

**Rapport annuel d'activité**

**2015**

**Centre national de  
référence des  
Leishmanioses**

**Année d'exercice  
2014**



## SOMMAIRE

<b>1. MISSION ET ORGANISATION DU CNR</b> .....	<b>8</b>
1.1. RAPPEL DES MISSIONS ET OBJECTIFS DU CNR .....	8
1.2. ORGANISATION ACTUELLE DU CNR (DEPUIS LE 1 <sup>ER</sup> JANVIER 2012).....	8
1.3. DESCRIPTION DE L'ÉQUIPE : PERSONNELS DÉVOLUS DANS LES ACTIVITÉS.....	8
1.4. LOCAUX ET ÉQUIPEMENTS (CNR ET LABORATOIRES ASSOCIÉS):.....	8
1.5. DESCRIPTION DE LA DÉMARCHE QUALITÉ DU LABORATOIRE (ACTUALISATION).....	8
1.5.1. Centre Coordonnateur de Montpellier.....	8
1.5.2. Laboratoire Associé de Cayenne.....	9
<b>2. ACTIVITES D'EXPERTISE</b> .....	<b>9</b>
2.1. CAPACITÉS TECHNIQUES DU CNR .....	9
2.1.1. Liste des techniques de référence.....	9
2.1.2. Collections de matériels biologiques .....	9
<b>2. ACTIVITES D'EXPERTISE EN 2014</b> .....	<b>10</b>
2.1. ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNÉE 2014.....	10
2.2. ACTIVITÉS D'EXPERTISE DE L'ANNÉE 2014 .....	10
2.2.1. Expertise diagnostique .....	10
2.2.2. Réception de souches de <i>Leishmania</i> .....	12
2.2.3. Distribution de souches de <i>Leishmania</i> .....	13
2.2.4. Typage biochimique (isoenzymatique).....	14
2.2.5. Identification moléculaire .....	14
2.2.6. Maintien et dynamique de la Collection de souches du CNR .....	15
2.3. ÉVOLUTION DES TENDANCES .....	16
<b>3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE</b> .....	<b>18</b>
3.1. SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTÉRISTIQUES DE L'INFECTION.....	18
3.1.1. Réseau de partenaires .....	18
3.1.2. Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances .....	19
3.1.3. Analyse de la distribution des cas .....	19
3.1.4. Analyse de la situation de la Guyane Française.....	21
3.2. SURVEILLANCE DE LA RÉSISTANCE DES <i>LEISHMANIA</i> AUX ANTI-LEISHMANIENS.....	22
3.3. PARTICIPATION AUX RÉSEAUX DE SURVEILLANCE .....	22
3.3.1. Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS .....	22
3.3.2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux .....	22
<b>4. ALERTE</b> .....	<b>23</b>
<b>5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL</b> .....	<b>23</b>
5.1. FORMATION – ENSEIGNEMENTS - STAGIAIRES.....	23
5.1.1. Enseignements .....	23
5.2.2. Stagiaires.....	23
5.2. INFORMATION, DIFFUSION .....	24
5.3. CONSEIL AUX PROFESSIONNELS DE SANTÉ.....	24
<b>6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.</b>	<b>26</b>
6.1. ACTIVITÉS DE RECHERCHE.....	26

6.1.1. <i>Projet DGRST "Eco-épidémiologie de la leishmaniose cutanée à Leishmania killicki en Tunisie"</i> .....	26
6.1.2. <i>Projet européen FP7 "EDENext" (Biology and control of vector-borne infections in Europe)</i> .....	26
6.1.3. <i>Projet européen LeishMan « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation »</i> .....	27
6.1.4. <i>Travaux de recherche en santé humaine avec les Centres Collaborateurs de Marseille et Nice</i> .....	27
6.1.5. <i>Programme de collaboration avec l'université de Kohat (Pakistan)</i> .....	28
6.1.6. <i>Autres travaux collaboratifs en recherche</i> .....	28
6.2. LISTE DES PUBLICATIONS.....	29
6.2.1. <i>Publications nationales</i> .....	29
6.2.2. <i>Publications internationales</i> .....	29
6.2.3. <i>Chapitres d'ouvrages</i> .....	30
6.2.4. <i>Communications à congrès nationaux</i> .....	30
<b>7. COLLABORATION AVEC LES STRUCTURES DE SANTE ANIMALE POUR LA SURVEILLANCE DES LEISHMANIOSES ANIMALES</b> .....	<b>31</b>
<b>8. PROGRAMME D'ACTIVITE 2015-2016</b> .....	<b>32</b>
8.1. ACTIVITÉS D'EXPERTISE.....	32
8.1.1. <i>Maintien et dynamique de la Collection de souches du CNR</i> .....	32
8.2. CONTRIBUTION À LA SURVEILLANCE DES LEISHMANIOSES.....	32
8.2.1. <i>Surveillance des leishmanioses humaines</i> .....	32
8.2.2. <i>Collaboration avec les structures en santé animale pour la surveillance de la leishmaniose animale</i> .....	34
8.3. CONSEIL, INFORMATION, FORMATION.....	35
8.4. RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITÉ DU CNR.....	35
8.4.1. <i>Projet européen EDENext</i> .....	35
8.4.2. <i>Projet européen LeishMan « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation »</i> .....	35
8.4.3. <i>Recherche en santé humaine en collaboration avec les Centres Collaborateurs du CNR</i> .....	35
8.4.4. <i>Recherche en collaboration avec les structures travaillant en santé animale et en entomologie médicale</i> .....	36
8.4.5. <i>Autres projets de recherche en collaboration</i> .....	37
8.4.6. <i>Projets de recherche du L-A de Cayenne</i> .....	38
8.4.7. <i>Projets internes au CNR directement adossés à la Collection</i> .....	38
8.4.8. <i>Activités de Publication</i> .....	38
8.5. LOCAUX, ÉQUIPEMENTS, DÉMARCHE QUALITÉ.....	38
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>39</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES CONTENUS DANS CE DOCUMENT</b> .....	<b>40</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>41</b>

# Résumé analytique

*Le Sud de la France* représente depuis les années 1920 une **zone d'endémie stable de leishmaniose viscérale (LV)** à *L. infantum*. La **maladie humaine**, bien qu'à un niveau faible, y est régulièrement entretenue grâce à l'existence d'une **enzootie canine très active**. La progression de la leishmaniose canine, tant au plan numérique que territorial, crée une situation épidémiologique **d'autant plus préoccupante que le réchauffement climatique** fait craindre une multiplication des populations de phlébotomes vecteurs et/ou l'extension de leur territoire géographique. La lutte contre la leishmaniose canine, bien que non organisée au niveau étatique, a pris depuis quelques années un nouveau tournant avec les mesures de protection prises par les propriétaires de chiens en zone endémique (colliers répulsifs et vaccin CaniLeish®): il n'existe cependant encore aucune évaluation de l'effet de ces mesures sur l'enzootie. De plus, autant chez l'homme que chez l'animal, la présence d'une importante population de porteurs sains est maintenant avérée. Dans ce contexte, la multiplication des causes d'immunodépression d'origine infectieuse (VIH) ou iatrogène représente un facteur de risque pour la population humaine. C'est pourquoi, la **surveillance des leishmanioses humaine et anormale en France métropolitaine s'impose**. De même dans le **département de la Guyane**, le niveau d'endémie de leishmaniose cutanée (LC), ainsi que l'épidémiologie totalement différente de celle du territoire métropolitain, nécessitent une surveillance régulière. La contamination humaine y résulte de la pénétration en forêt pour des activités professionnelles ou de loisir. *L. guyanensis* y est l'espèce prédominante. *L. braziliensis*, responsable d'une forme grave, avec évolution possible vers une atteinte des muqueuses de la face (LCM) pouvant être mutilante, a tendance à devenir plus prévalente.

Le CNR des Leishmanioses a été créé en 1998 avec pour missions principales de surveiller l'endémie leishmanienne en France (incl. la Guyane), de développer une expertise en diagnostic et en typage dans le domaine, d'informer et conseiller les professionnels à cette pathologie et de collecter les souches de *Leishmania* au sein de sa collection. Sa situation au sein de la zone d'endémie, sa longue expertise dans le domaine, sa collection de plus de 6500 souches de *Leishmania* et ses capacités techniques contribuent à ce que ces missions soient menées à bien. Les leishmanioses ne sont pas en France des maladies à déclaration obligatoire. Pourtant, le CNR des *Leishmania* a réussi à obtenir, depuis sa création en 1998, que les cas de leishmaniose autochtones ou importés, diagnostiqués sur son territoire lui soient signalés, ce qui permet de disposer de statistiques régulières. Le CNR s'est adjoint en 2012 le Laboratoire-Associé de Cayenne (Pr B. Carme) et est entouré de 6 centres collaborateurs en santé humaine et animale dans le domaine. Une **démarche Qualité** a été entreprise depuis plusieurs années en vue de la certification de la Collection de souches du CNR-L selon la norme NF S96.900.

Les principales missions du CNR-L ont continué d'être remplies en 2014.

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

L'offre d'**expertise diagnostique** s'est stabilisée en 2014 : 280 échantillons ont été reçus au Centre Coordonnateur (C-C) de Montpellier pour diagnostic moléculaire de leishmaniose, soit une diminution de 17% par rapport à 2013; mais à l'inverse, le nombre de Centres Hospitaliers français ayant envoyé du matériel biologique au CNR-L a doublé. Au Laboratoire-Associé (L-A) de Cayenne, 669 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 Centres de soins et postes de santé disséminés sur le territoire guyanais; soit une hausse de 63% par rapport à 2013.

L'activité d'**identification de *Leishmania*** a continué d'être importante. L'activité de typage moléculaire à Montpellier est restée stable, avec 87 identifications réalisées. L'incidence de *L. major*, responsable de leishmanioses cutanées importées d'Afrique du Nord, a diminué par rapport à 2013, alors que *L. infantum*, espèce du sud de la France et du Bassin Méditerranéen, devient majoritaire. L'activité de typage du L-A de Cayenne, a encore augmenté, avec surtout un

taux de succès en forte augmentation si l'on considère les cas parasitologiquement positifs. Pour les 232 biopsies fournies et positives en PCR, 222 identifications moléculaires ont été réalisées, soit 95,7% de succès d'identification. Ces données montrent toujours l'espèce *L. guyanensis* comme prédominante (92% des prélèvements typés), avec une diminution de *L. braziliensis* qui constitue environ 5% des prélèvements typés alors que depuis 3 ans, elle restait stable autour de 13%. Cette "modification épidémiologique" relève sans doute de l'augmentation de l'activité ayant amené à un recrutement plus important de *L. guyanensis*.

Par ailleurs, 30 identifications biochimiques (technique de référence pour l'O.M.S., réservée à des projets précis en épidémiologie) ont été réalisées en 2013.

La **Collection de souches** de *Leishmania* reste dynamique mais a diminué en activité. En 2014, 46 souches de *Leishmania* ont été isolées ou reçues, toutes d'hôpitaux, centres de soins ou instituts de recherche français, et 1 seule de centres de soins ou de recherche à l'étranger. A noter que, comme les 47 souches de 2013, les 102 souches isolées par le L-A de Cayenne ne sont pas comptabilisées dans ce bilan. Les souches ont été isolées à partir de contaminations de 8 pays différents, dont 4 pays d'Afrique, 2 pays d'Amérique et 1 pays d'Asie.

Par ailleurs, 36 souches de *Leishmania* ont été fournies à divers laboratoires et institutions en France et à l'étranger (contre 94 en 2013 et 379 en 2012). Si le nombre de souches distribuées en France a légèrement augmenté, c'est celui des souches envoyées à l'étranger qui est en forte diminution. Après la conclusion l'an dernier de travaux de thèse portant sur les leishmanioses et réalisés en France, les chiffres de cette année sont à mettre en rapport avec l'aboutissement de projets collaboratifs, en particulier sur le séquençage systématique, ayant nécessité une quantité importante de souches, mais arrivés aujourd'hui au stade de l'analyse des données obtenues.

