ont été fournies par le laboratoire collaborateur du CNRL à Cayenne et 23 par le Département d'épidémiologie et Santé Publique de l'Institut de Médecine tropicale du Service de Santé des Armées.

Ces résultats à la date du 31 mars 2009 sont détaillés ci-dessous. Ils 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.

a. Réseau de partenaires

La liste des services ayant déclaré au CNRL des cas de leishmanioses en 2009 figure ci-dessous.

Pour les CHU : les Laboratoires de Parasitologie-Mycologie des 20 CHU suivants : Besançon (25), Brest (29), Clermont Ferrand (63), Dijon (21), Fort-de-France (972), Grenoble (38), Limoges (87), Lyon (69), Marseille (13), Montpellier (34), Nice (06), Rennes (35), Tours (37), divers établissements de l'AP-HP à Paris (75) (Bichat, Cochin-St Vincent de Paul, Claude Bernard, Hôtel-Dieu, St Antoine, St Louis, Pitié-Salpêtrière).

Pour les CH et CHG : CH Avignon (84), CH Chambéry (73), CH Gonesse (95), CH Le Mans (72), CH Lons-le-Saunier (39), CHR Metz-Thionville (57), CHG de Cayenne (97.3)

Pour les Hôpitaux d'Instruction des Armées : HIA Laveran à Marseille (13).

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

Autres structures sanitaires : Institut Pasteur de Paris (75).

b. Cas humains déclarés en 2009

- France métropolitaine

En 2009, 101 fiches de déclaration de cas ont été reçues directement au CNRL, en presque totalité provenant de France métropolitaine (100 déclarations), et 1 cas provenant de Martinique. Parmi ces fiches de déclaration, 28 cas concernaient une leishmaniose viscérale, 70 une leishmaniose cutanée et 3 une leishmaniose muqueuse.

En France continentale, ont été déclaré en 2009 :

- 19 cas autochtones de leishmanioses, dont 14 cas de LV, 2 de LC et 3 LM,
- 74 cas importés de leishmanioses, dont 8 cas de LV, 66 cas de LC (dont 11 de Guyane française),
- dans 7 cas il n'a pas été possible de trancher sur l'origine, importée ou autochtone de la contamination.

L'ensemble de ces données, comparées à celles des années précédentes, figure sur le Tableau V.

Le nombre de cas de leishmanioses déclarés au CNRL par des structures de santé en France continentale est sensiblement au même niveau que l'année précédente (Tableau V). Ce score provient d'un nombre de cas importés supérieur à la moyenne annuelle, cependant que les cas autochtones accusent un nouveau fléchissement (nombre inférieur à la moyenne annuelle).

Le nombre de cas autochtones de LV est le plus bas observé depuis le début de la surveillance. En revanche, les cas autochtones de LM sont les plus élevés, mais ceci se joue à l'unité près. Tous les cas autochtones proviennent de six départements du sud de la France, situés dans la zone d'endémie leishmanienne connue, mais des départements pourvoyeurs habituels, comme le Gard, l'Hérault et les Pyrénées-Orientales, n'ont pas déclaré de cas, alors que des départements habituellement peu déclarant sont positifs, comme les Alpes de Haute-Provence ou l'Aveyron (Tableau VI).

Il convient toutefois de relativiser l'analyse, car des déclarations de cas peuvent encore parvenir dans le courant de l'année, pour des cas de l'année 2009. Nous apporterons un correctif ultérieur aux données présentées ici.

Sur les 14 cas autochtones de LV, 3 cas provenaient de patients immunodéprimés, dont 2 étaient infectés par le VIH.

Parmi les cas importés, ce sont les cas de LC qui sont élevés : 66, dont 39 cas de contamination en Afrique du Nord et 11 en Guyane.

- Martinique :

Un cas de leishmaniose a été déclaré en Martinique en 2009, chez un homme de 40 ans, né et demeurant au François, et n'ayant jamais quitté l'île. Une étude de ce cas est en cours.

Tableau V.- Comparaisons des nombres de déclarations annuelles des cas faites au CNRL entre 1999 et 2009.

Années		1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	Moyennes annuelles
Cas autochtones (France métropolitaine)	LV	22	30	31	18	20	18	19	16	22	17	14	
	LC	1	0	4	4	2	0	0	3	1	4	2	
	LM	1	0	0	1	1	0	0	0	2	0	3	
	Total	24	30	35	23	23	18	19	19	19	25	21	19
Cas importés (en France métropolitaine)	LV	3	6	3	5	5	8	6	7	7	4	8	
	LC	17	22	33	34	50	60	60	43	34	56	55	
	LC Guyane	62	9	3	9	21	32	17	8	21	17	11	
	LM	2	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	
	Total	84	37	39	48	76	101	85	58	62	77	74	74
Origine non précisée										1	6	7	
Totaux		108	67	74	71	99	119	104	77	88	104	100	92,0

Tableau VI.- Départements d'origine des cas autochtones de leishmanioses déclarés en 2009.

