

ANNEXES

au rapport annuel d'activité

2014

**Centre de national de
référence des
Leishmanioses**

**Année d'exercice
2013**

(mises à jour visibles en bleu)

1. MISSION ET ORGANISATION DU CNR

1.1. Rappel des missions et objectifs du CNR

Le Centre National de Référence des Leishmanioses (CNR-L) a été créé en mars 1998 (arrêté du 17 mars 1998). Il a été renouvelé en 2002, en 2006, et au 1^{er} janvier 2012 (JO-302 du 30 décembre 2011).

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

- l'isolement, la collecte et la conservation de souches de *Leishmania* et leur identification biochimique et moléculaire,
- l'expertise en matière de diagnostic et d'identification de souches pour de nombreux centres de santé (publics et parfois privés) ou laboratoires sur le territoire national (incluant la Guyane Française),
- la surveillance des différentes formes de leishmanioses humaines, avec un registre des cas autochtones et importés en France métropolitaine, ainsi qu'en Guyane française, avec l'aide du C.H. de Cayenne (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Pr B. Carme en 2013), et du Service de Santé des Armées,
- l'alerte, le conseil et la formation auprès de professionnels de santé dans le domaine de cette pathologie.

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

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

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

Le **L-A de Cayenne** est localisé au sein du Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie Mycologie (LHUPM) du Centre Hospitalier de Cayenne (CHAR) avec le service de Dermatologie comme composante clinique (Pr. Pierre Couppié). [Le LHUPM dirigé par le Pr B. Carme jusqu'en décembre 2013 a été "Centre collaborateur" du CNR-L pendant le dernier quinquennal \(2006-2011\). Il est aujourd'hui \(2014\) dirigé par le Dr Magalie Demar. Le coordonnateur du L-A depuis janvier 2014, désigné par consensus, est le Pr P. Couppié.](#)

Le L-A de Cayenne a une longue expérience de recherche en matière de diagnostic et d'épidémiologie des leishmanioses sud-américaines : niveau d'endémie, facteurs d'exposition, facteurs de risque d'origine environnementale et selon les particularités des souches parasitaires incriminées. Il est également compétent en matière de culture, de cryoconservation et de typage de souches.

Trois Laboratoires hospitaliers français reconnus pour leurs compétences en matière de leishmanioses depuis de nombreuses années (comme en attestent leurs publications) sont devenus **Centres collaborateurs pour ce qui concerne la santé humaine** au 1^{er} janvier 2012 : (i) le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du l'AP-HP de Marseille (Pr Renaud Piarroux) est en train de développer un projet sur l'étude des chimiorésistances de *Leishmania infantum*, ainsi que sur le typage par spectrométrie de masse; (ii) le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nice (Pr Pierre Marty) ainsi que celui de Marseille collaborent avec le CNR dans le domaine de l'épidémiologie des leishmanioses humaines; (iii) enfin, le Dr Pierre Buffet (AP-HP, Pitié-Salpêtrière) continuera à collaborer avec le CNR sur le conseil thérapeutique destiné aux

médecins; le CNR souhaite aussi développer une collaboration à la base de données clinico-épidémiologiques qu'il a constituée depuis des années et qu'il étend au niveau européen.

Par ailleurs, **trois structures expertes en santé animale** poursuivent leur collaboration avec le CNR en vue d'une meilleure concertation des systèmes de surveillance et de contrôle des leishmanioses humaines et animales (surtout canine sur le territoire métropolitain): (i) le Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Pathologie Animale et Zoonoses, ANSES (Drs. Mohamed Kasbari et P. Boireau); (ii) le Laboratoire de Parasitologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (Pr. G. Bourdoiseau); (iii) l'Unité sous Contrat de l'ANSES "VECPAR" ("Transmission vectorielle et épidémiosurveillance des maladies parasitaires"), également JE 2533, du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Reims (Pr. J. Depaquit). Ces trois laboratoires présentent une expertise complémentaire, le premier concernant l'épidémiologie et la surveillance de la leishmaniose canine, le second concernant le contrôle de la maladie, à la fois sur le plan vaccinal et sur le plan de la lutte médicamenteuse, et le troisième sur les aspects vectoriels (Phlébotome).