Le CNR-L s'emploie à faire vivre et progresser cette Collection, devenue essentielle à de nombreux centres hospitaliers et de recherche. Depuis 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 technicien (L. Talignani), et un Assistant-Ingénieur (Y. Balard), de façon rétrospective et selon des critères spécifiques (souches provenant d'un même patient, souches clonées, souches provenant d'expérimentations...). De plus, dans le cadre d'un projet financé par le GIS IBiSA, le CNR s'est investi de façon importante dans la mise en place d'un outil de gestion informatique des échantillons commun à plusieurs CRB microbiologiques.

2°) Les activités de **surveillance** continuent de constituer une grosse activité du CNR-L. Le nombre de déclarations de cas de leishmanioses parvenues au CNR hors-Guyane est stable par rapport à 2013, mais on note une forte augmentation du nombre de déclarations de cas en Guyane Française. Ceci est en partie expliqué par la campagne de sensibilisation, d'information et de formations faite en début d'année 2014 auprès des services comme les CDPS et le Service de Santé des Armées; cette augmentation s'élève à environ +56%. Ainsi, au total, le nombre de cas déclarés en 2014 s'élève à 349, dont 242 cas de Guyane Française; 17 étaient des cas de leishmaniose viscérale, 323 de leishmaniose cutanée et 3 de leishmaniose cutanéomuqueuse autochtone. Tous les cas autochtones de LV provenaient de départements du Sud de la France situés dans la zone d'endémie leishmanienne connue; 2 sur 11 seulement concernaient des patients immuno-déprimés. Le nombre de cas de leishmaniose cutanée contractés dans des pays du Maghreb est nettement redescendu par rapport aux années précédentes. En ce qui concerne les contaminations en Guyane, on constate une nette augmentation des cas déclarés. Ainsi avec 242 cas déclarés en Guyane et 291 cas déclarés au total, l'incidence annuelle de la LC en Guyane Française en 2014 serait au minimum de 0,97 à 1.2 p.1000, ce qui apparaît presque deux fois plus élevé qu'en 2013 et un peu plus élevé qu'en 2012. Ces variations sur les 3 ans peuvent être expliquées par des sous-déclarations liées à des problématiques spécifiques au territoire guyanais en 2013, ainsi que par une forte mobilisation du L-A en 2014.

3°) La **collaboration avec les structures de santé animale** (essentiellement le Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES, Drs M. Kasbari et P. Boireau) s'est poursuivie en

2014. 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, la surveillance des leishmanioses animales demeure primordiale, tant pour la santé animale que pour la santé publique. En sont une bonne illustration les travaux menés sur l'espèce nouvelle *L. siamensis* rapportée récemment chez l'animal en Europe et chez l'homme en Thaïlande, mais probablement présente chez l'animal bien avant d'atteindre l'homme, ainsi que la mise en évidence de l'existence à bas bruit d'une transmission non-vectorielle, transplacentaire et vénérienne, de la leishmaniose canine, permettant d'expliquer en France l'apparition de foyers "ectopiques" (en dehors de la zone d'endémie) de la maladie.

4°) En matière de **formation**, le CNR-L continue d'attirer des stagiaires en quête de formation sur les leishmanioses. 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 2014, au minimum 49 conseils thérapeutiques ont été donnés par téléphone. Le CNR donne également de nombreux conseils en matière de diagnostic moléculaire ou d'interprétation des données de typage.

5°) Enfin, le CNR-L participe à de nombreux projets de **recherche**, en collaboration avec des équipes françaises (en particulier avec les Centres collaborateurs des CHU de Marseille et Nice) ou étrangères.

Il participe à deux projets européens : EDENext (*Biology and control of vector-borne infections in Europe*), financé dans le cadre du programme européen FP7, et LeishMan (*Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation*). Notons également un projet avec l'Université de Monastir en Tunisie, un autre avec l'UMR 5086 à Lyon, un travail épidémiologique avec l'Université d'Oxford, des projets de génomique avec le N.I.H. aux Etats-Unis et l'Université de Lausanne, des travaux en lien avec les Centres collaborateurs (Marseille et Nice, l'ANSES, l'Université de Reims), ainsi qu'avec d'autres équipes à l'étranger...

Le Laboratoire Associé de Cayenne contribue également au développement des thématiques de recherche locales et nationales du fait de sa capacité à isoler et mettre à disposition des souches pouvant présenter un intérêt certain dans le cadre de recherches dans les domaines cliniques, thérapeutiques et physiopathologiques; notons en particulier un projet en collaboration avec l'Université de Lausanne portant sur les RNA Leishmania virus qui ont été montrés comme jouant un rôle dans la pathogénicité des espèces présentes en Guyane; le projet vise à évaluer leur prévalence chez *L. guyanensis* et déterminer leur diversité génétique.

6°) L'ensemble de ces activités a fait l'objet de **publications et de communications** à congrès : 14 publications dans des revues internationales (à comité de lecture), ainsi que 2 chapitres d'ouvrages, et 1 communication à congrès.

# **1. MISSION ET ORGANISATION DU CNR**

## **1.1. Rappel des missions et objectifs du CNR**

Cf. ANNEXES

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

Cf. ANNEXES

## **1.3. Description de l'équipe : personnels dévolus dans les activités**

Cf. ANNEXES

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

Cf. ANNEXES

## **1.5. Description de la démarche Qualité du laboratoire (actualisation)**

### **1.5.1. Centre Coordonnateur de Montpellier**

Le Département de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier est engagé dans la démarche Qualité nécessaire à l'accréditation des laboratoires de biologie médicale (certification ISO 15189). Christophe Ravel (membre du CNR-L) est d'ailleurs RQA suppléant dans ce cadre. Un audit externe et plusieurs audits internes ont accompagné ce processus au long de l'année 2014. Un dépôt partiel de dossier au COFRAC est prévu au 1<sup>er</sup> semestre 2015 : il inclura toutes les analyses de diagnostic moléculaire, en particulier le diagnostic moléculaire des leishmanioses.

Pour ce qui concerne le CNR-L proprement dit, une démarche Qualité a été entreprise depuis plusieurs années en vue d'une certification de la collection de Leishmania du CNR-L selon la norme NF S96-900. En 2014, le Système de Management de la Qualité a été amélioré selon les recommandations du premier audit pré-certification assuré dans le cadre du projet Investissements d'Avenir "BIOBANQUES" les 4-5 février 2013. Des pistes d'amélioration ont également été mises en évidence grâce au suivi des non-conformités et des actions correctives de l'année précédente.

La traçabilité du processus de réception, suivi et expédition des souches est totale, aujourd'hui assurée grâce au logiciel BRC-Lims, spécifiquement conçu pour les CRB microbiens dans le cadre d'un projet coordonné par Chantal Bizet (CRB de l'Institut Pasteur) et financé par IbISA. Ce logiciel a été adopté en routine en 2014 et l'ancien logiciel ModulBio abandonné. La réglementation en vigueur sur les transports des matières infectieuses est appliquée tant pour les souches envoyées au CNR-L que pour celles expédiées par le CNR-L. L'envoi des souches au CNR-L a été codifié en 2006, avec un transporteur agréé sélectionné par le CNR-L qui prend en charge les frais de transport.

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

- Création d'un fichier informatique de centralisation des autorisations de distribution des souches,
- Mise en place d'un outil informatique d'évaluation des fournisseurs et des produits critiques,
- Mise en place d'un questionnaire de satisfaction clients.

Des réunions trimestrielles de suivi de la Qualité ont permis de maintenir une dynamique tout au long de l'année. Ces efforts se poursuivront en 2015.

Par ailleurs, un pas important a été fait au niveau de la reconnaissance par les tutelles avec un accord de principe de la Direction du CHU pour intégrer la Collection de souches de Leishmania dans le Centre de Collections Biologiques Hospitalières de

Montpellier (CCBHM). Cette reconnaissance est importante du point de vue du soutien logistique, en particulier au niveau de la démarche Qualité.

### **1.5.2. Laboratoire Associé de Cayenne**

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

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

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

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

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

### **2.1. Capacités techniques du CNR**

#### **2.1.1. Liste des techniques de référence**

Cf. ANNEXES

##### **2.1.1.1. Diagnostic**

##### **2.1.1.2. Typage biochimique : Identification iso-enzymatique**

##### **2.1.1.3. Typage moléculaire**

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

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

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

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

Cf. ANNEXES

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

En 2014, la Collection a effectué le basculement définitif vers une nouvelle application de gestion appelée BRC-LIMS. Ce projet initié par l'institut Pasteur et soutenu par le GIS IBISA (Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie) a été testé et validé durant plusieurs mois avant de remplacer totalement l'ancienne application ModulBio. Toutes les données présentes sur l'ancienne base ont été reprises. Cette application présente toutes les garanties de sécurité avec davantage de souplesse et de possibilités.

Elle s'articule essentiellement autour d'une base de données sécurisée utilisant le SGBD Postgresql et fonctionnant sur un serveur DELL avec contrôleur 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 est réalisée vers un serveur NAS situé dans une autre pièce.

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

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

### **2.1.2.4. Collection d'ADN de *Leishmania***

## **2. ACTIVITES D'EXPERTISE EN 2014**

### **2.1. Évolutions des techniques au cours de l'année 2014**

### **2.2. Activités d'expertise de l'année 2014**

#### **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 immunologique**

En 2014, 208 sérologies leishmanioses ont été réalisées au Centre Coordonnateur de Montpellier : soit une activité proche de celles des années précédentes (244 et 245 pour 2012 et 2013).

#### **- Diagnostic moléculaire**

Au Centre Coordonnateur (C-C) de Montpellier, en 2014, 280 diagnostics moléculaires ont été réalisés dont 187 pour des formes viscérales et 93 pour des formes cutanées (soit une baisse de 17% par rapport à 2013). Nonobstant, le nombre de Centres Hospitaliers français ayant envoyé du matériel biologique au CNR-L a sensiblement augmenté, passant à 54 au lieu de 23. A noter également le nombre croissant de Centres qui adressent des ADN extraits de prélèvements biologiques pour lesquels ils sollicitent l'expertise du CNR-L en matière de diagnostic et surtout d'identification moléculaire des différentes espèces. Au total, 37 diagnostics positifs ont été rendus, 16 pour des formes viscérales, 21 pour des formes cutanées, ce qui constitue une diminution sensible par rapport à 2013 tant en nombre absolu (37 au lieu de 99) qu'en pourcentage de positifs (13% au lieu de 29%).

Au Laboratoire-Associé de Cayenne, en 2014, 669 prélèvements (étalements de frottis et/ou biopsies) ont été enregistrés, issus du CH de Cayenne, des CH de Kourou et de Saint-Laurent-du-Maroni, du Centre de Service des Armées (CMIA), et des Centres de soins ou Postes de Santé (CDPS) disséminés sur le territoire guyanais; soit une hausse de 63% par

**Tableau I. Fréquence de réalisation des techniques au L-A de Cayenne et leurs résultats dans le cadre de la leishmaniose cutanée ou cutanéomuqueuse**

	Direct	Culture	PCR	Réalisés	Positifs toutes techniques
	Pos	N/D	N/D	27	27
	Neg	N/D	N/D	13	
	Neg	Neg	Neg	25	
	Pos	Pos	Pos	60	60
	N/D	Neg	Neg	26	
	N/D	Conta	Pos	15	15
	Pos	Conta	Pos	36	36
	Neg	Conta	Neg	13	
	N/D	Neg	Pos	18	18
	N/D	Pos	Pos	25	25
	Neg	Pos	Pos	11	11
	N/D	N/D	Neg	2	
	N/D	Conta	Neg	8	
	N/D	Conta	Neg	8	
	Neg	Conta	Pos	5	5
	Neg	Neg	Pos	2	2
	Pos	Neg	Pos	14	14
	Neg	N/D	Neg	1	
	N/D	N/D	Pos	2	2
	Neg	Neg	N/D	1	
	N/D	Neg	N/D	2	
	Pos	Neg	Neg	8	8
	Pos	Neg	N/D	8	8
	Pos	Conta	Neg	6	6
	NegR	N/D	N/D	24	
	NegR	Neg	Neg	18	
	NegR	Pos	Neg	1	1
	NegR	Pos	Pos	6	6
	NegR	Conta	Neg	18	
	NegR	Conta	Pos	5	5
	NegR	Conta	N/D	1	
Réalisés	302 (197)	367 (173)	371(182)	<b>411 (272)</b>	<b>249 (140)</b>
Interprétables	221° (161)	225° (116)	356 (182)		
<b>Positifs</b>	<b>152 (86)</b>	<b>102 (47)</b>	<b>232 (101)</b>		

° Frottis avec assez de cellules pour être véritablement interprétable

°° Nombre de cultures contaminées (provenant surtout des centres de santé)

Chiffres entre parenthèses = année 2013.

rapport à 2013. Ces prélèvements correspondent à 393 patients avec essentiellement des suspicions de leishmanioses cutanées.

