



## **RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2008**

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

**Responsable :  
Professeur Jean-Pierre DEDET**

# **1. INTRODUCTION**

## **1. 1. Rappel des missions et objectifs :**

Le Centre National de Référence des *Leishmania* (CNRL) a été créé en mars 1998 (arrêté du 17 mars 1998). Il a été renouvelé le 26 avril 2002, puis le 6 janvier 2006, pour la période 2006-2009. Cette dernière période a été prolongée jusqu'en 2010.

Depuis sa création, il 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 :**

Durant l'année 2008, les principales missions du CNRL ont été remplies, et les recommandations du Comité scientifique des CNR ont été prises en compte.

Sur 158 souches de *Leishmania* reçues au CNRL, 99 ont été identifiées par électrophorèse des isoenzymes. Par ailleurs, 126 identifications moléculaires ont également été réalisées au CNRL et 76 au laboratoire collaborateur du CHG de Cayenne (Pr B. Carmes).

Le nombre de souches de *Leishmania* entrées dans la collection a été de 158, en retrait par rapport aux années précédentes, de même que le nombre de souches distribuées (n = 86). Ces variations sont analysées plus bas (paragraphe « évolution des tendances »).

La surveillance des leishmanioses humaines a été poursuivie tant en France métropolitaine qu'en Guyane (236 fiches de déclaration de cas reçues, soit 20 de plus qu'en 2007). En France métropolitaine, ont été déclarés en 2008 :

- 17 cas de leishmaniose viscérale (LV) et 4 cas de leishmaniose cutanée (LC) autochtones,
- 4 cas de LV et 56 cas de LC importés.

Un total de 169 cas de LC ont été contractés en Guyane, chiffre en légère progression 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.

Deux cas de leishmaniose ont été déclarés en Guadeloupe en 2008, dont l'un de LV apparemment autochtone et l'autre de LC. Dans les deux cas une enquête est en cours pour préciser le lieu de contamination.

Au terme de 10 années de surveillance des leishmanioses en France métropolitaine par le CNRL, nous avons réalisé une étude rétrospective des cas de leishmaniose tégumentaire (cutanées et muqueuses) autochtones déclarés entre 1998 et 2007.

En 2008, le CNRL a poursuivi sa participation au Réseau international de surveillance de la co-infection *Leishmania*/VIH coordonné par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

La surveillance de la leishmaniose canine menée en collaboration avec le Laboratoire de Parasitologie et maladies parasitaires de l'École Nationale vétérinaire (ENV) de Lyon (Pr G. Bourdoiseau) a été limitée en 2008 à la conclusion de l'enquête par questionnaire auprès des vétérinaires praticiens entamée en 2007, dont les données font l'objet d'un article en préparation.

Au plan de l'information, nous avons réalisé en mai 2008 une rétro-information sur les chiffres de déclaration de cas de leishmaniose humaine auprès des personnes ayant déclaré des cas. La partie CNRL du site Internet du laboratoire a fait l'objet d'une mise à jour. Cinq stagiaires ont été reçus en 2008.

Le conseil thérapeutique téléphonique créé en 2006 a poursuivi son activité (25 appels en 2008).

Les projets de recherche en lien avec l'activité du CNRL ont favorisé une forte activité de publications (9 publications dans des revues internationales avec comité de lecture réalisées en 2008 et 2 publications dans des revues nationales). L'activité du CNRL a généré 8 communications orales dans des congrès nationaux et internationaux, dont 3 sur invitation. Enfin en novembre 2008 à l'Institut Pasteur, j'ai organisé une séance spéciale de la Société de Pathologie Exotique sur le thème de la « thérapeutique des leishmanioses », au cours de laquelle une table-ronde regroupant 7 experts français a permis de générer le premier référentiel pour le traitement de première intention des 6 principales formes cliniques de leishmaniose observées en France.

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 2008.

### **1. 3. Equipe :**

#### **a. Personnel :**

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 2008, se sont ajoutés aux personnels antérieurement listés les docteurs Laurence Lachaud, au retour de son séjour post-doctoral au Canada et Nathalie Bourgeois, AHU.

**Personnel médical :** L'ensemble des personnels médicaux impliqués correspond à 1,8 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 conférence des Universités-Praticien hospitalier (UM1/CHU) : 0,5 ETP. F. Pratlong est la Curatrice de la collection de *Leishmania*.
- **DEREURE Jacques**, Maître de conférence des Universités, Médecin attaché consultant (UM1/CHU) : 0,1 ETP
- **BASSET Didier**, Praticien hospitalier (CHU) : 0,1 ETP
- **RAVEL Christophe**, Maître de conférence des Universités- Praticien hospitalier (UM1/CHU) : 0,5 ETP
- **LACHAUD Laurence**, Maître de conférence des Universités-Praticien hospitalier (UM1) : 0,2 ETP
- **BOURGEOIS Nathalie**, Assistant hospitalo-universitaire (UM1) : 0,1 ETP

**Personnel technique** : L'ensemble des personnels techniques impliqués correspond à 3,2 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**, adjoint technique (Université Montpellier 1) : 1 ETP
- **LEFEBVRE Michèle**, technicienne (Université Montpellier 1) : 0,5 ETP
- **SERRES Ghislaine**, technicienne (CHU de Montpellier) : 0,8 ETP
- **TALIGLIANI Loïc**, adjoint technique, Université Montpellier 1) : 0,5 ETP

**Secrétariat** :

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

## **b. Démarche Qualité**

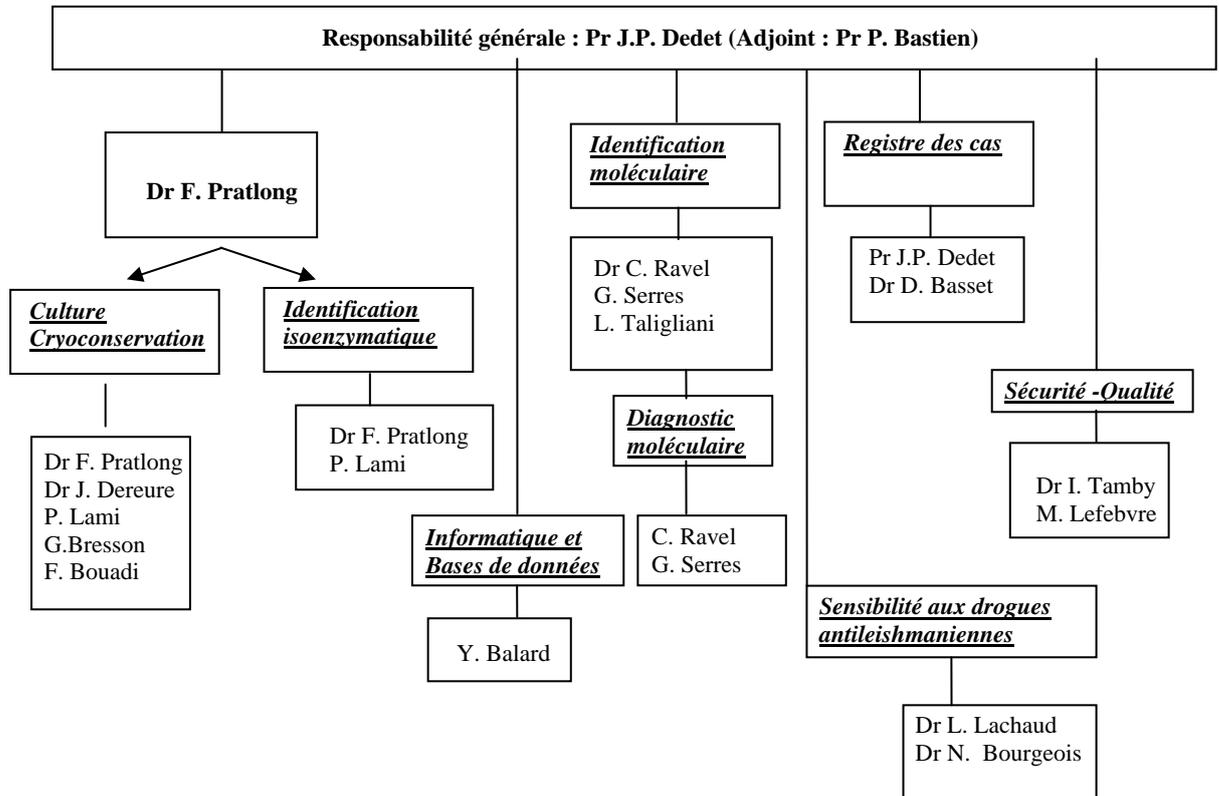
Depuis 2006, une démarche Qualité a été entreprise en vue d'une certification pour la collection de *Leishmania* du CNRL.

L'identification des activités du CNRL et un organigramme-Qualité ont été réalisés (annexe 1). La gestion documentaire a été mise en place.

L'ensemble des opérations est tracé informatiquement sur le programme Modul Bio : de la réception des souches ou leur isolement jusqu'à leur stockage, et leur cession éventuelle. La réglementation en vigueur sur les transports des matières infectieuses est appliquée tant pour les souches envoyées au CNRL que pour celles expédiées par le CNRL. L'envoi des souches au CNRL a été codifié en 2006, un transporteur agréé sélectionné par le CNRL qui prend en charge les frais de transport.

En 2008, l'effort de la démarche Qualité a porté sur le processus du typage moléculaire pour lequel une certification selon la norme AFNOR S96-900 est visée. La traçabilité de manipulation a été améliorée, la qualification des équipements et des personnels est en cours de réalisation. Un audit a été effectuée en septembre 2008 (Bryan Roberts, Walter Reed Army Research Institute, Washington, USA) pour aider à la démarche et l'inclure dans le contexte d'une participation à un essai thérapeutique collaboratif international entre le WRAIR (USA), l'Institut Pasteur de Tunis, l'Institut Pasteur (Paris) et le CNRL.

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



#### 1. 4. Locaux et équipements :

Le CNRL est localisé au sein du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier, installé sur 1500 m<sup>2</sup>. Il comporte les équipements courants d'un laboratoire hospitalo-universitaire de diagnostic et de recherche, et en particulier un plateau technique performant, en adéquation avec les missions de CNR :

- une unité de culture, avec une enceinte confinée de niveau P3, équipée de 4 enceintes de sécurité, une chambre chaude pour la croissance des cultures de *Leishmania* (24-26° C). En effet, parmi les espèces de *Leishmania*, celles responsables de LV et de leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM) (*L. donovani*, *L. infantum* et *L. braziliensis*) ont été classées en L3. Toutes les autres espèces sont classées en L2.
- une unité de cryoconservation avec un local spécifique aux normes de sécurité pour la manipulation de l'azote liquide et contenant 25 containers de 40 litres (GT 40), 5 containers de 140 litres (Arpège 140) et un container de répartition (TP100). Un contrat de livraison hebdomadaire d'azote liquide existe avec Air Liquide Santé (livraison hebdomadaire de 350 litres). La mise à niveau des containers est assurée chaque semaine par un technicien (P. Lami).

- des équipements courants généraux : un autoclave, diverses étuves, centrifugeuses, balances, pH-mètres, microscopes, appareils à électrophorèse en champ pulsé, appareils d'amplification génique (PCR), sécheurs de gels, bain sec, équipement polaroid, plaque UV, cuves à électrophorèse et électrofocalisation, générateurs divers, systèmes de refroidissement des cuves, congélateurs divers (- 20° et - 80° C).

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

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

### **2.1 Capacités techniques**

L'identification des *Leishmania* est réalisée dans notre laboratoire depuis 1979 selon la technique de référence d'identification biochimique par électrophorèse des isoenzymes. A cette technique s'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 déshydrogénase, MDH, EC 1.1.1.37 ; enzyme malique, ME, EC 1.1.1.40 ; isocitrate déshydrogénase, ICD, EC 1.1.1.42 ; 6-phosphogluconate déshydrogénase, PGD, EC 1.1.1.44 ; glucose-6-phosphate déshydrogénase, G6PD, EC 1.1.1.49 ; glutamate déshydrogénase, GLUD, EC 1.4.1.3 ; NADH diaphorase, DIA, EC 1.6.2.2 ; purine nucléoside phosphorylase, NP 1, EC 2.4.2.1 ; purine nucléoside phosphorylase, NP 2, EC 2.4.2.\* ; glutamate-oxaloacétate transaminase, GOT 1, EC 2.6.1.1 ; glutamate-oxaloacétate transaminase, GOT 2, EC 2.6.1.1 ; phosphoglucomutase, PGM, EC 5.4.2.2 ; fumarate hydratase, FH, EC 4.2.1.2 ; mannose phosphate isomérase, MPI, EC 5.3.1.8 ; glucose phosphate isomérase, GPI, EC 5.3.1.9.

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

#### **b. 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.

### **c. Identification moléculaire au laboratoire collaborateur de Cayenne (Pr B. Carme)**

Le souci d'améliorer les possibilités de surveillance de base des LC, mais aussi le diagnostic à titre individuel et le suivi des patients, ont incité à réaliser la détermination des espèces en quasi routine. Dans ce contexte, les techniques de PCR – RLFP ont été choisies, car plus aisées à réaliser et s'appliquant bien aux possibilités du laboratoire de Cayenne. La première technique utilisée initialement bien qu'adaptée aux souches sud-américaines posait des problèmes de différenciation entre *L.(V.) guyanensis* et *L.(V.) braziliensis*. Pour parer à cette difficulté une nouvelle cible et deux enzymes différents ont été choisis avec des résultats satisfaisants (SIMON S, CARME B. Diagnostic et surveillance des espèces de leishmanies en Guyane par une technique de PCR-RFLP. Congrès de la Société Française de Parasitologie décembre 2007, Nice ; publication soumise).

Depuis début 2008 la recherche de leishmanies par PCR en temps réel est devenue systématique au Centre Hospitalier de Cayenne pour tous les patients VIH+ présentant un tableau infectieux avec localisation viscérale. De plus, est effectuée à titre d'expertise une recherche par PCR chez les chiens suspectés d'être atteints de leishmaniose par les correspondants vétérinaires.

### **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 l'amphotéricine B et les dérivés antimoniés est étudiée. Depuis fin 2007, a été développé un système in vitro qui permet de tester la sensibilité des souches de *Leishmania* à l'amphotéricine B (AmB) en routine. Sa description a été faite dans le rapport 2007 du CNRL.

En 2008, a été entreprise l'étude in vitro de la sensibilité des souches de *Leishmania* aux dérivés antimoniés SbIII et SbV, avec un système promastigote/milieu axénique et un système amastigotes/macrophages de souris en collaboration avec l'équipe du Prof. Louis Maes (University of Antwerp, Laboratory of Microbiology, Parasitology and Hygiene (LMPH), Faculty of Pharmaceutical, Biomedical and Veterinary Sciences, Antwerp, Wilrijk, Belgium).

#### **- Approche MLST**

Le développement d'une approche d'identification et de typage par MLST s'est poursuivi au cours de l'année 2008. La très forte divergence génétique au sein du genre *Leishmania* a nécessité de très nombreuses mises au point et tests de différentes amorces pour analyser les génotypes des souches du Nouveau Monde. Ce travail se poursuit en

collaboration avec le « plateau technique séquençage » des CNR de l'Institut Pasteur (Responsable S. Brisse).

### **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 2008, le nombre de souches entrées dans la collection a été de 158, légèrement inférieur à la moyenne des années précédentes (figure 2).

La collection comporte actuellement 5.750 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 référencée sur le World Data Centre for Microorganisms de la World Federation for Culture Collections (depuis le 08/04/2005, n° 879) et sur le site internet des Centres de Ressources Biologiques-France : [www.crb-france.org](http://www.crb-france.org) (depuis le 27/07/2005).

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](http://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 1700) ou à partir de souches de culture (environ 600). 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.

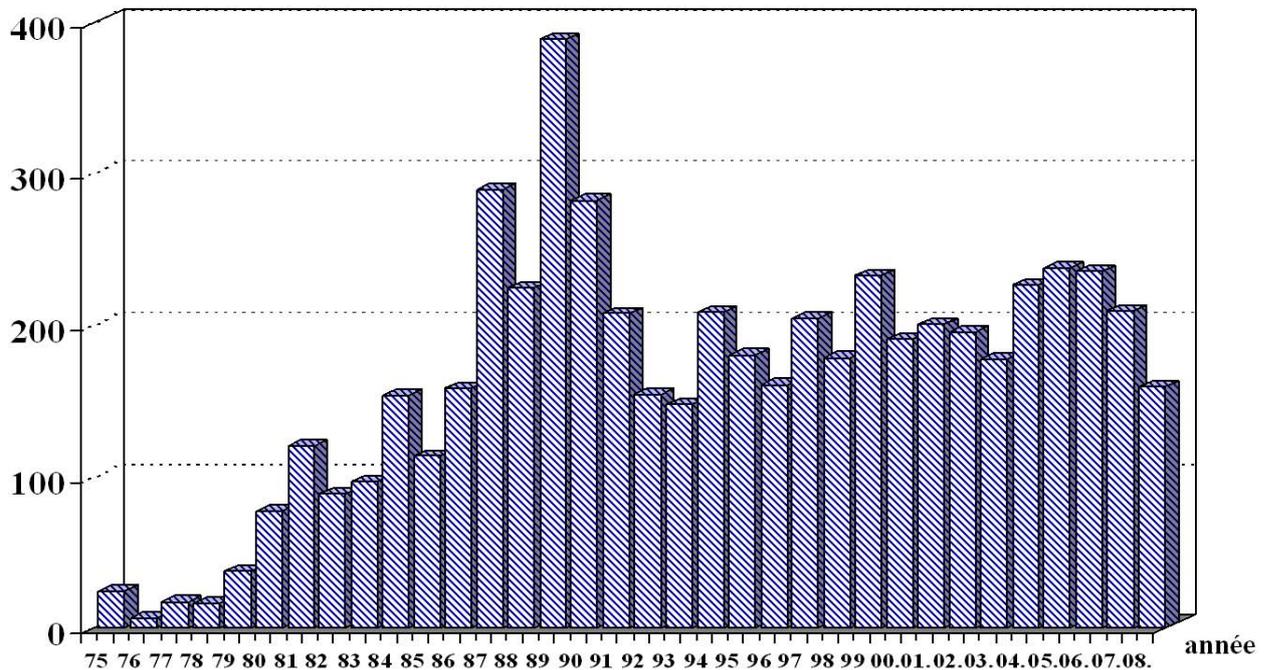
### **f. Techniques de diagnostic utilisées**

**- Le diagnostic moléculaire par PCR** est basé sur l'amplification du locus de l'ARN ribosomal.

**- 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 tégmentaires.

Figure 2.

Centre National de référence des *Leishmania*.  
Nombre de souches stockées annuellement de 1975 à 2008



## **2.2. Activités d'expertises en 2008**

### **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 2008, 259 échantillons pour diagnostic moléculaire de leishmanioses ont été analysés, dont 51 étaient positifs.

#### **- Diagnostic immunologique**

En 2008, 172 sérologies leishmaniennes ont été réalisées, parmi lesquelles ont été positives 32 immunofluorescences, 22 ELISA et 1 immuno-empreinte.

### **b. Souches recues**

En 2008, 158 souches de *Leishmania* ont été isolées ou reçues, dont 65 d'hôpitaux, centres de soins ou instituts de recherche français, et 93 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*.

