



INSTITUT  
DE VEILLE SANITAIRE

Surveiller, alerter, prévenir



## Rapport annuel d'activité 2011

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



CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE



Université Montpellier 1



# SOMMAIRE

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>5</b>
1.1. RAPPEL DES MISSIONS ET OBJECTIFS.....	5
1.2. ORGANISATION ACTUELLE DU CNR (DEPUIS LE 1 <sup>ER</sup> JANVIER 2012).....	5
1.3. RÉSUMÉ DES ACTIVITÉS DE L'ANNÉE.....	6
1.4. EQUIPE : PERSONNELS DÉVOLUS DANS LES ACTIVITÉS DU CNR ET LABORATOIRES ASSOCIÉS.....	9
1.4.1. Montpellier.....	9
1.4.2. Cayenne.....	10
1.4.3. Description de la démarche Qualité mise en œuvre au sein du laboratoire.....	14
1.5. LOCAUX ET ÉQUIPEMENTS (CNR ET LABORATOIRES ASSOCIÉS):.....	16
1.5.1. CNR Montpellier.....	16
1.5.2. Laboratoire Associé de Cayenne.....	17
<b>2. ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR.....</b>	<b>17</b>
2.1. CAPACITÉS TECHNIQUES ACTUELLES DU LABORATOIRE CANDIDAT DANS LE DOMAINE SPÉCIFIQUE DU CNR.....	17
2.1.1. Liste des techniques de référence.....	17
2.1.2. Collections de matériels biologiques.....	19
2.2. ACTIVITES D'EXPERTISE EN 2011.....	22
2.2.1. Expertise diagnostique.....	22
2.2.2. Réception de souches de <i>Leishmania</i> .....	22
2.2.3. Identification isoenzymatique.....	24
2.2.4. Identification moléculaire.....	24
2.2.5. Distribution de souches de <i>Leishmania</i> .....	25
2.2.6. Maintien et dynamique de la Collection de souches du CNR.....	25
2.2.7. Evolution des tendances.....	26
<b>3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....</b>	<b>27</b>
3.1. SURVEILLANCE DES LEISHMANIOSES HUMAINES.....	27
3.1.1. Réseau de partenaires.....	27
3.1.2. Déclaration de cas.....	28
3.1.3. Collaboration avec les structures de santé animale pour la surveillance de la leishmaniose canine.....	30
3.2. SURVEILLANCE DE LA RÉSISTANCE DES <i>LEISHMANIA</i> AUX PRODUITS ANTI-LEISHMANIENS.....	31
3.3. CONTRIBUTION AUX RÉSEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX.....	31
<b>4. ALERTE.....</b>	<b>31</b>
<b>5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....</b>	<b>32</b>
5.1. INFORMATION.....	32
5.2. FORMATION – ENSEIGNEMENTS - STAGIAIRES.....	32
5.2.1. Enseignements :.....	32
5.2.2. Stagiaires :.....	32
5.2.3. Conseil aux professionnels de santé :.....	33

5.2.4. Liste des activités d'expertises auprès du Ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)	34
<b>6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.</b>	<b>34</b>
6.1. Etude des caractéristiques épidémiologiques et du polymorphisme iso-enzymatique des souches de la Collection	34
6.2. Essai thérapeutique de la paromomycine-onguent dans le traitement de la leishmaniose cutanée à <i>L. major</i> en Tunisie	35
6.3. Projet ANR « Impact de l'anthropisation et de l'environnement sur le fonctionnement des foyers de leishmanioses »	35
6.4. Projet DGRST "Eco-épidémiologie de la leishmaniose cutanée à <i>Leishmania killicki</i> en Tunisie"	36
<b>7. LISTE DES PUBLICATIONS</b>	<b>37</b>
<b>8. PROGRAMME D'ACTIVITE 2012-2013</b>	<b>39</b>
8.1. ACTIVITÉS D'EXPERTISE	39
8.1.1. Maintien et dynamique de la Collection de souches du CNR	39
8.1.2. Participation à l'évaluation et à l'amélioration du diagnostic moléculaire des leishmanioses	39
8.1.3. Participation au développement et à l'évaluation des techniques d'identification (CNR de Montpellier, CC de Marseille)	40
8.2. CONTRIBUTION À LA SURVEILLANCE DES LEISHMANIOSES	40
8.2.1. Surveillance des leishmanioses humaines	40
8.1.5. Collaboration avec les structures en santé animale pour la surveillance de la leishmaniose canine	43
8.4. CONSEIL, INFORMATION, FORMATION	43
8.5. RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITÉ DU CNR	43
8.5.1. Projet européen EDENext	43
8.5.2. Projet européen « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation »	44
8.5.3. Recherche en santé humaine en collaboration avec les Centres Collaborateurs du CNR	44
8.5.4. Recherche en collaboration avec les structures travaillant en santé animale	45
8.5.5. Autres projets de recherche en collaboration	45
8.5.6. Projets internes au CNR directement adossés à la Collection	46
8.6. ACTIVITÉS DE PUBLICATION	46
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES CONTENUS DANS CE DOCUMENT	48

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. Rappel des missions et objectifs

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

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

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

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

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

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

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

**Trois Laboratoires hospitaliers français reconnus pour leurs compétences en matière de leishmanioses** depuis de nombreuses années (comme en attestent leurs publications) sont devenus Centres collaborateurs pour ce qui concerne la santé humaine au 1<sup>er</sup> janvier 2012 : (i) le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du l'AP-HP de Marseille (Pr Renaud Piarroux) est en train de développer un projet sur l'étude des chimiorésistances de *Leishmania infantum*, ainsi que sur le typage par spectrométrie de masse; (ii) le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nice (Pr Pierre Marty) collaborera avec le CNR dans le domaine du diagnostic immunologique des leishmanioses; (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 épidémiologie 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).

**N.B. Ce rapport a inclus quelques données du Laboratoire-Associé de Cayenne et de Centres Collaborateurs, bien qu'ils n'aient pas encore été nommés à ce titre en 2011.**

### 1.3. Résumé des activités de l'année

Les principales missions du CNR-L ont continué d'être remplies, et les recommandations du Comité scientifique des CNR ont été prises en compte.

1°) Une large place a été accordée aux missions d' **expertise**.

L'offre d'**expertise diagnostique** s'est intensifiée sur la période 2007-2011. Cette augmentation est sans doute en partie due à la très bonne efficacité diagnostique des techniques moléculaires en regard des autres techniques de mise en évidence directe du parasite. La perspective de l'Accréditation obligatoire des analyses biologiques en 2016 a sans doute aussi incité des Laboratoires hors zones d'endémie à se tourner vers le CNR-L pour le diagnostic de leishmaniose.

En 2011, 410 échantillons reçus pour diagnostic moléculaire de leishmaniose ont été analysés au Centre coordonnateur de Montpellier, soit une progression par rapport à 2010 (+ 5 %), 2010 ayant déjà été en forte progression par rapport à 2009 (+60%). Les demandes proviennent largement du CHRU de Montpellier (50 %) mais également de nombreux Centres hospitaliers français (47 CH ou CHU).

Au Laboratoire-Associé de Cayenne (Pr. B. Carme), 215 demandes de recherche de Leishmanies (à partir de frottis et/ou de biopsies) ont été enregistrées, issues du CH de Cayenne, des CH de Kourou et de Saint-Laurent-du-Maroni et des 21 centres et postes de santé disséminés sur le territoire guyanais. 119 se sont révélés positives (55,3%).

La **Collection de souches** de *Leishmania* reste dynamique. En 2011, 131 souches de *Leishmania* ont été isolées ou reçues, dont 77 d'hôpitaux, centres de soins ou instituts de recherche français, et 54 de centres de soins ou de recherche à l'étranger. Les souches ont été isolées à partir de contaminations de 18 pays différents, dont 4 pays d'Europe (23 souches), 6 pays d'Afrique (57 souches), 3 pays d'Amérique (28 souches) et 5 pays d'Asie (11 souches).

Par ailleurs, toujours en 2011, 480 souches de *Leishmania* ont été fournies à divers laboratoires et institutions en France et à l'étranger, dont 311 en France.

Le CNR-L s'emploie à faire vivre et progresser cette Collection, devenue essentielle à de nombreux centres hospitaliers et de recherche. En 2011, un travail d'**enrichissement des renseignements** relatifs aux souches de la Collection a été entrepris par le curateur de la cryobanque (Dr F. Pratlong), un adjoint-technique, Loïc Talignani, et un Assistant-Ingénieur, Yves Balard, à partir d'une étude rétrospective et selon des critères spécifiques (souches provenant d'un même patient, souches clonées, souches provenant d'expérimentations...).

L'activité d'**identification de souches** a continué d'être importante. En 2011, 109 identifications moléculaires ont été réalisées, et au total, 9 espèces de *Leishmania* ont été identifiées. La prédominance de *L. major* (36 %) était moins nette que les années précédentes, probablement en raison d'une moindre fréquence de prélèvements en provenance d'Afrique du Nord. *L. infantum*, espèce du sud de la France et du Bassin Méditerranéen, reste bien représentée (31 %). Au Laboratoire-Associé de Cayenne, une identification d'espèce a été réalisée sur 96 échantillons (80,6% des échantillons reçus), correspondant pour 85% à l'espèce *L. guyanensis*.

Le nombre d'identifications biochimiques (technique de référence pour l'O.M.S., réservée à des projets précis en épidémiologie) s'est maintenu. En 2011, sur les 131 souches isolées ou reçues, 70 ont été identifiées par électrophorèse des isoenzymes.

2°) Les activités de **surveillance** continuent de constituer une grosse activité du CNRL. Durant l'année 2011, 267 déclarations de cas sont parvenues au CNRL, dont 31 cas de leishmanioses viscérales et 236 de leishmanioses cutanées ; 93 cas provenaient de structures de santé de France métropolitaine, 1 du CHU de Martinique, 119 du Laboratoire Associé au CNRL à Cayenne et 54 du Département d'Epidémiologie et Santé Publique de l'Institut de Médecine tropicale et du Service de Santé des Armées. Tous les cas autochtones de LV provenaient de départements du Sud de la France situés dans la zone d'endémie leishmanienne connue. A noter que 130 cas de contamination en Guyane ont été répertoriés au total.

Enfin, la **collaboration avec les structures de santé animale** (essentiellement le Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES) s'est poursuivie, avec essentiellement la surveillance de cas groupés de leishmaniose canine dans des zones considérées comme non-endémiques (donc possibles foyers "ectopiques"), et des enquêtes canines et entomologiques précisant l'étude du rôle respectif des voies de transmission non-vectorielle et vectorielle de la leishmaniose canine dans la dynamique de ces foyers.

Le CNR-L a continué d'être impliqué dans les réseaux de surveillance internationaux, en particulier à l'O.M.S. pour les notifications de co-infections leishmaniose-SIDA.

Des avis sur le risque d'introduction et de diffusion en France de Leishmanies du Nouveau Monde ont été demandés par la DGAL (Ministère de l'Agriculture) au LSA de l'ANSES avant délivrance d'autorisation administrative d'importation de tamanoirs et de fourmiliers géants à partir du Brésil. De plus, un appui a été apporté aux Services vétérinaires et à l'Institut de Recherche Agronomique de Nouvelle-Calédonie (Dr T. Hue) pour leur enquête sur le premier cas d'apparition de leishmaniose canine sur l'île.

3°) Depuis 2006, une **démarche Qualité** a été entreprise en vue de la certification de la Collection de souches du CNR-L selon la norme NF 96.900. Freinée en 2009-2010 par le déménagement du Laboratoire, la démarche Qualité a été reprise en 2011 et confiée au Dr C. Ravel, MCU-PH, et à L. Talignani, Technicien, afin de coordonner et accélérer le travail en vue de la certification.

4°) En matière de **formation**, le CNR-L continue d'attirer des stagiaires en quête de formation sur les leishmanioses. En 2010-11 : six stagiaires ont été reçus sur 10 périodes de stage.

Le CNRL a également poursuivi l'activité de conseil thérapeutique téléphonique destinée aux médecins. Ce conseil thérapeutique est basé sur une collaboration entre le CNRL et les Drs. Pierre Buffet (AP-HP, Pitié-Salpêtrière) et Gloria Morizot (Institut Pasteur, Paris). En 2011, 40 conseils thérapeutiques ont été donnés, dont 34 pour des cas de LC, 5 pour des LV et 1 pour une LV récidivante avec des lésions de type "PKDL". Le CNR donne également de nombreux conseils en matière de diagnostic moléculaire ou d'interprétation des données de typage.

6°) Enfin, le CNR-L participe à plusieurs projets de **recherche**, en collaboration avec des équipes françaises ou étrangères.

Le projet européen EDENext (*Biology and control of vector-borne infections in Europe*), financé dans le cadre du programme européen FP7, fait suite au projet FP6 EDEN, auquel le CNR-L avait déjà contribué. Ses objectifs sont de comprendre les processus biologiques et éco-épidémiologiques menant à l'établissement, au maintien et à l'extension des maladies transmises par vecteurs, dont les leishmanioses; à moyen terme, il vise à mettre en place de meilleurs outils de surveillance et de prévention de ces maladies. Notons également un projet d'essai thérapeutique en collaboration avec le Walter Reed Army Institute à Washington, un projet ANR avec la

Guyane, un projet DGRST avec la Tunisie, des projets de génomique avec le N.I.H. aux Etats-Unis et l'Université de Lausanne...

Par ailleurs, en interne, un travail rétrospectif d'analyse des souches de leishmaniose viscérale présentes dans la Collection a été réalisé, portant à la fois sur les aspects épidémiologiques, noso-géographiques et taxonomiques.