Ce nombre est en légère hausse par rapport à l'année précédente (370), très probablement du fait de la mobilisation faite en début d'année 2014 pour la sensibilisation des professionnels de soins sur la recherche de leishmaniose en Guyane française, et de l'optimisation du circuit des prélèvements, notamment auprès du Service de Santé des Armées.

Le type de prélèvements diffère selon le Centre de soins et les ressources dont il dispose localement. Par exemple, pour les CDPS, le L-A du CNRL assure une recherche diagnostique sur frottis cutané ainsi qu'une détection par biologie moléculaire et identification de l'espèce. Par contre, le Service des Armées travaille en collaboration avec l'Institut Pasteur

de Guyane qui réalise le diagnostic sur frottis cutané et transmet les biopsies pour culture et PCR (identification d'espèce) au Laboratoire de Parasitologie du CHAR. De même, selon les formations des personnel de santé sur place, la réalisation de la biopsie peut ou non être faite.

249 patients ont été trouvés positifs toutes techniques confondues (Tableau I). Le seul examen direct n'aurait dépisté que 152 cas, soit 61% des positifs (sensibilité stable par rapport à 2013), alors que le diagnostic moléculaire en a détecté 93% (nette amélioration par rapport à 2013, 72%). On remarque que, comme en 2013, un certain nombre de diagnostics ont été réalisés sur frottis seul (27 contre 44 en 2013 et 11 en 2012), sans envoi de biopsies pour culture ou PCR.

## 2.2.2. Réception de souches de *Leishmania*

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

Au C-C de Montpellier, **46 souches** de *Leishmania* ont été isolées ou reçues en 2014, dont **45** d'hôpitaux, centres de soins ou instituts de recherche français, et **1** seule de l'étranger. Le détail de l'origine des souches par centre d'isolement en 2014 figure sur le tableau II. A noter que, comme les 47 souches de 2013, les 102 souches isolées par le L-A de Cayenne ne sont pas comptabilisées dans ce bilan car non envoyées au C-C de Montpellier.

**Tableau II.- Origine selon le centre de soins, des souches de *Leishmania* traitées par le CNR-L en 2014.**

France (45 souches)				Etranger (1 souche)		
Etablissements	Nb	Etablissements	Nb	Pays	Etablissements	Nb
APHP BICHAT	3	CHU ROUEN	1	ALGERIE	Institut Pasteur d'Alger	1
APHP COCHIN	1	CHU RENNES	11			
APHP LA PITIE-SALPETRIERE	3	CH ROUBAIX	1			
CHU MONTPELLIER	2	HIA BEGIN SAINT MANDE	1			
CHU NICE	14	HIA LAVERAN MARSEILLE	2			
CHU NIMES	4	HIA LEGUEST METZ	2			

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

L'origine géographique des souches reçues en 2014 figure dans le tableau III selon le pays où la contamination a eu lieu : les souches ont été obtenues de 8 pays différents, dont 4 pays d'Afrique, 2 pays d'Amérique et 1 pays d'Asie. Pour 4 souches, l'origine géographique n'a pas pu être déterminée.

**Tableau III.- Origine géographique par pays de contamination des souches traitées par le CNR-L en 2014.**

Continents	Pays	Nb	Continents	Pays	Nb
<b>Afrique (n = 12)</b>	Algérie	1	<b>Amérique (n = 19)</b>	Guyane française	18
	Maroc	3		Pérou	1
	Soudan	2	<b>Asie (n = 2)</b>	Iran	2
	Tunisie	6	<b>Europe (n = 9)</b>	France	9
<b>Origine géographique inconnue</b>		4			

● **Isolement de souches au L-A de Guyane Française.**

Au L-A de Cayenne, **102 souches** de *Leishmania* ont été isolées en 2014, dont 52% provenant des hôpitaux de Cayenne et de Saint-Laurent-Du-Maroni, 19,3% des Centres de soins ou Postes de Santé (CDPS), et 27% du Centre Médical du Service des Armées (CMIA). Le Centre de Maripasoula situé sur le Maroni représente 50% des prescripteurs des CDPS.

L'augmentation est très nette par rapport à 2013, où 47 souches avaient été isolées.

Le détail de l'origine des souches par centre d'isolement en 2014 figure sur le tableau suivant.

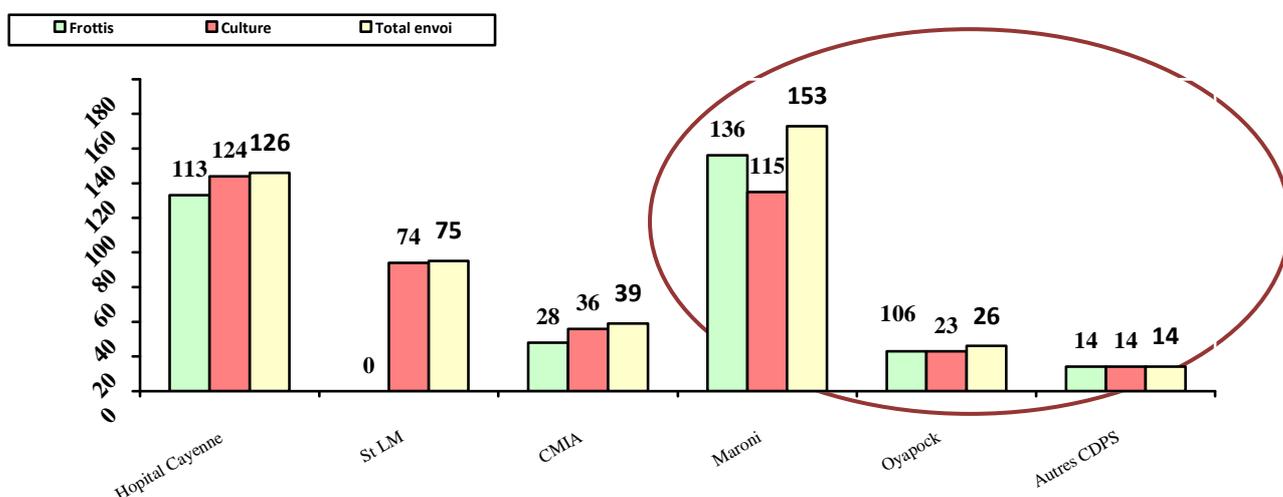
**Tableau IV.- Origine selon le centre de soins des souches de *Leishmania* traitées par le L-A du CNR-L en 2014.**

	Hôpitaux (SLM+CHAR)	Armée (CMIA)	Centre /Postes de santé (CDPS)	Total
TOTAL	53 (53%)	27 (27%)	20 (20%)	100*

\* Lieu de contamination non déterminé pour deux souches

A noter qu'un grand nombre de cultures sont ininterprétables (32%) car contaminées par des levures, bactéries ou champignons filamenteux. Les CDPS représentent 48% des centres pour lesquels les cultures sont ininterprétables.

**Figure 1.- Réseau de partenaires et type d'examen envoyés au L-A de Cayenne.**



Les souches obtenues en culture au LHUPM sont conservées en azote liquide. Elles doivent être mises à disposition et adressées à Montpellier par envois groupés.

**2.2.3. Distribution de souches de *Leishmania***

En 2014, **38 souches** de *Leishmania* ont été fournies à divers laboratoires et institutions en France et à l'étranger, dont la liste figure ci-dessous :

- 20 souches en France :
  - 7 souches : Institut de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Lyon (Pr Stéphane Picot)
  - 4 souches : Laboratoire de Santé Animale, ANSES, Maisons-Alfort (Dr Mohamed Kasbari)

- 2 souches : Institut Pasteur, Paris (Dr Thierry Lang)
  - 2 souches : UMR 8076, Université Paris Sud 11, Chatenay-Malabry (Pr Philippe Loiseau)
  - 2 souches : UMR CNRS 5290 / IRD 224 / Université de Montpellier "MiVEGEC" (Dr Anne-Laure Banuls)
  - 2 souches : Laboratoire de Parasitologie, CHRU Montpellier (Dr Christophe Ravel)
  - 1 souche : Service de Parasitologie-Mycologie, CHU Rennes (Pr Jean-Pierre Gangneux)
- 18 souches à l'étranger :
- UK NEQAS, Northern General Hospital, Sheffield, Royaume Uni

A noter, par ailleurs, que **255 souches** ont été décongelées et recongelées dans le cadre de l'entretien de la collection de souches du CNR-L.

#### 2.2.4. Typage biochimique (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 souche dans la classification existante lorsqu'un taxon nouveau est mis en évidence.

En 2014, le typage enzymatique a été réservé à des travaux collaboratifs d'intérêt soit épidémiologique soit taxonomique (caractérisation de zymodèmes nouveaux). Trente souches de *Leishmania* ont été caractérisées par cette méthode : le détail de ces identifications figure sur le tableau V.

12 *L. infantum* zymodème MON-1, une *L. infantum* zymodème MON-24 et une *L. infantum* zymodème MON-29; deux souches de *L. tropica* (zymodèmes MON-76 et MON-102); 9 souches de *L. killicki* (zymodème MON-8); 4 souches de *L. mexicana* (zymodèmes nouveaux); et une souche de *L. lainsoni* (zymodème MON-326).

**Tableau V.- Détails des identifications enzymatiques de souches réalisées en 2014.**

Taxon	Zymodèmes	Nombre
<i>L. infantum</i> (n= 14)	MON-1	12
	MON-24	1
	MON-29	1
<i>L. tropica</i> (n= 2)	MON-76	1
	MON-102	1
<i>L. killicki</i> (n= 9)	MON-8	9
<i>L. mexicana</i> (n= 4)	Zymodèmes nouveaux	4
<i>L. lainsoni</i> (n=1)	MON- 326	1
<b>TOTAL</b>		<b>30</b>

#### 2.2.5. Identification moléculaire

Au Laboratoire Coordonnateur, en 2014, 87 identifications moléculaires ont été réalisées et ont mis en évidence six espèces différentes de *Leishmania*. Ont été identifiées : de l'Ancien Monde, *L. major* (n=23), *L. infantum* (n=32) et *L. tropica* (n=4) ; et du Nouveau Monde, *L. braziliensis* (n=6), *L. guyanensis* (n=21) et *L. mexicana* (n=1).

Ces chiffres sont grossièrement comparables à ceux de l'an dernier, à l'exception d'une augmentation importante des cas à *L. guyanensis*, liée à un nombre accru de contaminations chez des militaires en mission en Guyane Française.

Au L-A de Cayenne, pour les 232 biopsies fournies et positives en PCR, 222 identifications moléculaires ont été réalisées, soit 95,7% de succès d'identification (en nette amélioration par rapport à 2013 qui était de l'ordre de 91%).