Départements	LV	LC	LM
Alpes de Haute Provence	1	0	0
Alpes-Maritimes	5	0	0
Aveyron	0	0	1
Bouches-du-Rhône	4	1	1
Drôme	1	0	0
Gard	0	0	0
Hérault	0	0	0
Pyrénées-Orientales	0	0	0
Var	2	0	0
Vaucluse	0	0	0
Département non précisé	1	2	1
Totaux	14	2	3

- Guyane française :

Durant l'année 2009 :

- le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (Professeur Bernard Carne) du Centre Hospitalier de Cayenne nous a adressé 119 déclarations de cas de LC diagnostiqués en Guyane,
- le Service de Santé des Armées (Département d'Epidémiologie et Santé publique de l'Institut de Médecine tropicale du Pharo) 23 cas,
- de plus, parmi les déclarations envoyées par les diverses structures sanitaires métropolitaines, 10 concernaient des cas de contamination en Guyane.

Ainsi au total, 152 cas de leishmaniose cutanée ont été contractés en Guyane en 2009. Le détail figure sur le tableau VII.

Tableau VII.- Cas de leishmaniose cutanée contractés en Guyane en 2009, en fonction de la source de déclaration.

Déclarations	Nb total	Sexe			Clinique	Statut		
		H	F	non précisé	LC	militaire	civil	inconnu
En France*	10	9	1	0	10	5	0	5
CH Cayenne	119	103	13	3	119	6	61	52
SS des Armées	23	23	0	0	23	23	0	0
Total	152	135	14	3	152	34	61	57

* France métropolitaine

Les nombres de cas en Guyane, depuis 2003, année où la surveillance par déclaration de cas est effective, en collaboration avec le Laboratoire de Parasitologie du Pr Carne, à Cayenne, ont montré de fortes valeurs en 2003-2005, avec une chute en 2006 que nous avons

attribuée, dans notre rapport de l'année 2006, à des causes externes (fermeture du Centre de Santé de Saint Elie, commune de l'intérieur où plus de 100 cas de LC avaient été comptabilisés de 2003 à mi-2005; et lutte très active contre les orpailleurs étrangers en situation illégale qui les amène à la clandestinité, et qui donc ne fréquentent plus les centres de santé de l'intérieur). La légère augmentation du nombre de cas en Guyane en 2007, s'est poursuivie en 2008. En revanche, le chiffre de 2009 est revenu sensiblement au niveau de 2007.

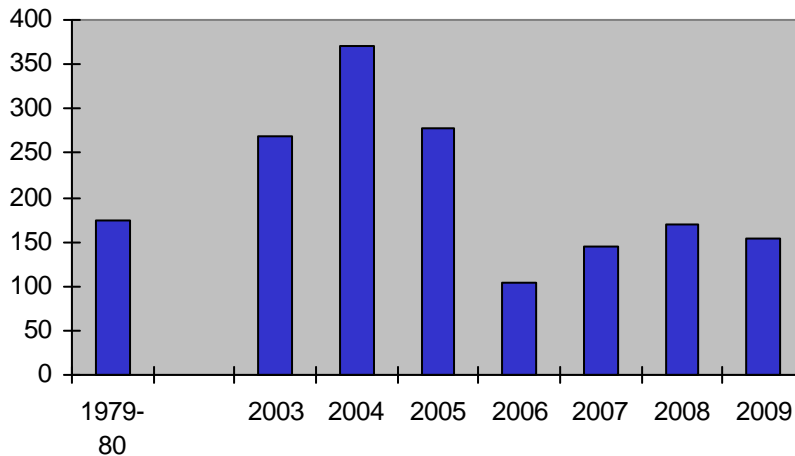


Figure 3.- Histogramme des nombres de cas de leishmaniose cutanée en Guyane française de 2003 à 2009. (L'incidence de l'année 1979-80 est notée pour mémoire, d'après Dedet et coll., *Rev. Epidémiol. Santé Publique*, 1991, 39 : 129-133).

c. Etude synthétique sur les leishmanioses tégumentaires autochtones

Une étude rétrospective des cas autochtones de leishmaniose tégumentaire à *L. infantum* observés dans le sud de la France durant le décennie 1998-2007 avait été réalisée en 2008 (thèse d'exercice à la Faculté de Médecine de Montpellier : Pratlong Laure. Les leishmanioses tégumentaires à *Leishmania infantum* du Sud de la France. Etude rétrospective 1998-2007. Thèse Faculté de Médecine de Montpellier, 5 décembre 2008).

L'année 2009 ayant montré 3 cas supplémentaires de leishmaniose tégumentaires autochtones, nous avons poursuivi l'étude, qui fait l'objet d'un article en préparation, qui sera publié en 2010.