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

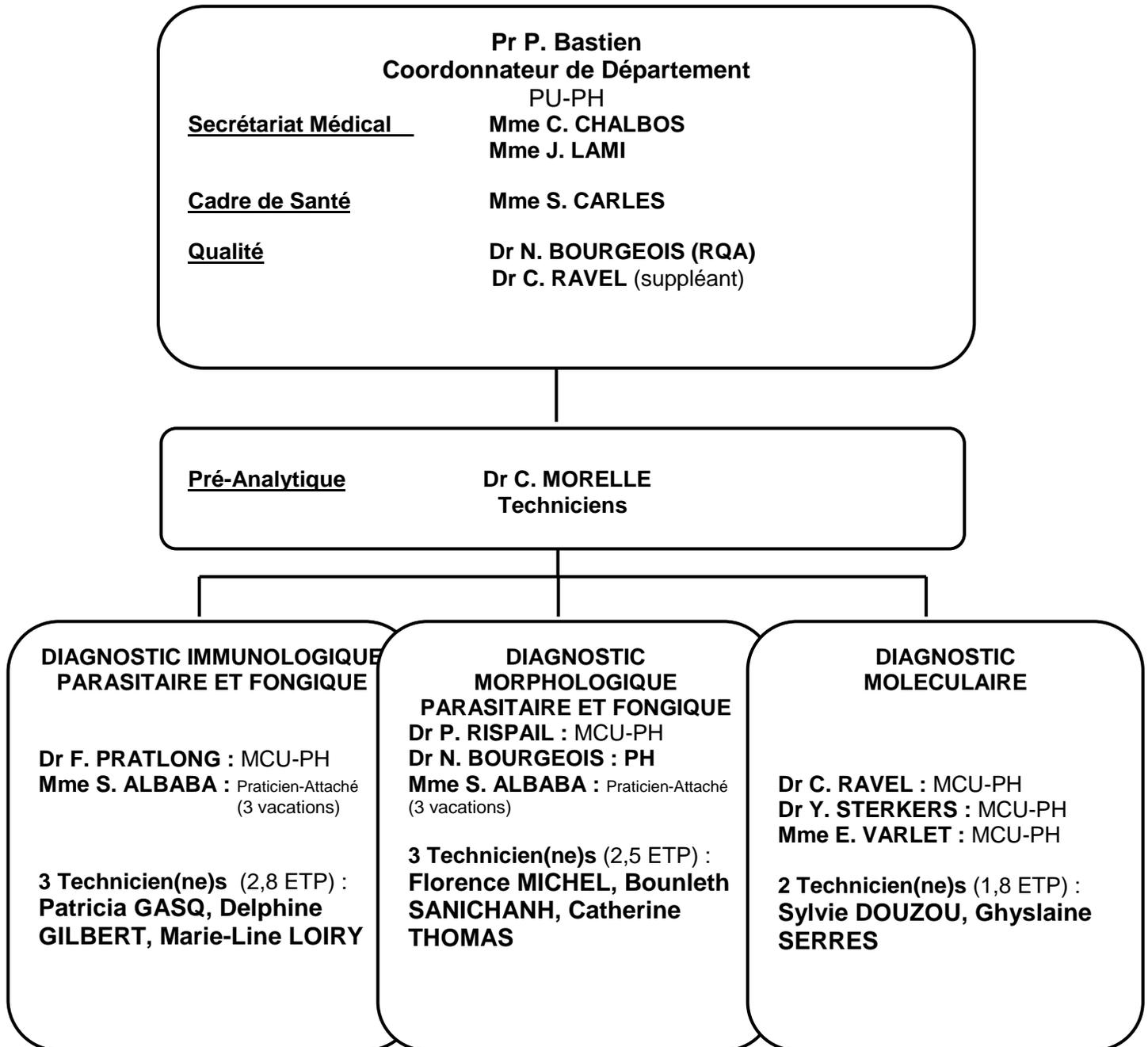
1.3.1. Montpellier

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

Noms et Prénoms	Qualifications	ETP	Appartenance administrative (pour l'activité au CNR-L)
Bastien Patrick	Médecin (PU-PH)	0,2	CHU-Univ. (50%-50%)
Dedet Jean-Pierre	Médecin (Professeur émérite)	0,05	Univ. Montpellier 1
Lachaud Laurence	Médecin (MCU-PH)	0,1	Univ. Montpellier 1
Pratlong Francine	Pharmacien (MCU-PH)	0,4	CHU-Univ. (50%-50%)
Ravel Christophe	Médecin (MCU-PH)	0,2	CHU-Univ. (50%-50%)
Balard Yves	Assistant-Ingénieur	0.3	Univ. Montpellier 1
Colombero Nadia	adjoint-technique	0,05	CHU Montpellier
Lami Patrick	technicien	0,5	Univ. Montpellier 1
Serres Ghislaine	technicien	0,1	CHU Montpellier
Talignani Loïc	technicien	0,5	Univ. Montpellier 1
Lami Joelle	secrétaire	0,05	CHU Montpellier

L'implication de ces personnels dans le CNR-L représente 3,6 ETP : 0,9 ETP pour le personnel médico-scientifique, 1.4 ETP pour le personnel technique et <0,05 ETP pour le secrétariat.