**Tableau VI.- Répartition des espèces de *Leishmania* à partir des différents sites de santé de la Guyane.**

Espèce identifiée	Hopitaux (SLM+CHAR)	Armée (CMIA)	Centre /Postes de santé (CDPS)	Total
<i>L. guyanensis</i>	105	31	66	202
<i>L. braziliensis</i>	6	0	5	11
<i>L. amazonensis</i>	5	0	0	5
<i>L. lainsoni</i>	1	0	0	1
TOTAL	117	31	71	219

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

La Collection internationale de souches de *Leishmania* du CNR-L est unique au monde, avec plus de 6600 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. Ces collaborations avec de nombreuses équipes nationales et internationales sont à l'origine du rayonnement de notre structure qui a été rapporté par Gregorio González-Alcaide et al. *Revista Soc. Brasil. Med. Trop.* 2013).

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

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

Le curateur de la cryobanque (Dr Francine Pratlong), connaissant et pratiquant cette collection depuis sa création, a entrepris depuis 2013 un travail rétrospectif avec l'aide de Loïc Talignani (TC) et Yves Balard (AI), dans le but d'identifier certaines souches particulières selon des critères précis et habituellement non renseignés.

- Sur les 6600 souches de la collection, un **enrichissement progressif du catalogue** des souches en ligne sur le site Internet du Laboratoire a été réalisé à partir de la collection avec, avant mise sur le site, un contrôle rigoureux de tous les renseignements relatifs à ces souches. Ceci porte à 570 le nombre actuel de souches sur le catalogue.

- **Enrichissement des données** associées aux souches à partir de travaux réalisés avec des souches de la collection (travaux de thèse ou articles scientifiques), comme par exemple :

- la sensibilité du parasite aux anti-leishmaniens,
- la virulence et l'infectivité des souches,
- la ré-émergence de foyers de leishmaniose dans le Bassin Méditerranéen,
- la découverte d'un nouveau réservoir de leishmaniose.

En 2014, ce travail a été étendu à toutes les publications mentionnant des souches de la Collection. Ces données, avec les références correspondantes, sont intégrées à la fiche électronique de chaque souche concernée. Ce travail long et minutieux est encore en cours et constitue une valorisation importante des souches de la Collection.

- Les souches reçues au CNR-L en plusieurs exemplaires et conservées ont fait l'objet d'un codage spécifique du code OMS.

L'ensemble de ces travaux permet à la Collection de **proposer aux équipes de recherche des souches bien documentées**, indispensables pour les travaux de recherche.

### 2.3. Evolution des tendances

L'activité globale du Centre Coordonnateur a diminué en 2014, alors que celle du L-A de Cayenne a fortement augmenté, probablement du fait de trois facteurs principaux : (i) une forte sensibilisation des prescripteurs sur la thématique (diffusion de procédures, réunions, information et formations des personnels se rendant dans les CDPS, coopération avec l'infectiologue dédié aux CDPS, amélioration du circuit des prélèvements et du rendu des résultats); (ii) au niveau des postes de santé, un renforcement de l'infectiologie (arrivée d'un médecin spécialisé) et un appui du CIC-EC du CHAR; (iii) la rationalisation du circuit des prélèvements des forces armées en Guyane suite à l'arrivée de médecins épidémiologistes militaires.

Le nombre de **souches reçues** au CNR-L a baissé dans les quatre dernières années, après une période d'une dizaine d'années aux environs de 180 par an. Les chiffres de 2014 sont encore en diminution par rapport aux deux années précédentes (94 en 2013 et 152 en 2012). Cette diminution est surtout frappante pour les souches provenant de l'étranger. Nous interprétons cette baisse comme la conséquence de plusieurs facteurs :

- (i) En France : le diagnostic moléculaire se généralise, en remplacement des techniques de diagnostic classiques, rendant non nécessaire l'isolement de souches en culture; ce dernier constitue donc de plus en plus un geste de "bénévolat" en faveur de la recherche future sur les leishmanioses, pratique peu favorisée par les politiques de restriction budgétaire actuelles. Par ailleurs, le L-A de Cayenne n'a pas envoyé ses souches au C-C en 2013 ni en 2014.
- (ii) A l'étranger : le recours au typage enzymatique, source essentielle d'envoi des souches, a fortement diminué; les campagnes épidémiologiques ont là aussi fortement recours à la biologie moléculaire, que ce soit pour le diagnostic ou le typage, ce qui réduit fortement la nécessité de l'isolement des souches (même si les interprétations qui peuvent en être tirées ne sont pas forcément aussi fiables). Par ailleurs, on constate une augmentation de l'autonomie des centres étrangers dans leurs capacités de stockage des souches, rendant moins indispensable le recours à notre Centre de Ressources Biologiques; enfin, les projets de collaboration avec l'étranger ont diminué.

A l'inverse, le nombre de **souches isolées en Guyane Française** a doublé en 2014 par rapport à 2013.

Le nombre de **souches distribuées** en 2014 a encore diminué de façon très importante (38 souches contre 94 en 2013 et 379 en 2012). Si le nombre de souches distribuées en France a légèrement augmenté, c'est celui des souches envoyées à l'étranger qui est en forte diminution. Après la conclusion l'an dernier de travaux de thèse portant sur les leishmanioses et réalisés en France, les chiffres de cette année sont à mettre en rapport avec l'aboutissement de projets collaboratifs, en particulier sur le séquençage systématique, ayant nécessité une quantité importante de souches, mais arrivés aujourd'hui au stade de l'analyse des données obtenues.

En ce qui concerne **l'identification de souches**, l'activité de typage moléculaire au C-C de Montpellier est restée stable, mais l'activité du typage moléculaire au L-A de Cayenne a encore augmenté, avec surtout un taux de succès en forte augmentation si l'on considère les cas parasitologiquement positifs.

**Tableau VII.- Evolution des cas positifs et des identifications d'espèce au L-A de Cayenne.**

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
<b>Nb de cas toutes techniques confondues</b>	96	129	114	119	160	119	142	140	249
<b>Nb d'identifications</b>	45 (46.9%)	82 (63.6%)	80 (70.2%)	93 (78.2%)	144 (90.0%)	96 (80.7%)	113 (79.6%)	92 (65.7%)	222 (89%)

Le typage iso-enzymatique, quant à lui, technique de référence mais réservée à certains taxons (*L. infantum*, *L. major*) ou à des études épidémiologiques précises, a diminué par rapport à 2013. Cette méthode de typage est progressivement remplacée par des techniques moléculaires, adaptables dans de nombreux centres de recherche ou de diagnostic.

### 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.*

*La surveillance des leishmanioses s'effectue davantage à partir de ces déclarations de cas que de l'isolement des souches, ce dernier étant techniquement difficile et donc aléatoire. A l'inverse, les isolements et adressages de souches au CNR sont, autant que possible, suivis d'une enquête visant à faire établir une déclaration de cas si elle n'a pas été faite.*

#### 3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques de l'infection

Le nombre de déclarations de cas de leishmanioses parvenues au CNR-L hors-Guyane est stable par rapport à 2013, mais on note une forte augmentation du nombre de déclarations de cas en Guyane Française. Comme précisé ci-dessus, ceci est en partie expliqué par la campagne de sensibilisation, d'information et de formations faite en début d'année 2014 auprès des services comme les CDPS et le Service de Santé des Armées; cette augmentation s'élève à environ +56%. Ainsi, au total, le nombre de cas déclarés s'élève à 349, dont 242 cas de Guyane Française.

##### 3.1.1. Réseau de partenaires

###### \* Centre coordonnateur (Montpellier) :

La liste des centres ayant déclaré au CNR-L des cas de leishmanioses en 2014 figure ci-dessous.

Pour les CHU : les Laboratoires de Parasitologie-Mycologie des CHU suivants : Angers (49), Caen (14), Dijon (21), Lyon (69), Marseille (13), Montpellier (34), Nice (06), Nîmes (30), Rennes (35), Rouen (76), Tours (37), divers établissements de l'AP-HP à Paris (75) (Pitié-Salpêtrière, Saint-Antoine, Bichat).

Pour les CH et CHG : CH Angoulême (85), CH Cayenne (973), CH Roubaix (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), HIA Clermont Tonnerre Brest (29)

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

La couverture du réseau reste donc nationale et stable.

###### \* Laboratoire-Associé (Cayenne) :

Le L-A a réactualisé début 2014 les protocoles et les informations auprès des prescripteurs comme le Service de Santé des Armées et les CDPS.

Les prélèvements, accompagnés de données cliniques et épidémiologiques dans environ deux-tiers des cas (464/669), sont adressés par les divers laboratoires et centres de soins de la Guyane :

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

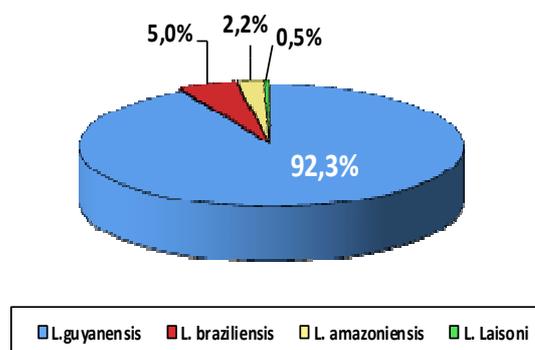
Le réseau de partenaires mis en place par le L-A permet d'apprécier de façon pratiquement exhaustive les cas diagnostiqués au CH de Cayenne, dans les CDPS et sur le reste du territoire. Au fil des années, le réseau reste stable mais relativement fluctuant en terme d'activités de diagnostic de la leishmaniose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

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

En France métropolitaine, la distribution des cas, aussi bien autochtones qu'importés, ainsi que des agents pathogène correspondants, reste remarquablement stable par rapport à 2013.

En Guyane Française, on note en 2014 une nette diminution de l'espèce *L. braziliensis*, qui constitue environ 5% des cas alors que depuis 3 ans, elle restait stable autour de 13%. En parallèle, on note une augmentation de *L. guyanensis* qui reste l'espèce prépondérante (92,4% contre 83,7% en 2013). Cette "modification épidémiologique" relève sans doute de l'augmentation de l'activité ayant amené à un recrutement plus important de *L. guyanensis*.

**Figure 2.- Répartition des différentes espèces de Leishmania isolées en 2014 au L-A de Cayenne.**



N.B. Le tableau détaillant cette figure est situé dans le paragraphe 2.2.5.

### 3.1.3. Analyse de la distribution des cas

En 2014, **au total, 349 cas** ont été déclarés au CNR-L : 100 fiches de déclaration de cas ont été reçues directement au CNR-L, provenant de structures de France métropolitaine (65 déclarations), de l'île de la Réunion (1 cas) et des Services de Santé des armées (34 cas); le L-A de Cayenne a déclaré 249 cas de LC diagnostiqués en Guyane Française, mais le détail de ces cas n'est pas encore parvenu à Montpellier.

Ces chiffres sont susceptibles d'être légèrement augmentés ou modifiés par la suite, certaines déclarations étant encore en suspens, et d'autres déclarations pouvant nous parvenir en retard.

La répartition de ces cas pour l'année 2014 se fait de la façon suivante toutes structures confondues :

- 17 cas de leishmanioses viscérales,
- 323 cas de leishmanioses cutanées,
- 3 cas de leishmaniose cutanéomuqueuse dont 2 autochtones (France métropolitaine).

Le nombre de cas de **leishmaniose viscérale (LV)** est à peu près stable par rapport aux dernières années (moyenne du nombre de cas par an entre 2006 et 2014 : 23.4). Sur les 17 cas de leishmaniose viscérale, 4 patients étaient immunodéprimés, mais aucun infecté par le VIH. Ceci constitue un net changement par rapport aux années précédentes, puisque même en 2013, 11 patients étaient immunodéprimés, dont 8 VIH+. Le sex ratio est plus équilibré que l'an dernier avec 8 patients de sexe féminin et 9 de sexe masculin. Seulement 7 cas sont des enfants de moins de 10 ans; 4 patients avaient entre 22 et 41 ans, et les autres plus de 54 ans. Ainsi, en France, la LV continue de toucher essentiellement des patients qui sont relativement jeunes en 2014 (moyenne d'âge de 26.8 ans [1-61 ans], inférieure à celle de l'an dernier à 35.7 ans).

