

**Rapport annuel d'activité**

**2019**

**Centre national de référence  
des Leishmanioses**

**Année d'exercice  
2018**

**Pr Patrick BASTIEN**  
Coordonnateur  
**P Laurence LACHAUD**  
**Dr Christophe RAVEL**

**CNR des Leishmanioses**  
Département de Parasitologie-Mycologie  
CHU de Montpellier/Faculté de Médecine  
39 Av. Charles Flahault  
34295 MONTPELLIER CEDEX 5

**Pr Magalie DEMAR**  
Responsable du CNR-LA à Cayenne  
**LHUPM**  
Centre Hospitalier Andrée Rosemon  
Av. des Flamboyants  
BP 6006  
97306 Cayenne





## Résumé analytique (en français et en anglais)

Les leishmanioses sont essentiellement des zoonoses dues à un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*, affectant de nombreuses espèces de mammifères, y compris l'homme, transmises par la piqûre d'un phlébotome. Elles affectent entre 1,5 et 2 millions de personnes chaque année dans 98 pays, avec une mortalité estimée à 50000 morts par an. Les leishmanioses sont endémiques dans tout le Bassin Méditerranéen, et en particulier dans le Sud de la France et toute l'Europe du Sud. Par ailleurs, en raison de l'accentuation des échanges avec les zones endémiques, il existe de nombreux cas importés de leishmaniose cutanée (LC) ou viscérale (LV) en France. En Guyane Française, la forte endémie de LC représente un problème de santé publique, avec un nombre élevé de cas annuels (220 cas déclarés en moyenne ces dernières années) et une épidémiologie totalement différente de ce qui se passe en France métropolitaine. Le Centre National de Référence des Leishmanioses (CNR-L), créé en 1998 à Montpellier, associé au CNR-LA (Laboratoire Associé) de Cayenne (Parasitologie-Mycologie, C.H. Andrée Rosemon), développent les différentes missions imparties aux CNR : expertise, surveillance, alerte et conseil; l'un en métropole, l'autre sur le territoire guyanais.

En 2018, l'offre d'**expertise** diagnostique s'est encore intensifiée au CNR, avec 912 demandes de diagnostic moléculaire à Montpellier (soit une augmentation de 34,7% par rapport à 2017 et 76 % par rapport à 2016) et 256 demandes de diagnostic à Cayenne (légère baisse de 25% par rapport à 2017). A noter que sur ces 256 demandes, le nombre de résultats positifs toutes techniques confondues est de 166, soit 64,8%, ce qui est très élevé (21,6% seulement à Montpellier).

La Collection internationale de souches de *Leishmania* a continué à faire l'objet d'une "curation" importante, à la fois des données et des stocks. 124 souches ont été reçues ou isolées à Montpellier et 103 à Cayenne. Le typage de souches en routine est aujourd'hui basé sur le MALDI-TOF (spectrométrie de masse) mais l'identification moléculaire est prépondérante pour le typage à partir du prélèvement : 124 et 170 identifications ont eu lieu par la première et la deuxième méthode, respectivement, à Montpellier, et 70 et 143 à Cayenne. Les demandes d'identification moléculaire (444) ont encore augmenté à Montpellier (34% de plus qu'en 2017 et 95% de plus qu'en 2016). Le taux de succès dans les identifications est passé de 45% en 2017 à 66% en 2018 à Cayenne. Et grâce à plusieurs axes d'amélioration, le délai moyen de rendu du typage à Cayenne est passé de 29 à 12 jours.

**La surveillance** est basée sur la déclaration volontaire des cas. Celle-ci provient chaque année d'une cinquantaine d'établissements de santé en métropole (CHU et CH surtout, au total environ 120 sur les années) et de plusieurs établissements et nombreux Centres de Santé en Guyane. En 2018, 426 cas au total ont été déclarés au CNR-L (soit une augmentation de 15,7% par rapport à 2017) : 269 (+46% par rapport à 2017) fiches de déclaration de cas ont été reçues directement au CNR-L, provenant de structures de France métropolitaine (196 déclarations) et des Services de Santé des Armées (35 cas) et directement de centres de santé en Guyane (37 cas). Le CNR-LA de Cayenne a déclaré 157 cas de leishmanioses cutanées, ce qui représente une baisse globale de 15% par rapport à 2017, identique à l'année précédente.

Les LC restent très majoritaires. Le nombre de LV demeure stable avec toujours une prédominance de sujets adultes non immunodéprimés. Les leishmanioses autochtones de métropole restent rares; et les cas importés, y compris de Guyane, représentent au minimum 77% des cas de métropole. Lissés sur 5 ans (2013-2017), la moyenne annuelle des cas de LC en France métropolitaine était de 130, alors qu'en 2018 nous avons recensés 214 cas. Les cas en provenance du Maghreb ont continué de progresser (23,5% des cas). En contrepartie, la *proportion* de contaminations en Guyane n'est plus que de 52,6% des cas totaux; mais le nombre de cas guyanais reste stable. La proportion de LC à *L. braziliensis* a augmenté en 2018 pour atteindre presque 20% des cas guyanais (surtout chez des militaires et des migrants).

Aucune **alerte** ni aucun événement de cas groupés n'ont été signalés durant cette période.

En corrélation avec l'arrêt de l'activité "Leishmanioses" à l'ANSES, aucune activité n'a eu lieu cette année au CNR-L concernant la leishmaniose en matière de **santé animale**.

Le **site Internet** du CNR a évolué, avec deux sites distincts et séparés du site du Laboratoire pour le CNR-L et le CRB.

Comme chaque année, le CNR a publié et communiqué des travaux de **recherche**. Plusieurs projets de recherche collaboratifs sont en cours (Pitié-Salpêtrière, IP de Cayenne, Nice, Liban, Israël, Barcelone).



Leishmanioses are essentially zoonoses caused by a flagellated protozoon of the genus *Leishmania*, affecting numerous mammalian species, including humans, transmitted by the bite of a sand fly. They affect between 1.5 and 2 million people each year in 98 countries, causing around 50 000 deaths a year.

Leishmanioses are endemic in the whole Mediterranean Basin, in particular in the South of France and all Southern Europe. Moreover, due to increasing exchanges with endemic countries, many cases of cutaneous (CL) and visceral (VL) leishmaniosis are imported into France every year. In French Guiana, the high endemicity of CL represents a true public health problem, with a high number of cases each year (mean notification 220 cases over the last few years) and an epidemiology entirely different from that observed in mainland France. The French National Reference Centre for Leishmanioses (NRC-L), created in 1998 in Montpellier and the NRC-'Associated Laboratory' of Cayenne (Parasitology-Mycology, Hospital Centre Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana) both develop the missions attributed to the NRCs: expertise, surveillance, alert and counsel; one in mainland France and the other one in French Guiana.

In 2018, the diagnostic **expertise** again intensified, counting 912 requests for molecular diagnosis in Montpellier – an increase of 34.7% as compared with 2017 and 76% as compared with 2016 – and 256 requests in Cayenne (slight decrease of 25% as compared with 2017). Of note, out of these 256 requests, the number of positive results combining all techniques was 166, *i.e.* 64.8%, which is very high (21.6% only in Montpellier).

The international Collection of *Leishmania* strains continued being 'curated' intensively, at both the stock and data levels. The strain catalogue was reduced for a greater efficacy. 124 strains were received or isolated in Montpellier and 103 in Cayenne.

Strain typing is routinely based on MALDI-TOF (mass spectrometry), but molecular typing is preponderant for dealing with biological samples : 124 and 70 identifications took place using the first and the second method, respectively, in Montpellier, and 70 and 143 in Cayenne. The requests for molecular typing (444) increased again in Montpellier (by +34% as compared with 2017 and 95% as compared with 2016). The typing rate of success in Cayenne raised from 45% in 2017 to 66% in 2018. And by setting up several lines of improvement, the mean time for returning results of typing was reduced from 29 to 12 days.

**Surveillance** is based on voluntary case notification. Each year, about 50 diverse health institutions - mainly public hospitals, and 120 in total over the years – notify cases to the NRC-L, together with several hospitals and numerous 'Health centres' in French Guiana. In 2018, a total of 426 cases were notified to the NRC-L (+15,7% as compared with 2017): 269 (+46% as compared with 2017) notification forms were received directly in Montpellier: from health structures in mainland France (196 cases), from the Army Health Services (35 cases) and directly from health centers in French Guiana (37 cases). The 'Associated Laboratory' of Cayenne notified 157 cases of CL from French Guiana, which represents a decrease of 15% as compared with 2017, similar to last year's reduction.

CL still constitutes the large majority of cases. VL remains stable, still with a predominance of non-immunocompromised adult patients. Autochthonous leishmanioses remain rare in mainland France; and imported cases, including from Guiana, represent a minimum of 77% of the mainland cases. Spread over 5 years), the mean number of cases of CL in mainland France was 130, whereas 214 cases were reported in 2018. Cases from North Africa continue progressing (23.5% of cases), with cutaneous forms with multiple localisations often refractory to treatment. On the other hand, the *proportion* of contaminations in French Guiana is now 52.6% of total cases; but the actual number of cases from Guiana remains stable. The proportion of *L. braziliensis* clearly raised in 2018, reaching almost 20% of the Guianese cases.

No **alert** or grouped cases events were notified during this period.

Due to the arrest of the leishmaniosis-related activity at the ANSES, no activity took place this year at the NRCL about **animal** leishmaniosis.

The **Internet website** of the NRC-L evolved, with the decision to individualize both the sites of the NRC and the CRB from each other and from the main laboratory website.

Like every year, the NRCL has published and communicated about its research works. Several collaborative research projects are currently developed (Pitié-Salpêtrière, Institut Pasteur from Cayenne, Nice, Liban, Israel, Barcelone).



## SOMMAIRE

<b>1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....</b>	<b>9</b>
<b>2. ACTIVITES D'EXPERTISE EN 2018.....</b>	<b>15</b>
2.1. EVOLUTION DES TECHNIQUES .....	15
2.2. TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, RÉACTIFS ET TROUSSES : MÉTHODE, ÉTAT D'AVANCEMENT, PRINCIPAUX RÉSULTATS.....	16
2.3. TECHNIQUES TRANSFÉRÉES VERS D' AUTRES LABORATOIRES.....	16
2.4. COLLECTION DE MATÉRIEL BIOLOGIQUE.....	16
2.4.1. Réception de souches de <i>Leishmania</i> .....	17
2.4.2. Distribution de souches de <i>Leishmania</i> .....	19
2.4.3. Maintien et dynamique de la Collection de souches (Montpellier).....	19
2.5. ACTIVITÉS D'EXPERTISE.....	20
2.5.1. Expertise diagnostique .....	20
2.5.2. Identification moléculaire .....	22
2.5.3. Identification par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) .....	23
2.5.4. Sensibilité <i>in vitro</i> des souches de <i>Leishmania</i> aux produits anti-leishmaniens...	24
2.6. ACTIVITÉS DE SÉQUENÇAGE .....	24
<b>3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....</b>	<b>27</b>
3.1. DESCRIPTION DU RÉSEAU DE PARTENAIRES .....	27
3.2. SURVEILLANCE DE L'INFECTION ET DES CARACTÉRISTIQUES DES LEISHMANIOSES.....	30
3.2.2. Déclaration des cas.....	30
3.2.3. Analyse de la distribution des différents types d'agents caractérisés en fonction des critères pertinents (âge, sexe, géographie) et analyse des tendances .....	31
3.2.3.1. France métropolitaine (hors Guyane).....	31
3.2.3.2. Guyane Française (synthèse).....	33
3.3. SURVEILLANCE DE LA RÉSISTANCE DES AGENTS PATHOGÈNES AUX ANTI-INFECTIEUX ...	36
3.4. INTERFACES AVEC LES RÉSEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX	36
3.4.1. Contribution à la surveillance nationale en interface avec Santé Publique France (échanges de données, périodicité, analyse commune).....	36
3.4.2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux.....	36
3.5. ENQUÊTES OU ÉTUDES PONCTUELLES CONCOURANT À LA SURVEILLANCE .....	36
<b>4. ALERTE : DÉTECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPÉS ET DES PHÉNOMÈNES ANORMAUX .....</b>	<b>37</b>
<b>5. ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL .....</b>	<b>37</b>
5.1. CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTÉ.....	37
5.1.1. Enseignements et formations.....	37
5.1.2. Accueil de stagiaires au CNR.....	38
5.1.3. Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion) .....	38
5.1.4. Diffusion des données de surveillance et des productions du CNR.....	38
5.1.5. Conseils aux professionnels de santé .....	38
5.2. CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITÉS SANITAIRES.....	40
5.3. CONSEIL ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (GRAND PUBLIC...) .....	40