ORGANIGRAMME FONCTIONNEL du DEPARTEMENT DE PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE, MONTPELLIER



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

1.3.2. Laboratoire-Associé de Cayenne

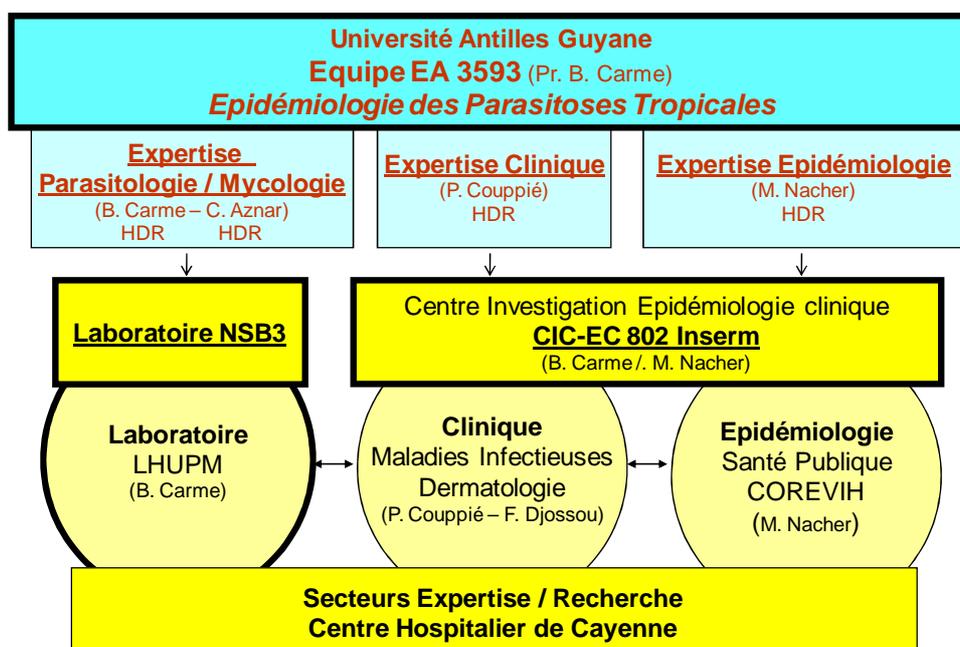
Les personnels scientifiques et techniques du LHUPM du Centre Hospitalier de Cayenne (CHAR) et de la Faculté de Médecine (Université Antilles Guyane) qui, pour partie de leur temps, ont été impliqués en 2013 dans les activités Leishmanioses en tant que Laboratoire Associé au CNR, sont listés dans le tableau ci-dessous. Leur implication dans ce cadre est indiquée en valeur ETP.

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

Une aide ponctuelle complémentaire pour les aspects analyse et expertise épidémiologique peut être apportée par l'équipe INSERM CIC-EC Antilles Guyane (fiche de présentation non fournie). Jusqu'en septembre 2013, les 3 structures étaient dirigées par la même personne (B. Carme) facilitant d'autant les collaborations.

Le schéma suivant illustre cette organisation, source de synergie.