Les cas autochtones de LV (11 cas) proviennent de départements du Sud de la France situés dans la zone d'endémie leishmanienne connue : Alpes-Maritimes, Gard, Ardèche, Var, et les autres du Sud de la France sans précision. Parmi ces 11 cas, seulement 2 patients avaient des facteurs d'immuno-dépression (aucun infecté par le VIH), mais 5 étaient des enfants de moins de 10 ans.

Le nombre de cas de leishmaniose cutanée (LC) reste relativement stable. Le nombre de cas de contamination ayant eu lieu dans les pays du Maghreb est à un niveau relativement faible (16 cas *versus* 35 en 2011). En ce qui concerne les patients contaminés en Guyane (cas du L-A + cas diagnostiqués en métropole = 291), le nombre de cas est nettement au-dessus de la moyenne annuelle des 7 dernières années (moyenne annuelle 195.8 cas/an [160-288] pour la période 2007-2013). Pour l'ensemble des cas de LC, autochtones ou importées, diagnostiquées en France métropolitaine (80 cas), 23 (29%) étaient des formes cutanées multiples. Enfin, 2 cas de leishmaniose muqueuse autochtone à *L. infantum* ont été rapportés en 2014.

**Tableau VIII.- Lieux de contamination pour l'ensemble des cas de leishmanioses déclarés au CNR-L en 2014.**

Forme clinique	Origine de la contamination						Total
	France métropolitaine	Antilles	Guyane	Maghreb (Algérie, Tunisie, Maroc)	Autre pays (ou plusieurs pays possibles)	Indéterminée ou non renseignée	
L. viscérale	11	0	0	0	5 (Europe)	1	17
L. cutanée	6	0	291	16	15	1	329
L. muqueuse	2	0	0	0	1 (Espagne)	0	3
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>0</b>	<b>291</b>	<b>16</b>	<b>21</b>	<b>2</b>	<b>349</b>

### 3.1.4. Analyse de la situation de la Guyane Française

Durant l'année 2014 :

- le Laboratoire-Associé de Cayenne a diagnostiqué 249 cas de LC. Dans un grand nombre de cas, le lieu présumé de la contamination n'était pas précisé (53%). Sur les 49 fiches renseignées, les lieux présumés étaient le Surinam et le Brésil pour respectivement 5 et 2 patients. Par ailleurs, aucun cas de LV ni de forme muqueuse ou disséminée n'a été répertorié cette année.
- les Hôpitaux d'instruction des Armées (HIA Bégin, Lavéran, Legouest et Sainte Anne) et le Service de Santé des Armées en métropole (Département d'Epidémiologie et Santé publique de l'Institut de Médecine tropicale du Pharo) ont déclaré 34 cas de LC avec une contamination en Guyane, ce qui constitue une forte augmentation par rapport à 2013; aucun cas de LV.
- de plus, parmi les déclarations envoyées par les diverses structures sanitaires métropolitaines, 15 concernaient des cas de LC avec une contamination en Guyane.

Ainsi, en 2014, pour la Guyane, on retrouve un total de 242 cas déclarés de LC contractées de façon certaine en Guyane, toutes structures confondues. Sur les 223 fiches renseignées, l'infection est survenue chez 161 hommes et 61 femmes, dont 23 militaires et 67 civils, les autres fiches étant incomplètes sur ces paramètres.<sup>1</sup> A cela, s'ajoute les cas diagnostiqués en métropole et ayant été contaminés en Guyane, soit 49 cas, à 100% masculins; ces cas ne concernent pas *a priori* des habitants de la Guyane. Le détail des cas figure sur le tableau ci-dessous.

**Tableau IX - Cas de leishmaniose cutanée contractés en Guyane en 2014, en fonction de la source de déclaration.**

Déclarations	Nb total	Sexe		Statut		
		H	F	militaire	civil	inconnu
France métropolitaine	15	15	0			15
HIA et SS des Armées	34	34	0	34	0	0
CH Cayenne	242	161	61	23	67	152
<i>Total</i>	<i>291</i>	<i>210</i>	<i>61</i>	<i>59</i>	<i>67</i>	<i>167</i>

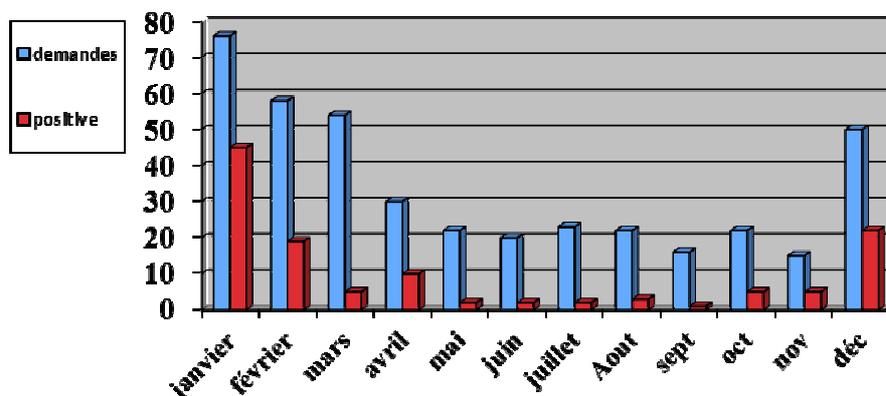
Ainsi avec 242 cas déclarés en Guyane et 291 cas déclarés au total, l'**incidence annuelle de la LC en Guyane Française** en 2014 serait au minimum de 0,97 à 1.2 p.1000 (sur la base de 250.000 habitants), ce qui apparaît presque deux fois plus élevé que pour l'année 2013 (0.6 p.1000) et un peu plus élevé qu'en 2012 (0.9 p. 1000). Ces variations sur les 3 ans peuvent être expliquées par des sous-déclarations liées à des problématiques spécifiques au territoire guyanais en 2013.

**Distribution temporelle des cas en Guyane :** La répartition sur l'année 2014 des cas de leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses est superposable à celle des années précédentes avec un faible nombre de cas à partir de mai (saison sèche) puis une reprise à compter de novembre (saison des pluies).

---

<sup>1</sup> N.B. Les doublons n'ont pas pu être analysés cette année, les données brutes du L-A en Guyane n'ayant pas été transmises à temps.

**Figure 3.- Répartition temporelle des cas positifs et des demandes de diagnostic au L-A de Cayenne sur l'année 2014.**



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

Cet item est peu applicable aux *Leishmania*, surtout en raison du faible niveau de résistance actuellement observé en France (où les dérivés antimonisés sont peu utilisés). Aucune souche n'a été adressée au CNR-L pour tester la chimiorésistance des parasites en 2014.

### 3.3. Participation aux réseaux de surveillance

#### 3.3.1. Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS

Au cours d'une réunion organisée le 04.06.2013 avec les représentants de la Cellule de l'InVS en Région Languedoc-Roussillon (Cire), Département Coordination des Alertes et des Régions (Amandine Cochet et Cyril Rousseau), l'intérêt et les modalités d'actions d'un renforcement du signalement au CNR dans certains territoires, en particulier dans les Pyrénées-Orientales avaient été discutés, en particulier pour les formes cutanées autochtones. Un projet de sensibilisation des dermatologues et des médecins généralistes avait été envisagé; le signalement pourrait s'accompagner d'une facilitation de l'accès au diagnostic. Les modalités restent encore à définir avec la Cire. Ce projet a été appuyé par le représentant de l'InVS, le Dr Harold Noel, au cours d'une autre réunion le 24.10.2013 lors d'une brève visite au CNR-L à Montpellier.

En Guyane française, une réunion a été organisée le 04.01.2014 avec le Service de Dermatologie et le Service de Santé des Armées. L'objectif de la réunion était de faire le point sur les prestations du LA-CNR et les demandes et attentes des praticiens. Un échange de protocoles, notamment de prélèvements (frottis et biopsie), a été opéré entre les différents membres du réseau. Une formation a été faite par les dermatologues au Centre de Santé de Maripasoula en février 2014.

#### 3.3.2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux

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

## **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, doivent également être 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. Depuis 2011, aucun phénomène particulier n'a été observé. Les cas importés d'Algérie, Maroc et Tunisie, ainsi que ceux de Guyane Française, font l'objet d'une surveillance particulière : le nombre de cas importés d'Afrique du Nord est faible pour l'année 2014 (16 cas); l'endémicité en Guyane Française apparaît en augmentation par rapport à 2013 mais l'optimisation du recrutement notamment auprès des CDPS et du Service des Armées peut être l'élément majeur de cette augmentation.

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

### **5.1. Formation – Enseignements - Stagiaires**

#### **5.1.1. Enseignements**

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

En Guyane :

- Diverses formations à différents niveaux du circuit de la prise en charge des leishmanioses sont mises en place : aspects cliniques, épidémiologiques, parasitologiques et thérapeutiques, notamment au cours du DU de Dermatologie Infectieuse et Tropicale (Pr. P. Couppié / UAG).
- Il existe aussi une formation pour les prélèvements de lésions cutanées et/ou muqueuses suspectes de leishmaniose pour les médecins affectés dans les Postes et Centres de Santé.
- Des fiches de protocole établies avec le service de Dermatologie et le LHUPM (L-A au CNR) sont aussi mises à disposition auprès des différents services et systèmes de soins, hospitaliers comme libéraux.

#### **5.2.2. Stagiaires**

Le CNR-L continue d'attirer des stagiaires en quête de formation sur les leishmanioses.

En 2013, deux stagiaires ont été reçus à Montpellier sur plusieurs 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 (Internes, Master 1 et 2, L3, BTS).*

A Cayenne, le LHUPM accueille des Internes de spécialités de biologie médicale et des internes de spécialité de DESC de Pathologie Infectieuse et Tropicale. Il veille à les sensibiliser sur la surveillance épidémiologique et les outils diagnostics.

**Tableau X.- Liste des stagiaires reçus au CNR-L en 2014.**

NOM	PRENOM	FORMATION / AFFILIATION	DATES DU STAGE
CHAARA	Dekra	Thèse Université 3 <sup>ème</sup> Année, Projet collaboration, Univ. Monastir, Tunisie	01/03/14 – 31/05/14 01/09/14 – 27/12/14
KASBARI	Mohamed	Thèse Université 3 <sup>ème</sup> Année, Vétérinaire Inspecteur, ANSES, Laboratoire Santé Animale, Maisons-Alfort	Plusieurs séjours d'une semaine au cours de l'année 2014
LY	Julie	Licence Option Biochimie et Biologie, Université Antilles-Guyane, Département Sciences, Technologies, Santé	04/04/14 - 18/05/14
GALVIS OVALLOS	Fredy	Université de Sao Paulo/ Faculté de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne	17/11/14 - 22/11/14
BOUCHOUICHA	Rim	Post-doc, Université de Reims (Projet PhlebExpo), Unite USC ANSES-Vecpar EA4688	01/11/14 - 31/12/14
AZZEDINE	Bounamous	Maitre de conférence, Département de Biologie, Institut des Sciences et de la Technologie, Université de Mila, Algérie;	12/12/14 - 27/12/14

## 5.2. Information, diffusion

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. Ces pages ont été revues et actualisées. Le 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, pour des raisons de confidentialité informatique, le site ne permet pas la notification directe en ligne des cas de leishmaniose par les services ou les laboratoires.

## 5.3. 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) permet une accessibilité plus simple et une possibilité de réponse plus rapide aux éventuelles requêtes.

### **a) Conseil thérapeutique**

L'argumentaire pour ce type de conseil a été énoncé dans les rapports précédents. Depuis 2006, le CNR-L a mis en place 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 Pr. P. Bastien) et le Dr. Pierre Buffet (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Pitié-Salpêtrière). 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 2014, au minimum 49 conseils thérapeutiques ont été donnés, dont 35 pour des cas de LC, 10 pour des LV, et 4 pour LCM.