<b>6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR.....</b>	<b>41</b>
<b>6.1. ACTIVITÉS DE RECHERCHE EN 2018.....</b>	<b>41</b>
6.1.1. PROJET EUROPÉEN LEISHMAN « IMPROVING TREATMENT OF LEISHMANIASIS BASED ON SPECIES DIFFERENTIATION ».....	41
6.1.2. IDENTIFICATION DES <i>LEISHMANIA</i> PAR LA TECHNIQUE DU MALDI-TOF.....	41
6.1.3. TRAVAUX DE RECHERCHE DU CNR-LA À CAYENNE.....	42
6.1.4. AUTRES TRAVAUX COLLABORATIFS EN RECHERCHE.....	42
<b>6.2. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DE 2018.....</b>	<b>43</b>
6.2.1. PUBLICATIONS NATIONALES.....	43
6.2.2. PUBLICATIONS INTERNATIONALES.....	43
6.2.3. CHAPITRES DE LIVRES.....	43
6.2.4. COMMUNICATIONS À CONGRÈS NATIONAUX.....	43
6.2.5. COMMUNICATIONS À CONGRÈS INTERNATIONAUX.....	43
6.2.6. CONFÉRENCES SUR INVITATION DANS CONGRÈS ET RÉUNIONS.....	43
<b>7. COOPÉRATION AVEC LES STRUCTURES DE SANTÉ ANIMALE POUR LA SURVEILLANCE DES LEISHMANIOSES ANIMALES.....</b>	<b>45</b>
<b>8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR 2018-2019.....</b>	<b>47</b>
8.1. ACTIVITÉS D'EXPERTISE.....	47
8.1.1. Réseau de partenaires.....	47
8.1.2. Evaluation de techniques de détection des <i>Leishmania</i> .....	47
8.1.3. Identification des <i>Leishmania</i> .....	48
8.1.4. Maintien et dynamique de la Collection de souches (Montpellier).....	48
8.1.5. Activités d'expertise du CNR-LA de Cayenne.....	49
8.1.6. Recherche en lien direct avec l'activité du CNR.....	50
8.1.6.1. Projet européen LeishMan « Improving treatment of Leishmaniasis based on species differentiation ».....	50
8.1.6.2. Recherche en collaboration avec les structures travaillant en santé animale....	50
8.1.6.3. Autres projets de recherche en collaboration.....	51
8.1.6.4. Projets de recherche du CNR-LA de Cayenne.....	51
8.2. CONSEIL, INFORMATION, FORMATION.....	52
8.2.1. Conseil.....	52
8.2.2. Information.....	52
8.2.3. Formation.....	53
8.3. CONTRIBUTION À LA SURVEILLANCE DES LEISHMANIOSES HUMAINES.....	53
8.4. CONTRIBUTION À L'ALERTE.....	54

# 1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

Evolutions notables en 2018 :

## 1.1. Personnel

Cf. Organigrammes ci-dessous

## 2.2. Démarche Qualité

\* Laboratoire coordonnateur : Le Laboratoire a accrédité le diagnostic moléculaire de la Leishmaniose en 2017 (visite du COFRAC en novembre 2016, et notification officielle en juillet 2017) et la sérologie Toxoplasmose, la recherche d'antigènes aspergillaires et la recherche de paludisme en 2018 (cf. Attestation d'accréditation ci-dessous).

La visite de suivi par le COFRAC a lieu du 8 au 11 avril 2019.

Le dossier déposé en 2019 comprend l'ensemble de la Mycologie.

\* Laboratoire Associé de Cayenne : Le dossier déposé en 2018 et actuellement en cours comprend la sérologie toxoplasmose et la recherche du paludisme (FS/GE et recherche d'antigènes parasitaires). Le dossier préparé pour 2019 comprend le diagnostic mycologique et l'examen direct de la leishmaniose.

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

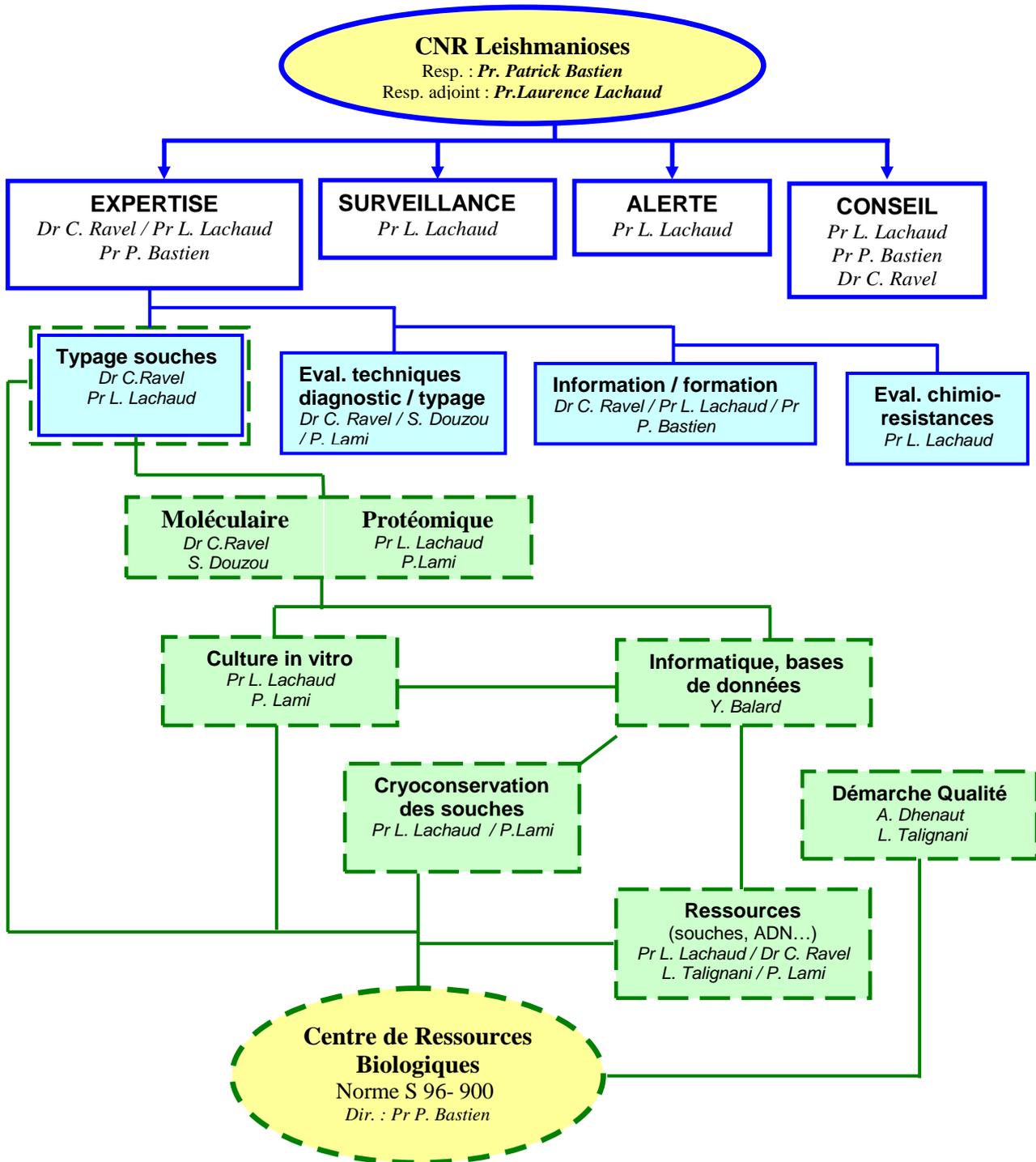
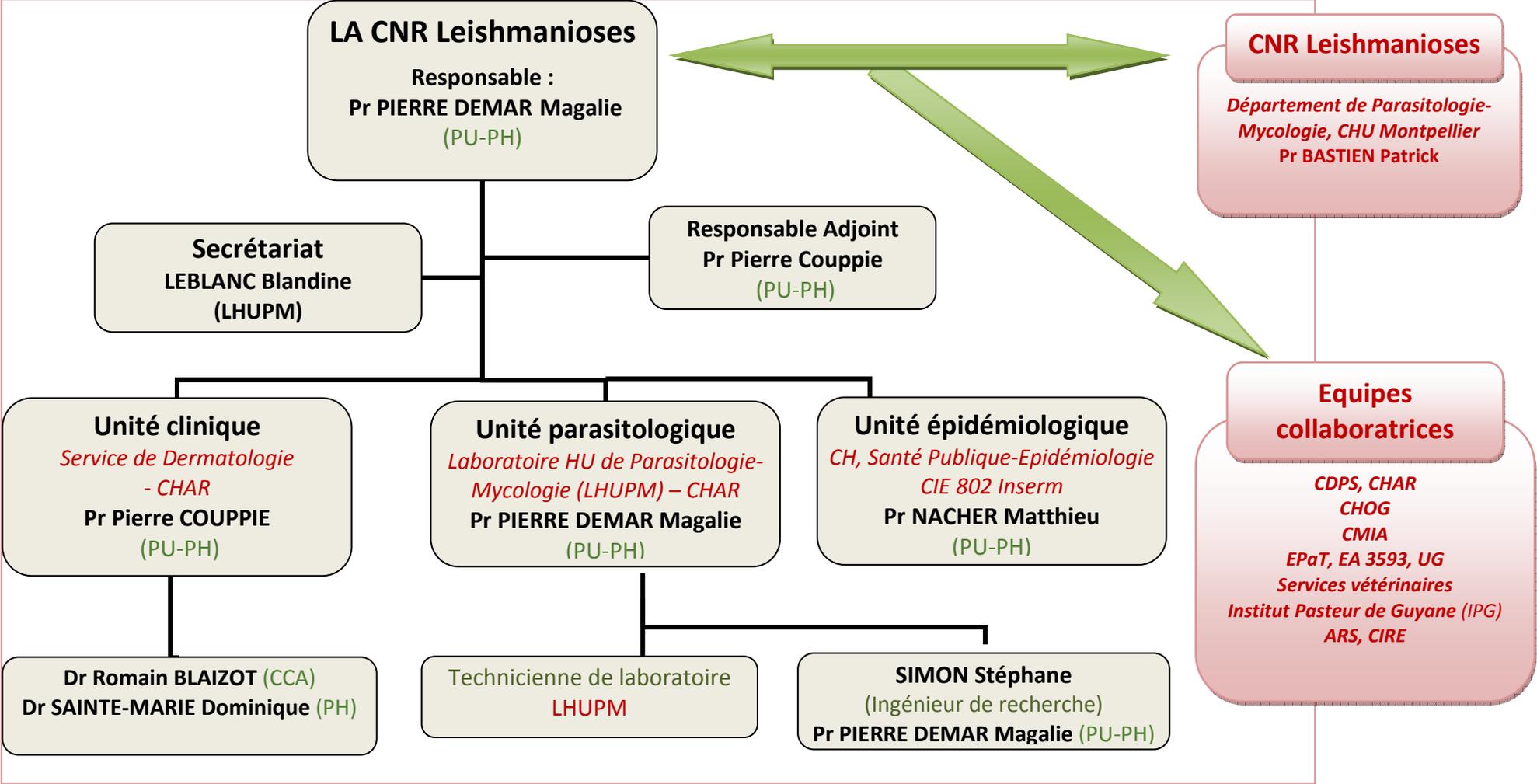
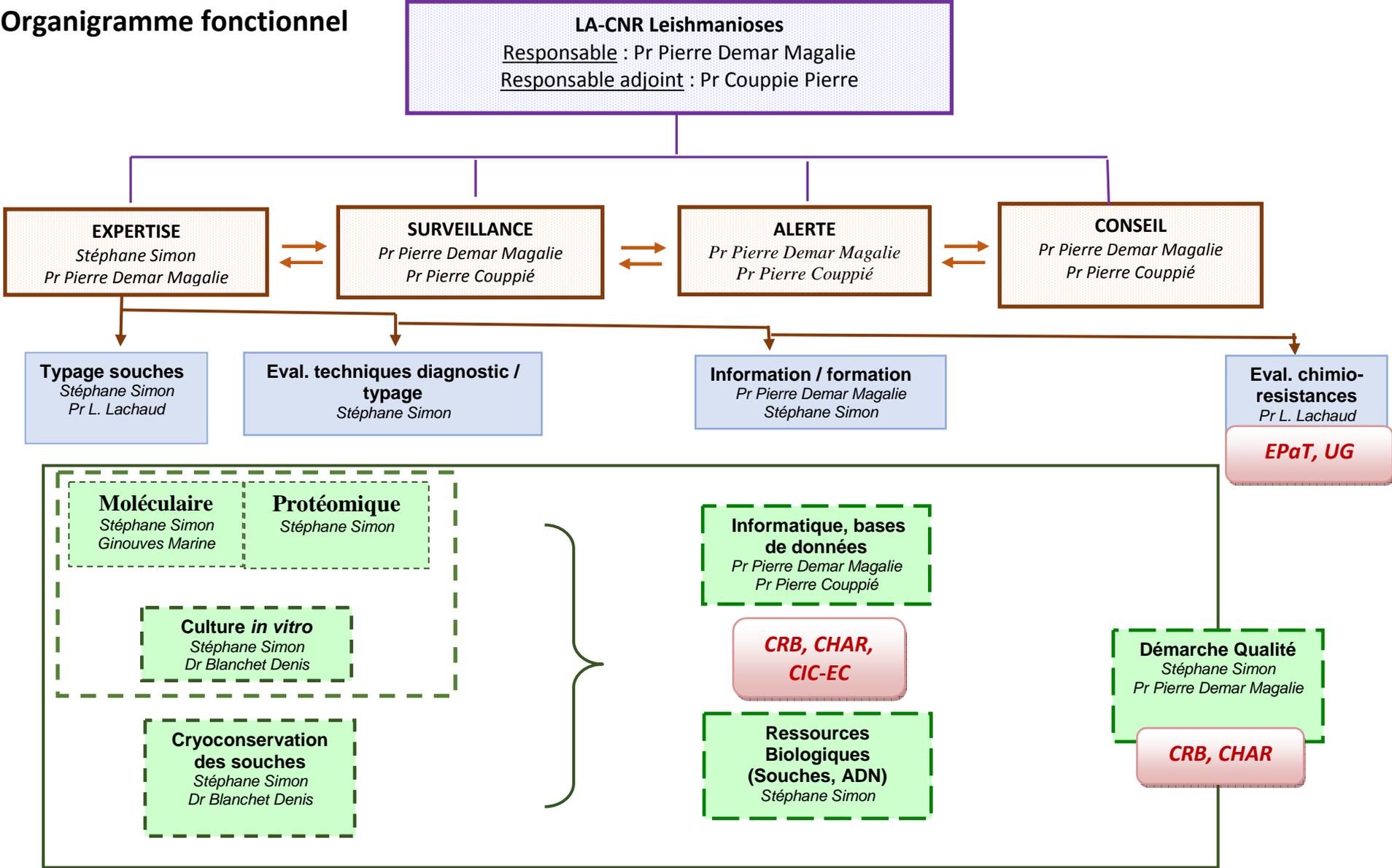


Figure 2. Organigrammes du Laboratoire Associé au CNR des Leishmanioses (Cayenne)



# Organigramme fonctionnel





Section Santé Humaine

Paris, le 18/10/2018

LEM du CHRU MONTPELLIER  
Département de Parasitologie-  
Mycologie  
39 avenue Charles Flahault  
34295 MONTPELLIER CEDEX 5

A l'attention de Madame Tndira TAMBY

N/Réf : SII18J-264087/LDO/ADS

Convention n° 5415 – Dossier d'accréditation n° 6-3401

Évaluation de surveillance S3 et d'extension n° SEI-18-0030

Objet : Notification de décision suite à l'examen du rapport d'évaluation n° SH-18-0030

 *Émission suite au Visa ROSSU - 21.01.44.05.16.09 - L.S. lisa.bonvallet@cofrac.fr*

Madame,

Comme suite à l'évaluation susmentionnée et compte-tenu de l'avis de l'instance sollicités, et ce votre engagement à mettre en œuvre les actions correctives, j'ai décidé de prononcer le maintien de l'accréditation de votre organisme pour le domaine de la biologie médicale\*.