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 est pour la première fois nettement inférieur (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 :

- l'isolement d'une première souche de leishmaniose cutanée en République Centrafricaine,
- l'isolement de 2 souches dans le département d'outre-mer de la Guadeloupe ; les aspects épidémiologiques correspondants seront discutés dans le chapitre sur la surveillance ;
- l'isolement de *L. donovani* MON-37 dans l'île de Chypre ; c'est le premier cas de pénétration de ce parasite d'origine asiatique en Europe. Cette observation a fait l'objet d'un signalement local aux autorités sanitaires et d'une publication internationale (Antonioni et coll., *Lancet Infect. Dis.*, 2008, *cf infra*).

**Tableau I.- Origine, selon le centre soin, des 158 souches de *Leishmania* traitées par le CNRL en 2008.**

France (65 souches)				Etranger (93 souches)		
Etablissements	Nb	Etablissements	Nb	Pays	Etablissements	Nb
CHU Besançon	1	AP-HP Pitié-Salpêtrière	4	Algérie	Ecole Vétérinaire d'Alger	20
CHU Grenoble	1	AP-HP St Antoine	1		Faculté Médecine d'Annaba	6
CHU Marseille	2	CHU Fort-de-France	1	Bangui	Institut Pasteur	1
CHU Montpellier	9	CHU Pointe-à-Pitre	1		Institut Pasteur Hellénique	1
CHU Nantes	1	HIA Bégin	1		Faculté de Médecine d'Hiraklion (Crète)	36
CHU Nice	6	HIA Laveran	2	Israël	Hadassah Medical School, Jérusalem	15
CHU Nîmes	3	HIA Legouest	1	Italie	Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Palerme, Sicile	4
CHU Tours	1	HIA Robert Picqué	2	Maroc	Institut National d'Hygiène, Rabat	6
CHU Strasbourg	1	CH Colombes	1	Portugal	Instituto Hygiene e Medicina tropical, Lisbonne	4
AP-HP Bichat	1	CH Thionville	1			
AP-HP Bobigny	1	Institut Pasteur (Paris)	6			
AP-HP Cochin	4	Institut Pasteur (Cayenne)	7			
AP-HP Henri Mondor	1	Ecole vétérinaire Lyon	5			

### **c. Identification moléculaire**

En 2008, 126 identifications ont été réalisées selon cette méthode (en progression par rapport à 2006), 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 8 espèces de *Leishmania* ont été identifiées. Parmi les souches de l'Ancien Monde prédominantes dans notre échantillon (75,4 %), c'est essentiellement *L. major* (67 souches) 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

en 2008 (*cf. infra*). *L. infantum*, espèce du sud de la France et du bassin méditerranéen, est également bien représentée (23 souches).

Trente et une souches du Nouveau Monde ont été également identifiées, dont une prédominance de *L. guyanensis* (23 souches).

**Tableau II.- Origine géographique, par pays d'isolement, des 158 souches traitées par le CNRL en 2008.**

Continents	Pays	Nb	Continents	Pays	Nb
<b>Afrique (n = 46)</b>	Algérie	29	<b>Asie (n = 19)</b>	Israël	2
	Burkina Faso	3		Ouzbekistan	6
	Rép. Centrafricaine	1		Palestine	9
	Maroc	7		Syrie	1
	Tunisie	4		Turquie	1
	Pays indéterminé	2			
<b>Amérique (n = 17)</b>	Guadeloupe	2	<b>Europe (n = 72)</b>	Chypre	2
	Guyane	12		Espagne	2
	Martinique	1		France	18
	Pays indéterminé	2		Grèce	35
				Italie	4
		Portugal		9	
<b>Origine géographique inconnue</b>		4		Pays indéterminé	2

#### **d. Identification isoenzymatique**

Sur les 158 souches isolées ou reçues en 2008, 99 ont été identifiées par électrophorèse des isoenzymes, ou sont en cours d'identification (incluant des zymodèmes nouveaux en cours d'expertise), et 59 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 diagnostic, 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 (par exemple celle de la République Centrafricaine).

**Tableau III.- Détails des identifications enzymatiques de 99 souches réalisées en 2008.**

Espèces	Zymodèmes	Nombres
<i>L. infantum</i>	MON-1	60
	MON-24	2
	MON-29	2
	MON-98	9
<i>L. major</i>	MON-25	5
	MON-74	1
<i>L. braziliensis</i>	MON-43	1
Typage en cours		19

Le typage s'est concentré sur l'espèce *L. infantum* présente dans le sud de la France et dans le Bassin méditerranéen. Le détail des identifications précises de ces souches figure sur le tableau III.

#### **e. Identifications moléculaires effectuées à Cayenne sur les souches locales**

Le laboratoire collaborateur du CNRL à Cayenne (Laboratoire hospitalo-universitaire de Parasitologie-Mycologie et EA 3593) dirigé par le Pr B. Carne a identifié durant l'année sous revue 76 souches, dont 61 appartenaient à l'espèce *L. guyanensis*, 8 à l'espèce *L. braziliensis*, 5 à *L. amazonensis* et 2 à l'espèce *L. lainsoni*. La fréquence de l'espèce *L. braziliensis* par rapport aux autres espèces s'accroît encore (10,5 contre 7,7 % en 2007). Un article sur ce problème a été soumis pour publication : Carne B., Simon S., Esterre P., Couppié P. Emerging *braziliensis* leishmaniasis in French Guiana. (soumis à *Emerging infectious diseases*).

Une vigilance particulière dans l'identification des souches est accordée à l'espèce *L. infantum*, à la suite du diagnostic de deux cas de leishmaniose canine à Cayenne, survenus en 2006 sur un chien importé et un chien vivant avec le cas importé (Rotureau et coll., *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44 : 1120-1122). Ainsi en 2008, 8 prélèvements ont été analysés.

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

Durant l'année sous revue, l'identification des différents stérols sur la membrane de *L. infantum* wild type et mutant est en cours. L'étude de souches de patients est programmée. Par ailleurs, les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol ont été identifiées, et une quantification par real-time PCR, chez la souche "wild type" et "mutant", des ARNm transcrits à chaque étape de voie de biosynthèse de l'ergostérol a été réalisée.

D'autre part, 25 souches de *L. infantum* issues de patients atteints de co-infection avec le VIH ont été testées vis à vis du SbIII

#### **g. Souches de *Leishmania* issues de la collection du CNRL distribuées en 2008**

En 2008, 86 souches de *Leishmania* ont été expédiées à la demande de divers laboratoires et institutions en France et à l'étranger, dont la liste figure ci-dessous :

➤ **En France, 85 souches ont été fournies :**

- 28 souches à l' UMR 2724 CNRS-IRD-UM1, **Centre IRD de Montpellier**
- 1 souche au Laboratoire de Parasitologie, **Hôpital Henri Mondor, CHU de Créteil**
- 2 souches au Laboratoire de Parasitologie, **Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, AP-HP Paris**
- 4 souches à l'Unité d'Immunophysiologie et Parasitisme intra-cellulaire, **Institut Pasteur, Paris**
- 50 souches à l'INSERM U399, **Faculté de médecine Marseille**

➤ **A l'étranger, 1 souche a été fournie :**

- 1 souche à Hadassah Medical School, **Hebrew University, Jerusalem, Israël.**

Par ailleurs, un projet de recherche développé au sein du laboratoire (*cf. infra*) a nécessité la décongélation et l'utilisation de 435 souches (projet structuration génétique des populations de *L. tropica*).

### **h. Evolution des tendances**

Durant l'année 2008, nous avons privilégié en routine le typage moléculaire (passé de 97 en 2007 à 126 en 2008), 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 (76 typages).

La collection de souches s'est enrichie de 158 exemplaires en 2008, un nombre d'entrées en recul par rapport à l'année précédente. Cette diminution s'explique par le fait que les souches isolées en Guyane ont été incluse dans le projet de recherche « Impact de l'anthropisation et de l'environnement sur le fonctionnement des foyers de leishmanioses » financé par l'ANR (*cf infra*), et pas encore intégrées à la collection.

Un logiciel de gestion de la collection d'ADN a été développé au sein du laboratoire durant l'année sous revue.

## **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.

La surveillance de la **leishmaniose canine** a été entreprise en 2006, en collaboration avec le Laboratoire de Parasitologie et maladies parasitaires de l'Ecole Nationale vétérinaire (ENV) de Lyon (Pr G. Bourdoiseau). Le chien étant le réservoir de *Leishmania infantum*, espèce présente dans le sud de la France et responsable de toutes les formes cliniques autochtones, la surveillance de la leishmaniose canine a un intérêt certain par son implication dans la santé humaine. Cette surveillance permet une collaboration étroite avec les vétérinaires.

### **3.1. Surveillance des leishmanioses humaines**

Durant l'année 2008, 236 déclarations de cas sont parvenues au CNRL, dont 79 de structures de santé de France métropolitaine, 8 de structures de santé de départements d'outre-mer, 113 ont été fournies par le laboratoire collaborateur du CNRL à Cayenne et 43 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 2008 sont détaillés ci-dessous. Ils sont susceptibles d'être légèrement augmentés ou modifiés, certaines déclarations étant encore en suspens.

Durant l'année sous revue, nous avons également réalisé une étude de synthèse sur les cas autochtones de leishmaniose tégumentaire déclarés entre 1998 et 2007 (*cf. infra*).

### **a. Réseau de partenaires**

La liste des services ayant déclaré au CNRL des cas de leishmanioses en 2008 figure ci-dessous.

**Pour les CHU :** les Laboratoires de Parasitologie-Mycologie des 20 CHU suivants : Besançon (25), Bobigny (93), Bordeaux (33), Brest (29), Créteil (94), Grenoble (38), Lyon (69), Marseille (13), Montpellier (34), Nice (06), Nancy (54), Nantes (44), Nîmes (30), Pointe-à-Pitre (97.1), Rennes (35), Tours (37), divers établissements de l'AP-HP à Paris (75) (Cochin-St Vincent de Paul, Claude Bernard, St Antoine, Pitié-Salpêtrière).

**Pour les CH et CHG :** CH Basse-Terre (97.1), CH Cannes (06), CH Chambéry (73), CH Gonesse (95), CH Le Mans (72), CHR Metz-Thionville (57), CHG de Perpignan (66), CH Pontarlier (25), CHG de Cayenne (97.3)

**Pour les Hôpitaux d'Instruction des Armées :** HIA Laveran à Marseille (13), HIA Clermont Tonnerre à Brest (29), HIA Robert Piquet à Bordeaux (33), HIA Legouest à Metz (57), HIA Bégin à Saint Mandé (94) et HIA Desgenettes à Lyon (69).

**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 :** Clinique du Cotentin, Equeurdreville-Hainneville (50), Institut Pasteur de Paris (75), Centre de soins de Kourou (97.4).

## **b. Cas humains déclarés en 2008**

### **- France métropolitaine**

En 2008, 87 fiches de déclaration de cas ont été reçues directement au CNRL, en majorité provenant de France métropolitaine (79 déclarations). Parmi ces fiches de déclaration, 22 cas concernaient une leishmaniose viscérale et 65 une leishmaniose cutanée.

En France continentale, ont été déclaré en 2008 :

- 21 cas autochtones de leishmanioses, dont 17 cas de LV et 4 de LC,
- 60 cas importés de leishmanioses, dont 4 cas de LV et 56 cas de LC (dont 17 de Guyane française),
- dans 6 cas il n'a pas été possible de trancher sur l'origine, importée ou autochtone de la contamination.

L'ensemble de ces données, comparées aux années précédentes, figurent sur le Tableau IV.

Le nombre de cas de leishmanioses déclarés au CNRL par des structures de santé en France continentale est légèrement supérieur à la moyenne annuelle, et sensiblement supérieur à ceux des deux années précédentes (Tableau IV). Ceci provient d'une augmentation des cas importés par rapport à la moyenne annuelle.

Le nombre de cas autochtones de LV est nettement inférieur à celui de 2007, et retombe aux niveaux des années 2004-2006. En revanche, les cas autochtones de LC sont les plus élevés depuis plusieurs années. Il n'a pas été rapporté de cas de leishmanioses muqueuses autochtones ou importés. Tous les cas autochtones proviennent de six départements du sud de la France, situés dans la zone d'endémie leishmanienne connue (Tableau V).

Sur les 17 cas autochtones de LV, 5 cas provenaient de patients infectés par le VIH et 2 de patients sous traitement immunosuppresseur.

**Tableau IV.- Comparaisons des nombres de déclarations annuelles des cas faites au CNRL entre 1999 et 2008.**

Années		1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Moyennes
<b>Cas autochtones</b> (France métropolitaine)	LV	22	30	31	18	20	18	19	16	22	17	
	LC	1	0	4	4	2	0	0	3	1	4	
	LM	1	0	0	1	1	0	0	0	2	0	
	<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>23</b>	<b>23</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>19</b>	<b>25</b>	<b>21</b>
<b>Cas importés</b> (en France métropolitaine)	LV	3	6	3	5	5	8	6	7	7	4	
	LC	17	22	33	34	50	60	60	43	34	56	
	LC Guyane	62	9	3	9	21	32	17	8	21	17	
	LM	2	0	0	0	0	1	2	0	0	0	
	<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>37</b>	<b>39</b>	<b>48</b>	<b>76</b>	<b>101</b>	<b>85</b>	<b>58</b>	<b>62</b>	<b>62</b>	<b>77</b>
Origine non précisée										1	6	
<b>Totaux</b>		<b>108</b>	<b>67</b>	<b>74</b>	<b>71</b>	<b>99</b>	<b>119</b>	<b>104</b>	<b>77</b>	<b>87</b>	<b>98</b>	<b>90,4</b>

**Tableau V.- Départements d'origine des cas autochtones de leishmanioses déclarés en 2008.**

Départements	LV	LC
Alpes-Maritimes	5	3
Bouches-du-Rhône	2	0
Gard	3	0
Hérault	1	0
Pyrénées-Orientales	3	1
Vaucluse	1	0
Département non précisé	2	0
<b>Totaux</b>	<b>17</b>	<b>4</b>

Parmi les cas importés, ce sont les cas de LC qui sont élevés : 56, dont 24 cas de contamination en Afrique du Nord et 17 en Guyane.

**- Guadeloupe :**

Deux cas de leishmaniose ont été déclarés en Guadeloupe en 2008, dont l'un de leishmaniose viscérale apparemment autochtone et l'un de leishmaniose cutanée. Dans les deux cas une enquête est en cours pour préciser le lieu de contamination.

**- Guyane française :**

Durant l'année 2008, le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (Professeur Bernard Carmes) du Centre Hospitalier de Cayenne nous a adressé 113 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) 43 cas, et diverses structures sanitaires métropolitaines 17 cas.

Une fois éliminés les doublons, en particulier entre les déclarations des Hopitaux d'Instruction des Armées et celles de l'Institut de Médecine tropicale du Pharo), nous avons un total de 169 cas de LC contractés en Guyane en 2008. Parmi ceux-ci, aucun cas d'atteinte muqueuse. Le détail figure sur le tableau VI.

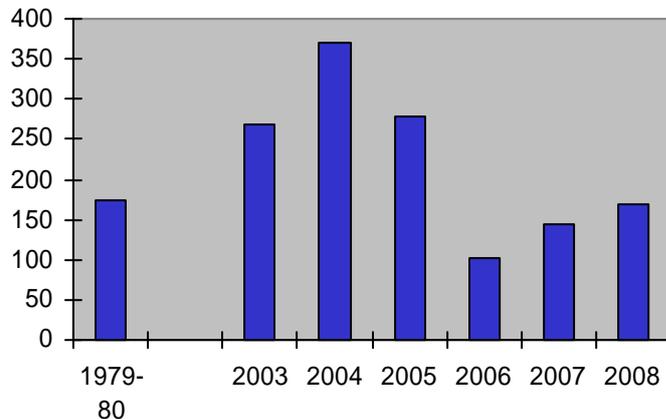
**Tableau VI.- Cas de leishmaniose cutanée contractés en Guyane en 2008, en fonction de la source de déclaration.**

Déclarations	Nb total	Sexe			Forme clinique		statut	
		H	F	Non précisé	LC	LM	militaire	civil
En France*	17	16	1	0	17	0	13	4
CH Cayenne	112	79	28	5	112	0	5	107
SS Armées	40	39	1	0	40	0	40	0
Total	169	134	30	5	169	0	58	111

\* 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 Carmes, 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 se confirme en 2008.



**Figure 3.- Histogramme des nombres de cas de leishmaniose cutanée en Guyane française de 2003 à 2008.** (L'incidence de l'année 1979-80 est notée pour mémoire ; in Dedet et coll., *Rev. Epidémiol. Santé Publique*, 1991, 39 : 129-133).

Une base de données Epidata, destinée à faciliter l'analyse des données de déclaration de Guyane française est en développement au Département international et tropical de l'INVS (M Arnaud Tarentola). La demande d'autorisation à la CNIL est en cours.

#### Surveillance

Depuis début 2008 la recherche de Leishmanies par PCR en temps réel est devenue systématique au Centre Hospitalier de Cayenne pour tous les patients VIH+ présentant un tableau infectieux avec localisation viscérale. Dans ce contexte, 8 analyses ont été pratiquées durant cette première année.

#### **c. Etude synthétique sur les leishmanioses tégumentaires autochtones**

Durant l'année 2008, une étude rétrospective des cas autochtones de leishmaniose tégumentaire à *L. infantum* observés dans le sud de la France durant le décennie 1998-2007 a fait l'objet d'une 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.

Cette étude a montré que 28 cas de leishmanioses tégumentaires avaient été déclarés au CNRL durant la période indiquée, représentant 13 % de l'ensemble des leishmanioses autochtones déclarées en France métropolitaine durant la période.

Parmi ces 28 cas, 22 correspondaient à des cas cutanés et 6 à des cas muqueux. La répartition des cas en fonction des foyers de leishmanioses du sud de la France figure sur le tableau VII. Les variations inter-annuelles des cas étaient importantes, la majorité des cas de LC a été observée entre 2001 et 2003.

**Tableau VII.- Répartition par foyer des cas de leishmanioses tégumentaires déclarés au CNRL entre 1998 et 2007.**

Foyers	LC	LM	Total
Pyrénées-Orientales	5	2	7
Cévennes	9	1	10
Provence	3	2	5
Côte d'Azur	5	1	6
Total	22	6	28

Les cas de leishmaniose cutanée ont été rencontrés principalement chez des enfants (55 %), en particulier âgés de 7 mois à 4 ans, et chez des adultes (45 %) en particulier âgés de 52 à 68 ans. Le sexe masculin était plus atteint (59 % des cas).

Les cas de leishmaniose muqueuse ont tous été observés chez des adultes, avec une prédominance de sexe masculin (83 %).

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

Il n'a pas été observé de cas groupés ou de phénomènes anormaux en 2008.

### **3. 2. Surveillance de la leishmaniose canine**

Depuis 2006, nous poursuivons la surveillance de la leishmaniose canine, en collaboration avec le Laboratoire de Parasitologie et Maladies parasitaires de l'Ecole Nationale vétérinaire (ENV) de Lyon (Pr G. Bourdoiseau).

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 actuellement réalisée. C'est pourquoi, afin de tenter de mieux cerner le niveau de l'enzootie canine en France, nous avons poursuivi en 2008 les deux actions engagées en 2006 : i. enrichissement de la base de données rétrospective, ii. enquête par questionnaire auprès des vétérinaires praticiens.

#### **a. Base de données rétrospective sur la leishmaniose canine**

La base de données rétrospective prenant en compte les données disponibles sur la leishmaniose canine en France, entreprise dans le cadre du projet de recherche européen EDEN (*cf. infra*) a été complétée et actualisée durant l'année sous revue. Elle contient à présent 718 entrées correspondant à 45 articles ou rapports et à 450 localités avec cas de leishmaniose canine et qui sont toutes géoréférencées.