Complémentarité des équipes hospitalières et universitaires



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

Présentation LHUPM du Centre Hospitalier de Cayenne



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



Chef de Service : Pr. Bernard Carme bernard.carme@wanadoo.fr

Contacts sabrina.arnaud@ch-cayenne.fr

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

Personnels

Biologistes spécialistes hospitalo-universitaires : 3

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

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

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

Secrétaire médicale : 1

Heures d'ouverture

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

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

Astreintes des Biologistes : tous les jours

Activités

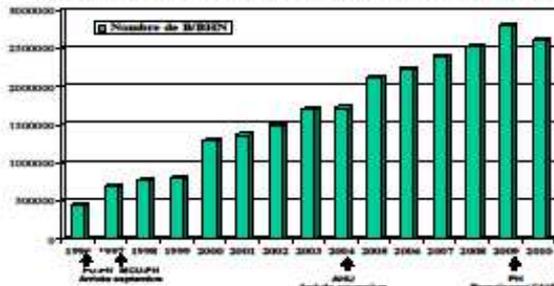
Diagnostic des infections parasitaires et mycosiques

Application

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

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

Activité du Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie Mycologie



Expertise et surveillance épidémiologique

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

Valorisation MIGAS et MERRI

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

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

Valorisation MERRI



Mots clés

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

Equipements

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

Associations

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

Organisation du secteur expertise, surveillance épidémiologique et recherche



Partenariats (liste non limitative)

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

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



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



Directeur:
 Pr. Bernard Carme
 Tél. : 0594 39 53 09 Fax : 0594 28 72 63
 E mail : carme.bernard@wsmadoo.fr

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

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

Paludisme

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

Leishmanioses cutanées

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

Toxoplasme

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

Réduves et Maladie de Chagas

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

Histoplasme et contexte épidémiologique des infections à VIH

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

Facteurs exposition, risque dépistage tardif et mauvais suivi VIH+

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

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



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

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

Association étroite avec CH de Cayenne

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



Partenariats (liste non limitative)

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

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

1.4.1. CNR Montpellier

Locaux : Le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de Montpellier (LPMM) a déménagé en juillet 2009 pour rejoindre l'un des sites du CHRU, entre l'Hôpital Lapeyronie et La Colombière. Il est installé dans un bâtiment modulaire de 1300 m², répartis sur deux étages, dont la construction a été entièrement prise en charge par le CHRU. Dans ces locaux sont installés à la fois le laboratoire hospitalier de diagnostic, le CNR-L et deux équipes de recherche incluses dans l'UMR "MiVEGEC" ("Maladies infectieuses et vecteurs : épidémiologie, génétique, évolution et contrôle") (CNRS / IRD / Universités Montpellier 1 et 2), dont le Pr. Patrick Bastien est également Directeur-Adjoint.

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

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

- une unité de culture de niveau P2, équipée de 3 enceintes de sécurité et d'une chambre chaude pour la croissance des cultures de *Leishmania* (24-26° C) ;
- à cette unité de culture, s'ajoute une enceinte confinée de niveau P3, pour la culture des espèces de *Leishmania* classées en L3 (*L. donovani* et *L. braziliensis*).
- une unité de cryoconservation avec un local spécifique, aux normes de sécurité pour la manipulation de l'azote liquide, et contenant : 1 container de 351 litres (Espace 351), 1 container de 151 litres (Espace 151), 5 containers de 140 litres (Arpège 140), 23 containers de 40 litres (GT 40) et un container de répartition (TP100). Un contrat de livraison hebdomadaire d'azote liquide existe avec Air Liquide Santé, avec mise à niveau des containers. Seul le remplissage des GT40 est encore assuré chaque semaine par un technicien du CNR-L.
- un laboratoire de biochimie pour l'électrophorèse des isoenzymes ;
- un plateau technique réservé à la biologie moléculaire, partagé avec l'équipe de recherche et l'équipe hospitalière, occupant environ 70 m² ; ces locaux sont conformes au GBEA et aux recommandations classiques pour cette activité, et même davantage. Des mesures très strictes de confinement et de séparation y sont imposées : organisation en trois locaux géographiquement séparés (préparation des ADN, préparation des mélanges réactionnels, étape post-amplification) avec sas d'entrée ; pression positive dans les pièces "pré-amplification" et négative dans les pièces "post-amplification" ; respect du sens du flux ; personnel autorisé ; séparation complète des matériels, blouses, consommables et réactifs ; sur-blouses, sur-chaussures ; autres mesures classiques de prévention des contaminations. De plus, en "pré-amplification" ont été physiquement séparées les activités de diagnostic en routine (sécurisation maximum) et les activités dites de développement (en particulier les activités du CNR).
- un bureau spécifique dévolu au CNR-L, ainsi que des bureaux réservés aux différents acteurs scientifiques du CNR.

