Santé publique France

Dossier de candidature en vue du renouvellement du **CNR des Leishmanioses** 2017-2021

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

1. NOTE DE PRESENTATION ET ENGAGEMENTS 7

1.1. ACTES DE CANDIDATURE 7
1.2. RAPPEL DE L'HISTORIQUE, DES MISSIONS ET DES OBJECTIFS 8
1.3. PRÉSENTATION DE L'ÉTAT DE LA QUESTION SCIENTIFIQUE ET DES ENJEUX DE SANTÉ PUBLIQUE 10
1.4. MOTIVATION À DEMEURER CNR AU REGARD DE L'EXPÉRIENCE ET DES COMPÉTENCES DES CANDIDATS 12
1.5. DÉCLARATIONS PUBLIQUES D'INTÉRÊTS 12

2. DESCRIPTIF DES CAPACITES DU CNR 13

2.1. ORGANISATION PROPOSÉE POUR RÉPONDRE AU CAHIER DES CHARGES 13
2.2. MOYENS DU LABORATOIRE AFFECTÉS AU CNR 15
2.2.1. Ressources humaines 15
2.2.2. Locaux et équipements (CNR et laboratoires associés): 23
2.2.2.1. CNR Montpellier 23
2.2.2.2. Laboratoire Associé de Cayenne 24
2.3. BREF DESCRIPTIF DES THÉMATIQUES DE RECHERCHE DU CANDIDAT DANS LE DOMAINE D'EXPERTISE DU CNR 25
2.4. CAPACITÉS TECHNIQUES ACTUELLES DU LABORATOIRE CANDIDAT DANS LE DOMAINE SPÉCIFIQUE DU CNR 26
2.4.1. Expertise diagnostique 27
2.4.2. Identification moléculaire 27
2.4.3. Identification biochimique (iso-enzymatique) 28
2.4.4. Autres techniques de typage utilisées 28
2.4.5. Collection de souches de Leishmania 28
2.4.6. Etude in vitro de la chimiosensibilité des souches de Leishmania 30

3. BILAN D'ACTIVITE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE (2011-2015) 31

3.1. RÉSUMÉ DU BILAN D'ACTIVITÉS 2011-2015 31
3.2. ACTIVITÉS D'EXPERTISE 2011-2015 33
3.2.1. Expertise diagnostique 33
3.2.2. Identification moléculaire 34
3.2.3. Identification isoenzymatique 35
3.2.4. Sensibilité in vitro des souches de Leishmania aux produits anti-leishmaniens 37
3.2.5. Réception de souches de Leishmania 37
3.2.6. Distribution de souches de Leishmania 40
3.2.7. Maintien et dynamique de la Collection de souches (Montpellier) 41
3.2.8. Bilan résumé de l'activité d'expertise; évolution des tendances 42
3.3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE ET D'ALERTE 47
3.3.1. Surveillance des leishmanioses humaines 47
3.3.2 PARTICIPATION AUX RÉSEAUX DE SURVEILLANCE 54
3.3.2.1. Contribution à la surveillance nationale en interface avec l'InVS 54
3.3.2.2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux 55
3.3.3. COLLABORATION AVEC LES STRUCTURES DE SANTÉ ANIMALE POUR LA SURVEILLANCE DES LEISHMANIOSES ANIMALES 55
3.3.4. ALERTE : Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux 57

3.4. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL 59
3.4.1. Information *59*
3.4.2. Formation *59*
3.4.2.1. Enseignements *59*
3.4.2.2. Organisation d'un Workshop pour l'O.M.S. : « Molecular diagnosis of leishmanioses » du 19 au 23 Mars 2012 ..... *60*
3.4.2.3. Stagiaires *60*
3.4.3. Conseil aux professionnels de santé : *61*
3.4.4. Liste des activités d'expertises auprès du Ministère chargé de la santé, de l'Institut de veille sanitaire, des agences de sécurité sanitaire, de la Haute Autorité en Santé ou de structure européenne (ECDC…) ou internationale (OMS…) *63*
3.5. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR ... 64
3.5.1. Etude rétrospective de la déclaration des cas de leishmanioses en France *64*
3.5.2. Etude des caractéristiques épidémiologiques et du polymorphisme iso-enzymatique des souches de la Collection *64*
3.5.3. Analyse génétique multilocus de Leishmania d'Afrique et d'Eurasie *65*
3.5.4. Essai thérapeutique de la paromomycine-onguent dans le traitement de la leishmaniose cutanée à L. major en Tunisie *65*
3.5.5. Projet DGRST "Eco-épidémiologie de la leishmaniose cutanée à Leishmania killicki en Tunisie" *65*
3.5.6. Etude de la résistance de Leishmania infantum à l'amphotéricine B *66*
3.5.7. Programme de collaboration avec l'Ecole Vétérinaire d'Alger *66*
3.5.8. Projet européen FP7 "EDENext" (Biology and control of vector-borne infections in Europe) *67*
3.5.9. Projet européen LeishMan « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation ». *67*
3.5.10. Identification des Leishmania par la technique du MALDI-TOF *68*
3.5.11. Autres travaux de recherche en santé humaine avec les Centres Collaborateurs de Marseille et Nice *68*
3.5.12. Collaboration avec le Centre Collaborateur en Santé animale de l'ANSES en matière de leishmanioses animales *69*
3.5.13. Programme de collaboration avec l'université de Kohat (Pakistan) *71*
3.5.14. Autres travaux collaboratifs en recherche *71*

4. LISTE DES PUBLICATIONS 2011-2015 74

4.1. PUBLICATIONS NATIONALES 74
4.2. PUBLICATIONS INTERNATIONALES 74
4.3. CHAPITRES DE LIVRES 79
4.4. COMMUNICATIONS À CONGRÈS NATIONAUX 79
4.5. COMMUNICATIONS À CONGRÈS INTERNATIONAUX 80
4.6. CONFÉRENCES SUR INVITATION DANS CONGRÈS ET RÉUNIONS NATIONAUX 82
4.7. CONFÉRENCES SUR INVITATION DANS CONGRÈS ET RÉUNIONS INTERNATIONAUX 82

5. DESCRIPTION DES DEMARCHES QUALITE ET GARANTIES MISES EN ŒUVRE AU SEIN DU LABORATOIRE 84

5.1. CENTRE COORDONNATEUR DU CHRU DE MONTPELLIER 84
5.2. LHUPM DU CH DE CAYENNE 85

6. DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE 85

6.1. ENVIRONNEMENT INFORMATIQUE DU CNR DE MONTPELLIER 85
6.2. APPLICATION INFORMATIQUE DE GESTION DE LA COLLECTION DU CNR 86

6.3. DISTRIBUTION DES SOUCHES PAR LE CNR 86
6.4. DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE DU CANDIDAT L-A DE GUYANE (CH DE CAYENNE) 87

7. PROPOSITION DE PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2017-2021 88

7.1. ACTIVITÉS D'EXPERTISE 88
7.1.1. Réseau de partenaires 88
7.1.2. Evaluation de techniques de détection des Leishmania 88
7.1.3. Identification des Leishmania 88
7.1.4. Maintien et dynamique de la Collection de souches (Montpellier) 90
7.1.5. Activités d'expertise du L-A de Cayenne 91
7.1.6. Recherche en lien direct avec l'activité du CNR 92
7.1.6.1. Projet européen LeishMan « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation ». 92
7.1.6.2. Recherche en santé humaine en collaboration avec les Centres Collaborateurs du CNR 93
7.1.6.3. Recherche en collaboration avec les structures travaillant en santé animale et en entomologie médicale 93
7.1.6.4. Autres projets de recherche en collaboration 95
7.1.6.5. Projets de recherche du L-A de Cayenne 95
7.1.6.6. Activités de Publication 96
7.2. CONSEIL, INFORMATION, FORMATION 97
7.2.1. Conseil 97
7.2.2. Information 97
7.2.3. Formation 98
7.3. CONTRIBUTION À LA SURVEILLANCE DES LEISHMANIOSES HUMAINES 98
7.4. CONTRIBUTION À L'ALERTE 100

ANNEXES AU DOSSIER DE RENOUVELLEMENT DU CNR DES LEISHMANIOSES 104

1. NOTE DE PRESENTATION ET ENGAGEMENTS

Coordonnées du laboratoire candidat :
Département de Parasitologie-Mycologie (Faculté de Médecine, Université de Montpellier)
CHU de Montpellier
39 Avenue Charles Flahault
34295 Montpellier Cedex 5, France

Nom et coordonnées du responsable scientifique :
Professeur Patrick BASTIEN
Tél. : 04.67.33.23.50 ; Fax : 04.67.33.23.78
Mail : p-bastien@chu-montpellier.fr

Nom et coordonnées du correspondant administratif et financier :
Robert Amier
Tél. : 04.67.33.70.06 ; Fax : 04.67.33.76.04
Mail : r-amier@chu-montpellier.fr
p/o Pr Jean-Paul Cristol, Responsable du Pôle Biologie-Pathologie

1.1. Actes de candidature

- Acte de candidature + lettre d'engagement du responsable du Laboratoire Coordonnateur

- Acte de candidature + lettre d'engagement du responsable du Laboratoire Associé de Cayenne

(voir documents ci-dessous)

PÔLE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE BIOLOGIE-PATHOLOGIE

CHRU MONTPELLIER

Standard Général : 04 67 33 67 33

DÉPARTEMENT DE PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE

Site Arnaud de Villeneuve
39, Av. Charles FLAHAULT 34295 Montpellier Cedex 5

CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES LEISHMANIOSES

CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DE LA TOXOPLASMOSE (pôle Biologie moléculaire)

Coordonnateur de Département
Pr Patrick BASTIEN
04 67 33 23 72

Secrétariat
Fax : 04 67 33 23 58

PARASITOLOGIE
Praticien Hospitalier
Dr N. BOURGEOIS
04 67 33 23 67
Assistant Hospitalo-Universitaire
Dr C. MORELLE
04 67 33 23 56/57

IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
MCU-PH
Dr L. LACHAUD
04 67 33 23 64
Praticien Attaché
Dr S. ALBABA
04 67 33 23 65

MYCOLOGIE
MCU-PH
04 67 33 23 69
Praticien Hospitalier
Dr N. BOURGEOIS
04 67 33 23 67
Praticien Attaché
Dr J. DEREURE

IMMUNOLOGIE FONGIQUE
Praticien Hospitalier
Dr N. BOURGEOIS
04 67 33 23 67

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MCU-PH
Dr C. RAVEL
04 67 33 23 77
Dr Y. STERKERS
04 67 33 23 71
Dr E. VARLET

Consultation/Prélèvement
Prise de Rendez-Vous
04 67 33 23 53/75

Qualité
Praticien Hospitalier
Dr N. BOURGEOIS
04 67 33 23 67

Cadre de Santé
M. C. MASMEJEAN

A : Monsieur le Directeur Général
Institut de Veille Sanitaire
12, rue du Val d'Osne
94415 SAINT-MAURICE CEDEX

Montpellier, le 2 Septembre 2016

Monsieur le Directeur Général,

Je vous informe par le présent courrier de mon acte de candidature, en tant que Laboratoire coordonnateur, pour le renouvellement du Centre National de Référence des Leishmanioses, en réponse à l'appel à candidature adressé le 20 Juin 2016.

En cas de nomination, je m'engage à assurer la fonction de coordonnateur de ce CNR durant la durée du mandat défini par l'InVS (2017-2021).

Je vous prie d'agréer, Monsieur le Directeur Général, l'expression de mes respectueuses salutations.

Professeur Patrick BASTIEN

Pr Patrick Bastien

A Mme La Directrice Générale
Institut de veille sanitaire
12, Rue du Val d'Osme
94415 St Maurice Cedex

Cayenne, le 15 septembre 2016

Mme La Directrice Générale

Par la présente, je vous confirme mon intention d'être Laboratoire Associé pour le renouvellement du Centre National de référence de Leishmaniose en réponse à l'appel à candidature adressé le 16 juin 2016.

En cas de nomination, je m'engage à assurer la fonction de coordonnateur du LA-CNR Leishmaniose durant la durée de son mandat soit de 2017 à 2021.

Veuillez agréer, Mme la Directrice, l'expression de mes salutations respectueuses.

Pr Pierre Demar Magalie

1.2. Rappel de l'historique, des missions et des objectifs

Le Centre National de Référence des Leishmanioses (CNR-L) a été créé en mars 1998 (arrêté du 17 mars 1998). Il a été renouvelé en 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.

1.3. 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 cutanéo-muqueuse (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 [1]. 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 [2]. **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* [3]. 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 Languedoc-Roussillon, de la Provence-Côte d'Azur et de la Corse [3]. 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 [4]. Par ailleurs, en raison de l'accentuation des échanges avec les zones endémiques, il existe de **nombreux cas importés** de leishmaniose viscérale ou cutanée

[1] Bastien P, Lachaud L. Leishmanioses: biologie, clinique et thérapeutique. *In : Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 2016, 8-506-A-10, 2016.
[2] den Boer M., et coll. Leishmaniasis impact and treatment access. Clin Microbiol Infect. 2011, 17: 1471–1477.
[3] 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.
[4] Alvar J et coll. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clin Microbiol Rev. 2008, 21:334-59.

en France, surtout originaires du pourtour méditerranéen (Maghreb en particulier) et de Guyane Française [5].

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 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) [1], est totalement implantée sur le territoire et a tendance à devenir plus prévalente [6].

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 [7]. 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 [8]; 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 [9,10]. 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 (filière 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 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 [11]. Enfin, le

[5] Lachaud L. et coll. Surveillance of leishmaniases in France, 1999 to 2012. Eurosurveillance, 2013, 18(29): 20534-...
[6] Dedet JP, et coll. Épidémiologie des leishmanioses autochtones en France métropolitaine et d'outre-mer. Presse Med. 2013; 42: 1469-81.
[7] Basset D. et coll. Visceral leishmaniasis in organ transplant recipients : eleven new cases and literature review. *Microbe Infect*. 2005, 7:1370-1375.
[8] Bañuls AL*, Bastien P* et coll. Clinical pleiomorphism in human leishmaniases, with special mention of asymptomatic infection. Clin Microbiol Infect. 2011, 17: 1451–1461.
[9] 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.
[10] 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.
[11] Buffet P. et coll. Traitement des leishmanioses en France : Proposition d'un référentiel consensuel. Presse Med. 2011; 40(2):173-84

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.

1.4. Motivation à demeurer CNR au regard de l'expérience et des compétences des candidats

Le Sud de la France, et plus encore la Guyane, sont des zones d'endémie de leishmaniose. La progression de la leishmaniose canine, tant au plan numérique que territorial, crée une situation épidémiologique d'autant plus préoccupante que le réchauffement climatique fait craindre une multiplication des populations de phlébotomes vecteurs et/ou l'extension de leur territoire géographique. Ajoutées à la multiplication des causes d'immunodépression, toutes les données exposées ci-dessus impliquent une **surveillance des leishmanioses** humaines (et canine) en France métropolitaine et en Guyane.

Le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de la Faculté de Médecine et du CHU de Montpellier a gagné une **notoriété nationale et internationale en matière de leishmanioses** depuis plus de 4 décennies. Cette expertise, mise en place par le Pr. J.A. Rioux dans les années 70, a été reprise par le Pr. J.P. Dedet et son équipe, dont faisait partie le Pr. P. Bastien, qui lui-même a pris la relève du Laboratoire depuis 2007. Cette continuité et cette transmission d'une expertise passionnée font l'une des forces du Laboratoire.

C'est tout naturellement que le Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie-Mycologie (LHUPM) de Cayenne a été proposé comme **Laboratoire-Associé (L-A)** en 2011. En effet, la Guyane est le théâtre d'une endémie importante de leishmaniose cutanée, dont l'épidémiologie est spécifique. L'incidence élevée fait de la leishmaniose un véritable problème de santé publique dans ce département. De plus, il existe comme à Montpellier une longue histoire de recherche dans le domaine depuis les années 80, axée sur l'épidémiologie et la clinique, et intégrant aujourd'hui les outils les plus modernes.

Depuis maintenant 18 ans, le **CNR des Leishmanioses (CNR-L)** a maintenu et même développé l'ensemble de ses missions. La Collection internationale de plus de 6000 souches de ce pathogène est en voie de certification; elle est connue dans le monde entier et référencée sur le *World Data Center for Microorganisms* de la *World Federation for Culture Collections*. Outre l'expertise scientifique, le Laboratoire coordonnateur a profondément développé les activités de diagnostic et de surveillance; et les demandes de diagnostic moléculaire et les déclarations de cas sont en augmentation. Après une période de transition, le L-A de Cayenne a également retrouvé une dynamique dans tous les domaines des missions du CNR.

Dans les deux laboratoires, de nombreuses collaborations continuent d'être mises en place.

Des objectifs supplémentaires sont envisagés pour le prochain mandat, rendus nécessaires par le maintien de la situation épidémiologique décrite ci-dessus. L'évolution des compétences et des techniques (séquençage haut-débit, protéomique…) autorise clairement ces développements, visant à renforcer la connaissance épidémiologique ainsi que le diagnostic et la surveillance de ces maladies polymorphes. Une collaboration plus étroite au sein du CNR sera bénéfique à la réalisation de ces objectifs.

1.5. Déclarations publiques d'intérêts

Voir Annexes.

2. DESCRIPTIF DES CAPACITES DU CNR

2.1. 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 1er 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 ce prochain quinquennal, il est proposé que le Pr Magalie Demar 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 1er 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 début 2017) et l'arrêt des thématiques concernant le CNR à Marseille nous incitent à proposer le Laboratoire de 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;

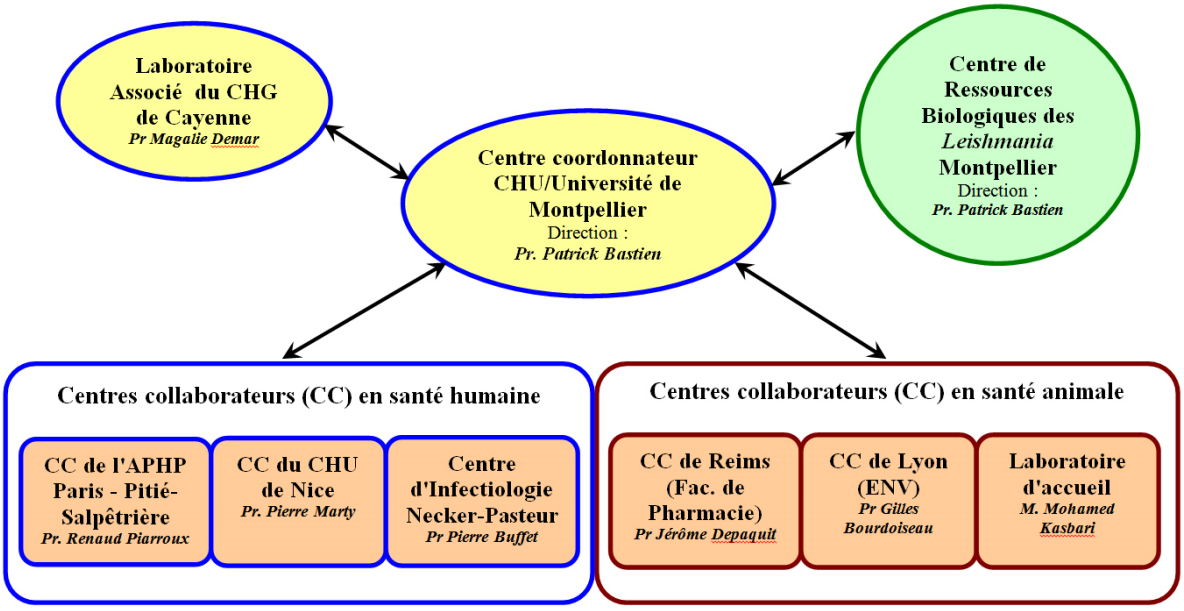
(ii) le Laboratoire de Parasitologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon (Pr. G. Bourdoiseau);

(iii) l'Unité sous Contrat de l'ANSES "VECPAR" ("Transmission vectorielle et épidémiosurveillance 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



2.2. Moyens du Laboratoire affectés au CNR

2.2.1. Ressources humaines

2.2.1.1. Département de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier

***Curriculum Vitae* du Responsable du Laboratoire Coordonnateur**

Nom: BASTIEN **Prénom: Patrick**
Né le 10/04/56 à Melun (77), France. Nationalité française. Situation de famille: Marié, deux enfants.
Adresse actuelle: Département de Parasitologie-Mycologie (UMR 5290 CNRS / 224 IRD/Université de Montpellier), UFR Médecine, CHU de Montpellier, 39 Av. Charles Flahault, 34295 Montpellier cedex.
Tel: 04 67 33 23 50 – e-mail: p-bastien@chu-montpellier.fr

I. TITRES ET DIPLOMES
- Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)
- Doctorat en Médecine, Université Paris V
- Doctorat d'Université (Sciences Biologiques, Parasitologie), Université Montpellier I
- Diplôme Universitaire de Pédagogie Médicale et Bases à la Communication Médicale, Université Montpellier I
- Diplôme Universitaire de Médecine Tropicale "Santé dans le Monde", Université Paris VI
- CESAM (Certificat de Statistiques Appliquées à la Médecine), Option Epidémiologie, Université Paris VI

II. CURSUS PROFESSIONNEL

2006-… : **Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Coordinateur du Département de Parasitologie-Mycologie, CHRU de Montpellier**

1995-2006 : Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier.

1991-1995: Assistant Hospitalier Universitaire, même Laboratoire.

1989-1991: Research Assistant à l'Imperial College of Science, Technology & Medicine, Londres.

1986-1989: Allocataire de Recherche "M.R.T." pour le Doctorat en Sciences (Parasitologie) à Montpellier.

1985-1986: D.E.A. de Parasitologie, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris.

1980-1984: République de Vanuatu (ex-Nouvelles Hébrides):

. *Médecin consultant*; *Chef du Service de Médecine Interne*; *Chef du Service de Pédiatrie*.

. *Responsable du projet OMS/TDR* "Etude de la chloroquino-résistance de Plasmodium falciparum à Vanuatu" (1982-84).

. *Adjoint au Directeur National du Service de Lutte Antipaludique* (Malaria Control Program).

III. ACTIVITES ET RESPONSABILITES ADMINISTRATIVES
- Coordonnateur du Département de Parasitologie-Mycologie de la Faculté de Médecine et du C.H.U. de Montpellier (depuis 2007)
- Directeur-adjoint de l'UMR 5290 CNRS / 224 IRD/ Université Montpellier ("MiVEGEC"); antérieurement directeur-adjoint de l' UMR 5093 CNRS / Université Montpellier 1 ("Biologie Moléculaire et Génome des Protozoaires Parasites") en 2006-2007
- Directeur du Centre National de Référence des Leishmanioses
- Responsable du Pôle "Biologie Moléculaire" du Centre National de Référence de la Toxoplasmose
- Co-directeur du LabEx national "ParaFrap"
- Direction de l'équipe MeBFEA puis BioGePPE au sein de l'UMR (depuis 2007).
- Co-Responsable de l'enseignement en Parasitologie-Mycologie au cours des Etudes Médicales (2ème et 3ème Cycles), UFR Médecine, Université Montpellier 1.
- Responsable du programme doctoral international du LabEx "ParaFrap" (2012-2019).

. Responsable (pour l'Université Montpellier 1) du Parcours "*Interactions hôtes-agents infectieux et mécanismes de défense*" du Master 2R BioMed, Spécialité "Biologie Santé" de 2007 à 2016, ainsi que de deux UE. Renouvellement du M2R obtenu auprès du Ministère en 2011 puis en 2015.

IV. ACTIVITES DE RECHERCHE

Thèmes de recherche actuels :

1) Biologie moléculaire et cellulaire du protozoaire parasite *Leishmania* .

2) Mise au point et évaluation de méthodes moléculaires de diagnostic de protozooses.

Membre d'une équipe CNRS depuis 1997; chef d'équipe depuis 2008.

Responsabilité et Financements d'Activités de Recherche :

Directeur-adjoint de l'UMR 5290 CNRS / 224 IRD/ Université Montpellier ("MiVEGEC");

Chef d'équipe depuis 2008 : "Mécanismes Biologiques Fondamentaux des Eucaryotes Ancestraux", dans l'UMR2724 puis "Biologie, Génétique et Pathologie des Pathogène Eucaryotes" dans l'UMR 5290 CNRS-IRD-Université Montpellier; co-direction en 2006-2007.

Responsabilité et participation directes dans l'établissement de l'Equipe postulante CNRS (1997) puis UMR CNRS (1999) dans le laboratoire.

Obtention de 18 Contrats de recherche en tant que porteur ou participant essentiel au projet (TDR/OMS, CRE INSERM, Groupement d'Etudes et de Recherche sur les Génomes, PHRC, SIDACTION + Responsabilité de la partie française du Contrat de Recherche CEE BioTech "Genomic sequencing of 3.8 Mb of *Leishmania major* Friedlin" (1999-2002)

Participation directe à l'obtention de 11 contrats de recherche : TDR/OMS, INSERM (Réseau Nord-Sud), CEE INCO-DC, Action incitative du Ministère, PICASSO (Actions intégrées franco-espagnoles), DGA, LabEx...

Activités d'"expertise"

- ✓ Expert scientifique auprès de Quality Control Molecular Diagnostics® pour l'organisation du Contrôle de Qualité en PCR-Toxoplasma à l'échelon européen (depuis 2010).
- ✓ Membre du Jury du Prix Jean Valade 2013, Fondation de France, Paris, 20 Nov. 2013.
- ✓ Président du Comité d'évaluation des Unités de recherche en Parasitologie à l'ANSES, Paris, 2-5 juillet 2012
- ✓ Missions d'expertise auprès du gouvernement espagnol : Evaluation de projets de recherche dans le cadre du Réseau de Recherche des Centres de Maladies Tropicales; Madrid, 1-2 Juillet 2004, 14-15 Sept. 2005.
- ✓ Réunions du **Réseau O.M.S. "*Leishmania* Genome Network"**, Cambridge, 23-24 Sept. 1995, et 27-30 Mars 1996; Istanbul 10-11 Mai 1997; Arcachon, 22-23 Avril 1998 ; Hinxton, 16-18 Mars 1999 et 2-5 juin 2003.
- ✓ Réunion d'experts sur la "Cartographie des génomes des Trypanosomatidés parasites" organisée par le **Programme TDR** (*Research and Training in Tropical Diseases*) **de l'O.M.S.** (Rio de Janeiro, 13-15 Avril 1994).
- ✓ Rapporteur pour nombreux projets de recherche (France, UK) et journaux scientifiques.