De plus, je vous informe que l'extension de votre accréditation est prononcée à compter du 18/10/2018 pour le domaine de la biologie médicale\*.

Toutefois, en lien avec les écarts non critiques n° CR02, CR05, V1.02 et N901, je vous informe que la gestion du personnel fera l'objet d'une attention particulière lors de votre prochaine évaluation sur site.

En lien avec les points à surveiller en page 11 du rapport d'évaluation, concernant le recueil de renseignements cliniques, je vous informe que ceci fera également l'objet d'une attention particulière lors de votre prochaine évaluation.

Vous trouverez, ci-joint, l'attestation d'accréditation de votre convention n° 5415 et son annexe technique correspondante prenant en compte l'extension accordée ainsi que la mise à jour des listes de portées en lien avec la révision du document Cofrac SII INT 50.

Tur ailleurs, suite à la révision du document Cofrac (FN REF 1) rév. 06 « Règles générales pour la référence à l'accréditation et aux accords de reconnaissance internationaux » applicable au 1er avril 2018, nous vous adressons, en deux exemplaires, une nouvelle version de l'annexe 2 à votre convention n° 5415. Nous vous remercions de bien vouloir nous retourner ces deux exemplaires dûment visés sous quinze. A réception, nous vous retournerons un exemplaire de cette annexe signé et daté.

Restant à votre disposition pour tout renseignement complémentaire, je vous prie d'agréer, Madame, l'assurance de ma considération distinguée.

*Pour le Directeur Général et par délégation,  
La Responsable de l'Unité d'accréditation Ouest,*

  
Pascale LIGER-GARNIER

Comité Français d'Accréditation

52, rue Jacques H. Leiret - 75012 PARIS - Tel. : +33 (0)1 44 68 82 20 - Fax : +33 (0)1 44 68 82 21 - Site Internet : <http://www.cofrac.fr>  
SIRET : 397 879 487 00031 APE 94997



## 2. ACTIVITES D'EXPERTISE EN 2018

- L'activité de diagnostic et de typage a à nouveau fortement augmenté. Les demandes de diagnostic se sont élevées à 912 à Montpellier (+34,7% par rapport à 2017 et +76 % par rapport à 2016), mais elles diminuent depuis plusieurs années à Cayenne (256 en 2018).
- Les demandes d'identification moléculaire (444 à Montpellier) ont augmenté de 34% par rapport à 2017 et quasiment doublé (+95%) par rapport à 2016.
- Le typage de souches est soit moléculaire, soit, et de plus en plus, basé sur le MALDI-TOF (spectrométrie de masse), et ce dans les deux centres : 170 (presque le double qu'en 2017) et 124 souches ont été typées par la première et la deuxième méthode, respectivement, à Montpellier, et 143 et 70 à Cayenne.
- 124 souches ont été reçues ou isolées à Montpellier et 103 à Cayenne. La baisse de 2013-2015 à Montpellier a été suivie d'une remontée aujourd'hui stabilisée grâce à la reprise de relations avec le L-A de Cayenne.
- Le CNR a aujourd'hui optimisé l'identification des souches de *Leishmania* par la technique du MALDI-TOF. La banque de "spectres" est maintenant disponible en ligne via l'application MSI (<https://biological-mass-spectrometry-identification.com/msi/>). Le CNR-L est le gestionnaire de cette banque en association avec la Pitié Salpêtrière (Pr Piarroux).
- Le CNR-LA de Cayenne a aussi fait évoluer sa méthode de typage moléculaire.
- La révision du catalogue et la "curation" de la Collection de souches de *Leishmania* se sont poursuivies.

### Description des techniques disponibles présentée en Annexe 1.

#### 2.1. Evolution des techniques

- Techniques développées ou en développement

Le CNR a optimisé l'identification des souches de *Leishmania* par la **technologie du MALDI-TOF** (spectrométrie de masse), validée en collaboration entre le CNR à Montpellier (Pr Lachaud), le Centre collaborateur de La Pitié-Salpêtrière (Pr Piarroux) et le LA de Cayenne (Pr Demar). Depuis la création d'une banque d'empreintes ("spectres") (MSI1) couvrant 33 espèces différentes de Leishmanies, la technique a été utilisée en routine. Le CNRL est le gestionnaire de la banque en association avec la Pitié Salpêtrière.

En 2018, le développement de la base de données a continué. Un nouvel algorithme a été développé avec le Pr Piarroux (Centre Collaborateur de la Pitié-Salpêtrière), et plus de 200 nouveaux spectres ont été incrémentés. Ceci a permis le développement d'une nouvelle base de données accessible via l'application MSI2, également disponible en ligne (<https://msi.happy-dev.fr/accounts/login/?next=/identification/new/>). Ce développement a permis une amélioration de la qualité de l'identification au sein du complexe *L. donovani* et de la différenciation entre *L. guyanensis* et *L. braziliensis*.

Le CNR-LA de Cayenne a ainsi finalisé l'optimisation de l'identification des souches par MALDI-TOF, qui est maintenant pleinement opérationnel et systématiquement utilisée pour tous les échantillons donnant une culture positive. Une corrélation de 100 % a été faite sur 66 cultures envoyées au CNR de Montpellier.

En fin d'année, il a également fait évoluer le **diagnostic moléculaire des leishmanioses** : après avoir optimisé sa détection de la PCR-RFLP par l'usage du RNA biotyper le choix a été fait d'abandonner progressivement cette technique au profit du séquençage de produits de PCR d'une portion du gène HSP70. En cas de positivité, le produit PCR amplifié est envoyé pour séquençage.

## **2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse : méthode, état d'avancement, principaux résultats**

Au CNR-LA de Cayenne, deux **kits de biologie moléculaire** qrtPCR sont en cours de test : le kit lyophilisé LshSpp dtec-qPCR Test de Genetic Analysis Strategies (GPS®) et le kit *Leishmania* spp. de CLONIT® distribué par Eurobio®. Il s'agit de les évaluer en comparaison avec la PCR classique sur le gène Hsp70 que nous utilisons habituellement.

Au Laboratoire coordonnateur de Montpellier, l'évaluation des performances (sensibilité et spécificité) de plusieurs **kits commerciaux de détection d'anticorps anti-*Leishmania*** est en cours. Il s'agit d'une étude rétrospective, de 1998 à 2018, multicentrique (4 centres participants), mais pour des raisons de cohérence les échantillons seront testés au CNR-L. La durée de l'étude est prévue sur une période de 1 an. La recherche des anticorps (IgG et/ou IgM) anti-*Leishmania* sera effectuée par six trousse commerciales différentes : kit ELISA NOVALISA® *Leishmania infantum* IgG ; kit ELISA BORDIER® *Leishmania infantum* ; Kit ELISA RIDASCREEN® *Leishmania* IgG ; Kit ELISA SCIMEDX® *Leishmania* ; TDR IT LEISH® ; TDR TruQuick™ LEISH IgG/IgM MERIDIAN®. Les échantillons inclus proviennent de patients atteints de Leishmaniose viscérale (diagnostic établi par PCR, examen direct, ou par culture), issus des Laboratoires de Parasitologie des CHU de Montpellier, Nice, et Marseille, et de l'Institut Pasteur de Tunis; les sérums témoins (patients indemnes de LV) proviennent du Département de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier. Une demande au Comité de Protection des Personnes a été faite. Les résultats de cette étude permettront de conseiller les laboratoires sur l'utilisation de ces kits. De nouveaux seuils d'interprétation différents des seuils fournisseurs pourront être proposés. Le coût médico-économique sera aussi évalué (temps de réalisation, simplicité d'utilisation, coût des réactifs, délai de rendu des résultats...).

## **2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires**

La technique du MALDI-TOF a été développée et améliorée en parallèle dans le Laboratoire Coordonnateur et le Laboratoire Associé du CNR. La collaboration se poursuit avec Cayenne afin d'évaluer la nouvelle base de données.

## **2.4. Collection de matériel biologique**

Organisation, conditions de stockage et de mise à disposition, gestion informatique etc. : cf. Annexe 1.

Le catalogue de la **Collection de souches de *Leishmania* de Montpellier** a été entièrement revu et mis à jour; et l'identification des souches vérifiée avec la méthode de MALDI-TOF. L'ensemble du stock a été vérifié. Le toilettage et la sécurisation de la collection de souches a continué en 2018.

124 souches ont été reçues en 2018 et 47 souches distribuées à l'extérieur. Toutes les souches reçues sont typées en MALDI-TOF, et pour les espèces plus rares, l'identification est établie par séquençage de l'ADN.

Chaque souche isolée par le **CNR-LA** est envoyée au CRB-*Leishmania* de Montpellier pour cryoconservation. Depuis janvier 2018, ces souches sont également cryoconservées au

Centre Hospitalier de Cayenne (CHC) au niveau du **CRB Amazonie**. Ce dernier a bénéficié du recrutement d'un ingénieur et le CRB est maintenant opérationnel. Une procédure de certification est en cours. Cette politique de "doublon" est en général difficile à mettre en œuvre pour les CRB, mais elle fait partie des critères de certification.

#### 2.4.1. Réception de souches de *Leishmania*

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

En 2018, 124 souches de *Leishmania* ont été isolées ou reçues à Montpellier, majoritairement d'établissements hospitaliers et particulièrement du CH de Cayenne.

**Tableau I. Origine, selon le centre de soins, des 124 souches de *Leishmania* traitées par le Laboratoire Coordonnateur en 2018.**

<b>France (124 souches)</b>			
<b>Établissements</b>	<b>Nb</b>	<b>Établissements</b>	<b>Nb</b>
APHP Cochin	13	Dr M. Kasbari (ex-ANSES)	24
APHP Bichat-Claude Bernard	2	Pr M. Gallego (Univ.de Barcelone)	2
APHP Pitié-Salpêtrière	1	Pr N. Fasel (Univ.de Lausanne, Suisse)	1
CH Cayenne	61		
CHU Montpellier	13		
CHU Nice	4		
CHU Rennes	2		
CHU Rouen	1		
CHU Strasbourg	1		

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

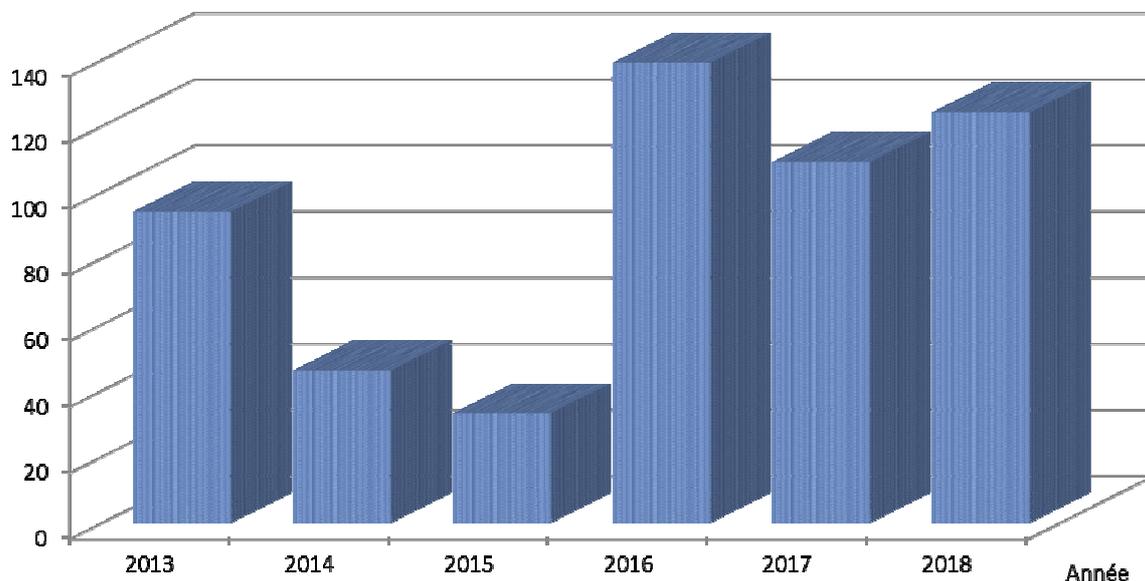
L'origine géographique des souches par pays où la contamination a eu lieu en 2018 figure sur le Tableau II : les contaminations ont eu lieu dans 14 pays différents, dont 4 pays d'Afrique, 1 pays d'Europe et 8 pays d'Amérique (en considérant la Guyane française comme un "pays").