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

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

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

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

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

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

1.4.2. Laboratoire Associé de Cayenne

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

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

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

- une unité de culture de niveau P3 destinée aux cultures d'agents parasitaires tels que *Trypanosoma sp*, *Toxoplasma*. C'est aussi dans cette unité équipée de 3 enceintes de sécurité et d'une chambre chaude (24-26° C) que sont effectuées les cultures de *Leishmania sp*.
- un lieu de cryoconservation aux normes de sécurité pour la manipulation de l'azote liquide. Le remplissage du container est assuré 1x/mois par un des membres affecté au LA du CNR-L.
- un plateau technique réservé à la biologie moléculaire, conforme aux recommandations classiques pour cette activité avec l'organisation en trois locaux géographiquement séparés

Equipements : le Laboratoire possède les équipements indispensables à l'activité : 2 containers de 80 litres d'azote liquide, appareil de PCR en temps réel de type Applied, thermocycleurs conventionnels, automate d'extraction d'ADN.

1.5. Description de la démarche Qualité du laboratoire

1.5.1. CNR Montpellier

Le Département de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier est engagé dans la démarche Qualité nécessaire à l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (certification ISO 15189). Christophe Ravel (membre du CNR-L) est d'ailleurs RQA suppléant dans ce cadre.

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

Dans l'objectif de la certification selon la norme NF S96-900, ce sont **Christophe Ravel** et **Loïc Talignani**, tous deux membres de l'équipe du CNR-L, qui ont repris la mise en œuvre de la démarche Qualité.

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

Un gros travail a été effectué à la suite de ce premier audit et selon ses recommandations.

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

- Création d'une planification des actions qualité et de suivi des indicateurs,
- Le comité scientifique a été désigné,
- L'ensemble de la documentation est désormais maîtrisé,
- D'importants moyens humains ont été consacrés à la validation de méthodes internes qui sont maintenant tracées,
- Des outils informatiques de gestion des non-conformités et d'évaluation des fournisseurs et prestataires de services ont également été mis en place.

Des réunions mensuelles de suivi de la mise en place de la Qualité ont permis de maintenir une dynamique tout au long de l'année. La mise en place du Système de Management de la Qualité est devenu un projet fédérateur au sein du CNRL. Ces efforts se poursuivront en 2014.