Organisation de congrès :

* 42ème Congrès du Groupement des Protistologues de Langue Française (120 participants, 14 conférenciers étrangers), Montpellier, 12-14 Mai 2004

* Comité d'organisation du congrès ISOPS III (3rd International Symposium on Phlebotomine Sandflies), Montpellier, 23-27 Août 1999.

V. PUBLICATIONS DE TRAVAUX DE RECHERCHE

135 publications, toutes dans journaux à comité de lecture, dont :

- **-** 114 dans revues internationales et 10 chapitres d'ouvrages
- 31 en premier auteur
- 30 en tant que directeur de l'étude.

VI. COMMUNICATIONS DE TRAVAUX DE RECHERCHE

136 communications scientifiques à congrès, dont

- 69 dans des congrès internationaux

- 25 sur invitation.

VII. ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

- Responsabilités: cf. supra.
- Chargé d'enseignement (cours, Travaux Dirigés, Travaux Pratiques) dans le cadre du **2° Cycle et du 3° Cycle des Etudes Médicales**, Faculté de Médecine de Montpellier.
- **.** Membre de la Commission Pédagogique du Master 2R "BioMed" (2007-2016).
- Participation annuelle aux jurys du **M2R** et du concours pour l'attribution des allocations de recherche doctorales du MENRT de l'***Ecole Doctorale 168 CBS2***.
- Participation à de nombreux jurys de thèse