**Tableau II. Origine géographique, par pays de contamination, des 124 souches traitées par le CNRL (Montpellier) en 2018**

<i>Continents</i>	<i>Pays</i>	<i>Nb</i>	<i>Continents</i>	<i>Pays</i>	<i>Nb</i>
<b>Afrique (n = 15)</b>	Maroc	7	<b>Amérique (n = 77)</b>	Brésil	2
	Sénégal	1		Guyane française	57
	Tunisie	6		Argentine	1
	Algérie	1		Suriname	10
				Equateur	1
				Costa Rica	1

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

**Figure 3. Nombre de souches stockées annuellement au Laboratoire coordonnateur de Montpellier entre 2013 et 2018.**



**En Guyane, 103 souches de *Leishmania*** ont été isolées en 2018, dont 44 souches (42,7%) provenant des hôpitaux de Cayenne et de Saint-Laurent-Du-Maroni (46,2% en 2017), 42 souches (41%) des CDPS (48% en 2017), et 17 souches (16,5%) du Centre Médical du Service des Armées (CMIA) (2,5% en 2017). On note que sur les souches isolées de patients vivant près des Centres de santé, 31 souches, soit 74% (stable), provenaient du CDPS de Maripasoula. Le nombre de souches isolées semble en diminution depuis le pic de 2016 (voir Tableau ci-dessous), mais reste nettement au-dessus des 47 souches isolées en 2013.

**Tableau III. Origine selon le centre de soins, des souches de *Leishmania* traitées par le LA à Cayenne entre 2014 et 2018.**

	Hôpitaux (SLM+CHAR)	Armée (CMIA)	Centre /Postes de santé (CDPS)	Total
Nombre de souches isolées en 2018	44 (42,7%)	17 (16,5%)	42 (40,8%)	103
Nombre de souches isolées en 2017	55 (46,2%)	7 (5,8)	57 (48%)	119
Nombre de souches isolées en 2016	74 (42%)	9 (5%)	91 (53%)	174
Nombre de souches isolées en 2015	90 (54,5%)	7 (4,2%)	68 (41,2%)	165
Nombre de souches isolées en 2014	53 (51%)	27 (26%)	20 (19,3%)	104

#### 2.4.2. Distribution de souches de *Leishmania*

En 2018, 47 souches de *Leishmania* ont été fournies à divers laboratoires et institutions, dont la liste figure ci-dessous :

- 16 souches au CDC (Center for Diseases Control) d'Atlanta, USA (Dr M Almeria)
- 15 souches à Science Laboratory, Byblos, Liban (T Salloum)
- 12 à l'Institut für Mikrobiologie, Marburg, Allemagne (Pr U Steinhoff)
- 3 à l'International Center for Chemical and Biological Sciences, Karachi (Pakistan)

Par ailleurs, 239 souches ont été distribuées en interne pour des projets propres au CNR (234 au Pr Laurence Lachaud et 5 au Dr Christophe Ravel).

Il en est de même pour le LA-CNR, où 60 souches ont été distribuées en interne pour des projets de l'équipe de recherche EPaT (EA 3593), affiliée au LHUPM et LA-CNR Leishmaniose.

#### 2.4.3. 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 des équipes nationales et internationales. Le CNR-L s'emploie à faire vivre et progresser cette collection, devenue importante pour de nombreux centres hospitaliers et de recherche.

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

En 2018, le travail de "**curation**" de la Collection entamé par le Pr Laurence Lachaud à son arrivée a été poursuivi.

- Le **catalogue des souches** en ligne sur le site Internet du Laboratoire a été revisité avec, avant mise sur le site, un contrôle rigoureux de tous les renseignements relatifs à ces souches. Un certain nombre de souches a du être enlevé du catalogue en raison de l'absence de certains renseignements, aujourd'hui considérés comme nécessaires par le Comité scientifique du CNR. D'autres souches ont été ajoutées. Le nombre actuel de souches sur le catalogue reste aux environs de 245 (chiffre approximatif car en évolution). Toutes les souches conservées ou mises au catalogue ont été typées au minimum en MALDI-TOF et sont représentatives de l'ensemble de la Collection.

- **Enrichissement des données** associées aux souches à partir de travaux réalisés avec des souches de la collection (travaux de thèse ou articles scientifiques), comme par exemple:
  - la sensibilité du parasite aux anti-leishmaniens,
  - la virulence et l'infectivité des souches,
  - la ré-émergence de foyers de leishmaniose dans le Bassin Méditerranéen,
  - la découverte d'un nouveau réservoir de leishmaniose.
  - typage systématique par MALDI-TOF
  - données cliniques plus précises pour les leishmanioses cutanées (nombre de lésions, aspect des lésions, localisations)

Ces données, avec les références correspondantes, sont intégrées à la fiche électronique de chaque souche concernée. Ce travail long et minutieux est encore en cours, encadré par le nouveau curateur, Dr Laurence Lachaud. Il constitue une valorisation importante des souches de la Collection.

- Les souches référencées comme marqueurs OMS et marqueurs de zymodèmes ont été sécurisées au CNR-L en plusieurs aliquotes.
- Les doublons sont repérés et fusionnés lorsque c'est possible.

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

## 2.5. Activités d'expertise

Activités d'expertise		Nombre
<b>Expertise diagnostique</b> (nombre d'échantillons réceptionnés)	Laboratoire Coordonnateur (Montpellier). Origine : CHU et CH essentiellement	912
	Laboratoire Associé (Cayenne). Origine: CH Cayenne et CDPS essentiellement	256
<b>Identification moléculaire</b>	Identification/demandes; Laboratoire Coordonnateur (Montpellier)	170/444
	Identification/demandes Laboratoire Associé (Cayenne)	143/238
<b>Identification par MALDI-TOF</b>	Laboratoire Coordonnateur (Montpellier)	124
	Laboratoire Associé (Cayenne)	70
<b>Nombre de souches</b> réceptionnées ou isolées	Laboratoire Coordonnateur (Montpellier). Origine : CHU et CH (essentiellement Cayenne) + HIA	124
	Laboratoire Associé (Cayenne). Origine : CH Cayenne et CDPS essentiellement + CMIA	103

### 2.5.1. Expertise diagnostique

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

#### - Diagnostic moléculaire

##### Au Laboratoire coordonnateur :

En 2018, 912 échantillons pour diagnostic moléculaire de leishmaniose ont été analysés (51% pour des formes viscérales, 49% pour des lésions cutanées), ce qui représente une augmentation de 34,7% par rapport à 2017 et de 76 % par rapport à 2016. Les demandes provenaient du CHRU de Montpellier (23 %) mais également de 60 Centres hospitaliers français (CH ou CHU); ces chiffres sont stables. 21.6 % des prélèvements se sont avérés positifs, dont environ 86 % pour des formes cutanées.

Le délai moyen de rendu de l'identification est de 4,4 jours +/- 2.

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

##### Au Laboratoire Associé (CNR-LA) de Cayenne :

En 2018, 256 demandes de diagnostic de leishmaniose cutanée ou cutanéomuqueuse ont été enregistrées, avec 210 recherches microscopiques, 236 recherches en culture et 238 recherches par biologie moléculaire. De plus, 17 autres demandes pour 16 patients concernaient le diagnostic

de leishmaniose viscérale avec recherche spécifique d'ADN de *L. infantum*, majoritairement dans le sang.

Sur ces 256 demandes, le nombre de résultats positifs toutes techniques confondues est de 166, soit 64,8%, ce qui est considérable..

Les demandes correspondent à 223 patients (33 patients ont eu au moins 2 demandes de recherche de leishmaniose).

**Tableau IV. Synthèse de l'activité diagnostique du L-A de Cayenne de 2013 à 2018**

	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Nombre de demandes de LC	409	669	809	461	344	256
Nombre de patients toutes techniques confondues	140 (34%)	249 (37%)	358 (44%)	308 (67%)	187 (54%)	223 (87%)
Nombre de souches isolées	47	102	165	174	119	103

Le nombre de demandes est en diminution par rapport à l'année 2017 (près de 25% en moins), avec une réduction de plus de 68% des cas depuis le pic de 2015 (Tableau IV). La diminution est globale et ne concerne pas un centre particulièrement. Cette tendance doit être confirmée dans le temps et dans l'espace.

Ces demandes sont issues de :

- CH de Cayenne : 90 (soit 35,2% contre 28% en 2017)
- CH de Saint Laurent du Maroni : 2 (0,8% contre 19,1% en 2017)
- Centre Medical InterArmées (CMIA) : 31 (12,1% contre 3% en 2017 )
- Centres Délocalisés de Prévention et de Soins (CDPS) : 133 (soit 51,9% contre 49,4% en 2017), répartis entre :

Maripasoula :	85/133 (63,9% contre 64,3% en 2017)
Camopi :	10/133 (7,5%)
Saint Georges :	15/133 (11,3%)
Papaïchton :	7/133 (5,3%)
Grand Santi :	1/133 (0,7%)
Cacao :	6/133 (4,5%)
Trois Sauts :	2/133 (1,5%)
Regina :	2/133 (1,5%)
Saül :	2/133 (1,5%)

Cette répartition est proche de celle de 2017 pour certains sites comme le CHAR et les CDPS (Centre délocalisés de soins et prévention), avec une demande majoritaire des CDPS qui se confirme cette année. On note une nette diminution des demandes de Saint-Laurent-Du-Maroni qui pour des raisons logistiques, a souhaité transférer ses prélèvements vers le CNR de Montpellier (problématique coursiers, connexions informatiques...)

**Tableau V. Evolution de la répartition des demandes de diagnostic auprès du CNR-LA de Cayenne**

	2016	2017	2018
CH de Cayenne	130 (31%)	97 (28%)	90 (35,2%)
CH St-Laurent-du-Maroni	42 (10%)	66 (19%)	2 (0,8%)
Centre Medical InterArmées (CMIA)	17 (4%)	11 (3,1%)	31 (12,1%)
Centres Délocalisés de Prévention et de Soins (CDPS)	223 (53,5%)	171 (49,4%)	133 (51,9%)
Total	418	344	256

## - Diagnostic immunologique

En 2018, 257 sérologies leishmaniennes ont été réalisées. Ce chiffre continue d'augmenter lentement au fil des ans. Ceci pourrait être du à l'arrêt de cette sérologie par plusieurs laboratoires et à l'externalisation de cette analyse vers le CNRL.

## 2.5.2. Identification moléculaire

### 2.5.2.1. Laboratoire coordonnateur

Le typage moléculaire est réalisé en routine depuis 2006.

En 2018, 444 demandes de typage moléculaire ont été reçues (soit 34% de plus qu'en 2017 et 95% de plus qu'en 2016), dont 170 qui ont donné lieu à une identification (soit presque le double qu'en 2017). Au total, 9 espèces de *Leishmania* ont été identifiées, avec toujours une prédominance de *L. major* (50 %), assez stable au fil des ans. Le nombre d'identifications pour des cas provenant du Nouveau Monde est passé de 25 à 68. Les espèces impliquées pour ces cas étaient 45 *L. guyanensis*, 17 *L. braziliensis*, 1 *L. naiffi*, 1 *L. amazonensis*, 3 *L. lainsoni* et 1 *L. panamensis*.

Contrairement à l'année précédente, les identifications faites par le Laboratoire coordonnateur confirment la relativement forte représentation de *L. braziliensis* observée en Guyane.

### 2.5.2.2. Laboratoire-Associé de Cayenne

L'identification de l'espèce par biologie moléculaire est réalisée en routine à Cayenne par PCR-RFLP depuis 2006. Depuis 2009, elle est appliquée à la grande majorité des cas vus en consultation de Dermatologie à Cayenne (90% en 2015), et, de plus en plus, aux cas des patients vivant dans les Centres de santé de la Guyane en zone isolée. En 2018, cette technique a progressivement laissé place à une PCR d'une portion du gène HSP70 suivi de séquençage. En combinant les 2 techniques, 238 demandes de typage moléculaire ont été faites, avec 157 détections positives et 143 identifications d'espèce rendues. Pour seulement 6 patients, la quantité d'ADN étant trop faible, la détermination d'espèce par RFLP n'a pas pu être faite. Ainsi, le taux de succès dans les identifications a considérablement augmenté au CNR-LA, de 45% en 2017 à 66% en 2018. Et on note une plus grande précision dans le diagnostic moléculaire avec une baisse nette des rendus indéterminés (4,2% contre 22% en 2017).

Par ailleurs, le pourcentage de *L. braziliensis* identifiés au CNR-LA a augmenté en 2018 (Tableau ci-dessous), ce qui peut s'expliquer d'une part par une augmentation des demandes chez des militaires retrouvant dans 32% des cas une infection à *L. braziliensis*, d'autre part par une plus grande fréquence de cas chez des migrants.