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

A partir d'octobre 2009, notre attention a été attirée par la survenue de cas groupés importés, en particulier familiaux, de leishmaniose cutanée à *L. major*, chez des immigrants marocains revenant de vacances familiales dans la région d'Errachidia, dans le sud marocain. La surveillance de ces cas s'est poursuivie en 2010.

3. 2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux

Le CNRL 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 : 2 cas de co-infection ont été déclarés en 2009.

4. ALERTE

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

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

En 2009, nous n'avons pas déclenché d'alerte en France. La poursuite d'apparition, en début 2010, de cas importés groupés de LC en provenance du Maroc, nous a amenés à envoyer une alerte à la CIRE LR, dont le détail sera présenté dans le rapport d'activité 2010.

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

5.1. Information

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

Les pages du site incluent toute l'information sur la réglementation et les conditions d'expédition des souches, la démarche pour les déclarations de cas, ainsi que les activités du CNRL (rapports d'activité en ligne). Le site Internet a fait l'objet d'une mise à jour en 2009, en particulier pour prendre en compte le changement d'adresse du Laboratoire et du CNRL. Le rapport d'activité 2008 a été mis en ligne en 2009.

La rétro-information des déclarations de cas de leishmanioses auprès des déclarants 2008 n'a pu être effectuée en 2009, en raison du déménagement du laboratoire, et de mon implication personnelle dans le Plan Grippe du CHU de Montpellier. Nous avons prévu d'effectuer la rétro-information des années 2008 et 2009 en même temps, en juin 2010.

5.2. Formation

En 2009, 10 stagiaires ont été reçus au CNRL, dont cinq Français, un Britannique, une Algérienne, deux Tunisiens, un Marocain et un Palestinien (Tableau VIII).

Parmi ces stagiaires, Melle Khatima Aït Oudhia, vétérinaire de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, doctorante en co-tutelle de thèse, a eu une première publication parue en 2009 (*cf. infra*).

Tableau VIII.- Liste des stagiaires reçus en 2009

NOM	PRENOM	FORMATION / AFFILIATION	ORIGINE	DATES DU STAGE
HALL	Miquette	University of Keele, cursus Hres/Erasmus Programme	Royaume-Uni	26/01/09 - 21/08/09
TROMBINI	Gregory	Vétérinaire des Armées, Marseille	France	05/02/09
LAHMEDI	Ramzi	Technicien, IP de Tunis	Tunisie	09/02/09 - 09/03/09 01/07/09 - 30/09/09
AIT OUDHIA	Khatima	Ecole Vétérinaire , Alger	Algérie	05/07/08 - 03/10/08 15/12/08 - 12/01/09 Août - Sept. 2009
CORCOS	Sami	5 ^{ème} Année Pharmacie	France	01/10/08 - 30/09/09
EL BAIDOURI	Fouad	Thèse Sciences 1 ^{ère} Année	Maroc	> sept. 2009
PRINCE	Clémentine	5 ^{ème} Année Pharmacie	France	01/10/09 - 31/06/10
ZAATOUR	Amor	Institut Pasteur de Tunis	Tunis	19/10/09 - 30/10/09
AL-JAWABREH	Amer	Université de Jericho-Palestine	Palestine	02/11/09 - 08/11/09
KASBARI	Mohamed	AFSSA, Maisons-Alfort	France	21/10/09 - 31/10/09

5.3. Conseil :

Trois demandes d'information et conseil sur l'épidémiologie et la prévention des leishmanioses ont été reçues en 2009, dont une de la Médecine préventive de l'INSERM du Département des Alpes-Maritimes. Une suite a été donnée à chacune d'entre elles.

5.4. Conseil thérapeutique :

Le traitement des leishmanioses est un problème difficile pour plusieurs raisons. En effet, 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 CNRL a mis en place en 2006 une structure de Conseil thérapeutique téléphonique destinée aux médecins. Ce Conseil thérapeutique est basé sur une collaboration entre le CNRL et le Centre Médical de l'Institut Pasteur de Paris (Dr Pierre Buffet et Dr Gloria Morizot).

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

Les informations médicales nécessaires à la formulation d'un conseil thérapeutique incluent la forme clinique et l'espèce de *Leishmania* suspectée, ainsi que les caractéristiques du patient. Le recueil de l'option thérapeutique qu'aurait choisi le clinicien sollicitant s'il n'avait pas eu accès au conseil cherche à déterminer l'impact tangible de l'activité de conseil (hospitalisations et traitement systémiques non indispensables évités). Enfin, il est recherché si le conseil a été effectivement suivi et de connaître l'évolution sous traitement. Le Conseil thérapeutique permet enfin parfois de faire déclarer des cas.