VIII. DIRECTION DE THESES OU DE MEMOIRES

- Direction de 7 **thèses d'Université,** 5 mémoires de **D.E.A./M2R**, 7 mémoires de **DES de Biologie Clinique** et **de Biologie Médicale,** et 3 **thèses d'exercice en Médecine et en Pharmacie**.

~~~~~~

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.

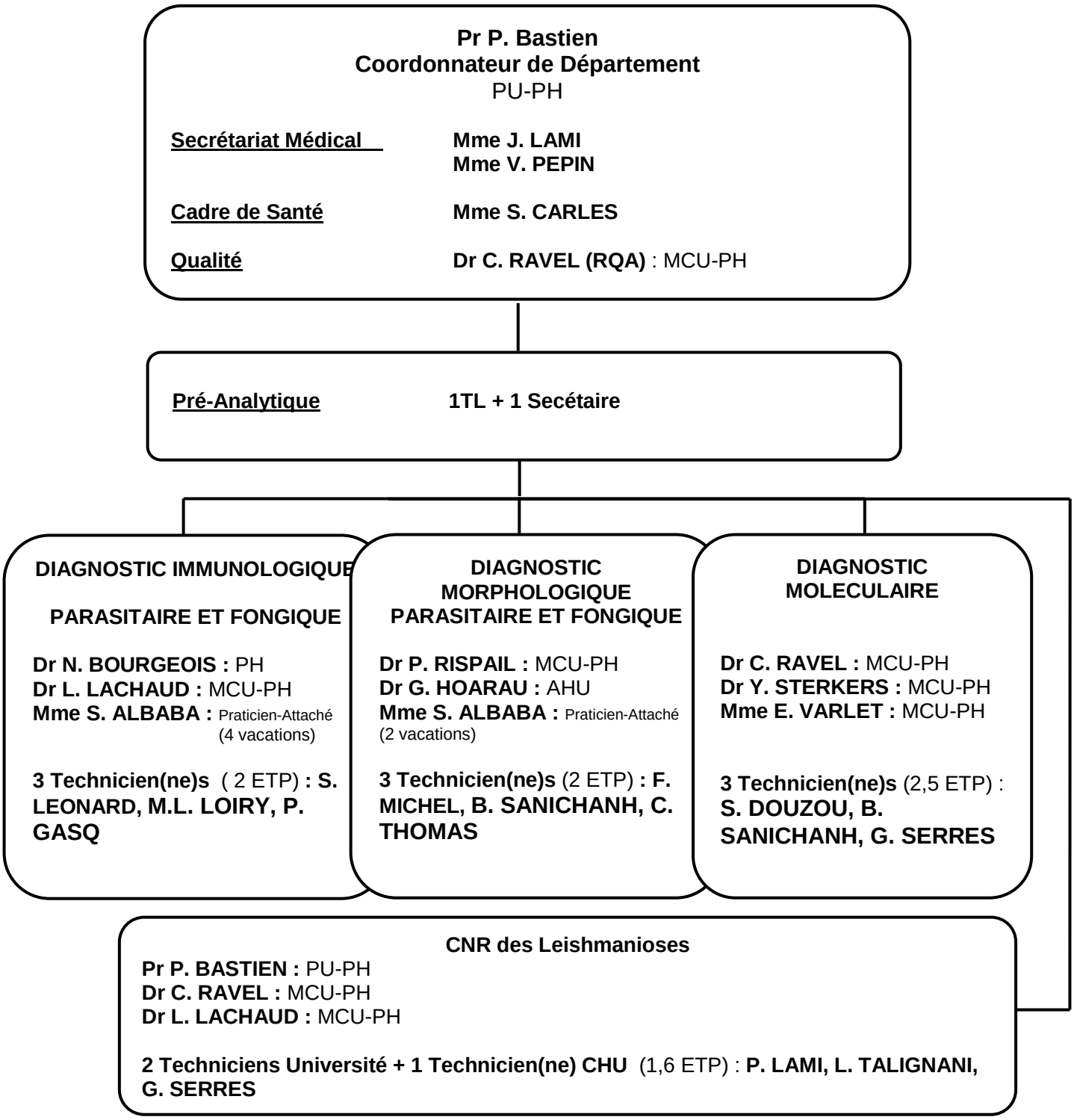
Un organigramme spécifique au Laboratoire Coordonnateur du CNR-L est ensuite présenté au-dessous.

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

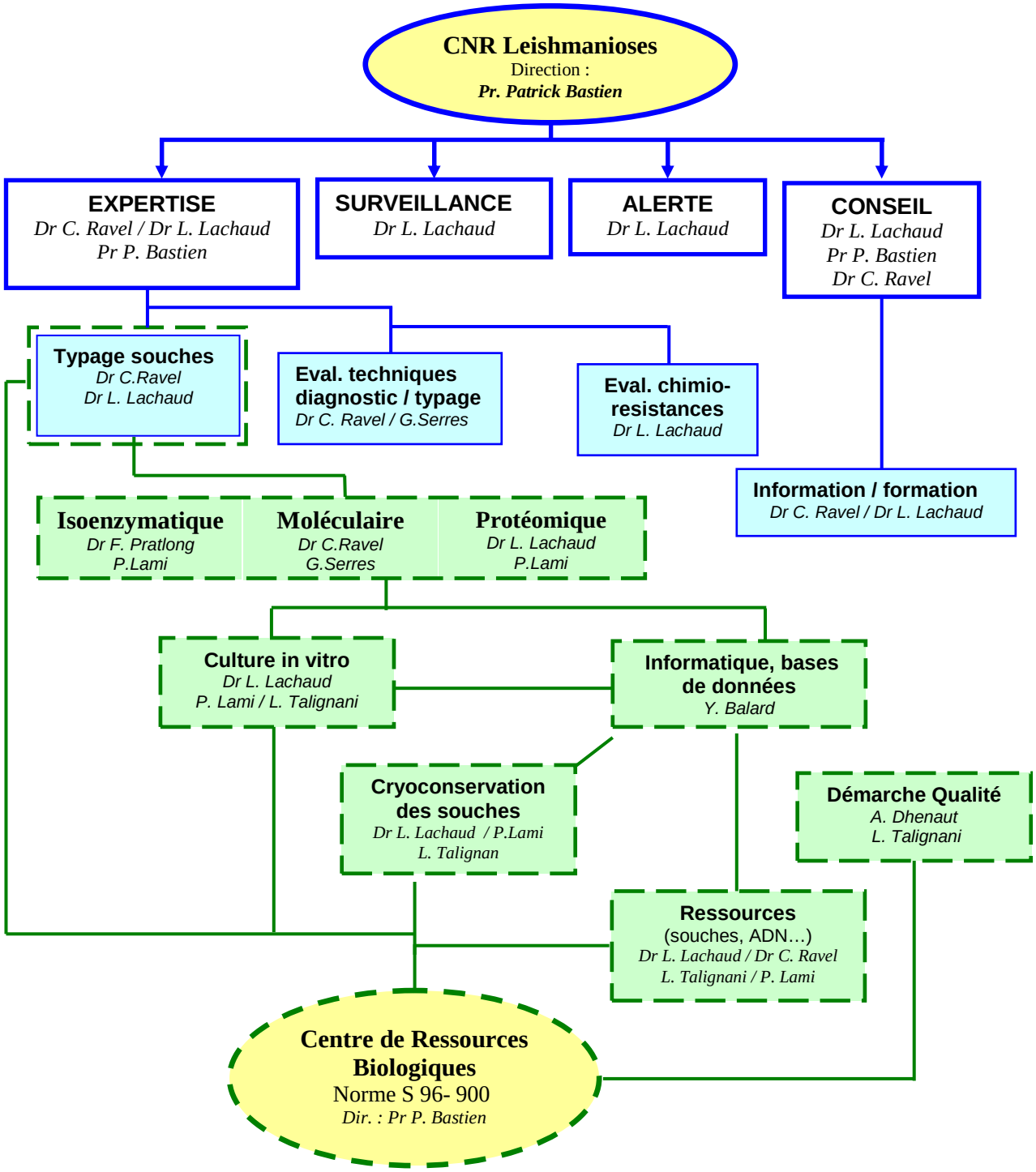
Noms et Prénoms	Qualifications	ETP	Appartenance administrative (pour l'activité au CNR-L)
Bastien Patrick	Médecin (PU-PH)	0,10	CHU-Univ. (50%-50%)
Lachaud Laurence	Médecin (MCU-PH)	0,30	Univ. Montpellier
Ravel Christophe	Médecin (MCU-PH)	0,20	CHU-Univ. (50%-50%)
Balard Yves	Assistant-Ingénieur	0,30	Univ.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



2.2.1.2. Laboratoire-Associé de Cayenne

Curriculum Vitae du Responsable du Laboratoire-Associé

Dr DEMAR ép PIERRE Magalie, N° Ordre national des médecins : GY/995
née le 21 Avril 1970
N°RPPS : 10002189057
Mariée, 2 enfants (7 ans, 9 ans)
0694.450568 /0594.395040
mdemar@yahoo.com
magalie.demar@ch-cayenne.fr

Titres et diplômes

Spécialisée en Infectiologie (DESC Pathologie Infectieuse et tropicale clinique et biologique, Paris 5-2004**), Spécialisée en biologie médicale (DES biologie médicale,** Paris 6 - 2001**), Docteur d'état en Médecine,** Paris - 2001.

Concours PU-PH (2014). Habilitation à diriger la recherche, HDR (Université Antilles-Guyane 2013), Docteur ès Sciences, PhD, (Université Antilles-Guyane 2009), **DEA «Santé Publique et pays en voie de développement»** (Paris, Marseille, Côte d'Ivoire), 2000. **Maîtrise de Sciences Biologiques et Médicales:** Parasitologie, génétique, biologie moléculaire (Paris 6, 1997)

Diplôme Universitaire (DU) «Maladies Infectieuses et foie», Paris 6, 2013. **Diplôme Universitaire** « épidémiologie en milieu tropical ». Université Antilles-Guyane, 2011. **Diplôme Universitaire** (DU) «Drépanocytose », Guadeloupe, 2010. **Diplôme Universitaire** (DU) «Infectiologie, chimiothérapie anti-infectieuse et vaccinologie, Lyon 2007. **Capacité de Médecine Tropicale**. Université Antilles-Guyane, 2003. **DIU Analyse des génomes**. Institut Pasteur/Université Paris 7, 2003. **École d'été de Santé Publique et d'épidémiologie** (Inserm U292)-Kremlin Bicêtre 2001. **Cours/DIU de Mycologie Médicale**. Institut Pasteur/Université Paris 7- 2001. **Diplôme Universitaire (DU) «lutte antipaludique,** Le Pharo-Marseille-2001. **Diplôme Universitaire de Médecine Tropicale** -Kremlin Bicêtre, 1998. **Études de Médecine** - Faculté de médecine de Nice (1988-1995). **Baccalauréat D** (mention Assez Bien) – Martinique 1987

Expérience professionnelle

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier (PU-PH) – Chef de service : 2014-. Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie-Mycologie (Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Guyane française)
Praticien Hospitalier (PH) : 2008-2013, **Praticien Hospitalier Contractuel (PH) (PHC)**, 2005-2008 Unité de Maladies Infectieuses et Tropicales Centre Hospitalier Andrée Rosemon (CHAR, Cayenne), Guyane française
Assistante Hospitalo-Universitaire (AHU) : 2001-2005 Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie-Mycologie Centre Hospitalier Andrée Rosemon (CHAR, Cayenne), Guyane française

Activités d'enseignement

Chargé d'enseignement pour les 2° et 3° cycle des Etudes Médicales
Chargé d'enseignement de

Activités de recherche

Thèmes de recherche actuels (EA 3593)

- Isolement de souches de *T. gondii* à partir de la faune de Guyane (sauvage, domestique, élevage)
- Etude des réservoirs d'agents de protozooses en Guyane française(Toxoplasmose, Chagas, Leish, Leptospirose, Coxiella)
- Epidémiologie des parasitoses impliquées en pathologie : aspect sérologique et moléculaire
- Virulence des souches de toxo circulants en Guyane française : Toxo amazonienne

Responsabilités et financements

- CEBA : Biohopsys « Toxoplasmose » : 2012-2015
- FEDER (Europe) : Parasitoses alimentaires en Guyane 2016-202019
- FEDER (Europe) : Leptospirose en Guyane 2016-2019

Publications

1: Martin N, Mosnier E, Favennec L, Roux G, Buteux A, Guarmit B, Epelboin L, Girouin C, Brousse P, **Demar M**. [Not Available]. Med Mal Infect. 2016 Jun;46(4 Suppl 1):107. doi: 10.1016/S0399-077X(16)30521-2. French. PubMed PMID: 27495658.

2: Epelboin L, Le Turnier P, Mosnier E, Kallel H, Jolivet A, Bourhy P, **Demar M**,Djossou F. [Not Available]. Med Mal Infect. 2016 Jun;46(4 Suppl 1):106. doi: 10.1016/S0399-077X(16)30518-2. French. PubMed PMID: 27495655.

3: Douine M, Musset L, Corlin F, Pelleau S, Mutricy L, Blanchet D, Djossou F, Hiwat H, **Demar M**, Nacher M. [Not Available]. Med Mal Infect. 2016 Jun;46(4 Suppl 1):93-4. doi: 10.1016/S0399-077X(16)30487-5. French. PubMed PMID: 27495620.

4: Baizet C, Ouar-Epelboin S, **Demar M**, Djossou F, Egmann G, Epelboin L. [Not Available]. Med Mal Infect. 2016 Jun;46(4 Suppl 1):25. doi: 10.1016/S0399-077X(16)30313-4. French. PubMed PMID: 27495449.

5: Ajzenberg D, Lamaury I, **Demar M**, Vautrin C, Cabié A, Simon S, Nicolas M, Desbois-Nogard N, Boukhari R, Riahi H, Dardé ML, Massip P, Dupon M, Preux PM, Labrunie A, Boncoeur MP. Performance Testing of PCR Assay in Blood Samples for the Diagnosis of Toxoplasmic Encephalitis in AIDS Patients from the French Departments of America and Genetic Diversity of Toxoplasma gondii: A Prospective and Multicentric Study. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Jun 29;10(6):e0004790. doi:10.1371/journal.pntd.0004790. eCollection 2016 Jun. PubMed PMID: 27355620; PubMed Central PMCID: PMC4927177.

6: Douine M, Musset L, Corlin F, Pelleau S, Pasquier J, Mutricy L, Adenis A, Djossou F, Brousse P, Perotti F, Hiwat H, Vreden S, **Demar M**, Nacher M. Prevalence of Plasmodium spp. in illegal gold miners in French Guiana in 2015: a hidden but critical malaria reservoir. Malar J. 2016 Jun 9;15:315. doi: 10.1186/s12936-016-1367-6. PubMed PMID: 27277831; PubMed Central PMCID: PMC4899929.

7: Mahamat A, Bertrand X, Moreau B, Hommel D, Couppie P, Simonnet C, Kallel H, **Demar M**, Djossou F, Nacher M. Clinical epidemiology and resistance mechanisms of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii, French Guiana, 2008-2014. Int J Antimicrob Agents. 2016 Jul;48(1):51-5. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.03.006. Epub 2016 Apr 25. PubMed PMID: 27236843.

8: Djossou F, Vesin G, Walter G, Epelboin L, Mosnier E, Bidaud B, Abboud P, Okandze A, Mattheus S, Elenga N, **Demar M**, Malvy D, Nacher M. Incidence and predictive factors of transaminase elevation in patients consulting for dengue fever in Cayenne Hospital, French Guiana. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2016 Feb;110(2):134-40. doi: 10.1093/trstmh/trv117. PubMed PMID: 26822606.

9: Le Govic Y, Guyot K, Certad G, Deschildre A, Novo R, Mary C, Sendid B, Viscogliosi E, Favennec L, Dei-Cas E, Fréalle E, Dutoit E; ANOFEL Cryptosporidium National Network. Assessment of microscopic and molecular tools for the diagnosis

and follow-up of cryptosporidiosis in patients at risk. Eur J Clin MicrobiolInfect Dis. 2016 Jan;35(1):137-48. doi: 10.1007/s10096-015-2519-2. Epub 2015 Nov 26. PubMed PMID: 26610340.

10: Ginouvès M, Simon S, Bourreau E, Lacoste V, Ronet C, Couppié P, Nacher M,**Demar M**, Prévot G. Prevalence and Distribution of Leishmania RNA Virus 1 in Leishmania Parasites from French Guiana. Am J Trop Med Hyg. 2016 Jan;94(1):102-6.

doi: 10.4269/ajtmh.15-0419. Epub 2015 Nov 23. PubMed PMID: 26598572; PubMed Central PMCID: PMC4710412.

11: Ginouves M, Veron V, Musset L, Legrand E, Stefani A, Prevot G, **Demar M**, Djossou F, Brousse P, Nacher M, Carme B. Frequency and distribution of mixed Plasmodium falciparum-vivax infections in French Guiana between 2000 and 2008.

Malar J. 2015 Nov 10;14:446. doi: 10.1186/s12936-015-0971-1. PubMed PMID: 26555553; PubMed Central PMCID: PMC4641342.

12: Martin-Blondel G, Iriart X, El Baidouri F, Simon S, Mills D, **Demar M**, Pistone T, Le Taillandier T, Malvy D, Gangneux JP, Couppie P, Munckhof W, Marchou B, Ravel C, Berry A. Outbreak of Leishmania braziliensis Cutaneous Leishmaniasis, Saül, French Guiana. Emerg Infect Dis. 2015 May;21(5):892-4. doi: 10.3201/eid2105.141181. PubMed PMID: 25897573; PubMed Central PMCID: PMC4412217.

13: Mahamat A, Abboud P, **Demar M**, JeanBourquin D, Djossou F. Combined antiparasitic treatment for neurocysticercosis. Lancet Infect Dis. 2015 Mar;15(3):264-5. doi: 10.1016/S1473-3099(15)70031-9. PubMed PMID: 25749224.

14: Nacher M, Adenis A, Sambourg E, Huber F, Abboud P, Epelboin L, Mosnier E, Vantilcke V, Dufour J, Djossou F, **Demar M**, Couppié P. Histoplasmosis or tuberculosis in HIV-infected patients in the amazon: what should be treated first? PLoS Negl Trop Dis. 2014 Dec 4;8(12):e3290. doi: 10.1371/journal.pntd.0003290. eCollection 2014 Dec. PubMed PMID: 25474641; PubMed Central PMCID: PMC4256267.

15: Khan A, Ajzenberg D, Mercier A, **Demar M**, Simon S, Dardé ML, Wang Q, Verma SK,Rosenthal BM, Dubey JP, Sibley LD. Geographic separation of domestic and wild strains of Toxoplasma gondii in French Guiana correlates with a monomorphic version of chromosome1a. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Sep 18;8(9):e3182. doi: 10.1371/journal.pntd.0003182. eCollection 2014 Sep. PubMed PMID: 25233228; PubMed Central PMCID: PMC4169257.

16: Sambourg E, **Demar M**, Simon S, Blanchet D, Dufour J, Sainte-Marie D, Fior A, Carme B, Aznar C, Couppié P. [Paracoccidioidomycosis of the external ear]. Ann Dermatol Venereol. 2014 Aug-Sep;141(8-9):514-7. doi:

10.1016/j.annder.2014.04.121. Epub 2014 Jun 3. French. PubMed PMID: 25209814.

17: Iriart X, Blanchet D, Menard S, Lavergne RA, Chauvin P, Adenis A, Cassaing S, Fillaux J, Magnaval JF, **Demar M**, Carme B, Bessieres MH, Couppie P, Nacher M, Berry A, Aznar C. A complementary tool for management of disseminated Histoplasma capsulatum var. capsulatum infections in AIDS patients. Int J Med Microbiol. 2014 Nov;304(8):1062-5. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.07.016. Epub 2014 Aug 7. PubMed PMID: 25201327.

18: Adenis A, Nacher M, Hanf M, Vantilcke V, Boukhari R, Blachet D, **Demar M**, Aznar C, Carme B, Couppie P. HIV-associated histoplasmosis early mortality and incidence trends: from neglect to priority. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Aug 21;8(8):e3100. doi: 10.1371/journal.pntd.0003100. eCollection 2014 Aug. PubMed PMID: 25144374; PubMed Central PMCID: PMC4140672.

19: Eldin C, Mahamat A, **Demar M**, Abboud P, Djossou F, Raoult D. Q fever in French Guiana. Am J Trop Med Hyg. 2014 Oct;91(4):771-6. doi: 10.4269/ajtmh.14-0282. Epub 2014 Aug 4. Review. PubMed PMID: 25092817; PubMed Central PMCID: PMC4183403.

20: Edouard S, Mahamat A, **Demar M**, Abboud P, Djossou F, Raoult D. Comparison between emerging Q fever in French Guiana and endemic Q fever in Marseille, France. Am J Trop Med Hyg. 2014 May;90(5):915-9. doi: 10.4269/ajtmh.13-0164. Epub 2014 Mar 17. PubMed PMID: 24639301; PubMed Central PMCID: PMC4015587.

21: Nacher M, Adenis A, Blanchet D, Vantilcke V, **Demar M**, Basurko C, Gaubert-Maréchal E, Dufour J, Aznar C, Carme B, Couppié P. Risk factors for disseminated histoplasmosis in a cohort of HIV-infected patients in French Guiana. PLoS Negl Trop Dis. 2014 Jan 30;8(1):e2638. doi: 10.1371/journal.pntd.0002638. eCollection 2014. PubMed PMID: 24498446; PubMed Central PMCID: PMC3907336.

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)

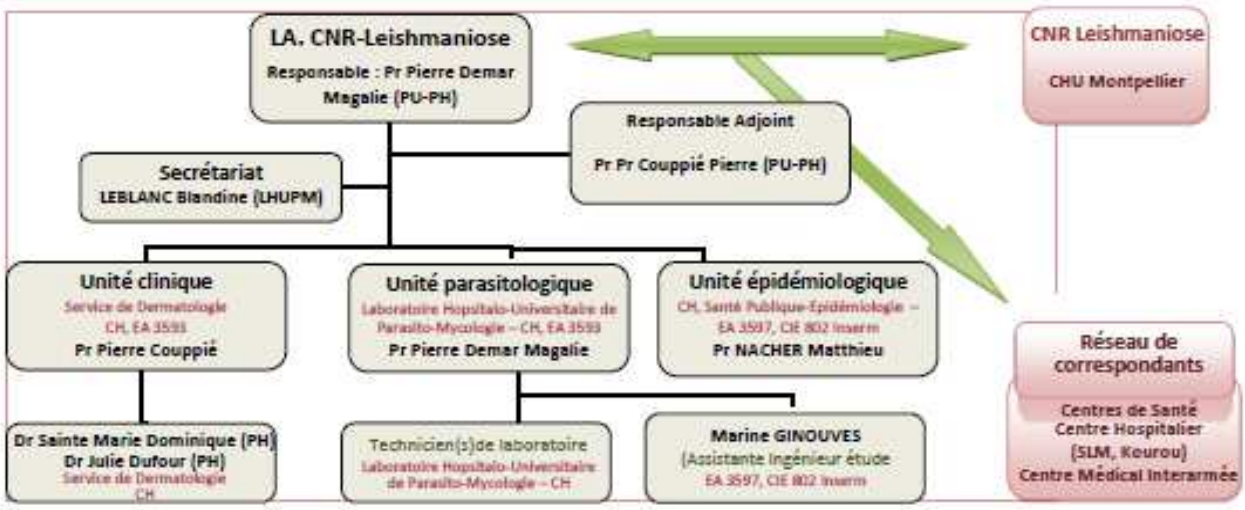
Nom et Prénom	Qualification	ETP	Appartenance administrative (pour l'activité au CNR-L)
Pierre Demar Magalie	Médecin (PU-PH: Parasitologie)	0,25	CH, LHUPM – UAG/ EA 3593 et CIE 802 Inserm
Couppié Pierre	Médecin (PU-PH : Dermatologie)	0,1	CH, Dermato – UAG/ EA 3593
Mathieu Nacher	Médecin (PU-PH : Santé 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.

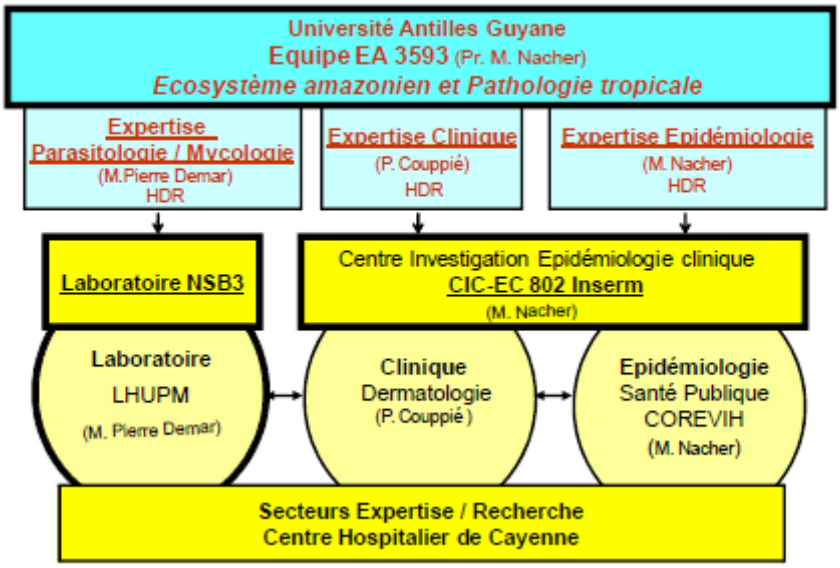
Une aide ponctuelle complémentaire pour les aspects analyse et expertise épidémiologique peut être apportée par l'équipe Inserm CIC-EC Antilles Guyane.

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.



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

2.2.2.1. 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 m², répartis sur deux étages, dont la construction a été entièrement prise en charge par le CHRU. Dans ces locaux sont installés à la fois le laboratoire hospitalier de diagnostic, le 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 m2 ; 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.

2.2.2.2. 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. comprennent :

* **Le LHUPM** est installé dans le secteur des laboratoires. Dans ces locaux, sont installés à la fois le laboratoire hospitalier de diagnostic en Parasitologie-Mycologie et le 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...

2.3. Bref descriptif des thématiques de recherche du candidat dans le domaine d'expertise du CNR

Le **Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU / Faculté de Médecine de Montpellier** a une activité de recherche centrée sur les leishmanioses depuis près de 40 ans. Il a acquis dans ce domaine une reconnaissance nationale et internationale, comme en attestent les très nombreuses publications issues de ses travaux, aussi bien en éco-épidémiologie qu'en biologie moléculaire, en passant par le typage biochimique (isoenzymes) et moléculaire (séquençage, microsatellites, MLST, PFGE), la taxonomie, le diagnostic et la clinique, les chimiorésistances, la génétique et la biologie cellulaire.

Le Département est associé à une Unité mixte de recherche labellisée CNRS depuis 1997. Longtemps UMR propre (5093 CNRS), il est aujourd'hui affilié à l'UMR 5290 CNRS / 224 IRD / UM1 ("MiVEGEC" ou "Maladies infectieuses et Vecteurs : écologie, génétique, évolution, contrôle") : http://www.mivegec.ird.fr/fr/ . Il comporte deux équipes dédiées entre autres à la recherche sur les *Leishmania* et les leishmanioses : "BioGEPPE", dirigée par P. Bastien, et une partie de "GeneSys", dirigée par A.L. Banuls.

La Collection internationale de souches de *Leishmania* a également été démarrée au début des années 70 par le Pr J.A. Rioux. Cette longue tradition se perpétue sous la direction du Pr P. Bastien, élève des Prs. J.A. Rioux et J.P. Dedet. C'est ce dernier qui a demandé et obtenu la création du CNR-L en 1998. La constitution du CNR a impulsé une forte dynamique dans les activités de collecte et distribution de souches, ainsi que dans celles de typage biochimique puis moléculaire. La labellisation de la Collection de souches en tant que Centre de Ressources Biologiques par le GIS IBiSA dans les années 2000 a encore augmenté sa visibilité nationale et internationale, et s'est accompagnée d'une démarche Qualité visant à la certification selon la norme NF S96-900. De nombreuses collaborations nationales et internationales sont associées à cette Collection, sur les diverses thématiques mentionnées ci-dessus.

Le **Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie-Mycologie (LHUPM) du Centre Hospitalier de Cayenne** a également une longue expérience de recherche en matière de diagnostic et d'épidémiologie des leishmanioses : niveau d'endémie, facteurs d'exposition et de risque d'origine environnementale et selon les particularités des souches parasitaires incriminées. Associé à l'équipe de recherche de l'Université Guyane, EA 3593 (« Ecosystème amazonien et

pathologie tropicale), il s'intéresse également depuis ces dernières années à la sensibilité des souches à certaines molécules issues de la pharmacopée traditionnelles ou des extraits d'huiles essentielles, à la virulence des souches hébergeant des *Leishmania*-RNA-Virus, à l'étude de la prévalence des différentes espèces de *Leishmania* présentes dans les vecteurs sur différentes communes de Guyane (Cayenne, Cacao et Saint-Georges).et au typage de souches notamment avec l'outil de spectrométrie de masse (MALDI-TOF).

Ces projets de recherche se font dans le cadre de collaboration avec d'autres laboratoires ou des entreprises de Guyane ou de métropole (Institut Pasteur de Guyane, Guyarômes, MiVEGEC, EDB, …).

2.4. Capacités techniques actuelles du laboratoire candidat dans le domaine spécifique 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 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).

2.4.1. 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.

2.4.2. 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 biopsiques, 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 [12]. 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

[12] Simon et coll., *Leishmania* species identification by PCR-RFLP analysis and its applications in French Guiana. *Diag. Microbiol. Infect. Dis*. 2010

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).

2.4.3. Identification biochimique (iso-enzymatique)

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

Elle reste la technique de référence en épidémiologie et continue à être demandée par plusieurs équipes en France ou ailleurs dans le monde.

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).

2.4.4. 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).

2.4.5. 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 [13]. Ce logiciel a 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 référencée 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 . 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.

[13] 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.

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.

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.

2.4.6. 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.

3. BILAN D'ACTIVITE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE (2011-2015)

3.1. Résumé du bilan d'activités 2011-2015

Au cours de cette période, le CNR-L a connu une certaine stabilité par rapport à la période quinquennale précédente en matière de structure et d'infrastructure.

Le L-A de Cayenne a connu davantage de changements. Le Pr Bernard Carme qui avait participé à l'intégration du LHUPM au CNR en tant que L-A a fait valoir ses droits à la retraite en 2013. Le Pr Pierre Couppié l'a remplacé dans ces fonctions au L-A fin 2013. Globalement, l'infrastructure du L-A reste inchangée.

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

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

L'offre d'**expertise diagnostique** s'est intensifiée. Ainsi, le nombre de demandes de diagnostics moléculaires a globalement augmenté par rapport au quinquennal précédent. A Montpellier, il a régulièrement augmenté sur la période 2011-2015 : environ 500 demandes par an, provenant de plus de 120 établissements de santé sur le territoire national.

Le L-A de Cayenne a aussi une forte activité d'expertise diagnostique, et l'activité n'a eu de cesse d'augmenter avec des demandes croissantes de la part des correspondants, notamment dans les CDPS (centres de santé périphériques).

Une telle expertise constitue une base intéressante pour promouvoir une réelle capacité de surveillance et d'alerte.

La **Collection de souches** de *Leishmania* a fait l'objet de nombreux travaux de "curage" visant à améliorer la qualité des données associées aux souches. Quatre cent cinquante-six (**456) souches de *Leishmania* ont été isolées ou reçues**, ce qui constitue une nette diminution par rapport au quinquennal précédent; celle –ci est discutée au § 3.2.7. Les hôpitaux, centres de soins ou instituts de recherche français constituent aujourd'hui la majorité (61%) des donneurs de souches. Les zones de contamination comprennent 31 pays, sur 4 continents.

Sur la même période, **648 souches de *Leishmania* de la Collection ont été distribuées** à des centres ou équipes de recherche, pour 50 % en France, et 50% à l'étranger.

L'activité d'i**dentification de souches** a continué d'être très importante : 498 souches ou échantillons ont fait l'objet d'un typage moléculaires ; les identifications biochimiques (technique de référence pour l'O.M.S.) bien que réservées à des projets précis en épidémiologie, ont concerné 66 % des souches reçues au CNR.

2°) Les activités de surveillance continuent de constituer une grosse activité du CNRL. Le recensement des cas s'est poursuivi pendant la période 2011-2015, avec un nombre de cas déclarés en constante augmentation. Au total, entre 2011 et 2015, **1610 fiches de déclaration de cas** ont été reçues, dont 119 cas de leishmaniose viscérale, 1484 cas de leishmaniose cutanée et 7 de leishmaniose muqueuse. Les déclarations sont parvenues de 31 CHU, 24 CHG, 7 Hôpitaux des Armées, et 8 autres structures de santé. Le nombre de cas déclarés avec contamination **en Guyane** est en nette augmentation par rapport au quinquennal précédent, avec une moyenne annuelle de 208 cas par an pour les 5 années passées.

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

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

Par ailleurs, le CNR-L a mis en place depuis 2007 des tests de **chimiosensibilité** des *Leishmania* aux anti-leishmaniens de première ligne que sont l'amphotéricine B et les dérivés

antimoniés. Ces tests demeurent rarement pratiqués du fait de la difficulté d'interprétation des CMI en l'absence de valeurs seuils consensus.

Enfin, la **collaboration avec les structures de santé animale** a été fructueuse, avec l'étude de plusieurs foyers "ectopiques" de leishmaniose canine, situés hors zone d'endémie, et la démonstration de l'importance des voies de transmission non conventionnelles (vénérienne et trans-placentaire) dans ces foyers.

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). Au total, 161 conseils thérapeutiques ont été donnés dans ce cadre. Une refonte importante du **site Internet du CNR** a eu lieu, de façon à mieux individualiser 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. Un **workshop de formation** d'une semaine sur le diagnostic moléculaire a été organisé en 2012, à la demande du Dr Jorge Alvar (Medical Officer) du Service Leishmaniasis Control, Neglected Tropical Diseases (HTM/NTD/IDM) de l'O.M.S., par les Drs Laurence Lachaud et Christophe Ravel.

4°) La démarche Qualité a connu un fort développement : (i) d'une part dans le Département, en phase avec la démarche d'accréditation des laboratoires de biologie médicale (certification ISO 15189), pour laquelle 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; (ii) d'autre part, pour ce qui concerne le CNR-L proprement dit, une démarche en vue d'une certification de la collection de *Leishmania* selon la norme NF S96-900, avec l'adjonction et l'aide d'un ingénieur Qualité du CRB du CHU de Montpellier.

5°) Enfin, le CNR-L a participé à de nombreux projets de recherche, en collaboration avec les équipes du Laboratoire ou d'autres équipes françaises ou étrangères.

6°) L'ensemble des activités du CNR-L et des travaux de recherche directement associés a fait l'objet de publications et de communications à congrès : 54 publications dans des revues internationales à comité de lecture, et 29 présentations orales ou affichées dans des congrès et réunions scientifiques, nationaux ou internationaux (période 2011-2015).

3.2. Activités d'expertise 2011-2015

3.2.1. 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 : De **2011 à 2015**, 2177 diagnostics moléculaires ont été réalisés et le nombre de demandes a régulièrement augmenté sur la période, surtout depuis 2014. Cette augmentation régulière est sans doute en partie due à la très bonne efficacité diagnostique des techniques moléculaires en regard des autres techniques de mise en évidence directe du parasite. Mais la perspective de l'Accréditation obligatoire des analyses biologiques en 2016 a sans doute aussi incité des Laboratoires hors zones d'endémie à se tourner vers le CNR-L pour le diagnostic de leishmaniose. Environ 120 Centres (hors CHU Montpellier) en France envoient des échantillons pour diagnostic, incluant les DROM et les Services de Santé des Armées (différentes régions d'opération des contingents militaires).

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).

En 2015 : 494 échantillons pour diagnostic moléculaire de leishmaniose ont été analysés. Les demandes provenaient du CHRU de Montpellier (27 %) mais également de nombreux Centres hospitaliers français (CH ou CHU). 16 % des prélèvements se sont avérés positifs, dont environ 60% pour des formes cutanées.

Au L-A de Cayenne : sur la période de 2011 à 2015, le nombre de demandes de diagnostics a augmenté d'un facteur 4 (215, 215, 409, 669 et 809 par an, respectivement), aboutissant à une augmentation des déclarations de cas d'un facteur proche de 2. Cette augmentation de l'activité a pu résulter de la sensibilisation faite auprès du réseau des prescripteurs sur la thématique (diffusion de procédures, amélioration du circuit des prélèvements et du rendu des résultats). Si on considère l'ensemble des cas positifs (Tableau ci-dessous), le taux d'identification est à peu près stable : on relève que comme en 2013, un certain nombre de diagnostics ont été réalisés sur frottis seul (27 contre 44 en 2013 et 11 en 2012), sans envoi de biopsies pour culture ou PCR.

	2006	**2007**	**2008**	**2009**	**2010**	**2011**	**2012**	**2013**	**2014**	**2015**
Nb de cas toutes techniques confondues	96	129	114	119	160	119	142	140	249	358

Toujours à Cayenne, en 2015, 809 demandes de diagnostic de leishmaniose ont été enregistrées. Les demandes correspondent à 303 patients et ont concerné essentiellement le diagnostic des leishmanioses cutanées et cutanéo-muqueuses (801 demandes) avec 244 recherches sur frottis, 255 recherches sur culture et 302 recherches par Biologie moléculaire. Ces demandes étaient issues du CH de Cayenne (114 demandes), de Saint-Laurent-du-Maroni (45 demandes), du Centre de service des Armées (CMIA) (12 demandes), des centres et postes de santé disséminés (176 demandes) sur le territoire guyanais.

Le seul examen direct n'aurait dépisté que 152 cas, soit 61 % des 249 positifs (sensibilité stable par rapport à 2013), contre 93% pour le diagnostic moléculaire; ce dernier a connu une nette amélioration par rapport à la sensibilité de celle de 2013, qui était de 61,4%.

La PCR-RFLP a été réalisée de la manière suivante : PCR-RFLP initiale (directement sur biopsie) : 156 ; PCR-RFLP sur biopsie après échec de la culture : 91 ; PCR-RFLP sur culture : 57