L'exploitation géographique de cette base de données n'a pas pu avoir lieu en 2008, suite au décès d'un des partenaires britanniques en charge de la partie « système d'information géographique » du projet EDEN. Elle va être réalisée en 2009 par une étudiante post-doctorale contractée dans le cadre du projet EDEN, qui travaillera sous le contrôle de la Maison de la Télé-détection à Montpellier. Cette étudiante réalisera une cartographie de présence, avec cartographie multifactorielle permettant la recherche des limites de la leishmaniose canine en France, en relation avec les facteurs environnementaux et, à terme, la

réalisation d'une modélisation spatiale et la confection de cartes de risque pour la leishmaniose canine.

### **b. Enquêtes par questionnaires auprès des vétérinaires praticiens**

En collaboration avec le Laboratoire de Parasitologie et Maladies parasitaires de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, l'enquête préliminaire par questionnaire auprès de vétérinaires praticiens réalisée en 2007, a été étendue en 2008 à 24 autres départements du sud de la France. Au total, 2312 vétérinaires praticiens de 29 départements ont reçu le questionnaire. L'analyse des réponses a pu être réalisée sur 561 questionnaires des 570 reçus. Les données de l'enquête ont fait l'objet de deux thèses de Doctorat vétérinaire (Ecole Vétérinaire de Lyon, Pr G. Bourdoiseau) :

Halloin E. Etude épidémiologique de la symptomatologie de la leishmaniose canine dans le Sud de la France et de l'influence des facteurs environnementaux. Thèse soutenue à l'Université Claude-Bernard-Lyon I, le 2 décembre 2008

Durpoix D. Etude épidémiologique de la leishmaniose canine dans le Sud de la France : techniques diagnostiques, prophylaxie et définition de la zone d'enzootie. Influence des facteurs environnementaux. Thèse soutenue à l'Université Claude-Bernard-Lyon I, le 2 décembre 2008

Un article de synthèse est en préparation. Il est ciblé sur la détermination des niveaux d'enzootie selon les départements, basée sur les données rapportées par les vétérinaires, et la cartographie des fréquences. Cette analyse cartographique sera menée en parallèle de celle de la base de données rétrospective (*cf. supra*).

### **3. 3. 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 : 5 cas de co-infection ont été déclarés en 2008.

## **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 2008, nous n'avons pas déclenché d'alerte en France. Un contact toutefois a été pris avec la DDASS des Pyrénées-Orientales et la CIRRE Languedoc-Roussillon à propos de trois cas provenant des Pyrénées-Orientales.

Un signalement a été effectué à nos partenaires locaux à Chypre, et, par leur intermédiaire, auprès des autorités sanitaires du pays, à propos de l'émergence de *L. donovani* MON-37 en Europe.

## **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](http://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 2008, avec mise en ligne du rapport d'activité 2007.

Une rétro-information des déclarations de cas de leishmanioses a été effectuée en mai 2008 par lettre auprès de tous les déclarants 2007. Nous effectuerons la même rétro-information en mai 2009, auprès des déclarants de 2008.

### **5.2. Formation**

En 2008, cinq stagiaires ont été reçus au CNRL, dont deux Français, un Britannique une Algérienne et une Syrienne (Tableau VIII).

**Tableau VIII.- Stagiaires reçus au CNRL en 2008**

<b>NOM – PRENOM</b>	<b>LABORATOIRE D'ORIGINE</b>	<b>DATE(S) DU (DES) STAGE(S)</b>
<b>AIT OUDHIA Khatima</b>	Ecole Nationale Vétérinaire d'El Harrach <i>ALGER (ALGERIE)</i>	5 juillet au 3 octobre 2008 15 au 30 décembre 2008
<b>OGOUE Fabien</b>	Master 1 Bio-Ingénierie, Université de Montpellier ( <b>FRANCE</b> )	5 février au 5 juillet 2008
<b>SAMPSON Christopher</b>	Université de Keele (Grande-Bretagne) Programme Léonardo	14 janvier au 14 août 2008
<b>CATHALAN Eva</b>	L3, Université Montpellier 2 ( <b>FRANCE</b> )	26 mai au 28 juin 2008
<b>AMEEN Lama</b>	Damas ( <b>SYRIE</b> )	11 décembre 2007 au 31 juin 2008

### **5.3. Conseil :**

Sept demandes d'information et conseil sur l'épidémiologie et la prévention des leishmanioses ont été reçues en 2008, dont six émanant de particuliers et une de la Caisse centrale de la Mutualité sociale Agricole. Une suite a été donnée à chacune.

### **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 2008, 25 appels téléphoniques pour conseil thérapeutique ont été reçus et traités, dont 21 à Paris et 8 à Montpellier-Nîmes. Ils concernaient 13 hommes et 12 femmes, dont la moyenne d'âge était 40 ans (extrêmes : 1 - 78 ans). Dans 21 cas il s'agissait de LC et dans 4 cas de LV (dont un patient VIH+, deux patients sous traitement immunosuppresseur et un toxicomane). Dans 11 cas, il s'agissait d'une prise en charge initiale de leishmaniose récemment diagnostiquée, dans 13 d'un suivi évolutif, parmi lesquels 9 avaient fait l'objet d'un appel au moment du diagnostic initial. Dans 24 cas sur 25, l'espèce de *Leishmania* en cause était connue.

Les appels provenaient de CHU (11 fois), de CH (6 fois), de centre de santé (1 fois) ou de praticiens libéraux (6 fois). Parmi ces appels, quatre provenaient de pays étrangers (Afghanistan, Algérie, Suisse).

Enfin, j'ai organisé, le 19 novembre 2008 à l'Institut Pasteur, une séance spéciale de la Société de Pathologie Exotique sur le thème de la « thérapeutique des leishmanioses ». Au cours de cette journée, les différentes modalités diagnostiques et thérapeutiques de toutes les formes de leishmaniose cutanée et viscérale diagnostiquées en France (y compris en Guyane) ont été traitées par les différents conférenciers invités. Une table-ronde organisée l'après-midi

a regroupé 7 experts français (Jean-Pierre Dedet, Pierre Marty, Jean Pierre Gangneux, Eric Rosenthal, Edward Lightburne, Pierre Buffet et Pierre Couppié). Elle a permis de générer le premier référentiel pour le traitement de première intention des 6 principales formes cliniques : LV de l'immunocompétent, LV de l'immunodéprimé (traitement d'attaque et prophylaxie secondaire), LC à *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. infantum*, *L. guyanensis* et *L. panamensis*, LC à *Leishmania braziliensis*, et leishmaniose muqueuse à *L. braziliensis*. Les points de désaccord ont été résolus par une discussion collégiale et un tableau synoptique a été généré, relu et validé par tous les experts. Un article sera publié sous peu dans le *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*.

## **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 de l'unité labellisée UMR 2724 (unité mixte IRD-CNRS-Universités Montpellier 1 et 2) : « Génétique et évolution des maladies infectieuses » (Direction F. Renaud), à laquelle nous sommes rattachés depuis le 1<sup>er</sup> 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<sup>ème</sup> PCRD; Contrat n° 010284) comprend un consortium de 46 participants des pays européens et pays associés hors Europe. Ce programme a débuté en novembre 2004 et se poursuivra jusqu'en 2009.

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

Le CNRL est partie prenante de ce projet auquel il apporte l'appui de ses données de référence (souches identifiées, registres de cas humains). Nous avons ainsi réalisé une base de données rétrospective sur la leishmaniose canine en France (*cf. supra*) et une base de données rétrospective sur la leishmaniose humaine en France est en cours d'établissement. L'exploitation cartographique de ces travaux est en cours et sera menée à bien en 2009 (*cf. supra*).

Durant l'année 2008, nous avons finalisé une 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). Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans *Vector Borne and Zoonotic Diseases* début 2009 :

**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, sous presse.

## **6.2. Structuration génétique des populations de *L. tropica* sur l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce.**

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

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

Ce travail avait fait l'objet en 2007 d'un mémoire de Master 2 Recherche et d'une thèse d'exercice de Doctorat en Pharmacie (Morio F. Etude de la dynamique allélique du protozoaire parasite *Leishmania tropica*. Thèse de Doctorat d'Etat en Pharmacie, soutenue le 20 septembre 2007, Faculté de Pharmacie de Montpellier).

L'analyse d'une centaine de nouvelles souches en 2008 doit nous permettre une analyse statistique plus robuste de nos résultats pour publication.

## **6.3. AOI 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 in vitro de *Leishmania infantum* à l'amphotéricine B (AmB) » est en cours. La modification de la composition en stérols de la membrane d'une souche de *Leishmania infantum* sensible à l'AmB et de son mutant résistant à l'AmB sont en cours de caractérisation par méthode HPLC couplée à la spectrométrie de masse (collaboration avec le Dr Brunel Jean Michel, UMR CNRS 6236, Unité URMITE, Faculté de médecine, Université de la méditerranée, Marseille).

Par ailleurs, 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 (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. Ce travail est en cours de mise au point technique (cf. § capacités techniques).

## **7. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

Neuf publications dans des revues internationales à comité de lecture et deux dans des revues nationales, et neuf communications dans des congrès nationaux ou internationaux (dont trois invitées), ont été générées par l'activité du CNRL, durant l'année 2008. Elles sont détaillées ci-dessous.

### **7.1. Publications internationales**

Alvar J., Aparicio P., Aseffa A., Den Boer M., Canavate C., **Dedet J.P.**, Gradoni L., Ter Horst R., Lopez-Velez R., Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS : the second 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2008, 21 : 334-359.

Antoniou M., Haralambous C., Mazeris A., **Pratlong F.**, **Dedet J.P.**, Soteriadou K. *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect. Dis.*, 2008, 1 : 6-7.

**Bourgeois N.**, **Lachaud L.**, Reynes J., Rouanet I., Mahamat A., **Bastien P.** Long-Term Monitoring of Visceral Leishmaniasis in Patients with AIDS : Relapse Risk Factors, Value of Polymerase Chain Reaction, and Potential Impact on Secondary Prophylaxis. *J. AIDS* 2008, 48:13-19.

Dujardin J.C., Campino L., Canavate C., **Dedet J.P.**, Gradoni L., Soteriadou K., Mazeris A., Ozbel Y., Boelaert M. Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008, 14 : 1013-1018.

Gradoni L., Soteriadou K., Louzir H., Dakkak A., Ozensoy S., **Dedet J.P.**, Campino L., Canavate C., Dujardin J.C. Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. *Trop. Med. Intern. Health*, 2008, 13 : 1-5.

Kallel K., **Pratlong F.**, Haouas N., Kaouech E., Belhadj S., Aanane S., **Dedet J.P.**, Babba H., Chaker E. Isoenzymatic variability of *Leishmania infantum* in Tunisia concerning 254 human strains. *Acta Trop.*, 2008, 106: 132-136.

Kuhls K., Chicharro C., Canavate C., Cortes S., Campino L., Haralambous C., Soteriadou K., **Pratlong F.**, **Dedet J.P.**, Mauricio I., Miles M., Schaar M., Ochsenreither S., Radtke O.A., Schöhian G. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLOS Negl. Trop. Dis.*, 2008, 2 (e261) : 1-18.

**Morio F.**, Reynes J., Dollet M., **Pratlong F.**, **Dedet J.P.**, **Ravel C.** Isolation of a Protozoan parasite genetically related to the insect Trypanosomatid *Herpetomonas samuelpessoai* from a human immunodeficiency virus-positive patient. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, 46 : 3845-3847.

Van der Meide W, De Vries H, **Pratlong F**, Van Der Wal A, Sabajo L. Leishmaniasis, Suriname. *Emerg Infect Dis.* **2008**, 14:857-9.

## **7.2. Publications nationales**

Kallel K., Haouas N., **Pratlong F.**, Kaouech E., Belhadj S., Anane S., **Dedet J.P.**, Babba H., Chaker E. La leishmaniose cutanée due à *Leishmania infantum* MON-24 en Tunisie : extension du foyer vers le centre du pays. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 2008, 101 : 30-31.

**Pratlong F., Dedet J.P.** Les infections parasitaires chez les transplantés. 2.- Leishmanioses. *Rev. Franc. Labor.*, 2008, 403 : 49-52..

## **7.3. Communications à congrès internationaux :**

**Dereure J.**, Davies C.R., Cox J., Ready P.D., **Dedet J.P.** Did the distribution and incidence of canine leishmaniasis in France change between 1969 and 2006 ? A preliminary approach of the problem. *Third Annual Meeting of the European "EDEN" Project, Brno, Czech Republic, 16-18 January 2008* (Communication invitée).

**Dedet J.P., Pratlong F.** Epidemiological features of cutaneous leishmaniasis foci of Africa, Near East and Middle East, based on the isoenzymatic analysis of 1,048 strains. *Seminar of the Department of Parasitology, Koninklijk Instituut voor de Tropen, Amsterdam, Hollande, 24 January 2008* (communication invitée).

**Dedet J.P.** The control of diseases transmitted by phlebotomine sandflies to humans, ever achievable ? *Third Canine Vector-borne Disease Symposium, Weissbaden, Allemagne, 16-19 Avril 2008.* (Communication invitée).

**Pratlong F., Ravel C., Lami P., Balard Y., Serres G., Dereure J., Lanotte G., Rioux J.A., Dedet J.P.** Epidemiological features of cutaneous leishmaniasis foci of Africa, Near and Middle-East, based on the isoenzymatic analysis of 1,048 strains. *Tenth European Multicolloquium of Parasitology, Paris, France, 25-28 Août 2008.*

Oury B., Diabaté M., Gazanion E., Vergnes B., Garcia D., **Pratlong F., Bastien P., Sereno D.** Chemosensitivity to antimony of *Leishmania infantum* isolated from dogs and sandflies in the region of Montpellier (South of France). *Tenth European Multicolloquium of Parasitology, Paris, France, 25-28 Août 2008.*

Makinson A, Le Moing V., **Ravel C.**, Fontaine C., Le Fahler G., Reynes J. Pentamidine followed by miltefosine as salvage therapy of relapsing visceral leishmaniasis caused by

*Leishmania infantum* in HIV-infected adults with undetectable viral load. ICAAC, 25-28 octobre 2008/

#### **7.4. Communications à congrès nationaux :**

**Dedet J.P.** Introduction à la prise en charge des leishmanioses. *Société de Pathologie exotique : Journée à thème sur "le traitement des leishmanioses. Institut Pasteur, Paris, France, 19 novembre 2008.*

**Dedet J.P.** Traitement de la leishmaniose cutanéomuqueuse. *Société de Pathologie exotique : Journée à thème sur "le traitement des leishmanioses. Institut Pasteur, Paris, France, 19 novembre 2008.*

Makinson A, Le Moing V., Fontaine C., **Ravel C.**, Le Fahler G., Reynes J. Pentamidine et Miltéfosine pour le traitement des leishmanioses chroniques chez l'adulte VIH-1 recevant un traitement antirétroviral efficace. *Journées nationales d'Infectiologie, 4-6 juin 2008.*

### **8. PROGRAMME D'ACTIVITE**

Le programme d'activité pour les deux années à venir comporte la poursuite des activités d'expertise, de surveillance, d'alerte et de conseil. Dans chacun de ces domaines nous nous efforcerons d'améliorer nos performances et d'accroître nos activités. Toutefois, notre activité technique sera difficile durant un mois environ de l'année 2009, le déménagement de la totalité de notre laboratoire vers une nouvelle structure entièrement neuve, située au sein du CHU étant prévu pour juillet 2009. Cette nouvelle structure comprendra tous les laboratoires reliés à l'activité du CNRL, en particulier un P3 et un local spécifique pour la collection de *Leishmania*. Elle sera décrite dans le rapport d'activité 2009.

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

#### **8. 1. Expertise**

L'identification des souches de *Leishmania* sera poursuivie en 2008, 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 cas particuliers où la précision de l'identification au niveau infra-spécifique est nécessaire.

La surveillance de la résistance médicamenteuse des souches de *Leishmania* circulantes sera poursuivie et amplifiée.

## **8. 2. Surveillance**

### **a. Leishmanioses humaines**

A la suite de l'étude comparative que nous avons menée avec la base de données PMSI (voir rapport d'activité 2007), nous poursuivrons notre effort d'amélioration de l'exhaustivité des déclarations. 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 CIRRE Languedoc-Roussillon.

Nous proposerons à l'INV s 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).

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

### **b. Leishmaniose canine**

Les actions entreprises en collaboration avec le Laboratoire de Parasitologie et maladies parasitaires de l'ENV de Lyon seront poursuivies.

La base de données rétrospective sera exploitée et une analyse cartographique multifactorielle réalisée. L'enquête par questionnaire auprès des vétérinaires fera l'objet d'une analyse synthétique et cartographique. Deux publications sont prévues sur ces thèmes.

La surveillance des souches de leishmaniose canine sera poursuivie, grâce au réseau de vétérinaires que l'ENV de Lyon a constitué.

## **8. 3. Conseil**

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, fera l'objet d'une publication en 2009.

## **8.4. Recherche**

Les projets de recherche en cours seront développés particulièrement dans leur interface avec le CNRL (projet européen EDEN, les deux PHRC et le projet ANR). Dans le cadre du projet EDEN, l'effort portera essentiellement dans la cartographie des leishmanioses canine et humaine, à partir des bases de données réalisées (*cf. supra*).

Dans le domaine de l'épidémiologie génétique, l'étude sur la génétique des populations de *L. tropica* sera intensifiée et si possible publiée.

## **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 de plus de 5700 souches conservées et identifiées, et toutes les données cliniques et épidémiologiques associées, nous donnent une vision globale des leishmanioses sur quatre continents, notamment dans le domaine épidémiologique.

La contribution de l'analyse isoenzymatique à la connaissance des foyers de leishmaniose cutanée de l'Ancien Monde présentée à des congrès au cours de l'année 2006, fait l'objet d'un article en cours de soumission. Un travail similaire sera réalisé en 2009 pour la leishmaniose viscérale.

Enfin, 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. Nous souhaitons mener à bien en 2009 ce travail que nous avions prévu en 2008.

A Montpellier, le 31 mars 2009

Professeur Jean-Pierre Dedet

## **Remerciements**

Je souhaite remercier l'ensemble des personnels du CNRL pour le travail fourni en 2008, 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).