Durant l'année 2009, 22 appels téléphoniques pour conseil thérapeutique ont été reçus et traités, dont 19 à Paris et 3 à Montpellier. Ils concernaient 15 hommes et 7 femmes, dont la moyenne d'âge était de 38,6 ans (extrêmes : 2 - 71 ans). Dans 17 cas il s'agissait de LC, dans 1 cas de leishmaniose muqueuse et dans 4 cas de LV (dont 2 patients VIH+, un greffé rénal et un patient pancytopenique avec signes d'autoimmunité). Dans 20 cas, il s'agissait d'une prise en charge initiale de leishmaniose récemment diagnostiquée, dans 2 d'un suivi évolutif.

Les appels provenaient de centres hospitaliers (20 fois), d'un centre de santé (1 fois) ou d'un praticien libéral (1 fois).

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

Le CNRL participe à plusieurs programmes de recherche conduits dans le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie et dans l'unité labellisée UMR 2724 (UMR IRD-CNRS-Université Montpellier 1) : « Génétique et évolution des maladies infectieuses » (Direction F. Renaud), à laquelle nous sommes rattachés depuis le 1^{er} janvier 2008.

Dans ce cadre, le CNRL développe des programmes plus spécifiques, orientés vers l'épidémiologie et la surveillance des leishmanioses.

6.1. Projet Européen EDEN

Le projet EDEN, pour "Emerging Diseases in changing European environment" . (6^{ème} PCRD; Contrat n° 010284) comprend un consortium de 46 participants des pays européens et pays associés hors Europe. Ce programme a débuté en novembre 2004 et s'est poursuivi jusqu'en 2009, avec une extension jusqu'en mai 2010.

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

Le CNRL est partie prenante de ce projet auquel il apporte l'appui de ses données de référence (souches identifiées, registres de cas humains). Nous avons ainsi réalisé une base de données rétrospective sur la leishmaniose canine en France et une base de données rétrospective sur la leishmaniose humaine en France est en cours d'établissement. L'exploitation cartographique de ces travaux a été menée à bien en 2010.

L'enquête sur la leishmaniose canine dans le département de l'Ariège, montrant les changements survenus dans la prévalence de l'enzootie canine à 13 années d'intervalle (1994 et 2007) a fait l'objet d'un article publié en 2009 dans *Vector Borne and Zoonotic Diseases* : **Dereure J., Vanwambeke S.O., Malé P., Martinez S., Pratlong F., Balard Y., Dedet J.P.** The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside

the classical area of the disease in Southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2009, 9, 687-694.

La base de données rétrospective prenant en compte les données disponibles sur la leishmaniose canine en France, entreprise dans le cadre du projet EDEN contient à présent 718 entrées correspondant à 45 articles ou rapports et à 425 localités avec cas de leishmaniose canine et qui sont toutes géoréférencées. L'exploitation géographique de cette base de données a été effectuée en 2009. Une analyse spatiale a été réalisée pour cartographier les cas de leishmaniose canine en France et produire une cartographie environnementale des zones à risque. Une analyse en composante principale suivie d'une classification hiérarchique ascendante a été effectuée pour obtenir le regroupement des localités où existait la leishmaniose canine selon des variables environnementales liées au climat, à la couverture forestière et aux densités humaines et de chiens. Pour chaque groupe, la distribution potentielle de la leishmaniose canine a été cartographiée en utilisant une approche de modélisation par niche, selon le modèle de Maxent.

Ce travail a fait l'objet d'un article soumis, dont la publication interviendra en 2010 : Chamailé L., Tran A., Meunier A., Bourdoiseau G., Ready P., Dedet J.P. Environmental risk mapping of canine leishmaniasis in France. *Parasites & Vectors*, sous presse.

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

Le CNRL est partenaire d'un essai thérapeutique de la paromomycine onguent dans le traitement de la leishmaniose cutanée à *L. major* en Tunisie, avec le Walter Reed Army Institute of Research de Washington (USA) et l'Institut Pasteur de Tunis (Tunisie). Dans cet essai, le CNRL est chargé de l'identification des souches isolées des patients.

Ainsi, en 2009, 78 souches ont fait l'objet d'une identification moléculaire et 20 d'une identification isoenzymatique.

6.3. AOI du CHU de Montpellier

Dans le cadre de l'Appel d'Offre Interne 2005 du CHU de Montpellier, un programme de recherche sur le thème "Etude de la résistance de *Leishmania infantum* à l'amphotéricine B (AmB) » s'est terminé fin 2009. Après des études clinico-biologiques concernant la résistance *in vivo* chez l'homme, des études ont été conduites *in vitro*. Des tests de résistance *in vitro* ont été mis au point et comparés de façon à sélectionner le test le plus adéquat et à pouvoir le proposer aux cliniciens qui en feront la demande. De plus, aucune résistance *in vitro* n'a été détectée, confirmant l'intérêt de cette molécule dans le traitement de la leishmaniose viscérale en France.

La modification de la composition en stérols de la membrane des souches de *Leishmania infantum* sensibles à l'AmB a par ailleurs été déterminée par méthode HPLC couplée à la spectrométrie de masse (collaboration avec le Pr. Philippe Loiseau, UMR 8076 CNRS-Université Paris-Sud XI).