- Diagnostic immunologique

De 2011 à 2015, 1186 sérologies leishmaniennes ont été réalisées à Montpellier.

En 2015, 218 sérologies leishmaniennes ont été réalisées. Ces chiffres montrent une stabilité par rapport aux années précédentes.

3.2.2. Identification moléculaire

3.2.4.1. Laboratoire coordonnateur

Le typage moléculaire est effectué en priorité (par rapport au typage iso-enzymatique) en routine depuis 2006.

Entre 2011 et 2015 : 498 identifications moléculaires (positives) ont été enregistrées et leur nombre s'est globalement maintenu (n=109, n=113, n=99, n=87, n=90). Les identifications ont été réalisées à partir de souches ou d'ADN, mais également directement à partir de divers types de prélèvements (biopsies, produits de grattage, sang, moelle osseuse).

A noter que ces statistiques n'incluent pas toutes les demandes de typage reçues par le L.-C. Comme dans tout typage à partir d'échantillons de prélèvements, environ 30% des typages ne peuvent être réalisés pour des raisons techniques (essentiellement trop peu d'ADN parasitaire présent).

Sur ces 498 identifications, douze espèces différentes de *Leishmania* ont été identifiées (*L. major, L. infantum, L. tropica et L. donovani* dans l'Ancien Monde, et *L. guyanensis, L. braziliensis, L. panamensis, L. martiniquensis, L. mexicana, L. naiffi, L. amazonensis et L. lainsoni* dans le Nouveau Monde). *L. major* (n=151; 30%) reste l'espèce la plus fréquente, en raison notamment du recrutement de patients exposés lors d'un séjour en Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie).

En 2015 : 124 demandes de typage moléculaire ont été reçues, dont 90 ont donné lieu à une identification. Au total 8 espèces de *Leishmania* ont été identifiées, avec toujours une prédominance de *L. major* (n= 36%). Les espèces impliquées pour 35 cas du Nouveau Monde ont été également identifiées, dont 23 *L. guyanensis*, neuf *L. braziliensis*, une *L. naiffi*, une *L. amazonensis*, et une *L. martiniquensis.*

3.2.4.2. Laboratoire-Associé de Cayenne

L'identification de l'espèce est réalisée en routine à Cayenne par PCR-RFLP depuis 2006. Depuis 2009, elle concerne la grande majorité des cas vus en Dermatologie à Cayenne (90% en 2015), alors que, pendant longtemps, cela n'était fait que pour une faible proportion car les prélèvements devaient être adressés en métropole.

Entre 2011 et 2015 : 712 identifications moléculaires (positives) ont été enregistrées au L-A (Tableau ci-dessous). L'espèce *L. guyanensis* reste majoritaire avec des fluctuations selon les

années. *L. braziliensis* se maintient à un niveau stable avec peut-être une tendance à l'augmentation.

Tableau 3. Répartition des différentes espèces de Leishmania isolées de 2006 à 2015 au L-A de Cayenne.

	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Total identifications	**45**	**82**	**80**	**93**	**144**	**96**	**104**	**92**	**222**	**198**
L. guyanensis (%)	84.4	85.5	81.2	88.2	94.4	85.4	78.8	83.7	92,2	67
L. braziliensis (%)	8.9	8.5	10	10.8	2.8	13.5	14.4	13	5	12.6
L. amazonensis (%)	2.2	4.9	6.2	1	1.4	0	5.8	2.2	2.3	5.5
L. lansoni (%)	4.4	1.2	2.5	0	1.1	1	1	1.1	0.4	2
L. naiffi (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05

La recherche systématique et le typage moléculaire doivent être proposés en particulier en raison de l'émergence de l'espèce *L. braziliensis*, ainsi que potentiellement de *L. infantum*, en Guyane.

En effet, ces données montrent que, si la majorité des cas de leishmanioses sont bénins et d'évolution favorable après traitement, il existe des motifs d'inquiétude :

1- l'émergence ou plus exactement la montée en puissance de *Leishmania (V.) braziliensis* avec ses localisations muqueuses potentiellement graves : la généralisation de l'identification des espèces sur place a confirmé que cette espèce est bien implantée (en moyenne 10 p. 100 des cas) avec des fluctuations annuelles, mais sans signe de progression pour la période 2011-2015.

2- la survenue de forme plus évolutive de leishmaniose cutanée chez le sujet VIH infecté par *L. guyanensis*, l'endémie à VIH étant particulièrement importante en Guyane.

3- l'implantation de la leishmaniose viscérale à *L. infantum* (anciennement *L. chagasi*) est redoutée, malgré l'absence (?) des vecteurs efficients néotropicaux connus.

3.2.3. 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").

De 2011 à 2015 : sur les 456 souches isolées ou reçues, 303 ont été identifiées (ou sont en cours d'identification) par électrophorèse des isoenzymes, et 153 n'ont pas fait l'objet d'un typage enzymatique. Les identifications enzymatiques sont indiquées dans le tableau 7.

Tableau 4. Détails des identifications enzymatiques de 303 souches réalisées de 2011 à 2015.

Ancien Monde (n= 264)		
Espèces	**Zymodèmes**	**Nombre**
L. infantum (n=113)	MON-1	83
	MON-24	3
	MON-29	1
	MON-30	1
	MON-33	3
	MON-80	7
	MON-98	4
	MON-281	7
	MON-319	4
L. donovani (n=6)	MON-3	1
	MON-18	1
	MON-37	2
	MON-73	1
	MON-277	1
L. archibaldi (n=2)	zymodème nouveau	2
L. aethiopica hybride (n=4)	MON-106	4
L. major (n=63)	MON-25	57
	MON-26	1
	MON-103	5
L. tropica (n=30)	zymodème nouveau	2
	MON-7	11
	MON-54	3
	MON-61	2
	MON-76	1
	MON-102	1
	MON-109	1
	MON-112	1
	MON-275	1
	MON-312	3
	MON-313	2
	MON-315	1
	MON-318	1
L. killicki (n=39)	MON-8	28
	MON-301	7
	MON-317	4
L. siamensis (n=3)	zymodème nouveau	3
Nouveau Monde (n= 39)		
Espèces	**Zymodèmes**	**Nombre**
L. braziliensis (n=26)	MON-43	3
	MON-44	2
	MON-45	1
	MON-129	8
	MON-140	1
	MON-158	7
	MON-204	1
	MON-205	1
	MON-218	1
	MON-221	1

L. panamensis (n=2)	MON-47	1
	MON-100	1
L. amazonensis (n=2)	MON-132	1
	MON-321	1
L. mexicana (n=5)	MON-156	1
	zymodème nouveau	4
L. lainsoni (n=4)	MON-320	1
	MON-326	1
	zymodème nouveau	2

En 2015, une étude taxonomique des souches de Leishmanies rares (exemple : *Leishmania herreri, L. deanei, L. tarentolae*, …) par électrophorèse des isoenzymes, en interne au sein de notre collection, a été débutée. Cette étude devrait se prolonger en 2016.

3.2.4. 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.

La sensibilité des souches de *L. infantum* aux drogues antileishmaniennes de première ligne que sont l'amphotéricine B et les dérivés antimoniés a été étudiée selon trois systèmes in vitro détaillés au § 2.4.6. En 2008, a été entreprise l'étude in vitro de la sensibilité des souches de *Leishmania* aux dérivés antimoniés SbIII et SbV, avec un système promastigote/milieu axénique et un système amastigotes/macrophages de souris en collaboration avec l'équipe du Prof. Louis Maes (University of Antwerp, Laboratory of Microbiology, Parasitology and Hygiene (LMPH), Faculty of Pharmaceutical, Biomedical and Veterinary Sciences, Antwerp).

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 résistance n'a été mise en évidence parmi les rares demandes. Ceci est à mettre en corrélation avec l'absence de résistance connue à l'amphotéricine B, drogue utilisée en première intention en France.

3.2.5. Réception de souches de *Leishmania*

● **Origine des souches selon le centre de soins**

De 2011 à 2015 : 456 **souches** de *Leishmania* ont été isolées ou reçues, dont :

- 280 (62%) d'hôpitaux, centres de soins ou instituts de recherche français, et
- 176 (38%) de centres de soins ou de recherche à l'étranger.

Le détail de l'origine des souches par centre d'isolement figure sur le tableau 5. Toutes les souches ont été congelées en azote liquide et sont conservées dans la Cryobanque de *Leishmania*.

En 2015, 33 souches de *Leishmania* ont été isolées ou reçues, dont 22 d'hôpitaux, centres de soins ou instituts de recherche français, et 11 de centres de soins ou de recherche à l'étranger. Le détail de l'origine des souches par centre d'isolement en 2015 figure sur le tableau 6.

A noter que la quasi absence d'envoi de souches par le Laboratoire de Cayenne depuis 2009 a accentué la diminution du nombre de souches reçues (cf. § 3.2.9).

Tableau 5. Origine selon le centre de soins, des 456 souches de Leishmania traitées par le CNRL de 2011 à 2015.

France (280 souches)				**Etranger (176 souches)**		
Etablissements	**Nb**	**Etablissements**	**Nb**	**Pays**	**Etablissements**	**Nb**
AP – HP Avicenne	8	CHU Nice	62	ALGÉRIE	Institut Pasteur d'Alger - Alger	4
AP – HP Bichat	15	CHU Nîmes	5	COLOMBIE	Centro Dermatologico Federico Lleras Acosta – **Bogota**	7
AP – HP Cochin	12	CHU Reims	1	DANEMARK	Dpt of Infectious Diseases Q, Aarhus University – **Aarhus**	2
AP – HP La Pitié Salpêtrière	38	CHU Rennes	25	ESPAGNE	Departamento de parasitologia, Facultat de Farmacia - **Granada**	5
AP – HP Saint Antoine	2	CH Roubaix	1	GRECE	Parasitology Hellenic Pasteur Institute **-Athènes**	2
AP – HP Saint Louis	6	CHU Rouen	5		Faculté de Médecine, Université de Crète - **Héraklion**	6
Agence Nationale de Sécurité Sanitaire – Maisons Alfort	8	CHU Strasbourg	4	ISRAEL	Department of Parasitology, Hadassah Medical School – **Jerusalem**	6
CHU Cayenne	29	Faculté de Pharmacie de Lyon	6	ITALIE	Laboratorio Centrale de Parasitologia Fondazione IRCCS - **Milan**	3
CHU Croix Rousse - Lyon	5	Laboratoire Vétérinaire de Nlle Calédonie - Paita	1	PORTUGAL	Universidade Nove de Lisboa-Medicina Tropical – **Lisbonne**	14
CH Limoges	1	HIA Bégin – St Mandé	3	ROYAUME UNI	Liverpool School of Tropical Medicine ; Pembroke Place - **Liverpool**	6
CHU Grenoble	3	HIA Desgenettes	1	TUNISIE	Faculté de Monastir – **Monastir**	16
CH Mantes-La-Jolie	1	HIA LAVERAN	18		Institut Pasteur de Tunis – **Tunis**	63
CHU Marseille	3	HIA Legouest – Metz Armées	6	TURQUIE	Department of Parasitology, Faculty of Medicine - Ege University - **Bornova**	42
CHU Montpellier	10	ZOO Montpellier	1			

Tableau 6. Origine, selon le centre de soins, des 33 souches de Leishmania traitées par le CNRL en 2015.

France (22 souches)				**Etranger (11 souches)**		
Etablissements	**Nb**	**Etablissements**	**Nb**	**Pays**	**Etablissements**	**Nb**
AP-HP LA PITIE SALPETRIERE	7	HIA LEGOUEST	1	TUNISIE	Institut Pasteur de Tunis	11
CHU NICE	9	HIA LAVERAN	1			
CHU NIMES	1					
CHU RENNES	1					
CH LIMOGES	1					
CHU LYON	1					

- **<u>Origine géographique des souches par pays de contamination</u>**.

  - **<u>De 2011 à 2015</u> :** le tableau 7 montre l'origine géographique des souches par pays où la contamination a eu lieu : les souches ont été reçues d'au moins 31 pays ou territoires différents, dont 6 pays d'Europe, 8 pays d'Afrique, 9 pays d'Amérique et 8 pays d'Asie. A noter que le plus grand nombre de souches a été isolé de pays du Maghreb.

Tableau 7. Origine géographique, par pays de contamination, des 456 souches traitées par le CNRL de 2011 à 2015.

Continents	**Pays**	**Nb**	**Continents**	**Pays**	**Nb**
Afrique (n = 176)	Algérie	16	**Asie (n = 67)**	Israël	4
	Burkina Faso	1		Iran	2
	Mali	4		Jordanie	4
	Mauritanie	2		Palestine	1
	Maroc	22		Syrie	1
	Sénégal	9		Thaïlande	6
	Soudan	2		Turkménistan	2
	Tunisie	117		Turquie	45
	Afrique (Origine imprécise)	3		Asie (origine imprécise)	2
Amérique (n = 114)	Bolivie	5	**Europe (n = 73)**	Danemark	1
	Brésil	4		Espagne	8
	Colombie	7		France	39
	Costa Rica	3		Géorgie	1
	Equateur	1		Grèce	6
	Guadeloupe	1		Portugal	15
	Guyane française	82		Europe du Sud (origine imprécise)	3
	Panama	1			
	Pérou	6			
	Amérique du sud (Origine imprécise)	4			
Origine géographique inconnue		26			

<u>En 2015</u>, l'origine géographique des souches par pays où la contamination des cas a eu lieu figure sur le tableau 8 : les souches ont été obtenues de 5 pays différents, dont 2 pays d'Afrique et 2 pays d'Amérique.

Tableau 8. Origine géographique, par pays de contamination, des 33 souches traitées par le CNRL en 2015

Continents	**Pays**	**Nb**	**Continents**	**Pays**	**Nb**
Afrique (n = 20)	Maroc	8	Amérique (n = 8)	Guyane française	5
	Tunisie	12		Pérou	3
Origine géographique inconnue		1	Europe (n = 4)	France	4

En Guyane, pour l'année 2015, **165 souches de *Leishmania* ont été isolées**, dont 54,5% provenant des hôpitaux de Cayenne et de Saint-Laurent-Du-Maroni (51% en 2014), 41,2% des Centres de soins ou Postes de Santé (CDPS) (19,3% en 2014), et 4,2% du centre Médical du service des Armées (CMIA) (27% en 2014). Le Centre de Maripasoula situé sur le Maroni représente 63% des prescripteurs des CDPS.

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

Tableau 9. Origine selon le centre de soins, des 167 souches de Leishmania traitées par le L-A à Cayenne en 2015.

	Hôpitaux (SLM+CHAR)	Armée (CMIA)	Centre /Postes de santé (CDPS)	Total
Nombre de leishmania identifiées en 2015	90 (54,5%)	7 (4,2%)	68 (41,2,%)	165
Nombre de leishmania identifiées en 2014	53 (51%)	27 (26%)	20 (19,3%)	104

On note donc une forte croissance du nombre de demandes venant des CDPS de la Guyane avec une bonne rentabilité du diagnostic, le taux d'identification par PCR-RFLP provenant des prélèvements des CDPS passe de 19,3% à 41,2%.

3.2.6. Distribution de souches de *Leishmania*

<u>De 2011 à 2015</u> : 648 souches de *Leishmania* issues de la collection du CNRL ont été distribuées :

- **<u>En France, 327 souches ont été fournies</u>** :

- 213 souches au CHRU de La Timone à Marseille,
- 62 souches à l'UM MiVEGEC (CNRS 5290 / IRD 224),
- 12 souches à l'Hôpital Avicenne de Bobigny,
- 8 souches à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086 CNRS, Université de Lyon,
- 7 souches à l'Institut de Parasitologie et de Mycologie Médicale de Lyon,
- 6 souches à la Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud 11,
- 4 souches au Laboratoire de Santé Animale de Maisons Alfort,
- 2 souches au CHRU de Montpellier,

- 2 souches au Centre IRD de Montpellier,
- 2 souches au Centre François Jacob de Paris,
- 2 souches à l'UFR des Sciences de Marseille Luminy,
- 1 souche à l'Institut Pasteur Research Consulting à Noisy Le Grand,
- 1 souche à l'Hôpital de Fort-de-France,
- 1 souche au Service de Parasitologie-Mycologie de Rennes,
- 2 souches à la Faculté de Médecine de Marseille.

➢ **A l'étranger, 321 souches ont été fournies** :

- 133 souches à l'Université de Lausanne – Suisse,
- 63 souches au Center of Diseases Control d'Atlanta – Etats Unis,
- 19 souches à l'Université de Bergen – Norvège,
- 18 souches à UK NEQAS, Northern General Hospital of Sheffield – Royaume Uni,
- 17 souches au Kuvin Centre for Study of Infectious and Tropical Diseases Jerusalem – Israël,
- 14 souches au National Reference Centre for Parasitology de Montréal – Canada,
- 10 souches à l'University of Saint Louis – Saint Louis, Etats-Unis.
- 10 souches à l'Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisbonne – Portugal,
- 8 souches à Lancaster University – Lancaster – Royaume Uni,
- 6 souches à la Faculdad de Medicina de La Paz – Bolivie,
- 6 souches à la Faculté des Sciences de Prague – République Tchèque,
- 4 souches au Smittskyddinstituet de Solna – Suède,
- 4 souches à l'American University of Beirut, Beyrouth – Liban,
- 3 souches à l'Université d'Anvers – Belgique,
- 2 souches au TvL-Lab, Medical Microbiology and Hygiene, de Ulm – Allemagne,
- 2 souches à l'Université de Ténérife – Espagne,
- 1 souche à la Faculty of Medical Sciences, University of Sri Jayewardenapura - Sri Lanka,
- 1 souche à la société Hippro, Girona – Espagne.

En 2015, 25 souches de *Leishmania* ont été fournies à divers laboratoires et institutions en France et à l'étranger, dont la liste figure ci-dessous :

➢ En France et territoires d'outre-mer, 2 souches ont été fournies :

- 2 souches à la Faculté de Médecine de Marseille.

➢ A l'étranger, 23 souches ont été fournies :

- 3 souches à l'Universty of Antwerp – Belgique,
- 6 souches à la Faculdad de Medicina de La Paz – Bolivie,
- 4 souches à l'American University of Beirut, Beyrouth – Liban,
- 10 souches à l'University of Saint Louis – Saint Louis, Etats-Unis.

3.2.7. 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 apparaitre certains groupes ou catégories de souches et rendre ainsi plus accessible la Collection en fonction de ce que souhaitent les chercheurs.

Le curateur de la cryobanque (Dr Francine Pratlong), connaissant et pratiquant cette collection depuis sa création, a entrepris entre 2013 et 2015 un travail rétrospectif avec l'aide de Loïc Talignani (TL) et Yves Balard (AI), dans le but d'identifier certaines souches particulières selon des critères précis et habituellement non renseignés.

- Sur les 6600 souches de la collection, un **enrichissement progressif du catalogue** des souches en ligne sur le site Internet du Laboratoire a été réalisé à partir de la collection avec, avant mise sur le site, un contrôle rigoureux de tous les renseignements relatifs à ces souches. Ceci porte à 565 le nombre actuel de souches sur le catalogue.

- **Enrichissement des données** associées aux souches à partir de travaux réalisés avec des souches de la collection (travaux de thèse ou articles scientifiques), comme par exemple:
  - la sensibilité du parasite aux anti-leishmaniens,
  - la virulence et l'infectivité des souches,
  - la ré-emergence de foyers de leishmaniose dans le Bassin Méditerranéen,
  - la découverte d'un nouveau réservoir de leishmaniose.

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, et constitue une valorisation importante des souches de la Collection.

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

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

3.2.8. Bilan résumé de l'activité d'expertise; évolution des tendances

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

Le nombre de demandes de **diagnostics moléculaires** à Montpellier a augmenté 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 analyses biologiques. Il avait déjà augmenté au cours du quinquennal précédent. Il en est de même au LHUPM à Cayenne où le nombre de demandes de diagnostics a été multiplié par 4.

En ce qui concerne **l'identification de souches**, le typage moléculaire est privilégié : il a augmenté de façon régulière, passant de 83 en 2011 à 148 en 2015. Le typage biochimique par les isoenzymes, technique de référence en taxonomie, a été réservé à certains taxons (*L. infantum*, *L. major*) ou à des travaux de recherche précis en épidémiologie. Le nombre d'identifications biochimiques a diminué de façon régulière : de 200 en 2011 à 144 en 2015, et par rapport au quinquennal précédent (303 *versus* 446). Il a concerné encore 66% des souches reçues, mais ce nombre ne peut que diminuer à l'avenir, cette méthode de typage étant progressivement remplacée par les techniques moléculaires, adaptables dans de nombreux centres de recherche ou de diagnostic.

L'activité du typage moléculaire au L-A de Cayenne a également augmenté, en particulier en 2014-2015 où il s'établissait à environ 200 identifications positives par an.

Le nombre annuel de **souches reçues** au CNR-L a baissé au cours des dernières années. Entre 1998 et 2010, les nombres annuels de souches reçues se situaient aux environs de 190 par an, avec des fluctuations annuelles assez faibles. Depuis 2012, ce nombre a diminué progressivement (456 souches reçues versus 933 dans le quinquennal précédent) (Figure 1). Cette évolution a concerné davantage les centres étrangers que les centres français, si bien que les souches provenant de centres français constituent aujourd'hui 61% des souches reçues, *versus* 40% lors du dernier quinquennal.

Il s'agit d'une tendance de fond; et nous interprétons cette baisse comme la conséquence de plusieurs facteurs :

(i) En France métropolitaine : les centres hospitaliers ont moins d'intérêt à isoler des souches en culture, étant donné la plus grande facilité et surtout la supériorité diagnostique du diagnostic moléculaire (280 souches *versus* 379 lors du quinquennal précédent). Le diagnostic moléculaire se généralise, en remplacement des techniques de diagnostic classiques, rendant non nécessaire l'isolement de souches; ce dernier constitue donc de plus en plus un geste de "bénévolat" en faveur de la recherche future sur les leishmanioses, pratique peu favorisée par les politiques de restriction budgétaire actuelles. L'isolement de souches nécessite en effet des milieux spéciaux, du personnel entraîné et du temps. Il est de plus difficile à accréditer pour un laboratoire de biologie médicale.

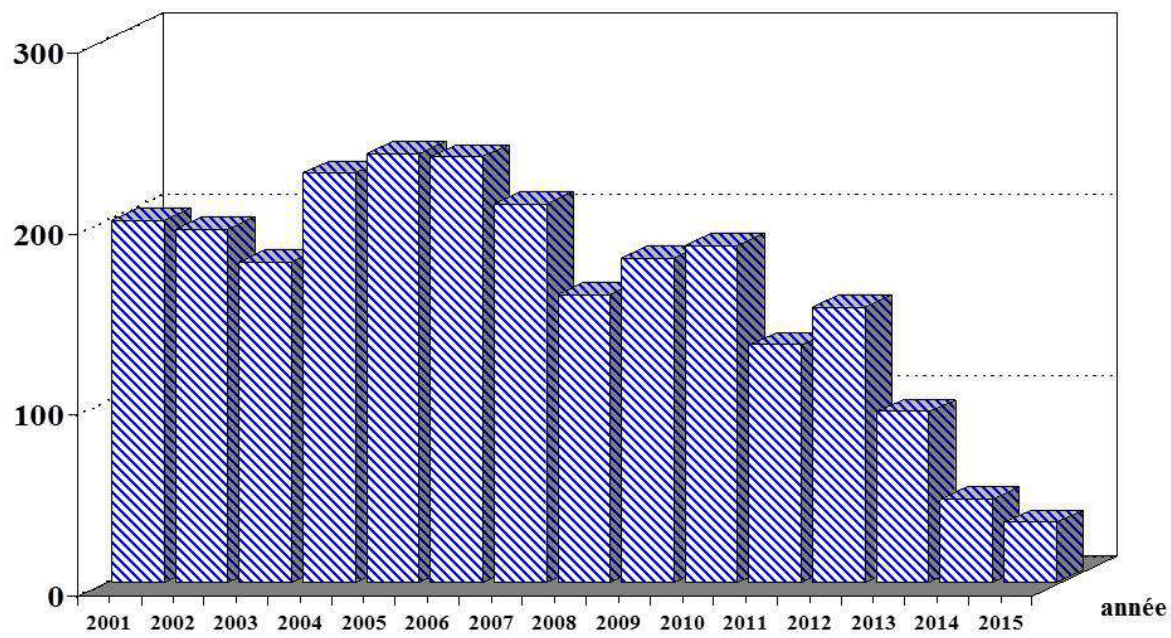
(ii) A l'étranger : le recours au typage enzymatique, source essentielle d'envoi des souches, a fortement diminué; les campagnes épidémiologiques ont là aussi fortement recours à la biologie moléculaire, que ce soit pour le diagnostic ou le typage, ce qui réduit fortement la nécessité de l'isolement des souches (même si les interprétations qui peuvent en être tirées ne sont pas forcément aussi fiables). Par ailleurs, on constate une augmentation de l'autonomie des centres étrangers dans leurs capacités de stockage des souches, rendant moins indispensable le recours à notre Centre de Ressources Biologiques.

(iii) Une troisième cause de diminution est la fin de plusieurs projets de collaboration, en particulier avec des pays du pourtour méditerranéen (incluant la France).

(iv) Enfin, il est important de noter qu'une part de la diminution de la réception de souches est également liée à l'arrêt presque complet d'envois de souches par le Laboratoire-Associé de Cayenne depuis 2009. Cette situation s'est normalisée en 2016, avec déjà 82 souches reçues de Guyane au cours du 1er semestre.

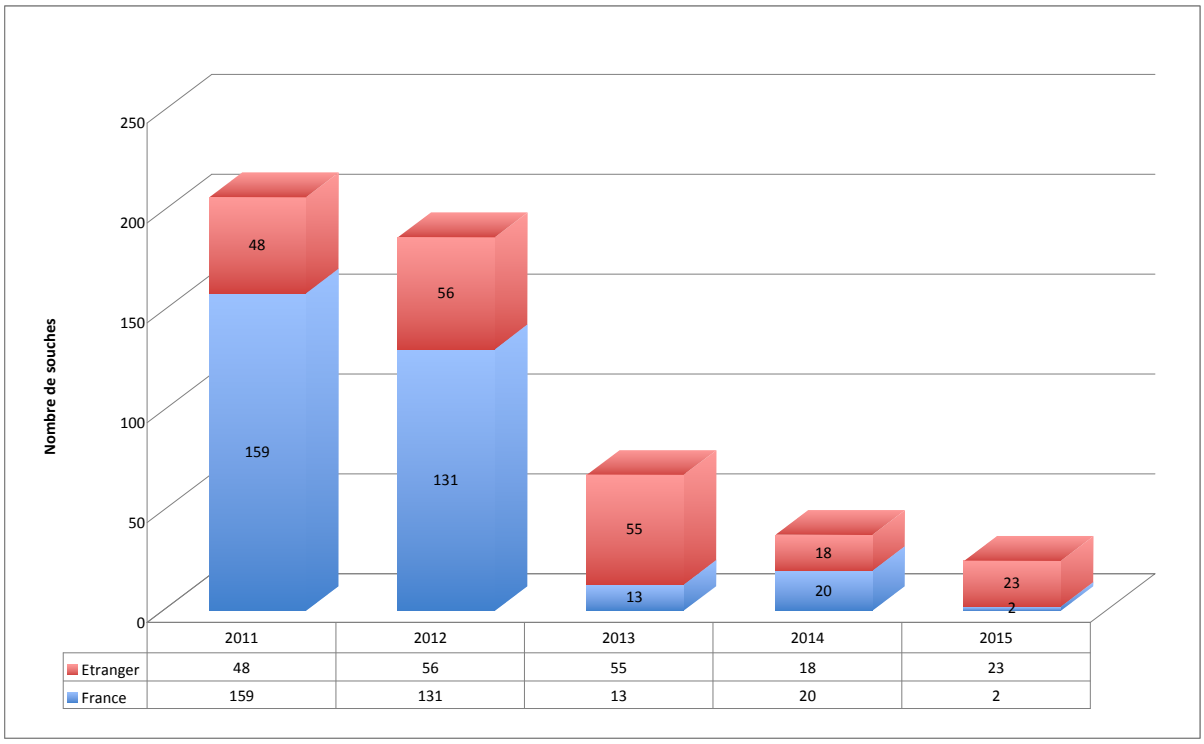
En effet, à l'inverse de la métropole, le nombre de souches isolées en Guyane Française a considérablement augmenté en doublé en 2014 et 2015.

Figure 1. Nombre de souches stockées annuellement au Laboratoire coordonnateur de Montpellier entre 2011 et 2015.



N.B. L'inclusion des souches isolées par le L-A de Cayenne depuis 2010 mais non envoyées à Montpellier devrait maintenir le nombre de souches à plus de 100-150 par an.

Figure 2. Nombre de souches distribuées par an par le CNR-L entre 2011 et 2015.



	2011	2012	2013	2014	2015
Etranger	48	56	55	18	23
France	159	131	13	20	2

Pour ce qui concerne l'**origine des contaminations**, au cours de cette période, de façon en partie conjoncturelle (par rapport à la Guyane), le plus grand nombre de souches provenait de pays du Maghreb; la part relative de cette origine a peu changé (34% *versus* 28%) mais devrait avoir diminué par rapport à la Guyane. A l'inverse, de façon frappante, la part de contaminations d'origine européenne a considérablement diminué (16% *versus* 42%).

Le nombre de **souches distribuées** a fortement diminué sur la période. Le chiffre global reste important (Figure 2) : 648 souches ont été distribuées au cours de cette période, *versus* 1139 au cours du quinquennal précédent. Le nombre de souches mises à disposition d'équipes étrangères a diminué seulement de moitié, et a même augmenté par rapport au quinquennal précédent. Cependant, le nombre de souches fournies à des équipes françaises s'est effondré en 2014-2015. Ceci s'explique par la conclusion en 2013 de travaux de thèse portant sur les leishmanioses et réalisés en France. Le nombre d'équipes françaises demandeuses, lui, est resté stable, alors que celui d'équipes demandeuses étrangères a diminué (18 au lieu de 26).

Ces données témoignent toujours de l’intérêt de la Collection pour les équipes nationales et internationales. De plus en plus, ces équipes recherchent des souches parfaitement caractérisées, conservées dans des conditions de rigueur maximales, avec des renseignements associés le plus complets possibles. De même, en ce qui concerne leurs propres isolats, elles sont intéressées par les conditions de conservation rigoureuses et sûres de la Collection du CNR-L. La certification en cours constitue également un avantage par rapport aux nombreuses autres collections de Leishmanies de par le monde, peut-être plus faciles d'accès mais moins formalisées.

3.3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE et D'ALERTE

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. Un modèle de cette nouvelle version est fourni en Annexe.*

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.

3.3.1. Surveillance des leishmanioses humaines

Au total, **entre 2011 et 2015,** 1610 fiches de déclaration de cas ont été reçues, dont 1484 cas de leishmaniose cutanée, 119 cas de leishmaniose viscérale et 7 cas de leishmaniose muqueuse. Ce chiffre est en augmentation de 37% par rapport au quinquennal précédent (1178 cas). Entre 2011 et 2015, le nombre de cas déclarés a également montré une légère augmentation, celle-ci étant surtout liée aux contaminations originaires de Guyane.

3.3.1.1. Réseaux de partenaires

*** Centre coordonnateur (Montpellier) :**

La liste des Services ayant déclaré au CNR-L des cas de leishmanioses **entre 2011 et 2015** figure ci-dessous.

Pour les CHU : les Laboratoires de Parasitologie-Mycologie des CHU suivants : Amiens, (80), Angers (49), Besançon (25), Bordeaux (33), Brest (29), Caen (14), Clermont Ferrand (63), Dijon (21), Fort-de-France (972), Grenoble (38), Lille (59), Limoges (87), Lyon (69), Marseille (13), Montpellier (34), Nancy (54), Nantes (44), Nice (06), Nîmes (30), Poitiers (86), Reims (51), Rennes (35), Rouen (76), St-Etienne (42), Tours (37), divers établissements de l'AP-HP à Paris (75) (Bichat, Cochin-St Vincent de Paul, Claude Bernard, Hôtel-Dieu, St-Antoine, St-Louis, Pitié-Salpêtrière). Avicenne à Bobigny (93), Créteil (94), Fort-de-France (971).

[**En 2015 pour les CHU :** les Laboratoires de Parasitologie-Mycologie des CHU suivants : Amiens (80), Angers (49), Fort-de-France (972), Grenoble (38), Lyon (69), Marseille (13), Montpellier (34), Nancy (56), Nantes (44), Nice (06), Nîmes (30), Reims (51), Rennes (35),

Rouen (76), et divers établissements de l'AP-HP à Paris (75) (Bichat, Cochin-St Vincent de Paul, St Louis, La Pitié-Salpêtrière).]

Pour les CHG : CH Alès (30), CH Angoulême (16), CH Annecy (74), CH Arles (13), CH Avignon (84), CH Bagnols (30), CH Cahors (46), CH Le Mans (72), CH Le Havre (76),CH Lons-le-Saunier (39), CH Le Mans (72), CH Niort (79), CH Pau (64), Service des Maladies infectieuses et tropicales du CH de Perpignan (66), CH Roanne (42), CH Toulon (83), CHD de Tourcoing (59), Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHG de Cayenne (973)

[**En 2015 pour les CH et CHG :** CH Annecy (74), CH Niort (79), CH Perpignan (66), CH Roubaix/Tourcoing (59), CHG de Cayenne (973)].

Pour les Hôpitaux d'Instruction des Armées : HIA Laveran à Marseille (13), HIA Clermont Tonnerre à Brest (29), HIA Robert Piquet à Bordeaux (33), HIA Legouest à Metz (57), HIA Bégin à Saint Mandé (94) et HIA Desgenettes à Lyon (69), HIA Sainte Anne Toulon (83).

