

**Plan du rapport annuel  
d'activité**

**2017**

**Centre de national de référence  
des Leishmanioses**

**Année d'exercice  
2016**

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





## SOMMAIRE

<b>1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....</b>	<b>8</b>
<b>2. ACTIVITÉS D’EXPERTISE 2016.....</b>	<b>8</b>
2.1. EVOLUTION DES TECHNIQUES.....	8
2.2. ACTIVITÉS D’EXPERTISE.....	8
2.2.1. Expertise diagnostique.....	8
2.2.2. Identification moléculaire.....	9
2.2.3. Identification par spectrométrie de masse (MALDI-TOF).....	10
2.2.4. Identification isoenzymatique.....	10
2.2.5. Sensibilité in vitro des souches de <i>Leishmania</i> aux produits anti-leishmaniens....	10
2.2.6. Réception de souches de <i>Leishmania</i> .....	10
2.2.6. Distribution de souches de <i>Leishmania</i> .....	12
2.2.7. Maintien et dynamique de la Collection de souches (Montpellier).....	12
2.2.8. Bilan résumé de l'activité d'expertise; évolution des tendances	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....</b>	<b>15</b>
3.1. SURVEILLANCE DE L'INFECTION ET DES CARACTÉRISTIQUES DES LEISHMANIOSES.....	15
3.1.1. Réseaux de partenaires.....	15
3.1.2. Déclaration de cas.....	16
3.1.3. Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances.....	18
3.1.3.1. France métropolitaine.....	18
3.1.3.2. Guyane Française (synthèse).....	19
3.2. SURVEILLANCE DE LA RÉSISTANCE DES AGENTS PATHOGÈNES AUX ANTI-INFECTIEUX ...	21
3.3. PARTICIPATION AUX RÉSEAUX DE SURVEILLANCE.....	21
3.3.1. Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France (échanges de données, périodicité, analyse commune).....	21
3.3.2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux.....	21
<b>4. ALERTE : DÉTECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPÉS ET DES PHÉNOMÈNES ANORMAUX.....</b>	<b>22</b>
<b>5. ACTIVITES D’INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....</b>	<b>22</b>
5.1. FORMATION.....	22
5.1.1. Enseignements.....	22
5.1.2. Stagiaires.....	23
5.2. DIFFUSION DE L'INFORMATION.....	23
5.3. CONSEIL AUX PROFESSIONNELS DE SANTÉ.....	24
5.4. LISTE DES ACTIVITÉS D’EXPERTISES AUPRÈS DU MINISTÈRE CHARGÉ DE LA SANTÉ, DE SANTÉ PUBLIQUE FRANCE, DES AGENCES DE SÉCURITÉ SANITAIRE, DE LA HAUTE AUTORITÉ EN SANTÉ OU DE STRUCTURE EUROPÉENNE (ECDC...) OU INTERNATIONALE (OMS...).....	25
<b>6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L’ACTIVITE DU CNR.....</b>	<b>25</b>
<b>6.1. ACTIVITES DE RECHERCHE.....</b>	<b>25</b>

6.1.1. ETUDE DES CARACTÉRISTIQUES ÉPIDÉMIOLOGIQUES ET DU POLYMORPHISME ISO-ENZYMATIQUE DES SOUCHES DE LA COLLECTION.....	25
6.1.2. PROJET EUROPÉEN LEISHMAN « IMPROVING TREATMENT OF LEISHMANIASIS BASED ON SPECIES DIFFERENTIATION ».....	25
6.1.3. IDENTIFICATION DES <i>LEISHMANIA</i> PAR LA TECHNIQUE DU MALDI-TOF .....	26
6.1.4. AUTRES TRAVAUX COLLABORATIFS EN RECHERCHE.....	26
<b>6.2. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 2016.....</b>	<b>27</b>
6.2.1. PUBLICATIONS NATIONALES .....	27
6.2.2. PUBLICATIONS INTERNATIONALES.....	27
6.2.3. CHAPITRES DE LIVRES .....	28
6.2.4. COMMUNICATIONS À CONGRÈS NATIONAUX.....	28
6.2.5. COMMUNICATIONS À CONGRÈS INTERNATIONAUX .....	28
6.2.6. CONFÉRENCES SUR INVITATION DANS CONGRÈS ET RÉUNIONS .....	28
<b>7. COLLABORATION AVEC LES STRUCTURES DE SANTÉ ANIMALE POUR LA SURVEILLANCE DES LEISHMANIOSES ANIMALES .....</b>	<b>28</b>
<b>8. PROGRAMME D'ACTIVITÉ POUR 2017-2019.....</b>	<b>30</b>
8.1. ACTIVITÉS D'EXPERTISE .....	30
8.1.1. Réseau de partenaires .....	30
8.1.2. Evaluation de techniques de détection des <i>Leishmania</i> .....	30
8.1.3. Identification des <i>Leishmania</i> .....	30
8.1.4. Maintien et dynamique de la Collection de souches (Montpellier).....	31
8.1.5. Activités d'expertise du L-A de Cayenne.....	33
8.1.6. Recherche en lien direct avec l'activité du CNR.....	33
8.1.6.1. Projet européen LeishMan « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation ».....	33
8.1.6.2. Recherche en collaboration avec les structures travaillant en santé animale et en entomologie médicale.....	34
8.1.6.4. Autres projets de recherche en collaboration.....	35
8.1.6.5. Projets de recherche du L-A de Cayenne.....	35
8.2. CONSEIL, INFORMATION, FORMATION .....	36
8.2.1. Conseil.....	36
8.2.2. Diffusion de l'information .....	36
8.3. CONTRIBUTION À LA SURVEILLANCE DES LEISHMANIOSES HUMAINES.....	37
8.4. CONTRIBUTION À L'ALERTE.....	38
<b>ANNEXES AU RAPPORT 2016 DU CNR DES LEISHMANIOSES.....</b>	<b>40</b>

## Résumé analytique

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires dues à un protozoaire flagellé appartenant au genre *Leishmania*. Il s'agit de zoonoses ("anthropozoonoses"), affectant de nombreuses espèces de mammifères, y compris l'homme, transmises par la piqure d'un insecte vecteur, le phlébotome. Les leishmanioses comprennent différentes formes cliniques dont la leishmaniose viscérale (LV), les leishmanioses cutanées (LC) et la leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM). Elles affectent entre 1,5 et 2 millions de personnes chaque année dans 88 pays, avec une mortalité estimée à 50000 morts par an<sup>1</sup>. Leur incidence tend à augmenter suite à un accroissement des facteurs de risque tenant aux modifications de l'environnement, aussi bien qu'aux comportements humains ou à l'évolution de l'état sanitaire des populations<sup>2</sup>. La leishmaniose est **endémique** dans tout le bassin méditerranéen et plus particulièrement dans le **Sud de la France** et toute l'Europe du Sud. Il y s'agit essentiellement de leishmaniose viscérale, mortelle en l'absence de traitement et due à l'espèce *L. infantum*<sup>3</sup>. Son réservoir est le chien, et la maladie humaine, bien qu'à un niveau faible, y est régulièrement entretenue grâce à l'existence d'une enzootie canine très active. Par ailleurs, en raison de l'accentuation des échanges avec les zones endémiques, il existe de **nombreux cas importés** de leishmaniose viscérale ou cutanée en France, surtout originaires du pourtour méditerranéen (Maghreb en particulier) et de Guyane Française<sup>4</sup>.

Dans le département de **Guyane Française** existe une forte endémie de leishmaniose cutanée, avec un nombre élevé de cas annuels (180 cas déclarés en moyenne). L'épidémiologie de la leishmaniose y est totalement différente de ce qui se passe en France métropolitaine, avec cinq espèces de *Leishmania* présentes, impliquées dans des cycles zoonotiques sauvages. L'explosion démographique de ce département, associée à d'importants mouvements migratoires peu maîtrisés, modifient l'épidémiologie.

Dans les foyers d'endémie de leishmaniose viscérale, et donc dans le Sud de la France, le nombre d'**infections inapparentes** à *Leishmania* est très nettement supérieur au nombre de cas cliniques détectés<sup>5</sup>; d'où le **risque d'extension et d'augmentation de l'endémicité** lié à l'augmentation des causes d'immunodépression. Par ailleurs, il apparaît aujourd'hui clairement que le réchauffement climatique entraîne une extension de la zone d'endémicité dans le Sud de l'Europe<sup>6,7</sup>. En **Guyane**, la leishmaniose représente un problème de santé publique par le nombre de cas détectés annuellement et constitue une **entrave au développement** en raison de sa présence dans le milieu forestier (filère bois, or, agriculture, travaux publics, chasse, tourisme).

Les leishmanioses continuent de poser des problèmes diagnostiques et thérapeutiques. **Le traitement** des leishmanioses, basé sur des molécules coûteuses et toxiques, et souvent objet de demandes de conseil de la part des cliniciens, bénéficie d'un conseil thérapeutique mis en place au CNR en 2006 en collaboration avec le Pr Pierre Buffet (Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur)<sup>8</sup>. Enfin, le **typage** des souches isolées demeure indispensable pour la surveillance en raison de différences de pronostic et de prise en charge du patient selon l'espèce de *Leishmania* en cause.

<sup>1</sup> Bastien P, Lachaud L. Leishmanioses: biologie, clinique et thérapeutique. In : *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 2016, 8-506-A-10, 2016.

<sup>2</sup> den Boer M., et coll. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect.* 2011, 17: 1471–1477.

<sup>3</sup> Pratlong F. et coll. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the South of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, 42: 4077-4082.

<sup>4</sup> Lachaud L. et coll. Surveillance of leishmaniasis in France, 1999 to 2012. *Eurosurveillance*, 2013, 18(29): 20534-...

<sup>5</sup> Bañuls AL\*, Bastien P\* et coll. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. *Clin Microbiol Infect.* 2011, 17: 1451–1461.

<sup>6</sup> Dereure J. et coll. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009; 9:687-94.

<sup>7</sup> Maroli M. et coll. The northward spread of leishmaniasis in Italy : evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop Med Int Health.* 2008; 13:256-64.

<sup>8</sup> Buffet P. et coll. Traitement des leishmanioses en France : Proposition d'un référentiel consensuel. *Presse Med.* 2011; 40(2):173-84

Le **Centre National de Référence des Leishmanioses (CNR-L)** a été créé en mars 1998 (arrêté du 17 mars 1998). Depuis sa création, il développe les différentes missions imparties aux CNR : expertise, surveillance, alerte et conseil. Ainsi, il effectue : (i) la collecte et la conservation de souches de *Leishmania* et leur identification biochimique et moléculaire; (ii) l'expertise en matière de diagnostic et d'identification de souches pour de nombreux laboratoires sur le territoire national; (iii) le conseil et la formation dans le domaine, en particulier en matière de diagnostic et de thérapeutique; (iv) la surveillance des différentes formes de leishmanioses humaines, avec un registre des cas autochtones et importés en France métropolitaine, ainsi qu'en Guyane française, avec l'aide du Laboratoire-Associé (L-A) de Cayenne; (v) l'alerte en cas de phénomènes anormaux observés au cours des activités de surveillance.

Le Laboratoire-Associé de Cayenne (Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie-Mycologie, C.H. Andrée Rosemon, Pr Magalie Demar) remplit effectivement les mêmes missions sur le territoire guyanais.

**L'année 2016** a vu un certain nombre d'évolutions dans l'activité du CNR-L.

1°) En ce qui concerne les missions d' **expertise**.

L'offre d'**expertise diagnostique** s'est intensifiée. Le nombre de demandes de **diagnostics moléculaires** à Montpellier a continué à augmenter comme sur la période 2011-2015, probablement en raison de la très bonne efficacité diagnostique des techniques moléculaires et de la perspective de l'Accréditation obligatoire des examens biologiques. A l'inverse, il a fortement diminué au L-A de Guyane, sans corrélation toutefois avec une baisse du nombre de cas, ce qui peut s'expliquer par une meilleure adaptation de la prescription. Le diagnostic moléculaire au L-A de Cayenne continue d'enregistrer une amélioration de ses performances. Les CDPS (centres de santé périphériques) constituent 53% des demandes de diagnostic.

En ce qui concerne l'**identification des *Leishmania***, depuis le milieu de l'année 2016, le Laboratoire coordonnateur a adopté le MALDI-TOF comme méthode de première ligne pour l'identification. Dans un certain nombre de cas, le typage moléculaire demeure nécessaire pour confirmer l'identification. Néanmoins, le nombre de demandes de typage moléculaire a continué à augmenter. L'activité du typage moléculaire au L-A de Cayenne a également augmenté, faisant passer leur nombre d'identifications positives à 270.

La **Collection de souches** de *Leishmania* a continué à faire l'objet de travaux de "curage" visant à améliorer la qualité des données associées aux souches. En effet, un travail systématique de croisement des données associées, et une entreprise de typage systématique des souches par MALDI-TOF, permettent de repérer des erreurs qui sont corrigées au fur et à mesure.

Le nombre annuel de **souches reçues** au CNR-L à Montpellier a de nouveau augmenté en 2016, après des années de diminution en lien avec la forte réduction d'envois de souches par le L-A de Cayenne. Cette situation s'est normalisée en 2016, avec 110 souches reçues de Guyane (cf. Figure 1). Ceci a permis de retrouver des flux de réception de souches plus proches des années antérieures à 2012. En effet, le nombre de souches isolées en Guyane Française a encore augmenté en 2016 (à 174) et a quasiment doublé depuis 2014. De façon notable, ce sont surtout les Centres de soins périphériques (CDPS) qui sont à l'origine de cette augmentation, témoin à la fois de l'augmentation d'incidence dans ces régions et de l'amélioration des pratiques mise en place grâce au L-A de Cayenne.

Néanmoins, la tendance à la diminution de l'isolement de souches persiste, en lien avec les difficultés à isoler et envoyer des souches et le moindre intérêt de la culture pour le diagnostic (cf. Dossier de renouvellement du CNR-L, 2017-2021). Par ailleurs, le nombre de souches reçues de centres étrangers a encore diminué. Ceci est là encore expliqué par la diffusion et le recours plus fréquent aux méthodes de diagnostic et de typage moléculaires en zone d'endémie.

Le nombre de **souches distribuées** a encore fortement diminué en 2016. L'explication est connue et a été exposée dans le dossier de renouvellement du CNR-L 2017-2021. Les équipes nationales et internationales recherchent souvent des souches parfaitement caractérisées, conservées dans des conditions de rigueur maximales, avec des renseignements associés le plus complets possibles; et la certification en cours constitue un avantage par rapport aux autres collections de Leishmanies de par le monde, peut-être plus faciles d'accès mais moins formalisées. Néanmoins, les aspects administratifs de cession des souches, devenus complexes avec la rigidification de la réglementation, rebutent nombre de demandeurs.

2°) Les activités de **surveillance** continuent de constituer une grosse activité du CNRL. Au total, en 2016, **435 cas ont été déclarés** au CNR-L : 16 cas de LV, 415 cas de LC et 4 cas de LCM. Les déclarations sont parvenues de 34 structures de santé en métropole, et du L-A de Cayenne : celui-ci a déclaré 308 cas de LC diagnostiqués en Guyane Française. Le nombre de cas de leishmanioses déclarés au CNR-L par des structures de santé en France métropolitaine est resté stable par rapport à 2015. Le nombre de contaminations ayant eu lieu dans les pays du Maghreb a continué de monter à un niveau relativement élevé avec 47 cas (*versus* 16 en 2014).

Le nombre total de cas déclarés avec contamination **en Guyane** est en **forte augmentation** par rapport à 2015 (340 versus 228); la moyenne annuelle était de 208 cas par an pour les années 2011-2015. Les raisons de cette augmentation ne sont pas démontrées, mais ont probablement trait aux changements de population en cours en Guyane, avec augmentation de l'immigration et des activités en forêt. Le taux de remplissage, souvent insuffisant, des fiches de renseignements associés ne permet pas d'avoir une vision complète des données épidémiologiques. A noter que 59% des cas déclarés ont été vus dans les CDPS.

Il n'y a pas eu d'alerte spécifique, ni de cas groupés détectés.

Par ailleurs, les collaborations avec des **structures de santé animale**, qui visent à mieux décrire et surveiller les nombreux foyers de leishmaniose canine présents en France, sont en nette décroissance depuis la soutenance de thèse du Dr Mohamed Kasbari (LSA, ANSES) mi-2016.

3°) En matière de **formation et conseil**, le CNR-L a développé une forte activité de conseil dans le cadre de l'expertise diagnostique (Dr C. Ravel). Il a poursuivi ses activités de **conseil thérapeutique** téléphonique destiné aux médecins, basé sur une collaboration entre le CNR et le Pr Pierre Buffet et Dr Gloria Morizot (Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur). Le travail sur le **site Internet du CNR** continue; les pages du CNR-L, ainsi que les pages spécifiques du diagnostic, de la déclaration de cas, du conseil thérapeutique et de la Collection de souches ont été mieux individualisées. **En Guyane française**, le Service de Dermatologie du CHAR (Pr Pierre Couppié) est le service référent pour la prise en charge clinique et thérapeutique de la leishmaniose cutanée avec comme responsable référent. Un protocole de confection des frottis cutanés et des biopsies cutanées et cutanéomuqueuses a été revu en accord avec les pratiques du Service de Dermatologie.

4°) Enfin, le CNR-L a participé à plusieurs projets de **recherche**, en collaboration avec les équipes du Laboratoire ou d'autres équipes françaises ou étrangères.

# 1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

Description détaillée présentée en Annexe.

## 2. ACTIVITES D'EXPERTISE 2016

Description des techniques disponibles présentée en Annexe.

### 2.1. Evolution des techniques

- Techniques développées ou en développement

Le CNR a aujourd'hui optimisé l'identification des souches de *Leishmania* par la technologie du MALDI-TOF (spectrométrie de masse). La première partie du projet de validation de la méthode en collaboration entre le CNR de Montpellier (Dr Lachaud) et le Centre collaborateur de Marseille (Pr Piarroux) a été menée à bien. De nouveaux développements sont en cours (cf. § 6.1.3).

- Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse : méthode, état d'avancement, principaux résultats
- Techniques transférées vers d'autres laboratoires

### 2.2. Activités d'expertise

#### 2.2.1. Expertise diagnostique

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

##### - Diagnostic moléculaire

###### Au Laboratoire coordonnateur :

En 2016, 518 échantillons pour diagnostic moléculaire de leishmaniose ont été analysés. Les demandes provenaient du CHRU de Montpellier (21 %) mais également de 55 Centres hospitaliers français (CH ou CHU). 25 % des prélèvements se sont avérés positifs, dont environ 78 % pour des formes cutanées.

Il est à noter que ces demandes diagnostiques sont une source essentielle d'informations pour la surveillance, et fournissent une réelle capacité d'alerte, ainsi que des occasions répétées de conseil aux professionnels de santé (Dr C. Ravel).

###### Au Laboratoire Associé (L-A) de Cayenne :

En 2016, 461 demandes de diagnostic de leishmaniose ont été enregistrées. Les demandes correspondent à 418 patients et ont concerné essentiellement le diagnostic des leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses (453 demandes) avec 338 recherches sur frottis, 430 recherches sur culture et 428 recherches par biologie moléculaire. Une recherche de leishmaniose viscérale a été demandée pour 8 patients (6 sur du sang et 2 sur de la moelle osseuse).

Ces demandes étaient issues du CH de Cayenne (140/453, soit 31% des demandes), de Saint-Laurent-du-Maroni (44/453 demandes, soit 10% des demandes), du Centre du Service des Armées (CMIA) (20/453, soit 4% des demandes), et des Centres de Soins et Postes de Santé (CDPS) disséminés sur le territoire guyanais (247/461, soit 53,5% des demandes). A noter que le

Centre de Maripasoula, situé sur le Maroni, représente à lui seul 159 demandes, soit 63% des prescripteurs des CDPS.

Pour 31 patients, il y a eu au moins deux demandes de recherche de leishmaniose cutanée ou cutanée-muqueuse faites sur l'année.