**Tableau VI.- Détail des identifications moléculaires de *Leishmania* au CNR-LA de Cayenne en 2017 et 2018**

	2017		2018	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
<i>L. guyanensis</i>	62	68,9%	111	77,6%
<i>L. braziliensis</i>	8	8,9%	25	17,5%
<i>L. lainsoni</i>	0	0%	1	0,7%
<i>L. naiffi</i>	0	0%	2	1,4%
<i>L. amazonensis</i>	0	0%	4	2,8%
Indéterminée	20	22,2%	6	4,2%

Ces demandes d'identification suivent la répartition des demandes de diagnostic et proviennent en majorité des CDPS (78 réalisations soit 49,7% contre 47,5% en 2017), puis du CH de Cayenne (55 réalisations soit 35% contre 29,5% en 2017) et du Centre Medical InterArmées (24 réalisations soit 15,3% contre 3% en 2017). Comme dit plus haut, le CH de Saint-Laurent-du-Maroni n'adresse quasiment plus ses demandes au CNR-LA.

Le délai entre l'enregistrement du prélèvement au laboratoire et la restitution des résultats est inférieur à 17 jours, le délai moyen de restitution se situant autour de 12 jours. Comme annoncé l'an dernier, ce délai s'est considérablement raccourci en 2018 par rapport à 2017 (entre 18 et 41 jours, avec un délai moyen de 29 jours). Cela s'explique d'une part du fait de l'adoption d'une nouvelle méthode (PCR + séquençage) qui a permis de fluidifier le circuit de rendu des résultats et optimise la prise en charge en terme de gain de temps; d'autre part du fait du recrutement de l'ingénieur de recherche prévu et donc de la réalisation d'une bonne partie des manipulations sur le site du CHAR (plate-forme de biologie moléculaire) au lieu du site de l'Université. Le séquençage est réalisé en sous-traitance avec un délai de rendu de résultat de 12 jours.

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

**Au Laboratoire Coordonnateur**, la banque de données d'identification des *Leishmania* construite en collaboration avec l'équipe du Pr R. Piarroux (initialement à La Timone, Marseille et actuellement à La Pitié Salpêtrière, Paris) a été mise en ligne. Actuellement, toutes les souches qui arrivent au CNR sont typées avec cette méthode. Une nouvelle base de données a été créée (MSI2) afin d'améliorer les performances d'identification au sein de deux complexes qui posaient des problèmes (*donovani* et *braziliensis*). La base est accessible et en cours d'évaluation.

La technique de MALDI-TOF permet de rendre un résultat d'identification en moyenne 4 à 5 jours après la réception de la souche.

**Tableau VII.- Détail des 124 identifications par MALDI-TOF des souches reçues par le CNRL à Montpellier en 2018**

Espèces	Nombre
<i>L. amazonensis</i>	1
<i>L. braziliensis / peruviana</i>	14
<i>L. guyanensis / panamensis</i>	58
<i>L. infantum / donovani</i>	37
<i>L. major</i>	13
<i>L. naiffi</i>	1

Le **LA de Cayenne** a débuté la mise en place de cette technique en mai 2016, en parallèle avec la technique de PCR-RFLP et en collaboration avec Marseille et le Laboratoire Coordonnateur. Durant l'année 2017, l'identification par MALDI-TOF s'est mise progressivement en place en routine au CNR-LA et tend à devenir réalisée en systématique dès lors que la culture le permet.

Sur les 236 demandes de **culture** enregistrées en 2018, 103 (44% contre 39.8% en 2017) ont été positives, 55 négatives (23,3% contre 21.7% en 2017), et 78 (33% contre 38.5% en 2017) ont révélé la présence d'un contaminant (levures et/ou bactéries). Sur les 103 cultures positives en 2018, le MALDI-TOF a permis l'identification d'espèce sur 70 demandes, réparties comme suit :

**Tableau VIII.- Détail des 103 identifications par MALDI-TOF des souches reçues par le CNR-LA (Cayenne) en 2018**

	Nombre	Pourcentage
<i>L. guyanensis (complexe)</i>	52	75%
<i>L. braziliensis (complexe)</i>	15	21,4%
<i>L. amazonensis</i>	2	3%
<i>L. lainsoni</i>	0	0%
<i>L. naiffi</i>	1	1,4%

On note ici encore une forte augmentation en proportion des cas de *L. braziliensis* (de 7,9% en 2017 à 21,4%).

Le délai entre l'enregistrement du prélèvement au laboratoire et la restitution des résultats varie entre 10 et 15 jours. Le délai moyen de restitution se situe autour de 12 jours (contre 29 jours en 2017). Cette amélioration est comme expliqué ci-dessus très probablement lié au personnel dédié et aux capacités sur site de réaliser les manipulations.

La combinaison en 2018 des **résultats du MALDI-TOF et du diagnostic moléculaire au CNR-LA de Cayenne** a permis de rendre le diagnostic d'espèce dans 147 des 166 positifs (88,5% contre 78,4% en 2017).

#### **2.5.4. 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.

Les tests de chimiosensibilité sont exceptionnellement demandés chez ce parasite, et posent un problème d'interprétation en raison des différences notables observées entre amastigotes et promastigotes de la même souche. Aucune demande n'a été enregistrée en 2018.

### **2.6. Activités de séquençage**

Le CNR-L n'a effectué aucune activité de séquençage à haut-débit cette année. Sa seule activité de séquençage est réservée au séquençage des produits de PCR à des fins de typage. Le CNR aurait accès à une plate-forme de séquençage externe au CNR (MGX-Montpellier) où les technologies les plus avancées sont proposées.

Malgré l'intérêt pour ce type d'approche, plusieurs obstacles en limitent la réalisation :

- la limitation la plus flagrante est celle du coût;
- la seconde est celle du temps disponible, pris en bonne partie par les exigences de l'accréditation des laboratoires (environ 1,2 ETP biologiste du CNR);
- la troisième est l'absence d'expertise en bio-informatique.

*Mentionner ici les activités de séquençage génomique (WGS, NGS ...) réalisées par le CNR lors de l'année N, en répondant notamment aux questions suivantes :*

- Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?
  - Si NON ou accès limité, en préciser les raisons ;
  - Si OUI : potentiellement MGX Montpellier (plate-forme CNRS externe au CNR), technologie Illumina
    - o Type d'accès (interne ou externe au CNR) ; si externe, préciser quelle(s) plateforme(s) ;
    - o Technologie/matériel de la (des) plateforme(s) de séquençage auquel le CNR a accès ;

- Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?
  - Si NON ou accès limité, en préciser les raisons :
  - Si OUI : Potentiellement Antoine Claessens (UMR5290 "MiVEGEC") mais il s'agirait d'une aide ou d'une collaboration plutôt que d'un service
    - o Type d'accès (interne ou externe au CNR) ; si externe, préciser la source ;
    - o Outils utilisés pour l'analyse des séquences : commercial (BioNumerics par exemple), outil open source, outil maison ...
- Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ? NON
  - Si NON, est-ce prévu et à quelle échéance ? NON
  - Si OUI, pour quelles activités :
    - o Investigations d'épidémies ?
    - o Surveillance ?
- Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrire les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et préciser si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquer alors lesquelles).
- Si le séquençage est utilisé à des fins d'investigations d'épidémies : nombre de séquences réalisées dans l'année
- Si le séquençage est utilisé à des fins de surveillance :
  - Nombres de séquences réalisées dans l'année
  - Modalités de sélection des souches pour séquençage : aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues), échantillonnage (préciser son type), études répétées, ...
- Si le séquençage est utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences brutes (fastaq files) :
  - Dans des bases de données fermées (nationales ou internationales)
  - Dans des bases de données publiques (ENA par exemple) avec ou sans métadonnées associées

*Note : ces informations sont importantes compte tenu de l'évolution des techniques microbiologiques. Elles permettront de rendre compte au Comité des CNR de votre activité en la matière, et aussi de répondre aux enquêtes annuelles de l'ECDC à ce sujet sans devoir vous solliciter une seconde fois.*



### 3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

- Le nombre de cas déclarés au CNR-L a encore augmenté (426 cas cette année), essentiellement des formes cutanées.
- Les cas en provenance du Maghreb continuent de progresser, avec des formes cutanées à localisations multiples qui répondent mal au traitement dans un certain nombre de cas. Le nombre de cas à contamination autochtone restent stables. Le nombre de LV demeure stable avec toujours une prédominance de sujets adultes non immunodéprimés
- Diminution du nombre de cas diagnostiqués ou contaminés en Guyane, qui constituent néanmoins la majorité (56%) des cas déclarés. La proportion de LC à *L. braziliensis* est à nouveau remontée en 2018, jusqu'à 19,5 %, ce qui représente son taux le plus élevé depuis plusieurs années. Il conviendra de maintenir la surveillance pour juger de la cinétique de cette espèce en termes de circulation au sein des populations humaines.

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

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

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

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

#### 3.1. Description du réseau de partenaires

- Description des partenaires ;
- Répartition par type d'activités ;
- Répartition géographique (utiliser une **carte** pour la décrire) ;
- Estimation de la couverture du réseau ou représentativité ;
- Evolution du réseau lors de l'année N ;
- Définition éventuelle de l'échantillon de souches reçues de ces partenaires ;

Le **réseau** de partenaires mis en place au fil des ans par le CNR reste fort. Il constitue un maillage sur l'ensemble du territoire métropolitain pour Montpellier et sur l'ensemble du territoire guyanais pour Cayenne. Il comprend l'ensemble des laboratoires de CHU, des laboratoires des CH pour Montpellier, et des CDPS (centres de santé) pour Cayenne. Les Centres de Santé des Armées constituent également des partenaires importants, plus ou moins réguliers selon les

années. Le réseau se montre stable au fil des ans. Tous les CHUs reçoivent annuellement une sollicitation via le réseau ANOFEL pour déclarer les cas diagnostiqués. Le réseau mis en place couvre l'ensemble du territoire métropolitain et le département de la Guyane Française. Le réseau maille ainsi l'ensemble des régions.

La couverture du réseau est difficile à estimer avec précision. La poussée de l'accréditation des laboratoires devrait nous permettre d'augmenter le nombre de correspondants par l'intermédiaire des demandes de diagnostic. Ainsi, au cours de l'année 2018, nous avons observé une augmentation de l'activité diagnostique du CNR-L, probablement liée à la difficulté d'accréditer des méthodes diagnostiques pour des pathologies peu répandues. Il est logique que ces activités spécialisées soient assurées de plus en plus par le CNR, qui dispense aussi les conseils de prise en charge.

**Figure 4. Répartition géographique du réseau des correspondants du CNR des Leishmanioses en 2018.**



Par ailleurs, depuis 2015, des relations plus fortes ont été établies entre Montpellier et le **L-A de Cayenne**; les relations sont fluides et des collaborations plus étroites ont été initiées. La visite de Patrick Bastien à Cayenne à l'automne 2016 a permis d'apprécier les fortes contraintes imposées au L-A par le contexte local et les potentialités offertes dans ce Département où la leishmaniose est un problème de santé publique particulièrement important.

### \* Centre coordonnateur (Montpellier) :

La liste des Centres ayant déclaré au CNR-L des cas de leishmanioses en 2018 figure ci-dessous.

**Pour les CHU (n=28):** les Laboratoires de Parasitologie-Mycologie des CHU suivants : Amiens, (80), Bordeaux (33), Caen (14), Clermont Ferrand (63), Dijon (21), Grenoble (38), Lyon (69), Marseille (13), Montpellier (34), Nancy (54), Nantes (44), Nice (06), Nîmes (30), Pointe-à-Pitre (971), Reims (51), Rennes (35), Rouen (76), Stasbourg (67), divers établissements de l'AP-HP à Paris (75) (Bicêtre, Bichat, Cochin-St Vincent de Paul, Henri-Mondor, Robert Debré, St Joseph, St-Louis, Pitié-Salpêtrière, Necker), Avicenne à Bobigny (93).

**Pour les CHG (n=18)** CH Annecy (74), CH Arcachon (33), CH Avignon (84), CH Béziers (34), CH Chambéry (74), CH Dreux (28), CH Le Mans (72), CH Metz (57), CH Mulhouse (68), CH Orléans (45), CH Pau (64), CH Orléans (45), CH Périgueux (24), CH de Tourcoing (59), CH de Roubaix (59), CH Villefranche sur Saone (69), CH Saint Lo (50), Centre de Santé de Saint Laurent du Maroni.

**Pour les Hôpitaux d'Instruction des Armées :** HIA Legouest à Metz (57), HIA Bégin à Saint Mandé (94) et HIA Laveran (13), Percy (50), Thionville (57).

**Pour le Service de Santé des Armées :** Département d'Epidémiologie et Santé publique. **Antennes militaires** à Cayenne, Kourou et Saint Laurent du Maroni.

Le réseau de partenaires, regroupant quasiment l'ensemble des CHU, est censé couvrir de façon pratiquement exhaustive les cas diagnostiqués en métropole. Le groupement en GHT, la pression de l'accreditation, ainsi que la refonte et la visibilité du site Internet du CNRL, ont probablement contribué à améliorer la collaboration avec le CNRL, et permettent d'évoluer vers un recensement exhaustif des cas diagnostiqués en métropole.

### \* 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 et 73%), adressés par les divers laboratoires et centres de soins de la Guyane :

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

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

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

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

d'activités de diagnostic de la leishmaniose cutanée. A noter toutefois, l'absence de données provenant de Saint-Laurent-Du-Maroni qui a fait le choix de transférer les prélèvements au CNR Montpellier du fait de problématiques logistiques (coursiers, connexions informatiques...).