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

[En 2015 : Pour les Hôpitaux d'Instruction des Armées : HIA Laveran à Marseille (13) ; HIA Bégin à Saint Mandé (94)), HIA Legouest Metz (54), HIA Sainte Anne Toulon (83)

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

*** 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).

Afin de compléter certains examens non prévus dans le bilan initial, une procédure d'information et de recueil généralisé de la "non-opposition" des patients consultants ou hospitalisés (cf. changement d'utilisation diagnostic - recherche) a été mise en place (CIC-EC). Cette information retranscrite dans les dossiers patients des laboratoires de l'hôpital est disponible à tout moment.

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.

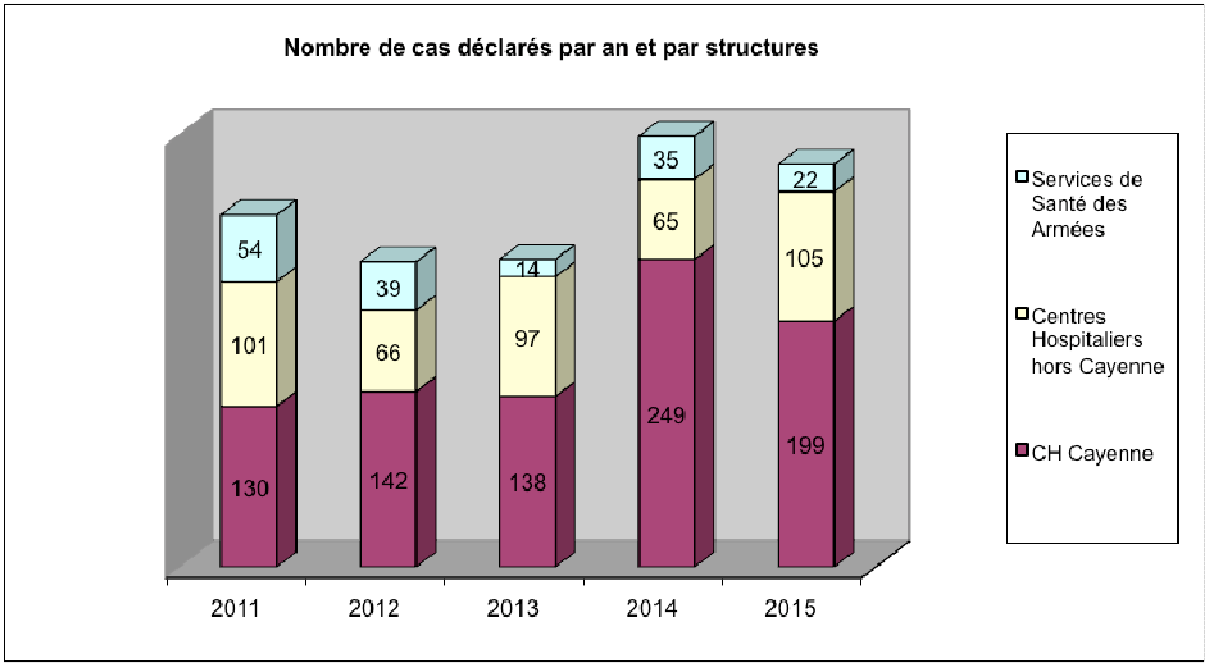
3.3.1.2. Déclaration de cas

Globalement, **entre 2011 et 2015**, 1610 fiches de déclaration de cas ont été reçues au CNR-L, dont 1484 cas de leishmaniose cutanée (LC), 119 cas de leishmaniose viscérale (LV), et 7 de leishmaniose muqueuse (LM).

Pour ce qui concerne les **déclarants**, 1012 ont été déclarés par le laboratoire collaborateur du CNR-L à Cayenne, 435 cas par des structures de santé de France métropolitaine, le CHU de St-Denis de la Réunion et le CHU de Fort-de France, et enfin 163 par les Services de Santé des Armées ou Hôpitaux d'Instruction des Armées.

L'**évolution** du nombre de cas déclarés par les différentes structures au cours des 5 années passées est schématisée dans la figure ci-dessous (Figure 3)

Figure 3. Nombre de cas humains déclarés au CNR-L de 2011 à 2015 par an selon les structures déclarantes



En 2015, **326 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), de La Martinique (1 cas) et des Services de Santé des armées (22 cas); le L-A de Cayenne a déclaré 199 cas de LC diagnostiqués en Guyane Française.

La répartition de ces cas pour l'année 2015 se fait de la façon suivante toutes structures confondues :

- 22 cas de leishmanioses viscérales, dont 8 cas d'autochtones et 2 où la contamination était possible en France ou dans un autre pays, 2 dont l'origine était indéterminée, 12 où la contamination avait eu lieu hors de France et un cas exceptionnel de transmission materno-foetale.
- 304 cas de leishmanioses cutanées,
- 0 cas de leishmaniose cutanéo-muqueuse.

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.

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

3.3.1.3.1. France métropolitaine

Leishmanioses autochtones/importées : sur la période 2011-2015, le nombre de cas de leishmanioses autochtones est stable avec 91 cas (62 LV, 25 LC et 4 LM) *versus* 98 cas sur le quinquennal précédent. Par contre, le nombre de cas importés (492, dont 45 LV et 447 LC) représente une nette augmentation par rapport aux 5 années précédentes (344 cas). Pour environ 3 cas /an, 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 a connu un pic en 2011 puis s'est stabilisé les années suivantes (Tableau 10). Ce pic provient à la fois des cas autochtones et importés. Au cours des années suivantes (2012-2015), le nombre de cas autochtones est resté stable avec une moyenne d'environ 15 cas annuels. Par contre, le nombre de cas importés est presque remonté, en 2015, au niveau de 2011.

Tableau 10. Evolution du nombre de déclarations annuelles des cas faites au CNR-L (hors CH Cayenne) entre 2011 et 2015.

Années		2011	2012	2013	2014	2015	Total	Moyenne annuelle
Cas autochtones (France métropolitaine)	LV	25	10	8	11	8	**62**	12.2
	LC	6	4	4	6	5	**25**	5
	LM	0	1	1	2	0	**4**	<1
	Total	**31**	**15**	**13**	**19**	**13**	**91**	**18**
Cas importés (en France métropolitaine)	LV	12	10	9	5	9	**45**	9
	LC	54	44	63	25	71	**257**	51.4
	LC Guyane	56	34	22	49	29	**190**	38
	LM	0	2	0	1	0	**3**	<1
	Total	**122**	**88**	**94**	**79**	**109**	**492**	**98.4**
Origine indéterminée		2	0	4	1	6	**13**	2.6
Total		155	103	111	99	128	**596** *	**119**

* + 2 cas forme clinique non précisée

Pathologie :

Le nombre moyen de cas annuel de LV sur la période **2011-2015** est de 21.4 [16-37], celui des LC de 94.4 [80-116]. Les cas de LCM restent toujours rares (moins de 3/an).

En 2015, le nombre de cas de LV est stable par rapport aux dernières années (moyenne du nombre de cas par an entre 2006 et 2015 : 23.2). Il en est de même pour les cas de LC. Les contaminations ayant eu lieu dans les pays du Maghreb sont remontées à un niveau relativement élevé (32 cas *versus* 16 en 2014).

Autres données patients :

Sur la période **2011-2015,** seulement 30 patients infectés par le **VIH** ont déclarés une leishmaniose (17 LV et 13 LC). Ceci confirme la diminution de l'infection chez les sujets VIH+ , déjà observée à la fin du quinquennal précédent. Concernant les cas de LV (118 cas), la moyenne **d'âge** était de 33 ans [0-83]. De façon surprenante, seulement 37 cas sont survenus chez des enfants âgés de moins 10 ans; et 52 chez des patients entre 40 et 74 ans. Ainsi, en France, la LV continue de toucher plus souvent des adultes relativement jeunes (moyenne d'âge de 27.6 ans [1-

56 ans], similaire à celle de l'an dernier).On notera également un **sex ratio** biaisé, avec seulement 32% des cas (38) chez des femmes.

En 2015, sur les 22 cas de LV, 6 patients étaient immunodéprimés, et 3 infectés par le VIH. En 2013, 11 patients étaient immunodéprimés, dont 8 VIH+, et en 2014 aucun. On notera un cas exceptionnel de transmission *in utero*. Le sex ratio est de 9 patients de sexe féminin et 14 de sexe masculin. Seulement 9 cas sont des enfants de moins de 10 ans; 5 patients avaient entre 22 et 41 ans, et les 9 autres entre 46 et 56 ans. Parmi les cas autochtones de LV déclarés en 2015 (10 cas possibles dont 8 sûrs et 2 avec possibilité de contamination dans un autre pays), 3 patients avaient des facteurs d'immuno-dépression (2 VIH+, 1 greffé pulmonaire), et 5 étaient des enfants de moins de 10 ans.

Sur l'ensemble des cas de LC diagnostiqués en France métropolitaine, autochtones ou importés (104 cas), 48 (29%) étaient des formes cutanées multiples.

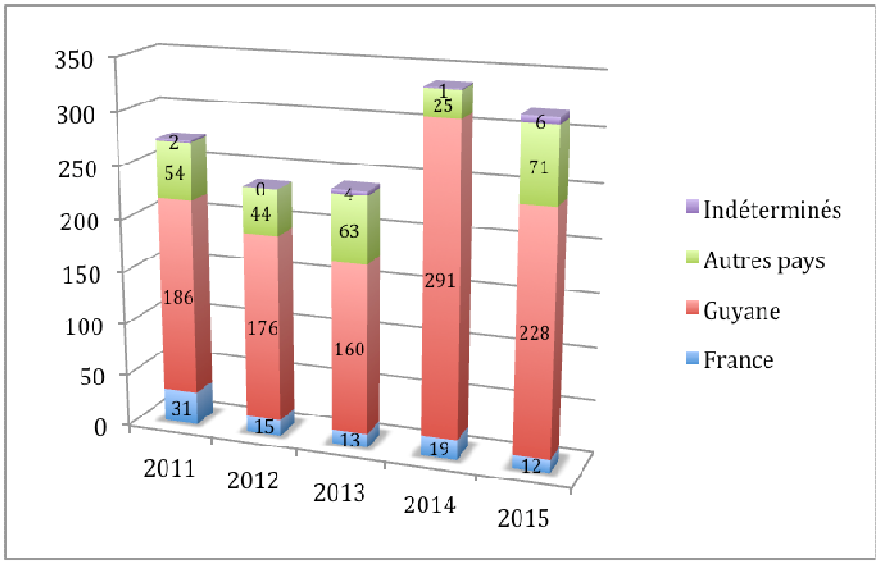
Distribution géographique :

*** Sur l'ensemble des cas,** la majorité des cas déclarés e**ntre 2011 et 2015** avaient été contaminés en Guyane. La seconde région grande pourvoyeuse de cas est le Maghreb, suivi par la France métropolitaine (Tableau 11 et Figure 4). Ceci n'est guère différent du quinquennal précédent.

Tableau 11. Lieux de contamination pour l'ensemble des cas de leishmanioses déclarés au CNR-L de 2011 à 2015.

Forme clinique	Origine de la contamination							
		France métropolitaine	Antilles	Guyane	Maghreb (Algérie, Tunisie, Maroc)	Autre pays (ou plusieurs pays possibles)	Indéterminée ou non renseignée	Total
	L. viscérale	61	0	0	17	28	13	119
	L. cutanée	24	0	1037	155	102	0	1318
	L. muqueuse	5	0	NR	0	3	0	8
	Total	**90**	**0**	**1037**	**172**	**133**	**13**	**1445**

Figure 4. Nombre de cas humains de leishmaniose déclarés au CNR-L de 2011 à 2015 en fonction du lieu de contamination



***** Pour les **leishmanioses autochtones** déclarées sur la période **2011-2015** (90 cas), le département de contamination a pu être déterminé pour 74 cas; ceux-ci provenaient de l'ensemble des départements du Sud de la France les plus impactés par l'endémie leishmanienne (cf. Tableau 12).

En 2015, les cas autochtones avec un lieu de contamination précis (8 LV et 5 LC) provenaient de six départements du sud de la France (Alpes-Maritimes, Ardèche, Bouches-du-Rhône, Hérault, Pyrénées orientales et Var), situés dans la zone d'endémie leishmanienne connue, et les autres du Sud de la France sans précision.

Tableau 12. Départements de contamination des cas de leishmanioses autochtones confirmés déclarés entre 2011 et 2015.

Départements	**LV**	**LC**	**LM**	**Total**
Alpes de Haute Provence				**0**
Alpes-Maritimes	17	3	1	**20**
Ardèche	7		1	**7**
Bouches-du-Rhône	3	1		**4**
Corse	5			**5**
Drôme				**0**
Gard	4	1		**5**
Hérault	8	9		**17**
Pyrénées-Orientales	5	3		**8**
Var	4	2	1	**7**
Vaucluse	1		1	**1**
Départements non précisés ou multiples	7	5	1	**16**
Total	**61**	**24**	**5**	**90**

3.3.1.3.1. Guyane Française

La situation en Guyane Française se caractérise par une **évolution assez marquée**, particulièrement si on fait le bilan sur les 10 dernières années. Celle-ci est détaillée ci-dessous.

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.

Evolution :

L'évolution pour la Guyane française est caractérisée par une forte augmentation.

Entre 2011 et 2015 : Le nombre total de cas déclarés par Cayenne (contamination en Guyane ou pays limitrophes) (851) ajouté aux cas de contamination en Guyane déclarés en France métropolitaine (192) s'élève à 1043 cas, soit une moyenne annuelle de 208 cas pour la période 2011-2015 :

- le Laboratoire-Associé de Cayenne a diagnostiqué 851 cas de LC;
- les Hôpitaux d'instruction des Armées (HIA Bégin, Lavéran, Legouest et Sainte Anne) et le Service de Santé des Armées en métropole (Département d'Epidémiologie et Santé publique de l'Institut de Médecine Tropicale du Pharo) ont déclaré 144 cas de LC contractés en Guyane;
- de plus, parmi les déclarations envoyées par les diverses structures sanitaires métropolitaines, 48 concernaient des cas de LC avec une contamination en Guyane.

Sur la période, le nombre de cas déclarés est resté stable (autour de 170) entre 2011 et 2013, puis ceci a été suivi d'un pic en 2014 à 291 cas. En 2015, le nombre de cas a de nouveau baissé (228) mais sans revenir aux niveaux des années antérieures moyenne annuelle des 7 années précédentes (195.8 cas/an [160-288] pour la période 2007-2013).

Ceci constitue donc globalement une forte augmentation par rapport au quinquennal précédent (765 cas). Il est difficile de dire si ceci est le résultat d'une augmentation de l'endémicité, donc d'une véritable augmentation d'incidence, ou d'un meilleur taux de déclaration résultant des actions de sensibilisation menées sur le territoire par le L-A. Une incidence précise est difficile à estimer car, pour de nombreux cas (53%) déclarés par Cayenne, l'origine de la contamination n'est pas précisée (Guyane ou pays limitrophes). A noter que l'incidence annuelle en 1979-80 avait été estimée à 170 cas par an (Dedet et coll., Rev. Epidémiol. Santé Publique, 1991, 39: 129-133), ce qui indiquerait une augmentation de 36% de l'endémie dans ce Département par rapport aux années 80.

Pour **l'année 2015 :** on retrouve un total de 228 cas de contamination en Guyane ou dans les pays limitrophes. Le détail figure sur le tableau 13.

- Le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (Pr. M. Demar) du Centre Hospitalier de Cayenne nous a adressé 199 déclarations de cas de LC diagnostiqués en Guyane Française. Pour 78% des fiches renseignées, le lieu de contamination retrouvé était la Guyane. Pour 110 d'entre elles (55%), le lieu de contamination n'était pas précisé mais situé probablement en Guyane ou dans les pays limitrophes.
- Les Hôpitaux d'instruction des Armées (HIA Bégin, Lavéran, Legouest et Sainte Anne) et le Service de Santé des Armées (Département d'Epidémiologie et Santé publique de l'Institut de Médecine tropicale du Pharo) ont déclarés 17 cas de LC avec une contamination en Guyane.
- De plus, parmi les déclarations de cas de LC envoyées par les diverses structures sanitaires métropolitaines, 29 concernaient une contamination en Guyane.

Tableau 13. Cas de leishmaniose cutanée contractés en Guyane en 2015, en fonction de la source de déclaration.

Déclarations	**Nb total**	**Sexe**		**Statut**		
		H	F	militaire	civil	inconnu
En France*	12	11	1	3	5	4
CH Cayenne	199	146	46	7	84	109
HIA et SS des Armées	17	17	-	17	-	-
Total	**228**	**173**	**47**	**27**	**89**	**113**

Pathologie :

Le nombre de cas en moyenne déclaré par Cayenne sur la période de 2011 à 2015 est de est de 170 par an, auxquels s'ajoutent en moyenne 16 cas par an diagnostiqués en métropole. La répartition des cas sur les années est superposable d'une année à l'autre avec un faible nombre de cas à partir de mai (saison sèche) puis une reprise à compter de novembre (saison des pluies).

Sur 2011-2015, tous les cas de contamination en Guyane Française étaient des LC; Seules deux leishmanioses cutanéo-muqueuses ont été déclarées en 2013 et 2015 (chez un patient VIH). Aucune leishmaniose viscérale n'a été détectée

Autres données patients :

Sur la période 2011-2015, l'infection est survenue chez 5 patients **VIH+** dont un ayant développé une infection à *L . amazonensis* avec des lésions nodulaires.

Le **sex ratio** homme-femme pour les cas où cette donnée était connue (88,2% des cas) était de 3,9 (595 hommes pour 152 femmes). Ceci est à mettre en relation avec les activités forestières (orpaillage, bucheron..), essentiellement masculines.

En 2015 : Sur les 199 fiches renseignées, l'infection est survenue chez 146 hommes et 46 femmes (pour 7 fiches la donnée était manquante), dont 7 militaires et 67 civils, les autres fiches étant incomplètes sur ces paramètres. A cela, s'ajoute les cas diagnostiqués en métropole et ayant été contaminés en Guyane, soit 29 cas, à 99% masculins; ces cas ne concernent pas *a priori* des habitants de la Guyane.

Ainsi avec 199 cas déclarés en Guyane et 228 cas déclarés au total, l'**incidence annuelle de la LC en Guyane Française** en 2015 serait au minimum de 0,91 p.1000 (sur la base de 250.000 habitants), ce qui apparaît stable par rapport à l'année 2014 (0.97 p.1000) ou à l'année 2012 (0.9 p. 1000).

Agents pathogènes en cause :

L'espèce *L. braziliensis* se maintient à un niveau stable avec peut-être une tendance à l'augmentation cf. § 3.2.4.2, Identification moléculaire). Elle a diminué en 2014 à environ 5% des cas, alors que depuis 3 ans, elle restait stable autour de 13%. Cette modification se fait au dépens d'une augmentation de *L. guyanensis* qui reste l'espèce prépondérante (92,4% contre 83,7% en 2013). Cette "modification épidémiologique" relève sans doute de l'augmentation de l'activité ayant amené à un recrutement plus important de *L. guyanensis*. Cette tendance ne se confirme pas l'année suivante soit en 2015, avec le taux le plus bas de *L. guyanensis* sur les 10 dernières années, à 67,7%. Ces chiffres confirment que si à priori exceptionnelle au cours des années 70 et 80, la leishmaniose à *L. braziliensis* est désormais bien implantée en Guyane avec une prévalence de l'ordre de 10% des cas. Les 3 autres espèces restent rares.

Distribution géographique et temporelle :

On note une nette recrudescence des diagnostics portés pour les patients des **centres de santé** entre 2014 et 2015, passant de 20% à 46,5%.

Cas déclarés	2014	2015
CDPS	(20%) 20/100	(46,5%) 93/200
Hopital	(53%) 53/100	(39,5%) 79/200
CMIA	(27%) 27/100	(0,07%) 7/100

De même, la répartition de *L. braziliensis* diagnostiqués dans les CDPS semble variable avec un taux à 0,7% en 2014 contre 48% en 2015.

La distribution temporelle des cas de leishmanioses cutanées et cutanéo-muqueuses en Guyane est superposable d'une année à l'autre avec un faible nombre de cas à partir de mai (saison sèche) puis une reprise à compter de novembre (saison des pluies).

3.3.2 Participation aux réseaux de surveillance

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

Au cours d'une réunion organisée le 04 Juin 2013 avec les représentants de la Cellule de l'InVS en Région Languedoc-Roussillon (Cire), Département Coordination des Alertes et des Régions (Amandine Cochet et Cyril Rousseau), l'intérêt et les modalités d'actions d'un renforcement du signalement au CNR dans certains territoires, en particulier dans les Pyrénées-

Orientales avaient été discutés, en particulier pour les formes cutanées autochtones. Un projet de sensibilisation des dermatologues et des médecins généralistes avait été envisagé; le signalement pourrait s'accompagner d'une facilitation de l'accès au diagnostic. Les modalités restent encore à définir avec la Cire. Ce projet a été appuyé par le représentant de l'InVS, le Dr Harold Noel, au cours d'une autre réunion le 24 Oct. 2013 lors d'une brève visite au CNR-L à Montpellier.

En Guyane française, une réunion a été organisée le 4 Janv. 2014 avec le Service de Dermatologie et le Service de Santé des Armées. L'objectif de la réunion était de faire le point sur les prestations du LA-CNR et les demandes et attentes des praticiens. Un échange de protocoles, notamment de prélèvements (frottis et biopsie), a été opéré entre les différents membres du réseau.

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

3.3.2.2. 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.

De **2011 à 2015**, au total, 30 cas de co-infection VIH/Leishmania ont été déclarés à l'OMS, représentant 17 cas de LV et 13 cas de LC dont 9 diagnostiquées à Cayenne.

En 2015, les cas autochtones de co-infection avec le VIH signalés sur le territoire national ont été au nombre de 2 (cas de LV). Pour 1 autre cas de co-infection (LV/VIH), il n'était pas possible de déterminer avec certitude le lieu de contamination compte tenu des déplacements du patient.

3.3.3. Collaboration avec les structures de santé 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, parait 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.

Le Centre Collaborateur **Laboratoire Santé Animale (LSA) de l'ANSES à Maisons-Alfort** (**Dr Mohamed Kasbari** / Dr Pascal Boireau), en raison de ses missions de diagnostic, de recherche, d'appui scientifique et technique auprès des tutelles, de veille et surveillance et de son expertise dans le domaine des maladies animales et zoonotiques, a contribué à la surveillance de la progression des leishmanioses et des souches de leishmanies susceptibles de passer du réservoir animal à l'homme.

Au cours de la période quinquennale écoulée, la bonne coopération entre le LSA de l'ANSES et le CNR depuis 2009 s'est traduite en matière de surveillance et de veille, tant par des échanges d'informations sur les souches circulantes dans la faune, que de matériel biologique ou

méthodologique. Ainsi, les souches isolées chez l'animal, en France ou à l'étranger par le LSA-ANSES, ont été régulièrement transmises au CNR-L pour typage puis cryoconservation dans la collection de souches du CNR. Au cours de cette période, les travaux du LSA relatifs à la leishmaniose animale et à ses vecteurs, conduits respectivement en collaboration avec le CNR-L et l'EA 4688 "Vecpar" (Anses-Université de Reims), ont principalement porté sur les aspects suivants.

3.3.3.1. Surveillance des foyers non conventionnels de leishmaniose canine autochtones "ectopiques"

Ces foyers sont dits "ectopiques" car ils sont localisés dans des zones considérée comme non-endémiques, donc indemnes de leishmaniose. Les enquêtes épidémiologiques (cliniques, sérologiques et moléculaires) conduites entre 2010 et 2015 dans des élevages canins et auprès de propriétaires de chiens infectés ont permis de mettre en évidence une vingtaine de foyers "ectopiques" canins en France, tous autochtones (non importés) notamment en régions Bretagne, Normandie, Ile-de-France, Pas-de-Calais, Poitou-Charentes, Limousin, Centre, Franche-Comté et Rhône-Alpes. Les résultats de ces enquêtes conduites avec les éleveurs et les vétérinaires praticiens, ainsi que ceux des enquêtes entomologiques de terrain, ont amené les auteurs à proposer l'hypothèse de probables transmissions non vectorielles dite "non conventionnelles". En particulier, l'hypothèse de voies transplacentaire et vénérienne a été confirmée par la suite par les travaux de recherche visant à établir leur existence et leur efficacité, et menés en zone confinée (excluant toute possibilité de vecteurs) en laboratoire de sécurité de niveau 2. Ce travail fait pour partie l'objet d'une publication en soumission à Plos. Negl. Trop. Dis.

3.3.3.2. Evaluation du rôle respectif des voies de transmission non-vectorielle et vectorielle de la leishmaniose canine dans les foyers "ectopiques"

Des enquêtes entomologiques ont été conduites sur la même période dans plusieurs départements concernés ou non par l'apparition de foyers autochtones de leishmaniose canine, mais tous situés en zone indemne de leishmaniose : notamment en Ille-et-Vilaine, Finistère, Côtes d'Armor, en Ile-de-France (94, 93, 95), en Poitou-Charentes (79, 86), et en région Rhône-Alpes (Loire, Jura) afin :

(a) d'objectiver le rôle de la **transmission non vectorielle** dans la dynamique des foyers ectopiques apparus;

(b) de déterminer **l'implication éventuelle de *Phlebotomus mascittii*** ;

(c) de contribuer progressivement à la **remise à jour des données anciennes de distribution des espèces de phlébotomes présentes hors zone d'endémie au nord de la Loire** (Pr. Rioux, 1969)**,** et à terme à l'établissement d'une carte de distribution des différentes espèces de phlébotomes permettant de compléter les données manquantes indispensables pour l'évaluation du risque et de son évolution temporelle et spatiale.

A ce jour, seul les espèces *P. mascittii* et *P. perniciosus* ont été capturés dans les régions précitées : en petits effectifs (quelques dizaines d'individus) pour *P. mascittii* et quelques rares spécimens pour *P. perniciosus*, confirmant pour l'instant l'absence ou la faible densité de vecteurs compétents dans les sites enquêtés au nord de la Loire. Aucun phlébotome n'a à ce jour été trouvé porteur de parasite ni en microscopie après dissection du tube digestif, ni par PCR.
Ce travail fait l'objet d'une publication en préparation.

Par ailleurs, considérant la présence, même en densité faible, de *P. mascittii* dans certains sites hébergeant des foyers ectopiques de leishmaniose canine, il serait urgent d'apporter une réponse à la compétence vectorielle encore indéterminée de *P. mascittii*, phlébotome majoritaire dans la moitié nord du pays, vis-à-vis de *Leishmania infantum*.

3.3.3.3. Surveillance épidémiologique de réservoirs animaux non conventionnels (domestiques et/ou sauvages) de leishmaniose

Différents réservoirs animaux non conventionnels de *Leishmania* ont été récemment décrits dans le monde et en particulier en Europe. Une dizaine de cas de leishmaniose équine cutanée ont été décrits en Allemagne (2009), en Suisse (2009) puis aux USA (2012), suivis d'un cas de leishmaniose bovine cutanée en Suisse (2010), donc chez des espèces animales habituellement non cibles (chevaux, vache), et de surcroit imputés à une espèce de *Leishmania* (*L. siamensis*), inconnue jusqu'alors en Europe et récemment rapportée en Thaïlande [14]. De façon plus préoccupante, une épidémie de leishmaniose viscérale et cutanée humaine est survenue en Espagne (Madrid) en 2010-2012, concomitante à une prolifération de lagomorphes sauvages trouvés infectés par la leishmaniose (*L. infantum*) [15].

Un travail d'évaluation de l'infection chez différents réservoirs animaux non conventionnels (chevaux et lagomorphes) a donc été mis en œuvre et est poursuivi au Centre collaborateur LSA à l'ANSES.

Entre 2012 et 2014, 292 sérums équins de 3 départements du sud de la France (collaboration avec l'unité de virologie de l'Anses) ont été analysés par Elisa et/ou Western Blot pour recherche d'anticorps anti-*Leishmania*. L'ensemble des sérums se sont révélés négatifs. L'étude est cependant en cours d'élargissement à deux autres départements de la zone d'endémie avec collecte d'autres sérums plus récents avant publication prochaine des résultats finaux.

Les travaux débutés en 2014 sur les lagomorphes sont toujours en cours.

3.3.3.4. Surveillance de l'émergence de nouvelles espèces de *Leishmania* circulantes dans la faune domestique et/ou sauvage

Il s'agit actuellement principalement (mais non uniquement) du suivi de l'espèce nouvelle *L. siamensis* : (i) par la veille épidémiologique; (ii) par des enquêtes séro-épidémiologiques de terrain (cf. supra) chez les équidés, ainsi que par des travaux de recherche en cours (cf. infra), portant sur la surveillance de cette émergence (pseudo-propagation) simultanée sur les trois continents à la fin des années 2000. Cette espèce a en effet été d'abord rapportée pour la première fois chez l'Homme en Thaïlande en 2008, puis récemment chez l'animal en Europe en 2009 et 2010, et enfin aux USA en 2012.

3.3.4. ALERTE : Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes 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.

---

14 SUKMEE T ET COLL. A SUSPECTED NEW SPECIES OF LEISHMANIA, THE CAUSATIVE AGENT OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN A THAI PATIENT. INT J PARASITOL. 2008;38(6):617-22

15 MOLINA R ET COLL. THE HARE (*LEPUS GRANATENSIS*) AS POTENTIAL SYLVATIC RESERVOIR OF LEISHMANIA INFANTUM IN SPAIN. VET PARASITOL. 2012;190(1-2):268-71

A la suite des cas groupés observés en 2009-2010, une surveillance des cas provenant du Maghreb a été mise en place au CNR-L. Depuis 2011, aucun phénomène particulier n'a été observé. Les cas importés d'Algérie, Maroc et Tunisie, ainsi que ceux de Guyane Française, font l'objet d'une surveillance particulière : le nombre de cas importés d'Afrique du Nord est de 172 cas pour la période 2011-2015, soit une incidence annuelle de 34.4.

L'endémicité en Guyane Française apparaît difficile à estimer car les lieux de contamination ne sont pas toujours précisés. La moyenne des cas annuels avec une contamination en Guyane ou dans les pays limitrophes est de 232 sur la période 2011-2015. L'endémicité apparait globalement en augmentation sur la période, mais l'optimisation du recrutement, notamment auprès des CDPS et du Service des Armées, peut être l'élément majeur de cette augmentation.

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

Un phénomène "d'exposition groupée" a provoqué l'apparition de 7 cas de leishmaniose cutanée à *L. braziliensis* parmi 24 scientifiques participant à une mission de terrain à la "crique" Limonade, à Saül, en Guyane Française. Les diagnostics ont été portés dans les villes d'origine des chercheurs, donc dans différents CHU de France, et même pour un cas à l'étranger. Ces cas ont donné lieu à publication en raison du taux exceptionnel d'infections à *L. braziliensis* par rapport à *L. guyanensis* qui constitue 85% des cas en Guyane Française :

Martin-Blondel G, Iriart X, El Baidouri F, Simon S, Mills D, Demar M, Pistone T, Le Taillandier T, Malvy D, Gangneux JP, Couppié P, Munckhof W, Marchou B, Ravel C, Berry A. Outbreak of *Leishmania braziliensis* Cutaneous Leishmaniasis, Saül, French Guiana. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(5):892-4.

3.4. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

3.4.1. Information