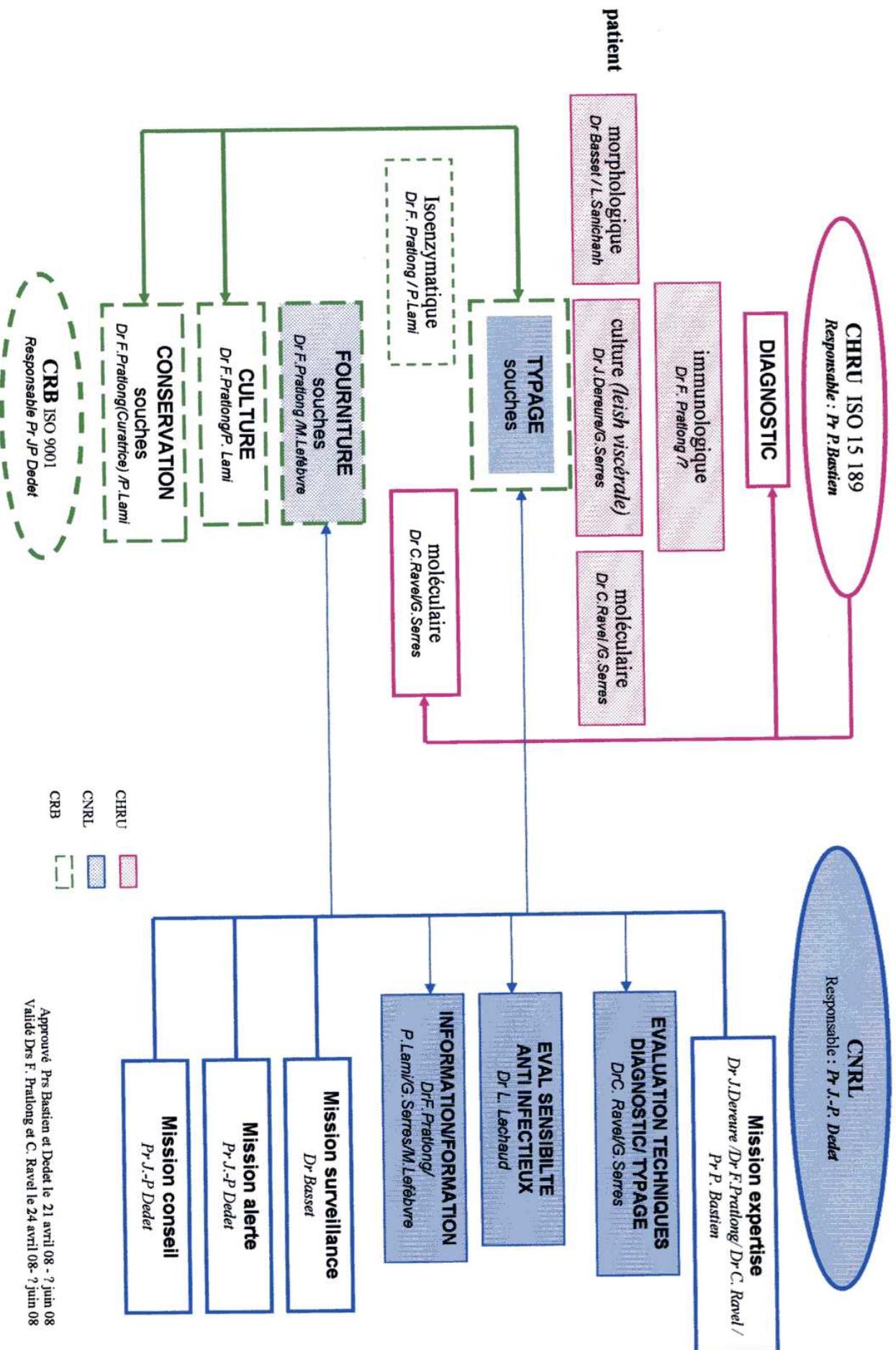
Je remercie également l'Institut de Veille sanitaire pour son appui efficace aux actions du CNRL, et tout particulièrement les correspondants du CNRL, M Arnaud Tarentola, et Mme Christine Saura au Secrétariat des CNR.

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

# **Annexes**

- 1. Identification des activités du CNRL**
- 2. Organigramme Qualité**
- 3. Résumés des communications à Congrès**

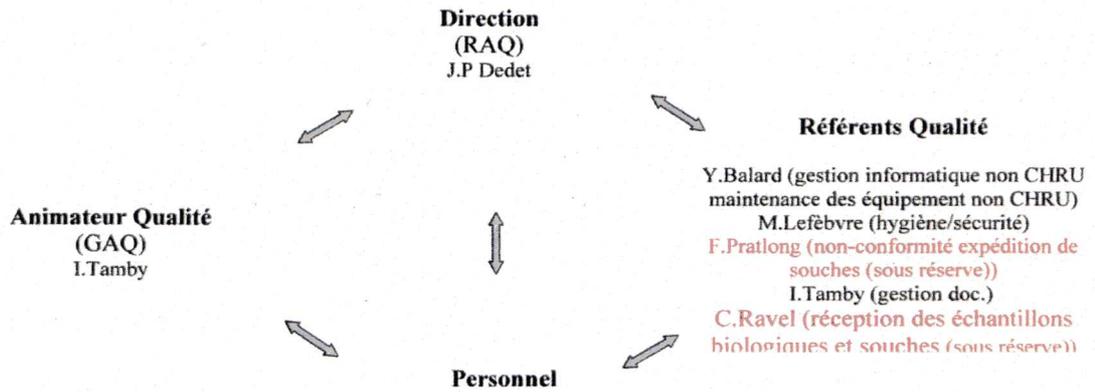
**LEISHMANIOSE Identification des activités (arrêté du 3/12/2004-art 1er) -9 juin 08**



CHRU  
 CNRL  
 CRB

Approuvé Prs Bastien et Dedet le 21 avril 08 - ? juin 08  
 Validé Drs F. Pratloug et C. Ravel le 24 avril 08 - ? juin 08

### ORGANIGRAMME QUALITE CNRL



Secteur	Biologiste	Technicien	Adjoint technique
T.moléculaire	Dr C.Ravel	G.Serres	L.Talignani
T.enzymatique	Dr F.Pralong	P.Lami	
Expédition		M.Lefebvre	

# X<sup>th</sup> EUROPEAN MULTICOLLOQUIUM OF PARASITOLOGY

Program &  
Abstract Book

**X**  
**P** *from*  
**O** *satellites*  
**M** *to*  
**E** *microsatellites*

**PARIS**

August 24-28, 2008



[www.emop10.eu](http://www.emop10.eu)

The enhancement of lysophospholipid (LPC) content could be ascribed to a phospholipid composition.

References :

- Rakotomanga M., Blanc S., Chaminade P., Loiseau P.M., 2007. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51 : 1425-1430.

- Rakotomanga M., Loiseau P.M., Saint-Pierre-Chazalet M., 2004. Hexadecylphosphocholine interactions with lipid monolayers. Biochimica et Biophysica Acta, 1661: 212-218.

SY15/03-03

**GLIBENCLAMIDE-RESPONSIVE ABC TRANSPORTERS IN LEISHMANIA: THEIR ROLE IN GLUCANTIME DISPOSITION AND ACTIVITY**

PADRON NIEVES M., DIAZ E., MACHUCA C., PONTE-SUCRE A.

Universidad Central de Venezuela, CARACAS, VENEZUELA

One cause of chemotherapeutic failure in anti-infective therapies is the increased movement of drugs across membranes through ATP-binding cassette (ABC) transporters. Herein, we show that Glucantime's efficacy to decrease the infection rate of Leishmania-infected macrophages is enhanced when used in combination with Glibenclamide, an ABC transporters blocker. Interestingly, Glibenclamide accumulates in an intracellular tubular system located at the anterior end of the cell, the nucleus and along the parasite. This tubular system is labeled by the acidic marker LysoTracker-red, but not by the nuclear marker 4',6'-diamidino-2-phenylindole, the mitochondrial marker MitoTracker-red, or the endocytic marker FM 4-64. These results demonstrate that ABC transporters inhibited by Glibenclamide are located at the membrane of intracellular organelles from Leishmania major. These organelles, probably associated with the lysosomal multivesicular system, may be involved in sequestering Glucantime from the cytosol. The inhibition of the ABC transporters located at the membranes of these organelles increases significantly the effective concentration of Glucantime and its leishmanicidal activity. Since combination therapy has been addressed as a way to decrease the cytotoxicity of individual drugs, the duration of therapy, and the potential development of resistance the herein described results could thus be of fundamental impact for leishmaniasis therapy.

SY15/03-04

**CHEMOSENSITIVITY TO ANTIMONY OF LEISHMANIA INFANTUM ISOLATED FROM DOGS AND SANDFLIES IN THE REGION OF MONTPELLIER (SOUTH OF FRANCE)**

OURY B.(1), DIABATÉ M.(1), GAZANION E.(1), VERGNES B.(1), GARCIA D.(1), PRATLONG F.(2), BASTIEN P.(2), SERENO D.(1)

(1) IRD (Institut de Recherche pour le Développement), UR16 «Caractérisation et Contrôle des Populations de Vecteurs», MONTPELLIER, FRANCE ; (2) Université Montpellier 1 et Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre National de Référence des Leishmania, MONTPELLIER, FRANCE

In the region of Montpellier (South of France), the treatment of canine leishmaniasis has been mainly based on the use of antimonials for several decades. Strains undergo therefore a high drug pressure which is likely to favour the emergence of chemoresistant strains on this long-range. To evaluate the sensitivity level to antimonials, the 50% inhibitory concentrations (IC50) of Potassium antimony tartrate (Sb(III) or trivalent antimony) and Sodium stibogluconate (Sb(V) or pentavalent antimony) were determined for promastigotes and intramacrophage amastigotes, respectively. Most of strains

under study were isolated from dogs, some of them from sandflies in a limited focus of transmission between 1974 and 2006. In vitro tests showed a variability of chemosensitivities. IC50s of more sensitive promastigotes ranged from 5 µg/mL to 10 µg/mL while IC50s of less sensitive strains were three- to five-fold higher. Interestingly less sensitive strains have emerged as early as the first decade of using antimony for treatment of canine leishmaniasis. Results question the mode of emergence of chemoresistant strains and consequently the risk of their transmission to humans.

SY15/03-05

**BACTERIA VERSUS PARASITES: LACTOBACILLUS RHAMNOSUS CELL-FREE SUPERNATANT INHIBIT THE SPORULATION OF EIMERIA OOCYSTS IN VITRO**

MOLAN A.L., DE S., THOMAS D.

Institute of Food, Nutrition and Human Health, Massey University, PALMERSTON NORTH, NEW ZEALAND

Avian coccidiosis, caused by infection with Eimeria species, is considered to be one of the most important diseases of domestic poultry worldwide. The purpose of this study was to determine if the probiotic bacterium, Lactobacillus rhamnosus, generates compounds that affect the sporulation of the oocysts of three species of Eimeria using an in vitro assay. L. rhamnosus was grown in Mann-Rogosa-Sharpe broth for 24 h at 37 C anaerobically and the cells were removed from the broth by centrifugation to get the cell-free supernatant (CFS). The oocysts were incubated with undiluted or diluted (1:2-1:64 in water) CFS for 72 h at 25-29 C. Following incubation sporulated and non-sporulated oocysts were counted and percent sporulation determined.

In control incubations containing oocysts of E. tenella, E. acervulina and E. maxima, 82.5-86% of the oocysts sporulated. In incubations containing diluted (1:16) CFS, 25%, 29% and 36% of the oocysts of these 3 species sporulated, respectively, and this corresponds to 70%, 67% and 57% inhibition in sporulation. (P<0.0001). Exposure of the oocysts of the 3 species of Eimeria to diluted (1:4) CFS resulted in 91%, 95% and 100% inhibition of sporulation while exposure to undiluted CFS resulted in 100% inhibition of sporulation.

The results show for the first time that CFS from L. rhamnosus cultures has anticoccidial activity and indicate the possibility of a natural biological control mechanism for avian coccidiosis.

SY15/04-02

**DYNAMICS OF ONCHOCERCA VOLVULUS MICROFILARIAL LOADS AFTER IVERMECTIN TREATMENT OF PATIENTS WITH EITHER HIGH OR LOW PREVIOUS DRUG PRESSURE**

BOUSSINESQ M.(1), KAMGNO J.(2), NANA DJEUNGA H.(3), PION S.(1), BOURGUINAT C.(4), CABARET J.(5), CHARVET C.(5), NJIOKOU F.(3), PRICHARD R.K.(4), WANJI S.(6)

(1) IRD, MONTPELLIER, FRANCE ; (2) Ministère de la Santé publique, YAOUNDÉ, CAMEROON ; (3) Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, YAOUNDÉ, CAMEROON ; (4) Institute of Parasitology, McGill University, MONTRÉAL, CANADA ; (5) INRA, NOUZILLY, FRANCE ; (6) REFOTDE, BUEA, CAMEROON

The main effects of ivermectin (IVM) on *Onchocerca volvulus* are a microfilaricidal effect, leading to a rapid decrease in the microfilarial loads, and a temporary blockage of the release of new microfilariae (mf) by the adult worms (embryostatic effect). After relaxation of the latter, the mf loads re-increase slowly from 3 months after treatment. Reports from Ghana suggest that this re-increase is more rapid in patients who have received many IVM doses previously. To evaluate whether this

(1) UNIVERSITY OF BUEA, BUEA, CAMEROON ; (2) RESEARCH FOUNDATION IN TROPICAL DISEASES AND ENVIRONMENT, BUEA, CAMEROON ; (3) Institute of Medical Microbiology, Immunology and Parasitology (IMMIP), University of Bonn, BONN, GERMANY ; (4) TROPICAL MEDECINE RESEARCH STATION, KUMBA, CAMEROON

Lymphoedema is a condition of localized fluid retention due to a compromised lymphatic system. One common cause in the tropics is filarial worms, but non-filarial lymphoedema has been reported in barefoot farmers in volcanic highland zones of Africa, Central and South America and North West India. There are contradictory reports on the causes of lymphoedema in the highland regions of Cameroon. This study was aimed at throwing more light on this neglected disease which is of great local public health importance. This cross-sectional study was carried out in communities in the Ndop and Tubah health districts. The subjects were made up of men and women above 15 years and who had lived in the area for at least 10 years. Individuals were interviewed to collect data on their knowledge, attitudes and practices (KAP) in relation to the disease. Of the 834 individuals examined clinically, 66 (7.91 %) had elephantiasis with all the differential stages represented. None of the 792 individuals examined parasitologically had circulating microfilariae of *W. bancrofti*. Of the 399 individuals tested for the *W. bancrofti* circulating antigens, only 1 (0.25 %) had a positive result. These findings suggest that the elephantiasis in the North West Province of Cameroon is of non-filariasis origin.

SY16/01-04

#### EPIDEMIOLOGICAL FEATURES OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS FOCI OF AFRICA, NEAR AND MIDDLE EAST, BASED ON THE ISOENZYMATIC ANALYSIS OF 1,048 STRAINS

PRAATLONG F., RAVEL C., LAMI P., BALARD Y., SERRES G., DEREURE J., LANOTTE G., RIOUX J.A., DEDET J.P.  
Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre National de Référence des Leishmania, Université Montpellier 1 & CHU, MONTPELLIER, FRANCE

Between 1981 and 2005, 1,048 *Leishmania* strains were isolated from cutaneous leishmaniasis foci of Africa, Near and Middle East and studied by isoenzyme analysis. They were obtained from humans, rodents, dogs and sandflies in 29 countries. The four classically dermatotropic species, *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* and *L. killicki*, were found. With the exception of *L. killicki*, localized up to now to Tunisia (1 zymodeme, 39 strains), *L. major* is the less polymorphic species (12 zymodemes, 638 strains). The two other species showed a high polymorphism. *L. tropica*, essentially anthroponotic and with the largest geographical distribution, is characterised by a complex polymorphism varying according to foci (35 zymodemes, 329 strains). *L. aethiopica*, localized to East Africa, showed a high polymorphism, in spite of a reduced number of strains (23 zymodemes, 40 strains). Recently a parasite close to *L. killicki* was isolated from Algeria.

During these 20 years, isoenzymatic analysis considerably contributed to the knowledge of natural hosts and leishmaniasis foci.

SY17/01-01

#### KINETICS OF TISSUE PARASITE LOAD AND SWITCH AFTER ORAL INFECTION OF MICE WITH TOXOPLASMA GONDII.

CHENE G.(1), CHARCOSSET M.(1), BELLETE B.(1), GINEVRA C.(1), HAFID J.(2), RABERIN H.(1), TRAN MAN SUNG R.(1), FLORI P.(1)

(1) CHU de Saint etienne, SAINT ETIENNE, FRANCE ; (2) Département de Biologie, Faculté des Sciences et Techniques, MARRAKECH, MOROCCO

*T. gondii* parasite loads of whole blood and of different tissues were assessed in Nude and immocompetent (NMRI) mice by a real-time PCR. Thirty six female mice were infected with 20 cysts each of a 76K strain of *T. gondii* by the oral route. Blood and organ samples were taken at 3, 5, 7, 10, 14, 21 days after inoculation. In parallel, a new molecular technique (reverse transcriptase-PCR) was developed to evaluate the switch between tachyzoite to bradyzoite forms. The quantitative PCR and the RT-PCR were made using FRET hybridization probes on the Light Cycler® using 529 bp gene, TUB gene, SAG2A gene (expressed by the tachyzoite form), SAG4 gene (expressed by the bradyzoite form).

The maximum parasitemia was at day-7 in NMRI mice (~10<sup>3</sup>/ml) and at day-20 in Nude mice (~10<sup>4</sup>/ml). In all the samples from Nude mice, the tissue burden increased with time and reached concentrations greater than 10<sup>6</sup>/g. In contrast, in the NMRI mice, heart, liver and lung tissue concentrations were maximal at day-10 (maximum ~ 10<sup>4</sup> -10<sup>5</sup>/g) ; Cerebral and muscle burdens increased with time and reached concentrations greater than 10<sup>5</sup>/g. Switch of parasitic forms was evaluated between day-7 and day-10.

Real time quantitative PCR using the FRET hybridization probe is a very sensitive and reproducible technique to study the kinetics and switch of parasitic burden.

SY17/01-02

#### CONSEQUENCES OF TOXOPLASMA GONDII INFECTION ON REPRODUCTIVE PARAMETERS OF MALE RATS EXPERIMENTALLY INFECTED BY THE PARASITE

TERPSIDES K., PAPAACHARIADOU M., TAITZOGLU I., PAPAIOANNOU N., GEORGIADES M.  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, ARISTOTLE UNIVERSITY OF THESSALONIKI, THESSALONIKI, GREECE

The GT F1 strain of *T. gondii* tissue cysts (at a dose of 5x10<sup>3</sup> tissue cysts per rat) were fed by oral gavage in an experimental group of 42 healthy adult male Wistar rats and an equal group was used as control. On days 10,20,30,40,50 and 60 post inoculation (p.i) 7 rats from each group were anesthetized by ether inhalation. The body weight was recorded for each animal then epididymis and testes were immediately removed, weight followed by semen evaluation. None of the infected animals showed any clinical sign of toxoplasmosis or other sign of illness. Weight of the right epididymis decreased on day 30 p.i. Sperm motility was significantly decreased in the infected group on days 10,20,30,40,50 and 60 p.i. Sperm concentration significantly decreased on day 30 p.i. which remained until the 60th day. A remarkable elevation of sperm abnormalities noticed on days 30 and 40 pi. According to our preliminary histopathological results they didn't detect pathological lesion either in the pituitary gland or the testes. Conclusion: Toxoplasmosis can affect main reproductive parameters in rats. As white rats considered the model for humans toxoplasmosis because of their natural resistance to *Toxoplasma* infection, the possible effect of toxoplasmosis on man's fertility is discussed.

SY17/01-03

#### REAL-TIME QUANTITATIVE PCR STUDY OF TOXOPLASMA GONDII BURDEN IN DIFFERENT TISSUES IN A MURINE MODEL OF CHRONIC TOXOPLASMOSIS

ABBARA A.(1), THOMAS M.(1), PERRET C.(1), ALLIOT A.(1), DURAND B.(2), BRETAGNE S.(3), AUBERT D.(4), HALOS L.(1)



**Jean-Pierre Dedet**

Université Montpellier, Laboratoire de Parasitologie, Montpellier, France

# The control of diseases transmitted by phlebotomine sandflies to humans, ever achievable?

The phlebotomine sandfly (diptera: psychodidae, phlebotominae) is a transmitter for several infectious pathogens causing leishmanioses, bartonellosis and arbovirus infections due to phleboviruses. Several of these diseases have wide geographical distributions around the world, and give rise to occasional epidemic outbreaks. In numerous countries, increasing risk factors are making sandfly-borne diseases a major public and veterinary health problem.