Enfin, les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol ont été identifiées par similarité avec le cycle de biosynthèse décrit chez *Saccharomyces cerevisiae*, et une quantification est réalisée par real-time PCR, chez la souche "wild type" et "mutant", des ARNm transcrits à chaque étape de voie de biosynthèse de l'ergostérol. Ce travail fait partie d'une thèse de doctorat d'Université en cours, à soutenir en 2010 (Nathalie Bourgeois).

6. 4. Projet « Impact de l’anthropisation et de l’environnement sur le fonctionnement des foyers de leishmanioses »

Ce projet est financé dans le cadre du Programme « Santé environnement et Santé travail » de l’ANR. Ce projet coordonné par T. de Meeûs (IRD), associe l’IRD, l’Université de Reims, l’Université des Antilles et de la Guyane, et les Universités Montpellier 1 et 2.

Il porte sur l’analyse génétique et épidémiologique des leishmanioses dans le sud de la France, en Guyane française et au Sénégal.

Dans le cadre de ce projet qui a débuté en 2007, le Laboratoire a en charge le typage moléculaire MLST des souches Sud Américaines.

6.5. Groupe de travail « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation ».

Un groupe de travail destiné à harmoniser les pratiques de prise en charge thérapeutique des patients atteints de Leishmaniose s’est constitué en 2009 et s’est réuni pour la première fois en janvier 2010 à Bâle, avec la participation d’un membre du CNRL (C. Ravel). Ce groupe rassemble des Biologistes et Cliniciens de plusieurs pays Européens (UK, Suisse, France, Espagne, Allemagne, Pays Bas, Belgique) et devrait s’élargir dans l’avenir.

Le CNRL doit contribuer en mettant à disposition de toutes les équipes des échantillons d’ADN de toutes les espèces de *Leishmania*, avec l’objectif d’harmoniser les techniques d’identification moléculaires des parasites, étape clé dans la prise en charge thérapeutique.

7. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Durant l’année 2009, l’activité de publication et communication a été très élevée. En effet, l’activité du CNRL a généré : 11 publications dans des revues internationales à comité de lecture et 2 chapitres de livres. En ce qui concerne les congrès, on note 1 communication dans un congrès national, 13 communications dans des congrès internationaux (dont 7 communications orales et 6 affichées), 6 conférences invitées, dont 3 dans des congrès nationaux et 3 dans des congrès internationaux. Trois membres du CNRL ont participé au **4th World Congress on leishmaniasis**, qui s’est tenu à Lucknow (Inde) du 3 au 7 février 2009.

Toutes ces publications et communications sont détaillées ci-dessous (en gras et soulignés les membres du CNRL).

7.1. Publications internationales

Aït-Oudhia K., Lami P., Lesceu S., Harrat Z., Hamrioui B., Dedet J.P., Pratlong F. Increase in the prevalence of canine leishmaniasis in urban Algiers (Algeria) following the 2003 earthquake. *Ann Trop Med Parasitol*, 2009, 103 : 679-692.

Alam M.Z., Haralambous C., Kuhls K., Gouzelou E., Sgouras D., Soteriadou K., Schnur L. **Pratlong F.**, Schönian G. The paraphyletic composition of *Leishmania donovani* zymodeme MON-37 revealed by multilocus microsatellite typing. *Microbes Infect*, 2009, 11 : 707-715.

Antoniou M., Haralambous C., Mazeris A., **Pratlong F., Dedet J.P.**, Soteriadou K. *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis*, 2009, 9 : 76-77.

Berens-Riha N., Fleishmann E., **Pratlong F.**, Bretzel F., Von Sonnenburg F., Löscher T. Cutaneous leishmaniasis (*Leishmania tropica*) in a german tourist after travel to Greece. *J travel Med*, 2009, 16 : 220-222.

Casanova M., Crobu L., Blaineau C., **Bourgeois N., Bastien P.**, Pagès M. Microtubule-severing proteins are involved in flagellar length control and mitosis in Trypanosomatids. *Mol Microbiol*, 2009, 71:1353-70.

Chargui N, Amro A, Haous N, Schönian G, Babba H, Schmidt S., **Ravel C., Lefebvre M, Bastien P.** Chaker K, Zribi M, Kuhls K. Population structure of Tunisian *Leishmania infantum* and evidence for the existence of hybrids and gene flow between genetically different populations. *Int J Parasitol* 2009, 39:801-11.

Dereure J., Vanwambeke S.O., Male P., Martinez S., **Pratlong F. Balard Y. Dedet J.P.** The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in Southern France. *Vector-borne Zoo Dis*, 2009, 9 : 687-694.