Ce conseil thérapeutique rentre également dans un projet à plus large échelle initié par le Dr Pierre Buffet à Paris Pitié-Salpêtrière et Gloria Morizot (Institut Pasteur, Paris). Dans ce projet, 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 maintenant intégrée dans le projet européen « LeishMan » ("Improving treatment of leishmaniasis based on species differentiation").

Un article a été publié en 2014 à ce sujet :

- Blum J, Buffet P, Visser L, Harms G, Bailey MS, Caumes E, Clerinx J, van Thiel PP, Morizot G, Hatz C, Dorlo TP, Lockwood DN. LeishMan recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers. *J Travel Med.* 2014; 21(2):116-29.

### **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.

## 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 / UM; dir. F. Simard), ainsi que dans l'équipe EA3593 ("**Epidémiologie des Parasitoses Tropicales**") à Cayenne. D'autres projets sont réalisés directement en collaboration avec des équipes françaises ou étrangères, orientés vers l'épidémiologie et la surveillance des leishmanioses.

### 6.1. Activités de recherche

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

Ce projet collaboratif avec le Pr. H. Babba, de la Faculté de Pharmacie de Monastir en Tunisie, n'est plus financé actuellement. Néanmoins, la collaboration de longue date que le Laboratoire entretient avec cette équipe s'est poursuivie, en particulier avec une thèse en co-tutelle portant sur les aspects épidémiologiques et noso-géographiques des leishmanioses au Maghreb. Dhekra Chaara, doctorante dirigée par le Dr F. Pratlong a ainsi soutenu sa thèse le 19 décembre 2014. Dans le cadre de cette thèse, un article de synthèse sur les leishmanioses au Maghreb a été publié en 2014 :

- Chaara D, Haouas N, Dedet JP, Babba H, Pratlong F. Leishmaniasis in Maghreb: an endemic neglected disease. *Acta Trop*. 2014;132:80-93.

Un article original a également été soumis :

- Chaara D., Ravel C., Bañuls AL., Haouas N., Lami P., Talignani L., El Baidouri F., Jaouadi, K., Harrat Z., Dedet JP., Babba H., Pratlong F. Evolutionary history of *Leishmania killicki* (syn. *Leishmania tropica*) and taxonomic implications., soumis.

#### 6.1.2. Projet européen FP7 "EDENext" (Biology and control of vector-borne infections in Europe)

Le Laboratoire Coordonnateur est partenaire dans un 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, regroupe 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 PhD (*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.

### **6.1.3. Projet européen LeishMan « 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 10 pays Européens (Royaume-Uni, Suisse, France, Espagne, Italie, Allemagne, Suède, Pays Bas, Belgique, Portugal), de la Turquie, d'Israël et de l'Australie.

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. Un article issu de ce travail collaboratif a été publié par ce réseau en 2014 :

- Van der Auwera G, Ravel C, Verweij JJ, Bart A, Schönian G, Felger I. Evaluation of four single-locus markers for *Leishmania* species discrimination by sequencing. *J Clin Microbiol.* 2014;52(4):1098-104).

Par ailleurs, en 2014, avec le soutien de l'ESCMID et la participation de UKNEQAS, une évaluation externe de la qualité (EEQ) portant sur l'identification moléculaire des différentes espèces de *Leishmania* a été mise en place. Le CNR-L a en particulier fourni le matériel nécessaire à la réalisation de ces tests. Les résultats de ce travail devraient faire l'objet d'une publication.

### **6.1.4. Travaux de recherche en santé humaine avec les Centres Collaborateurs de Marseille et Nice**

L'étude concernant l'identification de souches de *Leishmania* par spectrométrie de masse réalisée par le Centre Collaborateur du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Marseille (Pr. R. PIARROUX) en collaboration avec le CNR-L a été achevée. Cette étude a donné lieu à une publication internationale en 2014 :

Cassagne C, Pratlong F, Jeddi F, Benikhlef R, Aoun K, Normand AC, Faraut F, Bastien P, Piarroux R. Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2014, 20(6):551-7..

D'autres travaux de recherche avec cette même équipe à partir de souches de la Collection du CNR ont donné lieu à un article sur la résistance des *Leishmanies* aux antimoniés :

- Jeddi F, Mary C, Aoun K, Harrat Z, Bouratbine A, Faraut F, Benikhlef R, Pomares C, Pratlong F, Marty P, Piarroux R. Heterogeneity of molecular resistance patterns in antimony-resistant field isolates of *Leishmania* species from the western Mediterranean area. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Aug;58(8):4866-74.

Sur ce même thème de la résistance aux antimoniés, un autre article en collaboration avec une équipe de l'IRD à Montpellier, travail dirigé par D. SERENO, est sorti en 2014 :

- Seblova V, Oury B, Eddaikra N, Aït-Oudhia K, Pratlong F, Gazanion E, Maia C, Volf P, Sereno D. Transmission potential of antimony-resistant leishmania field isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Oct;58(10):6273-6.

### 6.1.5. Programme de collaboration avec l'université de Kohat (Pakistan)

La collaboration initiée en 2011 avec le Dr vétérinaire M. Hussain, enseignant-chercheur au Département de Microbiologie de l'Université de Kohat (Kohat, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan) dans le cadre d'un programme conjoint franco-pakistanaï (Ambassade de France au Pakistan) et à la suite d'une demande d'appui scientifique et technique de l'université de Kohat, s'est poursuivi en 2014 avec le CNR-L, le Laboratoire de Santé Animale LSA de l'ANSES (Dr vétérinaire M. Kasbari) et l'unité EA 4688 ANSES-Vecpar (univ.de Reims, Pr Depaquit), à l'aide d'un financement (post-doc) attribué par le Ministère Pakistanais de l'enseignement supérieur et de la recherche (HEC).

Ces études ont fait l'objet d'une communication orale au congrès WorldLeish 5 (Porto de Galinhas, Brésil) en 2013, et deux publications sont en cours de soumission. Elles ont montré que la prévalence de la leishmaniose cutanée a doublé lors de la grave épidémie de 2011 survenue à la frontière de l'Afghanistan, dans la province de Khyber Pakhtunkhwa (nord-ouest du Pakistan), dans les villages autochtones périphériques aux camps de réfugiés (ONU). Cette épidémie, qui connaît encore actuellement de nouveaux épisodes, était essentiellement due à *Leishmania tropica*; néanmoins, pour la première fois dans cette région, la présence de *L. major* a été montrée sur des patients migrants mais également autochtones. Ceci pose la question (i) de la pertinence de la stratégie de lutte contre l'épidémie qui n'a jusqu'ici ciblé que les populations de réfugiés/déplacés en oubliant les populations autochtones vivant dans les villages entourant les camps, mais aussi (ii) de la nature du réservoir animal impliqué.

Afin d'identifier ce dernier, des prélèvements sur différentes espèces animales domestiques et sauvages sont toujours en cours pour isolement des souches de leishmanies et analyse en sérologie (IFAT, Western blot) et par PCR-RFLP au LSA. Les souches en cours d'isolement sont ensuite typées par isoenzymes et MLST au CNR-L.

Par ailleurs, les premiers résultats de l'enquête entomologique menée dans les foyers ont permis de dresser un inventaire et d'identifier au laboratoire de l'unité EA 4688 ANSES-Vecpar (univ.de Reims, Pr Depaquit) 13 espèces différentes de phlébotomes dont au moins deux espèces impliquées dans la transmission dans ses foyers. Ce travail devrait faire l'objet de deux publications, l'une en cours de soumission, l'autre en cours de rédaction.

### 6.1.6. Autres travaux collaboratifs en recherche

Plusieurs collaborations de longue date ont été poursuivies avec des groupes français (Dr Nicole Desbois, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Fort de France) ou étrangers (Maria Antoniou, Laboratory of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, Faculty of Medicine, University of Crete; Joaquina Martin-Sanchez, Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Espagne). Ces travaux, concernant la taxonomie des *Leishmania* et l'épidémiologie des Leishmanioses, ont donné lieu à publication en 2014 (cf. Liste des Publications).

La collaboration avec l'UMR 5086 CNRS-Université Lyon 1 (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Pr. Sylvie Ricard-Blum) au sujet de la physiopathologie des leishmanioses, plus précisément des interactions entre le parasite et la matrice extracellulaire, a donné lieu à publication en 2014 :

- Fatoux-Ardore M, Peysselon F, Weiss A, Bastien P, Pratlong F, Ricard-Blum S. Large-scale investigation of *Leishmania* interaction networks with host extracellular matrix by surface plasmon resonance imaging. *Infect. Immun*. 2014; 82(2):594-606..

Les données issues de la collaboration mise en place en 2011 avec le **N.I.H. aux Etats-Unis**, pour un programme de séquençage "à haut débit" de nombreux isolats de toutes les espèces de *Leishmania* (Pr. Stephen Beverley, Dept. of Molecular Microbiology, Center for Infectious Disease Research, Washington University School of Medicine, St-Louis, USA) sont toujours en cours d'analyse.

Une autre collaboration a débuté en 2013 avec **l'Université d'Oxford** (Department of Zoology, Pr Simon Hay & Dr David Pigott) portant sur l'estimation de la distribution globale des leishmanioses dans le monde avec établissement de cartes de risque prédictives. La base de données du CNR-L a été mise à contribution pour ce travail à grande échelle compilant plusieurs milliers de cas. Ce travail a été publié en 2014 :

- Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ, Messina JP, Balard Y, Bastien P, Pratlong F, Brownstein JS, Freifeld CC, Mekaru SR, Gething PW, George DB, Myers MF, Reithinger R, Hay SI. Global distribution maps of the leishmaniasis. *e-Life*. 2014; 27,3. doi: 10.7554/eLife.02851.

## 6.2. Liste des publications

*N.B.1 : Seules les publications relevant de l'activité du CNR sont mentionnées ici.*

*N.B.2 : Les noms des auteurs appartenant au CNR et au L-A sont soulignés; et ceux appartenant aux L-S ou équipes de recherche associées sont soulignés en pointillé.*

### 6.2.1. Publications nationales

### 6.2.2. Publications internationales

- Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ, Messina JP, Balard Y, Bastien P, Pratlong F, Brownstein JS, Freifeld CC, Mekaru SR, Gething PW, George DB, Myers MF, Reithinger R, Hay SI. Global distribution maps of the leishmaniasis. *e-Life*. 2014 Jun 27; 3. doi: 10.7554/eLife.02851.

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

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

- Fatoux-Ardore M, Peysselon F, Weiss A, Bastien P, Pratlong F, Ricard-Blum S. Large-scale investigation of *Leishmania* interaction networks with host extracellular matrix by surface plasmon resonance imaging. *Infect Immun*. 2014; 82(2):594-606.

- Ginouves M, Carme B, Couppié P, Prevot G. Comparison of tetrazolium salt assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *J Clin Microbiol*. 2014; 52:2131-2138.

- Van der Auwera G, Ravel C, Verweij JJ, Bart A, Schönian G, Felger I. Evaluation of four single-locus markers for *Leishmania* species discrimination by sequencing. *J Clin Microbiol*. 2014; 52:1098-1104.

- Jeddi F, Mary C, Aoun K, Harrat Z, Bouratbine A, Faraut F, Benikhlef R, Pomares C, Pratlong F, Marty P, Piarroux R. Heterogeneity of molecular resistance patterns in antimony-

resistant field isolates of *Leishmania* species from the western Mediterranean area. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58:4866-74.

- Seblova V, Oury B, Eddaikra N, Aït-Oudhia K, Pratlong F, Gazanion E, Maia C, Volf P, Sereno D. Transmission potential of antimony-resistant *Leishmania* field isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58:6273-6.

- Brenques C, Ferré JB, Le Goff G, Lami P, Pratlong F, Pasteur N, Lagneau C, Simard F, Robert V. A multiplex PCR to differentiate the two sibling species of mosquitoes *Ochlerotatus detritus* and *Oc. coluzzii* and evidence for further genetic heterogeneity within the Detritus complex. *Infect Genet Evol.* 2014 Jul 18. pii: S1567-1348(14)00239-1.