### The phlebotomine sandflies

The first description of a phlebotomine sandfly was made in 1786, by an Italian naturalist, Scopoli,<sup>15</sup> under the name "*Bibio papatasi*". This species is known today as *Phlebotomus papatasi*, as the genus *Phlebotomus* was only described in 1840, by Rondani.<sup>13</sup>

Sandflies are psychodid diptera of the subfamily phlebotominae. Their life cycle includes two different biological stages: the free-flying adult and the developmental stages, which include eggs, four larval instars and a pupae stage. The adults are small flying insects of about 2–4 mm in length, with a yellowish hairy body (fig.1). During day, they rest in dark sheltered places. They are active at dusk and during the night. Both sexes feed on plant juices, but females also need a blood meal before they are able to lay eggs. It is during this blood meal that the patho-

gens are collected from, and transmitted to, the mammalian hosts.

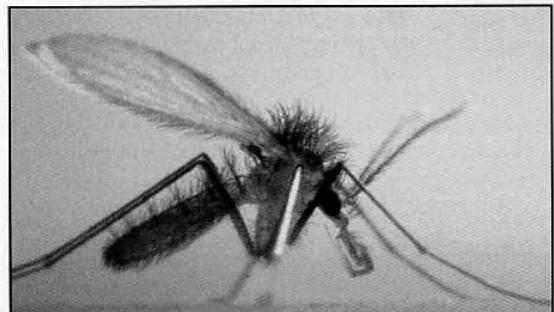


Figure 1: A phlebotomine sandfly adult  
(Photo Laboratoire de Parasitologie,  
Université Montpellier)

The development of immature stages of the sandflies takes place in damp soil rich in organic material. Breeding sites can be located within tree holes, soil cracks and forest litter. For the majority of the sandfly species, the localization of breeding sites is unknown. The only exceptions are *Phlebotomus papatasi* and *P. duboscqi*, vectors of *Leishmania major*, whose breeding sites are located within the burrows of the rodent reservoir of this species.

Among the 800 known species of sandflies, about 70, belonging to the genera *Phlebotomus* in the Old World and *Lutzomyia* in the New World, are proven or suspected vectors of pathogens. The vectorial competence of phlebotomine

sandflies is high. Several pathogens are transmitted by them, including viruses (phlebovirus), bacteria (*Bartonella bacilliformis*), fungi and numerous trypanosomatid protozoa (all species of *Leishmania* and *Endotrypanum* genera and a few species of *Trypanosoma* genus). For example, Brazilian sandflies have been shown to harbour almost 150 different pathogens,<sup>16</sup> but not all of them have been identified, and their life cycles are largely unknown.

A certain level of specificity exists between a pathogen and a sandfly species. Vectorial capacity of sandflies is hampered by their low longevity and the restricted number of blood meals they take.

Some aspects of sandfly biology need to be enlightened, as related to the control of these insects: The small size of the adults make them able to pass through a standard mosquito net. So they require the use of special sandfly nets in gauze, which are uncomfortable as they reduce air passing through, or better of mosquito nets impregnated with insecticides.

The phlebotomine sandflies are currently known to be sensitive to all insecticide classes. Reports of insecticide resistance refer to only three sandfly species against DDT in India.<sup>1</sup>

The breeding sites of sandflies are unknown for the majority of species, which means that no larval control measures can be used.

## The sandfly-borne diseases

The phlebotomine sandflies are vectors of several zoonotic, or even anthroponotic, diseases such as leishmanioses, bartonellosis and sandfly fever. It must be recognized that the importance of the leishmanioses has eclipsed the possible role of sandflies in the transmission of other diseases. Recent emergence of some of these diseases has lead to a change in the view of sandflies as important vectors.

### 1. Leishmanioses

The leishmanioses are parasitic diseases caused by flagellate protozoa of the genus *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae), which infect numerous mammalian species, including humans, and are transmitted through the infective bite of a phlebotomine sandfly.

*Leishmania* are dimorphic parasites which are present as two principal morphological stages: the intracellular amastigote, in the cells of the mammalian hosts mononuclear phagocytic system,

and the flagellated promastigote in the intestinal tract of the insect vector.

Since the first *Leishmania* species has been described,<sup>9</sup> the number of species has increased steadily, and currently stands around 30. As the different species are morphologically indistinguishable, other characters have been used for their taxonomy, mainly multilocus isoenzyme electrophoresis, and more recently molecular techniques. In humans, the disease may be visceral (visceral leishmaniosis, VL), cutaneous (cutaneous leishmaniosis, CL), of localized (LCL) or diffuse (DCL) type, or mucocutaneous leishmaniosis (MCL). The leishmanioses are widely distributed around the world. They occur in more than 88 countries, ranging over the intertropical zones of America and Africa, and extending into temperate regions of South America, southern Europe and Asia. The limits of the disease are latitudes 45° North and 32° South. The geographical distribution is governed by the limitations of the mammal or sandfly host species, which involves their own ecology and their own distribution area. The leishmanioses are diseases with natural focality. They include several "noso-epidemiological units", which can be defined as the conjunction of a particular *Leishmania* species, circulating in specific natural hosts, evolving in a natural focus with specific ecological patterns, and having a particular clinical expression<sup>4</sup> (tab.1). Some of the *Leishmania* species have dogs as reservoirs: *L. infantum*, agent of zoonotic VL, which has a worldwide distribution, and *L. peruviana*, agent of the Andine CL, restricted to the high Andine valleys of Peru. Dogs can also occasionally harbor other species of *Leishmania*, including *L. braziliensis* and *L. tropica*.

### 2. Bartonellosis

Bartonellosis or Carrion's disease is a human infection caused by *Bartonella bacilliformis*, a bacterium invading, primarily, the blood cells and secondarily the phagocytic mononuclear system, particularly the endothelial cells. The bacteria are transmitted to humans by the bite of the sandfly species *Lutzomyia verrucarum*. To date, a natural, non-human, vertebrate reservoir has not been identified.

The Carrion's disease evolves in two stages. The first stage, called Oroya fever, corresponds to acute bacteraemia, characterized by irregular remittent fever, a rapidly developing hemolytic anaemia, and severe pains in the head, joints and long bones. The death rate varies between 10 and 40 %.

"Noso-epidemiological units"	Parasite species	Reservoir hosts	Sandfly vector	Clinical form in humans	Distribution and ecological patterns
Anthroponotic VL	<i>L. donovani</i>	Humans	<i>P. argentipes</i>	Kala-azar, PKDL	Old World, rural disease
Zoonotic VL	<i>L. infantum</i>	Dogs	<i>P. (Larrousius) spp.</i>	Infantile VL	Old and New Worlds, rural disease
Zoonotic CL	<i>L. major</i>	Gerbilline rodents	<i>P. papatasi</i> , <i>P. duboscqi</i>	Localized CL	Old World arid and perarid areas, rural disease
Anthroponotic CL	<i>L. tropica</i>	Humans	<i>P. sergenti</i>	Localized CL	Near and Middle East, urban disease
Zoonotic CL	<i>L. aethiopica</i>	Hyracoids	<i>P. longipes</i> , <i>P. pedifer</i>	LCL, DCL	Ethiopia highlands, rural disease
Zoonotic CL	<i>L. killicki</i>	unknown	Unknown	LCL	Southern Tunisia
MCL or Espundia	<i>L. braziliensis</i>	Wild mammals	<i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. intermedia</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Lu. ylephiletor</i> , etc.	CL and MCL	New World primary rain forest, sylvatic zoonosis
New world CL	<i>L. guyanensis</i>	Sloths, anteaters; opossums	<i>Lu. umbratilis</i> , <i>Lu. whitmani</i>	Localized CL	New World primary rain forest, sylvatic zoonosis
New world CL	<i>L. panamensis</i>	Sloths, monkeys	<i>Lu. trapidoi</i> , <i>Lu. gomezi</i> , <i>Lu. ylephiletor</i>	Localized CL	New World primary rain forest, sylvatic zoonosis
Rodent enzootic leishmaniosis	<i>L. amazonensis</i>	Echimyid rodents	<i>Lu. flaviscutellata</i>	LCL, DCL	New World primary rain forest, sylvatic zoonosis
New world CL, or chiclero's ulcer	<i>L. mexicana</i>	Rodents	<i>Lu. olmeca</i>	LCL	New World primary rain forest, sylvatic zoonosis
New world CL	<i>L. naiffi</i>	Armadillos	<i>Lu. ayrozai</i> ; <i>Lu. paraensis</i> ; <i>Lu. squamiventris</i>	LCL	New World primary rain forest, sylvatic zoonosis
New world CL	<i>L. lainsoni</i>	<i>Agouti paca</i>	<i>Lu. ubiquitalis</i>		New World primary rain forest, sylvatic zoonosis
New world CL, or Uta	<i>L. peruviana</i>	Dogs	<i>Lu. peruensis</i>	LCL	Arid valleys of western slopes of Peruan Andes

Table 1: Main "noso-epidemiological units" of the human leishmanioses of the Old and New World

The Oroya fever can be followed by a chronic eruptive phase, the verruga peruana, characterized by an eruption sparse or abundant, discrete or confluent, of miliary or nodular type. The eruption is accompanied by fever and rheumat-

ic-like pains. The verruga peruana generally cures without mortality.

The Carrion's disease is mainly located in the high altitude valleys (800–3,000 meters) of the western slopes of the Andes, mainly in Peru, with

extension to Ecuador and Colombia. It occurred as epidemic outbreaks, the most important being during the construction of the central railway in Peru, where the disease was responsible for more than 7,000 deaths between 1870 and 1886.<sup>12</sup> More recently, epidemic outbreaks occurred in Peru in the years late 1980s–1990s, following the cessation of spraying which was part of the malaria eradication program.

### 3. Phleboviruses

Phleboviridae is one of the five genera of the family Bunyaviridae. They are members of the class V virus, with segmented ambisense RNA genomes. Phleboviridae have currently 68 antigenic serotypes, of which 8 are linked to human diseases.

Phleboviruses have been isolated in southern Europe, Africa, Central Asia and the Americas. They include two groups: the *Phlebotomus* fever virus, transmitted by phlebotomine sandflies (Alenquer, Candiru, Chagres, sandfly fever Naples/Toscana, sandfly fever Punta Toro, sandfly fever Sicilian) or by mosquitoes (Rift Valley fever) and the Uukuniemi group, transmitted by ticks.

Twenty-five phleboviruses have been isolated on the American continent, reflecting the great diversity of the New World sandflies. Twenty-one of these viruses come from Brazilian sandflies, but additional phleboviruses have been isolated from humans and rodents, which have not been found in sandflies, for example Alenquer, Candiru, Morumbi and Serra Norte.<sup>16</sup>

Phleboviruses cause diseases ranging from short self-limiting fevers to encephalitis and fatal haemorrhagic fever.

The phleboviruses Sicily and Toscana are responsible for "sandfly fevers", and are present in the Mediterranean basin. They were responsible for two historical epidemics: one occurring in the Austrian armies during the Napoleon wars, another infecting the American soldiers during the Second World War.

More recently, outbreaks of sandfly fever caused by the Naples/Toscana and Sicilian virus were reported from various Mediterranean countries, including Cyprus,<sup>8</sup> and extended to Jordan,<sup>2</sup> Israel,<sup>3</sup> North Sudan,<sup>19</sup> and the Khartoum province of Sudan.<sup>10</sup>

The sandfly fevers are serious, but non-fatal, diseases. The most common symptomatology is of influenzal type, with fever, headache, muscular

pain, nausea, conjunctivitis and photophobia. Meningitis and meningo-encephalitis can occasionally occur. Asymptomatic cases are frequent in endemic country populations, particularly in populations exposed at risk of sandfly bites, as shown in the Tuscany region of Italy, where the seroprevalence in forestry workers reached 77.2%.<sup>17</sup>

Toscana serotype of the Naples virus has regularly been associated to central nervous system infections in southern Italy<sup>6</sup> and Sardinia,<sup>18</sup> southern France,<sup>5</sup> Spain,<sup>11</sup> and Portugal.<sup>14</sup> Imported cases were also reported in non-endemic countries such as Germany.<sup>7</sup> Some species vectors of the sandfly fevers have been identified, such as *Phlebotomus papatasi* in Italy, *P. perniciosus* in Spain, Portugal and southern France.

### The control of sandfly-borne diseases in humans

Intervention strategies for prevention or control of the sandfly-borne diseases are hampered by the diversity of the pathogens involved and the variability of structure of the natural foci. The only attempts to control sandfly-borne diseases were restricted to leishmaniasis. So we will focus on this disease, with possible further extrapolation. In leishmaniasis, numerous species are involved, with many different reservoir hosts of epidemiological forms and a multiplicity of sandfly vectors, each with a different pattern of behavior (tab.1). In 1990, a WHO Expert Committee described no less than 11 distinct eco-epidemiological entities and defined control strategies for each one.<sup>20</sup>

#### Prevention

The aim of prevention is to avoid host infection (human or canine) and subsequent disease. It includes means to prevent intrusion of people into natural zoonotic foci and protection against infective bites of sandflies. Prevention can be at an individual or collective level. It includes the use of repellents, pyrethroid-impregnated bed-nets, self-protection insecticides, indoor residual spraying and forest clearance around human settlements. For dog protection, a permethrin-based ectoparasiticide spot-on and an deltamethrin collar have been available for a few years.

#### Control

Control programs are intended to interrupt the life cycle of the parasite in order to limit or ideally eradicate the disease. The structure and dynamics of natural foci of leishmaniosis are so diverse that a standard control program cannot be defined and control measures must be adapted to the local epidemiological situations. The strategy depends on the ecology and behavior of the two main targets, the reservoir hosts and the vectors, which are not mutually exclusive.

Control measures are very different depending on whether the disease is anthroponotic or zoonotic. In the New World, almost all the leishmanioses are sylvatic, and control is not usually feasible. Even removal of the forest itself may not be effective, as various *Leishmania* species have proved to be remarkably adaptable to environmental degradation.

Case detection and treatment are recommended when the reservoir host is man or dog, while massive destruction may be the chosen intervention strategy if the reservoir host is a wild animal. The reduced efficacy of the current anti-leishmanial drugs and their toxicity limit their use for systematic treatment of cases. The high level of asymptomatic infection both in human and canine hosts affects the efficiency and the feasibility of systematic case detection and treatment programs.

As far as vectors are concerned, control of breeding sites is limited to the few instances where they are identified (rodent burrows for *P. papatasi* and *P. duboscqi*). Anti-adult measures consist of insecticide spraying. Malaria control programs, based on indoor residual insecticide spraying, have had a side benefit for leishmaniosis incidence in several countries where a resurgence of leishmaniosis was observed after the ending of these campaigns: India, Italy, Greece and the Middle East, and Peru.

In practice, control programs include several integrated measures targeted not only on the reservoir host and/or vector, but also to associated environmental changes. Health education campaigns can considerably improve the efficiency of control programs. National leishmaniosis control programs have been developed in various countries to face endemic or epidemic situations (India, China and Brazil for VL, Central Asian Republics of the former USSR and Tunisia for CL).

Concerning the problem of control of the virus sandfly fevers, some points can be extrapolated from the data obtained from leishmaniosis control. The detection of human cases is possible (commercially detection kits are available), but the treatment of human cases is impossible due to unavailability of specific antiviral drugs. Animal reservoirs are unknown, even if an infection of wild animal was reported for some phlebovirus.

Vector control has the limits mentioned above, because larval control is impossible. Adults are sensitive to insecticides,<sup>1</sup> which means that indoor residual insecticide spraying is recommended in case of epidemic outbreaks.

Human and canine prevention of sandfly bites using repellents for humans and ectoparasiticide spot-on and collar for dogs remains the best prophylactic measure.

#### Acknowledgements

The author thanks Mr Christopher Sampson for revision of the manuscript and Yves Balard for figure preparation.

## References

1. Alexander J, Maroli M (2003). Control of Phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*; 17:1–18.
2. Batieha A, Saliba EK, Graham R, Mohareb E, Hijazi Y, Wijeyaratne P (2000). Seroprevalence of West-Nile, Rift Valley and sandfly arboviruses in Hashimiah, Jordan. *Emerg Infect Dis*; 6:358–362.
3. Cohen D, Zaide Y, Karasenty E, Schwartz M, LeDuc JW, Slepon R, Ksiazek TG, Shemer J, Green MS (1999). Prevalence of antibodies to West Nile fever, sandfly fever Sicilian, and sandfly fever Naples viruses in healthy adults in Israel. *Public Health Rev*; 27:217–230.
4. Dedet JP (2008). Protozoan diseases: leishmaniasis. In: *Encyclopedia of Public Health*, Heggenhougen HK Edr. Elsevier.
5. De Lamballerie K, Tolou H, Durand JP, Charrel RN (2007). Prevalence of Toscana virus antibodies in volunteer blood donors and patients with central nervous system infections in southeastern France. *Vector Borne Zoonotic Dis*; 7:275–277.
6. Di Nicuolo G, Pagliano P, Battisti S, Starace M, Mininni V, Attanasio V, Faella FS (2005). Toscana virus central nervous system infections in southern Italy. *J Clin Microbiol*; 43:6186–6188.
7. Imirzalioglu C, Schaller M, Bretzel RG (2006). Sandfly fever Naples virus (serotype Toscana) infection with meningeal involvement after a vacation in Italy. *Dtsch Med Wochenschr*; 131:2838–2840.
8. Konstantinou GN, Papa A, Antoniadis A (2007) Sandfly-fever outbreak in Cyprus: are phleboviruses still a health problem? *Travel Med Infect Dis*; 5:239–242.
9. Laveran A, Mesnil F (1903). Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Laveran et Mesnil), parasite d'une fièvre de l'Inde. *CR Acad Sci*; 137:957–961.
10. Mc Carthy MC, Haberberger RL, Salib AW, Soliman BA, El-Tigani A, Khalid IO, Watts DM (1996). Evaluation of Arthropod-borne viruses and other infectious disease pathogens as the causes of febrile illnesses in the Khartoum Province of Sudan. *J Med Virol*; 48:141–146.
11. Navarro JM, Fernandez-Roldan C, Pérez-Ruiz M, Sanbonmatsu S, de la Rosa M, Sanchez-Seco MP (2004). Meningitis by Toscana virus in Spain: description of 17 cases. *Med Clin (Barcelona)*; 27:420–422.
12. Rebagliati R (1940). Verruga peruana (enfermedad de Carrion). Torres Agirre, Lima; p. 204.
13. Rondani C (1840). Sopra una specie di Insetto Diptero. Mem prima per serv alla ditta ital, Parma; p. 16.
14. Santos L, Simoes J, Costa R, Martins S, Lecour H (2007). Toscana virus meningitis in Portugal. *Euro Surveill*; 12:E3–E4.
15. Scopoli J (1786). *Deliciae florum et faunae insubricae*. Pavia; p. 85.
16. Shaw JJ, Travassos de Rosa A, De Souza A, Cruz AC (2003). Transmissao de outros agentes. Os Flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas especies. In: *Flebotomíneos do Brasil*, Eds.: Rangel EF, Lainson R; pp. 337–351.
17. Valassina M, Valentini M, Pugliese A, Valensin PE, Cusi MG (2003). Serological survey of Toscana virus infections in a high-risk population in Italy. *Clin Diagn Lab Immunol*; 10:483–484.
18. Venturi G, Maddedu G, Rezza G, Ciccozzi M, Pettinato ML, Cilliano M, Fiorentini C, Muras MS, Ciufolini MG (2007). Detection of Toscana virus central nervous system infections in Sardinia Island, Italy. *J Clin Virol*; 40:90–91.
19. Watts DM, El-Tigani A, Botros BA, Salib AW, Olson JG, Mc Carthy M, Ksiazek TG (1994). Arthropod-borne viral infections associated with a fever outbreak in the Northern province of Sudan. *J Trop Med Hyg*; 97:228–230.
20. WHO (1990). Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report series; 793:173.