Le nombre de demandes est en forte diminution par rapport à l'année 2015 (près de 50% en moins), sans que l'on note une nette diminution des cas (Tableau I). On peut évoquer qu'au terme d'une période de sensibilisation et de formation, les professionnels de santé maîtrisent mieux la pathologie et ciblent mieux les indications de prélèvements.

**Tableau I. Synthèse de l'activité diagnostique du L-A de 2012 à 2016**

	2012	2013	2014	2015	2016
Nombre de demandes de LC	215	409	669	809	461
Nombre de cas toutes techniques confondues	142	140	249	358	308
	66%	34%	37%	44%	67%
Nombre de souches isolées		47	102	165	174

A noter également que le seul examen direct n'aurait dépisté que 195 cas, soit 63% des 308 patients positifs (sensibilité stable par rapport aux années précédentes), contre 300 cas, soit 97% pour le diagnostic moléculaire. La sensibilité de ce dernier a donc connu une nette amélioration par rapport à celle de 2013, qui était de 61,4%.

La PCR-RFLP a été réalisée de la manière suivante : PCR-RFLP initiale (directement sur biopsie) : 341 ; PCR-RFLP sur biopsie après échec de la culture : 20 ; PCR-RFLP sur culture : 47

### - Diagnostic immunologique

En 2016, 198 sérologies leishmaniennes ont été réalisées. Ces chiffres montrent une stabilité par rapport aux années précédentes.

## 2.2.2. Identification moléculaire

### 2.2.2.1. Laboratoire coordonnateur

Le typage moléculaire est réalisé en routine depuis 2006.

En 2016, 228 demandes de typage moléculaire ont été reçues, dont 100 où l'ADN était détectable et 88 qui ont donné lieu à une identification. Au total, 7 espèces de *Leishmania* ont été identifiées, avec toujours une prédominance de *L. major* (n= 43 %). Les espèces impliquées pour 33 cas du Nouveau Monde ont été également identifiées, dont 17 *L. guyanensis*, 14 *L. braziliensis* (dont 7 de Guyane), 1 *L. amazonensis*, et 1 *L. mexicana*.

Par rapport aux années précédentes, ces identifications font apparaître une forte représentation de *L. braziliensis*, qui représentait habituellement environ cinq à dix fois moins de cas que *L. guyanensis*. Le CNR n'a pas d'explication évidente pour cette déviation.

### 2.2.2.2. Laboratoire-Associé de Cayenne

L'identification de l'espèce est réalisée en routine à Cayenne par PCR-RFLP depuis 2006. Depuis 2009, elle est appliquée à la grande majorité des cas vus en Dermatologie à Cayenne (90% en 2015), et, de plus en plus, aux cas des patients vivant dans les Centres de santé de la Guyane en zone isolée.

En 2016, 428 demandes de diagnostic/typage moléculaire ont été reçues, et pour 296 l'ADN était détectable et a permis l'identification de 270 *Leishmania*. La répartition est retrouvée dans le tableau suivant.

	Nombre	Pourcentage
<i>L. guyanensis</i>	251	89%
<i>L. braziliensis</i>	9	3%
<i>L. lainsoni</i>	6	2%
<i>L. naiffi</i>	2	0,7%
<i>L. amazonensis</i>	2	0,7%
Indéterminée	10	3.5%

On notera que 57% des identifications sont réalisées sur les prélèvements en provenance des CDPS de la Guyane, avec un taux d'identification par PCR-RFLP croissant (de 19,3% à 65%).

### 2.2.3. Identification par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

Au cours de l'année 2016, une banque de données d'identification des *Leishmania* a été construite en collaboration avec l'équipe du Pr Piarroux (La Timone, Marseille). Actuellement, toutes les souches qui arrivent au CNR sont typées avec cette méthode. Des développements pour l'amélioration de la base de données sont en cours (cf. § 6.1.3).

Le L-A de Cayenne a débuté la mise en place de cette technique en mai 2016, en parallèle avec la technique de PCR-RFLP et en collaboration avec Marseille et le Laboratoire Coordonnateur. Elle n'est pas encore passée en utilisation de routine quotidienne.

### 2.2.4. Identification isoenzymatique

Le typage biochimique iso-enzymatique, qui est toujours une technique de référence reconnue par la communauté scientifique, n'est plus utilisé en routine, mais est réservé essentiellement aux enquêtes et études épidémiologiques. Cette technique permet également de placer une espèce dans la classification existante lorsqu'une Leishmanie nouvelle est mise en évidence (par ex. "Martinique", "Côte d'Ivoire").

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

Devant l'absence de centre expert en France dans ce domaine, le CNR-L a mis en place depuis 2007 des tests de chimiosensibilité des *Leishmania* aux anti-leishmaniens.

Les tests de chimiosensibilité sont exceptionnellement demandés chez ce parasite, et posent un problème d'interprétation en raison des différences notables observées entre amastigotes et promastigotes de la même souche. Aucune demande n'a été enregistrée en 2016.

### 2.2.6. Réception de souches de *Leishmania*

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

En 2016, 143 souches de *Leishmania* ont été isolées ou reçues, dont 138 d'hôpitaux, centres de soins ou instituts de recherche français, et 5 de centres de soins ou de recherche à

l'étranger. Le détail de l'origine des souches par centre d'isolement en 2016 figure sur le Tableau II.

**Tableau II. Origine, selon le centre de soins, des 143 souches de *Leishmania* traitées par le Laboratoire Coordonnateur en 2016.**

France (138 souches)				Etranger (5 souches)		
Etablissements	Nb	Etablissements	Nb	Pays	Etablissements	Nb
APHP Cochin	11	CHU Nice	4	ESPAGNE	Faculté de Barcelone	5
APHP Bobigny	1	CHU Strasbourg	1			
CHU Cayenne	110	CHU Rennes	3			
CH Croix Rousse Lyon	1	Dermatologue	1			
CHU Grenoble	1	SSA Kourou	2			
CHU Montpellier	3					

• **Origine géographique des souches par pays de contamination.**

En 2016, l'origine géographique des souches par pays où la contamination des cas a eu lieu figure sur le Tableau III : les souches ont été obtenues en provenance de 9 pays différents, dont 3 pays d'Afrique, 3 pays d'Europe et 3 pays d'Amérique.

**Tableau III. Origine géographique, par pays de contamination, des 143 souches traitées par le CNRL en 2016**

Continents	Pays	Nb	Continents	Pays	Nb
<b>Afrique (n = 10)</b>	Algérie	2	<b>Amérique (n = 124)</b>	Brésil	1
	Maroc	4		Guyane Française	122
	Tunisie	4		Mexique	1
			<b>Europe (n = 8)</b>	Espagne	2
		France		5	
		Portugal		1	
<b>Origine géographique inconnue</b>		1			

*N.B. Ces chiffres sont différents des chiffres de déclaration de cas.*

**Tableau IV.- Détail des identifications (MALDI-TOF) des 143 souches reçues en 2016**

Espèces	Nombre
<i>L. amazonensis</i>	3
<i>L. braziliensis</i>	5
<i>L. guyanensis</i>	89
<i>L. infantum</i>	11
<i>L. lainsoni</i>	5
<i>L. major</i>	7
<i>L. mexicana</i>	1
<i>L. naiffi</i>	2
<i>L. panamensis</i>	3
<i>L. peruviana</i>	2
<i>L. shawi</i>	1
<i>Typage en cours</i>	14

**En Guyane, pour l'année 2016, 174 souches de *Leishmania* ont été isolées**, dont 74 souches (42,5%) provenant des hôpitaux de Cayenne et de Saint-Laurent-Du-Maroni (51% en 2014), 91 souches (53%) des CDPS (19,3% en 2014), et 9 souches (5%) du Centre Médical du Service des Armées (CMIA) (27% en 2014). De façon corrélée avec les diagnostics, le nombre de souches isolées des CDPS a augmenté relativement par rapport aux autres centres (cf. également § 2.2.2. Identification moléculaire). On note que sur les souches isolées de patients vivant dans les centres de santé, 54 souches, soit 59%, provenaient du CDPS de Maripasoula.

Cette situation est stable par rapport à 2015 mais l'augmentation est très nette par rapport aux années précédentes (seulement 47 souches isolées en 2013 et 104 en 2014).

**Tableau V. Origine selon le centre de soins, des 174 souches de *Leishmania* traitées par le L-A à Cayenne entre 2014 et 2016.**

	Hôpitaux (SLM+CHAR)	Armée (CMIA)	Centre /Postes de santé (CDPS)	Total
Nombre de souches isolées en 2016	74 (42%)	9 (5%)	91 (53%)	174
Nombre de souches isolées en 2015	90 (54,5%)	7 (4,2%)	68 (41,2,%)	165
Nombre de souches isolées en 2014	53 (51%)	27 (26%)	20 (19,3%)	104

### 2.2.6. Distribution de souches de *Leishmania*

En 2016, 15 souches de *Leishmania* ont été fournies à divers laboratoires et institutions à l'étranger, dont la liste figure ci-dessous :

- 4 souches à la Facultad de Medicina de La Paz – Bolivie,
- 11 souches à l'American University of Beirut, Beyrouth – Liban.

Par ailleurs, 63 souches ont été restituées à l'isoleur dans le cadre d'un projet en collaboration de longue date avec la Facultat de Farmacia de Barcelone (Espagne).

### 2.2.7. Maintien et dynamique de la Collection de souches (Montpellier)

Le maintien de la Collection de souches du CNR fait appel à une logistique lourde, à une rigueur éprouvée et à une collaboration suivie avec de nombreuses équipes nationales et internationales. Ces collaborations sont à l'origine du rayonnement de notre structure qui a été rapporté par Gregorio González-Alcaide G. et coll. (Evolution of coauthorship networks: worldwide scientific production on leishmaniasis. *Revista Soc. Brasil. Med. Trop.* 2013, 46(6):719-27). Le CNR-L s'emploie à faire vivre et progresser cette Collection, devenue importante pour 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.

En 2016, le travail de "curage" de la collection a été repris et revisité par le Dr Laurence Lachaud.

- Le **catalogue des souches** en ligne sur le site Internet du Laboratoire a été revisité avec, avant mise sur le site, un contrôle rigoureux de tous les renseignements relatifs à ces souches. Un certain nombre de souches a du être enlevé du catalogue en raison de l'absence de certains

renseignements, aujourd'hui considérés comme nécessaires par le Comité scientifique du CNR. D'autres souches ont été ajoutées. Le nombre actuel de souches sur le catalogue reste aux environs de 550 (chiffre approximatif car en constante évolution en ce moment).

- **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.
  - typage systématique par MALDI-TOF
  - données cliniques plus précises pour les leishmanioses cutanées (nombre de lésions, aspect des lésions, localisations)

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, encadré par le nouveau curateur, Dr Laurence Lachaud, avec l'aide de l'ancien curateur Dr Francine Pratlong. Il constitue une valorisation importante des souches de la Collection.

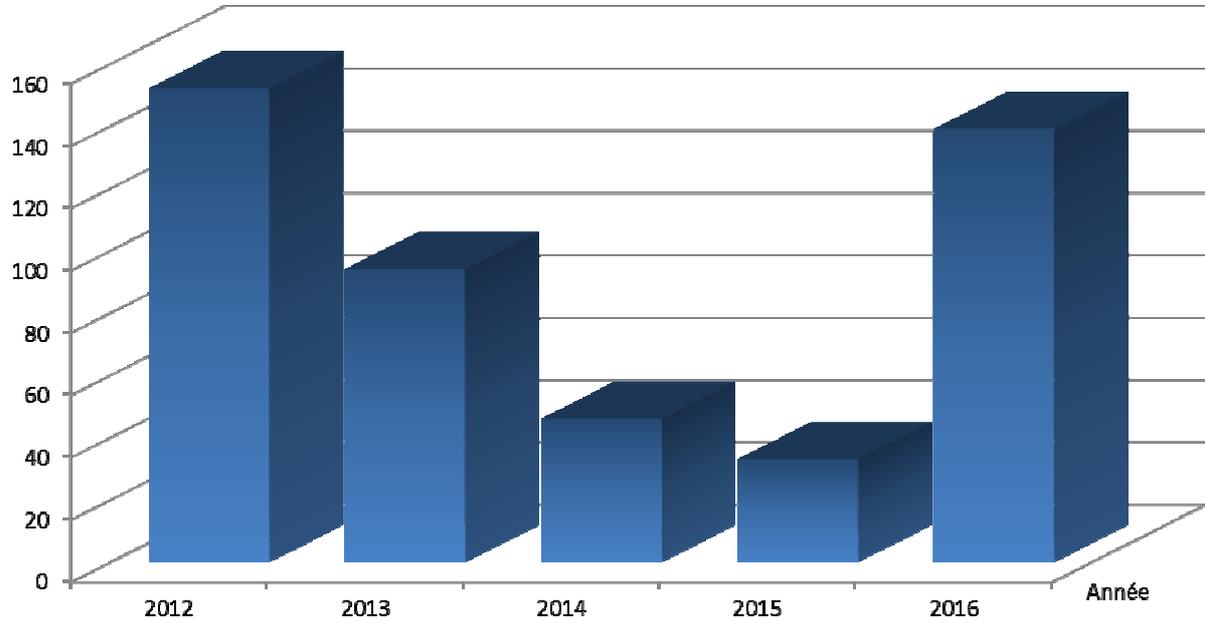
- Les souches référencées comme marqueurs de zymodèmes ont été sécurisées au CNR-L en plusieurs aliquotes.

- L'ensemble des codes OMS a été revu avec certaines annotations (en particulier pour les problèmes liés aux pays faisant partie de l'ancienne URSS) afin de clarifier la situation.

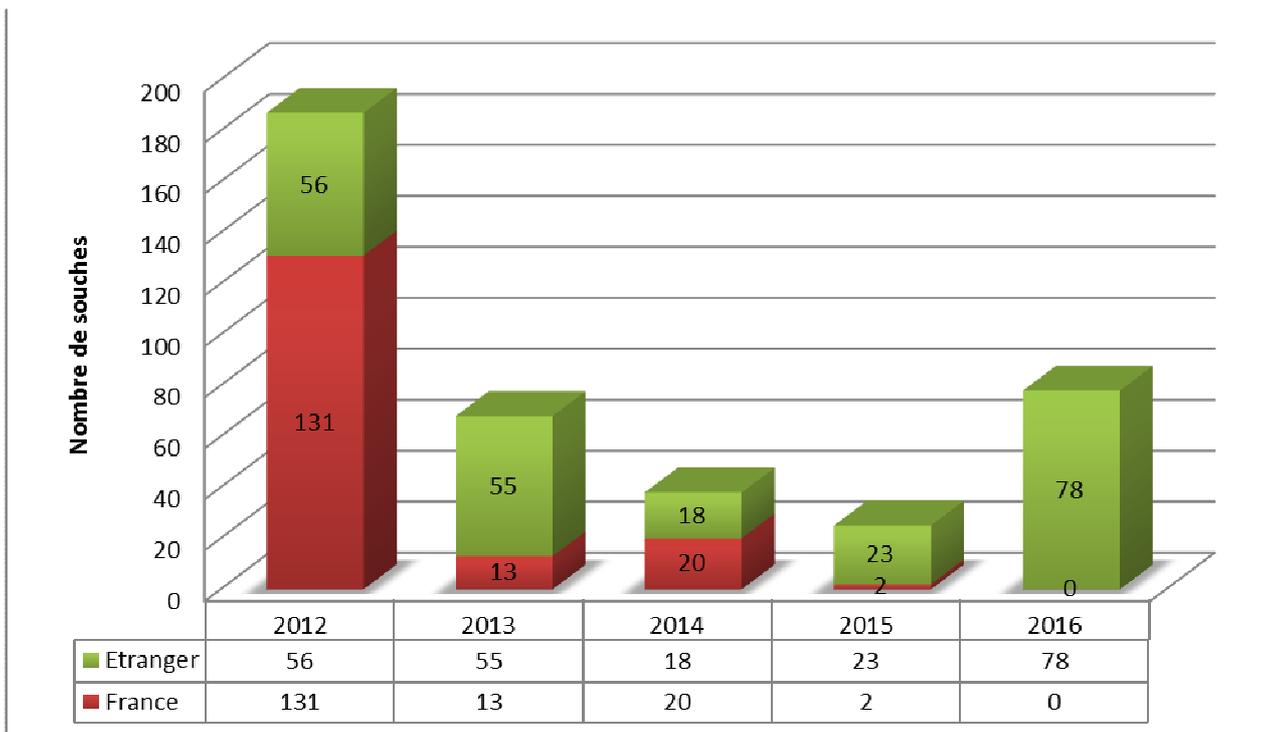
- Les doublons ont été repérés et fusionnés lorsque c'était possible.

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.

**Figure 1. Nombre de souches stockées annuellement au Laboratoire coordonnateur de Montpellier entre 2012 et 2016.**



**Figure 2. Nombre de souches distribuées par an par le CNR-L entre 2012 et 2016.**



### 3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

*La surveillance a pour but d'évaluer la persistance et la dynamique des foyers autochtones d'endémie leishmanienne, et d'essayer d'anticiper les implications de cette affection au plan de la santé publique, en particulier 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'éventuels cas groupés ou 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, qui a été récemment modifiée afin d'en faciliter l'usage.*

*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 demandes de diagnostic, de même que les envois 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'infection et des caractéristiques des leishmanioses

##### 3.1.1. Réseaux de partenaires

Le réseau de partenaires mis en place au fil des ans par le CNR reste fort.

Par ailleurs, des relations plus fortes ont été établies entre Montpellier et le **L-A de Cayenne**; les relations sont plus fluides et des collaborations plus étroites ont été initiées. La visite de Patrick Bastien à Cayenne à l'automne 2016 a permis d'apprécier les fortes contraintes imposées au L-A par le contexte local et les potentialités offertes dans ce Département où la leishmaniose est un problème de santé publique particulièrement important.

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

La liste des Services ayant déclaré au CNR-L des cas de leishmanioses en 2016 figure ci-dessous.

**Pour les CHU** : les Laboratoires de Parasitologie-Mycologie des CHU suivants : Amiens, (80), Caen (14), Dijon (21), Grenoble (38), Lille (59), Limoges (87), Lyon (69), Marseille (13), Montpellier (34), Nancy (54), Nantes (44), Nice (06), Nîmes (30), Reims (51), Rennes (35), Tours (37), divers établissements de l'AP-HP à Paris (75) (Bichat, Cochin-St Vincent de Paul, St-Antoine, St-Louis, Pitié-Salpêtrière). Avicenne à Bobigny (93).

**Pour les CHG** : CH Bayonne (64), CH Chambéry (74), CH Denain (59), CH de Perpignan (66), CH Thionville (57), CHD de Tourcoing (59), CH de Valenciennes (59), CHAR à Cayenne (973).

**Pour les Hôpitaux d'Instruction des Armées** : HIA Legouest à Metz (57), HIA Bégin à Saint Mandé (94) et HIA Desgenettes à Lyon (69).

**Pour le Service de Santé des Armées** : Département d'Epidémiologie et Santé publique.

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

Le Laboratoire-Associé (LHUPM) de Cayenne a établi un réseau important de partenaires sur le territoire. Le L-A reçoit un certain nombre de prélèvements, accompagnés de données cliniques et épidémiologiques dans environ deux-tiers des cas (entre 65 à 73%), 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 (centres de santé) de la Guyane.

Le service de Dermatologie, du fait de son ancienneté et de sa renommée, draine la majorité des cas pour les personnes pouvant se rendre à Cayenne. Le diagnostic est réalisé par l'examen parasitologique direct, mais aussi par culture et PCR. La démarche hospitalière (CH de Cayenne) est étendue aux postes et Centres de Santé de l'intérieur de la Guyane (qui sont sous son autorité administrative et médicale).

La transmission au CNR (Montpellier) des informations sur les cas de leishmaniose diagnostiqués se fait de façon annuelle sous forme d'un fichier Excel après anonymisation selon les fiches de déclaration fournies : conservation sur micro-ordinateurs (2 endroits différents) avec accès par mot de passe.