6°) L'ensemble de ces activités a fait l'objet de **publications et de communications** à congrès : 1 publication dans une revue nationale et 9 publications dans des revues internationales (à comité de lecture), et 5 présentations orales dans des congrès et réunions scientifiques, nationaux ou internationaux (dont 3 sur invitation).

## 1.4. Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés

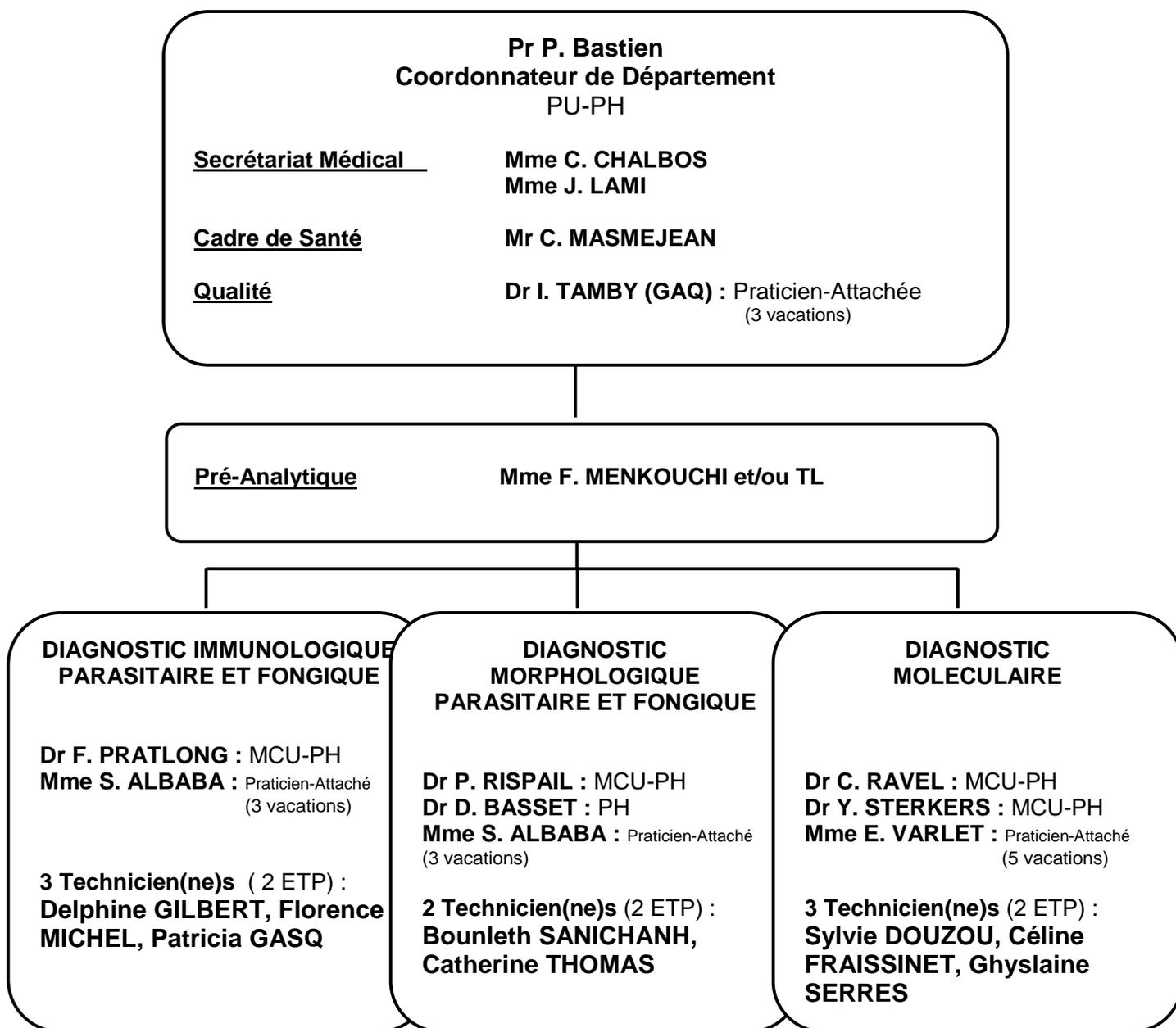
### 1.4.1. Montpellier

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

Noms et Prénoms	Qualifications	ETP	Appartenance administrative (pour l'activité au CNR-L)
Bastien Patrick	Médecin (PU-PH)	0,2	CHU-Univ. (50%-50%)
Bourgeois Nathalie	Médecin (PHU)	0,05	Univ. Montpellier 1
Dedet Jean-Pierre	Médecin (Professeur émérite)	0,05	Univ. Montpellier 1
Lachaud Laurence	Médecin (MCU-PH)	0,1	Univ. Montpellier 1
Pratlong Francine	Pharmacien (MCU-PH)	0,4	CHU-Univ. (50%-50%)
Ravel Christophe	Médecin (MCU-PH)	0,2	CHU-Univ. (50%-50%)
(recrutement en cours)	Ingénieur vacataire	0,1	CHU Montpellier
Balard Yves	Assistant-Ingénieur	0,4	Univ. Montpellier 1
Bouadi Fathia	adjoint-technique	0,05	CHU Montpellier
Lami Patrick	technicien	1	Univ. Montpellier 1
Serres Ghislaine	technicien	0,2	CHU Montpellier
Talignani Loïc	adjoint-technique	0,8	Univ. Montpellier 1
Lami Joelle	secrétaire	0,05	CHU Montpellier

L'implication de ces personnels dans le CNR-L représente 3,6 ETP : 1,1 ETP pour le personnel médico-scientifique, 2,5 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.

### 1.4.2. Cayenne

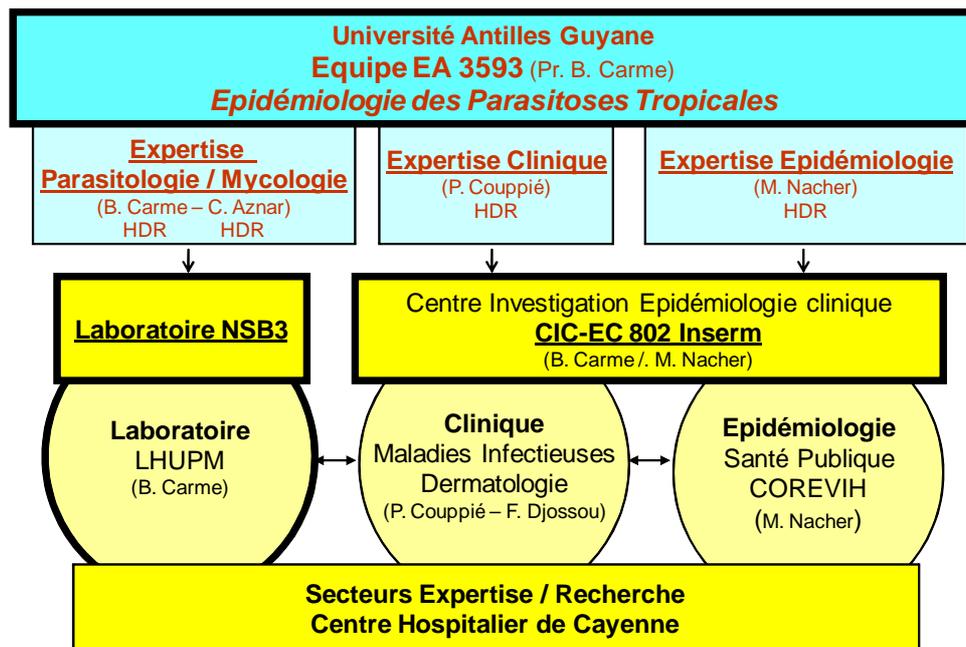
Les personnels scientifiques et techniques du LHUPM et de la Faculté de Médecine (Université Antilles Guyane) qui ont été, pour partie de leur temps, impliqués dans les activités Leishmanioses en tant que Laboratoire collaborateur du CNR (2007-2011) et devrait l'être pour la période 2012-2016, sont listés 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 : Parasito)	0,1	CH, LHUPM – UAG/ EA 3593 et CIE 802 Inserm
Couppié Pierre	Médecin (PU-PH C2 : Dermato)	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). Ces 3 structures sont dirigées par la même personne (B. Carme) facilitant d'autant les collaborations.

Le schéma suivant illustre cette organisation, source de synergie.

### Complémentarité des équipes hospitalières et universitaires



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

## Présentation LHUPM du Centre Hospitalier de Cayenne



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



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

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

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

- **Laboratoire :** Tél. : 0594 39 50 54

#### Personnels

**Biologistes spécialistes hospitalo-universitaires :** 3

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

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

**Surveillants :** 1\* **Technicien(ne)s :** 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

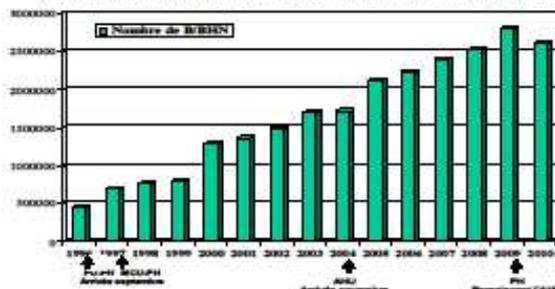
**Diagnostic des infections parasitaires et mycosiques**

##### 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)
- Relève 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 (Nlle Orléans)
- Réseau International Maladies Chagas (9 pays d'Amérique du Sud)

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



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



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

**Effectifs :**

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

**Thèmes de recherche :**

Parasitoses tropicales à transmission vectorielle ou zoonotique et/ou associées aux migrations et à la précarité

Connaissance facteurs d'exposition, de risque et de gravité, surveillance et alerte des phénomènes épidémiques, études du retentissement clinique adaptées au contexte et aux populations locales et orientées en vue de l'amélioration des diagnostics, des thérapeutiques et de la prévention

**Paludisme**

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

**Leishmanioses cutanées**

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

**Toxoplasme**

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

**Réduves et Maladie de Chagas**

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

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

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

Facteurs exposition, risque dépistage tardif et mauvais suivi VIH+

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

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

**Mots clés :**

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

**Equipements :**

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

**Association étroite avec CH de Cayenne**

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

**Partenariats (liste non limitative)**

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

### 1.4.3. Description de la démarche Qualité mise en œuvre au sein du laboratoire

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, un transporteur agréé sélectionné par le CNR-L qui prend en charge les frais de transport.

Dans le cadre de l'obtention de la certification selon la norme NF S96-900 et du label IBiSA, une visite d'évaluation a été effectuée le 8/12/2009 par une consultante-qualité désignée par l'INSERM. La grille d'auto-évaluation a montré un taux de réponse aux exigences de la norme de 42 %. Les points d'amélioration proposés ont fait l'objet d'un programme; mais celui-ci a souffert d'un certain nombre d'aléas, essentiellement concernant le personnel. En effet, en 2009-2010, le Pr. J.P. Dedet a dû se consacrer à ses tâches de conseiller aux risques épidémiques liés à la grippe (surtout H5N1) auprès du CHRU. Par ailleurs, depuis fin 2009, le RQ nommé auprès du CRB a démissionné de ses fonctions en raison d'un surcroît de travail auprès du CHRU.

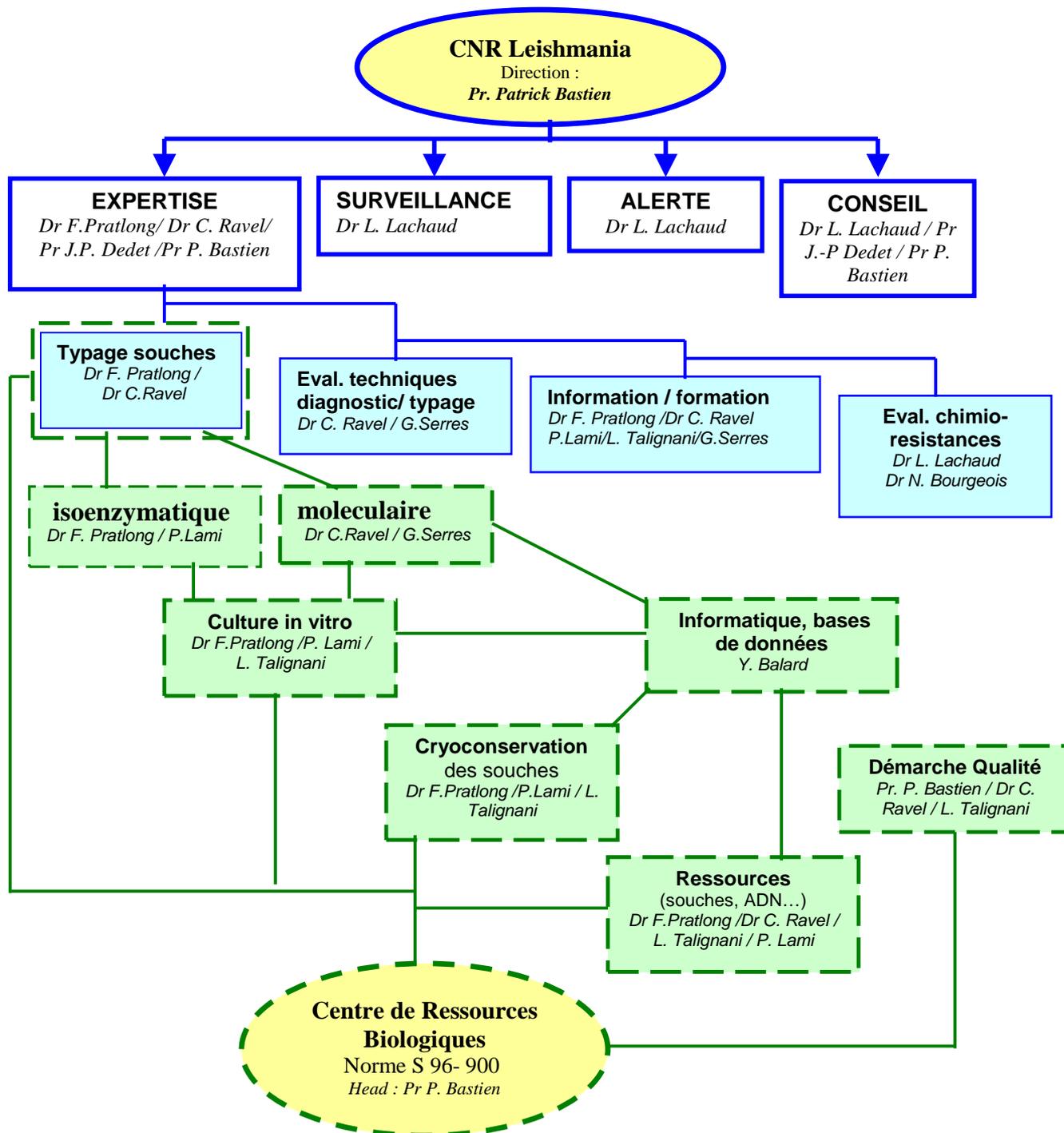
En juillet 2010, le Pr P. Bastien a repris la Direction du CNR-L. Il a mis en place un "Comité stratégique", qui se réunit tous les mois ou tous les deux mois, entre autres autour d'une réflexion continue sur le périmètre de certification de la Collection, sa sécurisation, et l'orientation des actions Qualité. Des tâches ont été distribuées à tous les acteurs du CNR et dans la plupart des domaines : finition de la mise en conformité des locaux, mise à jour des procédures essentielles et des modes opératoires, vérification et traçabilité des milieux de culture, organigrammes, gestion documentaire, fichier des donneurs de souches etc... Un nouvel organigramme du CNR-L a été réalisé (voir Figure 1 ci-dessous).