# Pentamidine Followed by Miltefosine as Salvage Therapy of Relapsing Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* in HIV-infected Patients with Undetectable Viral Load

Alain Makinson<sup>\*1</sup>, Vincent Le Moing<sup>1</sup>, Christophe Ravel<sup>2</sup>, Christophe Fontaine<sup>1</sup>, Georges Le Falher<sup>1</sup>, and Jacques Reynes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Infectious Diseases Department, Montpellier University Hospital, CHU Montpellier; <sup>2</sup>French National Centre on Leishmaniasis, UMR 2724 CNRS, IRD and University of Montpellier 1, Montpellier, all in France

\* Corresponding author: a-makinson@chu-montpellier.fr

## Introduction

- Visceral Leishmaniasis (VL) with *Leishmania infantum* (*L. infantum*) and HIV co-infection are frequent in Southern Europe
- VL relapses are associated with T CD4 lymphocyte depletion <200 cells/mm<sup>3</sup>, non-use of Combination Antiretroviral Therapy (CART), persistent detection of *Leishmania* DNA by PCR in blood, and absence of amphotericin-prophylactic treatment
- Long-term use of amphotericin B in relapsing VL is limited by serious amphotericin-related adverse events
- VL relapses in HIV-infected patients with undetectable viral loads are difficult to manage, as further increase of CD4 lymphocytes under CART is improbable

## Objective

- To describe the management, in our Infectious Diseases Department, of HIV-infected adults with relapsing VL and major amphotericin toxicities, all of whom had undetectable HIV viral loads under CART

## Subjects and methods

- Patients: (1) were HIV-infected and under CART, (2) had more than 2 VL relapses, despite plasma viral load < 40 copies/mL (3) and had major amphotericin adverse events requiring alternative strategies with pentamidine and miltefosine
- Diagnosis was made by a positive blood or medulla smear or detection of *Leishmania* DNA by PCR
- Data were censored on the 31st of May 2008

## Results

- Four patients were eligible (table)
- All had < 200/mm<sup>3</sup> CD4 lymphocyte T count at first VL diagnosis
- Median cumulative dose of Amphotericin B was 17 grams
- PCR detections of *Leishmania* DNA from blood were always positive, whether during or between clinical relapses
- Patient 1 relapsed two months after a one month course of miltefosine (50 mg bid)
- Patient 2 relapsed after 15 months of miltefosine administration (50 mg bid) to which he had been non-adherent
- Patient 4 relapsed and died in a context of septic shock after 24 months of miltefosine administration (50 mg bid)
- Patients 1, 3 and 4 relapsed after a single course of pentamidine (10 injections of 4 mg/kg)
- Patients 1 and 3 received pentamidine (10 injections at 4 mg/kg/day) followed by prolonged miltefosine treatment. There were no VL relapse after respectively 6 and 18 months follow up under miltefosine

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Duration of HIV-viral load undetectability (months)	97	80	50	33
Total number of relapses since viral load undetectability	4	2	2	4
Median TCD4 count at relapses (cells/mm <sup>3</sup> )	39	185	119	81
Amphotericin cumulative dose (gr)	43	20	16	1.55
Amphotericin adverse events	Deafness Dialysis	Renal insufficiency	Renal insufficiency deafness	Deafness
Relapses after pentamidine course	1	ND	1	1
Relapses under miltefosine	1	1	ND	1
Relapse after pentamidine course followed by prolonged miltefosine treatment	0	ND	0	ND

Table: selected characteristics and clinical response of VL to salvage therapies with pentamidine and miltefosine. ND=Not Done.

## Conclusion

- Repeated amphotericin infusions can lead to irreversible nephrotoxicity and/or deafness
- None of our patients showed long term remission with amphotericin, pentamidine or miltefosine courses alone despite HIV virological undetectability under CART
- Two of our patients had long term remission after pentamidine-based induction therapy followed by prolonged miltefosine administration

# COMPTES-RENDUS DE SÉANCES

## Séance de la SPE : Thérapeutique des leishmanioses, Institut Pasteur, Paris, 19 novembre 2008.

Sous la présidence de P. Ambroise-Thomas

Président de la Société de pathologie exotique. Président élu de la Fédération internationale de médecine tropicale. Membre de l'Académie nationale de médecine

### Les leishmanioses : introduction à la prise en charge.

J.-P. Dedet

Université Montpellier-I et CHU de Montpellier. Centre national de référence des *Leishmania*. 163, rue Auguste-Broussonet, 34090 Montpellier, France.

Les leishmanioses sont des parasitoses dues à des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania*. Parasites principalement zoonotiques, les leishmanies affectent de très nombreuses espèces de mammifères, dont l'homme, et sont transmises par la piqûre infectante d'un insecte vecteur, le phlébotome. Sévissant sur quatre continents, les leishmanioses affectent la santé des populations de 88 pays du monde, dont 72 parmi les plus faiblement développés. Leur aire géographique circumterrestre est globalement intertropicale, mais avec un fort débord sur les zones tempérées du sud de l'Europe, d'Afrique du Nord, d'Asie ou d'Amérique. L'incidence annuelle moyenne des leishmanioses est estimée entre 1,5 et 2 millions de cas.

Les leishmanioses posent un problème complexe dont la compréhension nécessite la conjonction de plusieurs approches et l'abord sous différents angles d'étude.

Pour le parasitologue, le genre *Leishmania* est constitué d'un grand nombre d'espèces, impossibles à distinguer par la morphologie et dont le cycle naturel se résume au passage alternatif d'un hôte mammifère à un phlébotome. Le spectre d'espèces de mammifères et de phlébotomes varie suivant l'espèce de *Leishmania*, avec toutefois une certaine spécificité d'hôte selon l'espèce. De même, les leishmanies présentent une grande diversité génétique, explorée par les différentes méthodes d'identification isoenzymatique et moléculaires. Elles possèdent également, chez l'homme, des tropismes distincts pour les organes profonds, la peau ou les muqueuses de la face.

Pour l'épidémiologiste, les leishmanioses évoluant dans la nature se distinguent en grandes unités noso-épidémiologiques, correspondant à l'association d'une espèce particulière de parasite, évoluant chez des hôtes naturels spécifiques et dans un écosystème donné, le foyer naturel d'infection. L'association biologique de l'espèce de *Leishmania*, avec ses hôtes vertébrés et son phlébotome vecteur, constitue le complexe pathogène, au sens de Max SORRE (1933).

Pour le clinicien, les leishmanioses correspondent à un groupe de maladies humaines comprenant différentes formes clini-

ques : la leishmaniose viscérale, les leishmanioses cutanées, localisées ou diffuses, et la leishmaniose cutanéomuqueuse. Cette variabilité dans l'expression clinique résulte à la fois de la grande diversité d'espèces de *Leishmania*, mais aussi des modalités de la réponse immune de l'hôte.

Le traitement des leishmanioses reste difficile, en 2008, en raison, d'une part de la multiplicité des espèces de *Leishmania* de sensibilité variable aux produits utilisés et, d'autre part, du nombre restreint de produits disponibles qui sont de surcroît anciens, toxiques et coûteux. Le traitement des leishmanioses est dominé depuis les années 1920 par les dérivés stibiés qui demeurent encore souvent des médicaments de première intention. Mais depuis l'accroissement des cas de co-infection LV/sida et l'apparition des résistances aux antimoniés, l'amphotéricine B, surtout sous sa forme liposomale, a tendance à leur disputer cette place. La miltéfosine, premier antileishmanien oral disponible, s'est révélée très efficace dans le traitement de la LV en Inde, où elle est devenue une alternative efficace. La pentamidine n'est plus utilisée que dans certaines formes de LC.

Longtemps d'utilisation empirique, ces produits ont des propriétés et des effets mieux connus depuis une vingtaine d'années, mais ils n'en demeurent pas moins, pour la plupart, d'utilisation délicate compte tenu de leur voie d'administration parentérale et de leur toxicité. C'est pourquoi diverses molécules font l'objet d'essais thérapeutiques : des formulations particulières ou des associations nouvelles sont en cours d'expérimentation clinique, mais il n'existe pas de produit réellement nouveau en développement. Des produits comme l'aminosidine ou les imidazolés pourraient trouver à l'avenir des applications dans les leishmanioses.

Enfin, l'existence de produits dont l'efficacité n'est pas prouvée complique le problème et jette le trouble chez le praticien prescripteur. De nombreux produits sont réputés efficaces dans les leishmanioses cutanées au vu d'expérimentations *in vitro* ou d'essais cliniques portant sur des formes cutanées spontanément curables, menés sur des effectifs réduits et sans groupe contrôle.

C'est dire qu'une mise au point sur le sujet s'avérerait nécessaire. L'objectif de la journée que la Société de pathologie exotique a accepté de consacrer au thème de la prise en charge thérapeutique des leishmanioses est de faire le point sur les avancées et les usages courants de la thérapeutique des leishmanioses.

## Quelle procédure diagnostique pour quelle leishmaniose ?

P. Marty

Service de parasitologie-mycologie, Centre hospitalier universitaire, Faculté de médecine et Unité Inserm 895, Hôpital de l'Archet, BP 3079, 06202 Nicedex 3.  
E-mail : marty.p@chu-nice.fr

En fonction de la forme clinique suspectée, la procédure diagnostique sera différente.

Dans les leishmanioses tégumentaires, la sérologie effectuée avec les techniques classiques est très souvent négative. Par contre, le Western blot est, dans notre expérience, très utile. Il met en évidence, quasi systématiquement dans les cas avérés, des anticorps spécifiques dirigés surtout contre les fractions antigéniques de 14, 16, 18 kDa. En cas de suspicion de leishmaniose cutanée, le Western blot, peut être utilisé comme test d'orientation. En cas de négativité de ce test, devant une lésion cutanée ou cutanéomuqueuse évocatrice, on peut quasiment exclure le diagnostic.

La mise en évidence du parasite se fait, après anesthésie locale, de préférence par biopsie au punch en cas de lésion ulcérée (comme avec *Leishmania major*), en prélevant, parfois après avoir retiré la croûte, sur le bord externe du cratère. S'il s'agit d'une lésion maculopapuleuse de petite taille (comme souvent avec *Leishmania infantum*) on préfère pratiquer une ponction-aspiration avec du sérum physiologique. On privilégie ce dernier type de prélèvement si la lésion siège au niveau du visage.

À partir de l'échantillon biologique récolté, on pratique des appositions ou des dépôts sur lames qui sont colorées au May-Grünwald Giemsa pour un examen au microscope à la recherche de formes amastigotes. Dans le même temps, une partie de l'échantillon est mise en culture sur des milieux spéciaux (NNN, Schneider), avec antibiotiques, en espérant la croissance de formes promastigotes qui permet la caractérisation isoenzymatique de la souche (afin de déterminer un zymodème) au Centre national de référence des *Leishmania* de Montpellier. Enfin, une partie de l'échantillon est conservée en vue d'une PCR, technique plus sensible, mais plus coûteuse, qui est pratiquée en cas de négativité de la microscopie. Un typage de la souche est aussi possible par une technique de biologie moléculaire, mais son résultat n'a pas le caractère officiel reconnu de la caractérisation isoenzymatique.

Dans les leishmanioses viscérales, les tests sérologiques classiques, comme l'immunofluorescence indirecte sur formes promastigotes, sont très rarement mis en défaut, sauf chez les patients très immunodéprimés. La positivité des tests classiques, associée aux signes cliniques de leishmaniose viscérale nous conduira à rechercher le parasite.

Pour cela, un prélèvement de sang périphérique peut suffire. À partir d'un tube de sang contenant du Citrate de Na, on réalise une leucocytocentrifugation qui est colorée au May-Grünwald Giemsa pour une recherche au microscope de formes amastigotes. D'autre part, une mise en culture est effectuée sur milieux spéciaux (NNN, Schneider) pour espérer la croissance de formes promastigotes en vue d'une caractérisation isoenzymatique. Un tube de sang contenant de l'EDTA, prélevé de façon concomitante, permet de pratiquer une PCR en cas de négativité de l'examen microscopique.

La recherche de leishmanies dans la moelle osseuse est parfois effectuée d'emblée, non précédée d'un prélèvement sanguin, parce que le clinicien veut écarter le diagnostic d'une hémopathie. Dans ce cas, la mise en évidence de formes amastigotes au microscope sur les frottis colorés au May-Grünwald Giemsa permettra d'affirmer le diagnostic de leishmaniose viscérale. La moelle osseuse reste le tissu le plus riche en leishmanies et

en cas de négativité de la microscopie, la négativité de la PCR permet d'exclure ce diagnostic.

Afin de permettre une culture et éventuellement une PCR, il est préférable de récupérer la moelle osseuse dans un tube contenant du citrate de Na, plutôt que de réaliser les frottis au lit du malade. Enfin, la PCR quantitative sur sang périphérique est utile pour suivre l'évolution thérapeutique du patient.

## Les drogues anti-leishmaniennes dans la leishmaniose viscérale.

J.-P. Gangneux

Laboratoire de parasitologie-mycologie, Faculté de médecine, 2 avenue du Professeur Léon-Bernard, CS 34317, 35043 Rennes Cedex, France. Tél. : (33) 2 23 23 44 90, fax : (33) 2 23 23 46 29, e-mail : jean-pierre.gangneux@univ-rennes1.fr

En dépit du nombre important de molécules ayant démontré une activité anti-leishmanienne *in vitro*, peu sont parvenues au stade de développement clinique pour le traitement de la leishmaniose viscérale (LV). Outre les dérivés pentavalents de l'antimoine (DPA) introduits en 1937 et qui constituent toujours une première ligne de traitement, seules l'amphotéricine B (désoxycholate ou liposomale), la miltéfosine, et l'aminosidine, représentent de véritables armes contre la LV.

Toutefois, des difficultés thérapeutiques persistent et leurs origines sont multifactorielles, à la fois liées au parasite, à l'hôte et aux drogues :

- les DPA (antimoniates de méglumine et stibogluconate de sodium), connus pour leur toxicité (stibio-intolérance et stibio-intoxication) ont désormais une efficacité franchement diminuée dans les foyers indien (région de Bihar notamment) et méditerranéen. Leur administration parentérale pendant 28 jours et la surveillance des effets secondaires imposent une hospitalisation coûteuse ;
- l'amphotéricine B désoxycholate est une alternative très efficace en cas de stibio-résistance, mais la toxicité rénale de la molécule limite l'adaptation de la posologie et sa tolérance ;
- plus récemment, l'arrivée de l'amphotéricine B liposomale a prouvé une excellente efficacité, associée à une excellente tolérance, grâce à la vectorisation de la molécule. Des posologies élevées de 3 à 10 mg/kg/injection sont possibles, permettant des protocoles d'administration de courte durée. Cette option thérapeutique largement utilisée sur le bassin méditerranéen chez l'adulte comme chez l'enfant, reste conditionnée par la nécessité d'une administration parentérale et par son coût ;
- la miltéfosine représente une avancée thérapeutique récente dans la LV, car elle est la seule drogue anti-leishmanienne disponible par voie orale. Elle s'administre pendant 28 jours, ce qui peut limiter son observance, et environ un quart des adultes et enfants traités rapportent des diarrhées et/ou vomissements ;
- la paramomycine injectable, validée pour son efficacité et sa tolérance dans plusieurs essais, constitue une alternative dont le développement est soutenu par plusieurs organisations non gouvernementales. Non disponible en Europe, cette drogue pourrait à terme représenter un traitement peu coûteux pour de nombreux pays en voie de développement.

Afin d'envisager l'optimisation de la prise en charge thérapeutique des LV, nous détaillerons pour l'ensemble de ces drogues, les données récentes sur les cibles d'action, les mécanismes de résistance et les profils de tolérance, permettant d'envisager l'intérêt des associations. La complémentarité de l'action anti-parasitaire et la possibilité de diminuer les effets secondaires, via une diminution des posologies, laissent

envisager de nouveaux protocoles prometteurs. En parallèle, le rôle d'un éventuel effet immunomodulateur des molécules, en plus de l'action leishmanicide directe, sera également analysé. Nous les comparerons et évaluerons leur bénéfice direct dans le traitement de la LV du patient immunodéprimé, notamment au cours de la co-infection VIH-*Leishmania*.

## Le traitement de la leishmaniose viscérale due à *Leishmania infantum* en Europe : traitement d'attaque et prophylaxie secondaire.

É. Rosenthal

Service de médecine interne, Centre hospitalier universitaire de Nice, Groupe hospitalier Archet, BP 3079, 06202 Nice cedex 3. E-mail : rosenthal.e@chu-nice.fr

Pendant plus de 60 ans, l'antimoine pentavalent a été considéré comme le traitement de référence de la leishmaniose viscérale (LV). L'apparition de souches de *Leishmania* résistantes aux antimoine a conduit à évaluer des traitements alternatifs, tels que l'amphotéricine B (AmB) et ses formulations lipidiques. Comparée aux traitements classiques, l'AmB liposomale a un rapport efficacité/tolérance et un profil coût/efficacité qui sont tous deux favorables. Treize essais cliniques, pour la plupart des études ouvertes de recherche de dose, ont étudié l'AmB liposomale dans le traitement de la LV. Dans la forme méditerranéenne à *Leishmania infantum*, chez les patients non infectés par le VIH, une dose totale (DT) de l'ordre de 20 mg/kg permet des taux de guérison > à 95 % (1). Plusieurs schémas d'administration sont utilisés en Europe, le plus classique consistant en 6 perfusions unitaires de 3 mg/kg/jour de J<sub>1</sub> à J<sub>5</sub>, puis à J<sub>10</sub>. Chez l'enfant, une courte série a montré que 2 perfusions unitaires de 10 mg/kg/jour J<sub>1</sub> et J<sub>2</sub> permettaient une régression des symptômes plus rapide qu'avec la même DT répartie sur 5 jours, sans toxicité rénale notable (8). Ce schéma, adopté par de nombreux pédiatres, est également proposé chez l'adulte (5), un comité d'experts réunis sous l'égide de l'OMS recommandant sa validation chez ces derniers (1). Chez les patients infectés par le VIH, l'utilisation des traitements antirétroviraux modernes a permis une nette régression de l'incidence de la LV (2) et du risque de rechute chez les patients en succès viro-immunologique. Chez les patients dont le taux des lymphocytes CD4 reste bas, comme chez les patients présentant une autre cause d'immunodépression, une prophylaxie secondaire est souhaitable bien que le niveau de preuve en faveur de cette attitude soit faible. Les données cliniques concernant les dérivés lipidiques de l'amphotéricine B sont peu nombreuses, l'AmB liposomale constituant la prophylaxie secondaire la plus attractive compte tenu de sa diffusion tissulaire élevée et de son profil de toxicité favorable (6, 7). L'AmB liposomale constitue aujourd'hui dans plusieurs pays d'Europe le traitement de première intention de la LV, en traitement d'attaque (3, 4) et en prophylaxie secondaire chez les patients immunodéprimés. Ses modalités d'utilisations doivent être précisées.