## 3.2. Surveillance de l'infection et des caractéristiques des leishmanioses

### 3.2.2. Déclaration des cas

**En 2018, 426 cas au total** ont été déclarés au CNR-L : 269 fiches de déclaration de cas ont été reçues directement au CNR-L, provenant de structures de France métropolitaine (196 déclarations), des Services de Santé des Armées (35 cas), directement de Guyane Française (37 cas) et de Guadeloupe (1 cas à *L. guyanensis* de Guyane). Le L-A de Cayenne a déclaré 157 cas de LC diagnostiqués en Guyane Française; ceci représente une baisse globale de 15% par rapport à 2017, déjà enregistrée à l'identique l'année précédente. Néanmoins, avec la hausse des déclarations en Métropole, le nombre de cas avec une contamination en Guyane française (224) est globalement stable par rapport à 2017.

La **répartition de ces cas selon la forme clinique** pour l'année 2018 se fait de la façon suivante (toutes structures confondues) :

- 22 cas de leishmanioses viscérales, dont 10 cas d'autochtones, 7 dont l'origine était indéterminée, et 5 où la contamination avait eu lieu hors de France.
- 399 cas de leishmanioses cutanées (dont 4 autochtones de France métropolitaine),
- 1 cas de leishmaniose cutanéomuqueuse (contamination en France métropolitaine).

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

Le Tableau IX et la Figure 5 ci-dessous montrent la répartition de ces cas **selon l'origine géographique** des contaminations.

Les principaux changements observés par rapport à 2017 sont :

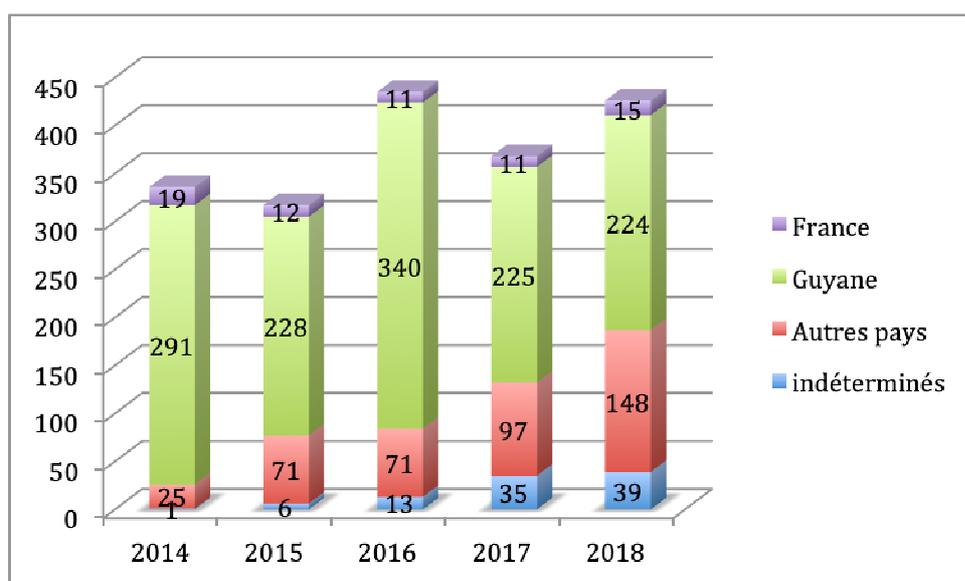
- une nette diminution de la *proportion* de cas de Guyane Française, ne représentant plus que 52,6% des cas (au lieu de 61% et 78% en 2017 et 2016 respectivement), mais avec un nombre global de cas guyanais qui reste stable;
- une augmentation modérée de la proportion de cas du Maghreb qui se poursuit depuis 3 ans (11% en 2016, 15% en 2017 et 18,9% en 2018).

Le pourcentage des cas où l'origine de la contamination n'est pas renseignée ou indéterminée est resté stable.

**Tableau IX. Lieux de contamination pour l'ensemble des cas de leishmanioses déclarés au CNR-L en 2018.**

Forme clinique	Origine de la contamination						Total
	France métropolitaine	Maghreb (Algérie, Tunisie, Maroc)	Guyane et pays limitrophes	Antilles	Autre pays (ou plusieurs pays possibles)	Indéterminée ou non renseignée	
L. viscérale	10	0	0	0	5	7	22
L. cutanée	4	100	224	0	46	29	403
L. muqueuse	1	0	0	0	0	0	1
<b>Total</b>	<b>15</b> (3,5%)	<b>100</b> (23,5%)	<b>224</b> (52,6%)	<b>0</b>	<b>51</b> (12%)	<b>36</b> (8,4%)	<b>426</b>

**Figure 5. Nombre de cas de leishmaniose déclarés au CNR-L de 2014 à 2018 en fonction du lieu de contamination**



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

#### 3.2.3.1. France métropolitaine (hors Guyane)

**Leishmanioses autochtones/importées** : en 2018, 15 cas de leishmanioses autochtones (10 viscérales, 4 cutanées et 1 muqueuse) ont été déclarés. Le nombre de cas importés est beaucoup plus élevé (148 cas dont 5 LV, 143 LC mais aucune LCM). Pour environ 39 cas, il n'a pas été possible de déterminer l'origine de la contamination (voyages ou résidences multiples en particulier).

**Evolution :** Le nombre de cas de leishmanioses déclarés au CNR-L par des structures de santé en France métropolitaine a significativement augmenté par rapport à 2017 (Tableau X), et cela peut être mis sur le compte des cas de LC importées. Lissés sur 5 ans, la moyenne annuelle des cas était de 130 sur 2013-2017, alors qu'en 2018 nous avons recensés 214 cas de LC.

Les cas autochtones restent à un niveau bas (15 cas) avec des chiffres toujours relativement faibles au cours des années passées (min. 11, max. 31).

Le nombre de contaminations ayant eu lieu dans les pays du Maghreb a continué de monter à un niveau relativement élevé avec 100 cas où la contamination a eu lieu avec certitude ou avec une très forte probabilité au Maghreb (*versus* 16 en 2014, puis 57 en 2017). Il s'agit dans plus de 90% des cas des LC dues à *L. major*. Des localisations cutanées multiples sont de plus en plus souvent constatées et présentent des difficultés de prise en charge thérapeutique. Une enquête menée est auprès de nos collègues marocains ont permis de confirmer que les mêmes observations ont été faites au Maroc. Après des échanges avec nos collègues dermatologues, une synthèse a été faite et une communication présentée aux Journées Dermatologiques de Paris (Décembre 2018).

**Tableau X. Evolution du nombre de déclarations annuelles des cas faites au CNR-L (hors CH Cayenne) entre 2014 et 2018.**

Années	2014	2015	2016	2017	2018	Total	Moyenne annuelle 2014-2018
LV autochtones	11	8	8	7	10	44	8,8
LC autochtones	6	5	3	3	4	21	4,2
LM autochtones	2	0	0	1	1	4	<1
<b>Total autochtones</b>	<b>19</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>15</b>	<b>69</b>	<b>13,8</b>
LV importées	5	9	6	9	5	34	6,8
LC importées Guyane	49	29	31	40	33	182	36,4
LC importées autres pays	25	71	64	88	143	391	78,2
LM importées	1	0	2	1	0	4	<1
<b>Total importées</b>	<b>79</b>	<b>109</b>	<b>103</b>	<b>138</b>	<b>181</b>	<b>611</b>	<b>122,2</b>
Origine indéterminée (LV + LC)	1	6	13	35	39 (7 + 32)	94	18,8
<b>Total</b>	<b>99</b>	<b>128</b>	<b>127</b>	<b>184</b>	<b>235</b>	<b>774</b>	<b>154,8</b>

**Pathologie :**

**En 2018**, comme depuis plusieurs années, le nombre de formes viscérales est stable.

Par contre le nombre de cutanées importées est en nette augmentation (210).

Sur l'ensemble des 210 cas de LC diagnostiqués en France métropolitaine, autochtones ou importés, et associés à des données fiables, 70 (versus 65 en 2017) étaient des formes cutanées multiples, 60 étaient des formes à lésion unique, et pour 80 cas il n'y avait pas de précision sur le nombre de lésions.

Un seul cas de forme cutanéomuqueuse à *L. infantum* a été rapporté.

### **Autres données patients :**

Pour les **22 cas de LV**, le facteur immunodépression était renseigné dans 17 cas : seulement 3 patients présentaient une immunodépression, tous les trois infectés par le VIH.

Cinq cas sont survenus chez des enfants âgés de moins de 3 ans et la contamination avait eu lieu en France ou en Espagne. On notera que 5 cas sont survenus chez des patients de plus de 75 ans (contamination en France ou au Portugal). Ainsi, en France, la LV continue de toucher plus souvent des adultes relativement jeunes (moyenne d'âge de 46.8 ans [1-85 ans]). On notera également, encore plus que précédemment, un sex ratio très biaisé (H/F = 4,5/1), avec seulement 4/22 cas de LV chez des femmes.

### **Distribution géographique :**

\* En 2018, comme les autres années, la majorité des cas déclarés ont été contaminés en Guyane (224/426, soit 52,6%), et si on considère l'ensemble de l'Amérique le nombre de cas s'élève à 250 cas (58,6%). La seconde région grande pourvoyeuse de cas reste le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie), avec 55,8% (100/179) des cas de formes cutanées diagnostiquées en métropole, contre 56 % (57/159) en 2017.

\* Pour les **leishmanioses autochtones**, les cas avec un lieu de contamination précis (7 LV, 1 LCM et 3 LC) provenaient de cinq départements du Sud de la France (Alpes-Maritimes, Bouches-du-Rhône, Corse, Hérault, Var et Vaucluse), situés dans la zone d'endémie leishmanienne connue, et les autres du Sud de la France sans précision. A noter que cette année, deux cas provenaient de Corse (1 LV et 1 LC).

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

La situation en Guyane Française a été détaillée dans le dossier de demande de renouvellement du CNR.

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

**Pour l'année 2018 : on retrouve un total de 224 cas de contamination en Guyane** ou dans les pays limitrophes (voir Tableau XI), soit un nombre identique à l'année passée (225) :

- Le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie (Pr. M. Demar) du Centre Hospitalier de Cayenne nous a adressé 157 déclarations de cas de LC diagnostiqués en Guyane Française (soit 14,6% de moins qu'en 2017, 2017 ayant déjà connu une baisse de déclarations de l'ordre de 40%). Sur 101 fiches renseignées sur ce paramètre, le lieu de contamination retrouvé correspondait dans 70,3% des cas à des sites situés en Guyane. Les autres lieux de contamination correspondaient aux pays limitrophes (Surinam et Brésil).
- 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), ceci incluant les antennes militaires de Guyane, ont déclaré un total de 45 cas de LC avec une contamination en Guyane (*versus* 12 en 2017). La notion de « militaire » était renseignée pour 25 patients.
- De plus, parmi les déclarations de cas de LC envoyées par les diverses structures sanitaires métropolitaines, 14 concernaient une contamination en Guyane, dont 3 pour lesquelles le patient était signalé comme militaire.

- A noter que 34 cas de LC avec contamination en Guyane ont été déclarés directement au Laboratoire coordonnateur, par le CH de Saint-Laurent-du-Maroni, et dans une moindre mesure par le Centre de Santé de Grand Santi.

Le nombre de cas originaires de Guyane est ainsi **stable par rapport à l'année passée**. Avec 157 cas déclarés en Guyane et 224 cas déclarés au total, l'incidence annuelle de la LC en Guyane Française en 2018 est similaire à 2017, soit 0,83 p.1000 (sur la base de 270.000 habitants, recensement 2016), alors qu'elle était de 1,36 p.1000 en 2016, et un peu inférieure à 1 p.1000 en 2015 et 2014.

**Tableau XI. Cas de leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse contractés en Guyane en 2018, en fonction de la source de déclaration.**

Déclarations	Nb total	Sexe		Statut		
		H	F	militaire	civil	non rens.
Centres de Santé de France métropolitaine	14	11	3	3	-	11
CH Cayenne et Centres de Santé de Guyane	165	111	54	12	-	153
HIA, SS des Armées et antennes militaires de Guyane	45	44	1	25	-	20
<b>Total</b>	<b>224</b>	<b>166</b>	<b>58</b>	<b>40</b>	<b>-</b>	<b>184</b>

#### **Pathologie :**

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

#### **Autres données patients :**

On notera que le niveau de remplissage des fiches est très variable selon le paramètre et 62 fiches n'ont pas été remplies (aucun renseignement clinique autre que l'état-civil du patient), ce qui a augmenté de 61% par rapport à 2017. Le niveau de remplissage des fiches pour le paramètre "Profession" est de 30% contre 59% en 2017, celui de "Lésion cutanée" de 68% contre 43% en 2017, celui du "Siège des lésions" de 65% contre 53% en 2017, en diminution sur ces deux derniers paramètres (données du CNR-LA).

Une LC a été observée chez 3 patients **VIIH**-positifs dont deux ayant développé une infection à *L. guyanensis*.

En 2018, le **sex-ratio** H/F pour les cas où cette donnée était connue était de 2,86 (166 hommes pour 58 femmes). Il était de 3,9 (595 hommes pour 152 femmes) durant la période 2011-2015. Ceci est à mettre en relation avec les activités forestières (orpaillage, bucheron..), essentiellement masculines.

La répartition des **origines ethno-culturelles** des patients est la suivante : 64 de nationalité étrangère (33,8%) dont 62 Brésiliens, 17 d'origine métropolitaine (9%), 9 Américains (4,8%), 5 Bushinengue (2,6%), 3 Hmongs (1,6%) et 2 Antillais (1%) (données du CNR-LA de Cayenne).