1.5.2. Laboratoire Associé de Cayenne

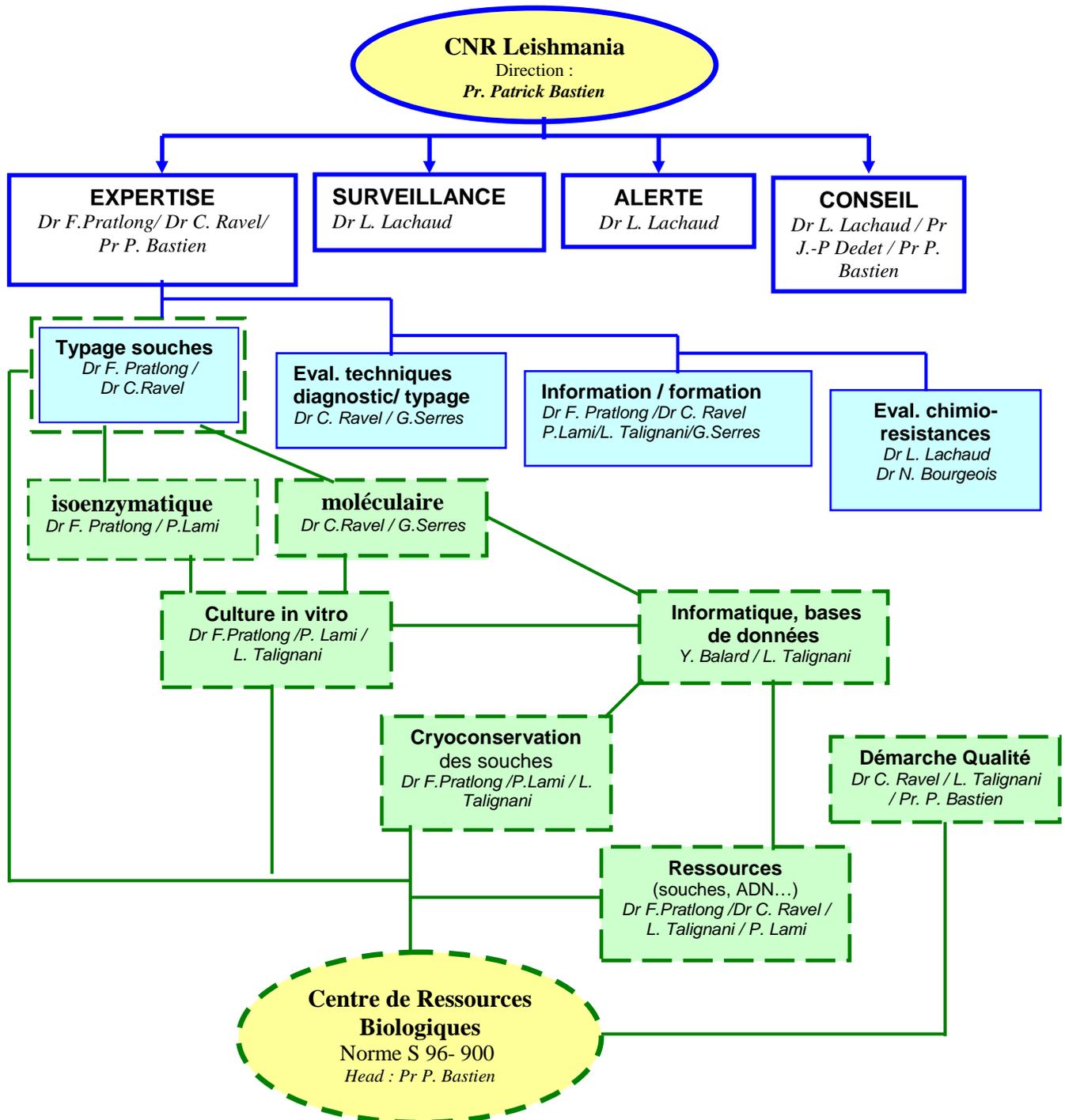
En conformité avec les exigences nationales, le L-A est engagé dans le processus de mise en place de la démarche Qualité nécessaire à l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (certification ISO 15189) dans chacun de ses secteurs. Cette exigence est indispensable au L-A du fait de son implication dans la démarche diagnostique et thérapeutique auprès des praticiens de Guyane Française.

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

- mise à disposition sur un site internet dédié de documents référents,
- conseils personnalisés par Mme Christine Roques, PH évaluatrice COFRAC travaillant dans le laboratoire HU de Parasitologie-mycologie à Toulouse,
- conseils personnalisés auprès des référents qualité du CNR à Montpellier.

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

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



2. ACTIVITES D'EXPERTISE

2.1. Capacités techniques du CNR

2.1.1. Liste des techniques de référence

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

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

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

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

2.1.1.1. Diagnostic

- Le **LPMM** réalise le diagnostic moléculaire des leishmanioses par PCR en temps réel (LightCycler LC480). La technique est basée les travaux de C. Mary et al. (*J Clin Microbiol.* 2004, 42: 5249-55) et repose sur l'amplification par PCR de l'ADN du kinétoplaste (ADN mitochondrial hautement répété) et la détection par sonde TaqMan. La sensibilité obtenue est très élevée, autour de 0.01 équivalents-génome par mL de sang. La quantification de la charge parasitaire dans le sang pour les leishmanioses viscérales a été mise au point et fonctionne en routine. Au **LPMM**, le typage moléculaire est effectué en priorité (par rapport au typage isoenzymatique) en routine depuis 2006. Les identifications sont réalisées à partir de souches ou d'ADN, mais également directement à partir de divers types de prélèvements (biopsies, produits de grattage, sang, moelle osseuse).