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. Déclaration de cas

**En 2016, 435 cas** au total ont été déclarés au CNR-L : 127 fiches de déclaration de cas ont été reçues directement au CNR-L, provenant de structures de France métropolitaine (104 déclarations) et des Services de Santé des Armées (19 cas); le L-A de Cayenne a déclaré 308 cas de LC diagnostiqués en Guyane Française.

La répartition de ces cas **selon la forme clinique** pour l'année 2016 se fait de la façon suivante (toutes structures confondues) :

- 16 cas de leishmanioses viscérales, dont 8 cas d'autochtones, 2 dont l'origine était indéterminée, et 6 où la contamination avait eu lieu hors de France.
- 415 cas de leishmanioses cutanées (dont 3 autochtones de France métropolitaine),
- 4 cas de leishmaniose cutanéomuqueuse (3 avec une contamination en Guyane et un au Brésil).

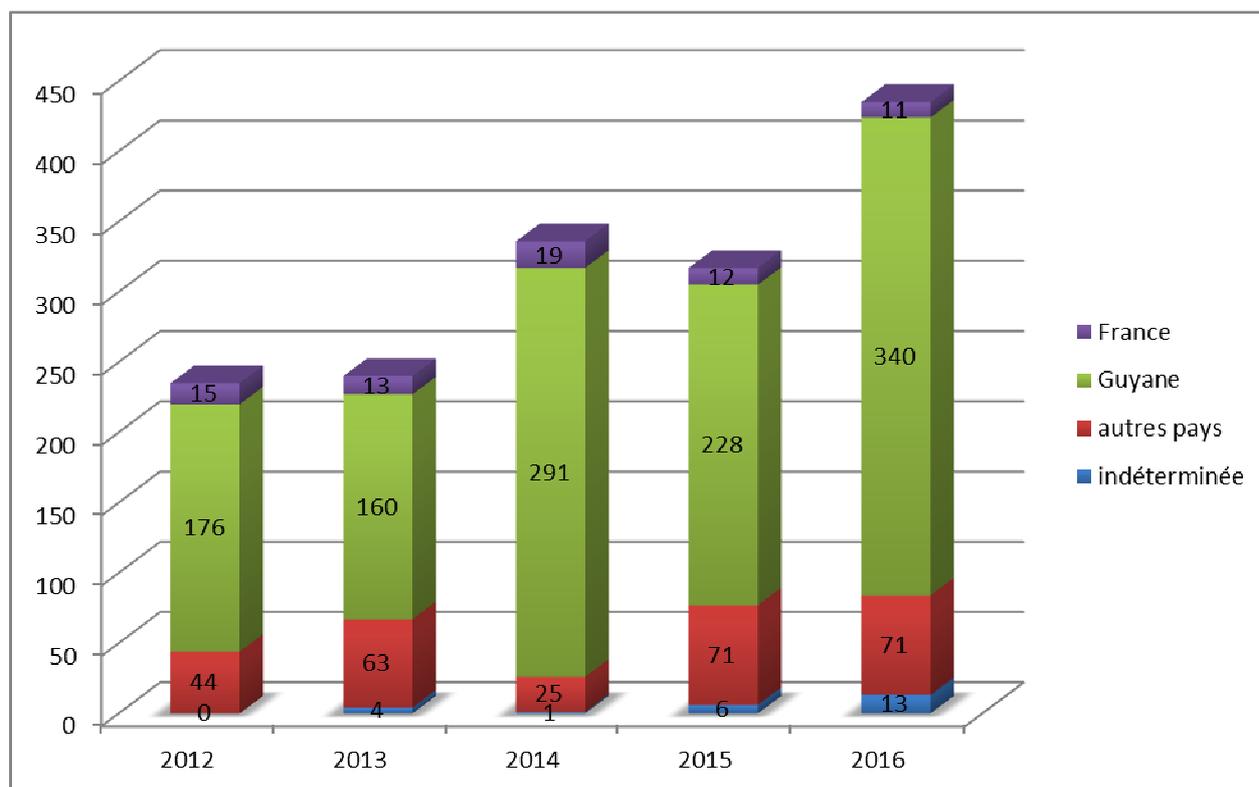
N.B. Ces chiffres sont susceptibles d'être légèrement augmentés ou modifiés par la suite, certaines déclarations étant encore en suspens, et d'autres déclarations pouvant nous parvenir en retard.

Le Tableau VI et la Figure 3 montrent la répartition de ces cas **selon l'origine géopographique** des contaminations.

**Tableau VI. Lieux de contamination pour l'ensemble des cas de leishmanioses déclarés au CNR-L en 2016.**

Forme clinique	Origine de la contamination						Total
	France métropolitaine	Maghreb (Algérie, Tunisie, Maroc)	Guyane et pays limitrophes	Antilles	Autre pays (ou plusieurs pays possibles)	Indéterminée ou non renseignée	
L. viscérale	8	0	0	0	6	2	16
L. cutanée	3	47	337	0	17	11	415
L. muqueuse	0	0	3	0	1	0	4
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>47</b>	<b>340</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>13</b>	<b>435</b>

**Figure 3. Nombre de cas humains de leishmaniose déclarés au CNR-L de 2012 à 2016 en fonction du lieu de contamination**



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

#### 3.1.3.1. France métropolitaine

**Leishmanioses autochtones/importées** : en 2016, 11 cas de leishmanioses autochtones (8 viscérales et 3 cutanées) ont été déclarés. Le nombre de cas importés est beaucoup plus élevé (71 cas dont 8 LV, 64 LC et 1 LCM). Pour environ 13 cas, il n'a pas été possible de déterminer l'origine de la contamination (voyages ou résidences multiples en particulier).

**Evolution** : Le nombre de cas de leishmanioses déclarés au CNR-L par des structures de santé en France métropolitaine est resté stable par rapport à 2015 (Tableau VII), et ce quelle que soit la forme de leishmaniose ou le caractère importé ou autochtone. Néanmoins, les cas autochtones sont à leur niveau le plus bas depuis au moins 2006, bien que les chiffres soient toujours faibles (min. 11, max. 31).

Le nombre de contaminations ayant eu lieu dans les pays du Maghreb a continué de monter à un niveau relativement élevé avec 47 cas (*versus* 16 en 2014).

**Tableau VII. Evolution du nombre de déclarations annuelles des cas faites au CNR-L (hors CH Cayenne) entre 2012 et 2016.**

Années		2012	2013	2014	2015	2016	Total	Moyenne annuelle 2012-2016
<b>Cas autochtones</b> (France métropolitaine)	LV	10	8	11	8	8	45	9
	LC	4	4	6	5	3	45	4,4
	LM	1	1	2	0	0	4	<1
	<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>19</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>94</b>	<b>14,2</b>
<b>Cas importés</b> (en France métropolitaine)	LV	10	9	5	9	6	39	7,8
	LC	44	63	25	71	64	267	53,4
	LC Guyane	34	22	49	29	31	165	33
	LM	2	0	1	0	2	5	1
	<b>Total</b>	<b>88</b>	<b>94</b>	<b>79</b>	<b>109</b>	<b>103</b>	<b>473</b>	<b>94,6</b>
Origine indéterminée (LV + LC)		0	4	1	6	13	24	4,8
<b>Total</b>		<b>103</b>	<b>111</b>	<b>99</b>	<b>128</b>	<b>127</b>	<b>568</b>	<b>113,6</b>

#### **Pathologie :**

**En 2016**, le nombre de formes viscérales ou cutanées est stable.

Sur l'ensemble des 106 cas de LC diagnostiqués en France métropolitaine, autochtones ou importés et associés à des données fiables, 46 étaient des formes cutanées multiples.

Quatre cas étaient des leishmanioses cutanéomuqueuses.

#### **Autres données patients :**

Pour les 16 cas de LV, le facteur immunodépression était renseigné dans 14 cas : de façon surprenante, aucun patient ne présentait d'immunodépression, confirmant ainsi le déclin de cette infection chez l'immunodéprimé (seulement 6 cas en 2015).

Quatre cas seulement sont survenus chez des enfants âgés de moins de 10 ans. Ainsi, en France, la LV continue de toucher plus souvent des adultes relativement jeunes (moyenne d'âge de 31.6 ans [1-77 ans]).

On notera également un sex ratio biaisé, avec seulement 5/16 cas chez des femmes.

#### **Distribution géographique :**

\* En 2016, comme les autres années, la majorité des cas déclarés avaient été contaminés en Guyane (379/474, 80%). La seconde région grande pourvoyeuse de cas reste le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie), avec 10% des cas au total (uniquement des formes cutanées), et 38% des cas de LC (47/124).

\* Pour les **leishmanioses autochtones**, les cas avec un lieu de contamination précis (6 LV et 1 LC) provenaient de trois départements du sud de la France (Alpes-Maritimes, Bouches-du-Rhône, et Pyrénées orientales), situés dans la zone d'endémie leishmanienne connue, et les autres du Sud de la France sans précision.

### **3.1.3.2. Guyane Française (synthèse)**

La situation en Guyane Française se caractérise par une **évolution assez marquée**, particulièrement au vu du bilan des 10 dernières années qui a été détaillé dans le dossier de demande de renouvellement du CNR.

Aux cas diagnostiqués et déclarés par le L-A de Cayenne s'ajoutent les cas diagnostiqués et déclarés par divers établissements de santé en France métropolitaine. Les chiffres donnés ci-dessous s'appuient sur ces deux types de notifications.

Pour **l'année 2016** : on retrouve un total de 340 cas de contamination en Guyane ou dans les pays limitrophes (voir Tableau VI).

- Le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (Pr. M. Demar) du Centre Hospitalier de Cayenne nous a adressé 308 déclarations de cas de LC diagnostiqués en Guyane Française. Sur 90 fiches renseignées sur ce paramètre, le lieu de contamination retrouvé correspondait à 54% des sites situés en Guyane. Les autres lieux de contamination correspondaient aux pays limitrophes. On notera que le niveau de remplissage des fiches est très variable selon le paramètre et 30 fiches n'ont pas été remplies (aucun renseignement clinique autre que l'état-civil du patient). Le niveau de remplissage des fiches pour le paramètre « Profession » est de 34%, celui de « Lésion cutanée » de 67%, celui du « siège des lésions » de 68%.
- Les Hôpitaux d'instruction des Armées (HIA Bégin, Lavéran, Legouest et Sainte Anne) et le Service de Santé des Armées (Département d'Epidémiologie et Santé publique de l'Institut de Médecine tropicale du Pharo) ont déclaré 19 cas de LC avec une contamination en Guyane.
- De plus, parmi les déclarations de cas de LC et LCM envoyées par les diverses structures sanitaires métropolitaines, 13 concernaient une contamination en Guyane.

Le nombre de cas originaires de Guyane est ainsi **en forte augmentation**. Avec 308 cas déclarés en Guyane et 340 cas déclarés au total, **l'incidence annuelle de la LC en Guyane Française** en 2016 serait au minimum de 1,36 p. 1000 (sur la base de 250.000 habitants), alors qu'elle était de 0,91 p.1000 en 2015, 0,97 p.1000 en 2014 et 0,9 p. 1000 en 2012.

**Tableau VIII. Cas de leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse contractés en Guyane en 2016, en fonction de la source de déclaration.**

Déclarations	Nb total	Sexe		Statut		
		H	F	militaire	civil	non rens.
Centres de Santé de France métropolitaine	13	10	2	5	8	-
CH Cayenne *	308	210	67	6	105	171
HIA et SS des Armées	19	>19	-	19	-	-
<b>Total</b>	<b>340</b>	<b>&gt;238</b>	<b>69</b>	<b>36</b>	<b>119</b>	<b>171</b>

\* sur les 277-282 fiches renseignées; inclut les cas du CMIA

### Pathologie :

Tous les cas de contamination en Guyane Française étaient des LC, excepté 4 cas de leishmaniose cutanéomuqueuse. Aucune leishmaniose viscérale n'a été détectée.

### Autres données patients :

L'infection est survenue chez 2 patients **VIH**-positifs ayant développé une infection à *L. guyanensis*.

En 2016, le **sex-ratio** H/F pour les cas où cette donnée était connue était de 3,45 (238 hommes pour 69 femmes). Il était de 3,9 (595 hommes pour 152 femmes) durant la période 2011-2015. Ceci est à mettre en relation avec les activités forestières (orpaillage, bucheron..), essentiellement masculines.

### Agents pathogènes en cause :

Le CH de Cayenne rapporte une baisse importante à 3% des cas à *L. braziliensis*, espèce qui poursuit une baisse entamée depuis 2014 (environ 5% des cas), alors que jusque là elle se maintenait à un niveau stable autour de 13%. Cette baisse est compensée par l'existence de 7 cas à *L. braziliensis* diagnostiqués en métropole, ce qui corrige la répartition *L. braziliensis/L. guyanensis* de Guyane à 5,6% / 94,4% (16 vs. 268). Cette modification est donc corrélée avec une augmentation de *L. guyanensis*, qui reste l'espèce prépondérante en 2016 à un niveau équivalent à celui de 2015.

Les chiffres qui indiquaient l'implantation réelle de *L. braziliensis* en Guyane avec une prévalence de plus de 10% des cas ne sont donc pas confirmés cette année.

Les espèces telles que *L. lainsoni*, *L. naïffi* ou *L. amazonensis*, bien que minoritaires (environ 4% des cas), sont de répartition plus diversifiée.

**Tableau IX. Identifications des espèces de Leishmania en cause en Guyane de 2011 à 2016.**

	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Nombre d' identifications	96	104	92	222	198	270
<i>L. guyanensis</i> (%)	85,4	78,8	83,7	92,2	67	89,3
<i>L. braziliensis</i> (%)	13,5	14,4	13	5	12,6	3,2
<i>L. amazonensis</i> (%)	0	5,8	2,2	2,3	5,5	0,7
<i>L. lansonii</i> (%)	1	1	1,1	0,4	2	2,5
<i>L. naïffi</i> (%)	0	0	0	0	0,05	0,7

### Distribution géographique et temporelle :

On note que la nette recrudescence des diagnostics portés pour les patients des **Centres de santé** (CDPS), passée de 20% à 46,5% entre 2014 et 2015, se confirme en 2016 avec 59% des cas.

**Tableau X. Origine des cas de leishmaniose en Guyane par centre de santé**

Cas déclarés	2014	2015	2016
CDPS	(20%) 20/100	(46,5%) 93/200	(59%) 180/308
Hôpital	(53%) 53/100	(47,5%) 95/200	(37%) 114/308
CMIA	(27%) 27/100	(6%) 12/200	(4%) 13/308

De même, la répartition de *L. braziliensis* diagnostiqués dans les CDPS se maintient à 44% en 2016 (48% en 2015).

La distribution temporelle des cas de leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses en Guyane est superposable d'une année à l'autre avec un nombre plus faible de cas à partir de mai (saison sèche) puis une reprise à compter de novembre (saison des pluies). En 2016, sur les 308 cas déclarés, on note 58% des cas en saison des pluies contre 41% des cas en saison sèche.

## **3.2. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux**

Des tests *in vitro* de sensibilité des Leishmanies aux drogues, en particulier à l'amphotéricine B, ont été mis au point au CNR depuis 2005. Cependant, (1) les résistances documentées à la fois *in vivo* et *in vitro* sont rarissimes et (2) les demandes sont également très rares. Aucune demande n'a été enregistrée en 2016.

## **3.3. Participation aux réseaux de surveillance**

### **3.3.1. Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France** (échanges de données, périodicité, analyse commune)

En Guyane française, une demande émanant de l'ARS visait à préparer et diffuser une maquette d'information sur la leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse à l'ensemble de la population. Le L-A du CNR a contribué à la rédaction du texte. L'étape d'édition et de diffusion est en cours.

Le recrutement d'une PH en Infectiologie affectée à mi-temps aux CDPS a contribué à la déclaration et surveillance des cas, de même qu'à la sensibilisation de la pathologie auprès des personnels. La forte demande émanant des CDPS en est la preuve. Des formations dispensées par le service de Dermatologie sont proposées aux personnels se rendant dans les CDPS portant sur la confection de frottis et de biopsies cutanées.

### **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.

En 2016, pour la première fois depuis les années 1980, il n'y a eu aucun cas autochtone de co-infection avec le VIH signalés sur le territoire métropolitain.

En Guyane, l'infection est survenue sur 2 patients VIH-positifs ayant développé une infection cutanée à *L. guyanensis*, sans critères de sévérité.

## **4. ALERTE : DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES ET DES PHENOMENES ANORMAUX**

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.

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 de 47 cas en 2016, soit légèrement supérieur à l'incidence annuelle calculée sur les 6 dernières années qui est de 36.5 cas/an.

L'endémicité en Guyane Française apparaît difficile à estimer car les lieux de contamination ne sont pas toujours précisés. En 2016, l'incidence de la leishmaniose a été significativement plus élevée que les années précédentes avec un total de 340 cas rapportés, soit une incidence de 1,36 p. 1000. Lissée sur 6 ans, la moyenne des cas annuels avec une contamination en Guyane ou dans les pays limitrophes est de 224 cas sur la période 2011-2016, donc stable par rapport à 2011-2015.

Aucun événement de cas groupés n'a été signalé durant cette période.

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

### **5.1. Formation**

#### **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, la leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse est largement enseignée :

- 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.
- Il en est de même pour le service universitaire de Dermatologie tropicale. Le service universitaire de Dermatologie accueille 3 internes de spécialité DES de Dermatologie de même que des internes de spécialité de DESC de Pathologie Infectieuse et Tropicale. Ils participent à la prise en charge clinique, diagnostique et thérapeutique des patients et

effectuent les prélèvements des frottis cutanés et cutanéomuqueux de même que les biopsies.

- 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.

### 5.1.2. Stagiaires

#### En 2016 :

- Anna Fernandez, de l'Université de Barcelone (Facultat de Farmacia) est venu effectuer un stage de 2 mois au CNR.

- le Dr Mohamed Kasbari (inspecteur vétérinaire à l'ANSES) a passé sa thèse de Doctorat d'Université sous la direction de Christophe Ravel sur des thématiques en étroite collaboration entre le CNR et le LSA de l'ANSES.

*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.*

## 5.2. Diffusion de l'information

Le **site Internet** du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie ([www.parasitologie.univ-montp1.fr](http://www.parasitologie.univ-montp1.fr)) mis en ligne fin 2004 inclut les pages spécifiques du CNR-L. Il existe également en une version en langue anglaise, qui est à actualiser. Ce site permet une présentation des leishmanioses, du CNR, du CRB et de son organisation, du catalogue des souches disponibles pour la communauté scientifique, et facilite la mise à disposition des souches grâce aux documents disponibles en ligne. Les pages du site incluent toute l'information sur la réglementation et les conditions d'expédition des souches, les démarches pour les demandes d'expertise ainsi que pour les déclarations de cas. Les **activités du CNR-L** y sont diffusées grâce à la mise en ligne des rapports d'activité (dernier rapport mis en ligne : rapport d'activité 2015 et demande de renouvellement 2017-2021).

Depuis 2011, le site Internet a fait l'objet de plusieurs mises à jour, en particulier pour introduire le Laboratoire-Associé de Cayenne, les nouvelles modalités d'envoi des souches, ainsi que l'actualisation des documents de demande de diagnostic, demande de souches et déclaration de cas.

En **2016**, une refonte importante du site a eu lieu, de façon à **mieux individualiser les pages du CNR-L**, ainsi que celles de la Collection de *Leishmania*. Ainsi, les pages spécifiques du diagnostic, de la déclaration de cas, du conseil thérapeutique et de la Collection de souches peuvent être ciblées dès la page d'accueil du site, pour une meilleure lisibilité de l'extérieur. Des fiches spécifiques pour les demandes de diagnostic, de typage, de dépôt de souche ou les déclarations de cas, sont téléchargeables directement sur le site avec les procédures d'envoi des échantillons. De même le catalogue de la Collection est accessible dès la page d'accès. A noter que le site ne permet pas la notification directe en ligne des cas de leishmaniose par les services ou les laboratoires.