Le **site Internet** du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (www.parasitologie.univ-montp1.fr) mis en ligne fin 2004 inclut les pages spécifiques du CNR-L. D'abord seulement en langue française, il fait l'objet d'une version en langue anglaise depuis 2005 (celle-ci 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, la démarche pour les déclarations de cas, ainsi que les activités du CNR-L (rapports d'activité en ligne).

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 **2015-2016**, 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. 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.

3.4.2. Formation

3.4.2.1. 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 cutanéo-muqueuse 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 cutanéo-muqueux 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.

3.4.2.2. Organisation d'un Workshop pour l'O.M.S. : « Molecular diagnosis of leishmanioses » du 19 au 23 Mars 2012

Ce séminaire a été organisé à la demande du Dr Jorge Alvar (Medical Officer) du Service Leishmaniasis Control, Neglected Tropical Diseases (HTM/NTD/IDM) de l'O.M.S., par les Drs Laurence Lachaud et Christophe Ravel. Douze participants venant d'Asie Centrale ont assisté à cette formation, en provenance des pays suivants : Arménie, Azerbaïdjan, Bulgarie, Géorgie, Kazakhstan, Kyrgyzstan, Ouzbékistan, Tadjikistan, Turkménistan et Turquie.

Le programme de la semaine s'est déroulé en 2 parties :

- une première partie théorique avec 3 séminaires (i) Leishmaniasis epidemiology; focus on Old World visceral and cutaneous leishmaniasis. (Pr Jean-Pierre Dedet) ; (ii) Visceral leishmaniasis in clinical practice: diagnosis, treatment and PCR follow up (Dr Alain Makinson & Dr Nathalie Bourgeois) ; (iii) Presentation of the National Reference Centre for Leishmaniases (Pr Patrick Bastien)

- une deuxième partie pratique sous forme de 8 modules (Drs L. Lachaud et C. Ravel) : 1 : In vitro cultivation of Leishmania and cell counts for seeded samples and positive controls; 2 : DNA extraction methods and negative controls; 3 : Conventional PCR; 4 : Real time PCR; 5 : Interpreting PCR results [validation of methods, sensibility, specificity, internal quality control and external quality assessment] ; 6 : PCR results: clinical relevance and impact on therapeutic decision-making; 7 : Molecular identification of Leishmania strains (focus on RFLP); 8 : Bioinformatics : primers, probe design NCBI…

3.4.2.3. Stagiaires

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

Entre 2011 et 2015 : 9 stagiaires ont été reçus au Laboratoire coordonnateur à Montpellier, souvent de façon répétée, totalisant ainsi **16 stages**. On comptait parmi eux trois Algérien(ne)s, deux Tunisiennes, deux Français, un Pakistanais et un Brésilien (cf. Tableau 14).

En 2015 : 3 stagiaires ont été reçus.

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.

Parmi eux, le Dr Mohamed Kasbari (inspecteur vétérinaire à l'ANSES), qui a passé sa thèse Doctorat d'Université sous la direction de Christophe Ravel (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier & UMR "MiVEGEC"), a publié 2 articles en collaboration avec le CNR-L.

Tableau 14. Liste des stagiaires reçus au CNR-L de 2011 à 2015

NOM	PRENOM	FORMATION / AFFILIATION	DATES DU STAGE
AIT OUDHIA	Khatima	Thèse Université 3ème Année, Ecole Vétérinaire d'Alger	07/12/10 – 05/01/11
KASBARI	Mohamed	Thèse Université, ANSES, Maisons-Alfort	15-30/07/11; 26-30/09/11; 01-30/11/11; 12-14/02/14; 01/11/14 – 15/07/15
MUBBASHIR	Hussain	Vétérinaire, Enseignant, Chercheur,Universite Koffat PAKISTAN	15/07/11 – 15/07/11 26/09/11 – 30/09/11
CHAARA	Dhekra	Thèse Université, Univ. Monastir, Tunisie	01/09/11 – 31/01/12; 01/02/13 – 31/07/13; 01/03/14 – 31/05/14
HAOUAS	Najoua	Thèse Sciences Univ. Monastir, Tunisie	24/12/11 – 21/01/12
GALVIS OVALLOS	Fredy	Université de Sao Paulo/ Faculté de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne	17/11/14 – 22/11/14
BOUCHOUICHA	Rim	Post-doc, Université de Reims (Projet PhlebExpo), Unite USC ANSES-Vecpar EA4688	01/11/14 – 30/03/15
AZZEDINE	Bounamous	Maitre de conférence, Département de Biologie, Institut des Sciences et de la Technologie, Université de Mila, Algérie	12-27/12/2014
LOKMAN	Galal	Stagiaire Master 2 Biologie moléculaire et cellulaire, spécialité Parasitologie, Université Paris 6,	2/03/15 – 15/07/15

Le LHUPM, quant à lui, a accueilli deux stagiaires sur la période.

LY	Julie	Licence Option Biochimie et Biologie, Université Antilles-Guyane, Département Sciences, Technologies, Santé	04/04/14 - 18/05/14
JEAN-BAPTISTE	Ruthly	Licence Option Biochimie et Biologie. Université Antilles Guyane. Département Sciences, Technologies, Santé	01/07/15 – 26/07/15

3.4.3. 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 thérapeutique est assuré par plusieurs praticiens du CNR-L. Les numéros de téléphone des praticiens concernés sont inscrits sur le site web du CNR.

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

Plus de 50 demandes annuelles d'information et de conseil sur l'épidémiologie et la prévention des leishmanioses ont été reçues depuis 2011. Une suite a été donnée à chacune d'entre elles. Des conseils sont également été 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 Dr Pierre Buffet et 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.

Les informations médicales nécessaires à la formulation d'un conseil thérapeutique incluent la forme clinique et l'espèce de *Leishmania* suspectée, ainsi que les caractéristiques du patient. Le recueil de l'option thérapeutique qu'aurait choisi le clinicien sollicitant s'il n'avait pas eu accès au conseil cherche à déterminer l'impact tangible de l'activité de conseil (hospitalisations et traitement systémiques non indispensables évités). Enfin, il est recherché si le conseil a été effectivement suivi et de connaître l'évolution sous traitement. Le conseil thérapeutique permet enfin parfois de d'augmenter l'exhaustivité des déclarations de cas.

Le référentiel sur la prise en charge thérapeutique des différentes formes de leishmanioses en France publié avec des membres du CNR-L en 2011 (Pierre A. Buffet et coll., Traitement des leishmanioses en France : proposition d'un référentiel consensuel, Presse Med. 2011; 40(2):173-84) continue de servir de guide pour le conseil thérapeutique.

Ce conseil thérapeutique rentre également dans un projet à plus large échelle initié par le Dr Pierre Buffet à Paris Pitié-Salpêtrière et Gloria Morizot (Institut Pasteur, Paris). Dans ce projet, les informations médicales nécessaires à la formulation d'un conseil thérapeutique incluent la forme clinique et l'espèce de *Leishmania* suspectée, ainsi que les caractéristiques du patient. Le recueil de l'option thérapeutique qu'aurait choisi le clinicien sollicitant s'il n'avait pas eu accès au conseil cherche à déterminer l'impact tangible de l'activité de conseil (hospitalisations et traitement systémiques non indispensables évités). Enfin, on cherche à savoir si le conseil a été effectivement suivi et quelle a été l'évolution sous traitement. Une base de données gérée par Pierre Buffet et Gloria Morizot recense toutes les données épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques recueillies lors des entretiens téléphoniques pour ce conseil thérapeutique. Cette base de données est maintenant intégrée dans le projet européen « LeishMan » ("Improving treatment of leishmaniasis based on species differentiation").

Un article a été publié en 2014 à ce sujet :

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

Sur la période **2011-2015**, 161 prestations de conseil au total ont été réalisées (en moyenne 40/an) dans ce cadre.

En Guyane française, le Service de Dermatologie est le service référent pour le conseil clinique et thérapeutique avec comme responsable référent, le Pr Pierre Couppié.

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.

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

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

- Des avis sur le risque d'introduction et de diffusion en France de leishmanies du Nouveau monde ont été demandés par la **DGAL (Ministère de l'Agriculture) au Laboratoire de Santé Animale de l'ANSES** avant délivrance d'autorisation administrative d'importation de tamanoirs et de fourmiliers géants (*Tamandua tetradactyla*, *Myrmecophaga tridactyla*) à partir du Brésil vers des parcs zoologiques français qui en ont fait l'acquisition. En effet, ces animaux sont connus pour être des réservoirs naturels potentiels de leishmanies, notamment *L. guyanensis*, *L. braziliensis*, ou *L. amazonensis.* Cependant, ces espèces de leishmanies étant transmises par les vecteurs du genre *Lutzomyia* absents hors Amérique, et sachant que les phlébotomes européens ne sont pas permissifs pour la transmission des leishmanies du Nouveau Monde, l'autorisation d'importation a été accordée sous condition du respect des conditions sanitaires et réglementaires habituelles.

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

3.5. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR

Le CNR-L a participé à plusieurs programmes de recherche conduits dans le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie et dans l'unité labellisée **"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.

3.5.1. Etude rétrospective de la déclaration des cas de leishmanioses en France

Un travail d'analyse retrospective de la declaration des cas au CNR-L depuis 1999 a été réalisé par l'équipe du CNR. Entre 1999 et 2012, 317 cas autochtones et 1,154 cas d'importation ont été notifies au CNR-L. Le nombre moyen des cas autochtones était de 22.6 par an, essentiellement des cas de LV (84.5%). Tous les patients avaient été contaminés dans le sud de la France. Dans la zone d'endémie, l'incidence de la leishmaniose est de 0.22 pour 100,000 habitants. Les cas d'importation sont plus frequents (moyenne annuelle : 82.4 cas) et sont majoritairement des cas de LC (91%), avec surtout des LC à L. major en provenance du Maghreb et de l'Afrique sub-saharienne, et des cas de LC à L. guyanensis de Guyane. Finalement, l'évolution temporo-spatiale de la maladie semble relativement stable au cours de cette période de ces 14 années. Ces travaux ont donné lieu à une publication internationale en 2013 :

Lachaud L, Dedet JP, Marty P, Faraut F, Buffet P, Gangneux JP, Ravel C, Bastien P; & the Working Group for the Notification of Human Leishmanioses in France. Surveillance of leishmanioses in France, 1999 to 2012. *Euro Surveill*. 2013 ;18(29) : 20534-40.

3.5.2. Etude des caractéristiques épidémiologiques et du polymorphisme iso-enzymatique des souches de la Collection

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

6.1.1. Souches de leishmanioses viscérales

Les caractéristiques épidémiologiques de foyers de leishmaniose viscérale dans l'Ancien Monde (38 pays) ont été étudiées grâce au polymorphisme enzymatique d'une série de **2277 souches de *Leishmania* de notre collection**. Ce travail a fait l'objet d'un article original en 2012.

PRATLONG F, LAMI P, RAVEL C, BALARD Y, DEREURE J, SERRES G, BAIDOURI FE, DEDET JP. Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. *Parasitology* 2012, 12:1-12.

6.1.2. Souches d'origine canine :

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

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

3.5.3. Analyse génétique multilocus de Leishmania d'Afrique et d'Eurasie

Une analyse génétique multilocus de 222 souches de *Leishmania* d'Afrique et d'Eurasie provenant de la collection du CRB-*Leishmania* de Montpellier a été menée sur plusieurs années et conclue en 2013. Elle a apporté des données nouvelles sur la classification et la structuration génétique des différentes espèces étudiées, en particulier le complexe d'espèces causant la leishmaniose viscérale. Ces travaux ont des retombées pratiques sur l'identification moléculaire des parasites. Ils ont donné lieu à une publication internationale en 2013 :

El Baidouri F, Diancourt L, Berry V, Chevenet F, Pratlong F, Marty P, Ravel C. Genetic structure and evolution of the *Leishmania* genus in Africa and Eurasia: what does MLSA tell us. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 ; 7(6): e2255

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

De 2008 à 2012, le CNR-L a été partenaire d'un essai thérapeutique portant sur la paromomycine-onguent dans le traitement de la leishmaniose cutanée à *L. major* en Tunisie. Ce projet se faisait en collaboration avec le Walter Reed Army Institute of Research à Washington (Dr M. Grogl), l'Institut Pasteur de Tunis (Pr A. Ben Salah), l'Institut Pasteur de Paris (G. Morizot) et le Service de Parasitologie-Mycologie de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière (Dr P. Buffet). Dans cet essai, le CNR-L était chargé de l'identification moléculaire des souches isolées à partir de patients par l'équipe Tunisienne (Dr C. Ravel). Dans un but de contrôle, environ 20% de ces souches étaient également typées par la technique de référence basée sur les isoenzymes. Ces souches étaient par ailleurs cryoconservées dans la cryobanque de Montpellier pour servir de référence, en particulier pour d'éventuelles études longitudinales de résistance des parasites aux drogues anti-leishmaniennes.

Ce projet a donné lieu à un contrat rémunérant la prestation de typage moléculaire (choix du WRAIR), et donc pas de publication associant le CNR.

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

Ce projet collaboratif avec le Pr. H. Babba, de la Faculté de Pharmacie de Monastir en Tunisie, avec lequel le Laboratoire entretient une collaboration de longue date, a fait l'objet d'un financement conjoint du CNRS et de la DGRST (projet 2009-2011 N° 22 635 : CNRS-DGRST ; responsable scientifique du projet pour la partie française : Dr F. Pratlong). Titre du projet : "Eco-épidémiologie de la leishmaniose cutanée à *Leishmania killicki* en Tunisie. Développement d'outils moléculaires pour la caractérisation du parasite, du vecteur et des réservoirs potentiels dans le foyer originel et les foyers émergents"). A la fin de ce financement, les collaborations mises en place se sont poursuivies. En particulier deux thèses d'Université ont été réalisées en co-tutelle (l'une par le Dr Pratlong, CNR-L, à Montpellier, l'autre par le Dr Depaquit, Centre collaborateur du CNR, à Reims). Ces deux thèses portent sur les aspects épidémiologiques et noso-géographiques des leishmanioses au Maghreb.

Ces travaux ont fait l'objet de nombreuses communications en congrès (voir liste) et plusieurs articles ont été publiés en collaboration avec ces deux équipes :

- Jaouadi K., Haouas N., Chaara D., Gorcii M., Chargui N., Augot D., Pratlong F., Dedet J.P., Ettlijani S., Mezhoud H., Babba H. First detection of *Leishmania killicki* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in *Ctenodactylus gundi* (Rodentia, Ctenodactylidae), a possible reservoir of human cutaneous leishmaniasis in Tunisia. *Parasites & Vectors*, **2011**, 4 : 159.

- Haouas N, Chaker E, Chargui N, Gorcii M, Belhadj S, Kallel K, Aoun K, Akrout FM, Ben Said M, Pratlong F, Dedet JP, Mezhoud H, Lami P, Zribi M, Azaiez R, Babba H. Geographical distribution updating of Tunisian leishmaniasis foci: about the isoenzymatic analysis of 694 strains. *Acta Trop*. 2012 Dec;124(3):221-8.

- - Jaouadi K, Depaquit J, Haouas N, Chaara D, Gorcii M, Chargui N, Dedet JP, Pratlong F, Boubabous R, Babba H. Twenty-four new human cases of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania killicki* in Metlaoui, southwestern Tunisia: probable role of Phlebotomus sergenti in the transmission. *Acta Trop*. 2012;122(3):276-83.
  - Chargui N, Haouas N, Jaouadi K, Gorcii M, Pratlong F, Dedet JP, Mezhoud H, Babba H. Usefulness of a PCR-based method in the detection and species identification of *Leishmania* from clinical samples. *Pathol Biol (Paris)*. 2012; 60(6):e75-9.
  - Jaouadi K, Haouas N, Chaara D, Boudabous R, Gorcii M, Kidar A, Depaquit J, Pratlong F, Dedet JP, Babba H. Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) bloodmeal sources in Tunisian cutaneous leishmaniasis foci : could *Sergentomia minuta*, which is not an exclusive herpetophilic species, be implicated in the transmission of pathogens ? *Ann. Entomol. Soc. Am*. 2013; 106 (1) : 79-85.
  - Chaara D, Haouas N, Dedet JP, Babba H, Pratlong F. Leishmaniases in Maghreb: an endemic neglected disease. *Acta Trop*. 2014;132:80-93.
  - Chaara D., Ravel C., Bañuls AL., Haouas N., Lami P., Talignani L., El Baidouri F., Jaouadi, K., Harrat Z., Dedet JP., Babba H., Pratlong F. Evolutionary history of *Leishmania killicki* (syn. *Leishmania tropica*) and taxonomic implications. *Parasit Vectors*. 2015; 8:198.
  - Chaara D, Bañuls AL, Haouas N, Talignani L, Lami P, Mezhoud H, Harrat Z, Dedet JP, Babba H, Pratlong F. Comparison of *Leishmania killicki* (syn. *L. tropica*) and *Leishmania tropica* Population Structure in Maghreb by Microsatellite Typing. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Dec 8;9(12):e0004204

3.5.6. Etude de la résistance de *Leishmania infantum* à l'amphotéricine B

Au cours du programme financé par un Appel d'Offres Interne 2005 du CHRU de Montpellier, sur le thème "Etude de la résistance de *Leishmania infantum* à l'amphotéricine B (AmB) » (2005-2010), des tests de résistance *in vitro* ont été mis au point et comparés de façon à sélectionner le test le plus adéquat et à pouvoir le proposer aux cliniciens qui en feront la demande. Aucune résistance *in vitro* n'avait été détectée, confirmant l'intérêt de cette molécule dans le traitement de la leishmaniose viscérale en France. A la suite de ce projet, des collaborations ont été mises en place avec le Pr. Philippe Loiseau, UMR 8076 CNRS-Université Paris-Sud XI) et le Pr Louis Maës (Université d'Anvers, Belgique). Celles-ci ont donné lieu à trois publications :

- Cojean S, Houzé S, Haouchine D, Huteau F, Lariven S, Hubert V, Michard F, Bories C, Pratlong F, Le Bras J, Loiseau PM, Matheron S. *Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(4):704-6.

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

- Hendrickx S, Mondelaers A, Eberhardt E, Lachaud L, Delputte P, Cos P, Maes L. Intracellular amastigote replication may not be required for successful in vitro selection of miltefosine resistance in *Leishmania infantum*. *Parasitol Res*. 2015; 114(7):2561-5.

3.5.7. Programme de collaboration avec l'Ecole Vétérinaire d'Alger

La sensibilité de souches de *L. infantum* isolées de chiens de la banlieue algéroise vis-à-vis des antimoniés (SbIII et SbV) a été étudiée par le Dr L. Lachaud en collaboration avec le Dr K. Aït-Oudhia (Alger) et D. Sereno et B. Oury de l'IRD. Ce travail a donné lieu à deux publications :

- Aït-Oudhia K, Gazanion E, Sereno D, Oury B, Dedet JP, Pratlong F, Lachaud L. In vitro susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. *Vet Parasitol*. 2012 Jul 6;187(3-4):386-93.

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

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

Le Laboratoire Coordonnateur a été partenaire dans un projet européen qui a débuté en 2011 pour 4 ans, et dont les thèmes entraient parfaitement dans la mission de surveillance du CNR-L. Ils répondaient en effet à plusieurs des recommandations spécifiques faites par le Comité des CNR pour le CNR-L : suivi de l'évolution des zones d'endémie dans le monde, et contribution aux systèmes de surveillance internationaux, en particulier européen. Le projet EDENext (*Biology and control of vector-borne infections in Europe*), financé dans le cadre du programme européen FP7, a regroupé un consortium de 42 partenaires de 22 pays européens et pays associés. Ses objectifs étaient de comprendre les processus biologiques et éco-épidémiologiques menant à l'établissement, au maintien et à l'extension des maladies transmises par vecteurs, dont les leishmanioses; l'intérêt à moyen terme était de mettre en place des cartes de risques des leishmanioses en Europe et de meilleurs outils de surveillance et de prévention de ces maladies.

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

3.5.9. 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 pour déterminer leur résolutivité et leur valeur pratique. Deux articles ont été publiés par le groupe sur ce sujet :

Van der Auwera G, Maes I, De Doncker S, Ravel C, Cnops L, Van Esbroeck M, Van Gompel A, Clerinx J, Dujardin JC. Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. *Euro Surveill.* 2013;25;18(30):20543-51.

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

Par ailleurs, en 2014, avec le soutien de l'ESCMID et la participation de UKNEQAS, une évaluation externe de la qualité (EEQ) portant sur l'identification moléculaire des différentes espèces de *Leishmania* a été mise en place. Le CNR-L a en particulier fourni le matériel nécessaire à la réalisation de ces tests. Les résultats de ce travail ont été publiés en 2015 :

Van der Auwera G, Bart A, Chicharro C, Cortes S, Davidsson L, Di Muccio T, Felger I, Paglia MG, Grimm F, Harms G, Jaffe CL, Kortbeek T, Maes I, Manser M, Ravel C, Robert-Gangneux F, Toz S, Verweij JJ, Chiodini P. Comparison of *Leishmania* species typing results in 17 european clinical laboratories. *Tropical Medicine & International Health* 2015;20: 34-35.

3.5.10. 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) a été mise au point en parallèle dans deux Centres collaborateurs du CNR, Marseille (Pr R. Piarroux) et Pitié-Salpêtrière (Pr P. Buffet) en collaboration avec le CNR. Toutes deux ont donnant lieu à publication:

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

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

Le niveau de résolution obtenu par cette méthode d'identification est excellent et, de façon surprenante, pourrait descendre jusqu'au niveau du zymodème. Cette étude est poursuivie à l'heure actuelle dans le Laboratoire, toujours avec le Centre Collaborateur de Marseille, avec la création d'une banque de spectres plus étendue. L'étude implique en particulier le Laboratoire-Associé de Cayenne.

3.5.11. Autres travaux de recherche en santé humaine avec les Centres Collaborateurs de Marseille et Nice

Une autre étude a eu lieu avec les Centres Collaborateurs des CHU de Marseille (Pr. R. PIARROUX) et Nice (Pr. P. MARTY) portant sur l'étude de la chimiorésistance des *Leishmania* provenant d'isolats des rives de la Méditerranée. Cette collaboration engagée en 2011 avec la cession de 142 souches de notre collection, s'est poursuivie avec la cession de 71 nouvelles souches en 2012. Les travaux ont donné lieu à une publication :

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

Par ailleurs, une collaboration avec le Centre Collaborateur du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nice (Pr. P. MARTY) a porté sur la caractérisation par microsatellites de

souches de *Leishmania* des foyers du Sud de la France. La collaboration sur ce thème a donné lieu à la cession de 202 souches de notre collection du foyer des Alpes-Maritimes depuis 2009. Ces travaux ont également donné lieu à publication :

Pomares C, Marty P, Bañuls AL, Lemichez E, Pratlong F, Faucher B, Jeddi F, Moore S, Michel G, Aluru S, Piarroux R, Hide M. Genetic Diversity and Population Structure of *Leishmania infantum* from Southeastern France: Evaluation Using Multi-Locus Microsatellite Typing. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(1):e0004303

3.5.12. Collaboration avec le Centre Collaborateur en Santé animale de l'ANSES en matière de leishmanioses animales

Durant ce dernier quinquennal, le Dr Mohamed Kasbari (LSA-ANSES) a mené à bien, en collaboration avec le CNR, plusieurs projets dans ce domaine.

a) Etude des voies de transmission non conventionnelle (non vectorielle), transplacentaire et vénérienne de *Leishmania infantum* et implication dans la dynamique d'émergence et de dissémination des foyers ectopiques de leishmaniose canine en zone indemne

De 2010 à 2015, un lourd programme de recherche portant sur l'évaluation de la possibilité et de l'efficacité d'une transmission de *L. infantum* par les voies transplacentaire et vénérienne chez des chiens naturellement infectés et des rongeurs a été conduit en milieu confiné en animalerie de niveau de sécurité A2 (CRBM, ENVA) et au Laboratoire de Santé Animale LSA-ANSES de Maisons-Alfort.

Ces travaux ont permis de démontrer sans ambiguïté que ces voies non conventionnelle de transmission étaient une réalité à prendre en compte pour la lutte contre la maladie notamment en raison des fréquences de transmission très élevées (plus de 50%) mises en évidence aussi bien chez des animaux infectés symptomatiques que chez les individus asymptomatiques. Par ailleurs, chez les animaux issus d'un élevage professionnel infecté, la semence des mâles de seconde génération (F1) arrivés à maturité sexuelle a pu être prélevée et le parasite viable (et non plus seulement l'ADN) a pu être isolé à partir de la semence fraiche, montrant l'infectiosité potentielle de la semence des mâles infectés et soulevant un nouveau problème pour les centres d'insémination artificielle canine.

L'étude a permis également de montrer que la transmission vénérienne est bidirectionnelle, d'un mâle infecté vers une femelle saine mais également de la femelle infectée vers un male sain, et non uniquement unidirectionnelle (mâle vers femelle) comme suggéré par de précédents travaux.

Ces études ont par ailleurs permis de proposer des mesures de lutte plus adaptées pour protéger les territoires et/ou élevages indemnes de l'introduction de reproducteurs infectés. Elles font l'objet:

- d'un article publié dans la revue Parasites and Vectors :

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: implication for new control measures and recommendations on importation of dogs.* Parasit. Vectors. 2016;9:108.

- d'un article soumis,
- de 3 publications en préparation et d'une thèse de doctorat soutenue en 2016.

b) Evaluation de l'exposition des populations humaines et animales aux phlébotomes vecteurs, en zone et hors-zone d'endémie en France

Le projet "**PhlebExpo**" (2012-2015), projet de recherche financé par l'ANSES (appel d'offres Environnement-Santé-Travail 2011) et porté par 3 équipes, l'EA ANSES-Université de Reims "Vecpar" (Pr J. Depaquit), le Laboratoire Santé Animale de l'ANSES à Maisons-Alfort (Dr M. Kasbari) et le CNR-L (Dr. C. Ravel) avait pour objectif d'évaluer le niveau d'exposition réelle, sur le terrain, des populations humaine et animale aux piqûres de phlébotomes en zone d'endémie de leishmaniose, mais également hors zone d'endémie, et ce, à l'aide de tests ELISA et Western blot basés sur les antigènes salivaires de phlébotomes, et capable de détecter chez l'homme et le chien, les anticorps anti-salive du vecteur, biomarqueurs reconnus d'exposition aux piqûres.