- Ntais P, Christodoulou V, Tsirigotakis N, Dokianakis E, Dedet JP, Pratlong F, Antoniou M. Will the introduction of *Leishmania tropica* MON-58, in the island of Crete, lead to the settlement and spread of this rare zymodeme? *Acta Trop.* 2014; 132:125-30.

- Chaara D, Haouas N, Dedet JP, Babba H, Pratlong F. Leishmaniasis in Maghreb: an endemic neglected disease. *Acta Trop.* 2014 Apr; 132:80-93.

- Díaz-Sáez V, Merino-Espinosa G, Morales-Yuste M, Corpas-López V, Pratlong F, Morillas-Márquez F, Martín-Sánchez J. High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: epidemiological consequences. *J. Vet Parasitol.* 2014; 202:119-127.

- Desbois N, Pratlong F, Quist D, Dedet JP. *Leishmania (Leishmania) martiniquensis* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), description of the parasite responsible for cutaneous leishmaniasis in Martinique Island (French West Indies). *Parasite* 2014; 21:12. doi: 10.1051/parasite/2014011.

- Hendrickx S, Boulet G, Mondelaers A, Dujardin JC, Rijal S, Lachaud L, Cos P, Delputte P, Maes L. Experimental selection of paromomycin and miltefosine resistance in intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. *Parasitol Res.* 2014; 113:1875-1881.

### 6.2.3. Chapitres d'ouvrages

Couppié P. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *In: Therapeutics in Dermatology* (Dubertret L. et al., eds), Fondation René Touaine 2001-2014, Médecine-Sciences, Flammarion, Paris 2014.

Couppié P. Leishmaniose cutanéomuqueuse. *In: Dermatologie infectieuse* (Mokni M, Dupin N et Del Giudice P, eds), Elsevier-Masson SAS, Paris, 2014.

### 6.2.4. Communications à congrès nationaux

- Darrigade As, Sambourg E, Duvignaud A, Sainte-Marie D, Labbe S, Renaux A, Simon S, Carne B, Demar M, Couppié P. Leishmanioses cutanéomuqueuses en Guyane: prédominance de l'espèce *Leishmania guyanensis*. Journées Dermatologiques de Paris, 9-13 décembre 2014. CO131. *Ann Dermatol Venerol.* 2014;141 ; S298.

## 7. COLLABORATION AVEC LES STRUCTURES DE SANTE ANIMALE POUR LA SURVEILLANCE DES LEISHMANIOSES ANIMALES

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

*Le Centre Collaborateur **Laboratoire Santé Animale de l'ANSES** à Maisons-Alfort (Dr M. Kasbari/Dr P. Boireau), en raison de ses missions de diagnostic, de recherche, d'appui scientifique et technique auprès des tutelles, de veille et surveillance et de son expertise dans le domaine des maladies animales et zoonotiques, contribue à la surveillance de la progression des leishmanioses et des souches de leishmanies susceptibles de passer du réservoir animal à l'homme. La bonne coopération entre le LSA de l'ANSES et le CNR se traduit en matière de surveillance et de veille, tant par des échanges d'informations sur les souches circulantes dans la faune, que de matériel biologique ou méthodologique. Ainsi, les souches isolées chez l'animal, en France ou à l'étranger par le LSA-ANSES, sont régulièrement transmises au CNR-L pour cryoconservation et typage.*

Au cours de l'année 2014, le **LSA de l'ANSES** a poursuivi ses activités relatives à la leishmaniose animale et à son vecteur, en collaboration avec le **CNR-L** et l'**EA 4688 Anses-Université de Reims "Vecpar"** (Pr J. Depaquit).

Ces activités ont concerné les points suivants :

1) La surveillance de cas groupés de leishmaniose canine autochtone survenant dans des zones pourtant considérées comme non-endémiques, et donc possibles foyers "ectopiques" à transmission non vectorielle : deux nouveaux foyers identifiés en Bretagne et en région Rhône-Alpes fin 2014 / début 2015 font actuellement l'objet d'une enquête épidémiologique et feront l'objet en 2015 d'une enquête entomologique (piégeage), dès le retour de la saison d'activité du vecteur.

2) L'évaluation du rôle respectif des voies de transmission non-vectorielle et vectorielle de la leishmaniose canine dans la dynamique de ces foyers "ectopiques" : le LSA a étudié l'efficacité des voies de transmission transplacentaire et vénérienne chez le chien en milieu confiné en animalerie de niveau de sécurité A2 (CRBM, ENVA). Les animaux issus d'un élevage professionnel infecté ont été suivis sur plusieurs générations. En 2014, la semence des mâles de seconde génération (F1) arrivés à maturité sexuelle a pu être prélevée et le parasite viable (et non plus seulement l'ADN) a pu être isolé sur certains des géniteurs à partir de la semence fraîche, confirmant la possibilité de transmission vénérienne de la leishmaniose par cette dernière, et ce, en l'absence totale de Phlébotomes vecteurs. Ces travaux font l'objet d'une publication en cours de soumission.

3) Des enquêtes entomologiques ont également été poursuivies dans certains départements situés en dehors de la zone d'endémie habituelle de la leishmaniose canine afin (a) d'objectiver le rôle de la transmission non vectorielle dans la dynamique des foyers ectopiques apparus; (b) de déterminer la compétence vectorielle de *Phlebotomus mascitti* ; (c) de contribuer progressivement à l'établissement de la carte de distribution des espèces de phlébotomes présentes hors zone d'endémie au nord de la Loire, permettant à terme de compléter les données manquantes indispensables pour l'évaluation du risque et de son évolution temporelle et spatiale.

4) La surveillance des espèces de leishmanies émergentes dans la faune (ex : *L. siamensis*), et de leur propagation, ainsi que la veille relative aux espèces animales réservoirs (domestiques et sauvages) nouvelles ou anciennes mais récemment décrites infectés en Europe (ex : chevaux, lagomorphes) a été poursuivie. A ce titre, en 2014, 40 sérums équinés ont été analysés par ELISA, complétant ainsi l'étude débutée en 2013 qui a déjà porté sur 260 chevaux. Cette étude devrait faire l'objet d'une publication.

Par ailleurs, en **Guyane Française**, aucun cas de leishmaniose canine n'a été déclaré. Néanmoins, comme chaque année, le réseau des vétérinaires de la Guyane a reçu une note incitant les recherches en leishmaniose viscérale animale et les déclarations auprès du L-A de Cayenne.

## **8. PROGRAMME D'ACTIVITE 2015-2016**

*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 qui est recherché.

En 2015-2016, les renseignements relatifs à chaque souche continueront à être revus et améliorés. Par ailleurs, le travail d'inclusion de renseignements complémentaires utiles aux équipes de recherche sera poursuivi (cf. 2.2.6), en particulier avec le rajout d'éventuelles références bibliographiques concernant les souches. Les références des articles ayant utilisé une souche donnée figureront sur la fiche informatique de la souche. Un travail identique sera ensuite réalisé pour les thèses d'Université.

##### **8.1.1.2. Enrichissement du catalogue de souches en ligne**

Le travail d'incrémentation de souches dans le catalogue en ligne (cf. 2.1.2.3), qui nécessite un contrôle minutieux de tous les renseignements accompagnant les souches, sera poursuivi en 2015 et 2016.

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

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

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

Le C-C 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** centralisera les déclarations de cas pour la Guyane qui continueront à être transmises au CNR des *Leishmania*.

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 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 rétrospectif des données nationales du PMSI, qui recueille tous les séjours hospitaliers publics ou privés, reste prévu sur la dernière décennie, 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.

En ce qui concerne les cas de leishmanioses à *L. guyanensis* du personnel des Armées, le CNR va continuer à intensifier sa collaboration avec les **Services de Santé des Armées** déjà initiée cette année, afin d'obtenir des données épidémiologiques, cliniques et de suivi thérapeutique plus complètes et ainsi d'établir des protocoles de prévention et de prise en charge (contact avec le Dr Thierry Boyé, dermatologue, HIA Sainte Anne à Toulon). Enfin, des protocoles de suivi plus précis seront établis en collaboration avec le Dr Eric Garnotel, HIA Laveran à Marseille.

Ces différentes actions devraient permettre 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. L'intégration d'une secrétaire dans l'organigramme du LA-CNR devrait permettre de relancer et motiver les praticiens dans ce sens. Un recueil informatique au travers du logiciel Voozadoo d'Epiconcept sera favorisé.

Par ailleurs, 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, ou à une orientation et une sensibilité plus tournées vers le diagnostic individuel que la 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'orpillage, etc ...

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 poursuivons et persévérons dans notre souhait d'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. 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 (Pr. Pierre Couppié) et 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).

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

Les projets de collaboration dans ce domaine concernent surtout le Centre collaborateur situé à l'ANSES, Laboratoire de Santé Animale, Maisons-Alfort (Dr M. Kasbari) et l'Unité de recherche en entomologie médicale EA 4788 ANSES-Vecpar de l'Université de Reims (Pr. J. Depaquit) et seront poursuivis principalement selon trois axes :

- 1) la poursuite de la surveillance de la dynamique des foyers (dits "ectopiques") de leishmaniose canine, d'extension possible sans vecteur, dans différents départements considérés comme non endémiques ;
- 2) la veille relative aux souches de leishmanies circulantes et/ou émergentes dans les réservoirs animaux ;
- 3) les enquêtes entomologiques en zone non-endémique et l'étude de la compétence vectorielle du phlébotome *Phlebotomus mascitti*, majoritaire dans la moitié nord de la France mais dont la biologie et la compétence vectorielle demeurent inconnues.

### **8.3. 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.

### **8.4. 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.

#### **8.4.1. Projet européen EDENext**

Le projet EDENext (*Biology and control of vector-borne infections in Europe*), financé dans le cadre du programme européen FP7, s'efforce 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. Le CNR continuera de s'impliquer 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

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

Ce projet se poursuit depuis plusieurs années avec l'objectif d'harmoniser les techniques d'identification moléculaires des parasites, étape clé dans la prise en charge thérapeutique et de mettre en place une base de données intégrant des données cliniques, épidémiologiques, thérapeutiques et d'identification des parasites qui devraient permettre une prise en charge mieux standardisée des patients. Des guidelines pour l'identification moléculaire des espèces ont été définies et publiées en 2014. La méthodologie d'identification par MLST développée ces dernières années par le CNR-L (Dr Christophe Ravel) sert de référence dans ces comparaisons. La mise en place d'un système d'évaluation externe de la qualité (EEQ) pour l'identification des espèces de *Leishmania* devrait se poursuivre en 2015, avec le soutien de l'ESCMID et la participation de l'UKNEQAS.

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

Le **Centre Collaborateur de Marseille** (Pr. R. Piarroux) a prévu un projet de recherche en collaboration avec le CNR-L :

- Epidémiologie et géographie de la leishmaniose viscérale autochtone dans le Languedoc-Roussillon, la deuxième région la plus touchée par cette maladie en France. 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, a été réalisé avec succès 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.

La collaboration avec le **Centre Collaborateur de Nice** (Pr Pierre Marty) sur le typage des souches par microsatellites devrait se poursuivre en 2015-16, permettant de réaliser ces travaux sur d'autres foyers de leishmaniose du Sud de la France : Provence, Cévennes, Pyrénées Orientales.

#### **8.4.4. Recherche en collaboration avec les structures travaillant en santé animale et en entomologie médicale**

##### **8.4.4.1. 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 porté par 3 équipes, l'EA ANSES-Université de Reims "Vecpar" (Pr J. Depaquit), le Laboratoire Santé Animale de l'ANSES à Maisons-Alfort (Dr M. Kasbari) et le CNR-L (Dr. C. Ravel) et est financé par l'ANSES (appel d'offres Environnement-Santé-Travail, APR-EST, 2011-2015). Son objectif 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.