### 5.3. Conseil aux professionnels de santé

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

Un conseil pour l'expertise diagnostique et thérapeutique est assuré par plusieurs praticiens du CNR-L. Les numéros de téléphone des praticiens concernés sont inscrits sur le site web du CNR. Les personnes référentes seront le Dr. Laurence Lachaud (leishmaniose viscérale) et le Pr Pierre Buffet (leishmanioses cutanées), ainsi que le Pr. Patrick Bastien en deuxième ligne.

Par ailleurs, une adresse mail commune ([cnr-leishmania@chu-montpellier.fr](mailto:cnr-leishmania@chu-montpellier.fr)) a été mise en place afin d'offrir une accessibilité plus simple et une possibilité de réponse plus rapide aux différentes requêtes.

Des conseils sont également donnés par le Dr Christophe Ravel à de nombreux praticiens de diverses structures de santé en France à propos de la prise en charge diagnostique, des diagnostics réalisés et des identifications d'espèces.

#### a) Conseil thérapeutique

Le traitement des leishmanioses est un problème difficile pour plusieurs raisons. Les produits disponibles ont une efficacité limitée, dépendante de l'espèce de *Leishmania* en cause. Ils peuvent exposer à des effets indésirables sévères et requièrent de ce fait des modalités de suivi spécifiques. Il n'existe pas à ce jour d'algorithme décisionnel simple. C'est pourquoi le CNR-L a mis en place depuis 2006 une structure de conseil thérapeutique téléphonique destinée aux médecins.

Ce conseil thérapeutique a été basé sur une collaboration entre le CNR-L à Montpellier et le Pr Pierre Buffet et le Dr Gloria Morizot, au départ au Centre Médical de l'Institut Pasteur de Paris. Un numéro téléphonique est accessible aux médecins aux heures ouvrables, permettant de proposer 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. Le conseil est donné soit en direct soit dans les 48 h pour les cas complexes. 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 **2016**, 23 conseils thérapeutiques ont été donnés à Necker-Pasteur et 14 à Montpellier.

**En Guyane française**, le Service de Dermatologie du CHAR est le service référent pour la prise en charge clinique et thérapeutique de la leishmaniose cutanée avec comme responsable référent, le Pr Pierre Couppié. Un protocole de confection des frottis cutanés et des biopsies cutanées et cutanéomuqueuses a été revu en accord avec les pratiques du Service de Dermatologie.

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

Le Dr Christophe Ravel, responsable du diagnostic moléculaire des leishmanioses et de l'identification moléculaire des *Leishmania*, reçoit de nombreux appels téléphoniques provenant de praticiens de diverses structures de santé en France, à propos de la prise en charge diagnostique, des diagnostics réalisés et de l'interprétation des données de typage. Ces appels ne sont toutefois pas tracés.

Ils constituent une source importante de conseil aux professionnels de santé, mais aussi en retour, d'informations concernant d'éventuels regroupements anormaux de cas de leishmaniose ou d'augmentation d'incidence localisée.

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

- Le CNR-L participe au réseau international de Surveillance de la co-infection *Leishmania*/VIH coordonné par l'**Organisation Mondiale de la Santé** (WHO/UNAIDS Surveillance Network), auquel il déclare les cas autochtones de co-infection signalés sur le territoire national.
- Le CNR-L a été consulté fin 2016 par la **H.A.S.** pour expertise concernant les examens biologiques relatifs au diagnostic conventionnel, sérologique et moléculaire, des différentes formes de leishmanioses dans différents contextes cliniques. Cette consultation se poursuit en 2017.

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

### **6.1. ACTIVITES DE RECHERCHE**

Le CNR-L a participé à plusieurs programmes de recherche conduits dans le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie et dans l'unité labellisée "**Maladies infectieuses et vecteurs : écologie, génétique, évolution et contrôle**" ou "MiVEGEC" (UMR CNRS 5290/ IRD 224 / Université Montpellier, dir. F. Simard), à laquelle nous sommes rattachés depuis 2008.

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

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

Un travail rétrospectif concernant la Collection a été mené concernant à la fois la structure et ses activités, et portant à la fois sur les aspects épidémiologiques, noso-géographiques et taxonomiques. Ce travail a fait l'objet d'un article original :

PRATLONG F, BALARD Y, LAMI P, TALIGNANI L, RAVEL C, DEREURE J, LEFEBVRE M, SERRES G, BASTIEN P, DEDET JP. The Montpellier *Leishmania* Collection, from a Laboratory Collection to a Biological Resource Center: A 39-Year-Long Story. *Biopreserv Biobank*. 2016; 14(6):470-479.

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

Développé à l'initiative du Pr Johannes Blum (Université de Bâle), le groupe LeishMan (pour Leishmaniasis Management) travail à harmoniser les pratiques de prise en charge

thérapeutique des patients atteints de leishmaniose. Il s'est réuni pour la première fois en janvier 2010 à Bâle et plusieurs fois depuis, avec la contribution d'un membre du CNR-L (C. Ravel). Ce groupe rassemble des biologistes et cliniciens de plusieurs pays Européens (UK, Suisse, France, Espagne, Allemagne, Pays Bas, Belgique, Suède, Portugal, Italie) ainsi que de Turquie, d'Israël et d'Australie. Associée à la prise en charge et au conseil thérapeutique, une base compilant les données cliniques, épidémiologiques et biologiques a été développée par le Pr Pierre Buffet. Elle a entre autre l'originalité de recueillir les options thérapeutiques qu'auraient choisies le clinicien sollicitant s'il n'avait pas eu accès au conseil (mesure de l'impact tangible de l'activité de conseil).

Au sein du groupe, le Dr C. Ravel participe en particulier à la réflexion sur l'identification moléculaire et les éléments de taxonomie du parasite, 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. Depuis 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 entre 16 laboratoires européens; les résultats issus de ce travail ont été publiés en 2016 :

VAN DER AUWERA G, BART A, CHICHARRO C, CORTES S, DAVIDSSON L, DI MUCCIO T, DUJARDIN JC, FELGER I, PAGLIA MG, GRIMM F, HARMS G, JAFFE CL, MANSER M, RAVEL C, ROBERT-GANGNEUX F, ROELFSEMA J, TÖZ S, VERWEIJ JJ, CHIODINI PL. Comparison of *Leishmania* typing results obtained from 16 European clinical laboratories in 2014. *Euro Surveill.* 2016; 21(49).

En 2016, la réunion annuelle du groupe de travail du projet "LeishMan" a été organisée par le Dr Christophe Ravel à Montpellier.

### **6.1.3. Identification des *Leishmania* par la technique du MALDI-TOF**

Une nouvelle approche de typage des *Leishmania*, basée sur l'analyse de spectres de masse obtenus par la technique de Maldi-Tof (Matrix assisted laser desorption/ionization-Time of flight) avait été initiée en 2015 en parallèle dans deux Centres collaborateurs du CNR, Marseille (Pr R. Piarroux) et Pitié-Salpêtrière (Pr P. Buffet), en collaboration avec le CNR.

Les premiers résultats montraient que cette technique permet de faire une pré-identification de l'espèce dans un délai extrêmement court à partir de parasites en culture. Un échantillonnage de 121 souches formellement identifiées par le CNR-L et couvrant 32 taxons différents a été utilisé pour la mise au point d'une technique d'obtention d'empreintes ("spectres") et pour la création d'une banque de spectres de référence. Cependant, la base de données n'était pas assez fournie. En collaboration avec le Centre Collaborateur de Marseille, le L.-A. de Cayenne et l'équipe du Pr Montserrat Gallego à Barcelone, une base de données beaucoup plus complète a été construite et testée. Sa validation a été effectuée par les 4 centres (Montpellier, Marseille, Cayenne et Barcelone) à partir de 268 isolats. Une application gratuite permettant l'identification en ligne à partir de fichiers bruts générés par l'automate de MALDI-TOF Bruker® a été conçue et validée. Cette étude est poursuivie en 2017 au CNR.

### **6.1.4. Autres travaux collaboratifs en recherche**

Une étude concernant l'identification de certaines espèces de *Leishmania* par PCR en temps réel a été publiée en collaboration avec le Dr Momar N'Dao, Centre National de Référence pour la Parasitologie, à l'**Université McGill** (Research Institute of the McGill University Health Centre), Montréal, Canada :

NATH-CHOWDHURY M, SANGARALINGAM M, BASTIEN P, RAVEL C, PRATLONG F, MENDEZ J, LIBMAN M, NDAO M. Real-time PCR using FRET technology for Old World cutaneous leishmaniasis species differentiation. *Parasit . Vectors* 2016; 9:255.

Une étude collaborative portant sur l'épidémiologie de la leishmaniose cutanée en Turquie (Prof. Yusuf Ozbel, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, **Ege University, İzmir, Turquie**); cette étude a mis en évidence pour la première fois la transmission autochtone de l'espèce *L. major* en Turquie :

ÖZBILGIN A, ÇULHA G, UZUN S, HARMAN M, TOPAL SG, OKUDAN F, ZEYREK F, GÜNDÜZ C, ÖSTAN İ, KARAKUŞ M, TÖZ S, KURT Ö, AKYAR I, ERAT A, GÜNGÖR D, KAYABAŞI Ç, ÇAVUŞ İ, BASTIEN P, PRATLONG F, KOCAGÖZ T, ÖZBEL Y. Leishmaniasis in Turkey: first clinical isolation of *Leishmania major* from 18 autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in four geographical regions. *Trop Med Int Health*. 2016 ;21(6):783-91.

## 6.2. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 2016

Les publications et communications sont détaillées ci-dessous (en souligné les membres du CNR-L, en souligné pointillé les membres des Centres collaborateurs ou les doctorants).

### 6.2.1. Publications nationales

### 6.2.2. Publications internationales

Pratlong F, Balard Y, Lami P, Talignani L, Ravel C, Dereure J, Lefebvre M, Serres G, Bastien P, Dedet JP. The Montpellier *Leishmania* Collection, from a Laboratory Collection to a Biological Resource Center: A 39-Year-Long Story. *Biopreserv Biobank*. 2016; 14(6):470-479.

Hartley MA, Bourreau E, Rossi M, Castiglioni P, Eren RO, Prevel F, Couppié P, Hickerson SM, Launois P, Beverley SM, Ronet C, Fasel N. Leishmanivirus-Dependent Metastatic Leishmaniasis Is Prevented by Blocking IL-17A. *PLoS Pathog*. 2016; 12:e1005852

Van der Auwera G, Bart A, Chicharro C, Cortes S, Davidsson L, Di Muccio T, Dujardin JC, Felger I, Paglia MG, Grimm F, Harms G, Jaffe CL, Manser M, Ravel C, Robert-Gangneux F, Roelfsema J, Töz S, Verweij JJ, Chiodini PL. Comparison of *Leishmania* typing results obtained from 16 European clinical laboratories in 2014. *EuroSurveill*. 2016; 21(49).

Daval N, Marchal C, Guillaumot L, Hüe T, Ravel C, Keck N, Kaşbari M. First report of autochthonous non-vectorial canine leishmaniasis in New Caledonia, south-western Pacific: implications for new control measures and recommendations on importation of dogs. *Parasit Vectors* 2016; 9:108.

Nath-Chowdhury M, Sangaralingam M, Bastien P, Ravel C, Pratlong F, Mendez J, Libman M, Ndao M. Real-time PCR using FRET technology for Old World cutaneous leishmaniasis species differentiation. *Parasit . Vectors* 2016; 9:255.

Özbilgin A, Çulha G, Uzun S, Harman M, Topal SG, Okudan F, Zeyrek F, Gündüz C, Östan İ, Karakuş M, Töz S, Kurt Ö, Akyar I, Erat A, Güngör D, Kayabaşı Ç, Çavuş İ, Bastien P, Pratlong

E, Kocagöz T, Özbel Y. Leishmaniasis in Turkey: first clinical isolation of *Leishmania major* from 18 autochthonous cases of cutaneous leishmaniasis in four geographical regions. Trop Med Int Health. 2016 ;21(6):783-91.

### **6.2.3. Chapitres de livres**

Bastien P., Lachaud L. " Leishmanioses". In : *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 2016, 8-506-A-10.

Couppié P. Leishmanioses cutanées. In : *Dermatologie et infections sexuellement transmissibles* (Saurat JH, Lachapelle JM, Lipsker D, Thomas L, Borradori L.). Ed. Elsevier Masson SAS, Paris, 2017. pp. 196-198.

### **6.2.4. Communications à congrès nationaux**

Sambourg E, Ginouyès M, Vantilke V, Dufour D, Sainte-Marie D, Labbe S, Boukari R, Nacher M, Demar M, Couppié P. Leishmaniose cutanée et infection par le VIH en Guyane française: série de 33 cas. *Journées Dermatologiques de Paris*. 8-12 décembre 2015, Paris. Ann Dermatol Venereol. 2015;142S:S626.

Darmon A, Leduc N, Delaigue S, Ginouyès M, Bonini J, Dufour J, Prevot G, Sainte-Marie D, Labbé S, Boukari R, Nacher M, Demar M, Couppié P. Leishmaniose cutanée multilésionnelle en Guyane française : étude comparative. *Journées Dermatologiques de Paris*. 9-13 décembre 2016, Paris. Ann Dermatol Venereol. 2016;143S:S341.

Aoun-Coussieu A, Nacher M, Dufour J, Demar M, Couppié P. Cas de leishmanioses cutanées à *L. lainsoni* en Guyane française de 2003 à 2013. *Journées Dermatologiques de Paris*. 9-13 décembre 2016, Paris. Ann Dermatol Venereol. 2016;143S:S342-S343.

### **6.2.5. Communications à congrès internationaux**

### **6.2.6. Conférences sur invitation dans congrès et réunions**

## 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. Cette surveillance est fortement contributive à celle des leishmanioses humaines dans la mesure où le chien joue un rôle de "sentinelle" dans les foyers endémiques à *L. infantum*.*

*Rappelons que la leishmaniose canine n'est pas une maladie à déclaration obligatoire en France. Les diagnostics établis par les vétérinaires praticiens ne sont pas centralisés. Aucune activité de surveillance n'est vraiment formalisée.*

**En 2016, l'ANSES a souhaité recentrer ses activités** et arrêter les activités liées à la leishmaniose animale. Le **Dr Mohamed Kasbari** (LSA, ANSES) a néanmoins passé plusieurs semaines au CNR-L pour terminer la rédaction de sa thèse, qu'il a brillamment soutenue le 19 Juillet 2016. Le titre de la thèse était : "Contribution à l'étude des voies de transmission non conventionnelles horizontale et verticale des leishmanioses humaines et animales", Université de Montpellier. Ses travaux ont concerné essentiellement : l'étude de cas groupés de leishmaniose canine autochtone survenant dans des zones considérées comme non-endémiques, et donc possibles foyers "ectopiques" à transmission non vectorielle; l'évaluation du rôle respectif des voies de transmission non-vectorielle et vectorielle dans la dynamique de ces foyers "ectopiques" ; l'importance sur les plans qualitatif et quantitatif des voies de transmission vénérienne et trans-placentaire (données expérimentales à l'appui).

Plusieurs articles devraient être publiés à l'issue de cet énorme travail.

Par ailleurs, une étude a été publiée à l'occasion d'une première notification de cas autochtone de leishmaniose canine en **Nouvelle-Calédonie**. Ce cas s'est déclaré à la suite de contacts étroits avec un chien leishmanien importé. Toutes les investigations ont permis de mettre en évidence l'absence de transmission vectorielle, soulignant à nouveau l'importance sous-estimée de la transmission par contact (directe, verticale ou vénérienne) entre chiens.

DAVAL N, MARCHAL C, GUILLAUMOT L, HÜE T, RAVEL C, KECK N, KASBARI M. First report of autochthonous non-vectorial canine leishmaniasis in New Caledonia, south-western Pacific: implications for new control measures and recommendations on importation of dogs. *Parasit Vectors* 2016; 9:108.

Le Dr M. Kasbari reste proche du CNR en raison de son fort intérêt pour le diagnostic, l'épidémiologie et la veille dans le domaine des leishmanioses animales (cf. Rapport de la demande de renouvellement du CNR). Il souhaite continuer à contribuer à la surveillance de la progression des leishmanioses et des souches de leishmanies susceptibles de passer du réservoir animal à l'homme. Il est en cela fortement soutenu par le CNR, mais sa position en détachement pour ces missions spécifiques reste malheureusement aujourd'hui incertaine.

## 8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR 2017-2019

Le programme d'activité pour les 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. Réseau de partenaires

Environ 120 établissements de santé publics, privés ou des Armées, envoient des échantillons chaque année à Montpellier pour un diagnostic de leishmaniose. Un renforcement des collaborations avec le Service de Santé des Armées est actuellement difficile en raison de la complète restructuration de ces services.

Le L-A de Cayenne draine l'ensemble des diagnostics et des déclarations de cas pour cette forte zone d'endémie. Le L-A a le souci constant de veiller au maintien des contacts avec les prescripteurs, en particulier ceux des CDPS. Il continuera ses actions de sensibilisation et de formation qui ont porté leurs fruits au cours du quinquennal précédent. Il cherchera aussi à améliorer le recueil de données épidémiologiques et cliniques concernant les cas de leishmaniose.

Par ailleurs, les collaborations initiées entre Montpellier et le L-A de Cayenne seront renforcées. Des réunions en métropole seront proposées à l'occasion de visites du responsable du L-A, Magalie Demar, ou d'autres membres de ce Laboratoire (visite prévue de Ghislaine Prévot au Centre Coordonnateur en mai 2017). Une réunion trimestrielle est prévue par visio-conférence afin de faire un bilan sur les bases de données et les problématiques.

#### 8.1.2. Evaluation de techniques de détection des *Leishmania*

D'assez nombreux kits de détection commerciaux sont maintenant proposés à travers le monde. Les cibles moléculaires visées sont peu nombreuses (gène kinétoplastique du cytochrome B en particulier) ou non décrites. Une évaluation comparative d'un certain nombre de ces kits devrait permettre d'établir s'il existe des différences significatives de sensibilité de détection entre eux. Le système non commercialisé actuellement utilisé au CNR (basé sur la technique développée par C. Mary et al. J Clin Microbiol. 2004, 42, 5249-55) pourra être comparé. Le CNR a accès à une collection importante d'ADN extraits à partir de prélèvements cliniques, cette collection sera un très bon matériel pour établir ces comparaisons.

D'autre part, le CNR envisage la constitution d'échantillons de sang artificiels lyophilisés destinés à permettre des comparaisons stables dans le temps au sein du CNR et entre Centres désirant comparer leurs techniques respectives.

#### 8.1.3. Identification des *Leishmania*

L'évaluation de l'identification des souches de *Leishmania* sera poursuivie, avec maintien de deux approches :

- l'identification moléculaire, devenu technique de référence dans notre structure ; à noter que seule cette méthode autorise un typage des *Leishmania* in situ dans les échantillons humains sans mise en culture préalable ou en cas d'échec de la culture.
- le typage par MALDI-TOF qui a été mis en route et s'avère très utile pour la gestion de la Collection de souches du CNR.

### **8.1.3.1. Développement de l'identification moléculaire**

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

Elle contribue depuis plusieurs années aux projets du groupe de travail européen "*Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation*", destiné à harmoniser les pratiques de prise en charge thérapeutique des patients atteints de leishmaniose, et dans lequel le Laboratoire Coordonnateur est impliqué.

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

#### **a) Laboratoire coordonnateur :**

Suite aux deux études concernant l'identification par MALDI-TOF dans les Centres collaborateurs de Marseille (Pr R. Piarroux) et Pitié-Salpêtrière (Pr P. Buffet), la méthode est adaptée à Montpellier pour un usage plus extensif. L'application de cette technique aux souches de *Leishmanias* réduit indubitablement les délais d'identification et de typage par rapport aux autres techniques utilisées à l'heure actuelle comme l'analyse iso-enzymatique, l'identification moléculaire ou le MLST.