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

- De par sa longue expérience en région d'endémicité élevée, le **LHUPM de Cayenne** possède également une expertise en diagnostic des leishmanioses, que ce soit par microscopie, en culture *in vitro*, par techniques sérologiques classiques (microscopie à fluorescence, ELISA, Western Blot...) ou par techniques de biologie moléculaire (PCR conventionnelle et PCR en temps réel). Sa technique de diagnostic moléculaire repose sur l'amplification du gène de l'ARN polymérase II (bande à 615 pb).

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

2.1.1.2. Typage biochimique : Identification iso-enzymatique

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

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

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

2.1.1.3. Typage moléculaire

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

L'identification moléculaire permet notamment la différenciation rapide de toutes les espèces de *Leishmania*. Elle est appliquée non seulement sur les souches en culture, mais également, dans environ 70% des cas, sur les prélèvements, en particulier biopsiques, ce qui permet un typage même en cas de culture négative ou contaminée.

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

Le **LHUPM de Cayenne** a également développé depuis 2006 une technique d'identification moléculaire par PCR-RFLP (HgaI et TspRI) spécifique pour le diagnostic d'espèce des *Leishmania* du Nouveau Monde. Cette technique peut être réalisée à partir des cultures et, le cas échéant, directement à partir de biopsies de lésions cutanées (Simon S, Veron V, Carme B. *Leishmania* species identification by PCR-RFLP analysis and its applications in French Guiana. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 2010; 66, 175-180).

2.1.1.4. Autres techniques de typage utilisées

- Typage par microsattellites :

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

- Typage par électrophorèse en champ pulsé (PFGE) :

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

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

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

2.1.2. Collections de matériels biologiques

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

Débutée en 1971, elle s'est régulièrement enrichie. Depuis la création du CNR en 1998, le nombre de nouvelles souches cryoconservées chaque année dans la collection se situe entre 100 et 200.

La Collection comporte aujourd'hui près de 6600 souches provenant de 67 pays, sur 4 continents. Les souches proviennent principalement de cas humains de leishmanioses, mais également de chiens et d'autres hôtes mammifères, ainsi que de phlébotomes vecteurs. Du point de vue géographique, les souches proviennent principalement d'Europe (42 %) et d'Afrique (32 %), mais également d'Asie (10 %) et d'Amérique (16 %). La présence de souches non seulement échantillonnées de foyers bien identifiés mais provenant en plus de tous les acteurs du cycle épidémiologique de l'espèce de *Leishmania* en cause, confère une richesse exceptionnelle à cette Collection.

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

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

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

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

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

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

2.1.2.2. Application informatique de gestion de la collection du CNR

En 2013, la Collection a effectué le basculement vers une nouvelle application de gestion appelée BRC-LIMS. Ce projet initié par l'institut Pasteur et soutenu par le GIS IBiSA (Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie) a été testé et validé durant 3 mois avant de remplacer totalement l'ancienne application ModulBio. Toutes les données présentes sur l'ancienne base ont été reprises. Cette application présente toutes les garanties de sécurité avec davantage de souplesse et de possibilités.

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

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

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

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

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

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

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

2.1.2.3. Conditions de mise à disposition de la collection

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

L'option choisie pour une meilleure diffusion du matériel conservé dans notre collection a consisté dans la réalisation d'un catalogue de souches sous forme d'une base de données interrogeable et accessible sur le site Internet du laboratoire (www.parasitologie.univ-montp1.fr/cryobanque.htm). Jusqu'en 2010, un échantillon de 419 souches représentatives de la diversité des hôtes, réservoirs, vecteurs, origine géographique, et aspects cliniques chez l'homme, figurait sur notre site. Depuis 2011, un travail d'enrichissement de ce catalogue a été entrepris et celui-ci a été augmenté à près de 1500 souches.

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

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

2.1.2.4. Collection d'ADN de *Leishmania*

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