### Références

1. BERN C, ADLER-MOORE J, BERENQUER J, BOELAERT M, DEN BOER M *et al.* – Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, 2006, **43**, 917-924.
2. DEL GIUDICE P, MARY-KRAUSE M, PRADIER C, GRABAR S, DELLAMONICA P *et al.* – Impact of highly active antiretroviral therapy on the incidence of visceral leishmaniasis in a French cohort of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*, 2002, **186**, 1366-1370.
3. GRADONI L, GRAMICCIA M & SCALONE A – Visceral leishmaniasis treatment, Italy. *Emerg Infect Dis*, 2003, **9**, 1617-1620.
4. GRADONI L, SOTERIADOU K, LOUZIR H, DAKKAK A, TOZ SO *et al.* – Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. *Trop Med Int Health*, 2008, **13**, 1272-1216.
5. JEANDEL PY, MARTY P, ROGER P, FUZIBET JG, ROSENTHAL E – Amphotéricine B liposomale en cure courte dans le traitement de la leishmaniose viscérale méditerranéenne de l'adulte non immunodéprimé. *Rev Med Interne*, 2007, **28**, 44-45.
6. LÓPEZ-VÉLEZ R, VIDELA S, MÁRQUEZ M, BOIX V, JIMÉNEZ-MEJÍAS ME *et al.* – Amphotericin B lipid complex versus no treatment in the secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother*, 2004, **53**, 540-543.
7. MOLINA I, FALCÓ V, CRESPO M, RIERA C, RIBERA E *et al.* – Efficacy of liposomal amphotericin B for secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother*, 2007, **60**, 837-842.
8. SYRIOPOULOU V, DAIKOS GL, THEODORIDOU M, PAVLOPOULOU I, MANOLAKI AG *et al.* – Two doses of a lipid formulation of amphotericin B for the treatment of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, 2003, **36**, 560-566.

## Stratégies de traitement des leishmanioses cutanées du nouveau Monde dans le Service de santé des Armées.

E. Lightburne

Service de dermatologie, HIA Laveran, Marseille Armées

Les auteurs rapportent leur connaissance des leishmanioses cutanées du nouveau Monde qu'ils rencontrent chez les militaires séjournant en Guyane française.

Il s'agit de lésions cutanées localisées à *Leishmania guyanensis* le plus souvent, mais également à *L. braziliensis*, connue pour pouvoir donner à long terme une forme cutanéomuqueuse délabrante. La prévalence réelle de *L. braziliensis* sera mieux connue au décours d'une enquête prospective concernant tous les cas recensés avec recherche parasitaire systématique sur échantillon biopsique. L'obtention beaucoup plus rapide du diagnostic parasitaire par les nouvelles techniques d'identification moléculaire a des conséquences sur le choix du traitement de deuxième intention en cas d'échec du traitement initial par isethionate de pentamidine.

Les auteurs discutent les différentes options thérapeutiques à la lumière de leur expérience et des développements thérapeutiques récents.

Les leishmanioses tégumentaires sont des protozooses transmises par des petits moucheron, les phlébotomes, et dont les présentations cliniques extrêmement diverses ont en commun de ne pas gratter, de ne pas faire mal, d'évoluer de façon chronique avec une tendance à s'ulcérer et à disséminer. Les différentes espèces de leishmanies ont des caractéristiques extrêmement diverses en termes de répartition géographique, de cycle épidémiologique, de caractères antigéniques et moléculaires, de pathogénicité et de sensibilité aux rares traitements disponibles, toujours toxiques (3, 8).

Les enquêtes épidémiologiques, les progrès du diagnostic biologique et l'apparition de nouvelles molécules actives sont donc régulièrement à l'origine de publications et de mises au point (2, 9), et ont entraîné ces dernières années une profonde modification des prises en charge, notamment à l'occasion « d'épidémies » récentes, touchant des militaires séjournant en zone d'endémie, comme les Américains en Irak (19).

Les leishmanioses tégumentaires font l'objet d'une déclaration épidémiologique dans les armées françaises et l'implication des médecins d'unité se fait à tous les niveaux dans la prévention, le diagnostic et le traitement.

La Guyane française constitue un lieu privilégié où se rencontrent les principales préoccupations des médecins militaires français concernant les leishmanioses tégumentaires. Ils peuvent être amenés à en rencontrer sur d'autres théâtres opérationnels, en Afghanistan, à Djibouti ou au Tchad par exemple, mais les espèces de leishmanies en cause poseront moins de problèmes thérapeutiques.

En Guyane française, les espèces de leishmanies sont essentiellement représentées par *L. guyanensis* à plus de 90 %, mais aussi *L. braziliensis* avec une fréquence estimée inférieure à 5 % sur des données épidémiologiques antérieures à 1985 (5). En 15 ans de surveillance épidémiologique dans les armées, l'identification parasitaire n'a jamais dépassé 10 % des cas recensés, le plus souvent traités sur le territoire guyanais, mais le faible nombre de cas de *L. braziliensis* ne remettait pas en cause ces anciennes données (10). Plus récemment, 5 cas de *L. braziliensis* ont été reconnus chez nos militaires en 2003 pour une vingtaine de cas de *L. guyanensis* sur la même période. Il n'est pas licite de parler de recrudescence en termes statistiques sur une aussi faible représentation, mais un débat ancien est à nouveau relancé concernant la prévalence réelle de *L. braziliensis* en Guyane française (4, 6).

Comme dans d'autres pays du nouveau Monde, la problématique de la leishmaniose tégumentaire est liée à la gravité potentielle de l'affection quand *L. braziliensis* est en cause (risque de forme cutanéomuqueuse destructrice à type d'ulcération centrofaciale jusqu'à 30 ans après la guérison apparente d'une forme cutanée localisée), d'où la nécessité communément admise d'un traitement systémique quand on n'est pas certain de l'espèce (2, 3, 8, 9).

L'apparition de nouvelles techniques diagnostiques toujours en cours de validation par le centre national de référence de Montpellier du Pr DEDET a cependant déjà des conséquences sur notre prise en charge thérapeutique. L'identification moléculaire est en effet obtenue en une dizaine de jours, soit un délai diagnostique de 2 à 4 semaines en comptant le temps d'obtention de l'isolat en culture et/ou d'acheminement alors que l'identification isoenzymatique prend toujours 3 à 4 mois (15).

Notre attitude actuelle est l'obtention d'une identification parasitaire pour l'ensemble des cas militaires recensés de leishmaniose tégumentaire en Guyane grâce à la mise en place d'une stratégie d'envoi de prélèvements biopsiques au centre de référence.

Il n'est cependant pas question d'attendre le résultat de l'identification pour débiter sur place le traitement de première intention afin de ne pas augmenter le risque d'échec de la première cure d'isethionate de pentamidine. Lors de la dernière « épidémie » en milieu militaire (326 cas traités lors de la « saison leishmanienne » 1998-1999), il est apparu évident que les meilleurs résultats thérapeutiques dans le groupe traité en Guyane française, par rapport au groupe traité en métropole, étaient la conséquence directe d'un délai de prise en charge thérapeutique plus court sur place qu'au retour de Guyane (11). Cette considération rejoint d'ailleurs la constatation d'une baisse d'efficacité quand il existe déjà des signes de dissémination intradermique autour des lésions cutanées (12). Nous ne remettons pas en cause le choix de la pentamidine comme traitement de première intention en Guyane, compte tenu de son efficacité sur l'espèce prédominante *L. guyanensis* (14), mais notre expérience nous a conduit à respecter les protocoles AMM du Pentacarinat® à 4 mg/kg/injection et à préconiser la voie IV pour des raisons de meilleure tolérance et d'une efficacité similaire. Aucun cas de rhabdomyolyse n'a été noté chez les 25 patients traités par ce nouveau protocole depuis 2000 dans les HIA Clermont-Tonnerre (Brest), Legouest (Metz), Sainte-Anne (Toulon) et Laveran (Marseille), contrairement à une série antérieure où la pentamidine était administrée à plus forte dose et par voie IM (11).

Jusqu'en 2003, l'attitude de rigueur devant l'échec d'une première cure (aggravation à 6 semaines, récurrence ou non résolution des lésions dans un délai de 3 mois) était la réalisation systématique d'une deuxième cure aux mêmes doses (11, 14). La connaissance de l'espèce parasitaire dans l'intervalle rend beaucoup plus discutable cette attitude univoque. L'identi-

cation de l'espèce va en effet avoir une incidence sur le choix du traitement de deuxième intention.

S'il s'agit de *L. braziliensis*, réputée moins sensible aux sels de pentamidine (14), les dérivés stibiés (Glucantime®) s'imposent comme la référence OMS à la dose de 20 mg SbV/kg/j/20j mais les effets indésirables obligent souvent à interrompre la cure avant son terme ou à en diminuer les doses quotidiennes (2-4). L'amphotéricine B liposomale peut constituer une alternative avec des résultats qui semblent meilleurs pour Ambisome® que pour Abelcet®, probablement pour des raisons pharmacocinétiques (16, 20). Dans notre expérience, la tolérance a été excellente avec un protocole utilisé pour la leishmaniose viscérale dose totale de 18 mg/kg en 6 perfusions (J<sub>1-5</sub> et J<sub>10</sub>) et les résultats encourageants en terme d'efficacité sur *L. braziliensis* : 3 patients traités avec guérison des 2 patients infectés par *L. braziliensis* et échec pour le patient infecté par *L. guyanensis*.

S'il s'agit de *L. guyanensis*, le choix se portera sur une deuxième cure de pentamidine, puisque les dérivés pentavalents de l'antimoine semblent moins efficaces sur cette espèce (17), mais il est possible d'avoir dans un futur proche d'autres alternatives dans cette situation : un imidazole comme le kétoconazole par exemple ayant jusque-là montré son efficacité dans le nouveau Monde sur *L. (V) panamensis* et *L. (L) mexicana* (13); un agent antitumoral, la miltefosine, utilisé avec succès dans la leishmaniose viscérale et qui montre son efficacité sur certaines espèces (*L. panamensis* en Colombie – mais pas sur *L. braziliensis*) et une tolérance acceptable avec une élévation minime de la créatinine, des nausées et en moyenne 1 à 2 vomissements par cure à la dose de 2,5 mg/kg/j/28j (18). Enfin, il ne nous paraît pas illicite de s'abstenir d'un traitement systémique avec *L. (V) guyanensis* devant une ou deux lésions isolées persistantes accessibles à des injections locales de Glucantime®, voire à un traitement topique par paromomycine si l'on en dispose (1). Nous mettons à ce propos en place en coopération avec les forces armées américaines (WRAIR) un essai de phase III contrôlé et randomisé d'un topique à base de gentamycine et paromomycine (WR279396), pour évaluer son efficacité dans les leishmanioses cutanées contractées en Guyane par nos militaires vs. traitement de référence (pentamidine IV 4 mg/kg/j injectée à J<sub>1</sub>, J<sub>3</sub>, J<sub>5</sub>). En accord avec d'autres auteurs, nous pensons que les traitements locaux peuvent retrouver une place dans les leishmanioses cutanées du nouveau Monde non liées à *L. braziliensis*, en l'absence de signes de dissémination (2, 3).

## Références

1. ARANA BA, MENDOZA CE, RIZZO NR & KROEGER A – Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, **65**, 466-470.
2. BERMAN J – Recent developments in leishmaniasis : epidemiology, diagnosis and treatment. *Curr Infect Dis Rep*, 2005, **7**, 33-38.
3. BUFFET P, CAUMES É & GENTILINI M – Traitement des leishmanioses cutanées localisées. *Ann Dermatol Vénéréol*, 1994, **121**, 503-511.
4. COURTOIS D, COURRIER P-L, THIERRY J, PELLETIER J & BOUTET B – Isolement de *Leishmania braziliensis braziliensis* chez des militaires français opérant en Guyane. *Médecine et armées*, 1988, **16**, 331-333.
5. DEDET JP – Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: a review. *Am J Trop Med Hyg*, 1990, **43**, 25-28.
6. DEDET JP, PRATLONG F, MARTINI A, LEFEBVRE M & DEREURE O – *Leishmania (Viannia) braziliensis* en Guyane française : une réalité à prendre en considération. *Nouv Dermatol*, 1994, **13**, 188-189.
7. DIMIER-DAVID L, VALDA L, INOFUENTES A, MALLEA F, DAVID C, DEDET JP – Traitement de la lésion cutanée primaire de la leishmaniose à *Leishmania braziliensis braziliensis* : échec de l'iséthionate de pentamidine. *Med Mal Infect*, 1992, **22**, 1183-1189.
8. GREVELINK SA & LERNER EA – Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*, 1996, **34**, 257-272.
9. HEPBURN NC – Cutaneous leishmaniasis: current and future

- management. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2003, **1**, 563-570.
10. LIGHTBURN E, MEYNARD JB, MORAND JJ, GARNOTEL E, KRAEMER P *et al.* – Surveillance épidémiologique des leishmanioses tégumentaires en Guyane. Synthèse de données civiles et militaires sur 10 ans. *Méd Trop*, 2002, **62**, 545-553.
  11. LIGHTBURN E, MORAND J-J, MEYNARD J-B, KRAEMER P, CHAUDIER B *et al.* – Thérapeutique des leishmanioses tégumentaires du Nouveau Monde. Expérience à propos de 326 cas traités par iséthionate de pentamidine à fortes doses – *Méd Trop*, 2003, **63**, 35-44.
  12. NACHER M, CARME B, SAINTE MARIE D, COUPPIÉ P, CLYTI E *et al.* – Influence of clinical presentation on the efficacy of a short course pentamidine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol*, 2001, **95**, 331-336.
  13. NAVIN TR, ARANA BA, ARANA FE, BERMAN JD, CHAJÓN JF – Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *J Infect Dis*, 1992, **165**, 528-534.
  15. PRADINAUD R – Le traitement de la leishmaniose tégumentaire par la pentamidine en Guyane Française. *Méd Trop*, 1994, **54**, 418-422.
  16. PRATLONG F, MARTINI A, LAMBERT M, LEFEBVRE M, DEDET JP & RIOUX JA – Intérêt de la culture et de l'identification isoenzymatique des leishmanies dans le diagnostic et l'épidémiologie des leishmanioses. *Médecine et armées* 1994, **22**, 61-65.
  17. RAPP C, IMBERT P, DARIE H, SIMON F, GROS P *et al.* – Traitement par amphotéricine B liposomale d'une leishmaniose cutanée contractée à Djibouti et résistant à l'antimoniate de meglumine. *Bull Soc Pathol Exot*, 2003, **96**, 209-211. [<http://www.pathexo.fr/pages/articles/2003/2003-T96-3/DK67.html>]
  18. ROMERO GA, GUERRA MV, PAES MG & MACEDO VO – Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, **65**, 456-465.
  14. SOTO J, ARANA BA, TOLEDO J, RIZZO N, VEGA JC *et al.* – Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, 2004, **38**, 1266-1272.
  19. WEINA PJ, NEAFIE RC, WORTMANN G, POLHEMUS M & ARONSON NE – Old World leishmaniasis: an emerging infection among deployed US military and civilian workers. *Clin Infect Dis*, 2004, **39**, 1674-1680.
  20. YARDLEY V & CROFT SL – A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents*, 2000, **13**, 243-248.

## Diagnostic biologique et surveillance des leishmanioses à Cayenne (Guyane française).

### B. Carme

Laboratoire hospitalo-universitaire de parasitologie-mycologie (LHUPM), Centre hospitalier de Cayenne, Équipe UPRES EA 3593, Faculté de médecine des Antilles et de la Guyane.

Pour le diagnostic et la surveillance des leishmanioses, le laboratoire hospitalo-universitaire de parasitologie-mycologie (LHUPM) du centre hospitalier de Cayenne a mis en place depuis 2006 un dispositif (qui nous paraît) performant : large recours à la culture, diagnostic par PCR temps réel et détermination des espèces parasitaires par technique PCR-RFLP.

### Pour les leishmanioses cutanées

Outre l'examen par microscopie directe sur des étalements colorés au MGG de produits de lésions, une culture sur milieu RPMI (suivi de 28 jours) est réalisée systématiquement lorsque nous pouvons obtenir un prélèvement biopsique effectué avec une pince emporte-pièce pour biopsie dermique de 3 mm (« *biopsy punch* »). Les cultures ont 3 objectifs :

- améliorer la sensibilité du dépistage par l'obtention de confirmation diagnostique, alors que l'examen direct s'est avéré négatif ou non interprétable. Les étalements insuffisamment riches en cellules sont relativement fréquents. En effet, les prélèvements sont habituellement réalisés dans des services non spécialisés, souvent dans des centres de santé en région enclavée où les possibilités de contrôles sont difficiles. Pour

- la période janvier à septembre 2008, la culture a permis de « récupérer » 28 cas sur 78 confirmés à l'examen direct pour un total d'examen associant les 2 techniques de 135 (1);
- déterminer avec 100 % de réussite l'espèce en cause en ayant recours à une technique PCR-RFLP avec extraction de l'ADN parasitaire à partir du milieu de culture (5);
- recueillir des souches de leishmanies et les conserver dans l'azote liquide en vue d'expertises complémentaires.

La technique PCR-RFLP utilisée a une rentabilité légèrement inférieure lorsque l'on utilise un fragment biopsique ou le raclage d'un étalement sur lame pour la réalisation de la technique PCR-RFLP (6). Mais le recours à ces prélèvements est utile en l'absence de culture afin de pouvoir déterminer l'espèce de leishmanie en cause pour le maximum de cas dépistés. En effet, préciser l'espèce même en cas de présentation clinique bénigne est primordial en Guyane, tant à titre de diagnostic individuel que dans le cadre de la surveillance des leishmanioses cutanées. En effet, la présence de *Leishmania braziliensis* paraît se renforcer avec le risque de formes cutanées et muqueuses sévères, ces atteintes pouvant être retardées après une infection cutanée initiale banale. En présence de cette espèce, les modalités thérapeutiques diffèrent du schéma préconisé pour les atteintes dues à *L. guyanensis* ou *L. amazonensis*, et la surveillance après traitement doit être prolongée en prévenant le patient du risque de récurrence tardive.

Ce protocole a permis de préciser les proportions respectives des différentes espèces de leishmanies impliquées en Guyane dans les atteintes cutanées et/ou muqueuses et permettra de suivre leur évolution dans le temps. Les données classiques, habituellement rapportées, font état de la présence de *L. guyanensis*, espèce « bénigne », dans plus de 95 % des cas, laissant peu de place aux autres espèces (3).

Nos résultats plus récents sont différents. Pour 158 déterminations concluantes au cours de la période janvier 2007-juin 2008, les pourcentages d'infection étaient respectivement de 84,8 % pour *L. guyanensis*, 8,2 % pour *L. braziliensis* (ce qui correspondait à 13 cas), 5,1 % pour *L. amazonensis* et 1,9 % pour *L. lansoni*. Au LHUPM, les travaux concernant les cultures de leishmanies et la manipulation des souches se font désormais dans un secteur de sécurité de type NSB3 répondant ainsi aux normes officielles dans la mesure où *L. brasiliensis* est un germe classé en catégorie 3.

### Pour les leishmanioses viscérales

Rappelons que cette forme de leishmaniose n'est pas considérée comme endémique en Guyane. Toutefois sa présence dans les pays voisins, en particulier au Brésil est préoccupante compte tenu de la circulation des hommes et des animaux dans la région. De plus, un cas humain (*a priori* importé) chez un sujet VIH+ (2) et deux cas chez des chiens (4), dont un était importé d'Espagne (une chienne) et le second, plus jeune, né à Cayenne, mais en contact étroit avec le premier, ont été diagnostiqués au LHUPM 2006 et 2007. Pour ces 3 cas, il s'agissait de *L. infantum*.