En ce qui concerne la base de données, elle fera l'objet de nouveaux développements afin d'améliorer la qualité de l'identification, en particulier au sein des complexes *L. braziliensis*, *L. guyanensis* et *L. donovani*. L'étude implique en particulier le L.-A. de Cayenne.

La technique étant validée, elle pourra être étendue à l'ensemble des souches stockées ou reçues au CNR. Ainsi, l'identification systématique des >6000 souches existantes peut être envisagée afin de détecter d'éventuelles erreurs anciennes de manipulations, déjà mises en évidence lors de la mise au point de ce typage.

Le progrès enregistré sur ce plan technique pourra être amplifié et partagé en tant que CNR. La banque de spectres constituée sera mise en ligne gratuitement avec des conditions d'accessibilité liées à la demande d'identifiant et de mot de passe. A notre connaissance, ce sera la seule banque de données de spectres aussi complète disponible dans le monde. Une publication est en cours de rédaction.

Par contre, si sa facilité d'utilisation pour le typage rapide de souches ne fait de doute, il sera indispensable d'évaluer la capacité de cette méthode à être utilisée pour des études épidémiologiques

**b) Laboratoire Associé :** Un travail de collaboration avec le Centre collaborateur de Marseille (Pr R. Piarroux) et le CNR de Montpellier (Dr L. Lachaud) a été entrepris depuis le début de l'année visant à évaluer l'identification d'un panel de souches de *Leishmania* représentatives des différentes régions ayant une problématique de leishmaniose en santé publique. Ce travail permettra de corrélérer les rendus de typage entre les techniques de séquençage, du MALDI-TOF et de la RFLP-PCR.

### **8.1.4. Maintien et dynamique de la Collection de souches (Montpellier)**

Le maintien de la Collection internationale de souches de *Leishmania* du CNR-L fait appel à une logistique lourde, à une rigueur éprouvée et à une collaboration suivie avec de nombreuses équipes nationales et internationales.

Le CNR-L s'emploiera à continuer à faire vivre et progresser cette Collection, qui reste importante pour de nombreux centres hospitaliers et de recherche.

#### **8.1.4.1. Amélioration des données associées aux souches**

La richesse et la précision des renseignements relatifs à chaque souche nécessitent un travail constant de contrôle et de synthèse au vu de l'énorme masse de données engrangée au fil des 40 années de l'existence de la Collection. A la suite du travail du curateur de la Collection en 2014-2015 (Dr Francine Pratlong), il est apparu essentiel d'améliorer la précision et l'exactitude de ces renseignements. Il s'agit d'un travail long et minutieux consistant à comparer les renseignements présents dans la base de données avec ceux issus des documents originaux accompagnant les souches, et éventuellement des publications ayant utilisé ces souches

Le Dr Laurence Lachaud s'est attachée avec énergie à ce nouveau chantier, qu'elle poursuivra avec l'aide des deux techniciens, Loïc Talignani et Patrick Lami, et de l'Assistant-Ingénieur responsable de l'informatique, Yves Balard. Le Dr Francine Pratlong, MCU-PH émérite, qui connaît et pratique cette collection depuis sa création, sera sollicitée régulièrement pour son expertise. Les souches vérifiées seront étiquetées comme telles et seront susceptibles de passer au catalogue.

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

Enfin, un travail de plus grande ampleur pourra inclure, dans les données associées à chaque souche, d'éventuelles **références bibliographiques** des articles ayant utilisé et mentionnant telle ou telle souche.

L'ensemble de ces travaux permettra à la Collection de proposer aux équipes de recherche des souches particulières, qui sont souvent l'objet d'un intérêt spécifique pour les travaux des chercheurs. Ceci constitue une valorisation supplémentaire importante de la Collection.

#### **8.1.4.2. Curage des données d'identification de souches**

A la suite de la reprise du travail de curateur de la Collection par Laurence Lachaud en 2016, il est également apparu qu'un certain nombre d'autres erreurs pouvaient être présentes. Ces erreurs sont inévitables au vu de l'importance de la collection, du nombre d'années de son existence et de la multiplicité des acteurs qui s'y sont succédés depuis sa création. Suivant une approche différente de celle de Francine Pratlong, et profitant de sa mise au point du MALDI-TOF dans le Laboratoire, L. Lachaud, assistée de Patrick Lami et Yves Balard, a ainsi commencé à identifier des erreurs concernant le code O.M.S., le nombre de cryotubes restants, voire l'identification d'espèce ou de zymodème.

Le MALDI-TOF, qui autorise un typage simple et rapide, sera ainsi utilisé pour vérifier l'identité des souches de façon systématique, en particulier avant tout envoi de souches vers l'extérieur, mais également à l'aveugle ou en cas de doutes sur toute donnée associée à une souche. Cette technique améliorera sans aucun doute la souplesse de la gestion de la Collection.

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

A la suite de ce contrôle minutieux de tous les renseignements accompagnant les souches, le catalogue en ligne (cf. § 3.2.7) sera simplifié et épuré, de façon à proposer une offre plus claire et mieux visible.

#### **8.1.4.4. Démarche Qualité**

La démarche Qualité sera poursuivie et accentuée, avec pour objectif au cours du quinquennal la certification selon la norme NF 96.900 pour le CRB et l'accréditation selon la norme ISO 15189 pour l'ensemble du Département de Parasitologie-Mycologie.

Toutes les structures et ressources humaines sont aujourd'hui en place pour mener à bien cette démarche à son terme. En particulier, la présence d'un Ingénieur Qualité (Andreia Dhenaut) au sein du CRB du CHU de Montpellier est a priori un gage de succès.

La Collection de souches de *Leishmania* (CRB-Leish) doit être proposée à la certification en 2017.

### 8.1.5. Activités d'expertise du L-A de Cayenne

Le programme d'activités d'expertise du L-A de Cayenne peut se décliner comme suit :

- **Optimisation des identifications de *Leishmania* par outil MALDI-TOF.** Cf. § 8.1.3.2 ci-dessus.
- **Mise en place d'un outil moléculaire de type qPCR** pour assurer un diagnostic en routine des leishmanioses cutanées adaptées aux souches circulantes de Guyane. La pratique de la PCR-RFLP reste une pratique peu adaptée à de la routine de laboratoire, nécessitant un temps technicien non négligeable et des contraintes majeures en terme de pratique de biologie moléculaire. La mise en place d'une qPCR sur des souches de *L. braziliensis* ou *L. guyanensis* en uniplex ou biplex est en cours de réflexion par le L-A. Des essais avec le système SyberGreen sont en cours.
- **Mise en place d'un Contrôle inter-Laboratoires (CIL)** pour le diagnostic direct de *Leishmania* avec certains laboratoires privés et publics effectuant le diagnostic par cette technique en Guyane.
- **Accompagnement de certains pays limitrophes (Guyana, Surinam)** sur la mise en place d'un **diagnostic direct** de leishmaniose cutanée. Une discussion avec le Surinam et le Guyana est en cours pour mettre à disposition l'expertise microbiologique du LA-CNR sur le diagnostic des *Leishmania* d'origine cutané-muqueuses : prélèvements de biopsies cutanées, étalement de lames, coloration des lames et lecture.
- **Amélioration du recueil de données épidémiocliniques.** La secrétaire affectée au LA est chargée de vérifier l'ensemble des renseignements notifiés sur les fiches de déclaration en terme de richesse et pertinence des informations (appels des praticiens, ..).
- **Mise en place d'un Centre de Ressources Biologiques au CHAR incluant les collections du L-A.** Une étude de faisabilité a été effectuée en mars 2016 ayant entraîné le montage d'un dossier et une demande de financement FEDER dans ce cadre. Cette structure permettra d'optimiser la conservation des souches de *Leishmania* circulant en Guyane française et accentuera la démarche Qualité du L-A.

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

#### 8.1.6.1. 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 permet 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 C. Ravel) sert de référence dans ces comparaisons. L'objectif pour les années à venir est de renforcer la base de données cliniques et biologiques pour augmenter encore l'exhaustivité des données et évaluer en particulier la corrélation entre type génétique, présentation clinique et évolution (spontanée vs. sous traitement) des lésions.

Le CNR devrait rester le principal fournisseur de souches de référence et l'un des principaux experts pour l'identification et la taxonomie des différentes espèces de *Leishmania*.

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

Bien que ne dépendant pas des compétences de Santé Publique France, la leishmaniose canine à *L. infantum* est une cause majeure de pathologie animale dans tout le Sud de l'Europe. L'incidence annuelle de la leishmaniose canine en France a été estimée entre 7000 et 12000 cas et la prévalence entre 8 et 17 p. 1000 animaux<sup>9</sup>. Par ailleurs, d'autres réservoirs animaux ont été décrits en Europe, particulièrement à Madrid où une pullulation de lagomorphes a été responsable d'une épidémie de leishmaniose humaine.

La **collaboration avec les structures travaillant en santé animale** doit donc être poursuivie, en vue d'une meilleure concertation des systèmes de surveillance et de contrôle des leishmanioses humaines et animales (surtout canine sur le territoire métropolitain). La fructueuse collaboration avec le Dr Mohamed Kasbari mérite tout particulièrement d'être poursuivie. Cependant, l'ANSES ayant décidé de ne pas maintenir la thématique "Leishmaniose animale", la poursuite de cette collaboration est pour l'instant en *stand-by*.

En raison de cette situation instable, les propositions faites dans le rapport de demande de renouvellement du CNR pourront ou non être réalisées sur le plan national avec le Dr Mohamed Kasbari. A noter que plusieurs de ces propositions ont une forte incidence en matière de surveillance des leishmanioses.

Ne sont conservées pour l'instant ci-dessous que les projets réalisables dans un contexte local, qui concernent la **dynamique du réservoir animal en Languedoc-Roussillon**.

Des collaborations au niveau local entre le Centre coordonnateur de Montpellier et le **LVD et l'ONCFS** seront développées avec deux objectifs :

#### ➤ **Etude de la prévalence de la leishmaniose canine en Languedoc :**

Des observations très indirectes font penser que l'incidence de la leishmaniose canine a fortement diminué dans la région. Une enquête sera menée dans le foyer Cévenol afin d'évaluer l'endémicité canine dans un foyer particulièrement bien décrit et connu par le passé. La dernière enquête date de 1997-98 et il n'existe pas de données actualisées sur cette endémie, alors que des changements importants sont intervenus en termes de moyens préventifs : port de collier à la deltaméthrine (type Scalibor®) et introduction du vaccin depuis plusieurs années. Ce travail sera mené en collaboration avec le LDV et portera sur environ 300 chiens dispersés sur une zone géographique représentative. Les méthodes utilisées reposeront sur la détection d'anticorps spécifiques et la recherche d'ADN circulant ; par ailleurs, les données éco-épidémiologiques seront recueillies. Autant que possible, les localités ciblées seront celles étudiées il y a 20 ans, de façon à pouvoir réellement apprécier l'évolution de la prévalence dans le réservoir animal et d'en déduire l'effet des mesures préventives. Une nette diminution d'incidence pourrait être mise en corrélation avec la réduction de l'incidence de la maladie chez l'homme.

#### ➤ **Recherche d'un réservoir animal chez les lagomorphes :**

Des enquêtes seront réalisées sur les lagomorphes de la région afin d'étudier leur rôle éventuel en tant que réservoir des *Leishmania* en Languedoc-Roussillon. Cette étude sera basée sur des prélèvements de sang et d'organes profonds à analyser à la recherche d'anticorps et de parasites.

---

<sup>9</sup> Coulibaly E. et coll. Enquête descriptive sur la leishmaniose canine dans le Sud de la France. *Prat Med. Chir. Anim. Comp.*, 2004, 39 : 35-40.

#### 8.1.6.4. Autres projets de recherche en collaboration

Une collaboration avec le Dr Najoua Haouas (**College of Applied Medical Sciences, Department of Clinical Laboratory Sciences, University of Hail, Arabie Saoudite**) a été engagée début 2016 avec comme objectif l'évaluation des espèces de *Leishmania* et de leur répartition en Arabie Saoudite, zone où très peu de données sur l'épidémiologie de la leishmaniose sont actuellement connues. Ce travail sera poursuivi.

#### 8.1.6.5. Projets de recherche du L-A de Cayenne

Des projets de recherche en collaboration avec d'autres laboratoires ou entreprises de Guyane ou de métropole (IPG, Guyarômes, Mivegec, EDB, ...) permettent de contribuer à une meilleure connaissance de la leishmaniose en Guyane française.

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 (« Ecosystèmes amazoniens et pathologie tropicale ») et collaborateurs.

Les sujets de recherche dans lesquels est impliqué directement ou non le L-A sont :

- L'étude de **corrélation *in vivo/in vitro*** dans le cadre de collaborations avec le Centre Médical Inter-Armées (CMIA), le service de dermatologie et le LHUPM. Il s'agit de décrire les aspects cliniques particuliers ou non en rapport ou non avec la circulation des différentes souches de *Leishmania*.
- **Etudes épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques.** Il s'agit d'actualiser les données de nature épidémiologique mais aussi relatifs aux présentations cliniques et aux aspects thérapeutiques. Il implique la participation du service de Dermatologie avec lequel nous avons une étroite et ancienne collaboration (Pr. Pierre Couppié) et l'aide méthodologique apportée par le CIC-EC (Pr. Mathieu Nacher). Ces études permettront 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).
- Typage des **phlébotomes de Guyane** par MALDI-TOF en comparaison avec l'identification moléculaire (collaboration avec l'Institut Pasteur de Guyane).
- Etude de la **sensibilité des souches de *Leishmania*** (i) aux composés issus de la pharmacopée traditionnelle ou des extraits d'huiles essentielles (projet en cours de financement); (ii) aux drogues habituellement utilisées pour le traitement.
- **Détection et phylogénie moléculaire des *Leishmania RNA Virus*.** 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 *Leishmania RNA virus* chez *L. guyanensis* et déterminer leur diversité génétique. Il s'agit d'un projet dont le promoteur à Cayenne est l'EPaT ou EA3593 (Université Guyane), en partenariat avec l'Unité Immunologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Cayenne (Eliane Bourreau), le Department of Biochemistry à Lausanne (Suisse) (Pr. N. Fasel et Dr C. Ronet) et le L-A pour les composantes clinique et parasitologique.
- Etude de la **prévalence des différentes espèces de *Leishmania* présentes dans les vecteurs** sur différentes communes de Guyane (Cayenne, Cacao et Saint-Georges) ; projet en collaboration avec l'Institut Pasteur de Cayenne.
- **Epidémiologie moléculaire des plateaux** de Guyane avec typage moléculaire des *Leishmania* isolés dans la région des plateaux.

## 8.2. CONSEIL, Information, Formation

### 8.2.1. Conseil

Les membres du CNR-L répondront aux **demandes d'expertise** de l'administration en accord avec le Ministère chargé de la Santé. Ils participeront à l'élaboration de mesures de lutte contre la maladie. Ils joueront un rôle de conseil auprès des organismes administratifs décentralisés (ARS) et auprès des professionnels.

L'activité de conseil sera poursuivie et mieux tracée, car beaucoup d'activités de conseil réalisées ne sont pas répertoriées.

Le **conseil thérapeutique** téléphonique décrit au § 5.3 sera poursuivi, 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. En effet, dermatologues, infectiologues, internistes et généralistes français sont confrontés de façon sporadique au traitement des leishmanioses. Or, la complexité du sujet cantonne le savoir-faire thérapeutique à de rares spécialistes. Par ailleurs, sauf situation exceptionnelle, aucune des formes cliniques ne requiert de décision urgente.

**Au niveau du LA-CNR**, le service de Dermatologie du CHAR est le service référent de la prise en charge de la leishmaniose cutanée. La personne référente par rapport au conseil thérapeutique est le Pr Pierre Couppié.

### 8.2.2. Diffusion de l'information

En ce qui concerne le **site Internet du CNR**, dans un souci de clarté, le travail en cours sera poursuivi pour scinder le site actuel du laboratoire en trois sites spécifiques relié par des liens : un serait dédié au CNR-L uniquement, l'autre au CRB des *Leishmania* et un troisième au reste du laboratoire comme actuellement (équipes de recherche, enseignement et activité hospitalière). Cette évolution permettra une meilleure visibilité du CNR, ainsi qu'un accès plus clair des utilisateurs aux prestations de conseil et expertise.

Par ailleurs, au cours du prochain quinquennal, il est prévu de créer sur le site Internet du CNR :

-(i) un espace "grand public" présentant des informations sur les leishmanioses en France et en Guyane d'une part et dans les autres grands foyers d'autre part. Ceci permettra de sensibiliser le Public à la présence de cette maladie, à son mode de transmission et à sa prévention.

-(ii) un espace réservé aux professionnels de santé pour la mise en ligne de documents spécialisés à visée professionnelle. Des documents très complets sur l'épidémiologie, la clinique, le diagnostic et le traitement des leishmanioses, réalisés par le Pr. Pierre Buffet en collaboration avec le CNR-L et SANOFI, seront mis en ligne en 2017.

-(iii) Pour ce qui concerne le **L-A de Cayenne**, une information sur les missions et cahiers des charge du L-A est mise sur le site intranet du CHAR. Des pages spécifiques au L-A seront rédigées et mises en forme par le L-A pour être mises en ligne sur le site du CNR à Montpellier, ce qui lui assurerait une meilleure visibilité.

## 8.3. Contribution à la surveillance des leishmanioses humaines

### 8.3.1. En France métropolitaine (Montpellier)

Le Laboratoire Coordonnateur à Montpellier continuera à assurer le **recensement des cas de leishmanioses diagnostiqués sur le territoire métropolitain**, qu'ils soient autochtones ou importés. Dans le département de la Guyane, le Laboratoire-Associé "Guyane" du **Centre Hospitalier de Cayenne** centralisera les déclarations de cas pour la Guyane qui continueront à être transmises au CNR-L.

La fiche de déclaration des cas à utiliser a été revue et améliorée en 2016.

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. Les nombres seront également affichés sur le site du CNR.

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 tracés. 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 sur les données nationales du PMSI, qui recueille tous les séjours hospitaliers publics ou privés, reste dans les projets, avec l'aide du Département d'Informatique Médicale du CHRU de Montpellier. Cependant, un premier essai a révélé un relatif manque de faisabilité de ce projet. Un deuxième essai sera tenté en réduisant la période d'étude aux deux dernières années. L'exhaustivité de la surveillance serait estimée en réalisant la comparaison des résultats des déclarations de cas faites au CNR-L avec la base de données.

Ces différentes actions devraient permettre d'améliorer le réseau d'épidémiologie-surveillance des leishmanioses humaines en France métropolitaine.

### 8.3.2. En Guyane (L-A : LHUPM du CH de Cayenne)

Le projet du L-A de Guyane se décline selon 3 objectifs.

#### a) Meilleure couverture du recensement des cas

L'effort d'organisation et de motivation des différents partenaires doit être poursuivi afin de mieux connaître le véritable niveau d'endémie. Y a-t-il sous-estimation des cas et si oui dans quelle proportion? En 2016, l'incidence, difficilement évaluée du fait du taux incertain de la population (population illégale non chiffrable), a augmenté en comparaison avec les années antérieures.

Les difficultés à résoudre sont connues et demandent :

- Maintien de la motivation des acteurs et de la bonne mise en application des instructions fournies aux personnels soignants des Postes et Centres de Santé avec l'objectif de réduire les difficultés comme celles liées au *turn over* élevé du personnel, à une orientation et une sensibilité plus "diagnostic individuel" que "santé publique".

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

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

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

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

#### **c) 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 peut être 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.

### **8.4. Contribution à l'alerte**

Le Laboratoire Coordonnateur, aidé en cela par le Laboratoire-Associé, centralisera et signalera à Santé Publique France tout évènement anormal concernant l'augmentation du nombre de cas, l'existence de cas groupés, ou une modification éventuelle des formes cliniques, en France métropolitaine, dans les DROM ou à l'étranger.