#### **Agents pathogènes en cause :**

La combinaison des données de Cayenne et de Montpellier montre donc la répartition suivante selon l'espèce en cause : 156 cas de *L. guyanensis* (116 à Cayenne et 40 à Montpellier), 41 cas de *L. braziliensis* (25 à Cayenne et 16 à Montpellier), 3 cas de *L. naiffi*, 5 *L. amazonensis*, 4 *L. lainsoni* et 1 *L. panamensis*.

En Guyane, *L. guyanensis* reste donc l'espèce prépondérante, à un niveau équivalent à celui des années antérieures (40 au CNRL et 116 à Cayenne). Le CH de Cayenne rapporte 25 cas à *L. braziliensis*; mais, en cumulant les identifications réalisées au LA de Cayenne et au Laboratoire Coordonnateur, on obtient 41 cas à *L. braziliensis*, espèce qui maintient donc une visibilité et une présence constante depuis plusieurs années, ici à 19,5% (41/210 identifications d'espèce) après s'être maintenue autour de 13% jusqu'à 2015, et une baisse inexplicable en 2014 et 2016.

Un examen de l'évolution depuis 2011 (Tableau XII) montre des fluctuations relativement importantes de la répartition des principales espèces, mais sur le moyen terme une situation globalement stable. Les chiffres confirment donc l'implantation réelle de *L. braziliensis* en Guyane avec une prévalence qui semble en augmentation. Cette tendance devra être confirmée dans les années qui viennent.

Les espèces telles que *L. lainsoni*, *L. naïffi* ou *L. amazonensis*, restent minoritaires (environ 5% des cas).

**Tableau XII. Pourcentages des espèces de Leishmania identifiées pour les cas de Guyane de 2011 à 2018.**

	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Nombre d'identifications	96	104	92	222	198	270	170	210
<i>L. guyanensis</i> (%)	85,4	78,8	83,7	92,2	67	89,3	82,4	74,6
<i>L. braziliensis</i> (%)	13,5	14,4	13	5	12,6	3,2	12,4	19,6
<i>L. amazonensis</i> (%)	0	5,8	2,2	2,3	5,5	0,7	3,5	2,4
<i>L. lainsoni</i> (%)	1	1	1,1	0,4	2	2,5	0,6	1,9
<i>L. naïffi</i> (%)	0	0	0	0	0,05	0,7	1,2	1,4

N.B. Les résultats de 2017 et 2018 ont été obtenus en combinant les résultats du CNR-LA de Cayenne et du séquençage au Laboratoire-Coordonnateur.

### **Distribution géographique et temporelle :**

La part des cas déclarés par les **Centres de santé (CDPS)** reste stable pour cette année 2018 avec 50% des cas. Les cas recensés au niveau des **Centres de Santé des Armées** ont, par contre, beaucoup augmenté cette année, avec 31 demandes contre 11 en 2017.

**Tableau XIII. Origine des cas de leishmaniose en Guyane par types de centres de santé**

Cas déclarés	2014	2015	2016	2017	2018
CDPS	20 (20%)	93 (46,5%)	180 (59%)	96 (51,9%)	113 (59,2%)
Hôpitaux	53 (53%)	95 (47,5%)	114 (37%)	79 (42,7%)	53 (27,7%)
CMIA	27 (27%)	12 (6%)	13 (4%)	10 (5,4%)	25 (13,1%)
	sur 100 cas	sur 200 cas	sur 308 cas	sur 184 cas	Sur 191 cas

La distribution temporelle des cas de leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses en Guyane suit toujours une certaine saisonnalité avec un grand nombre de cas durant la saison des pluies de décembre à mai (77,3% des cas en 2017) puis une baisse des cas durant la saison sèche de juin à novembre (22,7%)(voir Tableau XIV ci-dessous).

**Tableau XIV. Répartition des cas en fonction de la date de prélèvement.**

Mois	Janv.	Fev.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juil.	Aout	Sept.	Oct.	Nov.	Dec.
Cas 2017	45	30	27	11	16	17	6	3	3	5	8	14
Cas 2018	55	42	21	16	5	3	4	4	3	2	8	3

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

Des tests *in vitro* de sensibilité des Leishmanies aux drogues, en particulier à l'amphotéricine B, ont été mis au point au CNR depuis 2005. Cependant, (1) les résistances documentées à la fois *in vivo* et *in vitro* sont rarissimes et (2) les demandes sont également très rares. Aucune demande n'a été enregistrée en 2018.

### **3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux**

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

En Guyane française, une demande émanant de l'ARS visait à préparer et diffuser une maquette d'information sur la leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse à l'ensemble de la population. Le L-A du CNR a contribué à la rédaction du texte. Le document a été édité et diffusé en 2018.

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

#### **3.4.2. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux**

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

En 2018, 4 cas de co-infection VIH/*Leishmania* ont été rapportés :

- 3 cas de LV chez des patients VIH+ sur le territoire métropolitain (1 cas de contamination en France métropolitaine et 2 cas sans précision);
- 3 cas de LC chez des patients VIH+ en Guyane (dont deux à *L. guyanensis*, et un à *L. braziliensis* le 3<sup>ème</sup> patient), sans critères de sévérité.

### **3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance**

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

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

*Si le phénomène concerne le reste du territoire national, les DOM-TOM ou l'étranger, le CNR contacte également le Département des Maladies Infectieuses de S.P.F.*

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

Les cas importés d'Algérie, Maroc et Tunisie, ainsi que ceux de Guyane Française, font l'objet d'une surveillance particulière : le nombre de cas importés d'Afrique du Nord est de 100 cas en 2018 (*versus* 57 en 2017), ce qui est une nette augmentation par rapport à l'incidence annuelle moyenne calculée sur les 6 dernières années. Cette augmentation est peut-être en partie due à l'amélioration du recensement des cas et au fait que de plus en plus de laboratoires font appel au CNR-L pour confirmer le diagnostic ou identifier l'espèce. La localisation précise du pays est disponible pour seulement 71 cas sur les 100 (pour les autres, le lieu est « Maghreb »). Pour ces 71 cas, la répartition par pays est la suivante : 30 cas provenant du Maroc, 29 de Tunisie et 12 d'Algérie. Un cas d'Algérie associait une forme viscérale et une localisation cutanée. Pour les autres cas, on relevait 45 formes cutanées à localisations multiples et 23 avec une lésion unique (non précisé pour les 32 autres cas).

L'endémicité en Guyane Française apparaît difficile à estimer de façon précise, car le lieu de contamination n'est pas toujours précisé dans les déclarations. En 2017 et 2018, l'incidence de la leishmaniose a légèrement baissé mais demeure relativement élevée, à peu près au même niveau que 2015 (0,83 p. 1000). Lissée sur les 7 dernières années, la situation en Guyane apparaît relativement stable.

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

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

### 5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé

#### 5.1.1. Enseignements et formations

Dans les deux Laboratoires du CNR, une formation est dispensée aux Internes concernant les prélèvements de leishmaniose cutanée.

**En Guyane :**

- 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 accueille 3 internes de spécialité DES de Dermatologie de même que des internes de spécialité de DESC de Pathologie Infectieuse et Tropicale. Ils participent à la prise en charge clinique, diagnostique et thérapeutique des patients et effectuent les prélèvements des frottis cutanés et cutanéomuqueux de même que les biopsies.

- Une formation pour les prélèvements de lésions cutanées et/ou muqueuses suspectes de leishmaniose est réalisée pour les médecins affectés dans les Postes et Centres de Santé.
- Des fiches de protocole établies avec le service de Dermatologie et le LHUPM (L-A au CNR) sont aussi mises à disposition auprès des différents services et systèmes de soins, hospitaliers comme libéraux.

### 5.1.2. Accueil de stagiaires au CNR

En 2018 :

Anna FERNANDEZ et Pr Montserrat GALLEGO	Université de Barcelone (Facultat de Farmacia)	Doctorat d'Université	4-8/06/2018
Houliati ISMAILA	Univ. Montpellier	Master 2 Recherche Biologie-Santé	15/01-15/06/2018
Victoria CHAUVIN	Univ. Montpellier	Externe 5ème année Pharmacie	01/01-31/03/2018
Camille GOJARD	Univ. Montpellier	BTS	29/10-21/12/2018

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

### 5.1.3. Liste des guides élaborés (contenu, modes de diffusion)

#### 5.1.4. Diffusion des données de surveillance et des productions du CNR

\* Rétro-information aux partenaires : les rapports du CNR sont diffusés grâce au site Internet du CNR-L (dernier rapport mis en ligne : rapport d'activité 2017, ainsi que la demande de renouvellement 2017-2021).

Une réunion du type "Journée du CNR-L" est envisagée en 2019 ou 2020.

\* Le **site Internet** du CNR-L a fait l'objet en 2018 d'une rénovation complète, avec un site maintenant autonome (<https://cnr-leish.edu.umontpellier.fr/>), dissocié de celui du site du Département de Parasitologie-Mycologie. Il présente de façon claire le CNR et son organisation, les instructions pour le diagnostic biologique (en particulier en cas d'envoi au CNR) et le typage, les déclarations de cas, et le conseil thérapeutique pour les leishmanioses. Les activités du CNR-L y sont diffusées grâce à la mise en ligne des rapports d'activité.

Le site du CRB-*Leishmania* a également été séparé et rénové (<https://crb-leish.edu.umontpellier.fr/>) de façon à permettre une visibilité et une séparation plus faciles des activités CNR/CRB vues de l'extérieur. Il permet une présentation 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 version anglaise des deux sites est encore en construction.

### 5.1.5. Conseils aux professionnels de santé

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

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

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

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

### **a) Conseil thérapeutique**

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

Ce conseil thérapeutique a été basé sur une collaboration entre le CNR-L à Montpellier et le Pr Pierre Buffet et le Dr Gloria Morizot, au départ au Centre Médical de l'Institut Pasteur de Paris, aujourd'hui à l'INTS/CHU Necker-Enfants Malades. Bien que la demande soit aujourd'hui le plus souvent faite par e-mail, un numéro téléphonique est accessible aux médecins aux heures ouvrables. Ceci permet de proposer au sollicitant (médecin français confronté à un cas et fournissant les informations cliniques nécessaires) une solution thérapeutique au cas par cas, reposant sur une connaissance précise de la littérature et sur l'expérience personnelle des intervenants. Le conseil est donné soit en direct, soit dans les 48 h pour les cas complexes. La responsabilité de prescription demeure toutefois entre les mains du médecin directement en charge du patient. Ce conseil doit en outre permettre d'améliorer le recueil et la déclaration des effets indésirables graves des médicaments anti-leishmaniens en relation avec les services de pharmacovigilance.

En **2018**, 28 conseils thérapeutiques ont été donnés par l'équipe de Montpellier; un nombre plus important a été donné par l'équipe de Necker-Pasteur (non tracé).

**En Guyane Française**, le Service de Dermatologie du CHAR est le service référent pour la prise en charge clinique et thérapeutique de la leishmaniose cutanée avec comme responsable référent, le Pr Pierre Couppié. Un nouveau Chef de Clinique-Assistant est venu renforcer l'équipe en 2018, avec des missions réalisées dans le cadre des CDPS.

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

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

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

## 5.2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires

- 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.
- Après la consultation du CNR-L par la **H.A.S.** en 2016 et 2017 pour expertise concernant les examens biologiques relatifs au diagnostic conventionnel, sérologique et moléculaire, des différentes formes de leishmanioses, l'HAS a publié des recommandations pour le diagnostic des leishmanioses ([https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_2751691/fr/actualisation-des-actes-de-biologie-medicale-relatifs-au-diagnostic-de-la-leishmaniose](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2751691/fr/actualisation-des-actes-de-biologie-medicale-relatifs-au-diagnostic-de-la-leishmaniose)). A ce jour les modifications de la nomenclature ont été validées par la CHAP et la CNAM; la publication au J.O. sera effective avant fin juin 2019.

## 5.3. Conseil et expertise pour d'autres cibles (grand public...)

Le CNR-LA à Cyaenne, en collaboration avec l'EPaT (EA 3593), participe chaque année au projet « la Fête de la Science » qui consiste à animer des stands auprès du public en abordant des thématiques de santé. La leishmaniose fait partie des thématiques abordées.

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

### 6.1. ACTIVITES DE RECHERCHE EN 2018

Le CNR-L participe à plusieurs programmes de recherche conduits

- d'une part dans le Département de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier et dans l'unité labellisée "MiVEGEC" ("Maladies infectieuses et vecteurs : écologie, génétique, évolution et contrôle", UMR CNRS 5290/ IRD 224 / Université Montpellier, dir. F. Simard), à laquelle le CNR-LC est rattaché depuis 2008.
- d'autre part dans le LHUPM et l'EA 3593 "EPaT" à Cayenne.

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

#### 6.1.1. 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) travaille 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 autres l'originalité de recueillir les options thérapeutiques qu'aurait choisies le clinicien sollicitant s'il n'avait pas eu accès au conseil (mesure de l'impact tangible de l'activité de conseil).

Au sein du groupe, le Dr C. Ravel participe en particulier à la réflexion sur l'identification moléculaire et les éléments de taxonomie du parasite, avec l'objectif d'harmoniser les techniques d'identification moléculaires des parasites, étape clé dans la prise en charge thérapeutique. Des analyses comparatives ont été faites entre différents systèmes de typage.

Depuis 2016, un autre membre du CNR-L (L. Lachaud) a rejoint le groupe sur la thématique "Mise en place de recommandations thérapeutiques".