Une vacation Qualité, spécifique au CRB et destinée à un Ingénieur Qualité, a également été demandée à la Direction du C.H.U. Toutefois, dans le contexte de restrictions budgétaires mises en place par le CHU de Montpellier, la vacation Qualité n'a finalement pas pu être obtenue. Début 2012, le Pr Bastien a donc demandé au **Dr C. Ravel et à Loïc Talignani**, tous deux membres de l'équipe du CNR-L, de reprendre en main la démarche Qualité.

C. Ravel est impliqué dans la démarche vers l'accréditation norme ISO 15189 du Laboratoire du CHU de Montpellier.

L. Talignani doit suivre la formation proposée par l'INSERM à tous les CRB membres du projet "BioBanques" financé dans le cadre du plan Investissements d'Avenir.

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



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

### 1.5.1. CNR Montpellier

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

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

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

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

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

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

Le déménagement du laboratoire a été l'occasion pour le CHRU de renouveler de nombreux équipements courants généraux du laboratoire âgés de plus de 15 ans : autoclave,

postes de sécurité microbiologiques (PSM), étuves, centrifugeuses, balances, microscopes, générateurs, cuves d'électrophorèse et d'électrofocalisation, systèmes de refroidissement des cuves, sécheur de gels, bains secs, plaques UV, fours à hybridation, pH-mètres, congélateurs divers (- 20° et - 80° C).

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

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

### **1.5.2. 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 1.4.2**)..

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

### **2.1. Capacités techniques actuelles du laboratoire candidat dans le domaine spécifique 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 des *Leishmania* est réalisée dans notre laboratoire 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 d'un gène de la RNA polymérase II. Un typage par séquençage multilocus (MLST) a également été développé, 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.

### 2.1.1.1. Diagnostic

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

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

- De par sa longue expérience en région d'endémicité élevée, le **LHUPM de Cayenne** possède également une expertise en diagnostic des leishmanioses, que ce soit par microscopie, par techniques sérologiques classiques (microscopie à fluorescence, ELISA, Western Blot...) ou par techniques de biologie moléculaire (PCR conventionnelle et PCR en temps réel).

### 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 provenant de leishmanioses tégumentaires ou viscérales. Elle est basée sur le séquençage du locus du gène de la RNA Polymérase 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, dans environ 70% des cas, sur les prélèvements, en particulier biopsiques, ce qui permet un typage même en cas de culture négative ou contaminée.

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

Le **LHUPM de Cayenne** a également développé une technique d'identification moléculaire par PCR-RFLP spécifique pour le diagnostic d'espèce des *Leishmania* du Nouveau Monde. Cette technique peut être réalisée à partir des cultures et, le cas échéant, directement à

partir de biopsies de lésions cutanées (Simon S, Veron V, Carme B. *Leishmania* species identification by PCR-RFLP analysis and its applications in French Guiana. Diag. Microbiol. Infect. Dis. 2010; 66, 175-180.).

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

##### **- Approche MLST :**

Le développement d'une approche d'identification et de typage par Multilocus Sequence Typing (MLST) se poursuit au LPM. La très forte divergence génétique au sein du genre *Leishmania* a nécessité en 2009 et 2010 de très nombreuses mises au point et l'essai de différentes amorces pour analyser les génotypes des souches du Nouveau Monde. Actuellement, des données sur 7 loci génomiques ont été obtenues sur environ 398 souches de référence, représentant l'ensemble des espèces du genre *Leishmania*. Un important travail d'analyse bioinformatique a été réalisé en 2010 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. Cette approche vise à établir une méthode taxonomique fine et aussi universelle que celle des isoenzymes, mais basée sur les données moléculaires.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**La Collection comporte aujourd'hui précisément 6122 souches** provenant de 67 pays, sur 4 continents. Les souches proviennent principalement de cas humains de leishmanioses, mais également de chiens et d'autres hôtes mammifères, ainsi que de phlébotomes vecteurs. Du point de vue géographique, les souches proviennent principalement d'Europe (42 %) et d'Afrique (32 %), mais également d'Asie (10 %) et d'Amérique (16 %). La présence de souches non seulement échantillonnées de foyers bien identifiés mais provenant en plus de tous les acteurs du cycle

épidémiologique de l'espèce de *Leishmania* en cause, confère une richesse exceptionnelle à cette Collection.

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

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 Comité sectoriel Microorganismes du Comité Consultatif des Centres de Ressources Biologiques, au Ministère de l'Enseignement supérieur et Recherche.

**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).

En 2011, 54 souches issues de patients ont été isolées, caractérisées, et conservées en azote liquide. Dans 95% des cas, il s'agissait de *L. guyanensis*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

L'option choisie pour une meilleure diffusion du matériel conservé dans notre collection a consisté dans la réalisation d'un catalogue de souches sous forme d'une base de données interrogeable et accessible sur le site Internet du laboratoire ([www.parasitologie.univ-montp1.fr/cryobanque.htm](http://www.parasitologie.univ-montp1.fr/cryobanque.htm) ) Celui-ci a été récemment augmenté à 565 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 2300) ou à partir de souches de culture (environ 750). Tous les ADN sont cryoconservés à – 30°C dans un congélateur sécurisé (alarme de température). 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 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.

## 2.2. ACTIVITES D'EXPERTISE en 2011

### 2.2.1. Expertise diagnostique

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

#### - Diagnostic moléculaire

Le nombre de demandes de diagnostics moléculaires a augmenté sur la période **2007-2011**. Cette augmentation est sans doute en partie due à la très bonne efficacité diagnostique des techniques moléculaires en regard des autres techniques de mise en évidence directe du parasite. La perspective de l'Accréditation obligatoire des analyses biologiques en 2016 a sans doute aussi incité des Laboratoires hors zones d'endémie à se tourner vers le CNR-L pour le diagnostic de leishmaniose.

**En 2011**, 410 échantillons reçus pour diagnostic moléculaire de leishmaniose ont été analysés au Centre coordonnateur de Montpellier, soit une progression par rapport à 2010 (+ 5 %), 2010 ayant déjà été en nette progression par rapport à 2009 (+60%). Les demandes proviennent largement du CHRU de Montpellier (50 %) mais également de nombreux Centres hospitaliers français (47 CH ou CHU). 10% des prélèvements se sont avérés positifs, dont plus de la moitié pour des formes cutanées.

Au Laboratoire-Associé de Cayenne, 215 demandes de recherche de Leishmanies (à partir de frottis et/ou de biopsies) ont été enregistrées, issues du CH de Cayenne, des CH de Kourou et de Saint-Laurent-du-Maroni et des 21 centres et postes de santé disséminés sur le territoire guyanais. 119 se sont révélés positives (55,3%).

#### - Diagnostic immunologique

En 2011, 271 sérologies leishmaniennes ont été réalisées, un chiffre stable par rapport à 2010 (alors que l'augmentation était constante dans les années précédentes (de 173 à 275 entre 2006 et 2010)).

### 2.2.2. Réception de souches de *Leishmania*

#### • Origine des souches selon le centre de soins

En 2011, **131 souches** de *Leishmania* ont été isolées ou reçues, dont **77** d'hôpitaux, centres de soins ou instituts de recherche français, et **54** de centres de soins ou de recherche à l'étranger. Le détail de l'origine des souches par centre d'isolement en 2011 figure sur le tableau I.

#### • Origine géographique des souches par pays d'isolement.

L'origine géographique des souches reçues en 2011 figure sur le tableau II selon le pays où la contamination a eu lieu : les souches ont été isolées à partir de contaminations de 18 pays différents, dont 4 pays d'Europe (23 souches), 6 pays d'Afrique (57 souches), 3 pays d'Amérique (28 souches) et 5 pays d'Asie (11 souches).

**Tableau I.- Origine, selon le centre de soins, des 131 souches de *Leishmania* traitées par le CNRL en 2011**

France (77 souches)		Etranger (54 souches)		
Etablissements	Nb	Pays	Etablissements	Nb
CHU Nice	19			
AP – HP Pitié Salpêtrière	12	COLOMBIE	Centro Dermatologico Federico Lleras Acosta – <b>Bogota</b>	7
HIA LAVERAN	10	DANEMARK	Dpt. of Infectious Diseases, Q. Aarhus University – <b>Aarhus</b>	1
CHU Rennes	6			
CHU Montpellier	5	ESPAGNE	Departamento de Parasitologia, Facultat de Farmacia - <b>Granada</b>	4
AP – HP Avicenne	4	ISRAEL	Department of Parasitology, Hadassah Medical School – <b>Jerusalem</b>	5
AP – HP Cochin	4	PORTUGAL	Universidade Nove de Lisboa-Medicina Tropical – <b>Lisboa</b>	2
AP – HP Bichat	3	TUNISIE	Institut Pasteur de Tunis – <b>Tunis</b>	23
AP – HP Saint Louis	3	TUNISIE	Faculté de Pharmacie de Monastir – <b>Monastir</b>	12
CHU Marseille	3			
Agence Nationale de Sécurité Sanitaire – Maisons-Alfort	2			
Laboratoire Vétérinaire de N <sup>elle</sup> Calédonie - Païta	1			
CHU Reims	1			
CHU Strasbourg	1			
CHU Grenoble	1			
HIA LEGOUEST	1			
ZOO Montpellier	1			

**Tableau II.- Origine géographique, par pays d'isolement, des 131 souches traitées par le CNRL en 2011**

Continents	Pays	Nb	Continents	Pays	Nb
<b>Afrique (n = 57)</b>	Algérie	6	<b>Asie (n = 11)</b>	Israël	3
	Burkina Faso	1		Jordanie	3
	Mali	3		Palestine	1
	Maroc	5		Thaïlande	2
	Sénégal	1		Asie	2
	Tunisie	41			
<b>Amérique (n = 28)</b>	Colombie	7	<b>Europe (n = 23)</b>	Danemark	1
	Guyane française	19		Espagne	5
	Amérique du sud	2		France	15
<b>Origine géographique inconnue</b>		12			

### 2.2.3. Identification isoenzymatique

Le typage biochimique iso-enzymatique, qui est toujours une technique de référence reconnue par la communauté scientifique et par l'OMS, est réservé essentiellement aux enquêtes et études épidémiologiques. Cette technique permet également de placer une espèce dans la classification existante lorsqu'une *Leishmanie* nouvelle est mise en évidence.

En 2011, sur les 131 souches isolées ou reçues, **70 ont été identifiées** (ou sont en cours d'identification) par électrophorèse des isoenzymes, et 61 n'ont pas fait l'objet d'un typage biochimique. Comme en 2010, le typage biochimique a été concentré sur l'espèce *L. infantum* présente dans le sud de la France et dans le Bassin méditerranéen, et sur *L. major*, dans le cadre du suivi d'un essai thérapeutique de la paromomycine en onguent dans la LC à *L. major* en Tunisie. Le détail des identifications des souches figure sur le tableau III.

**Tableau III.- Détails des identifications enzymatiques de 70 souches réalisées en 2011.**

Espèces	Zymodèmes	Nombre
<i>L. infantum</i> (n=21)	MON-1	17
	MON-80	4
<i>L. major</i> (n=24)	MON-25	22
	MON-103	2
<i>L. tropica</i> (n=2)	zymodème nouveau	2
<i>L. killicki</i> (n=13)	MON-8	10
	MON-317	3
<i>L. braziliensis</i> (n=2)	MON-43	1
	MON-44	1
<i>L. guyanensis</i> (n=1)	MON-45	1
<i>L. panamensis</i> (n=2)	MON-47	1
	MON-100	1
<i>L. donovani</i> (n=1)	MON-73	1
<i>L. amazonensis</i> (n=1)	MON-132	1
<i>L. mexicana</i> (n=1)	MON-156	1
<i>Leishmania</i> hybride <i>L. infantum</i> / <i>L. major</i>		1
<i>Leishmania siamensis</i>	Espèce et zymodème nouveaux	1

### 2.2.4. Identification moléculaire

Au Centre coordonnateur de Montpellier, le typage moléculaire est effectué en priorité (par rapport au typage iso-enzymatique) 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).