Les contacts avec les CIRE régionales de chacun des quatre centres seront maintenus de façon régulière (Languedoc-Roussillon-Midi-Pyrénées et Antilles-Guyane).

Le CNR-L est bien entendu prêt à collaborer, comme il l'a fait les années précédentes, à toutes les enquêtes proposées par le Ministère de la Santé, les Agences Régionales de Santé ou les organismes compétents décentralisés.

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

\* \* \* \* \*

## Remerciements

Je souhaite remercier l'ensemble des personnels du CNR-L, autant du Laboratoire Coordonnateur que du Laboratoire Associé, pour le travail fourni ainsi que pour ce rapport. Je remercie également les Laboratoires collaborateurs et leurs responsables (Pr Pierre Buffet, Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur, à Paris, ainsi que Dr Gloria Morizot à l'Institut Pasteur ; Pr Renaud Piarroux, AP-HM Marseille ; Pr Pierre Marty, CHU de Nice ; Drs Mohamed Kasbari et Pascal Boireau, ANSES ; Pr Jérôme Depaquit, Université de Reims ; Pr Gilles Bourdoiseau, ENV de Lyon).

Au nom du CNR-L, je remercie également tous les Centres hospitaliers et tous les praticiens et professionnels de santé, que ce soit en France métropolitaine ou en Guyane française, qui ont effectué des déclarations de cas, et/ou qui ont adressé prélèvements et souches à Montpellier ou à Cayenne.

Je remercie enfin Santé Publique France pour son appui efficient aux actions du CNR-L.

**ANNEXES**  
**AU RAPPORT 2016 DU CNR DES LEISHMANIOSES**

## ANNEXE 1 : MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

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

Le Centre National de Référence des Leishmanioses (CNR-L) a été créé en mars 1998 (arrêté du 17 mars 1998). Il a été renouvelé en avril 2002, puis en janvier 2006 et janvier 2011. Depuis sa création, il développe les différentes missions imparties aux CNR : expertise, surveillance, alerte et conseil.

Dans ce cadre, il effectue depuis sa création :

- la collecte et la conservation de souches de *Leishmania* et leur identification biochimique et moléculaire,
- l'expertise en matière de diagnostic et d'identification de souches pour de nombreux laboratoires sur le territoire national, et plus rarement de chimio-sensibilité des souches de *Leishmania*,
- le conseil et la formation dans le domaine de cette pathologie, en particulier en matière de diagnostic et de thérapeutique (conseil thérapeutique téléphonique, en collaboration avec le Pr P. Buffet du Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur).
- la surveillance des différentes formes de leishmanioses humaines, avec un registre des cas autochtones et importés en France métropolitaine, ainsi qu'en Guyane française, avec l'aide du Laboratoire-Associé (L-A) de Cayenne, et une participation importante du Service de Santé des Armées.
- l'alerte en cas de phénomènes anormaux observés au cours des activités de surveillance.

Le Laboratoire-Associé de Cayenne (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, C.H. Andrée Rosemon, Pr Magalie Demar) remplit effectivement les mêmes missions sur le territoire guyanais.

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

### 1.2. Présentation de l'état de la question scientifique et des enjeux de santé publique

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires dues à un protozoaire flagellé appartenant au genre *Leishmania*. Il s'agit de zoonoses ("anthropozoonoses"), affectant de nombreuses espèces de mammifères, y compris l'homme, transmises par la piqûre d'un insecte vecteur, le phlébotome. Chez l'homme, les leishmanioses comprennent différentes formes cliniques dont la leishmaniose viscérale (LV), les leishmanioses cutanées (LC) et la leishmaniose cutanéomuqueuse (LCM). Les leishmanioses affectent entre 1,5 et 2 millions de personnes chaque année dans 88 pays, avec une mortalité estimée à 59000 morts par an<sup>10</sup>. Leur incidence tend à augmenter suite à un accroissement des facteurs de risque tenant aux modifications de l'environnement, aussi bien qu'aux comportements humains ou à l'évolution de l'état sanitaire des populations<sup>11</sup>. **La leishmaniose est endémique** dans tout le bassin méditerranéen et plus particulièrement dans **le Sud de la France** et toute l'Europe du Sud. Il y s'agit essentiellement de leishmaniose viscérale, mortelle en l'absence de traitement et due à l'espèce *L. infantum*<sup>12</sup>. Son réservoir est le chien, et la maladie humaine, bien qu'à un niveau faible, y est régulièrement entretenue grâce à l'existence d'une enzootie canine très active. Les foyers majeurs sont ceux du

<sup>10</sup> Bastien P, Lachaud L. Leishmanioses: biologie, clinique et thérapeutique. In : *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 2016, 8-506-A-10, 2016.

<sup>11</sup> den Boer M., et coll. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect.* 2011, 17: 1471-1477.

<sup>12</sup> Pralognon F. et coll. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the South of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, 42: 4077-4082.

Languedoc-Roussillon, de la Provence-Côte d'Azur et de la Corse<sup>3</sup>. L'incidence est relativement stable après l'augmentation liée à l'immunodépression dans les années 80, résultant entre autres de la co-infection *Leishmania*/VIH<sup>13</sup>. Par ailleurs, en raison de l'accentuation des échanges avec les zones endémiques, il existe de **nombreux cas importés** de leishmaniose viscérale ou cutanée en France, surtout originaires du pourtour méditerranéen (Maghreb en particulier) et de Guyane Française<sup>14</sup>.

Dans le département de **Guyane** existe une forte endémie de leishmaniose cutanée, avec un nombre élevé de cas (180 cas en moyenne avec des variations de 138 à 242 cas déclarés par an, soit une incidence annuelle entre 0,97 et 1,2 p. 1000). L'épidémiologie de la leishmaniose y est totalement différente de ce qui se passe en France métropolitaine, avec cinq espèces de *Leishmania* présentes, impliquées dans des cycles zoonotiques sauvages. La leishmaniose cutanée fait certes partie du paysage infectieux traditionnel de la Guyane Française; mais celui-ci est en continuelle évolution, avec l'explosion démographique de ce département, sans équivalent en territoire français, associée à d'importants mouvements migratoires peu maîtrisés et le phénomène de l'orpaillage. La contamination humaine résulte de la pénétration en forêt pour des activités professionnelles ou de loisir. L'anthropisation de la forêt, avec en particulier les activités d'orpaillage, expose ainsi une population importante mais difficilement chiffrable au risque de leishmaniose. *L. guyanensis* est l'espèce prédominante. *L. braziliensis*, responsable d'une forme grave, avec évolution possible vers une atteinte des muqueuses de la face (LCM)<sup>1</sup>, est totalement implantée sur le territoire et a tendance à devenir plus prévalente<sup>15</sup>.

Les leishmanioses, mais surtout la LV, sont associées à un **déficit du système immunitaire**, qu'il soit acquis ou induit, et patent (ex.: SIDA) ou latent (ex.: personne âgée). Toutes les causes d'immunodépression, d'origine infectieuse ou iatrogène, favorisent le développement de cette forme de leishmaniose, en particulier, depuis quelques décennies, le SIDA et les transplantations d'organes<sup>16</sup>. Dans les foyers d'endémie de leishmaniose viscérale, et en particulier dans le Sud de la France, le nombre d'**infections inapparentes** à *Leishmania* est très nettement supérieur au nombre de cas cliniques détectés<sup>17</sup>; d'où le **risque d'extension et d'augmentation de l'endémicité** lié à l'augmentation des causes d'immunodépression. Par ailleurs, il apparaît aujourd'hui clairement que le réchauffement climatique entraîne une extension de la zone d'endémicité dans le Sud de l'Europe<sup>18,19</sup>. **En Guyane**, la leishmaniose représente un problème de santé publique par le nombre de cas détectés annuellement et constitue une **entrave au développement** en raison de sa présence dans le milieu forestier (filrière bois, or, agriculture, travaux publics, chasse, tourisme).

Les leishmanioses continuent de poser des problèmes diagnostiques et thérapeutiques. **Le diagnostic** repose aujourd'hui essentiellement sur les techniques moléculaires (PCR), développée dans plusieurs CHU en France. Comme pour d'autres infections, ce diagnostic moléculaire est développé indépendamment dans chaque centre et souffre d'un manque de standardisation, source de variations importantes dans les performances diagnostiques. La sérologie est l'autre examen le plus classiquement utilisé : pratiquée dans la moitié des CHU français, elle est réalisée avec des méthodes le plus souvent commerciales, donc *a priori* standardisées. Les différents tests disponibles n'ont cependant pas les mêmes performances diagnostiques, et n'ont pas fait l'objet d'études comparatives. **Le traitement** des leishmanioses reste aujourd'hui problématique. Basé sur des molécules coûteuses et toxiques, il est souvent l'objet de demandes de conseil au CNR de la part des cliniciens. Il bénéficie d'une part d'un conseil thérapeutique mis en place au CNR en

<sup>13</sup> Alvar J et coll. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clin Microbiol Rev. 2008; 21:334-59.

<sup>14</sup> Lachaud L. et coll. Surveillance of leishmaniasis in France, 1999 to 2012. Eurosurveillance, 2013, 18(29): 20534-...

<sup>15</sup> Dedet JP, et coll. Épidémiologie des leishmanioses autochtones en France métropolitaine et d'outre-mer. Presse Med. 2013; 42: 1469-81.

<sup>16</sup> Basset D. et coll. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients : eleven new cases and literature review. Microbe Infect. 2005; 7:1370-1375.

<sup>17</sup> Bañuls AL\*, Bastien P\* et coll. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. Clin Microbiol Infect. 2011, 17: 1451-1461.

<sup>18</sup> Dereure J. et coll. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in southern France. Vector Borne Zoonotic Dis. 2009; 9:687-94.

<sup>19</sup> Maroli M. et coll. The northward spread of leishmaniasis in Italy : evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. Trop Med Int Health. 2008; 13:256-64.

2006 en collaboration avec le Pr Pierre Buffet (Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur), d'autre part d'un référentiel de consensus national publié en 2011 (à l'initiative des Prs. Jean-Pierre Dedet et Pierre Buffet), visant à venir en aide aux cliniciens confrontés à cette pathologie<sup>20</sup>. Enfin, le **typage** des souches isolées demeure indispensable pour la surveillance en raison de différences de pronostic et de prise en charge du patient selon l'espèce de *Leishmania* en cause.

### 1.3. Organisation proposée pour répondre au cahier des charges

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

Depuis 2012, le Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie Mycologie (LHUPM) du Centre Hospitalier de Cayenne (CHAR) a été inclus dans le CNR comme le **Laboratoire Associé (L-A) de Cayenne**, avec le Service de Dermatologie comme composante clinique (Pr. Pierre Couppié). Le LHUPM avait été "Centre collaborateur" du CNR-L pendant le dernier quinquennal (2006-2011). L'inclusion de Cayenne comme L-A apparaissait non seulement logique mais nécessaire si l'on considère le fait que ce département est de loin le plus touché par la leishmaniose autochtone, et que plus de la moitié des cas de leishmaniose déclarées en France proviennent de Guyane Française. Le L-A de Cayenne a une longue expérience de recherche en matière de diagnostic et d'épidémiologie des leishmanioses sud-américaines : niveau d'endémie, facteurs d'exposition, facteurs de risque d'origine environnementale et selon les particularités des souches parasitaires incriminées. Il est également compétent en matière de culture, de cryoconservation et de typage de souches de Leishmanies. Enfin, il est en relation avec un réseau de Centres de santé lui permettant une vue complète et une compréhension intime de cette endémie en Guyane.

Le LHUPM a été dirigé par le Pr B. Carme jusqu'en décembre 2013 et est aujourd'hui dirigé par le Pr Magalie Demar. Le responsable du L-A depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2014, désigné par consensus entre les différents membres du CNR, a été le Pr P. Couppié, du fait de son expertise de longue date sur les leishmanioses. Dans le quinquennal 2017-2021, c'est le Pr Magalie Demar qui coordonne ce L.-A. En effet, le LHUPM est de fait au centre de la plupart des activités concernant le diagnostic et le typage nécessaires à la surveillance de la leishmaniose en Guyane. Il draine les échantillons du réseau de Centres de santé évoqué ci-dessus. Le Pr P. Couppié, désigné comme co-responsable du L-A apportera le support de son activité clinique et thérapeutique, et de plus mènera une activité de prévention auprès des populations.

**Trois Laboratoires hospitaliers français reconnus pour leurs compétences en matière de leishmanioses** depuis de nombreuses années (attestées par leurs publications) sont devenus Centres collaborateurs pour ce qui concerne la santé humaine au 1<sup>er</sup> janvier 2012 :

(i) le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du l'AP-HP de Marseille (Pr Renaud Piarroux) pour ses études sur l'épidémiologie et les chimiorésistances de *Leishmania infantum*, ainsi que sur le typage par spectrométrie de masse;

(ii) le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nice (Pr Pierre Marty) pour l'épidémiologie des leishmanioses humaine et canine;

(iii) enfin, le Pr Pierre Buffet (auparavant AP-HP Pitié-Salpêtrière, aujourd'hui au Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur) continue à collaborer avec le CNR sur le conseil thérapeutique destiné aux médecins; le CNR souhaite aussi développer une collaboration à la base de données clinico-épidémiologiques qu'il a constituée depuis des années et qu'il étend au niveau européen.

La mutation du Pr Renaud Piarroux vers la Pitié-Salpêtrière (prévue en 2017) et l'arrêt des thématiques concernant le CNR à Marseille nous incitent à proposer le Laboratoire de

<sup>20</sup> Buffet P. et coll. Traitement des leishmanioses en France : Proposition d'un référentiel consensuel. Presse Med. 2011; 40(2):173-84

Parasitologie-Mycologie de la Pitié-Salpêtrière comme Centre Collaborateur du CNR pour la période à venir, avec le Pr Renaud Piarroux.

Par ailleurs, **des structures expertes en santé animale** poursuivent leur collaboration avec le CNR en vue d'une meilleure concertation des systèmes de surveillance et de contrôle des leishmanioses humaines et animales (surtout canine sur le territoire métropolitain) :

(i) le Dr Mohamed Kasbari, inspecteur vétérinaire qui travaille depuis plusieurs années sur les leishmanioses animales et a récemment obtenu sa thèse d'Université sur ce sujet, devrait continuer à travailler sur les leishmanioses, mais ne sera plus rattaché à l'ANSES, cette dernière ne souhaitant plus soutenir ce programme;

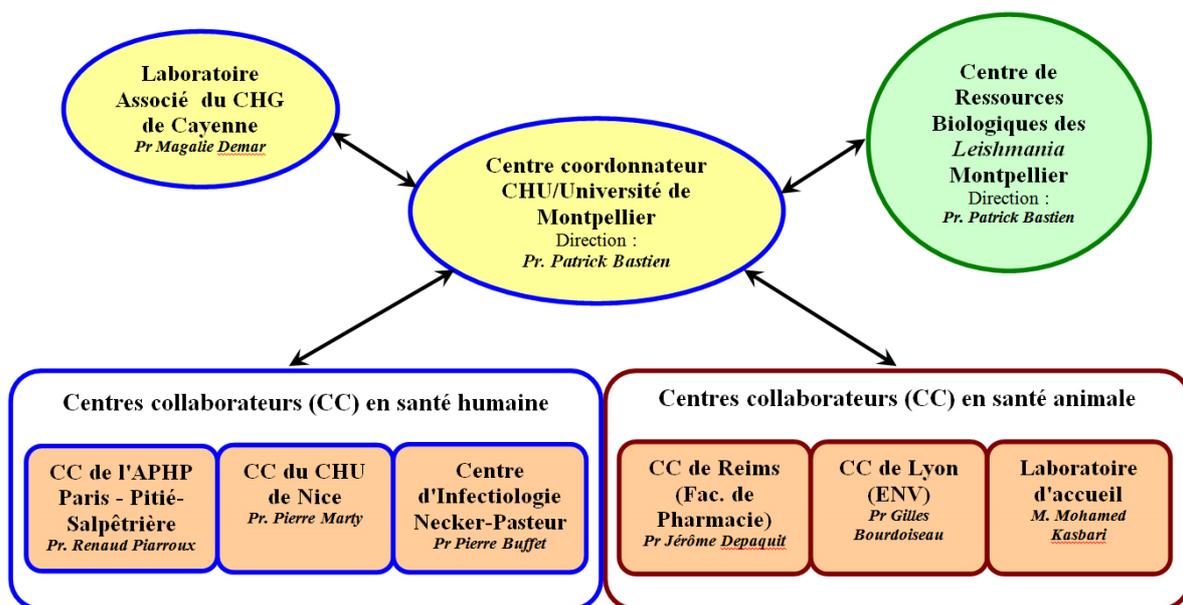
(ii) le Laboratoire de Parasitologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (Pr. G. Bourdoiseau);

(iii) l'Unité sous Contrat de l'ANSES "VECPAR" ("Transmission vectorielle et épidémiologie des maladies parasitaires"), également JE 2533, du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Reims (Pr. J. Depaquit).

Ces trois équipes présentent une expertise complémentaire, le premier concernant l'épidémiologie et la surveillance de la leishmaniose canine, le second concernant le contrôle de la maladie, à la fois sur le plan vaccinal et sur le plan de la lutte médicamenteuse, et le troisième sur les aspects vectoriels (Phlébotome), qui concerne autant la leishmaniose humaine que l'endémie canine.

La structuration proposée pour les 5 ans à venir est figurée ci-dessous.

### Structuration du CNR des Leishmanioses



## 1.4. Description détaillée des équipes

### 1.4.1. Département de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier

Les personnels scientifiques et techniques du Département de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Montpellier et de la Faculté de Médecine (Université Montpellier 1), qui sont, pour partie de leur temps, impliqués dans les activités et le fonctionnement du CNR-L, sont listés dans le tableau ci-dessous (prévisions 2017-2021).

Leurs tâches respectives au sein du Département figurent sur l'organigramme fonctionnel présenté en page suivante.

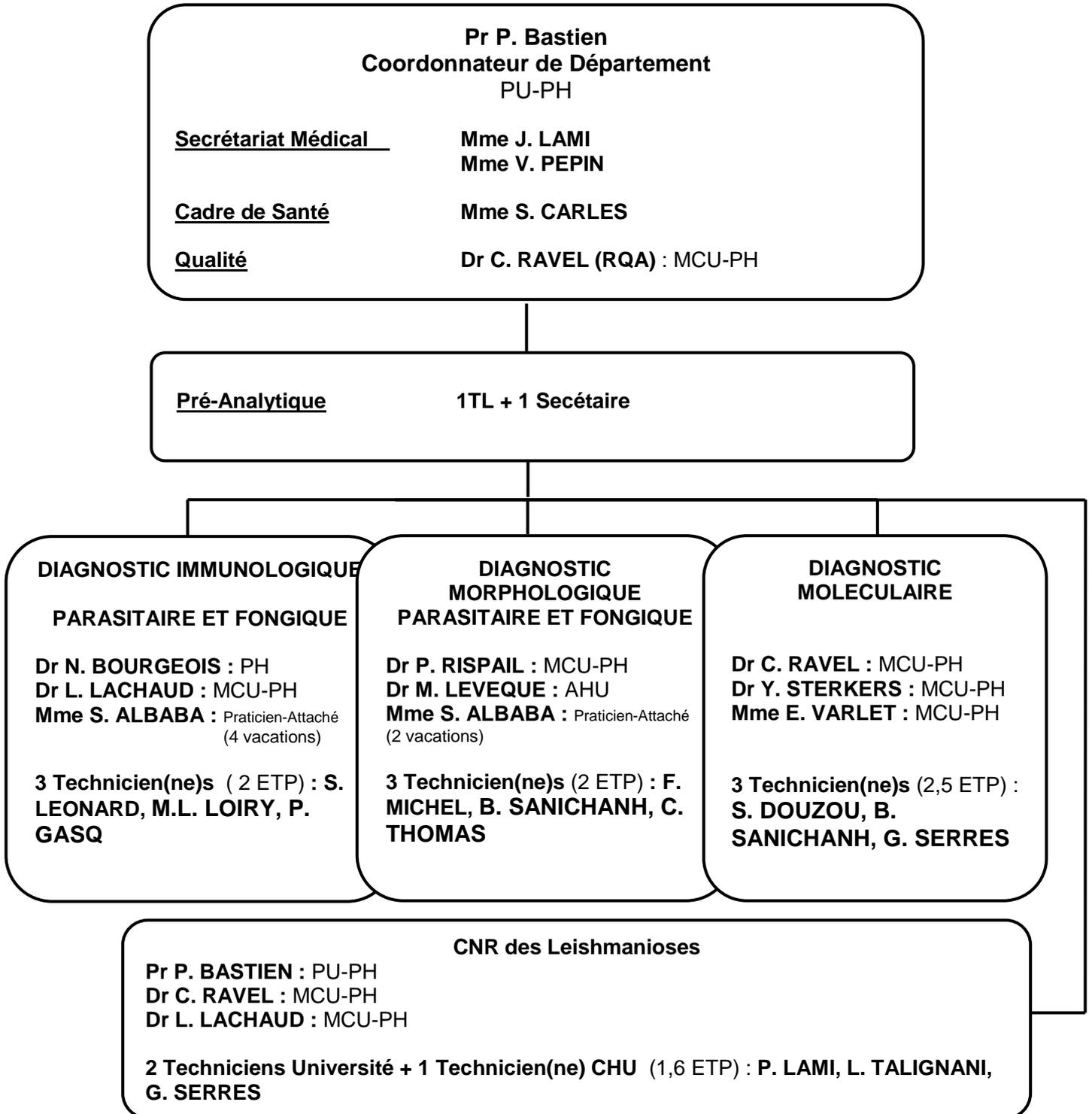
Un organigramme spécifique au Laboratoire Coordonnateur du CNR-L est ensuite présenté au-dessous.