Après la mise en place d'élevage de phlébotome dans l'unité Vecpar, et le développement de deux modèles animaux expérimentaux, murin et canin, d'exposition aux piqures de phlébotomes *P. duboscqi* et *P. mascittii* (d'élevage) et *P. perniciosus* (capturés),
a été développée une technique ELISA de détection des anticorps chez les animaux piqués par *P. perniciosus*. Cette technique a ensuite été utilisée dans le cadre d'enquêtes séro-épidémiologiques de terrain menées chez le chien, sur plus de 600 sérums collectés auprès d'éleveurs et de vétérinaires de la zone d'endémie, de la zone tampon, et hors zone d'endémie de la leishmaniose.

Les résultats préliminaires ont permis de montrer :
- qu'en zone d'endémie, la séroprévalence de la leishmaniose canine était comprise entre 6 % et 26.6 % selon le département considéré; et celle de l'exposition aux piqures de phlébotomes pouvait être très élevée (jusqu'à 73%);
- en dehors de la zone d'endémie habituelle de la maladie, l'existence d'une exposition de faible intensité aux piqures de *P. perniciosus* de chiens autochtones, notamment dans les départements de la Loire, Saône-et-Loire, Allier, et Jura.

En revanche, nous n'avons pas dépisté de chiens exposés dans les départements de la zone non-endémique de la façade atlantique (hormis en Gironde) que certains modèles prédictifs désignent comme à risque potentiel de transmission.

Ces premiers résultats faisant état d'une avancée du risque leishmanien à travers le couloir rhodanien plutôt que le long de la façade atlantique devront néanmoins être confirmés avec un nombre plus important d'animaux prélevés par département dans le cadre de travaux encore en cours. Ce travail doit également être prochainement soumis dans un journal international.

3) Etude de la compétence vectorielle du phlébotome *Phlebotomus mascittii*

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

A partir de 2011, 4 essais d'infection expérimentale de *P. mascittii* d'élevage nourris sur des chiens infectés malades ont été conduits en animalerie confinée de niveau 2 à Maisons-Alfort (ENVA, CRBM) par le LSA de l'ANSES (Dr. M. Kasbari) et l'EA 4688 Anses "Vecpar" (Pr J. Depaquit) en collaboration avec l'Université de Heidelberg (Dr Naucke T.J. et Abdo A.). Les premiers résultats faisant intervenir un nombre faible de phlébotomes femelles gorgées (une quarantaine) n'ont pas permis de mettre en évidence de leishmanies infectant le tube digestif des femelles *P. mascittii* après J8 et semblent indiquer pour la première fois une absence ou une très faible compétence vectorielle de *P. mascittii* pour *L. infantum*.

Néanmoins, de nouveaux essais avec une quantité plus importante de femelles *P. mascitti* doivent encore être conduits pour confirmer ou infirmer les résultats de cette première étude, essentiels pour l'évaluation du risque leishmanien en France et en Europe septentrionale. Ce travail doit également faire l'objet d'une prochaine publication.

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

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

Ces études étaient motivées par la grave épidémie de 2011 survenue à la frontière de l'Afghanistan, dans la province de Khyber Pakhtunkhwa (nord-ouest du Pakistan), qui ss poursuit avec des réveils d'épisodes épidémiques encore actuellement, dans les villages autochtones périphériques aux camps de réfugiés (ONU). Elles ont montré que la prévalence de la leishmaniose cutanée a doublé et qu'elle était essentiellement due à *L. tropica*, avec néanmoins la confirmation de l'apparition pour la première fois dans cette région de *L. major* sur des patients migrants mais également autochtones. Ceci pose la question :

- de la pertinence de la stratégie de lutte contre l'épidémie qui n'a jusqu'ici ciblé que les populations de réfugiés/déplacés en oubliant les populations autochtones vivant dans les villages entourant les camps;
- de la nature du réservoir animal impliqué

Afin d'identifier ce dernier, des prélèvements sur différentes espèces animales domestiques et sauvages ont été analysés en sérologie (IFAT, Western blot) et par PCR-RFLP au LSA- ANSES.

Par ailleurs, les premiers résultats de l'enquête entomologique menée dans les foyers ont permis de dresser un inventaire et d'identifier au laboratoire de l'unité EA 4688 ANSES-Vecpar (univ.de Reims, Pr Depaquit) 13 espèces différentes de phlébotomes dont au moins deux espèces vectrices connues pour être impliquées dans la transmission dans ses foyers.

Ces travaux ont fait l'objet d'une communication orale au congrès WorldLeish 5 (Porto de Galinhas, Brésil) en 2013 et 3 publications sont en cours, dont une en cours de re-soumission.

Cette collaboration très fructueuse, tant du point de vue scientifique qu'en matière de santé publique, a ainsi permis :

i) la mise en place des outils de diagnostic de la leishmaniose humaine et animale dans une zone géographique reculée où ils faisaient défaut;

ii) d'identifier les vecteurs phlébotomes locaux impliqués dans les épidémies au Pakistan, et de former un enseignant puis plusieurs étudiants à la dissection et à la diagnose des phlébotomes;

iii) d'évaluer l'évolution et l'impact de la leishmaniose en santé publique humaine et animale; iv) de mettre en place un plan de lutte intégrée (réservoir animal, vecteur, Homme (diagnostic et traitement des cas humains) contre la maladie adaptée aux conditions locales de cette province reculée du Nord-Ouest du Pakistan qui paie jusqu'à présent un lourd tribut aux épidémies successives.

3.5.14. Autres travaux collaboratifs en recherche

Plusieurs collaborations menées avec **des équipes françaises ou étrangères** (Cameroun, Ecuador, Grèce, Mali, Palestine, Sri Lanka, Thaïlande) ont donné lieu à publication au cours de la période (cf. Liste des Publications), témoignant du rayonnement international du CNR-L.

Des collaborations de longue date ont été poursuivies avec des équipes françaises (Dr Nicole Desbois, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Fort de France) ou étrangers (Maria Antoniou, Laboratory of Clinical Bacteriology, Parasitology, Zoonoses and Geographical Medicine, Faculty of Medicine, University of Crete; Joaquina Martin-Sanchez, Departamento de

Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Espagne). Ces travaux, concernant la taxonomie des *Leishmania* et l'épidémiologie des Leishmanioses, ont donné lieu à plusieurs publications (cf. Liste des Publications).

Un projet en collaboration avec l'**UMR 5086 CNRS-Université Lyon 1** (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Pr. Sylvie Ricard-Blum) s'est déroulé entre 2009 et 2014. Le projet portait sur la physiopathologie des leishmanioses, plus précisément sur les interactions entre le parasite et la matrice extra-cellulaire. Cette collaboration a donné lieu à une publication en 2014 :

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

Une collaboration avec l'**Université de Lausanne (Department of Biochemistry**, Pr. N. Fasel et Dr C. Ronet), engagée depuis 2010 a concerné la mise en évidence de virus chez certaines espèces de *Leishmania* du Nouveau Monde qui sont en rapport avec une pathogénicité accrue du parasite, en particulier avec la production de métastases muqueuses à distance.

Ces travaux ont donné lieu à une communication orale au 5th World Congress on Leishmaniasis (Porto de Galinhas, Brésil) et deux publications internationales :

- Zangger H, Ronet C, Desponds C, Kuhlmann FM, Robinson J, Hartley MA, Prevel F, Castiglioni P, Pratlong F, Bastien P, Müller N, Parmentier L, Saravia NG, Beverley SM, Fasel N. Detection of *Leishmania* RNA virus in *Leishmania* parasites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1) : e2006.
- Bourreau E, Ginouves M, Prévot G, Hartley MA, Gangneux JP, Robert-Gangneux F, Dufour J, Sainte-Marie D, Bertolotti A, Pratlong F, Martin R, Schütz F, Couppié P, Fasel N, Ronet C. Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse. *J Infect Dis*. 2016 Jan 1;213(1):105-11

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

- Valdivia HO, Reis-Cunha JL, Rodrigues-Luiz GF, Baptista RP, Baldeviano GC, Gerbasi RV, Dobson DE, Pratlong F, Bastien P, Lescano AG, Beverley SM, Bartholomeu DC. Comparative genomic analysis of *Leishmania (Viannia) peruviana* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *BMC Genomics*. 2015;16:715.

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

- Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ, Messina JP, Balard Y, Bastien P, Pratlong F, Brownstein JS, Freifeld CC, Mekaru SR, Gething PW, George DB, Myers MF, Reithinger R, Hay SI. Global distribution maps of the leishmaniases. e-*Life*. 2014; 27,3. doi: 10.7554/eLife.02851.
- Pigott DM, Golding N, Messina JP, Battle KE, Duda K, Balard Y, Bastien P, Pratlong F, Brownstein JS, Freifeld CC, Mekaru SR, Madoff LC, George DB, Myers MF, Hay SI. Global database of leishmaniasis occurrence locations, 1960–2012. *Sci Data*. 2014;1:140036.

4. Liste des publications 2011-2015

L'activité du CNR Leishmania est génératrice d'un nombre élevé de publications et de communications, elles-mêmes à l'origine d'une visibilité importante aux niveaux national et international.

Toutes ces 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).

4.1. Publications nationales

Chargui N, Haouas N, Jaouadi K, Gorcii M, Pratlong F, Dedet JP, Mezhoud H, Babba H. Usefulness of a PCR-based method in the detection and species identification of *Leishmania* from clinical samples. Pathol Biol (Paris) 2012 ;60(6):e75-9.

Dedet JP, Carme B, Desbois N, Bourdoiseau G, Lachaud L, Pratlong F. Épidémiologie des leishmanioses autochtones en France métropolitaine et d'outre-mer. Presse Med. 2013;42(11):1469-81.

Dedet J.P., Pratlong F., Bastien P. Existe-t-il un risque d'installation d'une nouvelle espèce de *Leishmania* en France méditerranéenne. Bulletin épidémiologique Santé animale-alimentation, 2015, 66 : 70.

4.2. Publications internationales

Aït-Oudhia K, Gazanion E, Sereno D, Oury B, Dedet JP, Pratlong F, Lachaud L. In vitro susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. Vet Parasitol. 2012; 187(3-4):386-93.

Berdjane-Brouk Z, Koné AK, Djimdé AA, Charrel RN, Ravel C, Delaunay P, del Giudice P, Diarra AZ, Doumbo S, Goita S, Thera MA, Depaquit J, Marty P, Doumbo OK, Izri A. First detection of *Leishmania major* DNA in *Sergentomyia (Spelaeomyia) darlingi* from cutaneous leishmaniasis foci in Mali. PLoS One. 2012;7(1):e28266.

Bualert L, Charungkiattikul W, Thongsuksai P, Mungthin M, Siripattanapipong S, Khositnithikul R, Naaglor T, Ravel C, El Baidouri F, Leelayoova S. Autochthonous disseminated dermal and visceral leishmaniasis in an AIDS patient, southern Thailand, caused by *Leishmania siamensis*. Am J Trop Med Hyg. 2012;86(5):821-4.

Christodoulou V, Antoniou M, Ntais P, Messaritakis I, Ivovic V, Dedet JP, Pratlong F, Dvorak V, Tselentis Y. Re-emergence of visceral and cutaneous leishmaniasis in the Greek Island of Crete. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012 Mar;12(3):214-22.

Cojean S, Houzé S, Haouchine D, Huteau F, Lariven S, Hubert V, Michard F, Bories C, Pratlong F, Le Bras J, Loiseau PM, Matheron S. *Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker. Emerg Infect Dis. 2012;18(4):704-6.

Gouzelou E, Haralambous C, Amro A, Mentis A, Pratlong F, Dedet JP, Votypka J, Volf P, Toz SO, Kuhls K, Schönian G, Soteriadou K. Multilocus microsatellite typing (MLMT) of strains from Turkey and Cyprus reveals a novel monophyletic *L. donovani sensu lato* group. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(2):e1507.

Haouas N, Chaker E, Chargui N, Gorcii M, Belhadj S, Kallel K, Aoun K, Akrout FM, Ben Said M, Pratlong F, Dedet JP, Mezhoud H, Lami P, Zribi M, Azaiez R, Babba H. Geographical distribution updating of Tunisian leishmaniasis foci: about the isoenzymatic analysis of 694 strains. Acta Trop. 2012;124(3):221-8.

Jaouadi K, Depaquit J, Haouas N, Chaara D, Gorcii M, Chargui N, Dedet JP, Pratlong F, Boubabous R, Babba H. Twenty-four new human cases of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania killicki* in Metlaoui, southwestern Tunisia: probable role of Phlebotomus sergenti in the transmission. Acta Trop. 2012 Jun;122(3):276-83.

Kasbari M, Ravel C, Harold N, Pesson B, Schaffner F, Depaquit J. Possibility of leishmaniasis transmission in Jura, France. Emerg Infect Dis. 2012;18(6):1030.

Libert C, Ravel C, Pratlong F, Lami P, Dereure J, Keck N. *Leishmania infantum* infection in two captive barbary lions (*Panthera leo leo*). J Zoo Wildl Med. 2012;43(3):685-8.

Mansouri R, Pratlong F, Bachi F, Hamrioui B, Dedet JP. The first isoenzymatic characterizations of the *Leishmania* strains responsible for cutaneous leishmaniasis in the area of Annaba (eastern Algeria). Open Conf. Proc. J, 2012, 3 (suppl 2-M2) 6-11.

Ngouateu OB, Kollo P, Ravel C, Dereure J, Kamtchouing P, Same-Ekobo A, von Stebut E, Maurer M, Dondji B. Clinical features and epidemiology of cutaneous leishmaniasis and *Leishmania major*/HIV co-infection in Cameroon: results of a large cross-sectional study. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2012;106(3):137-42.

Pratlong F, Lami P, Ravel C, Balard Y, Dereure J, Serres G, Baidouri FE, Dedet JP. Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and L*eishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. Parasitology 2012, 12:1-12.

Ranasinghe S, Zhang WW, Wickremasinghe R, Abeygunasekera P, Chandrasekharan V, Athauda S, Mendis S, Hulangamuwa S, Matlashewski G, Pratlong F. *Leishmania donovani* zymodeme MON-37 isolated from an autochthonous visceral leishmaniasis patient in Sri Lanka. Pathog Glob Health. 2012; 106(7):421-4.

Vase MØ, Hellberg YK, Larsen CS, Petersen E, Schaumburg H, Bendix K, Ravel C, Bastien P, Christensen M, d'Amore F. Development of splenic marginal zone lymphoma in a HIV-negative patient with visceral leishmaniasis. Acta Haematol. 2012;128(1):20-2.

Zapata S, Mejía L, Le Pont F, León R, Pesson B, Ravel C, Bichaud L, Charrel R, Cruaud C, Trueba G, Depaquit J. A study of a population of *Nyssomyia trapidoi* (Diptera: Psychodidae) caught on the Pacific coast of Ecuador. Parasit Vectors. 2012;5:144.

Lachaud L, Dedet JP, Marty P, Faraut F, Buffet P, Gangneux JP, Ravel C, Bastien P; & the Working Group for the Notification of Human Leishmanioses in France. Surveillance of leishmanioses in France, 1999 to 2012. *Euro Surveill*. 2013 ;18(29): 20534-40.

El Baidouri F, Diancourt L, Berry V, Chevenet F, Pratlong F, Marty P, Ravel C. Genetic structure and evolution of the *Leishmania* genus in Africa and Eurasia: what does MLSA tell us. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 ; 7(6): e2255.

Pratlong F, Lami P, Ravel C, Balard Y, Dereure J, Serres G, El Baidouri F, Dedet JP. Geographical distribution and epidemiological features of Old World *Leishmania infantum* and *Leishmania donovani* foci, based on the isoenzyme analysis of 2277 strains. *Parasitology*. 2013 ;140(4): 423-34.

Morizot G, Kendjo E, Mouri O, Thellier M, Pérignon A, Foulet F, Cordoliani F, Bourrat E, Laffitte E, Alcaraz I, Bodak N, Ravel C, Vray M, Grogl M, Mazier D, Caumes E, Lachaud L,

Buffet PA. Travelers with cutaneous leishmaniasis cured without systemic therapy. *Clin Infect Dis.* 2013;57(3):370-80.

Roger A, Nacher M, Hanf M, Drogoul AS, Adenis A, Basurko C, Dufour J, Sainte Marie D, Blanchet D, Simon S, Carme B, Couppié P. Climate and leishmaniasis in French Guiana. Am J Trop Med Hyg. 2013; 89(3):564-9.

Van der Auwera G, Maes I, De Doncker S, Ravel C, Cnops L, Van Esbroeck M, Van Gompel A, Clerinx J, Dujardin JC. Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. *Euro Surveill.* 2013;25;18(30):20543-51.

Larréché S, Launay G, Weibel Galluzzo C, Bousquet A, Eperon G, Pilo JE, Ravel C, Chappuis F, Dupin M, Mérens A. Cluster of zoonotic cutaneous leishmaniasis (*Leishmania major*) in European travelers returning from Turkmenistan. *J Travel Med*. 2013;20(6):400-2.

Faiman R, Abbasi I, Jaffe C, Motro Y, Nasereddin A, Schnur LF, Torem M, Pratlong F, Dedet JP, Warburg A.A. Newly Emerged Cutaneous Leishmaniasis Focus in Northern Israel and Two New Reservoir Hosts of *Leishmania major*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(2) : e2058.

Zangger H, Ronet C, Desponds C, Kuhlmann FM, Robinson J, Hartley MA, Prevel F, Castiglioni P, Pratlong F, Bastien P, Müller N, Parmentier L, Saravia NG, Beverley SM, Fasel N. Detection of *Leishmania* RNA virus in *Leishmania* parasites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1) : e2006.

Jaouadi K, Haouas N, Chaara D, Boudabous R, Gorcii M, Kidar A, Depaquit J, Pratlong F, Dedet JP, Babba H. Phlebotomine (Diptera, Psychodidae) bloodmeal sources in Tunisian cutaneous leishmaniasis foci : could *Sergentomia minuta*, which is not an exclusive herpetophilic species, be implicated in the transmission of pathogens ? *Ann. Entomol. Soc. Am*. 2013; 106 (1) : 79-85.

Ntais P, Sifaki-Pistola D, Christodoulou V, Messritakis I, Pratlong F, Poupalos G, Antoniou M. Leishmaniases in Greece. *Am J Trop Med Hyg*. 2013 ;89(5) : 906-15

Gouzelou E, Haralambous C, Antoniou M, Christodoulou V, Martinković F, Zivičnjak T, Smirlis D, Pratlong F, Dedet JP, Ozbel Y, Toz So, Presber W, Schönian G, Soteriadou K. Genetic diversity and structure in *Leishmania infantum* populations from southeastern Europe revealed by microsatellite analysis. *Parasit Vectors*. 2013; 6(1) : 342-60.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pigott DM, Golding N, Messina JP, Battle KE, Duda K, Balard Y, Bastien P, Pratlong F, Brownstein JS, Freifeld CC, Mekaru SR, Madoff LC, George DB, Myers MF, Hay SI. Global database of leishmaniasis occurrence locations, 1960–2012. *Sci Data*. 2014;1:140036.

Amarir F., Sebti F., Fellah H., Pratlong F., Dedet J.P., Hmamoucha A., Abassi I., Rhajaoui M. Epidemiological characteristic of a new focus of Cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Settat, Morocco. Acta Trop. 2015; 150 : 116-121.

Bastien P, Volf P, Depaquit J, Dondji B, Gallego M, Gangneux JP, Izri A, Marty P, Piarroux R,

Pratlong F, Dedet JP. Comments on *Leishmania major* in Gorilla Feces (Letter). J Infect Dis. 2015; 212(3):505-6.

Austrup J, Ntais P, Christodoulou V, Dedet JP, Pratlong F, Karanis P, Antoniou M. Frequency of MDR 1-related p-gp overexpression in Greek *Leishmania* isolates. Parasitol Res. 2015; 114(9):3565.

Chaara D, Ravel C, Bañuls A, Haouas N, Lami P, Talignani L, El Baidouri F, Jaouadi K, Harrat Z, Dedet JP, Babba H, Pratlong F. Evolutionary history of *Leishmania killicki* (synonymous *Leishmania tropica*) and axonomic implications. Parasit Vectors. 2015; 8:198.

Shaw J, Pratlong F, Floeter-Winter L, Ishikawa E, El Baidouri F, Ravel C, Dedet JP. Characterization of *Leishmania (Leishmania) waltoni n.sp*. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), the Parasite Responsible for Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in the Dominican Republic. Am J Trop Med Hyg. 2015; 93(3):552-8.

Valdivia HO, Reis-Cunha JL, Rodrigues-Luiz GF, Baptista RP, Baldeviano GC, Gerbasi RV, Dobson DE, Pratlong F, Bastien P, Lescano AG, Beverley SM, Bartholomeu DC. Comparative genomic analysis of *Leishmania (Viannia) peruviana* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. BMC Genomics. 2015; 16:715.

Chaara D, Bañuls AL, Haouas N, Talignani L, Lami P, Mezhoud H, Harrat Z, Dedet JP, Babba H, Pratlong F. Comparison of *Leishmania killicki* (syn. *L. tropica*) and *Leishmania tropica* Population Structure in Maghreb by Microsatellite Typing. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(12):e0004204.

Hendrickx S, Mondelaers A, Eberhardt E, Lachaud L, Delputte P, Cos P, Maes L. Intracellular amastigote replication may not be required for successful in vitro selection of miltefosine resistance in *Leishmania infantum*. Parasitol Res. 2015; 114(7):2561-5.

Martin-Blondel G, Iriart X, El Baidouri F, Simon S, Mills D, Demar M, Pistone T, Le Taillandier T, Malvy D, Gangneux JP, Couppié P, Munckhof W, Marchou B, Ravel C, Berry A. Outbreak of *Leishmania braziliensis* Cutaneous Leishmaniasis, Saül, French Guiana. Emerg Infect Dis. 2015; 21(5):892-4.

Liautaud B, Vignier N, Miossec C, Plumelle Y, Kone M, Delta D, Ravel C, Cabié A, Desbois N. First case of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania martiniquensis*. Am J Trop Med Hyg. 2015; 92(2):317-9

Haouas N, Remadi L, Chaara D, Chargui N, Dabghi R, Jbeniani H, Babba H, Ravel C. Unexpected co-detection of promastigote and amastigote *Leishmania* forms in a human cutaneous lesion: implications for leishmaniasis physiopathology and treatment. Diagn Microbiol Infect Dis. 2015; 81(1):18-20.

Van der Auwera G, Bart A, Chicharro C, Cortes S, Davidsson L, Di Muccio T, Felger I, Grazia Paglia M, Grimm F, Harms G, Jaffe CL, Kortbeek T, Maes I, Manser M, Ravel C, Robert-Gangneux F, Toz S, Verweij JJ, Chiodini P. Comparison of *Leishmania* species typing results in 17 European clinical laboratories. Tropical Medicine and International Health, 2015, 20 (suppl 1), 1–147.

Henry B, Morizot G, Blum J, Van der Auwera G, Clerinx J, Harms G, Bart A, Armstrong M, Ravel C, Robert-Gangneux F, Gangneux JP, Felger I, Bailey M, Grogl M, Lockwood D, Buffet P.

Worldwide diversity of leishmaniasis: harmonized collection of data and isolates by the European "LeishMan" network: the LeishMan Network. Tropical Medicine and International Health, 2015, 20 (suppl 1), 1–147.

Murat JB, Maubon D, Ravel C, Templier I, Epaulard O. Superiority of local antimoniate over systemic liposomal amphotericin B therapy in a *Leishmania infantum* cutaneous leishmaniasis. Journal of Medical Microbiology Case Reports, 2015, doi:10.1099/jmmcr.0.000068.

4.3. Chapitres de livres

Couppié P. Leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses. *In:* Thérapeutique dermatologique. Fondation René Touraine. Masson Eds., Paris, 2012.

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

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

Bastien P., Marty P. Chapitre " Leishmaniose". *In :* Référentiel en microbiologie médicale (Rémic 5.2), Société Française de Microbiologie, 2015: pp. 799-802.

4.4. Communications à congrès nationaux

El Baidouri F., Morelle C., Marty P., Ravel C. Structure génétique et évolution du genre *Leishmania* : validité de l'approche MLSA (Comm. orale). Société Française de Parasitologie, Rennes, 9-11 mai 2012.

Bourgeois N., Touzet O., Sterkers Y., Lachaud L., Pagès M., Bastien P. Aneuploïdie mosaïque et adaptation chez *Leishmania* (Comm. orale). Société Française de Parasitologie, Rennes, 9-11 mai 2012.

Morelle C., Ceballos P., Amigues L., Fegueux N., Bastien P., Sterkers Y. Leishmaniose viscérale après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (Comm. affichée). Société Française de Parasitologie, Rennes, 9-11 mai 2012.

Couppié P, Sainte Marie D, Dufour J. Leishmniose cutanée – infection à Mycobacterium ulcerans (ulcère de Buruli) : rappels et actualités 2012. Journées Dermatologiques, 2012, Paris.

Lachaud L., Carme B., Marty P., Faraut F., Buffet P., Gangneux J.P., Simon S., Ravel C., Kasbari M., Desbois N., Pratlong F., Dedet J.P., Bastien P. & le Groupe de Travail pour la Déclaration des cas de Leishmanioses. La surveillance des leishmanioses en France métropolitaine et dans les territoires ultra-marins de 1999 à 2012 (Comm. orale). Société Française de Parasitologie, Dijon, 15-16 Mai 2013.

Vignier N., Liautaud B., Miossec C., Plummel Y., Ravel C., Desbois N., Cabie A.. Premier cas de leishmaniose viscérale autochtone en Martinique due à une *Leishmania* récemment décrite (Comm. affichée). Journée Nationales d'Infectiologie, Clermont Ferrand, 13-15 Juin 2013.

Benet D.E., Samanta K., Kebe M.N., Kajava A., Pagès M., Coux O., Fernandez J.F., Bastien P. Le complexe mitochondrial de type protéasome HslVU : une cible thérapeutique potentielle chez *Leishmania* (Comm. orale). 6ème Journée d'Echanges sur les Leishmanioses, Montpellier, 26 Sept. 2013.

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

4.5. Communications à congrès internationaux

Beverley S.M., Lye L.F., Owens K., Hickerson S.M., Kuhlmann F.M., Acino E., Dobson D.E., Akopyants N., Pratlong F., Bastien P., Ronet C., Zangger H., Fasel N. Genomic studies of *Leishmania* and RNA Viruses in South America. British Society for Parasitology, 2-3 Avril 2012, Glasgow, Royaume-Uni

Beverley S.M. and the Trypanosomatid Genome Sequencing Consortium. Genomic studies of *Leishmania* focusing on virulence and RNA interference. *Infectious Disease Genomics and Global Health.* Cold Spring Harbor Asia**,** Suzhou, China, 7-11 Mai 2012

Samanta K., Kebe N.M, Apicella V., Lisowski V., Kajava A., Payrot N., Pagès M., Martinez J., Bastien P., Coux O., Hernandez J.F. HslVU, an ancestral form of the 26S proteasome as a potential target for the treatment of parasitoses due to protozoa (*Leishmania, Trypanosoma*) (Comm. affichée). *32nd European Peptide Symposium*, Athènes, 2-7 Sept. 2012.

Dedet J.P., Pratlong F., Marty P., Faraut F., Pomares C., Faucher B., Bastien P. *Leishmania infantum* tegumentary leishmanisis in Southern France. Retrospective study 1998-2009. (présentation orale). Fifth World Congress on Leishmaniasis, Porto de Galinhas, Brésil, Mai 2013.

Gouzelou E., Haralambous C., Martinkovic F., Pratlong F., Dedet J.P., Christodoulou V., Antoniou M., Ozbel Y., Toz S.O., Presber W., Schonian G., Soteriadou K.S. Inference of the population structure *of Leishmania infantum* from Southeastern Europe focusing on Cyprus, Greece and Turkey (présentation orale). Fifth World Congress on Leishmaniasis, Porto de Galinhas, Brésil, Mai 2013.

Kasbari M., Depaquit J., Ravel C., Dommanget N., Hubert B., Pratlong F., Lami P., Boireau P., Bastien P., Bourdeau P., Dedet J.P., Bourdoiseau G. Importance of transplacental and venereal transmission for canine leishmaniasis emergence, persistence and spread in non-endemic areas in France : strong evidence from the field to the lab. (présentation orale). Fifth World Congress on Leishmaniasis, Porto de Galinhas, Brésil, Mai 2013.