En 2011 : 109 identifications ont été réalisées, et au total, 9 espèces de *Leishmania* ont été identifiées. La prédominance de *L. major* (36 %) était moins nette que les années précédentes, probablement en raison d'une moindre fréquence de prélèvements en provenance d'Afrique du Nord. *L. infantum*, espèce du sud de la France et du Bassin Méditerranéen, est également bien représentée (31 %).

Trente identifications ont été faites à partir de prélèvements en provenance du Nouveau Monde, avec une prédominance de *L. guyanensis* (20 identifications), mais aussi huit *L. braziliensis*, une *L. panamensis* et une "MAR1", nouvelle espèce de *Leishmania* décrite en Martinique depuis seulement quelques années (Noyes H. et al. 2002, Parasitology, 124, p.17-24) et régulièrement observée depuis.

Au **Laboratoire-Associé de Cayenne**, une identification d'espèce a été réalisée sur 96 échantillons (80,6% des échantillons reçus), répartie comme suit :

*L. guyanensis* : 82 (85,4%)

*L. braziliensis* : 13 (13,5%)

*L. lainsoni* : 1 (1,1%)

*L. amazonensis* : 0

## 2.2.5. Distribution de souches de Leishmania

En 2011, **480 souches** de *Leishmania* ont été fournies à divers laboratoires et institutions en France et à l'étranger, dont la liste figure ci-dessous :

➤ **En France, 311 souches ont été distribuées :**

- 163 souches à l'UMR 5290 CNRS / 224 IRD / UM1-UM2, Montpellier (dans le cadre, entre autres d'un projet interne de thèse)
- 142 souches au CHRU de La Timone à Marseille,
- 2 souches à Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086, Université de Lyon,
- 2 souches à l'UFR Sciences de Marseille-Luminy,
- 1 souche à la Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud 11,
- 1 souche à Institut Pasteur Research Consulting à Noisy Le Grand.

➤ **A l'étranger, 169 souches ont été distribuées :**

- 97 souches à l'Université de Lausanne – Suisse,
- 31 souches au Center of Disease Control d'Atlanta – Etats Unis,
- 12 souches au Kuvim Centre for Study of Infectious and Tropical Diseases, Jerusalem – Israël,
- 10 souches à l'Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisbonne – Portugal,
- 8 souches à la Lancaster University – Lancaster – Royaume Uni,
- 8 souches au National Reference Centre for Parasitology de Montréal – Canada,
- 2 souches au TvL-Lab, Medical Microbiology and Hygiene Institute de Ulm – Allemagne,
- 1 souche au laboratoire Hippro de Girona – Espagne

Par ailleurs, **142 souches ont été décongelées et recongelées** dans le cadre de l'entretien de la collection de souches du CNRL.

## 2.2.6. Maintien et dynamique de la Collection de souches du CNR

La Collection internationale de souches de *Leishmania* du CNRL est unique au monde, avec plus de 6000 souches originaires de 67 pays, représentant toutes les espèces connues, et isolées sur une grande variété d'hôtes et de vecteurs dans des foyers et des situations épidémiologiques très divers. Son maintien fait appel à une logistique lourde, à une rigueur éprouvée et à une collaboration sans failles avec de nombreuses équipes nationales et internationales.

Le CNR-L s'emploie à faire vivre et progresser cette Collection, devenue essentielle à de nombreux centres hospitaliers et de recherche.

**En 2011, un travail d'enrichissement des renseignements relatifs aux souches de la Collection a été entrepris** par le curateur de la cryobanque (Dr Francine Pratlong), un adjoint-technique, Loïc Talignani, et un Assistant-Ingénieur, Yves Balard, à partir d'une étude rétrospective permettant d'identifier des souches particulières selon des critères précis et habituellement non renseignés.

Ainsi :

- les souches provenant d'un même patient et issues de prélèvements successifs, qu'ils s'agissent de rechutes ou de recontaminations. ont été recensées et identifiées par des codes spécifiques,
- un travail d'identification et de codage a été réalisé sur toutes les souches de *Leishmania* clonées (souches-mère, clones et sous-clones), ainsi que sur les souches provenant d'expérimentations (expérimentations sur l'animal de laboratoire ou sur les Phlébotomes vecteurs).

### **2.2.7. Evolution des tendances**

Les échantillons reçus au CNR-L pour diagnostic moléculaire augmentent régulièrement.

Les nombres de souches reçues au CNR-L se situent aux environs de 180 par an depuis plus d'une dizaine d'années, avec des fluctuations annuelles assez faibles. Les chiffres de 2011 se rapprochent de ceux de 2008 (n = 152), après 2 années de forte activité de réception de souches.

A l'inverse, le nombre de souches distribuées a considérablement augmenté en 9 ans, mais connaît des variations annuelles fortes : 2011 a été une année très active sur ce plan. Il est intéressant de noter que la proportion de centres demandeurs français ou étrangers s'est inversée au cours des 10 dernières années : depuis 2007, ce sont surtout des équipes françaises qui en ont bénéficié.

Ces données témoignent de l'**intérêt de la Collection pour les équipes nationales et internationales**. De plus en plus, ces équipes recherchent des souches parfaitement caractérisées, conservées dans des conditions de rigueur maximales, avec des renseignements associés le plus complets possibles. De même, en ce qui concerne leurs propres isolats, elles sont intéressées par les conditions de conservation rigoureuses et sûres de la Collection du CNR-L.

En ce qui concerne l'**identification de souches**, l'année 2011 a marqué le pas pour l'activité de typage moléculaire, tandis que l'identification iso-enzymatique, technique de référence, mais réservée à certains taxons (*L. infantum*, *L. major*) ou à des études épidémiologiques précises, est restée stable.

### 3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

La surveillance a pour but d'évaluer les foyers autochtones d'endémie leishmanienne, leur dynamique et d'essayer d'anticiper les implications de cette affection au plan de la santé publique, et tout particulièrement au cours de l'infection VIH et chez les sujets subissant des transplantations d'organes. Elle vise également à surveiller les cas d'importation et détecter d'éventuelles augmentations d'incidence dans des foyers endémiques à l'étranger, permettant ainsi d'actualiser les recommandations aux voyageurs dans ces zones d'endémie.

Les leishmanioses ne sont pas en France des maladies à déclaration obligatoire.

Le **recensement annuel des cas de leishmanioses autochtones et importées** diagnostiqués en France a été instauré par le CNR-L en 1998, d'après les déclarations volontaires de cas autochtones ou importés qui lui sont envoyées. Les déclarations sont faites par les établissements publics ou privés de santé, voire par des praticiens libéraux, ainsi que par les Services de Santé des Armées. Ce recensement a porté initialement sur la France métropolitaine, puis a été étendu à la Guyane en 2003. Il continue à être effectué grâce à une fiche de déclaration de cas, téléchargeable sur le site du CNR-L.

#### 3.1. Surveillance des leishmanioses humaines

Le nombre de cas déclarés a presque continuellement augmenté entre 2006 et 2010, sans que l'on ait pu déterminer si cette augmentation est due à une réelle augmentation de l'incidence ou à une meilleure déclaration.

Durant l'année 2011, 267 déclarations de cas sont parvenues au CNRL, dont 93 de structures de santé de France métropolitaine, 1 du CHU de Martinique, 119 du Laboratoire Associé au CNRL à Cayenne et 54 du Département d'Epidémiologie et Santé Publique de l'Institut de Médecine tropicale du Service de Santé des Armées ou des Services de Santé des Armées.

Ces résultats (à la date du 31 mars 2012) sont détaillés ci-dessous. Ils sont susceptibles d'être légèrement augmentés ou modifiés par la suite, certaines déclarations étant encore en suspens, et d'autres déclarations pouvant nous parvenir en retard.

##### 3.1.1. Réseau de partenaires

La liste des services ayant déclaré au CNRL des cas de leishmanioses en 2011 figure ci-dessous.

**Pour les CHU :** les Laboratoires de Parasitologie-Mycologie des CHU suivants : Amiens (80), Brest (29), Dijon (21), Fort-de-France (972), Grenoble (38), Lille (59), Lyon (69), Marseille (13), Montpellier (34), Nantes (44), Nice (06), Nîmes (30), Poitiers (86), Reims (51), Rennes (35), Tours (37), divers établissements de l'AP-HP à Paris (75) (Bichat, Cochin-St Vincent de Paul, St-Louis, Pitié-Salpêtrière).

Pour les CH et CHG : CH Annecy (74), CH Arles (13), CH Avicenne (93), CH Cahors, CH Cayenne (973), CH Le Havre (76), CH Pau (64), CH Perpignan (66), CH Roanne (69), CH Toulon (83), CH Tourcoing (59),

**Pour les Hôpitaux d'Instruction des Armées :** HIA Laveran à Marseille (13), HIA Bégin à Saint Mandé (94), HIA Legouest Metz (54), HIA Sainte Anne Toulon (83).

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

Par ailleurs, un **réseau de partenaires spécifique à la Guyane Française** a été mis en place par le Pr B. Carmes, du Laboratoire-Associé de Cayenne : en premier lieu le service de Dermatologie du CH de Cayenne et les Centres de Santé répartis dans les différentes communes de Guyane; mais aussi les 2 autres hôpitaux de Guyane (Saint-Laurent-du-Maroni et Kourou) et de façon ponctuelle les Laboratoires d'analyses médicales privés, et l'Institut Pasteur.

### 3.1.2. Déclaration de cas

En 2011, un total de **267 cas** a été déclaré au CNRL : **148 fiches** de déclaration de cas ont été **reçues directement au CNRL**, provenant de structures de France métropolitaine (93 déclarations), de Martinique (1 cas) et des Services de Santé des armées (54 cas). Le Laboratoire Associé (Professeur Bernard Carne) du **Centre Hospitalier de Cayenne** nous a adressé **119 déclarations** de cas de LC diagnostiqués en Guyane

La **répartition de ces cas** pour l'année 2011 se fait de la façon suivante toutes structures confondues :

- 31 cas de leishmanioses viscérales,
- 236 cas de leishmanioses cutanées.

Le nombre de cas de leishmanioses déclarés au CNRL est légèrement en baisse par rapport à l'année 2010, et ceci quel que soit la structure déclarante considérée.

Le nombre de cas de **leishmaniose viscérale (LV)** est nettement plus élevé que les années passées avec 31 cas déclarés (moyenne du nombre de cas par an entre 2006 et 2010 : 22.2).

Sur les 31 cas de leishmaniose viscérale, 16 patients étaient immunodéprimés, dont 7 infectés par le VIH. On note que 8 patients sont de sexe féminin et 23 de sexe masculin et que seulement 10/31 cas sont des enfants de moins de 16 ans. Ainsi, en France, la LV continue de toucher essentiellement des patients adultes (moyenne d'âge de 53.4 ans [29-84 ans]).

Tous **les cas autochtones de LV** proviennent de départements du sud de la France situés dans la zone d'endémie leishmanienne connue: 4 cas des Alpes Maritimes, 1 cas de Corse, 1 cas en Ardèche, 1 cas des Bouches du Rhône, 1 cas du Gard, 1 cas du Var, 1 cas du Vaucluse, 3 cas de l'Hérault, 2 cas des Pyrénées Orientales et 2 cas dont l'origine n'est pas précise. Parmi ces cas 9 patients avaient des facteurs d'immuno-dépression (2 étaient infectés par le VIH).

Le nombre de cas de **leishmaniose cutanée (LC)** est identique aux années 2008-2009 et légèrement inférieur à l'année passée. Ceci concerne essentiellement le nombre de contaminations provenant de Guyane qui passe de 197 en 2010 à 130 en 2011. On note un nombre de cas assez élevé de cas de contamination ayant eu lieu dans les pays du Maghreb. Pour l'année 2011, aucun cas de leishmaniose muqueuse n'a été rapporté.

L'origine des contaminations en fonction des formes cliniques pour l'ensemble des cas recensés est présentée dans le tableau ci-dessous.

**Tableau IV. Lieux de contamination pour l'ensemble des cas de leishmanioses recensées en 2011**

Forme clinique	Origine de la contamination						Total
	France métropolitaine	Antilles	Guyane	Maghreb (Algérie, Tunisie, Maroc)	Autre	Indéterminée ou non renseignée	
L. viscérale	17	1	0	3	5	5	31
L. cutanée	7	0	130	35	18	46	236
L. muqueuse	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>1</b>	<b>130</b>	<b>38</b>	<b>23</b>	<b>51</b>	<b>267</b>

**- Cas particulier de la Guyane française :**

Durant l'année 2011 :

- le Laboratoire-Associé du **Centre Hospitalier de Cayenne** (Laboratoire H-U de Parasitologie-Mycologie, Professeur Bernard Carme) nous a adressé 119 déclarations de cas de LC diagnostiqués en Guyane. Parmi les cas pour lesquels le lieu de contamination était renseigné, on retrouve **73** cas en Guyane.
- **les Hôpitaux d'instruction des Armées** (HIA Bégin, Lavéran, Legouest et Sainte Anne) et le Service de Santé des Armées (Département d'Epidémiologie et Santé publique de l'Institut de Médecine tropicale du Pharo) ont déclarés **49** cas de LC avec une contamination en Guyane.
- de plus, parmi les déclarations envoyées par les diverses **structures sanitaires métropolitaines**, **8** concernaient des cas de LC avec une contamination en Guyane.