**Tableau 1. Etat des emplois du Laboratoire coordonnateur du CNR-Leishmaniose (Montpellier)**

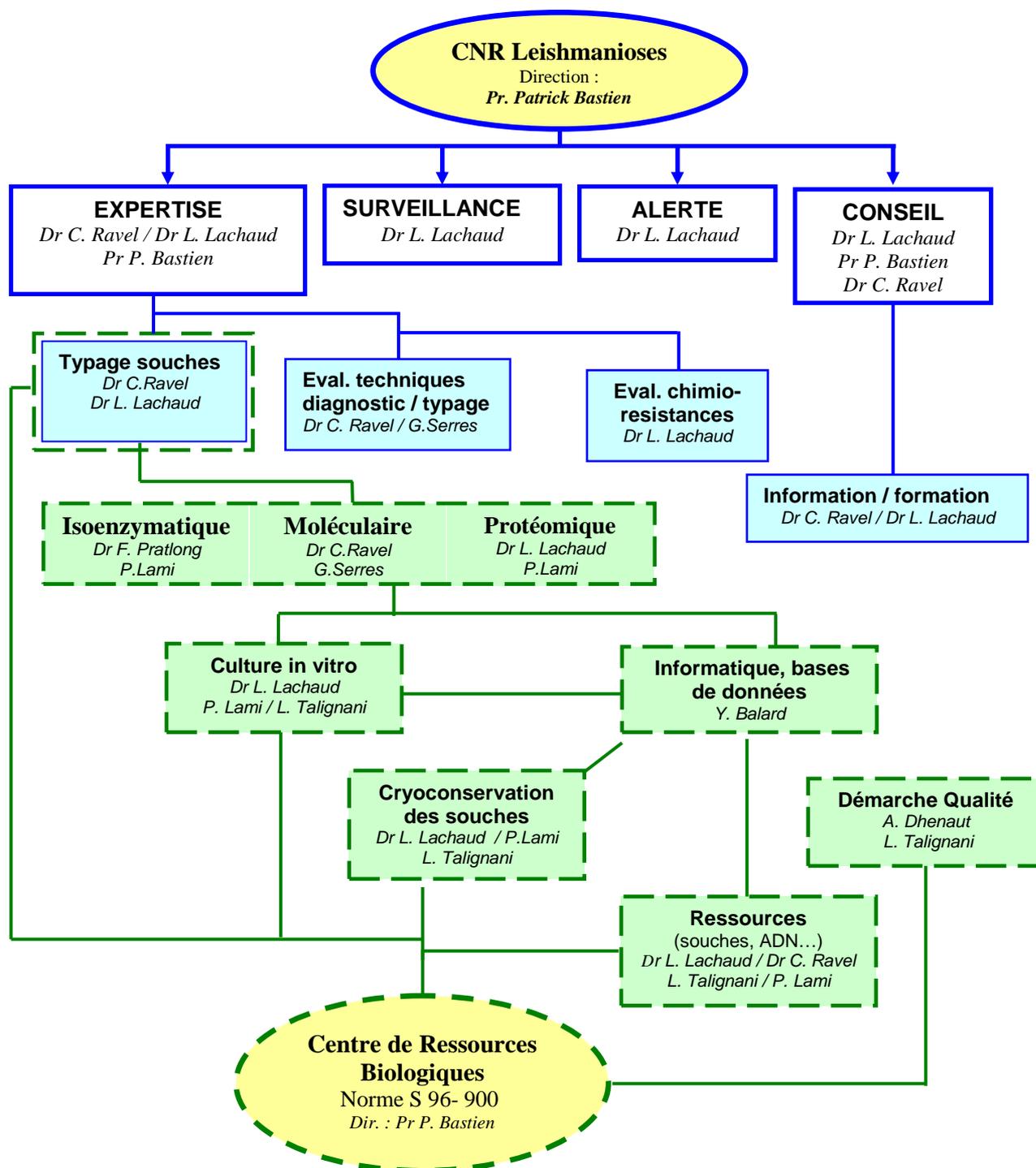
Noms et Prénoms	Qualifications	ETP	Appartenance administrative (pour l'activité au CNR-L)
Bastien Patrick	Médecin (PU-PH)	0,10	CHU-Univ. (50%-50%)
Lachaud Laurence	Médecin (MCU-PH)	0,30	Univ. Montpellier
Ravel Christophe	Médecin (MCU-PH)	0,20	CHU-Univ. (50%-50%)
Balard Yves	Assistant-Ingénieur	0,30	Univ. Montpellier
Lami Patrick	technicien	0,50	Univ. Montpellier
Serres Ghislaine	technicien	0,10	CHU Montpellier
Talignani Loïc	technicien	0,40	Univ. Montpellier
Lami Joelle	secrétaire	0,05	CHU Montpellier

L'implication de ces personnels dans le CNR-L représente 1,85 ETP : 0,9 ETP pour le personnel médico-scientifique (incluant un ingénieur informaticien), 1 ETP pour le personnel technique et 0,05 ETP pour le secrétariat. Par ailleurs, le Pr Jean-Pierre Dedet et le Dr Francine Pratlong, tous deux émérites de la Faculté, continuent d'apporter ponctuellement leur expertise au CNR.

**ORGANIGRAMME FONCTIONNEL**  
**du DEPARTEMENT DE PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE, CHU de**  
**MONTPELLIER**



## ORGANIGRAMME du LABORATOIRE COORDONNATEUR du CNR DES LEISHMANIOSES (MONTPELLIER)



### 1.4.2. Laboratoire-Associé (LHUPM) de Cayenne

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

**Tableau 2. Etat des emplois du L-A au CNR Leishmanioses (Cayenne, Guyane Française)**

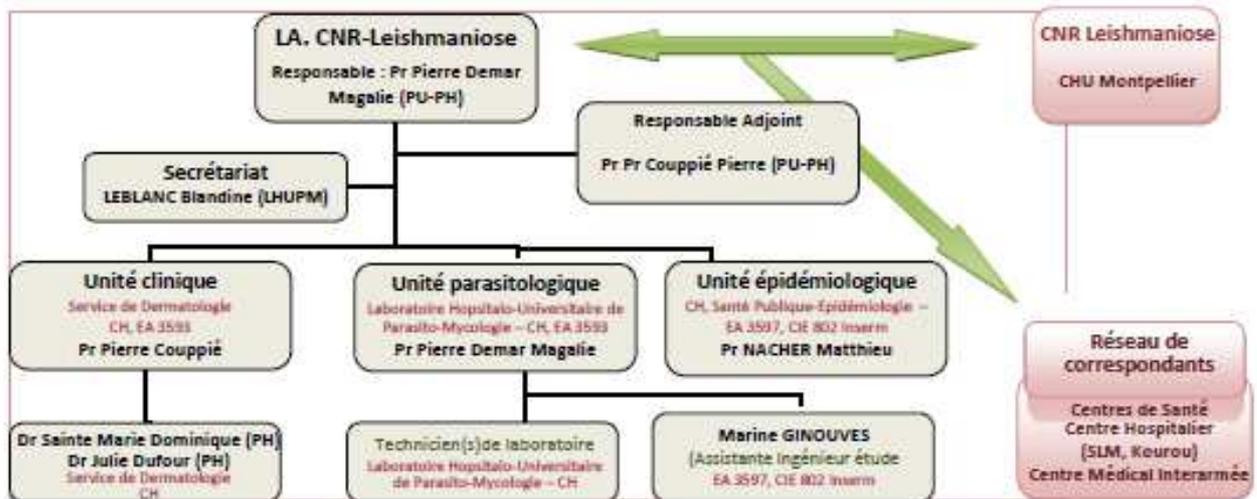
Nom et Prénom	Qualification	ETP	Appartenance administrative (pour l'activité au CNR-L)
Pierre Demar Magalie	Médecin (PU-PH: Parasitologie)	0,25	CH, LHUPM – UAG/ EA 3593 et CIE 802 Inserm
Coupié Pierre	Médecin (PU-PH : Dermatologie)	0,1	CH, Dermato – UAG/ EA 3593
Mathieu Nacher	Médecin (PU-PH : Santé Publique)	0,1	CH, Santé Publique-Epidémiologie – CIE 802 Inserm
Ginouves Marine	Assistant Ingénieur	0,8	Univ. Antilles Guyane (EA 3593) et par convention CH, LHUPM
Blandine Leblanc	Adjoint administratif	0,2	Centre Hospitalier Andrée Rosemon (CHAR)
Technicien de laboratoire (selon le planning)	Technicien	0,3	Centre Hospitalier Andrée Rosemon (CHAR)

L'implication de ces personnels dans le CNR-L représente 1,75 ETP avec (i) une activité quasiment dédiée pour ce qui est du personnel scientifique (0,8 ETP), (ii) 0,5 ETP pour le personnel médico-scientifique effectuant des activités d'épidémiologie, de diagnostic clinique et biologique, et de thérapeutique; (iii) 0,2 ETP pour le secrétariat amené à gérer le réseau de correspondants, notamment les Centres de santé.

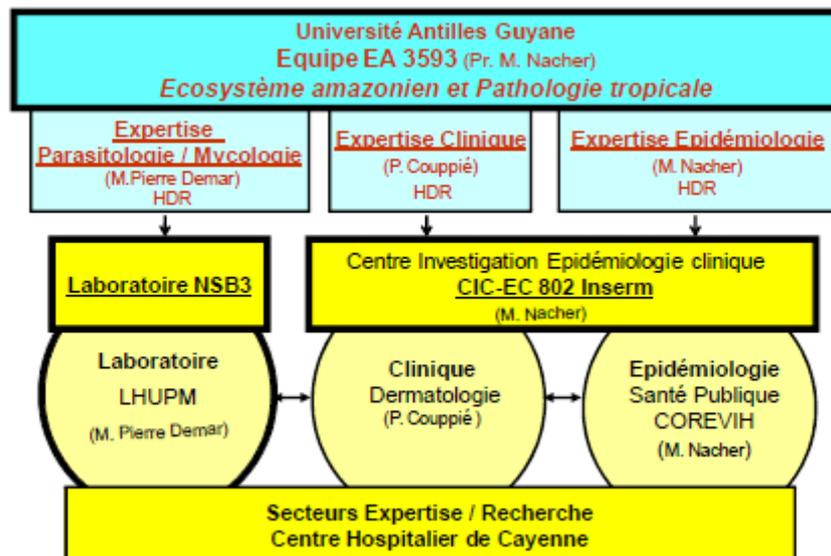
Une aide ponctuelle complémentaire pour les aspects analyse et expertise épidémiologique peut être apportée par l'équipe Inserm CIC-EC Antilles Guyane.

Le schéma suivant illustre l'organisation du LA-CNR-L

## ORGANIGRAMME du LABORATOIRE ASSOCIE du CNR DES LEISHMANIOSES (CAYENNE)



Le schéma suivant illustre la complémentarité entre les équipes hospitalières et universitaires au L-A de Cayenne.



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

#### 1.5.1. CNR Montpellier

**Locaux** : Les locaux n'ont en rien changé par rapport au dossier de 2010.

Le Département de Parasitologie-Mycologie a déménagé en juillet 2009 pour rejoindre l'un des sites du CHRU, entre l'Hôpital Lapeyronie et La Colombière. Il est installé dans un bâtiment modulaire de 1300 m<sup>2</sup>, répartis sur deux étages, dont la construction a été entièrement prise en

charge par le CHRU. Dans ces locaux sont installés à la fois le laboratoire hospitalier de diagnostic, le Centre National de Référence des *Leishmania* et tout ou partie de 3 équipes de recherche faisant partie de l'UMR "MiVEGEC" ("Maladies infectieuses et vecteurs : écologie, génétique, évolution, contrôle") (CNRS / IRD / Université Montpellier), dont le Pr. Patrick Bastien est également Directeur-Adjoint.

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

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

- une unité de culture de niveau P2, équipée de 3 enceintes de sécurité et d'une chambre chaude pour la croissance des cultures de *Leishmania* (24-26° C) ;
- à cette unité de culture, s'ajoute une enceinte confinée de niveau P3, pour la culture des espèces de *Leishmania* classées en L3 (*L. donovani* et *L. braziliensis*).
- une unité de cryoconservation avec un local spécifique, aux normes de sécurité pour la manipulation de l'azote liquide, et contenant : 1 container de 351 litres (Espace 351), 2 containers de 220 litres (LO-2200), 1 container de 151 litres (Espace 151), 5 containers de 140 litres et 1 de 110 litres (Arpège 140 et 110), 23 containers de 40 litres (GT 40) et un container de répartition (TP100). Un contrat de livraison hebdomadaire d'azote liquide existe avec Air Liquide Santé, avec mise à niveau des containers. Seul le remplissage des GT40 est encore assuré chaque semaine par un technicien du CNR-L. La pièce est aux normes de sécurité avec alarme centralisée en cas de baisse du niveau d'oxygène liée à une fuite d'azote.
- un laboratoire de biochimie pour l'électrophorèse des isoenzymes ;
- un plateau technique réservé à la biologie moléculaire, partagé avec l'équipe de recherche et l'équipe hospitalière, occupant environ 70 m<sup>2</sup> ; ces locaux sont en voie d'accréditation selon la norme ISO 15189 propre aux laboratoires de biologie médicale et aux recommandations classiques pour cette activité, et même davantage. Des mesures très strictes de confinement et de séparation y sont imposées : organisation en trois locaux géographiquement séparés (préparation des ADN, préparation des mélanges réactionnels, étape post-amplification) avec sas d'entrée ; pression positive dans les pièces "pré-amplification" et négative dans les pièces "post-amplification" ; respect du sens du flux ; personnel autorisé ; séparation complète des matériels, blouses, consommables et réactifs ; sur-blouses, sur-chaussures ; autres mesures classiques de prévention des contaminations... De plus, en "pré-amplification" ont été physiquement séparées les activités de diagnostic en routine (sécurisation maximum) et les activités dites de développement (en particulier les activités du CNR).
- un bureau spécifique dévolu au CNR-L, ainsi que des bureaux réservés aux différents acteurs du CNR.

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

**Equipements** : Dans le domaine particulier des activités de référence, objet du présent dossier de candidature, le laboratoire possède les locaux et équipements en adéquation avec les missions proposées. Au cours du dernier quinquennal, le Laboratoire a acquis un container Arpège 110 (Air Liquide®) et deux conteneurs LO-220 (Cryo-Diffusion®).

Le déménagement du laboratoire en 2009 a été l'occasion pour le CHRU de renouveler de nombreux équipements courants généraux du laboratoire âgés de plus de 15 ans : autoclave, postes de sécurité microbiologiques (PSM), étuves, centrifugeuses, balances, microscopes, générateurs, cuves d'électrophorèse et d'électrofocalisation, systèmes de refroidissement des cuves, sécheur de gels, bains secs, plaques UV, fours à hybridation, pH-mètres, congélateurs divers (- 20° et - 80° C).

Par ailleurs, le Département possède d'autres équipements indispensables à l'activité : containers d'azote liquide (cf. supra), appareil de PCR en temps réel de type LightCycler 480,

thermocycleurs conventionnels, automate d'extraction d'ADN, appareils à électrophorèse en champ pulsé, station de prises de vues numériques avec analyseur d'images,...

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

### 1.5.2. Laboratoire Associé de Cayenne

**Locaux :** Les zones d'activité où s'exercent les activités du LA-CNR-L se répartissent en 2 secteurs : le secteur hospitalier situé sur le site du Centre Hospitalier de Cayenne au sein duquel est situé le LHUPM, et le secteur universitaire situé sur le campus universitaire de la Faculté de Médecine.

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

- une unité de culture de niveau P3 destinée aux cultures d'agents parasitaires tels que *Trypanosoma sp*, *Toxoplasma...* C'est aussi dans cette unité équipée d'un PSM et d'une enceinte à 24-26° C que sont effectuées les cultures de *Leishmania* classées au niveau L3 (*L. braziliensis*).
- une unité de culture de niveau P2 située au sein du secteur Mycologie dotée d'une enceinte de sécurité et d'une chambre chaude (24-26°C) et au sein de laquelle s'effectuent la plupart des cultures de *Leishmania sp*.
- un lieu de cryoconservation aux normes de sécurité pour la manipulation de l'azote liquide. Un contrat de livraison mensuel d'azote liquide existe avec Air Liquide Santé, avec mise à niveau des containers. Le remplissage du container est assuré 1x/mois par un des membres affecté au LA du CNR-L.
- un secteur partagé avec le secteur de bactériologie contenant le spectromètre de masse, MALDI-TOF permettant l'identification des espèce de *Leishmania sp*.
- un secteur de lecteur sur microscope inversé situé en salle de parasitologie directe.

\* Le **secteur universitaire** est installé sur le campus dans les locaux de la Faculté de Médecine. Il comporte un plateau technique réservé à la biologie moléculaire, conforme aux recommandations classiques pour cette activité avec l'organisation en trois locaux géographiquement séparés : un secteur de prétraitement des échantillons, un secteur de préparation des mix et un secteur d'amplification/post-amplification.

**Equipements :** le Laboratoire possède les équipements courants de laboratoire (PSM, étuves, centrifugeuses, microscopes optiques,...) de même que ceux indispensables à l'activité : 2 containers de 80 litres d'azote liquide, appareil de PCR en temps réel de type Applied, thermocycleurs conventionnels, automate d'extraction d'ADN, microscope inversé...

## 1.6. Description des démarches qualité et garanties mises en œuvre au sein du laboratoire

### 1.6.1. Centre Coordonnateur du CHRU de Montpellier

Deux démarches d'accréditation/certification sont en cours en parallèle au CNR-L.

Les activités du CNR s'appuient largement sur une infrastructure et une logistique internes au CHU de Montpellier. Certaines activités comme le diagnostic moléculaire sont même partie intégrante de l'activité du CHU. 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 2014 et 2015. Un dépôt de dossier au COFRAC a eu lieu en 2015, incluant toutes les analyses de diagnostic moléculaire, en particulier le diagnostic moléculaire des leishmanioses. Ce secteur de Biologie moléculaire a une réunion Qualité (avec suivi des actions d'amélioration) réunissant tous les acteurs concernés sur un rythme mensuel. Après la visite du COFRAC en Novembre 2016, l'accréditation de ces analyses a été accordée fin 2016 (document officiel toujours en attente).