Après la mise en place d'un élevage pilote de *P. duboscqi* dans l'unité Vecpar en 2012/2013, et la capture de phlébotomes *P. perniciosus*, le projet s'est poursuivi par la collecte des sérums canins nécessaire à l'étude auprès de cliniques vétérinaires. Les premiers résultats obtenus par ELISA montrent que les chiens sont effectivement piqués par les phlébotomes (présence d'anticorps anti-salivaires) dans des aires géographiques considérées jusqu'ici comme non-endémiques (notamment au nord de Rhône-Alpes). Le travail se poursuit actuellement dans d'autres départements de la zone non-endémique pour collecter plus de sérums à tester. Ce travail devrait faire l'objet d'une publication.

##### **8.4.4.2 Etude des voies de transmission non-vectorielle chez le chien**

Après les résultats très intéressants obtenus ces 3 dernières années, l'étude de l'efficacité des voies de transmission transplacentaire et vénérienne de la leishmaniose chez l'espèce canine sera poursuivie au Laboratoire de Santé Animale (ANSES, Maisons-Alfort) et en animalerie de niveau de sécurité A2 (CRBM, Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort). Elle a permis de montrer que la transmission vénérienne est bidirectionnelle (mâle vers femelle et vice-versa), et non uniquement unidirectionnelle (mâle vers femelle) comme initialement suggéré par les travaux précédents. La question du maintien de son efficacité sur plusieurs générations d'animaux sans intervention de vecteurs reste cependant posée et en cours d'étude.

##### **8.4.4.3. Etude des réservoirs animaux non conventionnels**

Suite (i) à l'apparition en Allemagne, en Suisse, puis aux USA de cas de leishmaniose animale cutanée imputées à une espèce exotique inconnue jusqu'alors (*L. siamensis*), sur des espèces animales habituellement non cibles (chevaux, vache), et (ii) à l'épidémie de leishmaniose humaine en Espagne (Madrid) concomitante à une prolifération de lagomorphes infectés par la leishmaniose, un travail d'évaluation de l'infection chez différents réservoirs animaux non conventionnels est toujours en cours et sera poursuivi au Centre collaborateur sis à l'ANSES : les 40 sérums équins collectés et analysés en 2014

seront intégrés au pool de 2015 avec d'autres sérums en cours de collecte, à analyser également par Western blot.

#### **8.4.4.4. Description et étude de pathogénicité de la nouvelle espèce *Leishmania siamensis* sur modèles animaux**

La description exhaustive de cette nouvelle espèce est en cours. Elle inclut : (i) la caractérisation morphologique du parasite; (ii) la pathogénicité sur plusieurs modèles animaux au Centre collaborateur LSA de l'ANSES et (iii) la caractérisation biochimique (typage isoenzymatique) et moléculaire (typage MLST) au CNR-L à Montpellier.

#### **8.4.4.5. Etude de la compétence vectorielle du phlébotome *Phlebotomus mascitti***

*P. mascitti* est l'espèce de phlébotome rapportée comme majoritaire dans la moitié nord de la France, mais sa biologie et sa compétence vectorielle demeurent inconnues.

De nouveaux essais de piégeage, afin d'obtenir une quantité plus importante de *P. mascitti* en lien avec le projet PhlebExpo (cf. supra), seront conduits par le Centre collaborateur LSA de l'ANSES (Maisons-Alfort) et l'EA 4688 Anses "Vecpar" (Reims) pour poursuivre les essais expérimentaux de transmission et de compétence vectorielle conduits depuis 2011 à l'université de Heidelberg et en animalerie confinée de niveau 2 (ENVA, CRBM) à Maisons-Alfort.

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

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

Plusieurs collaborations sont en cours avec l'UMR 5290 CNRS-IRD-Université Montpellier (Dr D. Fontenille) au sujet de l'épidémiologie de la leishmaniose en Tunisie (A.L. Banuls) et de la résistance de *L. infantum* aux antimonies (D. Sereno).

#### **b) A l'étranger**

Une **collaboration avec l'Université d'Anvers** (Pr. Louis MAES, Laboratory for Microbiology, Parasitology and Hygiene), initiée en 2011, a abouti à la publication d'un article en 2014. Elle portait sur la résistance des *Leishmania* à la paromomycine et à la miltéfosine. Des parasites (amastigotes) résistants ont été sélectionnés dans plusieurs souches, avec néanmoins des difficultés importantes rencontrées contre la miltéfosine.

La collaboration avec **l'Université de Lausanne** (Pr. N. Fasel et Dr C. Ronet, Dept. of Biochemistry) sur les RNA virus présents chez les *Leishmania* **inclut également le L-A de Cayenne**. Ces virus ont en effet été montrés comme jouant un rôle dans la virulence des espèces présentes en Guyane (*L. guyanensis* et *L. braziliensis*). L'objectif avec Cayenne sera d'évaluer la prévalence des RNA *Leishmania* virus chez *L. guyanensis* et déterminer leur diversité génétique. Le promoteur du projet à Cayenne est l'EPaT ou EA 3593 (Université Antilles-Guyane), en partenariat avec l'Institut Pasteur de Cayenne (Laboratoire d'immunologie des Leishmanioses, Laboratoire des Interactions Virus-Hôtes), et le L-A au CNRL pour les composantes clinique et parasitologique.

La collaboration avec **le NIH aux U.S.A.** (Pr. Stephen Beverley) sur le séquençage haut débit de souches de ce parasite est également poursuivie.

La collaboration impliquant **l'Université de Kohat au Pakistan** (Dr M. Hussain), le Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES de Maisons-Alfort (Dr M. Kasbari), l'Unité EA 4688 USC ANSES-VECPAR (Univ. Reims, Pr Depaquit), et le CNR-L sera poursuivie en

2015 sur d'autres foyers humains de LC dans les autres districts de la province pour identification des réservoirs et des vecteurs susceptibles d'être impliqués dans l'apparition des foyers épidémiques et le maintien de la maladie dans cette province reculée et difficilement accessible du Nord-Ouest du Pakistan. Les prélèvements collectés continueront pour partie à être mis en culture et pour partie analysés par sérologie et PCR au LSA, ANSES puis typée par analyse moléculaire et isoenzymatique au CNR-L. Les phlébotomes recueillis continueront à être identifiés et analysés dans l'unité VECPAR.

Cette collaboration permet ainsi de (i) poursuivre le travail de mise en place des outils de diagnostic de la leishmaniose animale et d'identification des vecteurs phlébotomes locaux, (ii) d'évaluer l'évolution et l'impact de la leishmaniose en santé publique humaine et animale dans cette région, et (iii) de proposer un plan de lutte intégré (réservoir animal /phlébotomes / Homme) contre la maladie dans cette province du Pakistan qui paie un lourd tribut aux épidémies successives.

#### **8.4.6. Projets de recherche du L-A de Cayenne**

Certaines souches isolées au L-A et présentant un intérêt épidémiologique, clinique ou thérapeutique seront conservées sur le site du L-A et mises à disposition dans le cadre de travaux de recherche de l'équipe EA3593 (« Epidémiologie des Parasitoses Tropicales ») :

- Détection et phylogénie moléculaire des *Leishmania* Virus (recherche en collaboration avec l'Unité Immunologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Cayenne (Eliane Bourreau) et le Department of Biochemistry à Lausanne (Suisse) (Pr. N. Fasel et Dr C. Ronet),
- Etude de corrélation *in vivo/in vitro*
- Sensibilité des souches vis-à-vis des anti-leishmaniens majeurs
- Sensibilité des souches par rapport à la pharmacopée traditionnelle.

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

Un article rétrospectif portant sur l'évolution de la Collection sur 38 ans est en cours d'écriture: Pratlong F., Balard Y., Lami P., Talignani L., Ravel C., Dereure J., Lefebvre M., Serres G., Rioux JA, Bastien P., Dedet JP. The Montpellier *Leishmania* collection, from a laboratory collection to a biological resource centre : a 38 year story.

#### **8.4.8. 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.

### **8.5. Locaux, équipements, démarche Qualité**

Le CRB-Leish est entré dans une démarche de certification. Pour monter en puissance dans cette démarche, il devrait bénéficier en 2015 de l'aide de la DRI du CHU de Montpellier, qui a recruté un Ingénieur qualitatif.

Un certain nombre de travaux devraient être faits afin de mettre le CRB aux normes en vigueur : en particulier, la liaison des containers d'azote et congélateurs à la GTC (gestion technique centralisée). La question du financement de ces travaux n'est pas réglée.

## REMERCIEMENTS

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

Je souhaite remercier l'ensemble des personnels du CNR-L pour leur travail œuvrant au développement du CNR, et en particulier F. Pratlong pour le gros travail de "curation" terminé cette année, C. Ravel pour la biologie moléculaire et le développement de la démarche Qualité, Yves Balard pour son investissement dans la mise en place du logiciel de gestion commun aux CRB-microbiologie "BRC-LIMS", L. Talignani pour son investissement dans les trois domaines sus-cités (!), P. Lami pour son expertise croissante dans l'identification isoenzymatique et L. Lachaud pour son travail concernant la surveillance et le suivi épidémiologique.

Je remercie également les Centres collaborateurs et leurs responsables, autant en santé humaine (Pr Renaud Piarroux, AP-HM Marseille, Pr Pierre Marty, CHU de Nice, et Dr Pierre Buffet, 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, ANSES, Laboratoire de Santé Animale, Maisons-Alfort, Pr Gilles Bourdoiseau, ENVL, Lyon, et Pr Jérôme Depaquit, Université de 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.



## **LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES CONTENUS DANS CE DOCUMENT**

Tableau I. Fréquence de réalisation des techniques au L-A de Cayenne et leurs résultats dans le cadre de la leishmaniose cutanée ou cutanéomuqueuse.

Tableau II.- Origine selon le centre de soins, des souches de Leishmania traitées par le CNR-L en 2014.

Tableau III.- Origine géographique par pays de contamination des souches traitées par le CNR-L en 2014.

Tableau IV.- Origine selon le centre de soins des souches de Leishmania traitées par le L-A du CNR-L en 2014.

Tableau V.- Détails des identifications enzymatiques de souches réalisées en 2014.

Tableau V.- Evolution des cas positifs au et des identifications d'espèce au L-A de Cayenne.

Tableau VI.- Répartition des espèces de Leishmania à partir des différents sites de santé de la Guyane.

Tableau VII.- Evolution des cas positifs et des identifications d'espèce au L-A de Cayenne.

Tableau VIII.- Lieux de contamination pour l'ensemble des cas de leishmanioses déclarés au CNR-L en 2014.

Tableau IX. - Cas de leishmaniose cutanée contractés en Guyane en 2014, en fonction de la source de déclaration.

Tableau X.- Liste des stagiaires reçus au CNR-L en 2014.

\* \* \*

Figure 1.- Réseau de partenaires et type d'examen envoyés au L-A de Cayenne.

Figure 2.- Répartition des différentes espèces de Leishmania isolées en 2014 au L-A de Cayenne.

Figure 3.- Répartition des cas positifs, négatifs et des demandes de diagnostic au L-A de Cayenne sur l'année 2014.

## **ANNEXES**

(cf. document séparé)

### **1. Mission et organisation du CNR**

#### **1.1. Rappel des missions et objectifs du CNR**

#### **1.2. Organisation actuelle du CNR**

#### **1.3. Description de l'équipe : personnels dévolus dans les activités**

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

#### **1.5. Description de la démarche Qualité du laboratoire**

### **2. Capacités techniques du CNR**

#### **2.1. Liste des techniques de référence**

##### **2.1.1. Diagnostic**

##### **2.1.2. Typage biochimique : Identification iso-enzymatique**

##### **2.1.3. Typage moléculaire**

##### **2.1.4. Autres techniques de typage**

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

#### **2.2. Collections de matériels biologiques**

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

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

##### **2.2.3. Conditions de mise à disposition de la collection**

##### **2.2.4. Collection d'ADN de *Leishmania***

#### **2.3. Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) recommandées par le CNR**