Ainsi, en 2011, on retrouve un total de 130 cas de contamination en Guyane, ce qui représente une diminution par rapport à 2010. Le détail figure sur le tableau ci-dessous.

**Tableau V.- Cas de leishmaniose cutanée contractés en Guyane en 2011, en fonction de la source de déclaration.**

Déclarations	Nb total	Sexe		Statut		
		H	F	militaire	civil	inconnu
France métropolitaine	8	5	3	1	6	1
CH Cayenne	73	63	10	6	58	9
HIA et SS des Armées	49	49	0	49	0	0
<b>Total</b>	<b>130</b>	<b>117</b>	<b>13</b>	<b>56</b>	<b>64</b>	<b>10</b>

### 3.1.3. Collaboration avec les structures de santé animale pour la surveillance de la leishmaniose canine

Dans le contexte actuel d'avancée de la leishmaniose canine rapportée sur des positions de plus en plus septentrionales et dans un contexte plus général d'émergence de maladies vectorielles animales, en lien ou non avec le réchauffement climatique, la surveillance de la leishmaniose animale, de ses différents vecteurs et de ses réservoirs paraît primordiale tant pour la santé animale que pour la santé publique.

Au cours de l'année 2011, le **Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES de Maisons-Alfort (Dr M. Kasbari)** a poursuivi ses activités relatives à la leishmaniose animale et à son vecteur, en collaboration avec le CNR-L et l'Unité de recherche Vecpar ("Transmission vectorielle et Epidémiologie des maladies parasitaires" - JE 2533, Faculté de Pharmacie, Univ. Reims)

Ces activités ont surtout concerné la **surveillance de cas groupés de leishmaniose canine** dans des zones considérées comme non-endémiques, et donc **possibles foyers "ectopiques"**. Ces "nouveaux foyers" font depuis 2009 l'objet d'une collaboration avec le Dr M. Kasbari.

Deux foyers autochtones hors zone d'endémie, l'un en Bretagne l'autre dans le Jura, respectivement confirmés et suspectés de leishmaniose canine, ont été mis en évidence.

Concernant le foyer breton, les analyses PCR des prélèvements canins ont révélé la présence de *Leishmania infantum*. Les animaux infectés avaient été croisés avec des animaux porteurs asymptomatiques issus de la zone d'endémie. L'enquête entomologique n'a pas à ce jour montré la présence d'espèces de phlébotomes connus pour être vecteurs.

Le foyer du Jura sera étudié en 2012 (cf. Projet).

Par ailleurs, **l'étude du rôle respectif des voies de transmission non-vectorielle et vectorielle** de la leishmaniose canine dans la dynamique de ces foyers "ectopiques" est poursuivie. Depuis 2008-2009, est en particulier étudiée au LSA (ANSES, Maisons-Alfort) l'efficacité des voies de transmission transplacentaire et vénérienne de la leishmaniose chez le réservoir canin. Une proportion sans doute non négligeable des cas de leishmaniose canine, tant en zone d'endémie que hors zone d'endémie sont imputables à la transmission de l'infection de la mère infectée aux chiots ou lors d'accouplements entre animaux sains et porteurs asymptomatiques. Les animaux de plusieurs élevages professionnels canins infectés ont été et demeurent actuellement suivis sur plusieurs générations.

Par ailleurs, des **enquêtes entomologiques** ont été poursuivies dans les départements situés en dehors de la zone d'endémie habituelle de la leishmaniose afin de déterminer la distribution, la nature et la densité des espèces de phlébotomes compétents. Les captures de phlébotomes ont été réalisées en Bretagne (35), en Ile-de-France (91, 94) et en Poitou-Charentes (79). Elles permettront à terme de compléter les données manquantes indispensables pour l'évaluation du risque et de son évolution temporelle et spatiale et de confirmer ou infirmer les modèles prédictifs existants de progression de la leishmaniose canine en France.

Enfin, un appui a été apporté aux **Services vétérinaires et à l'Institut de Recherche Agronomique de Nouvelle-Calédonie** (Dr T. Hue) pour leur enquête sur le premier cas d'apparition de leishmaniose canine sur l'île. Une enquête épidémiologique, entomologique et des analyses de diagnostic et typage des prélèvements ont été conduites sur l'île notamment avec l'appui scientifique du Laboratoire Santé animale de l'ANSES, l'unité Vecpar de Reims et le CNR-L, afin de déterminer l'origine d'un cas confirmé de leishmaniose sur un chien autochtone et d'évaluer le risque de diffusion.

### 3.2. Surveillance de la résistance des *Leishmania* aux produits anti-leishmaniens

La sensibilité des souches de *Leishmania infantum* vis-à-vis des drogues anti-leishmaniennes de première ligne que sont l'amphotéricine B et les dérivés antimoniés peut être étudiée au CNR selon trois systèmes *in vitro* (AIT-LOUDHIA K., GAZANION E., SERENO D., OURY B., DEDET J.P., PRATLONG F., LACHAUD L. In vitro susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. *Vet. Parasitol.* soumis).

Durant l'année 2011, une souche de *L. infantum* isolée d'un patient greffé et présentant des épisodes de rechutes de leishmaniose viscérale a été testée vis-à-vis de l'amphotéricine B. Aucune résistance à cette molécule n'a été mise en évidence.

### 3.3. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux

Le Laboratoire a été Centre Collaborateur de l'O.M.S. pour les Leishmanioses de 2004 à 2008. Le dossier n'a pas été renouvelé en raison d'un manque de notification. Un nouveau dossier a été déposé par le Pr P. Bastien en 2010.

Le CNR-L participe au réseau international de Surveillance de la co-infection *Leishmania*/VIH coordonné par l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO/UNAIDS Surveillance Network), auquel il déclare les cas autochtones de co-infection signalés sur le territoire national.

En 2011, les cas de co-infection avec le VIH signalés sur le territoire national sont au nombre de 8 (7 cas de LV et 1 cas de LC). Parmi les cas de LV, 2 cas étaient autochtones, 3 étaient des cas d'importation (2 Algérie et 1 Djibouti) et 1 cas était lié à une contamination en Martinique, ce qui est assez exceptionnel. Pour 2 cas (1 LV et 1 LC), il n'était pas possible de déterminer avec certitude le lieu de contamination compte tenu des déplacements des patients.

Par ailleurs, le CNR-L participe au réseau européen BBMRI ("Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure").

## 4. ALERTE

En cas de détection de phénomène anormal concernant une augmentation du nombre de cas, ou l'existence de cas groupés, ou une modification éventuelle des formes cliniques, sur le plan local, Le Laboratoire Coordonnateur, aidé du Laboratoire-Associé, se met en contact avec la CIRE Languedoc-Roussillon, ou avec la CIRE Antilles-Guyane pour la Guyane Française.

Si le phénomène concerne le reste du territoire national, les DOM-TOM ou l'étranger, le CNR contacte également le Département des maladies Infectieuses de l'InVS.

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

A la suite des cas groupés observés en 2009-2010, une surveillance des cas provenant du Maghreb a été mise en place au CNR-L. En 2011, aucun phénomène particulier n'a été observé. Un total de 38 cas (35 LC et 3 LV) a été recensé avec une contamination dans l'un des trois pays suivants : Algérie, Maroc et Tunisie.

## 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)) inclut les pages spécifiques au CNR-L. Ce site permet une présentation des leishmanioses, du CNR, du CRB et de son organisation, du catalogue des souches disponibles pour la communauté scientifique, et facilite la mise à disposition des souches grâce à des documents concernant la demande et disponibles en ligne.

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 CNR-L. Ce site est présenté en version française, anglaise et espagnole de façon à permettre son accès à une audience internationale. Il est régulièrement revisité pour mieux individualiser et cibler les pages spécifiques au CNR-L dès la page d'accueil. De même le catalogue de la Collection est accessible dès la page d'accès. A noter que le site ne permet pas la notification directe en ligne des cas de leishmaniose par les services ou les laboratoires.

### 5.2. Formation – Enseignements - Stagiaires

#### 5.2.1. Enseignements :

Des cours sur les leishmanioses sont régulièrement donnés par les membres du Laboratoire dans le cadre d'enseignements du Second et du Troisième Cycle des Etudes Médicales.

La leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse est largement enseignée dans le cadre des DU (Université Antilles Guyane) se déroulant en Guyane : "Pathologie Tropicale", "Dermatologie Infectieuse et Tropicale" ainsi qu'au cours de la Capacité de Médecine Tropicale. Une mini-formation sur les aspects cliniques, le diagnostic et le traitement est délivrée aux médecins affectés dans les centres de santé.

#### 5.2.2. Stagiaires :

Le CNR-L continue d'attirer des stagiaires en quête de formation sur les leishmanioses, et, dans les faits, doit en refuser régulièrement.

**De fin 2010 à fin 2011** : six stagiaires ont été reçus sur 10 périodes de stage.

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

**Tableau VI.- Liste des stagiaires reçus au CNR-L fin 2010 et 2011**

NOM	PRENOM	Affectation	Dates
FATOUX	Marie	Thèse Sciences 2 <sup>ème</sup> Année, Université Lyon (CNRS)	06/09-15/09/10
YAZIDI	Rihab	Technicien, Institut Pasteur de Tunis	20/09-24/09/10
AIT OUDHIA	Khatima	Thèse Sciences 3 <sup>ème</sup> Année, Ecole Vétérinaire d'Alger	07/12/10 - 05/01/11
KASBARI	Mohamed	Thèse Sciences 1 <sup>ère</sup> Année, ANSES, Maisons-Alfort	15/07-30/07/11 26/09-30/09/11 01/11-30/11/11
MUBBASHIR	Hussain	Vétérinaire, Enseignant-Chercheur, Université Koffat, Pakistan	15/07/11 26/09-30/09/11
HAOUAS	Najoua	Projet collaboration, Univ. Monastir, Tunisie	24/12/11 - 21/01/12

### 5.2.3. Conseil aux professionnels de santé :

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

Les numéros de téléphone des praticiens concernés sont inscrits sur le site web du CNR.

Par ailleurs, une adresse mail commune ([cnr-leish@univ-montp1.fr](mailto:cnr-leish@univ-montp1.fr)) a été mise en place en 2011 afin d'offrir une accessibilité plus simple et une possibilité de réponse plus rapide à d'éventuelles requêtes.

#### a) Conseil thérapeutique

Le traitement des leishmanioses est un problème difficile pour plusieurs raisons. Les produits disponibles ont une efficacité limitée, dépendante de l'espèce de *Leishmania* en cause. Ils peuvent exposer à des effets indésirables sévères et requièrent de ce fait des modalités de suivi spécifiques. Il n'existe pas à ce jour d'algorithme décisionnel simple. La complexité du sujet cantonne le savoir-faire thérapeutique à de rares spécialistes. Or, dermatologues, infectiologues, internistes et généralistes français sont confrontés de façon sporadique au traitement de ces maladies. Par ailleurs, sauf situation exceptionnelle, aucune des formes cliniques ne requiert de décision urgente.

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 CNR-L (essentiellement Dr Laurence Lachaud, également Prs. P. Bastien et J.P. Dedet) et les Drs. Pierre Buffet (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Pitié-Salpêtrière) et Gloria Morizot (Institut Pasteur, Paris). Un numéro téléphonique est accessible aux médecins aux heures ouvrables, permettant de proposer dans les 48 heures au sollicitant (médecin français confronté à un cas et fournissant les informations cliniques nécessaires) une solution thérapeutique au cas par cas, reposant sur une connaissance précise de la littérature et sur l'expérience personnelle des intervenants. La responsabilité de prescription demeure toutefois entre les mains du médecin directement en charge du patient. Ce conseil doit en outre permettre d'améliorer le recueil et la déclaration des effets indésirables graves des médicaments anti-leishmaniens en relation avec les services de pharmacovigilance.

En 2011, 40 conseils thérapeutiques ont été donnés, dont 34 pour des cas de LC, 5 pour des LV et 1 pour une LV récidivante avec des lésions de type "PKDL".

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, on cherche à savoir si le conseil a été effectivement suivi et quelle a été l'évolution sous traitement. Une base de données gérée par Pierre Buffet et Gloria Morizot recense toutes les données épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques recueillies lors des entretiens téléphoniques pour ce conseil thérapeutique. Cette base de données est en train d'être étendue à un projet européen. Il est regrettable que le CNR ne puisse pas intégrer entièrement ou partiellement cette base de données, cette situation étant due à la non-acceptation par l'InVS de ce Laboratoire en tant que Laboratoire-Associé en 2011.

#### b) Conseil en matière de diagnostic et typage

Le Dr Christophe Ravel, responsable du diagnostic moléculaire des leishmanioses et du typage des *Leishmania*, reçoit de nombreux appels téléphoniques provenant de professionnels

concernant du conseil en matière de diagnostic moléculaire ou d'interprétation des données de typage. Ces appels ne sont toutefois pas tracés.