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. Au cours du dernier quinquennal, le Système de Management de la Qualité a été amélioré selon les recommandations d'audits pré-certification assuré dans le cadre du projet Investissements d'Avenir "BIOBANQUES" en 2013 et 2014. En 2015, le CRB-*Leishmania* a rejoint le Centre de Ressources Biologiques du CHU de Montpellier, bénéficiant ainsi de la dynamique à l'œuvre dans ce domaine dans l'ensemble du CRB. Loic Talignani est ainsi RQA pour la Collection de *Leishmania*, aux côtés d'Andreia Dhenaut pour le CRB du CHU. Le dépôt de dossier de certification de la Collection de souches de *Leishmania* est prévu en 2017.

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 :

- Définition d'indicateurs Qualité d'évaluation des différentes étapes des processus de réception, de conservation et de mise à disposition des ressources biologiques,
- Définition des compétences, qualifications et habilitations des différents personnels du CRB, permettant un meilleur suivi des remplacements de personnels et des besoins en formation,
- Fusion des procédures de gestion des non-conformités et des axes d'améliorations avec celles déjà existantes au niveau du CRB du CHU,
- Convention avec le service informatique permettant d'assurer la sauvegarde des données, la maintenance des logiciels et de l'infrastructure,
- Identification et validation des méthodes critiques,
- Vérification de la qualité des renseignements sur les ressources biologiques (cohérence, justesse) saisis dans la base de données par rapport au stock réel et aux fiches de renseignements papier des déposants,
- 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 dans le quinquennal à venir.

## 1.6.2. LHUPM du CH de Cayenne

En conformité avec les exigences nationales, le L-A, au travers du LHUPM, s'est engagé avec le laboratoire de Biologie polyvalente du centre Hospitalier de Cayenne 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 avec dépôt de dossier au COFRAC en mai 2015. 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 est 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 le Dr Christine Roques, évaluatrice COFRAC et PH dans le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Toulouse.

Des réunions hebdomadaires axées sur l'accréditation ont été initiées depuis fin 2015 de même que des groupes de travail notamment sur les CNR (Maladie de Chagas et leishmaniose)

Certaines activités du CNR comme le diagnostic direct font partie intégrante de l'activité du CHAR. Un dépôt de dossier au COFRAC a été fait en 2015 incluant pour le LHUPM, la sérologie Chagas, avec une visite du COFRAC prévue fin 2016.

Pour ce qui concerne les activités en rapport avec le secteur du NSB3, une démarche Qualité a été entreprise depuis 2014 avec remise à plat, réévaluation et réécriture de l'ensemble des procédures qualité, hygiène et sécurité.

La traçabilité du processus de mise en cryoconservation et des expéditions des souches, est totale, aujourd'hui assurée grâce au logiciel BRC-Lims,

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).



## ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES ACTUELLES DU CNR

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

Le diagnostic des leishmanioses repose presque exclusivement aujourd'hui sur la détection par PCR en temps réel.

L'identification des *Leishmania* est actuellement réalisée dans notre laboratoire par des techniques moléculaires basées sur le séquençage d'un ou plusieurs gènes uniques. Ces gènes sont intégrés à un schéma MLST (Multi Locus Sequence Typing) développé sur 7 loci indépendants. A cette technique s'ajoute **de façon de plus en plus répandue la technique d'identification par MALDI-TOF, et enfin** éventuellement la technique d'électrophorèse des isoenzymes, réalisée depuis 1979 et qui reste aujourd'hui, malgré l'essor des techniques moléculaires, la technique de référence d'identification biochimique pour la taxonomie et la biogéographie (recommandation de l'O.M.S.). D'autre part, le typage par analyse des caryotypes moléculaires (électrophorèse en champ pulsé) est réalisé ponctuellement sur des souches isolées de patients immunodéprimés (infection VIH) souffrant d'une infection leishmanienne au long cours.

Les tests de chimiosensibilité du parasite sont également réalisés de façon ponctuelle, en général à la demande de cliniciens.

De par sa longue expérience en région d'endémicité élevée, **le LHUPM de Cayenne** possède une expertise en diagnostic des leishmanioses, que ce soit par microscopie, par techniques de culture axénique des parasites ou par techniques de biologie moléculaire (PCR conventionnelle et PCR en temps réel).

Il a également développé une technique **d'identification moléculaire** par RFLP spécifique pour le diagnostic d'espèce des *Leishmania* du Nouveau Monde. Le L-A a aussi la possibilité d'optimiser ses capacités d'identifications des souches à travers la technologie du MALDI-TOF (spectrométrie de masse). Un projet de validation de la méthode est en cours en collaboration avec le CNR de Montpellier (Dr Lachaud) et le Centre collaborateur de Marseille (Pr Piarroux).

Le LHUPM a une capacité de **stockage des souches** de *Leishmania* isolées à - 80°C et/ou en azote liquide pour une période limitée (maximum deux ans) avant transfert des souches au Laboratoire coordonnateur pour stockage à long terme et mise à disposition des collections selon les conditions du CNR (autorisations etc.). Les collections biologiques sont déclarées par le CH de Cayenne selon les procédures officielles (ADN et leishmanies formes promastigotes issues des cultures).

### 2.1. Liste des techniques de références

#### 2.1.1. Expertise diagnostique

- **Le Laboratoire coordonnateur** réalise le diagnostic moléculaire des leishmanioses par PCR en temps réel (LightCycler LC480). La technique est basée les travaux de Ch. Mary et al. (J Clin Microbiol. 2004, 42: 5249-55) et repose sur l'amplification par PCR de l'ADN du kinétoplaste (ADN mitochondrial hautement répété) et la détection par sonde TaqMan. La sensibilité obtenue est très élevée, autour de 0.01 équivalents-génome par mL de sang. La

quantification de la charge parasitaire dans le sang pour les leishmanioses viscérales a été mise au point et fonctionne en routine.

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

- Le **LHUPM de Cayenne** possède également une expertise en diagnostic des leishmanioses, que ce soit par microscopie, en culture in vitro, ou par techniques de biologie moléculaire (PCR conventionnelle et PCR en temps réel). Sa technique de diagnostic moléculaire repose sur l'amplification du gène de l'ARN polymérase II (bande à 615 pb).

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

### 2.1.2. Identification moléculaire

Au **Laboratoire coordonnateur**, l'identification moléculaire est réalisée depuis fin 1998 sur tout prélèvement ou culture provenant de leishmanioses tégumentaires ou viscérales. Elle est basée sur le séquençage de différents loci correspondant à des séquences codantes en copie unique intégrées dans un schéma MLST. Actuellement, des données sur 7 loci génomiques ont été obtenues sur environ 400 souches de référence, représentant l'ensemble des espèces du genre *Leishmania*. Un important travail d'analyse bioinformatique a été réalisé (El Baidouri et al. 2013) et met en évidence une grande robustesse de cette approche pour l'identification spécifique et une très bonne cohérence avec les techniques d'identification isoenzymatique. L'identification moléculaire est appliquée non seulement aux souches en culture, mais également, dans environ 70% des cas, à des échantillons biologiques de patients, en particulier biopsies, ce qui permet un typage même en cas de culture négative ou contaminée par des éléments fongiques ou bactériens.

Actuellement cette technique permet également la vérification systématique des souches distribuées avant l'envoi.

- Le **LHUPM de Cayenne** a également développé depuis 2006 une technique d'identification moléculaire par PCR-RFLP (HgaI et TspRI) spécifique pour le diagnostic d'espèce des *Leishmania* du Nouveau Monde. Cette technique peut être réalisée à partir des cultures et, le cas échéant, directement à partir de biopsies de lésions cutanées<sup>21</sup>. L'identification moléculaire permet notamment la différenciation rapide de toutes les espèces de *Leishmania* et a été intégrée dans le management thérapeutique des patients à la demande du Service de Dermatologie (Pr Couppié). Elle est appliquée à partir de prélèvements cliniques (biopsies cutanées ou muqueuses, produits de grattage, sang, moelle osseuse) et aussi sur les biopsies en culture n'ayant pas poussé (en cas de négativité ou de contamination).

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

---

<sup>21</sup> Simon et coll., *Leishmania* species identification by PCR-RFLP analysis and its applications in French Guiana. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2010

### 2.1.3. Identification biochimique (iso-enzymatique)

L'analyse isoenzymatique des souches reste la technique de référence en épidémiologie et continue à être demandée par plusieurs équipes en France ou ailleurs dans le monde.

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

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

### 2.1.4. Autres techniques de typage utilisées

#### - Typage par microsatellites :

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

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

Les caryotypes moléculaires des *Leishmania* (obtenus par PFGE) présentent un extrême polymorphisme. Cette caractéristique permet d'envisager une différenciation entre souches génétiquement très proches. Cette méthode, mise au point dans le Laboratoire depuis 1989, est utilisée à des fins d'identification depuis 2007. Elle s'applique principalement à l'étude de souches isolées de façon répétitives de patients co-infectés par *Leishmania* et VIH et permet de distinguer les rechutes des réinfections (Lachaud et al., *Clin. Infect. Dis*, 2009).

## 2.2. Collection de souches de *Leishmania*

#### - Collection de souches de *Leishmania* (Centre de Ressources Biologiques) :

La Collection internationale de souches de *Leishmania* du CNR-L est unique au monde. Elle comporte aujourd'hui plus de 6000 souches provenant de 67 pays, sur 4 continents, représentant quasiment toutes les espèces connues, et isolées sur une grande variété d'hôtes et de vecteurs dans des foyers et des situations épidémiologiques très divers. Les souches proviennent principalement de cas humains de leishmanioses, mais également de chiens et d'autres hôtes mammifères, ainsi que de phlébotomes vecteurs. Du point de vue géographique, les souches proviennent principalement d'Europe (41, 7 %) et d'Afrique (31, 8 %), mais également d'Asie (10,5 %) et d'Amérique (16 %). La présence de souches non seulement échantillonnées de foyers bien identifiés mais provenant en plus de tous les acteurs du cycle épidémiologique de l'espèce de *Leishmania* en cause, confère une richesse exceptionnelle à cette Collection.

Débutée en 1971, elle s'est régulièrement enrichie. Depuis 1998, environ 150 nouvelles souches sont cryoconservées chaque année dans la Collection (en moyenne).

Toutes les souches sont conservées en azote liquide (cf. Equipements).

Toutes les souches sont également répertoriées dans une base de données. De 2006 à Juin 2013, le process des échantillons biologiques et des souches, depuis leur arrivée jusqu'à leur stockage, était entièrement tracé et géré informatiquement grâce à un logiciel spécifiquement développé pour la Collection (base de données Modulbio, sécurisée sous Oracle).

En 2011, a débuté un gros travail collaboratif en vue de l'adoption en 2013 par le réseau des CRB français en Microbiologie (FBRcMi) d'un logiciel commun de gestion des échantillons et de saisie des données dénommé BRC-LIMS. Ce projet, financé par le GIS IBiSA et auquel le CNR-L a largement contribué, a été coordonné par Chantal Bizet, Institut Pasteur<sup>22</sup>. Ce logiciel a remplacé ModulBio et a définitivement été adopté en routine en 2014 (cf. Chapitre 6).

La collection est fortement engagée dans une démarche Qualité visant à la certification selon la norme NF S96-900 avec le CRB du CHU de Montpellier.

La collection est référéncée sur le World Data Centre for Microorganisms de la World Federation for Culture Collections (depuis le 08/04/2005) sous l'acronyme LeishCryoBank et le numéro WDCM 879.

Le CNR-L participe au réseau européen BBMRI ("*Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure*"), à l'organisation européenne ECCO ("*European Culture Collections Organisation*", <https://www.eccosite.org/>), au Réseau français des CRB de Microorganismes (<http://www.fbrcmi.fr/>), ainsi qu'au réseau de CRBs français en santé "Biobanques" qui a été lauréat de l'appel à projets "Infrastructures nationales en biologie et santé".

#### **- Conditions de mise à disposition de la collection :**

Toutes les souches de la collection sont cessibles après accord du comité scientifique du CRB et du donneur de la souche. Un **catalogue de 565 souches disponibles** dans la collection est présenté sur le site Internet du laboratoire : [www.parasitologie.univ-montp1.fr/cryobanque.htm](http://www.parasitologie.univ-montp1.fr/cryobanque.htm) . Les souches distribuées à la communauté scientifique sont destinées à des projets scientifiques. Le déstockage des souches est contrôlé par le logiciel de la Collection permettant la traçabilité de la sortie des aliquotes cédées.

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

En accord avec les personnels travaillant au sein du CNR et selon les différents projets en cours, le L-A a défini ses critères de mise à disposition des souches auprès du CNR de Montpellier au travers de documents d'autorisation et de cession de souches.

#### **- Collection d'ADN de *Leishmania***

Depuis 2003, une collection d'ADN a été constituée. Elle renferme des ADN obtenus à partir de produits pathologiques (environ 2300) ou à partir de souches de culture (environ 750). En 2008, un logiciel de gestion de cette collection a été développé au sein du Département. Cette collection a été déclarée dans le cadre du Centre des Collections Biologiques hospitalières du CHRU de Montpellier (CCBH-M) conformément au décret n°2007- 1220 du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain.

**Le LHUPM** possède également une collection importante de souches de *Leishmania* isolées à partir de patients évoluant sur l'ensemble du territoire guyanais. A ce jour, depuis 2012, plus de 300 souches ont été cryoconservées, dont un certain nombre ont été transférées au Laboratoire coordonnateur à Montpellier. Toutes les souches sont conservées en azote liquide en duplicata de la Collection de Montpellier.

---

<sup>22</sup> Demey, S., Begaud, E., Chaïbi, N., Gallais, J., Raynal-Melchy, E., Clermont, D., Talignani, L., Helloin, E., Casaregola, S., Favel, A., Briand, M., Valence-Bertel, F., Darde, M.-L., Villena, I., Guyonneaud, R., Pressigout, M., Bizet, C. (2014). *BRC-LIMS : applications for the management of French Biological Resource Centres of Microorganisms*. Presented at the International Network "Paving the way for Research on Global Health and One Health", Paris, 10-13 Sept. 2014.

Il possède également une collection importante d'ADN de *Leishmania* isolées en Guyane. Elle renferme des ADN obtenus à partir de produits pathologiques ou à partir de souches de culture. Tous les ADN sont cryoconservés à - 80°C.

A signaler la demande de création d'un Centre de Ressources Biologiques au Centre Hospitalier de Cayenne par le CIC-EC /Inserm (pré-visite de faisabilité par Mme Di Donato en mars 2016, montage de dossier et demande de financement en cours), ce centre étant disposé dans les locaux du laboratoire et étant prévu de fonctionner en co-gestion avec le CIC-EC (Pr Mathieu Nacher). Les collections de *Leishmania* devraient constituer une bonne partie des collections prévues de ce CRB et cette mise en place devrait contribuer à améliorer les conditions de stockage et de gestion de la collection de souches existantes au LHUPM.

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

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

Les demandes extérieures de test de chimiosensibilité des Leishmanies restent cependant exceptionnelles.

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

#### **1) Diagnostic**

En France et dans les pays développés, le diagnostic moléculaire est aujourd'hui devenu la méthode de référence pour les leishmanioses. Cependant, peu de kits commerciaux sont disponibles, et aucun n'a été correctement évalué avec des méthodes de référence fiables. En conséquence, la plupart des laboratoires continuent à réaliser ce diagnostic avec des méthodes de PCR dites "maison".

Le CNR recommande l'utilisation de systèmes de PCR "fermés" type PCR en temps réel.

Par contre, il ne peut pas recommander à l'heure actuelle de méthode d'amplification (cibles, amorces...) en raison du manque d'études scientifiques comparatives.

#### **2) Typage**

Le typage est là encore aujourd'hui prioritairement moléculaire. Ce typage est très peu répandu et réservé à des centres experts.

La méthode de référence de typage moléculaire est le MultiLocus Sequence Typing (MLST) développée par le CNR, avec amplifications et séquençage de 7 gènes (El Baidouri et al. PLoS NTD 2013). Une étude comparative multicentrique européenne plus récente a comparé plusieurs méthodes de typage moléculaire (Van der Auwera et al, EuroSurv. 2016) et a adopté cette méthode comme le *gold standard*; toutefois, elle a conclu à une bonne efficacité du typage par séquençage du gène hsp70 .

Les autres méthodes publiées ne sont pas recommandées.

Au cours des 2 dernières années, le CNR a mis au point, avec le centre collaborateur de Marseille, la méthode de typage par MALDI-TOF pour *Leishmania* (cf. § 6.1.3). Le nombre important de souches typées à ce jour a permis d'établir une base de données ("banque de spectres") fiable qui est disponible *via* une application Internet (MSI) et accessible après

obtention de login et mot de passe auprès du webmaster. En Mars 2017, seuls quatre centres ont la possibilité de se connecter. Pour les autres centres, l'accès se fait via le CNRL.

### **3) Sensibilité aux anti-infectieux**

Il est très difficile pour le CNR de recommander une méthode pour les tests de chimiosensibilité, d'une part en raison de la rareté des demandes, d'autre part du fait qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode standard ; de plus, des contradictions ont été observées entre les différentes méthodes utilisées dans la littérature.

## **2.5. Description de l'infrastructure informatique**

### **2.5.1. Environnement informatique du CNR de Montpellier**

Le CNR-L se place essentiellement dans un environnement informatique dépendant de l'Université de Montpellier. Il bénéficie de la sécurité et de la surveillance de base liées à cet environnement.

Le Laboratoire hospitalier est lui dans un environnement purement C.H.R.U., comprenant des règles de sécurité maximales en matière de contact avec l'extérieur. Seule l'activité d'expertise diagnostique du CNR-L est en interface avec cet environnement qui gère les analyses médicales du Laboratoire par le logiciel DxLab, de la société MEDASYS, conforme à la fois aux exigences de l'accréditation ISO 15189 et aux recommandations de la CNIL.

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

En 2013, la Collection a effectué le basculement vers une nouvelle application de gestion des souches 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 4 mois avant de remplacer totalement l'ancienne application ModulBio (sous Oracle). Toutes les données présentes sur l'ancienne base ont été reprises. Cette application présente toutes les garanties de sécurité avec davantage de souplesse et de possibilités.

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

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

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

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

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

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

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

### **2.5.3. Distribution des souches par le CNR**

L'option choisie pour une meilleure diffusion du matériel conservé dans notre collection a consisté dans la réalisation d'un catalogue sous forme d'une base de données interrogeable et accessible sur Internet.

Ceci nous a conduits à réaliser un site Internet pour notre laboratoire et ses différentes composantes (UMR5290, Centre National de Référence des Leishmania, Laboratoire hospitalier, etc...). Ce site est en ligne depuis 2004 à l'adresse suivante : [www.parasitologie.univ-montp1.fr](http://www.parasitologie.univ-montp1.fr) .

Ce site permet une présentation 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 Rapports annuels d'activités sont mis en ligne sur le site une fois validés par l'InVS. Ce site est présenté en version française et anglaise de façon à permettre son accès à une audience internationale.

A noter que le site ne permet pas la notification directe en ligne des cas de leishmaniose par les services ou les laboratoires.

En 2016, les exigences de la norme de certification NF S96-900 nous ont incités à réaliser un nouveau site Internet spécifiquement dédié au CRB-Leishmania.

Une actualisation des pages concernant le CNR proprement dit sera également réalisée selon le même format en 2016-2017.

### **2.5.4. Description de l'infrastructure informatique du candidat L-A de Guyane (CH de Cayenne)**

Le LHUPM / LA-CNR bénéficie de la sécurité et de la surveillance de base liées à l'environnement hospitalier avec des règles de sécurité en matière d'accès aux données et d'identitovigilance. Les examens de diagnostic des leishmanioses sont gérés par le logiciel HEXALIS.

Les collections biologiques du LHUPM sont déclarées de façon anonyme par le CH de Cayenne selon les procédures officielles (ADN et leishmanies formes promastigotes de cultures). La gestion des souches est informatisée.