Beverley S.M., Lye L., Akopyants N.S., Dobson D.E., Owens K., Pratlong F., Bastien P., Saravia N., Valdivia H.O., Lucas C.M., Baldeviano G.C., Edgel K.A., Lescano A.G., Dujardin J., Arevalo J., Schiefer A., Carvalho E., Zangger H., Ronet C., Fasel N. Characterization and associations of

RNA viruses of *Leishmania braziliensis.* (présentation orale). Fifth World Congress on Leishmaniasis, Porto de Galinhas, Brésil, Mai 2013.

Chaara D., Banuls A.L., Haouas N., Ravel C., Jaouadi K., Lami P., Talignani L., Dedet J.P., Babba H., Pratlong F. Genetic structure of *Leishmania killicki* populations in Maghreb. (communication affichée). Fifth World Congress on Leishmaniasis, Porto de Galinhas, Brésil, Mai 2013.

Sakru N., Ata A., Velet M., Demir M., Ravel C., Pratlong F. Viceral leishmaniasis : a rarely diagnosed adult case in the Thrace region, Turkey. (communication affichée). Fifth World Congress on Leishmaniasis, Porto de Galinhas, Brésil, Mai 2013.

Jaouadi K., Haouas N., Gorcii M., Kidar A., Pratlong F., Dedet J.P., Babba H. Is leishmaniasis widespread in Tunisia ? First data on *Leishmania killicki* in the province of Gafsa, Southwest Tunisia. (communication affichée). Fifth World Congress on Leishmaniasis, Porto de Galinhas, Brésil, Mai 2013.

Jaouadi K., Haouas N., Gorcii M., Boudabous R., Dahri B., Pratlong F., Dedet J.P., Slim E., Babba H. Cutaneous leishmaniasis in Tunisia : study of the disease reservoir and first detection of *Leishmania killicki* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) in *Ctenodactylus gundi* (Rodentia, Ctenodactylidae). (communication affichée). Fifth World Congress on Leishmaniasis, Porto de Galinhas, Brésil, Mai 2013.

Chaara D., Banuls A.L., Haouas N., Ravel C., Lami P., Talignani L., Dedet J.P., Babba H., Pratlong F. Organisation génétique et évolution spatio-temporelle de *Leishmania killicki* en Tunisie. (Comm. orale). 1ères Journées Franco-Maghrébines de Parasitologie et Mycologie médicale, Rabat, Maroc, Oct. 2013.

Kasbari M., Ravel C., Depaquit J., Dommanget N., Hubert B., Pratlong F., Lami P., Boireau P., Bastien P., Bourdeau P., Dedet J.P., Bourdoiseau G. Importance of transplacental and venereal transmission for canine leishmaniasis emergence, persistence and spread in non-endemic areas in France : strong evidence from the field to the lab. (Comm. orale). 1ères Journées Franco-Maghrébines de Parasitologie et Mycologie médicale, Rabat, Maroc, Oct. 2013.

Chaara D., Ravel C., Haouas N., Banuls A.L., Lami P., Talignani L., El Baidouri F., Harrat Z., Dedet J.P., Babba H., Pratlong F. *Leishmania killicki* : un complexe indépendant ou un taxon de *Leishmania tropica* ?. (Comm. affichée). 1ères Journées Franco-Maghrébines de Parasitologie et Mycologie médicale, Rabat, Maroc, Oct. 2013.

Ozbilgin A., Kurt O., Akyar I., Culha G., Zeyrek F., Gunduz C., Oyur T., Pratlong F., Bastien P., Ozbel Y. Leishmaniasis in Turkey: comparison of isoenzyme, real time PCR and MALDI-TOF analyses for the identification of *Leishmania* species in clinical samples (Comm. orale). 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2014), Barcelona, Espagne, Mai 2014.

Ozbilgin A., Culha G., Uzun S., Harman M., Gunasti Topal S., Okudan F., Gunduz C., Bastien P., Pratlong F., Kurt O. Leishmaniasis in Turkey: emerging *Leishmania major* infections in Anatolia (Comm. affichée). 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2014), Barcelona, Espagne, Mai 2014.

Ballart C; González E; Ravel C; Jiménez M; Abras A; Molina R; Portús M, Gállego M. Identification of the blood meal of the *Leishmania infantum* vectors in the Northeast of Spain. 8th International Symposium on Phlebotomine Sandfly, Puerto Iguaçu, Argentina, Sept. 2014.

Van der Auwera G, Bart A, Ravel C, Cortes S, Cruz I, Davidsson L, Felger I, Gramiccia M, Grimm F, Harms-Zwingenberger G, Jaffe C, Kortbeek T, Maes I, Manser M, Nicastri E, Ozbel Y, Robert-Gangneux F, Verweij JJ, Chiodini P. Comparison of *Leishmania* species typing outcomes in 17 European clinical laboratories. 9th European congress on Tropical Medicine and International Health, Bâle, 6-10 Sept. 2015.

4.6. Conférences sur invitation dans congrès et réunions nationaux

Bastien P. Actualités dans le diagnostic des leishmanioses humaines. (Conf. invitée). *5ème Journée d'Actualités Leishmanioses du RESFIZ,* 27 Avril 2012, Nice.

Bastien P. Aspects génétiques des Leishmanioses (Conf. invitée). *6ème Journée d'Actualités Leishmanioses du RESFIZ,* 15 Mars 2014, Monaco.

4.7. Conférences sur invitation dans congrès et réunions internationaux

SterkersY., Lachaud L., Morelle C., Pagès M., Bastien P. Mosaic aneuploidy in *Leishmania*: no need for sex? (Conférence invitée). *31st Annual Swiss Trypanosomatid Meeting,* Leysin, Suisse, 22-24 Janv. 2014.

5. DESCRIPTION DES DEMARCHES QUALITE ET GARANTIES MISES EN ŒUVRE AU SEIN DU LABORATOIRE

5.1. 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. La visite du COFRAC est prévue en 2016.

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.

5.2. 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).

6. DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

6.1. 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.

6.2. 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.

6.3. 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 .

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.

6.4. 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.

7. PROPOSITION DE PROGRAMME DE TRAVAIL QUINQUENNAL POUR LA PERIODE 2017-2021

Le programme d'activité pour les cinq 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.

7.1. Activités d'Expertise

7.1.1. Réseau de partenaires

Le CNR-L a un réseau de partenaires étendus, autant en métropole qu'en Guyane Française.

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 sera à nouveau tenté en raison de l'envoi de contingents dans des zones d'endémie de leishmaniose, ce qui leur confère une situation en première ligne pour ce qui concerne les cas d'importation.

De même, 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 liens seront resserrés entre Montpellier et le L-A de Cayenne, dans le but de fluidifier les relations et d'établir des collaborations plus étroites. Patrick Bastien doit se rendre à l'automne 2016 à Cayenne pour une visite sur place afin de mieux évaluer les contraintes imposées et les potentialités offertes au L-A. Des réunions en métropole seront proposées à l'occasion de visites du nouveau responsable du L-A, Magalie Demar.

7.1.2. 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.

7.1.3. Identification des Leishmania

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

- l'identification moléculaire, devenu le typage de référence dans notre structure ; à noter que seule cette méthode autorise un typage des *Leishmania* in situ dans les échantillons humains.
- le typage par MALDI-TOF qui sera évalué de façon exhaustive (voir ci-dessous). Pour les souches, cette technique rapide et bon marché pourrait remplacer en partie l'identification moléculaire. Elle pourrait être en particulier très utile pour la gestion de la Collection du CNR.

Quand le nombre d'échantillons traités sera suffisant, ces comparaisons techniques pourront être publiées et éventuellement donner lieu à des collaborations scientifiques avec d'autres structures.

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

7.1.3.1. 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.

7.1.3.2. 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.

Les premiers résultats montrent que cette technique permettra à terme de faire une pré-identification de l'espèce dans un délai extrêmement court à partir de parasites en culture. Un échantillonnage de 121 souches formellement identifiées par le CNR-L et couvrant 33 espèces différentes de Leishmanies (*L. major, L. infantum, L. tropica, L. donovani, L. aethiopica, L. amazonensis, L. panamensis, L. mexicana, L. braziliensis, L. guyanensis*) est actuellement utilisé pour la mise au point d'une technique d'obtention d'empreintes ("spectres") et pour la création d'une banque d'empreintes de référence. Cette banque d'empreintes permettra ensuite l'identification de nouvelles souches isolées de prélèvements humains. Un typage au niveau infra-spécifique sera recherché. Ce projet sera poursuivi avec le Pr R. Piarroux, qui créera un nouveau Centre Collaborateur à Paris (Pitié-Salpêtrière) où il prendra ses nouvelles fonctions au 1er Janvier 2017.

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

Une fois la mise au point terminée et la technique validée, elle pourra être étendue à l'ensemble des souches stockées ou reçues au laboratoire dans le cadre du 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.

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 nous permettra de corréler les rendus entre les techniques de séquençage, du MALDI-TOF et de la RFLP-PCR.

7.1.4. Maintien et dynamique de la Collection de souches (Montpellier)

La Collection internationale de souches de *Leishmania* du CNR-L est décrite au § 2.4.5. Son maintien 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.

7.1.4.1. 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, Dr Francine Pratlong, en 2014-2015, 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 poursuivra cette entreprise 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'infectivité 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.

7.1.4.2. 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.

7.1.4.3. Enrichissement du catalogue de souches en ligne

A la suite de ce contrôle minutieux de tous les renseignements accompagnant les souches, le travail d'incrémentation de souches dans le catalogue en ligne (cf. § 3.2.7) sera poursuivi par L. Lachaud avec Patrick Lami, Loic Talignani et Yves Balard.

7.1.4.4. Réception des souches

Les souches reçues durant les années à venir continueront à alimenter la Collection internationale. Notre statut de centre d'identification assure en effet un recrutement en souches provenant de l'ensemble des CHU et CHG français ainsi que d'équipes du monde entier.

Le CNR pourra également, comme il l'a fait par le passé, accepter en dépôt pour conservation les collections de diverses équipes confiées pour sauvegarde dans une structure de référence. Sur recommandation de l'Organisation Mondiale de la Santé, nous recevrons également en dépôt les souches correspondant aux différentes espèces décrites, ainsi que les souches objets de recherches approfondies et servant de modèles, en particulier pour les études de séquençage à haut débit.

Le dépôt de souches s'accompagnera à l'avenir d'un contrat de cession.

7.1.4.5. Mise à disposition des ressources de la collection

Le CNR continuera à assurer une diffusion des souches à la demande, selon les modalités éprouvées, respectant les règles déontologiques édictées par l'OMS en 1984 et adaptées aux évolutions actuelles :

- la règle suivante sera appliquée dans la mesure du possible : toute souche reste la propriété de la personne qui l'a isolée pendant trois ans, délai au-delà duquel elle peut être fournie, sans accord avec l'isoleur, à toute équipe la demandant (recommandations de l'OMS) ;
- toutefois, le CNR-L laissera la possibilité au donneur de demander un "embargo" pendant une période de 5 ans, renouvelable une fois, pour qu'il puisse continuer à effectuer ses recherches sur ces souches pendant la période impartie.
- toute mise à disposition de souche est assortie d'un contrat de mise à disposition de matériel biologique (MTA : material transfer agreement).

7.1.4.6. 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.

7.1.5. 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. § 7.1.3.2 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.
- **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 cutanéo-muqueuses : prélèvements de biopsies cutanées, étalement de lames, coloration des lames et lecture.
- **Amélioration du recueil de données épidémio-cliniques.** 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 entrainé 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.

7.1.6. Recherche en lien direct avec l'activité du CNR

7.1.6.1. 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.

La mise en place d'un système d'évaluation externe de la qualité (EEQ) pour l'identification des espèces de *Leishmania* s'est poursuivie en 2015, avec le soutien de l'ESCMID et la participation de UK NEQAS®. 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*.

7.1.6.2. Recherche en santé humaine en collaboration avec les Centres Collaborateurs du CNR

Le futur **Centre Collaborateur de Paris Pitié-Salpêtrière** (Pr. R. Piarroux) a prévu un projet de recherche en collaboration avec le CNR-L sur l'épidémiologie et la biogéographie de la leishmaniose viscérale autochtone dans le Languedoc-Roussillon, la deuxième région la plus touchée par cette maladie en France. Le CC sait utiliser de manière systématique les Systèmes d'Informations Géographiques associés aux logiciels de modélisation afin de représenter et d'analyser l'épidémiologie de la leishmaniose autochtone. Ce travail, particulièrement intéressant dans un contexte d'extension potentielle du territoire touché par la maladie, a été réalisé avec succès sur la région Provence-Alpes Côte d'Azur et notamment sur le foyer provençal; il sera généralisé au pourtour méditerranéen français.

7.1.6.3. 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 à *L. infantum* est une cause majeure de pathologie canine 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[16]. L'importance de cette affection chez le chien tient évidemment à son **rôle de réservoir** du parasite, rendant indissociable la lutte contre la maladie chez le chien et celle chez l'homme. Les zones endémiques sont en effet forcément les mêmes pour l'un et pour l'autre. 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 (voir § 3.3.3.3).

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). Les Centres Collaborateurs en santé animale ont été décrits au début de ce rapport. La fructueuse collaboration avec le Dr Mohamed Kasbari (LSA de l'ANSES) mérite tout particulièrement d'être poursuivie. Cependant, en la matière, le dernier trimestre 2016 sera capital dans les orientations stratégiques de la période quinquennale à venir. Les activités à l'ANSES demeurent en effet suspendues à une prochaine décision de la nouvelle direction de l'Agence de maintenir ou non la thématique "Leishmaniose animale" dans un contexte de restriction budgétaire et de redistribution des moyens en personnel. La poursuite de cette collaboration dépend donc davantage de décisions impliquant ces structures même, que d'un souhait du seul CNR.

En dépit de cette situation instable, des propositions sont faites ci-dessous pour le prochain quinquennal, qui pourront ou non être réalisées sur le plan national avec le Dr Mohamed Kasbari ou de façon plus locale dans la région du CNR. Plusieurs de ces propositions, en particulier les 4 premières, ont une forte incidence en matière de surveillance.

a) Création d'un réseau d'épidémiosurveillance de la leishmaniose animale.

La création d'un tel réseau formalisé, actuellement inexistant en France, permettrait de capitaliser sur l'ensemble des efforts déjà consentis ces 5 dernières années par le LSA de l'ANSES (cf. § 3.3.3) afin :

[16] 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.

- de détecter rapidement les foyers de leishmaniose canine autochtone, en particulier en zone indemne (moitié Nord de la France) mais également en zone endémique, et de fournir des chiffres de prévalence et incidence annuelle précis et actualisés pour la maladie animale;
- de distinguer après enquête de terrain les foyers autochtones d'origine réellement vectorielle de ceux imputables à une transmission non conventionnelle (transplacentaire, vénérienne, par contact direct, autres) et de mieux apprécier la part relative des deux modes de transmission vectorielle et non vectorielle;
- en conséquence, de confirmer ou non la remontée des vecteurs à partir du Bassin Méditerranéen sur des positions plus septentrionales, et mettre à jour régulièrement et en temps réel l'aire géographique de distribution de la leishmaniose pour détecter précocement un éventuel démarrage du cycle de transmission de la maladie. Les enquêtes de sérologie chez l'animal, plus exposé aux piqures de phlébotomes que l'Homme, peuvent jouer un rôle de "sentinelle" relative pour la progression des leishmanioses humaines.

Pour ce faire, le réseau s'appuiera sur les acteurs compétents existants œuvrant sur le terrain en santé animale, notamment le réseau des LVD (laboratoires vétérinaires départementaux), des cliniques vétérinaires sentinelles volontaires qui ont déjà participé aux précédentes études de terrain menées par l'ANSES, les 4 écoles nationales vétérinaires et peut-être le laboratoire de santé animale LSA de l'ANSES.

b) Poursuite des enquêtes entomologiques

Ces enquêtes seront poursuivies en zone indemne et en zone endémique en étroite collaboration avec l'équipe EA 4788 ANSES "Vecpar" de l'Université de Reims (Pr. J. Depaquit) afin de compléter les données entomologiques relatives à la nature et à la distribution des différentes espèces de phlébotomes pour les départements manquants, et de mettre à jour la carte de distribution de ces vecteurs en France datant des travaux pionniers du Pr. Rioux (1969). Ceci permettrait par là même de surveiller la progression du risque leishmanien sur le territoire national et de fournir aux tutelles des données actualisées.

c) Poursuite des enquêtes sérologiques canines concernant l'exposition aux Phlébotomes

Les nouvelles données d'exposition aux piqures de phlébotomes, résultant de l'utilisation de l'ELISA anti-salive de phlébotome développée dans le cadre du projet PhlebExpo, seront associées à celles de prévalence de la leishmaniose canine, afin de mieux définir les zones à risque potentiel d'émergence de la maladie.

d) 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.

e) Poursuite des travaux concernant la transmission (vectorielle et non-vectorielle) des leishmanioses animales

La poursuite de l'étude de la compétence vectorielle du phlébotome *P. mascitti*, majoritaire dans la moitié nord de la France et à la biologie mal connue, demeure prioritaire et doit être achevée rapidement.

Les travaux menés par le LSA-ANSES (Dr. M. Kasbari) en collaboration avec le CNR-L portant sur la transmission de la leishmaniose par des voies non conventionnelles (VTNC), transplacentaire et vénérienne, seront poursuivis, en particulier sur la transmission horizontale directe non vénérienne par contact (cohabitation) entre animal infecté et animal sain, passant notamment par le contact entre muqueuses.

L'efficacité de la vaccination anti-leishmaniose sur la transmission du parasite chez le chien par les VTNC sera également évaluée afin de déterminer si la transmission du parasite par les voies vénérienne et transplacentaire peut ou non être bloquée, ou *a minima* réduite, chez les animaux infectés.

Enfin, des travaux portant sur la recherche des éventuelles espèces animales réservoirs et des insectes vecteurs de la nouvelle espèce émergente *L. siamensis* seront poursuivis en collaboration avec les partenaires thaïlandais.

7.1.6.4. Autres projets de recherche en collaboration

La collaboration avec **le NIH aux U.S.A**. (Pr. Stephen Beverley, Dept. of Molecular Microbiology, Center for Infectious Disease Research, Washington University School of Medicine, St-Louis, USA) sur le séquençage haut débit de plusieurs dizaines de souches de toutes les espèces connues de *Leishmania* sera également poursuivie.

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.

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

7.1.6.5. 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 collaboration 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).
- 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.

7.1.6.6. Activités de Publication

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

7.2. CONSEIL, Information, Formation

7.2.1. 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 sera poursuivi. 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.

Un numéro téléphonique sera accessible aux médecins aux heures ouvrables, permettant de proposer dans les 48 heures au sollicitant (médecin français confronté à un cas et fournissant les informations cliniques nécessaires) une solution thérapeutique au cas par cas, reposant sur une connaissance précise de la littérature et sur l'expérience personnelle des intervenants.

Les personnes référentes seront le Dr. Laurence Lachaud (leishmaniose viscérale) et le Pr Pierre Buffet (leishmanioses cutanées), ainsi que le Pr. Patrick Bastien et le Pr. Jean-Pierre Dedet en deuxième ligne.

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.

Un protocole de confection des frottis cutanés et des biopsies cutanées et cutanéo-muqueuses a été revu en accord avec les pratiques du Service de Dermatologie.

7.2.2. Information

La **veille d'information** (Internet, bibliographie) sera améliorée par le CNR, par des données actualisées sur l'évolution de la maladie dans les zones d'endémie leishmanienne dans le monde**, avec** mise à jour annuelle des **recommandations aux voyageurs** (**publication dans le BEH).** Le point sera également fait de façon régulière comme actuellement à propos des leishmanioses importées, d'après le système de surveillance du CNR.

Il nous semble intéressant aussi de développer une politique d'information et de sensibilisation pour les personnes se rendant au Maghreb durant la saison de transmission de *Leishmania major* afin de limiter l'incidence des cas de leishmaniose cutanée importées du Maghreb (cf. Alerte 2010).

En ce qui concerne le **site Internet du CNR**, dans un souci de clarté, un travail est en cours 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.

-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.

7.2.3. Formation

Le CNR-L continuera d'accueillir des **stagiaires** français et étrangers pour leur formation en matière d'épidémiologie des leishmanioses, de diagnostic moléculaire, d'isolement et de culture in vitro, d'identification de souches, de cryoconservation et de stockage, et d'étude de la chimiosensibilité.

Des cours sur les leishmanioses seront donnés aux étudiants en médecine et au DES de Biologie médicale.

Au **L-A de Cayenne**, une sensibilisation est faite auprès de tout **professionnel de santé amené à exercer en zones isolées** ou en Centres de santé (CDPS) : formation sur une journée au Service de Dermatologie pour la confection des frottis et biopsies, connaissance du protocole de confection en vigueur.

Par ailleurs, lors de missions dermatologiques de terrain, la méthodologie pour la confection du frottis cutané et de la biopsie est expliquée et le protocole revu par le personnel de dermatologie.

Le L-A souhaite poursuivre l'accueil de stagiaires au sein du laboratoire pour la réalisation de la RFLP-PCR, de la culture, de l'identification par MALDI-TOF.

7.3. Contribution à la surveillance des leishmanioses humaines

7.3.1. 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 des *Leishmania* .

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.

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

Cette surveillance a pour but d'évaluer les foyers autochtones d'endémie leishmanienne, leur dynamique et d'essayer d'anticiper les implications de cette affection au plan de la santé publique, et en particulier au cours de l'infection VIH et au décours des transplantations d'organes. Elle vise également à surveiller les cas d'importation et détecter

d'éventuelles augmentations d'incidence dans des foyers endémiques à l'étranger, permettant ainsi d'actualiser les recommandations aux voyageurs dans ces zones d'endémie.

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 la dernière décennie des données nationales du PMSI, qui recueille tous les séjours hospitaliers publics ou privés, reste prévu, avec l'aide du Département d'Informatique Médicale du CHRU de Montpellier. L'**exhaustivité** de la surveillance sera estimée en réalisant la comparaison des résultats des déclarations de cas faites au CNR-L avec la base de données.

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

7.3.2. 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

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

Les difficultés à résoudre sont connues et demandent :

- Motivation des acteurs et bonne mise en application des instructions fournies aux personnels soignants des Postes et Centres de Santé avec l'objectif de réduire les difficultés comme celles liées au *turn over* élevé du personnel, à une orientation et une sensibilité plus "diagnostic individuel" que "santé publique".
- Connaissance et prise en compte d'événements extérieurs source de biais : fermeture d'un centre de santé pour des raisons de sécurité, variation du nombre de consultants selon les opérations de lutte contre l'orpaillage, etc …
- Nécessité d'unifier les relevés de cas en tendant vers l'exhaustivité Une organisation avec la CIRE Antilles-Guyane sera recherchée avec au mieux l'intégration de la leishmaniose cutanée dans les pathologies officiellement surveillées par cet organisme. Le LHUPM est déjà en relation avec cette CIRE, site Guyane / ARS Guyane, pour la transmission des données de paludisme du CH de Cayenne.

Les règles de recueil des données et les modalités de transmission au 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.

7.4. Contribution à l'alerte

Le Laboratoire Coordonnateur, aidé en cela par le Laboratoire-Associé, centralisera et signalera à l'Institut de Veille sanitaire 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 au cours de ce quinquennal, ainsi que pour ce rapport. Je remercie également les Laboratoires collaborateurs de 2011 à 2016 et leurs responsables (Pr Pierre Buffet, à l'Hôpital Pitié-Salpêtrière, 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 l'Institut de Veille Sanitaire pour son appui efficace aux actions du CNR-L.

ANNEXES AU DOSSIER DE RENOUVELLEMENT DU CNR DES LEISHMANIOSES

- Liste des Tableaux et Figures
- D.P.I des responsables du Laboratoire coordonnateur et du Laboratoire Associé
- Plan du Laboratoire Coordonnateur avec identification des pièces impliquées dans les activités du CNR-L
- Formulaire de déclaration de cas de leishmaniose
- Fiche de renseignements CNRL Typage
- Copie des Annexes budgétaires:
  - du Laboratoire Coordonnateur
  - du L-A de Cayenne