#### **5.2.4. Liste des activités d'expertises auprès du Ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC...) ou internationale (OMS...)**

- Le CNR-L participe au réseau international de Surveillance de la co-infection *Leishmania*/VIH coordonné par l'**Organisation Mondiale de la Santé** (WHO/UNAIDS Surveillance Network), auquel il déclare les cas autochtones de co-infection signalés sur le territoire national.
- Des avis sur le risque d'introduction et de diffusion en France de leishmanies du Nouveau monde ont été demandés par la **DGAL (Ministère de l'Agriculture) au Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES** avant délivrance d'autorisation administrative d'importation de tamanoirs et de fourmiliers géants (*Tamandua tetradactyla*, *Myrmecophaga tridactyla*) à partir du Brésil vers des parcs zoologiques français qui en ont fait l'acquisition. En effet, ces animaux sont connus pour être des réservoirs naturels potentiels de leishmanies, notamment *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, ou *L. amazonensis*. Cependant, ces espèces de leishmanies étant transmises par les vecteurs du genre *Lutzomyia* absents hors Amérique, et sachant que les phlébotomes européens ne sont pas permissifs pour la transmission des leishmanies du Nouveau Monde, l'autorisation d'importation a été accordée sous condition du respect des conditions sanitaires et réglementaires habituelles.
- Par ailleurs, un appui a été apporté aux **Services vétérinaires et à l'Institut de Recherche Agronomique de Nouvelle-Calédonie** (Dr T. Hue) pour leur enquête sur le premier cas d'apparition de leishmaniose canine sur l'île. Une enquête épidémiologique, entomologique et des analyses de diagnostic et typage des prélèvements ont été conduites sur l'île notamment avec l'appui scientifique du Laboratoire Santé animale de l'ANSES, l'unité Vecpar de Reims et le CNR-L, afin de déterminer l'origine d'un cas confirmé de leishmaniose sur un chien autochtone et d'évaluer le risque de diffusion.

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

Le CNR-L a participé à plusieurs programmes de recherche conduits dans le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie et dans l'unité labellisée "MiVEGEC" : "**Maladies infectieuses et vecteurs : écologie, génétique, évolution et contrôle**" (UMR 5290 CNRS / 224 IRD / UM1/UM2; dir. D. Fontenille).

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

### **6.1. Etude des caractéristiques épidémiologiques et du polymorphisme iso-enzymatique des souches de la Collection**

#### **6.1.1. Souches de leishmanioses viscérales**

Un travail rétrospectif d'analyse des souches présentes dans la Collection est réalisé à intervalles réguliers, portant à la fois sur les aspects épidémiologiques, noso-géographiques et taxonomiques.

Ainsi : Le polymorphisme enzymatique d'une série de **2277 souches de *Leishmania* de notre collection** responsables de leishmaniose viscérale dans l'Ancien Monde (38 pays) a fait l'objet d'un article de synthèse actuellement soumis à publication.

Avec le même objectif et en complément, un article est actuellement en cours de rédaction sur le polymorphisme enzymatique de **2276 souches de *Leishmania***, de notre collection, responsables surtout de leishmanioses viscérales de l'Ancien Monde (38 pays) :

**PRATLONG F., LAMI P., RAVEL C., BALARD Y., DEREURE J., SERRES G., EL BAIDOURI F., RIOUX J.A., DEDET J.P.** Geographical distribution and epidemiological features of Old World *L. infantum* and *L. donovani* foci, based on isoenzyme analysis of 2,277 strains soumis en 2011.

### **6.1.2. Souches d'origine canine :**

A l'occasion d'une thèse en co-tutelle avec l'Ecole Vétérinaire d'Alger, un travail de synthèse sur la leishmaniose canine portant sur le polymorphisme isoenzymatique de **1023 souches de *Leishmania*** isolées de 1981 à 2009 dans 15 pays du Bassin a été publié. Douze zymodèmes ont été identifiés, bien que 86% des souches appartiennent au classique zymodème MON-1.

AIT-OUHDIA K., HARRAT Z., BENIKHLEF R., **DEDET J.P., PRATLONG F.** Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* causing canine leishmaniasis : a review including 996 strains of the Mediterranean area, with special reference to Algeria. *Acta Tropica* 2011, 118: 80-86.

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

Depuis 2008, le CNR-L est partenaire d'un essai thérapeutique portant sur la paromomycine-onguent dans le traitement de la leishmaniose cutanée à *L. major* en Tunisie. Ce projet se fait en collaboration avec le Walter Reed Army Institute of Research à Washington (Dr M. Grogil), l'Institut Pasteur de Tunis (Pr A. Ben Salah), l'Institut Pasteur de Paris (G. Morizot) et le Service de Parasitologie-Mycologie de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière (Dr P. Buffet). Dans cet essai, le CNR-L est chargé de l'identification de 70 à 100 souches qui sont isolées chaque année à partir de patients par l'équipe Tunisienne. Dans un but de contrôle, environ 20% de ces souches sont également typées par la technique de référence basée sur les isoenzymes. Ces souches sont par ailleurs cryoconservées dans la cryobanque de Montpellier et pourront servir de référence, en particulier pour d'éventuelles études longitudinales de résistance des parasites aux drogues anti-leishmaniennes.

## **6.3. Projet ANR « Impact de l'anthropisation et de l'environnement sur le fonctionnement des foyers de leishmanioses »**

Ce projet, débuté en 2007, 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. Conséquence de difficultés d'échantillonnage sur le terrain, ce projet a été prolongé d'une année, sur 2011.

Dans le cadre de ce projet qui a débuté en 2007, le Laboratoire a eu en charge le typage moléculaire MLST des souches Sud-Américaines, et des études comparatives de nos résultats avec les marqueurs moléculaires développés par V. Rougeron et al. sont en cours.

#### **6.4. Projet DGRST "Eco-épidémiologie de la leishmaniose cutanée à *Leishmania killicki* en Tunisie"**

Il s'agit d'un projet collaboratif avec le Pr. H. Babba, de la Faculté de Pharmacie de Monastir en Tunisie, avec lequel le Laboratoire entretient une collaboration de longue date. Ce projet a fait l'objet d'un financement conjoint du CNRS et de la DGRST.

Projet 2009-2011 N° 22 635 : CNRS-DGRST

Responsable scientifique du projet pour la partie française : Dr F. Pratlong

Titre du projet : «Eco-épidémiologie de la leishmaniose cutanée à *Leishmania killicki* en Tunisie. Développement d'outils moléculaires pour la caractérisation du parasite, du vecteur et des réservoirs potentiels dans le foyer originel et les foyers émergents ».

Ce projet a généré une publication en 2011 : JAOUADI K., HAOUAS N., CHAARA D., GORCII M., CHARGUI N., AUGOT D., PRATLONG F., DEDET J.P., ETTLIJANI S., MEZHOUD H., BABBA H. First detection of *Leishmania killicki* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in *Ctenodactylus gundi* (Rodentia, Ctenodactylidae), a possible reservoir of human cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Parasites & Vectors*, **2011**, 4 : 159.

#### **6.5. Programme de collaboration avec l'Ecole Vétérinaire d'Alger**

L'étude de la sensibilité de souches de *L. infantum* isolées de chiens de la banlieue algéroise vis-à-vis des antimonies (SbIII et SbV) et réalisée par le Dr L. Lachaud en collaboration avec le Dr K. Aït-Oudhia, a été soumise à publication : AIT-OUHDIA K., GAZANION E., SERENO D., OURY B., DEDET J.P., PRATLONG F., LACHAUD L. In vitro susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. *Vet Parasitol* soumis.

#### **6.6. Programme conjoint de bourse franco-pakistanaise avec l'université de Kohat (Pakistan)**

Dans le cadre d'un programme conjoint de bourse franco-pakistanaise lancé en juillet 2010, et à la suite d'une demande d'appui scientifique et technique de l'université de Kohat, le Dr vétérinaire M. Hussain, enseignant-chercheur au Département de Microbiologie (Kohat, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan) a été accueilli au **LSA à l'ANSES de Maisons-Alfort** et au CNRS pendant 6 mois pour la mise en place des techniques d'isolement et de culture de leishmanies à partir de prélèvements canins, de diagnostic par ELISA et de typage par PCR-RFLP des parasites *L. tropica* et *L. donovani* chez le réservoir animal et humain.

Les outils mis en place serviront à des fins d'enquêtes épidémiologiques, de diagnostic et de lutte contre les foyers épidémiques de leishmaniose humaine (et animale) actuellement en extension dans cette région reculée du Pakistan où la population très pauvre n'a pas accès au diagnostic et au traitement de la leishmaniose.

## 7. LISTE DES PUBLICATIONS

### 7.1. Publications nationales

BUFFET P.A., ROSENTHAL É., GANGNEUX J.P., LIGHTBURNE E., COUPPIE P., MORIZOT G., LACHAUD L., MARTY P., DEDET J.P. Traitement des leishmanioses en France: proposition d'un référentiel consensuel. *Presse Med.*, 2011, 40 : 173-84.

### 7.2. Publications internationales

AIT-LOUDHIA K., HARRAT Z., BENIKHLEF R., DEDET J.P., PRATLONG F. Canine *Leishmania infantum* enzymatic polymorphism: a review including 1023 strains of the Mediterranean area, with special reference to Algeria. *Acta Tropica*, 2011, 118 : 80-86.

BAÑULS A. L.\* , BASTIEN P.\*, POMARES C., AREVALO J., FISA R., HIDE M. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. *Clin Microbiol Infect* 2011, 17: 1451–1461.

BASTIEN P. Leishmaniasis control: what part for development and what part for research? (Editorial). *Clin Microbiol Infect* 2011, 17: 1449–1450.

BOUBIDI S.C., BENALLAL K., BOUDRISSA A., BOUIBA L., BOUCHAREB B., GARNI R., BOURATBINE A., RAVEL C., DVORAK V., VOTYPKA J., VOLF P., HARRAT Z. *Phlebotomus sergenti* (Parrot, 1917) identified as *Leishmania killicki* host in Ghardaïa, south Algeria. *Microbes Infect.*, 2011, 13: 691-6. .

FARKAS R., TÁNCZOS B., BONGIORNO G., MAROLI M., DEREURE J., READY P.D. First surveys to investigate the presence of canine leishmaniasis and its phlebotomine vectors in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2011, 11: 823-34.

FAUCHER B., POMARES C., FOURCADE S., BENYAMINE A., MARTY P., PRATLONG L., FARAUT F., MARY C., PIARROUX R., DEDET J.P., PRATLONG F. Mucosal *Leishmania infantum* leishmaniasis : specific pattern in a multicentre survey and historical cases. *Journal of Infection*, 2011, 63 : 76-82

FRANCO A.O., DAVIES C.R., MYLNE A., DEDET J.P., GALLEGO M., BALLART C., GRAMICCIA M., GRADONI L., MOLINA R., GALVEZ R., MORILLAS-MARQUEZ F., BARON-LOPEZ S., ALVES PIRES C., AFONSO M.O., READY P.D., COX J. Predicting the distribution of canine leishmaniasis in Western Europe based on environmental variables. *Parasitology*, 2011, 138: 1878-1891

JAOUADI K., HAOUAS N., CHAARA D., GORCII M., CHARGUI N., AUGOT D., PRATLONG F., DEDET J.P., ETTLIJANI S., MEZHOUH H., BABBA H. First detection of *Leishmania killicki* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in *Ctenodactylus gundi* (Rodentia, Ctenodactylidae), a possible reservoir of human cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Parasites & Vectors*, 2011, 4 : 159

ROUGERON V, BAÑULS AL, CARME B, SIMON S, COUPPIÉ P, NACHER M, HIDE M, DE MEEÛS T. Reproductive strategies and population structure in *Leishmania*, the case of *L. guyanensis*: another brick in the wall? *Mol. Ecol.* 2011, 20: 3116-3127.

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

ROGER A, M. HANF, C. BASURKO, N. NACHER, B. CARME, P. COUPPIE. Climat et leishmaniose en Guyane. *Société Française de Parasitologie*, Strasbourg, Mai 2011, CA28.

#### **7.5. Communications à congrès internationaux**

STERKERS Y., LACHAUD L., BOURGEOIS N., CROBU L., BASTIEN P., PAGÈS M. The Far Side of genomics: 'mosaic aneuploidy' in *Leishmania* (Comm. orale). *EMBO Conference "Comparative Genomics of Eukaryotic Microorganisms: Understanding The Complexity of Diversity"*, 15-20 Oct. 2011, San Feliu de Guixols, Espagne

#### **7.6. Conférences sur invitation dans congrès et réunions nationaux**

DEDET J.P. Les difficultés du contrôle des leishmanioses. *9èmes Journées des Sciences Vétérinaires*, Alger, Algérie, 20-21 avril 2011 (Conf. invitée).

#### **7.7. Conférences sur invitation dans congrès et réunions internationaux**

PRATLONG F., RAVEL C., DEDET J.P., BASTIEN P. The *Leishmania* international biobank of Montpellier (France), a valuable resource for parasite genetics and genomics (Conf. invitée). Colloquium "*Leishmania Genomics*", *International Exploratory Meetings of the Swiss National Science Foundation*, Lausanne, Suisse, 2-5 Oct. 2011

BOURGEOIS N., LACHAUD L., STERKERS Y., PAGÈS M., BASTIEN P. 'Chromosomal mosaicism' and genomic/genetic contents of *Leishmania*, OR How to organize disorder ? (Conf. invitée). Colloquium "*Leishmania Genomics*", *International Exploratory Meetings of the Swiss National Science Foundation*, Lausanne, Suisse, 2-5 Oct. 2011

## 8. PROGRAMME D'ACTIVITE 2012-2013

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, le CNR-L s'efforcera d'améliorer ses performances et d'accroître ses activités, comme il l'a fait depuis sa création.

### 8.1. Activités d'Expertise

#### 8.1.1. Maintien et dynamique de la Collection de souches du CNR

##### 8.1.1.1. Enrichissement des renseignements relatifs aux souches

La richesse des renseignements relatifs à chaque souche nécessite un travail de contrôle et de synthèse pour faire apparaître certains groupes ou catégories de souches et rendre ainsi plus accessible la Collection en fonction de ce qu'on recherche.