Harrat Z., Boubidi S.C., **Pratlong F.**, Benikhlef R., Selt B., **Dedet J.P., Ravel C.**, Belkaid M. Description of a dermatotropic *Leishmania* close to *L. killicki* (Rioux, Lanotte & Pratlong 1986) in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2009, 103 : 716-720.

Lachaud L., Bourgeois N., Plourde M., Leprohon P., **Bastien P.**, Ouellette M. Parasite susceptibility to Amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfecting with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. *Clin Infect Dis*, 2009, 48: 16-22

Maubon D., Guillou C.T., **Ravel C.**, Leccia M.T., Pelloux H. *Leishmania killicki* imported from Tunisian desert. *Emerg Infect Dis*. 2009, 15 :1864-5.

Pratlong F., Dereure J., Ravel C., Lami P., Balard Y., Serres G., Lanotte G., Rioux J.A., Dedet J.P. Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains. *Trop Med Intern Health*, 2009, 14 : 1071-1085.

7.2. Chapitres de livres

Dedet J.P., Pratlong F. Leishmaniasis. In Manson's Tropical Diseases, 22nd edition, Cook G.C. & Zumla A.I. Eds., 2009, Saunders Elsevier : 1341-1365.

Dedet J.P. Trypanosomatidae : *Leishmania* species, *Trypanosoma cruzi* (Chagas Disease), and associated complications. In : Sequelae and long term consequences of infectious

diseases, Fratamico P.M., Smith J.L. & Brogden K.A. *ASM Press, Washington D.C. (USA)*, 2009 : 275-289.

7.3. Communications à congrès nationaux :

Mougin B., Avenel-Audran M., Abgueguen P., Cottin J., Hasseine L., Pomares C., Delaunay P., Marty P., **Ravel C.**, Chabasse D., Martin L. Ulcération cutanée liée à une co-infection *Mycobacterium ulcerans* – *Leishmania braziliensis* en Amérique du Sud. **Journées Dermatologiques de Paris, 2009.**

7.4. Communications à congrès internationaux :

1. Communications orales :

Dedet J.P., Pratlong F., Ravel C. The Montpellier (France) Collection and Identification Center of *Leishmania* (Protozoa, Trypanosomatidae): from early stages (1975) to an emerging Biological Resource Center. **4th World Congress on leishmaniasis, 3-7 Février 2009, Lucknow, India.**

Lachaud L., Bourgeois N., Plourde M., Leprophon P., **Bastien P.,** Ouellette M. Drug-susceptibility of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* isolates collected during first and recurrent visceral leishmaniasis episodes. **4th World Congress on leishmaniasis, 3-7 Février 2009, Lucknow, India.**

Mazeris A., Soteriadou K., **Dedet J.P.,** Haralambous C., Tsatsaris A., **Pratlong F.,** Moschandra J., Messaritakis I. The emerging and re-emerging of leishmaniasis in Cyprus. **4th World Congress on leishmaniasis, 3-7 Février 2009, Lucknow, India.**

Pratlong F., Dereure J., Marty P., Campino L., Gallego M., Chaker E., Faraut F., Harrat Z., Rioux J.A., **Dedet J.P.** Epidemiological features of *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* of Old World leishmaniasis foci, based on the isoenzymatic analysis of 2,296 strains. **4th World Congress on leishmaniasis, 3-7 Février 2009, Lucknow, India.**

Pratlong F., Dereure J., Ravel C., Lami P., Balard Y., Serres G., Rioux J.A., **Dedet J.P.** Epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzymatic analysis of 1,048 strains. **4th World Congress on leishmaniasis, 3-7 Février 2009, Lucknow, India.**

Soteriadou K., Haralambous C., Gouzelou E., Smirlis P., Zahangir M., Kuhls K., **Pratlong F.,** **Dedet J.P.,** Antoniou M. *Leishmania donovani* emergence in Europe : Cyprus evidence is an alarm call. **4th World Congress on leishmaniasis, 3-7 Février 2009, Lucknow, India.**

Casanova M., Blaineau C., Crobu L., Pagès M., **Bastien P.** Nuclear organization in Trypanosomatids. **3rd Kinetoplastid Molecular Cell Biology Meeting, 26-29 avr. 2009, Woods Hole, USA.**

2. Communications affichées

Dedet J.P., Pratlong F., Ravel C. The Montpellier (France) collection and identification Centre of *Leishmania* (Protozoa, Trypanosomatidae) : from early stages (1975) to an emerging Biological Resource Centre. **International Colloquium on leishmaniasis in Sri Lanka, 1st February 2009, Colombo, Sri Lanka**

Dedet J.P., Meunier A., **Dereure J.**, Cox J., Ready P.D., Davies C.R. Mapping the distribution of canine leishmaniasis in France using the retrospective database compiled for the EDEN Project. **4th World Congress on leishmaniasis, 3-7 Février 2009, Lucknow, India.**