Une surveillance est par conséquent nécessaire. Depuis cette année (2008), la recherche de leishmanies par PCR en temps réel est devenue systématique au centre hospitalier de Cayenne pour tous les patients VIH+ présentant un tableau infectieux avec localisation viscérale. De plus, nous effectuons à titre d'expertise une recherche par PCR chez les chiens suspects d'être atteints de leishmaniose par nos correspondants vétérinaires.

### Références

1. CARME B, SIMON S & COUPPIÉ P – Apport de la culture au diagnostic des leishmanioses cutanées en Guyane. V<sup>e</sup> réunion du comité local de la SPE Antilles-Guyane, 30-31 octobre 2008, Cayenne. *Bull Soc Pathol Exot*, 2009, in press.

2. DEMAR-PIERRE M, EPELBOIN L, CHESNAIS C, BLANCHET D, HAMICHE K, AZNAR C, CARME B, DJOSSOU F – Premier cas humain de leishmaniose viscérale à *L. infantum* diagnostiqué en Guyane. Communication affichée lors du Centenaire de la SPE, 20 juin 2008, Paris. *Bull Soc Pathol Exot*, 2008, 101, 267-268.
3. ROTUREAU B, COUPPIÉ P, NACHER M, DEDET JP & CARME B – Les leishmanioses cutanées en Guyane Française. *Bull Soc Pathol Exot* 2007, 100, 251-260. [http://www.pathexo.fr/pages/articles/2007/2007-T100-4/2989.html]
4. ROTUREAU B, RAVEL C, AZNAR C, CARME B & DEDET JP – First report of *Leishmania infantum* in French Guiana: canine visceral leishmaniasis imported from the Old World. *J Clin Microbiol*, 2006, 44, 1120-1122.
5. SIMON S & CARME B – Diagnostic et surveillance des espèces de leishmanies en Guyane par une technique de PCR-RFLP. (non publié)
6. SIMON S & CARME B – Leishmaniose cutanée : diagnostic et détermination de l'espèce parasitaire à partir de prélèvements anciens réalisés pour un diagnostic de routine. (non publié)
3. MORIZOT G, DELGIUDICE P, CAUMES E, LAFFITTE E, MARTY P et al. – Healing of Old World cutaneous leishmaniasis in travelers treated with fluconazole: drug effect or spontaneous evolution? *Am J Trop Med Hyg*, 2007, 76, 48-52.
4. TUON FF, AMATO VS, GRAF ME, SIQUEIRA AM, NICODEMO AC & AMATO NETO V – Treatment of New World cutaneous leishmaniasis—a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol*, 2008, 47, 109-124.

## Traitement topique de la leishmaniose cutanée due à *Leishmania major* par crèmes à base d'aminosides.

P. Buffet

Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière & Institut Pasteur, Paris, France.

La majorité des patients pris en charge pour une leishmaniose cutanée en France métropolitaine ont été contaminés en Afrique (Maghreb, Sahel), où *L. major* prédomine. L'administration intra-lésionnelle de dérivés pentavalents de l'antimoine (associée ou non à une cryothérapie superficielle) est contraignante chez l'adulte, souvent difficile à réaliser chez l'enfant. De nombreuses modalités thérapeutiques ont été évaluées ou sont en cours d'évaluation dans le traitement de la leishmaniose cutanée de l'Ancien Monde, mais seuls le fluconazole oral, la photothérapie dynamique et les formulations d'aminosides topiques ont été considérés comme d'efficacité validée dans une revue systématique récente (2). Le fluconazole a donné des résultats moins convaincants en France qu'en Arabie saoudite (3) et la photothérapie dynamique requiert un équipement qui n'est pas encore largement disponible. Depuis la première utilisation clinique de la paromomycine topique dans la leishmaniose cutanée (1) plus de 20 essais comparatifs comportant au moins un bras paromomycine topique ont été publiés (4). Ces données peuvent être résumées en 3 points :

- les formulations contenant du chlorure de méthylbenzéthonium (formulations de 1<sup>re</sup> génération) sont en général efficaces, contrairement à la plupart des formulations n'en contenant pas (2<sup>e</sup> génération);
- les réactions cutanées locales sont généralement plus fréquentes et plus intenses avec les formulations de 1<sup>re</sup> génération;
- la paromomycine systémique est inefficace. Une formulation de 3<sup>e</sup> génération ne contenant pas de chlorure de méthylbenzéthonium (WR279396) est en cours de développement.

L'efficacité a été supérieure au placebo dans une étude de phase 2 (essentiellement pédiatrique) franco-tunisienne. Une étude de phase 3 est en cours en Tunisie. L'objectif est une mise sur le marché, dans un avenir raisonnablement proche, ce qui simplifierait la prise en charge thérapeutique de la leishmaniose cutanée à *L. major*, tant chez les patients vivant en zone d'endémie que chez les voyageurs.

## Références

1. AKOVBYAN AA & MUKHAMEDOV SM – Treatment of cutaneous leishmaniasis of the acute necrotizing type (Borovsky disease) with monomycin. *Vestn Dermatol Venerol*, 1968, 42, 74-76.
2. GONZÁLEZ U, PINART M, REVEIZ L & ALVAR J – Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2008, CD005067.

## Traitement de la leishmaniose cutanée due à *L. guyanensis* par la pentamidine.

P. Couppié

Université des Antilles et de la Guyane et CHG de Cayenne, Guyane, France.

Nos connaissances concernant la leishmaniose cutanée (LC) à *L. guyanensis* sont les suivantes : le risque de leishmaniose cutanéomuqueuse est faible, mais non nul; l'atteinte cliniquement décelable d'un ganglion et/ou d'un vaisseau lymphatique est constatée chez environ 40 % des patients; la durée moyenne de guérison spontanée n'a jamais été étudiée, mais dépasse probablement les 6 mois, voire un an. En conséquence, un traitement par voie générale est actuellement classiquement recommandé.

En pratique, le choix dans l'utilisation d'un des traitements disponibles doit tenir compte des éléments suivants : épidémiologie parasitaire locale; caractéristiques des populations humaines infectées; niveau de performance du laboratoire concernant le diagnostic de genre, voire d'espèce; efficacité du traitement vis à vis de *L. guyanensis*; simplicité d'administration du traitement; simplicité de la surveillance sous traitement; fréquence et sévérité potentielle des effets secondaires; coût de la prise en charge thérapeutique.

L'évaluation de thérapeutiques de la LC due à *L. guyanensis* concerne essentiellement 2 familles de molécules : l'antimoniote de méglumine-Glucantime® et les pentamidines; mésylate de pentamidine-Lomidine® et iséthionate (ou diiséthionate) de pentamidine-Pentacarinat®. Les essais thérapeutiques sont cependant très peu nombreux et de niveau de preuve moyen. Un essai relativement récent concerne le Glucantime®; les résultats sont décevants (de l'ordre de 26 % de guérison après une cure de 20 j à 20 mg SbV/kg/j IM ou IV dans l'état d'Amazonas au Brésil). Quatre essais concernent la pentamidine seule avec des modalités de traitement variables. Le taux de guérison après une cure varie de 67 % à 95 %.

En pratique, le Pentacarinat® est actuellement privilégié comme traitement de première intention en Guyane par les équipes médicales locales, car *L. guyanensis* y est largement majoritaire. Les effets secondaires sont moins graves qu'avec le Glucantime® et l'efficacité sur cette espèce semble supérieure. Le traitement minute par voie IM (7 mg/kg) est également privilégié, car il semble aussi efficace que d'autres schémas thérapeutiques plus longs. Le système de santé devant couvrir une faible population (200 000 habitants), répartie sur un territoire vaste comme le Portugal, il paraît important de privilégier un traitement simple et rapide qui ne nécessite que peu ou pas d'examen complémentaires, les populations concernées étant par ailleurs particulièrement mobiles (orpailleurs, populations des fleuves, immigrants). Le même type d'approche thérapeutique a été privilégié au Surinam et dans l'état d'Amazonas au Brésil.

Cependant un traitement moins agressif et non injectable reste à trouver pour améliorer la prise en charge de nos patients car les effets secondaires de la pentamidine peuvent être relativement importants.

## Traitement de la leishmaniose cutané-muqueuse due à *Leishmania braziliensis*.

J.-P. Dedet

Université Montpellier-I et CHU de Montpellier. Centre national de référence des *Leishmania*. 163, rue Auguste-Broussonet, 34090 Montpellier, France.

La leishmaniose cutané-muqueuse (LCM) ou « *espundia* » est une entité nosologique particulière du nouveau Monde. Due principalement à l'espèce *Leishmania braziliensis*, elle est largement répandue du sud du Mexique au nord de l'Argentine.

Cette affection évolue en deux temps : une primo invasion cutanée pouvant être ultérieurement suivie par une atteinte muqueuse secondaire. L'atteinte cutanée initiale n'est pas différente des lésions de leishmaniose cutanée localisée et son évolution se fait en général vers la guérison spontanée. La guérison de la (ou des) lésion(s) cutanée(s) une fois acquise, l'infection leishmanienne reste quiescente pendant une durée variable, pouvant être très longue (de 1 à plus de 40 ans), voire durer toute la vie du sujet.

L'atteinte muqueuse, lorsqu'elle se produit, débute à la muqueuse nasale. La muqueuse buccale peut ensuite être atteinte. L'extension au pharynx et au larynx s'accompagne de dysphonie et de toux métallique. La dysphagie et la gêne à l'alimentation retentissent gravement sur l'état général du patient. Une obstruction aiguë peut se produire. Les nécroses et les mutilations qui apparaissent dans les stades avancés sont particulièrement graves. Elles se traduisent par d'importantes pertes de substance, avec des mutilations faciales au fort retentissement socio-psychologique.

Le traitement de la lésion cutanée primaire s'impose pour éviter si possible la diffusion des parasites vers les muqueuses faciales. Toutefois, il a été montré qu'un traitement bien conduit n'empêchait pas la survenue d'une atteinte muqueuse secondaire. Le traitement recommandé est encore l'antimoniote de méglumine, à la dose de 20 mg SbV/kg/jour pendant 20 jours.

Le traitement des atteintes muqueuses doit être aussi précoce que possible afin d'éviter l'apparition des mutilations. Les antimoniés s'utilisent à la même dose, en cure de 28 jours. Le taux de guérison obtenu varie de 51 % pour le stibogluconate de sodium à 88 % avec l'antimoniote de méglumine. L'amphotéricine B déoxycholate est couramment employée dans les cas avancés ou chez les non répondeurs au traitement antimonié. Elle est parfois même employée en première intention lors de campagnes de masse. La guérison peut être obtenue à partir de 1 g, mais une dose plus élevée (2 à 3 g) est en général nécessaire. Des observations préliminaires montrent l'efficacité de l'amphotéricine B liposomale et de la miltéfosine dans les atteintes muqueuses secondaires de la LCM. Des études complémentaires sont nécessaires pour valider ces résultats. Les cas de résistance à l'amphotéricine B semblent exister, bien que peu d'observations documentées n'existent sur ce sujet.

## Vision stratégique pour le contrôle des leishmanioses.

J. Alvar & J. Jannin

OMS (Neglected Tropical Diseases, Innovative and Intensified Disease Management, Leishmaniasis Control Programme), Genève, Suisse.

À l'instar d'autres maladies tropicales négligées (NTD), la leishmaniose n'est pas perçue comme une menace pour la sécurité internationale. Cependant le contrôle de la maladie pourrait contribuer à accomplir les objectifs du millénaire, puisqu'elle est associée au maintien de la pauvreté, la marginalisation et l'iniquité. Plus que d'autres NTDs, la leishmaniose manque d'attention.

En ce qui concerne la construction d'un cadre politique, l'Assemblée générale de la santé a approuvé la résolution WHA/2007/60/13 concernant l'élaboration des plans stratégiques pour le développement et l'implémentation des mesures de prévention, dans le but d'atteindre l'élimination des certaines formes de leishmanioses. Ce cadre politique devrait entraîner une prise de conscience de la part des gouvernements, donateurs et organisations.

Cependant en plaidoyer, il faudrait remplacer les anciennes estimations par des systèmes de surveillance fiables qui serviront à déterminer la charge de la maladie en termes de mortalité et morbidité. Afin d'améliorer la qualité de l'information, de déterminer l'ampleur du problème, et d'entreprendre des activités de sensibilisation, le programme de contrôle de la leishmaniose mène des réunions à des niveaux régionaux, qui seront complétées par la formulation des stratégies régionales. L'information par pays mise à jour et les programmes régionaux contribueront à élaborer un profil de la maladie qui servira comme document de base pour les activités de sensibilisation.

Le panel d'experts se réunira en 2009 pour réviser la série de rapports techniques de l'OMS sur le contrôle, afin de mettre à jour les stratégies globales de contrôle, une série de méta-analyses réalisées sur les outils de contrôle et l'information épidémiologique. De plus, la création d'une « force de frappe globale », responsable de promouvoir le Programme global, parmi les politiciens et donateurs sera visée.

À l'heure actuelle, presque 2 millions des patients souffrent de la maladie chaque année. Des épidémies de leishmaniose cutanée et viscérale surviennent régulièrement, en particulier sur la Corne de l'Afrique et en Asie. Le nombre de cas de co-infection HIV-*Leishmania* augmente chaque année et beaucoup des patients n'ont pas accès aux traitements à cause de problèmes de stocks, prix ou de réglementation d'importation au niveau national. D'importantes réductions dans les coûts des médicaments sont en cours de négociations avec les entreprises et les donateurs pour des médicaments comme le Glucantime®, AmBisome® and Miltefosine®. Pour une meilleure prise en charge, des essais cliniques avec de nouveaux régimes sont aussi en cours de réalisation par des agences de recherche et des institutions académiques. Les premiers résultats sont très encourageants.

# Pentamidine et miltefosine pour le traitement des leishmanioses chroniques chez l'adulte VIH-1 recevant un traitement antirétroviral efficace

MAKINSON A., LE MOING V., FONTAINE C., RAVEL C., LE FALHER G., REYNES J.

## Introduction

La leishmaniose viscérale (LV) à *L. Infantum* est une infection opportuniste fréquente au cours de l'infection par le VIH dans le Sud de l'Europe où coexistent les deux épidémies. Les principaux facteurs de risque sont l'immunodépression (TCD4<300/mm<sup>3</sup>) et un antécédent de toxicomanie intra-veineuse [1]. Le traitement de référence est l'amphotéricine B et la restauration immunitaire par CART (Combinaison Antirétroviral Therapy) [2,3]. L'amphotéricine B peut être administrée en prophylaxie secondaire toutes les 3 semaines après le traitement d'attaque [3].

Les LV chroniques sont définies par des poussées récidivantes de LV. Lorsqu'elles surviennent chez des patients VIH avec charge virale (CV) VIH indétectable sous CART, la prise en charge peut être problématique : l'immunité cellulaire restituée semble insuffisante et l'amphotéricine B au long cours présente des effets toxiques inacceptables. Nous décrivons ici la prise en charge de 4 cas de LV chronique à *L. Infantum* chez des sujets infectés par le VIH-1 avec CV indétectable et proposons une prise en charge séquentielle par pentamidine puis miltefosine.

## Méthodes

Étude rétrospective observationnelle de tous les patients VIH de notre service avec des poussées récidivantes de LV malgré un traitement antirétroviral efficace et une CV constamment <40 copies/ml.

## Présentation des cas et prise en charge thérapeutique

Les quatre patients avaient un taux de lymphocytes TCD4<200 cellules/mm<sup>3</sup> au moment du premier diagnostic de LV. La PCR leishmaniose dans le sang restait positive tout au long du suivi, même en dehors des poussées cliniques. Au cours d'un suivi médian de 65 mois avec CV indétectable sous CART, une médiane de 3 récidives cliniques a été observée (min 2 ; max 4). La médiane des lymphocytes CD4 au moment des récidives était de 81/mm<sup>3</sup>. Tous les patients furent traités par de nombreuses cures d'amphotéricine B en traitement d'attaque et en prophylaxie secondaire (dose médiane cumulée : 17 g). Trois patients présentèrent une surdité et deux une insuffisance rénale (IR) chronique. Mr G. et Mr C. reçurent deux cures de pentamidine (10 perfusions IV de 4 mg/kg sur 10 à 20 jours), suivies d'un traitement d'entretien par miltefosine (50 mg X 2 po) sans rechute clinique après un suivi médian de 10,5 mois. Ils avaient au préalable reçu une cure de pentamidine seule, et avaient rapidement rechuté. Mr S. et Mr T eurent une rechute sous miltefosine après respectivement 2 et 24 mois. Ces deux patients n'avaient pas reçu au préalable de pentamidine. Mr T décéda ensuite sous pentamidine d'un choc septique sur poussées de diverticulite.

Cas	Durée de suivi avec CV indétectable (mois)	TCD4 aux rechutes (/mm <sup>3</sup> ) (médiane)	Dose cumulée d'amphotéricine (g)	Effets indésirables de l'amphotéricine	Rechute après pentamidine seule (nb)	Rechute après miltefosine seule (nb)	Rechute après pentamidine suivie de miltefosine (nb)
Mr G.	97	39	43,2	Surdité, IR chronique sévère	1	Non effectué	0 (6 mois de suivi)
Mr S.	80	185	20	IR résolutive	Pas de pentamidine seule	1 (2 mois de suivi)	Non effectué
Mr C.	50	119	16	Surdité et IR résolutive	1	Non effectué	0 (15 mois de suivi)
Mr T.	33	81	1,55	surdité	1	1 (24 mois de suivi)	décédé

## Discussion

Tous nos cas de LV chroniques sont survenus chez des patients avec une lymphopénie TCD4 persistante malgré une CV indétectable. Tous ont eu besoin de nombreuses cures d'amphotéricine B. Les effets secondaires graves de l'amphotéricine B, illustrés par nos cas, rendent l'utilisation de ce médicament difficile au long cours chez des patients atteints de LV chroniques.

L'efficacité de la pentamidine et de la miltefosine a été démontrée chez les patients non infectés par le VIH avec *L. Donovanii* en Inde [4][5]. La miltefosine présente l'avantage d'une prise orale et d'une toxicité probablement moindre. Il n'existe à notre connaissance aucune étude sur le traitement des LV à *L. Infantum* avec la miltefosine ou la pentamidine chez les patients infectés par le VIH. Parmi nos quatre cas cliniques, seule la séquence thérapeutique de pentamidine en cure de 10 perfusions sur 10 à 20 jours suivie d'un traitement par miltefosine n'a pas été suivie de rechute clinique après une médiane de 10,5 mois de suivi. Au contraire, la pentamidine seule, ou la miltefosine seule ont toutes été suivies d'une rechute.

## Conclusion

Les traitements des LV chroniques à *L. Infantum* des patients VIH malgré une CV VIH indétectable sous CART posent un réel problème de prise en charge au long cours. La persistance de l'infection leishmanienne pourrait être auto-entretenu par la lymphopénie qu'elle entraîne chez ces patients.

L'amphotéricine B présente des effets secondaires inacceptables au long cours. Une cure de pentamidine suivie d'un traitement prolongé par la miltefosine pourrait être une stratégie efficace chez ces patients. Cette stratégie de prise en charge est à évaluer chez un nombre plus élevé de patients avec un recul plus important.

## Bibliographies

- Pinto V. et al. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore)* 2001;80:54-73
- Laguna F et al. Amphotericin B lipid complex versus meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis in patients infected with HIV: a randomized pilot study. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:464-8
- Lopez-Velez R et al. Amphotericin B lipid complex versus no treatment in the secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:540-3
- Jha, T.K. et al. Evaluation of diamidine compound (pentamidine isethionate) in the treatment resistant cases of kala-azar occurring in North Bihar, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1983. 77(2): p. 167-70
- Sundar S. et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 2002;347:1739-46