Le curateur de la cryobanque (Dr Francine Pratlong), connaissant et pratiquant cette collection depuis sa création, a entrepris avec un adjoint-technique, Loïc Talignani, et un Assistant-Ingénieur, Yves Balard, un travail rétrospectif permettant d'identifier certaines souches particulières selon des critères précis et habituellement non renseignés (cf. 2.2.8).

En 2012-2013, lorsqu'un travail de thèse ou un article utilisant les souches de la Collection apportent des données intéressantes comme par exemple **la sensibilité du parasite aux anti-leishmaniens** ou bien **la virulence et l'infektivité des souches**, ces données seront intégrées à la fiche électronique de chaque souche concernée.

Un travail de plus grande ampleur sera également débuté, visant à inclure d'éventuelles **références bibliographiques** des articles ayant utilisé et mentionnant telle ou telle souche.

Ces évolutions constituent une **valorisation supplémentaire** importante de la Collection.

##### 8.1.1.2. Projet d'évolution du logiciel et de la base de données du CNR

Le laboratoire est engagé au sein du réseau national des CRB micro-organismes (FBRCMi) dans un projet commun de base de données, BRC-LIMS, qui prévoit la prise en charge totale de la gestion de la collection. Ce projet initié en 2009 par l'institut Pasteur et soutenu par le GIS IBiSA (Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie) a, après une pause en 2010, été en partie finalisé cette année par la société Ajilon IT Consulting.

Les différentes évolutions projetées pour ModulBio, notre application actuelle, ont donc été reportées et tout notre intérêt s'est concentré sur le développement de BRC-LIMS. Le déploiement dans les différents CRB ainsi que les phases de test sont prévues pour 2012. Afin de mener à bien l'ensemble de ces tests et éviter tout risque pour l'application utilisée actuellement, un nouveau serveur a été acheté. Fin 2012, après validation, BRC-LIMS devrait devenir l'application principale de gestion de la Collection.

##### 8.1.2. Participation à l'évaluation et à l'amélioration du diagnostic moléculaire des leishmanioses

Dans le cadre de la mise en place d'un Contrôle de Qualité inter-laboratoires (CIL) pour le diagnostic PCR des Leishmanioses, une étude comparative sur la quantification de la charge parasitaire sur le sang a été initiée en 2011 entre les Laboratoires de Montpellier, Marseille et Nice, laboratoires du Sud de la France qui reçoivent le plus de demandes de diagnostic de leishmanioses. La méthodologie de détection est globalement la même pour les trois Laboratoires

(PCR en temps réel avec sonde TaqMan, d'après le protocole de Mary et al. 2004). La sensibilité de la technique actuelle de diagnostic est très bonne (en pratique inférieure à 1 parasite/ 5 mL de sang) et il ne semble pas qu'elle puisse être beaucoup améliorée. Cependant, différentes étapes (extraction d'ADN, définition de calibrateurs, etc.) restent à comparer et à uniformiser. Ce CIL devrait être étendu à une dizaine d'autres centres français en 2012.

### **8.1.3. Participation au développement et à l'évaluation des techniques d'identification (CNR de Montpellier, CC de Marseille)**

#### **8.1.3.1. Développement de l'identification moléculaire (Montpellier)**

Ces dernières années un travail systématique d'analyse par MLST (MultiLocus Sequence Typing) de toutes les espèces de *Leishmania* a été engagé dans le Laboratoire. Cette méthodologie s'avère très résolutive.

Elle doit contribuer aux projets du groupe de travail européen « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation », destiné à harmoniser les pratiques de prise en charge thérapeutique des patients atteints de leishmaniose, et dans lequel le Laboratoire Coordonnateur est impliqué.

Parallèlement, le Laboratoire proposera, en s'appuyant sur les analyses bioinformatiques des données MLST déjà produites, de choisir un locus génomique ayant une efficacité maximale pour l'identification spécifique et utilisable en pratique quotidienne par d'autres laboratoires.

En parallèle, il sera important de poursuivre la constitution d'une base de données MLST appliquée à toutes les souches de la Cryobanque de Montpellier. Des données sont actuellement disponibles pour environ 400 souches sur les 6000 cryoconservées.

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

Ce projet sera entrepris par le **Centre Collaborateur de Marseille (Pr. R. Piarroux)**, en collaboration avec le LPMM à Montpellier.

Une nouvelle approche de typage, basée sur l'analyse de spectres de masse obtenus par la technique de Maldi-Tof (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight) est en cours de mise au point dans ce CC. Les premiers résultats sont très encourageants et montrent que cette technique permettra à terme de faire une pré-identification de l'espèce dans un délai extrêmement court à partir de parasites en culture. Un nombre important de souches formellement identifiées par le CNR-L et couvrant diverses espèces différentes de Leishmanies a été envoyé par le CNR pour la mise au point d'une technique d'obtention d'empreintes et pour la création d'une banque d'empreinte de référence. Cette banque d'empreintes permettra ensuite l'identification et le typage de nouvelles souches isolées de prélèvements humains.

L'application de cette technique aux souches de *Leishmania* devrait indubitablement réduire les délais d'identification et de typage par rapport aux autres techniques utilisées à l'heure actuelle comme l'analyse iso-enzymatique, l'identification moléculaire ou le MLST.

## **8.2. Contribution à la surveillance des leishmanioses**

### **8.2.1. Surveillance des leishmanioses humaines**

#### **8.2.1.1. En France métropolitaine (Montpellier)**

Le Laboratoire coordonnateur à Montpellier continuera à assurer le **recensement des cas de leishmanioses diagnostiqués sur le territoire métropolitain**, qu'ils soient autochtones ou importés. Dans le département de la Guyane, le Laboratoire-Associé "Guyane" du **Centre**

**Hospitalier de Cayenne** (Pr. B. Carme) centralisera les déclarations de cas pour la Guyane qui continueront à être transmises au CNR des *Leishmania* (cf. § 8.2.2.)

Les statistiques seront mises sur le site internet du CNRL, et annuellement mises à jour. Un **retour d'information** sera fait auprès des Laboratoires et Services ayant déclaré des cas durant l'année écoulée.

Notre laboratoire continuera à **participer au Réseau sur la surveillance de la co-infection leishmaniose/SIDA** mis en place par l'Organisation Mondiale de la Santé, et au registre des cas de co-infection dans le sud de l'Europe.

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

Le travail de Thèse de Diana Pellet (cf. § D.3.1.4) a déjà permis d'initier ce type de travail dans le département de l'Ardèche auprès des médecins généralistes et dermatologues. Cette approche sera intensifiée. Par ailleurs, des visites sur sites dans les Pyrénées-Orientales sont prévues afin de sensibiliser les différents intervenants à l'intérêt des déclarations des cas humains de leishmaniose. Ce sera aussi l'occasion de présenter le référentiel de prise en charge thérapeutique qui a été publié en 2010 et de mettre en place un protocole d'évaluation de la prise en charge thérapeutique.

Le système envisagé prévoit dans sa structuration des relances périodiques par voie de mail ou courrier (voire d'appels téléphoniques pour mieux renseigner certaines questions spécifiques). Ces envois ainsi que leurs réponses sont tracées. Une adresse mail sera mise à la disposition de tous les laboratoires (à partir du site Internet du Laboratoire) pour toutes questions relatives à la déclaration des cas, permettant ainsi une réponse rapide; l'ensemble des mails sera tracé et conservé par le Laboratoire Coordonnateur.

Enfin, un travail similaire à celui réalisé en 2007 (cf. § D.3.1.5) sera à nouveau effectué avec l'aide du Département d'Informatique Médicale du CHRU de Montpellier. L'exhaustivité de la surveillance sera estimée en réalisant la comparaison des résultats des déclarations de cas faites au CNR-L avec la base de données nationale du PMSI qui recueille tous les séjours hospitaliers publics ou privés.

En ce qui concerne les cas de leishmanioses à *L. guyanensis* du personnel des Armées, il est important que le CNR intensifie sa collaboration avec les **Services de Santé des Armées** afin d'obtenir des données épidémiologiques, cliniques et de suivi thérapeutique encore plus complètes et ainsi d'établir des protocoles de prévention et de prise en charge.

Ces différentes actions permettront de mettre en place un véritable **réseau d'épidémiologie-surveillance des leishmanioses** en France.

### **8.2.1.2. En Guyane Française (L-A de Cayenne)**

#### **a) Amélioration de l'exhaustivité de la surveillance**

Un effort d'organisation et de motivation des différents partenaires sera mené afin de mieux connaître le véritable niveau d'endémie. Y a-t-il sous-estimation des cas et si oui dans quelle proportion ? Ces dernières années, l'incidence (difficilement) évaluée est nettement inférieure aux estimations anciennes.

Les difficultés à résoudre sont connues et demandent :

- Motivation des acteurs et bonne mise en application des instructions fournies aux personnels soignants des Postes et Centres de Santé avec l'objectif de réduire les

difficultés comme celles liées au « turn over » élevé du personnel, à une orientation et une sensibilité plus diagnostic individuel que santé publique.

- Connaissance et prise en compte d'événements extérieurs source de biais : fermeture d'un centre de santé pour des raisons de sécurité, variation du nombre de consultants selon les opérations de lutte contre l'orpaillage, etc ...
- Nécessité d'unifier les relevés de cas en tendant vers l'exhaustivité Une organisation avec la CIRE Antilles-Guyane sera recherchée avec au mieux l'intégration de la leishmaniose cutanée dans les pathologies officiellement surveillées par cet organisme. Le LHUPM est déjà en relation avec cette CIRE, site Guyane / ARS Guyane, pour la transmission des données de paludisme du CH de Cayenne.

Les règles de recueil des données et les modalités de transmission au Centre Coordonnateur de Montpellier se feront selon les mêmes règles qu'actuellement.

## **b) Surveillance des possibles cas de leishmaniose viscérale humaine et animale**

### **Chez l'homme :**

La leishmaniose viscérale n'est pas endémique en Guyane contrairement à d'autres pays de la région (Brésil, Venezuela). Son implantation est favorisée par la forte prévalence de l'infection à VIH en Guyane mais aussi par l'importance des migrants en provenance du Brésil. Cela impose une surveillance du fait des mouvements migratoires (homme et animaux). La recherche sera systématique par PCR en temps réel en cas de suspicion clinique, associée à la sérologie classique, avec des indications élargies chez les sujets immunodéprimés.

### **Chez l'animal :**

Recherche et/ou identification d'espèces à la demande des services et des praticiens vétérinaires suspectant une infection à *L. infantum*, chez le chien en premier lieu.

## **c) Optimisation de la confirmation parasitologique, détermination des espèces et recueil des souches**

Nous chercherons à obtenir une confirmation parasitologique le plus souvent possible en essayons de se rapprocher de l'exhaustivité des cas ayant abouti à une consultation en milieu médical. Pour ce faire, nous préconisons la réalisation systématique d'une mini-biopsie type "punch", associée au recueil des prélèvements de sécrétions dermiques des lésions. La biopsie permettant la mise en culture facilite d'autant l'identification de l'espèce et permet d'isoler et de conserver les souches. Dans certains cas, les techniques de PCR-RLFP pourront être réalisées à partir de la biopsie elle-même (culture négative, contaminée ou non réalisée).

Les données recueillies permettront entre autres de surveiller l'émergence de *L. braziliensis* dans ce département.

## **d) Etudes épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques**

Le dernier objectif est d'actualiser les données de nature épidémiologique (en particulier l'influence des paramètres climatiques) mais aussi relatives aux présentations cliniques et aux aspects thérapeutiques.

Il implique la participation du service de Dermatologie avec lequel nous avons une étroite et ancienne collaboration (Pr. Pierre Coupié) et avec l'aide méthodologique apportée par le CIC-EC (Pr. Mathieu Nacher).

Il s'agit de :

- parfaire nos connaissances concernant la leishmaniose à *L. guyanensis*.
- préciser les aspects particuliers des atteintes dues aux autres espèces, tout particulièrement *L. braziliensis*.
- décrire les spécificités en cas de déficit immunitaire (infection rétrovirale VIH, HTLV1).

### **8.1.5. Collaboration avec les structures en santé animale pour la surveillance de la leishmaniose canine**

Les projets de collaboration concernent surtout l'ANSES et l'étude de la dynamique des foyers d'extension possible de la maladie en zone considérée comme non-endémique (foyers dits "ectopiques"). Plusieurs aspects seront développés.

#### **8.1.5.1. Etude de la dynamique des foyers "ectopiques" de leishmaniose canine**

L'étude des foyers ectopiques identifiée au cours des deux dernières années sera poursuivie, et s'intéressera à la fois aux aspects parasitologiques (diagnostic, isolement et identification de souches), entomologiques (cf. *infra*) et épidémiologiques.

Concernant le Jura, des enquêtes épidémiologique et entomologique seront conduites respectivement au début de l'année et à l'été 2012. La présence de *Phlebotomus perniciosus*, vecteur compétent de *L infantum*, ayant été décrite par le passé dans les départements limitrophes du Jura (côte d'or, Saône-et-Loire), la circulation à bas bruit de la maladie dans le réservoir animal semble possible et mérite prospection.

#### **8.1.5.2. Enquêtes entomologiques**

Les piégeages de phlébotomes vecteurs réalisés en régions Poitou-Charentes, Bretagne et Ile-de-France, en collaboration avec l'Unité VECPAR, seront poursuivis pour déterminer la distribution, la nature et la densité des espèces de phlébotomes hors zone d'endémie. Ils fourniront les données manquantes indispensables pour l'évaluation du risque et de son évolution temporelle et spatiale dans ces zones.