Haouas N. Kaouther J. Gorcii M. **Ravel C.**, Babba H. First application of PCR sequencing method in the study of phlebotomine sandflies trophic preferences in Tunisian *Leishmania* foci: preliminary results. **4th World Congress on leishmaniasis, 3-7 Février 2009, Lucknow, India.**

Lachaud L., Sterkers Y., Pagès M., **Bastien P.** Chromosome copy number polymorphisms observed by FISH demonstrates constitutive aneuploidy and intra-strain heterogeneity in ploidy in *Leishmania*. **4th World Congress on leishmaniasis, 3-7 Février 2009, Lucknow, India.**

Dujardin JC., Schoenian G., Miles M., Volf P., Alvar J., **Dedet JP.**, Milon G., Campino L., Canavate C., Gamarro F., Gradoni L., Fasanella A., Soteriadou K., Dakkak M. Leish-Med : Monitoring risk factors for spreading of leishmaniasis around the Mediterranean Basin. **4th World Congress on leishmaniasis, 3-7 Février 2009, Lucknow, India.**

Sterkers Y., **Lachaud L.**, Pagès M., **Bastien P.** Asymmetric chromosomal distribution leads to constitutive mosaicism in *Leishmania* (Comm. orale). **Third Kinetoplastid Molecular Cell Biology Meeting, 26-29 avr. 2009, Woods Hole, USA.**

7.5. Conférences sur invitations dans congrés et réunions nationales

Dedet J.P. Les leishmanioses humaines autochtones et importées en France. **Commission Maladies infectieuses et parasitaires, Académie Nationale de Médecine, 19 mai 2009, Paris, France.**

Dedet J.P. Les leishmanioses en France, épidémiologie et surveillance. **5^{ème} Séminaire des Centres Nationaux de Référence, 28 mai 2009, Paris, France.**

Dedet J.P. Les leishmanioses en France : zoonose autochtone et cas importés. Epidémiologie et surveillance. **29^{ème} Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse (RICAI), Symposium « Nos amies les bêtes », 3-4 décembre 2009, Paris, France.**

7.6. Conférences sur invitations dans congrès et réunions internationales

Dedet J.P. Epidemiology and control of Old World leishmaniasis : enzymatic polymorphism of parasites and its implications. **International Colloquium on leishmaniasis in Sri Lanka, 1st February 2009, Colombo, Sri Lanka.**

Dedet J.P. Current situation of leishmaniasis in Europe. **Vith European Congress on Tropical Medicine and International Health, 6-10 September 2009, Verona, Italy.**

Dedet J.P., Pratlong F. Epidemiological features of Old World leishmaniasis, based on multilocus enzyme electrophoresis analysis of 3,324 *Leishmania* strains. **XXI Congresso Brasileiro de Parasitologie & II Encontros de Parasitologia do Mercosul, 26-30 octobre 2009, Foz do Iguaçu, Brésil.**

8. PROGRAMME D'ACTIVITE

Atteint par la limite d'âge, je quitterai mes fonctions hospitalières et universitaires au 31 août 2010. C'est pourquoi en décembre 2009 j'ai demandé à l'INVS, sous couvert du Directeur-Général du CHU, que la direction du CNRL soit dès janvier 2010 assurée par le Professeur Patrick Bastien, déjà Responsable-adjoint du CNRL, Chef de service du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU et responsable de l'Unité de recherche. Cette situation transitoire permettra au CNRL de poursuivre ses activités jusqu'en fin 2011. En ce qui me concerne, j'ai sollicité l'Eméritat auprès de l'Université Montpellier 1, ce qui me permettra de continuer à assurer une journée par semaine d'activité scientifique, que je partagerai entre le suivi de la démarche qualité au CNRL, en essayant d'atteindre la certification, le suivi d'étudiants en doctorat et la rédaction d'articles de recherche.

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

Le travail pour répondre à l'appel d'offre sur le renouvellement du CNRL est déjà entamé ; il a fait l'objet d'une réflexion en interne et avec plusieurs collègues d'autres structures hospitalo-universitaires.

8. 1. Expertise

L'identification des souches de *Leishmania* sera poursuivie en 2010-11, avec maintien de la tendance à la majoration du typage moléculaire, par rapport à l'identification isoenzymatique, qui restera réservée à l'espèce *L. infantum* du sud de la France et du Bassin méditerranéen, et aux expertises et cas particuliers où la précision de l'identification au niveau infra-spécifique est nécessaire, en particulier dans le domaine de la recherche.

La surveillance de la résistance médicamenteuse des souches de *Leishmania* circulantes vis-à-vis des trois principales molécules antileishmaniennes (antimoniés, amphotéricine B et miltéfosine) sera poursuivie et amplifiée.

8. 2. Surveillance des leishmanioses humaines

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

Nous proposerons à l'INV la création sur son site internet d'un « dossier thématique » sur les leishmanioses susceptible d'inciter les praticiens à déclarer au CNRL (action que nous avons programmée pour 2008, mais n'avons pas eu le temps de réaliser en 2009, année au cours de laquelle le déménagement a mobilisé beaucoup d'énergie).