## **8.4. Conseil, Information, Formation**

Le CNR-L contribuera à la mise à jour annuelle des **recommandations aux voyageurs** par l'InVS, d'une part par des données actualisées sur les leishmanioses importées et d'autre part le suivi des zones d'endémie dans le monde. Les données concerneront surtout le Maghreb et la Guyane Française.

Il nous semble aussi intéressant de développer une politique d'information pour les personnes se rendant au Maghreb pour une longue durée (1 à 2 mois) durant la saison de transmission de *Leishmania major* afin d'éviter une recrudescence de cas de leishmaniose cutanée à *L. major* importées du Maghreb (cf. Alerte 2009-2010). Ceci se fera en collaboration avec la CIRE Languedoc-Roussillon.

## **8.5. Recherche en lien direct avec l'activité du CNR**

Les projets de recherche en cours seront développés particulièrement dans leur interface avec le CNR-L, à la fois dans et entre le Laboratoire Coordonnateur, le Laboratoire-Associé et les Centres Collaborateurs.

### **8.5.1. Projet européen EDENext**

Le Laboratoire Coordonnateur est partenaire dans un nouveau projet européen qui a débuté en 2011 pour 4 ans, et dont les thèmes entrent parfaitement dans la mission de surveillance du CNR-L; ils répondent en effet à plusieurs des recommandations spécifiques faites par le

Comité des CNR pour le CNR-L : suivi de l'évolution des zones d'endémie dans le monde, et contribution aux systèmes de surveillance internationaux, en particulier européen.

Le projet EDENext (*Biology and control of vector-borne infections in Europe*), financé dans le cadre du programme européen FP7, fait suite au projet FP6 EDEN, auquel le Laboratoire avait déjà contribué. Il s'agit d'un consortium de 42 partenaires de 22 pays européens et pays associés. Ses objectifs sont de comprendre les processus biologiques et éco-épidémiologiques menant à l'établissement, au maintien et à l'extension des maladies transmises par vecteurs, dont les leishmanioses; à moyen terme, il vise à mettre en place de meilleurs outils de surveillance et de prévention de ces maladies. Les risques d'épidémies seront particulièrement étudiés. L'étude des taux d'infection chez les vecteurs et les réservoirs permettra de mettre à jour les cartes de risques des leishmanioses en Europe.

Le Laboratoire est impliqué dans le sous-programme PhBD (*Plebotomus-Borne Diseases*) par l'une des équipes de recherche qui y sont rattachées (Dr C. Ravel, équipe GeneSys, dir. A.L. Banuls, UMR "MiVEGEC" 5290 CNRS /224 IRD /UM1). Son rôle spécifique est d'étudier la diversité génétique des souches de *Leishmania* transmises dans les foyers étudiés en France et au Maroc. L'un des Laboratoires Collaborateurs (USC VECPAR, JE 2533, J. Depaquit, Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Reims) est également largement impliqué dans ce sous-programme.

### **8.5.2. Projet européen « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation ».**

Un groupe de travail destiné à harmoniser les pratiques de prise en charge thérapeutique des patients atteints de leishmaniose s'est réuni pour la première fois en janvier 2010 à Bâle et plusieurs fois depuis, avec la participation d'un membre du CNR-L (C. Ravel). Ce groupe rassemble des biologistes et cliniciens de plusieurs pays Européens (UK, Suisse, France, Espagne, Allemagne, Pays Bas, Belgique, Portugal).

Le Dr C. Ravel contribue en particulier à ce projet (i) en étant responsable de la partie typage moléculaire; (ii) en mettant à disposition de toutes les équipes des échantillons d'ADN de toutes les espèces de *Leishmania*, avec l'objectif d'harmoniser les techniques d'identification moléculaires des parasites, étape clé dans la prise en charge thérapeutique. Des analyses comparatives ont été faites entre différents systèmes de typage pour déterminer leur résolutivité et leur valeur pratique.

Ce projet sera soumis à financement par l'UE dans le cadre du FP7.

### **8.5.3. Recherche en santé humaine en collaboration avec les Centres Collaborateurs du CNR**

Le Centre Collaborateur de Marseille, outre l'identification des espèces de *Leishmania* par spectrométrie de masse (cf. § 8.1.3), poursuit deux projets de recherche en collaboration avec le CNR-L :

- **Etude des chimio-résistances de *Leishmania infantum* (Dr Ch. Mary)**
- **Epidémiologie et géographie de la leishmaniose viscérale autochtone** dans les deux régions les plus touchées par cette maladie en France (PACA, puis Languedoc-Roussillon) (**Pr. R. Piarroux**). Le CC de Marseille utilise de manière systématique les Systèmes d'Informations Géographiques associés aux logiciels de modélisation afin de représenter et d'analyser l'épidémiologie de la leishmaniose autochtone. Ce travail, particulièrement nécessaire dans le contexte actuel d'extension du territoire touché par la maladie, porte sur la région Provence-Alpes Côte d'Azur et notamment sur le foyer provençal; il sera généralisé à tout le pourtour méditerranéen français. Il permettra d'évaluer l'impact des mesures de lutte comme celles ciblant le réservoir canin, ce qui est particulièrement important dans le contexte actuel de diffusion de

colliers à la deltaméthrine et d'arrivée sur le marché d'un vaccin anti-leishmanien destiné à ce réservoir domestique.

#### **8.5.4. Recherche en collaboration avec les structures travaillant en santé animale**

##### **8.5.4.1. Evaluation de l'exposition des populations humaines et animales aux phlébotomes vecteurs, en zone et hors-zone d'endémie en France**

Le projet "**PhlebExpo**" est un projet de recherche déposé en mai 2011 conjointement par le Laboratoire Santé Animale de l'**ANSES de Maisons-Alfort (Dr M. Kasbari)**, le CNR des Leishmanioses et l'Unité de recherche Vecpar (Univ. Reims) suite à l'appel d'offre EST 2011 du programme Environnement-Santé-Travail de l'ANSES. Il a été sélectionné et financé pour 30 mois (2012-2015). Son objectif général est d'évaluer le niveau d'exposition réelle, sur le terrain, des populations humaine et animale aux piqûres de phlébotomes en zone d'endémie de leishmaniose, mais également hors zone d'endémie, et ce, à l'aide de tests ELISA et Western blot à développer, basés sur les antigènes salivaires de phlébotomes, et capable de détecter chez l'homme et le chien, les anticorps anti-salive du vecteur, biomarqueurs reconnus d'exposition aux piqûres. Ces futures données d'exposition, corrélées aux données de séroprévalence de la leishmaniose canine et humaine ainsi qu'aux données entomologiques des piégeages, devraient permettre une meilleure évaluation du risque d'infection et une mise à jour de son inscription spatiale en France.

##### **8.5.4.2. Surveillance de possibles foyers de leishmaniose "ectopiques" en France**

Il s'agit là encore d'une collaboration avec le Laboratoire Santé Animale de l'**ANSES de Maisons-Alfort (Dr M. Kasbari)** et l'**unité Vecpar (Univ. Reims)**.

Outre le foyer breton, dont les cas groupés continuent de faire l'objet d'une surveillance accrue, le foyer suspecté dans le Jura sera étudié par des enquêtes épidémiologique (séroprévalence de la leishmaniose canine) et entomologique (nature et densité des espèces de phlébotomes), en particulier autour des foyers canins.

Par ailleurs, des campagnes entomologiques seront poursuivies en Ile de France et dans l'Ouest de la France : départements ciblés en 2012 : Seine et Marne (77), Val d'Oise (95), Cotes d'Armor (22), Finistère (29).

#### **8.5.5. Autres projets de recherche en collaboration**

##### **a) En France**

Plusieurs collaborations sont en cours avec l'**UMR 5290 CNRS-IRD-Université Montpellier 1** (Dr D. Fontenille ) au sujet de l'épidémiologie du portage sain de la leishmaniose viscérale méditerranéenne (A.L. Banuls), de la résistance de *L. infantum* aux antimoniés (D. Sereno) et de l'identification moléculaire des *Leishmania* (C. Ravel).

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

##### **b) A l'étranger**

Des **collaborations avec la Tunisie** (Pr. H. Babba, Faculté de Pharmacie de Monastir) et **l'Algérie** (Pr. Z. Harrat, Institut Pasteur d'Algérie; Dr K. Aït-Oudhia, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger) sont également en cours de formalisation (projets DGRST). Elles visent à étudier l'épidémiologie des leishmanioses viscérales et cutanées, et la caractérisation biochimique et moléculaire des agents pathogènes. L'extension du complexe *Leishmania killicki* dans tout le Sud du Maghreb fera l'objet de collaborations transnationales, grâce à l'installation d'un membre

de l'Unité de recherche "MiVEGEC" à Casablanca (Dr D. Sereno, IRD). Les réservoirs et phlébotomes vecteurs de cette espèce seront activement recherchés.

La collaboration impliquant **l'Université de Kohat au Pakistan**, le LSA (ANSES), l'Unité VECPAR (Univ. Reims), et le CNR-L sera poursuivie. Le Dr vétérinaire M. Hussain, enseignant chercheur au Département de Microbiologie (Kohat, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan), de retour dans son pays, doit démarrer des enquêtes épidémiologiques visant à mieux caractériser la circulation des Leishmanies présentes dans ce foyer très mal connu. Les souches isolées à partir des échantillons collectés localement seront typés par PCR à Maisons-Alfort et par MLST et typage iso-enzymatique au CNR de Montpellier. Les phlébotomes recueillis dans la vallée de Kohat seront identifiés et analysés dans l'Unité VECPAR.

Cette collaboration permettra ainsi de mettre en place des outils de diagnostic de la leishmaniose animale au Pakistan, et d'évaluer l'impact de la leishmaniose en santé publique humaine et animale.

La collaboration avec **l'Université de Lausanne** (Dept. de Biochimie, Pr. Nicolas Fasel) à propos de l'implication éventuelle de virus intra-cellulaires des Leishmanies dans la virulence de l'espèce *L. braziliensis*, en particulier dans sa capacité à produire des métastases à distance, se poursuivra.

Enfin, la collaboration **avec le N.I.H.** aux Etats-Unis, pour un programme de "séquençage massif" de nombreux isolats de toutes les espèces de *Leishmania*, se poursuivra également. L'investigateur principal est le Pr. Stephen Beverley (Dept. of Molecular Microbiology, Center for Infectious Disease Research, Washington University School of Medicine, St-Louis, USA).

#### **8.5.6. Projets internes au CNR directement adossés à la Collection**

Un vaste travail d'**identification et de taxonomie** de la majorité des espèces de *Leishmania*, basé sur la technique de MLST (C. Ravel) est en cours depuis plusieurs années au sein du Laboratoire. Plus de 200 souches représentant toutes les espèces pathogènes d'Afrique et d'Eurasie ont été analysées d'un point de vue génétique ; en collaboration avec le Laboratoire d'Informatique, de Robotique et de Microélectronique de Montpellier (LIRMM, V. Berry), une analyse bio-informatique de la congruence des groupes ainsi obtenues avec ceux définis par l'analyse isoenzymatique a été réalisé et montre une très bonne corrélation. Un article est en cours de rédaction sur ces résultats.

**Le travail rétrospectif d'analyse des souches présentes dans la Collection**, portant à la fois sur les aspects épidémiologiques, noso-géographiques et taxonomiques, sera poursuivi (F. Pratloug).

#### **8.6. Activités de Publication**

L'effort sera poursuivi pour publier les résultats obtenus par le CNR-L. Il nous semble en effet essentiel que le CNR soit visible sur les plans national et international. Les publications scientifiques ou de vulgarisation, de même que les communications à congrès et les conférences, permettent de diffuser les acquis, les connaissances et l'expertise des membres du CNR.

\* \* \*

## Remerciements

*Ce rapport a été réalisé par Patrick BASTIEN, avec l'aide indispensable de Francine PRATLONG, Laurence LACHAUD et Christophe RAVEL, ainsi que de Loïc TALIGNANI et Yves BALARD.*

Je souhaite remercier l'ensemble des personnels du CNR-L pour leur travail œuvrant au développement du CNR.

Je remercie également les Centres collaborateurs et leurs responsables, autant en santé humaine (Pr Renaud Piarroux, Marseille, Pr Pierre Marty, Nice, et Dr Pierre Buffet, à l'Hôpital Pitié-Salpêtrière, à Paris, ainsi que le Dr Gloria Morizot à l'Institut Pasteur) qu'en santé animale (Drs Mohamed Kasbari et Pascal Boireau, Maisons-Alfort, Pr Gilles Bourdoiseau, Lyon, et Pr Jérôme Depaquit, Reims).

Au nom du CNR-L, je remercie également tous les Centres hospitaliers et tous les praticiens qui ont effectué des déclarations de cas, et/ou qui nous ont adressé prélèvements ou souches.

Je remercie enfin l'Institut de Veille sanitaire pour son appui efficace aux actions du CNR-L.



## Liste des Tableaux et des figures contenus dans ce document

Tableau I.- Origine, selon le centre de soins, des 131 souches de *Leishmania* traitées par le CNRL en 2011

Tableau II.- Origine géographique, par pays d'isolement, des 131 souches traitées par le CNRL en 2011

Tableau III.- Détails des identifications enzymatiques de 70 souches réalisées en 2011.

Tableau IV. Lieux de contamination pour l'ensemble des cas de leishmanioses recensées en 2011.

Tableau V.- Cas de leishmaniose cutanée contractés en Guyane en 2011, en fonction de la source de déclaration.

Tableau VI.- Liste des stagiaires reçus au CNR-L en 2011

Figure 1 : Organigramme du Laboratoire Coordonnateur du Centre National de Référence des *Leishmania*