8. 3. Conseil

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. Dans le domaine de la thérapeutique des leishmanioses, le référentiel pour le traitement de première intention des leishmanioses observées en France, généré par la réunion spéciale de la Société de Pathologie exotique consacrée à ce sujet de novembre 2008, va faire l'objet de deux publications, l'une en anglais l'autre en français. Ces publications sont actuellement rédigées et seront publiées en 2010.

8.4. Recherche

Les projets de recherche en cours seront développés particulièrement dans leur interface avec le CNRL.

Le projet EDEN sera clôturé en mai 2010.

Dans le domaine de l'épidémiologie génétique, l'étude sur la génétique des populations de *L. tropica* fera l'objet d'une publication.

En ce qui concerne les chimio-résistances de *Leishmania infantum*, le travail portant sur les modifications membranaires des souches sensibles et résistantes à l'AmB sera finalisé pour publication. Un travail similaire sera entrepris sur les résistances aux dérivés antimonisés, souvent encore proposés comme alternative à l'AmB pour des raisons économiques, mais pour lesquels des résistances ont largement été décrites au Brésil ou en Inde. Là encore, différents types de tests devront être comparés et optimisés.

Une collaboration avec les CHU de Nice (Pr. P. Marty) et Marseille (Pr. R. Piarroux) sera entreprise afin d'affiner l'épidémiologie moléculaire et la biologie des populations de *Leishmania* dans les foyers du Sud de la France.

Une collaboration avec l'AFSSA (Pr. Pascal Boireau) est en cours au sujet de l'épidémiologie de la leishmaniose canine en France, et particulièrement l'exploration de foyers français dits "ectopiques", c'est-à-dire situés en-dehors des zones classiques d'endémicité.

Des collaborations avec la Tunisie et l'Algérie sont également en cours de formalisation (projets DGRST), visant à étudier l'épidémiologie des leishmanioses viscérales et cutanées et la caractérisation biochimique et moléculaire des agents pathogènes.

Une collaboration est en train d'être mise en place avec l'UMR 5086 CNRS-Université Lyon 1 (Pr. S. Ricard-Blum) au sujet de la physiopathologie des leishmanioses, plus précisément des interactions entre le parasite et la matrice extra-cellulaire.

8. 5. Publications

Durant l'année à venir, nous prévoyons la réalisation de plusieurs articles générés par les programmes de recherche développés, mais aussi par notre expertise dans le domaine des leishmanioses et l'accumulation de très nombreuses données. En effet, trente années d'activité de la cryobanque, avec toute la richesse d'une collection d'environ 6000 souches conservées et identifiées, et toutes les données cliniques et épidémiologiques associées, nous donnent une vision globale des leishmanioses sur quatre continents, notamment dans le domaine épidémiologique.

L'article de synthèse déjà publié sur le polymorphisme enzymatique des espèces de *Leishmania* dermatropes de l'Ancien Monde, sera suivi d'un article sur le polymorphisme enzymatique des souches de leishmaniose viscérales *L. donovani* et *L. infantum*.

La cryobanque de *Leishmania* de Montpellier est une collection unique au service de la communauté scientifique internationale. Nous ressentons la nécessité de traduire dans un article scientifique à large diffusion l'état actuel de sa structure, de sa richesse et de présenter les services qu'elle peut rendre.

Durant l'année 2010, nous essaierons de rééquilibrer notre production scientifique qui a été presque exclusivement en langue anglaise en 2009, avec la publication de deux articles en langue française dans des revues nationales.

A Montpellier, le 31 mars 2010

Jean-Pierre Dedet

Remerciements

Je souhaite remercier l'ensemble des personnels du CNRL pour le travail fourni en 2009, les laboratoires collaborateurs et leurs responsables (Pr Bernard Carne, CHG de Cayenne, Pr Gilles Bourdoiseau, à l'ENV de Lyon et Dr Pierre Buffet, à l'Hôpital Pitié-Salpêtrière, à Paris, ainsi que le Dr Gloria Morizot à l'Institut Pasteur).

Je remercie également l'Institut de Veille sanitaire pour son appui efficace aux actions du CNRL, et tout particulièrement les correspondants du CNRL, Mr Arnaud Tarentola, et Mme Christine Saura au Secrétariat des CNR. Je remercie également le Département d'Epidémiologie et Santé publique de l'Institut de Médecine Tropicale du Pharo, à Marseille, pour les déclarations de cas de leishmanioses chez les militaires de Guyane.

Je remercie enfin tous les praticiens qui ont effectué des déclarations de cas, et/ou qui nous ont adressé prélèvements ou souches.

Annexes

1. Plan du nouveau Laboratoire avec identification des pièces impliquées dans les activités du CNRL

2. Résumés des communications à Congrès