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

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

Les premiers résultats montraient que cette technique permet de faire une pré-identification de l'espèce dans un délai extrêmement court à partir de parasites en culture. Un échantillonnage de 121 souches formellement identifiées par le CNR-L et couvrant 32 taxons différents a été utilisé pour la mise au point d'une technique d'obtention d'empreintes ("spectres")

et pour la création d'une banque de spectres de référence. Cependant, la base de données n'était pas assez fournie. En collaboration avec le Centre Collaborateur de **La Pitié-Salpêtrière** (Pr Renaud Piarroux, ex-Marseille), la base de données a évolué. Une nouvelle base (MSI2) a été construite. L'algorithme a été amélioré pour une identification plus fine des complexes *L. donovani* et *L. braziliensis*. Le nombre de données incrémentées a aussi été augmenté. La validation est en cours par les 4 centres (Montpellier, Pitié-Salpêtrière, Cayenne et Barcelone). Les premiers résultats semblent très prometteurs. L'application gratuite permettant l'identification en ligne à partir de fichiers bruts générés par l'automate de MALDI-TOF Bruker® a été maintenue. Ce travail fera l'objet d'une publication dès les tests achevés. Nous avons communiqué à différentes reprises sur ce sujet afin de faire connaître cet outil.

### 6.1.3. Travaux de recherche du CNR-LA à Cayenne

- Le CNR-LA contribue au travers des souches isolées à la poursuite des projets de recherche de l'EPaT, EA 3593 sur la virulence des souches, l'épidémiologie moléculaire, et l'usage de la pharmacopée traditionnelle dans cette pathologie.
- **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).Ce travail a fait l'objet en 2018 d'un mémoire de DESC de Spécialité en dermatologie pour les années 2017-2018.

### 6.1.4. Autres travaux collaboratifs en recherche

En 2017, un travail collaboratif a été initié avec l'équipe du Pr Pierre Antoine Bonnet (Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier) et l'équipe du Dr Hiba El Hajj, (Department of Experimental Pathology, Immunology and Microbiology, Faculty of Medicine, **American University of Beirut**). L'objectif est de tester l'efficacité *in vitro* de nouvelles molécules candidates sur diverses souches et espèces de *Leishmania* dans des modèles promastigotes, amastigotes et murins. En 2018, les financements demandés n'ont pas abouti, de nouvelles demandes sont en cours en 2019.

La collaboration de longue date avec l'équipe du Pr Charles Jaffe (National Center for Leishmaniasis, **Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem**) sur les souches responsables de LV et de PKDL (*post-kala azar dermal leishmaniosis*) en Ethiopie et au Soudan a abouti à une publication en commun dans *Infect. Genet. Evol.* en 2018.

La collaboration, également de longue date, avec l'équipe du Pr Monserrat Gallego (Facultat de Farmacia, **Universitat de Barcelona**) s'est poursuivie dans le cadre de la thèse d'université d'Anna Fernández-Arévalo. Elle concerne le typage de souches et l'épidémiologie des leishmanioses en pays catalan. L'un des aspects du travail est de préciser la structure génétique du complexe *L. donovani* sur l'ensemble de son aire de répartition et d'évaluer les flux génétiques entre les taxons qui sont réunis dans ce complexe (*i.e. L. infantum, L. archibaldi* et *L. donovani*).

## 6.2. LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DE 2018

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

### 6.2.1. Publications nationales

### 6.2.2. Publications internationales

JABER HT, HAILU A, PRATLONG F, LAMI P, BASTIEN P, JAFFE CL. Analysis of genetic polymorphisms and tropism in East African *Leishmania donovani* by Amplified Fragment Length Polymorphism and kDNA minicircle sequencing. *Infect Genet Evol.* 2018; 65:80-90.

EL HAJJ R, BOU YOUNESS H, LACHAUD L, BASTIEN P, MASQUEFA C, BONNET PA, EL HAJJ H, KHALIFEH I. EAPB0503: an Imiquimod analog with potent in vitro activity against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12(11):e0006854. doi: 0.1371/journal.pntd.0006854

CHRISTEN JR, BOURREAU E, DEMAR M, LIGHTBURN E, COUPPIÉ P, GINOUVÈS M, PRÉVOT G, GANGNEUX JP, SAVINI H, DE LAVAL F, POMMIER DE SANTI V, BRIOLANT S. Use of the intramuscular route to administer pentamidine isethionate in *Leishmania guyanensis* cutaneous leishmaniasis increases the risk of treatment failure. *Travel Med Infect Dis.* 2018; 24:31-36. doi: 10.1016/j.tmaid.2018.02.010.

### 6.2.3. Chapitres de livres

### 6.2.4. Communications à congrès nationaux

### 6.2.5. Communications à congrès internationaux

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

PRADINAUD R., DEMAR M. Éco-épidémiologie des leishmanioses dans le Bassin amazonien. Congrès de la Société Française de Parasitologie-Mycologie, Nice, Mai 2018

LACHAUD L. Le Centre National de Référence des Leishmanioses. Congrès Franco-Marocain de Parasitologie et Mycologie Médicale. Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat – 1er au 3 février 2018.

DEMAR M. Diagnostic de parasitologie en MALDI-TOF (phlébotomes et réduves, typage leishmaniose). Symposium « *Microbiology & Diagnostics* », Paris, Décembre 2018

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

*Dans le contexte actuel d'avancée de la leishmaniose canine rapportée sur des positions de plus en plus septentrionales et dans un contexte plus général d'émergence de maladies vectorielles animales, en lien ou non avec le réchauffement climatique, la surveillance de la leishmaniose animale, de ses différents vecteurs et de ses réservoirs, paraît primordiale tant pour la santé animale que pour la santé publique. Cette surveillance est fortement contributive à celle des leishmanioses humaines dans la mesure où le chien joue un rôle de "sentinelle" dans les foyers endémiques à *L. infantum*.*

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

*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, contribuait depuis 2009 à la surveillance de la progression des leishmanioses et des souches de leishmanies susceptibles de passer du réservoir animal à l'homme.*

Pour des raisons indépendantes de notre volonté, l'ANSES a décidé d'arrêter cette activité, mettant un terme à la coopération en matière de surveillance et de veille entre le LSA de l'ANSES et le CNR, qui s'était traduite tant par des échanges d'informations sur les souches circulantes dans la faune, que de matériel biologique ou méthodologique, voire de données d'expérimentations.

En conséquence, aucune activité n'a eu lieu cette année au CNR-L concernant la leishmaniose animale. Le Dr Mohamed Kasbari nous a néanmoins envoyé 24 souches issues de ses recherches antérieures.



## 8. PROGRAMME D'ACTIVITE POUR 2018-2019

Le programme d'activité pour 2018-2019 comporte la poursuite des activités d'expertise, de surveillance, d'alerte et de conseil. Dans chacun de ces domaines, le CNR-L s'efforcera d'améliorer ses performances et d'accroître ses activités, comme il l'a fait depuis sa création.

### 8.1. Activités d'Expertise

#### 8.1.1. Réseau de partenaires

Le CNR-L a un réseau de partenaires étendus, autant en métropole qu'en Guyane Française. Environ 120 établissements de santé au total, publics, privés ou des Armées, envoient des échantillons à Montpellier pour un diagnostic de leishmaniose.

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 continueront à être stimulés entre Montpellier et le L-A de Cayenne, dans le but de fluidifier les relations et d'entretenir des collaborations plus étroites. Les réunions téléphoniques continueront autant que possible sur une base régulière. Des réunions en métropole pourraient avoir lieu à l'occasion du passage du Pr Magalie Demar. Des formations en biologie moléculaire sur le site de Montpellier pourraient être organisées pour l'ingénieur de recherche de Cayenne.

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

D'assez nombreux kits de détection commerciaux sont maintenant proposés à travers le monde. Les cibles moléculaires visées sont peu nombreuses (gène kinétoplastique du cytochrome B en particulier) ou non décrites. Une évaluation comparative d'un certain nombre de ces kits devrait permettre d'établir s'il existe des différences significatives de sensibilité de détection entre eux. Le système non commercialisé actuellement utilisé au LC du 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.

Le CNR-LA poursuivra ses tests de performances pour deux systèmes de PCR commerciaux : le kit lyophilisé LshSpp dtec-qPCR Test de Genetic Analysis Strategies (GPS®) et le kit Leishmania spp. de CLONIT® distribué par Eurobio®. Ces kits permettront la détection qualitative des leishmanies dans les échantillons; la PCR «typage» serait conservée pour les échantillons positifs. S'ils sont satisfaisants en termes de sensibilité et spécificité, ces kits devraient aussi offrir une meilleure standardisation et une meilleure adéquation avec les exigences de l'accréditation de la biologie.

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

### 8.1.3. Identification des *Leishmania*

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

- l'identification moléculaire, devenu le typage de référence dans le Laboratoire coordonnateur ; 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 a largement remplacé l'identification moléculaire dans la plupart des applications en routine. Par contre, si sa facilité d'utilisation pour le typage rapide de souche ne semble pas faire de doute, il reste indispensable d'évaluer la capacité de cette méthode à être utilisée pour des études épidémiologiques.

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

La phase de mise au point est terminée et la technique validée. Cette technique, utilisée au quotidien autant à Montpellier qu'à Cayenne, permet un contrôle sur l'ensemble des souches stockées ou reçues au laboratoire dans le cadre du CNR. Ainsi, l'identification systématique des >6000 souches existantes se poursuivra afin de détecter d'éventuelles erreurs anciennes de manipulations, déjà mises en évidence lors de la mise au point de ce typage (à ce jour plus de 600 souches typées, dont l'ensemble des souches du catalogue).

Le progrès enregistré sur ce plan technique sera amplifié et partagé au titre du CNR.

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

La Collection internationale de souches de *Leishmania* du CNR-L est décrite au § 2.4. 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.

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

La richesse et la précision des renseignements relatifs à chaque souche nécessitent un travail constant de contrôle et de synthèse au vu de l'énorme masse de données engrangée au fil des 40 années de l'existence de la Collection. Depuis le travail de l'ancien 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 de Patrick Lami, technicien, 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.

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

A la suite de la reprise du travail de curateur de la Collection par Laurence Lachaud en 2016 et 2017, 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 Pralong, et profitant de sa mise au point du MALDI-TOF dans le Laboratoire, L. Lachaud, assistée de Patrick Lami et Yves Balard, doit donc continuer à identifier des erreurs éventuelles concernant le code O.M.S., le stock de cryotubes existant, 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 la souplesse de la gestion de la Collection.

#### **8.1.4.3. Réception des souches**

Les souches reçues durant les années à venir continueront à alimenter la Collection internationale. 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.

#### **8.1.4.4. Démarche Qualité**

La démarche Qualité sera poursuivie, 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.

En ce qui concerne le CRB, les structures 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. Cependant, la Collection de souches de *Leishmania* manque de ressources humaines pour terminer la tâche, Une vacation "Qualité" sera demandée pour un technicien Qualité afin de terminer ce qui reste à faire pour la Collection de souches.

#### **8.1.5. Activités d'expertise du CNR-LA de Cayenne**

Le programme d'activités d'expertise du LA de Cayenne peut se décliner comme suit :

- **Un outil moléculaire de type qPCR** pour assurer un diagnostic en routine des leishmanioses cutanées adaptées aux souches circulantes de Guyane est actuellement en phase de développement avec le test de 2 kits commerciaux. Une accréditation ISO 15189 pourrait être envisagée si un de ces kits peut être utilisé en routine pour la détection des leishmanies.

- 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 LA
- **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. Le protocole de faisabilité est rédigé et soumis aux partenaires.
- **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 CNR-LA sur le diagnostic des *Leishmania* d'origine cutanéomuqueuse : prélèvements de biopsies cutanées, étalement de lames, coloration des lames et lecture.
- **Amélioration du recueil de données épidémiocliniques.** La secrétaire affectée au CNR-LA est chargée de vérifier l'ensemble des renseignements notifiés sur les fiches de déclaration en termes de richesse et pertinence des informations (appels des praticiens, ..).

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

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

Ce projet se poursuit depuis plusieurs années avec l'objectif d'harmoniser les techniques d'identification moléculaire 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 du Pr Pierre BUFFET 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.

### 8.1.6.2. Recherche en collaboration avec les structures travaillant en santé animale

#### Prévalence de la leishmaniose canine en Languedoc-Roussillon

Une collaboration au niveau local entre le Centre coordonnateur de Montpellier et le LVD sera développée avec pour objectif **l'étude de la prévalence de la leishmaniose canine en Languedoc**. Ce travail a pris du retard du fait de difficultés liées à la disponibilité des propriétaires de chenils dans la région cévenole. Le travail est relancé pour 2019-2020.

Des observations très indirectes font penser que l'incidence de la leishmaniose canine a fortement diminué dans la région. Une enquête de prévalence 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 200-300 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.

### 8.1.6.3. Autres projets de recherche en collaboration

La collaboration de longue date avec l'équipe du Pr Charles Jaffe (National Center for Leishmaniasis, **Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem**) sur les souches responsables de PKDL (*post-kala azar dermal leishmaniosis*) sera également poursuivie à la lumière de nouvelles données obtenues grâce au NGS.

Le travail collaboratif avec l'équipe du Pr Pierre Antoine Bonnet (**Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier**) et l'équipe du Dr Hiba El Hajj, (Department of Experimental Pathology, Immunology and Microbiology, **Faculty of Medicine, American University of Beirut**) visant à tester l'efficacité in vitro de nouvelles molécules candidates sur diverses souches et espèces de *Leishmania* sera également poursuivi.

Un projet d'évaluation de différentes techniques sérologiques dans le cadre du diagnostic de la leishmaniose viscérale va être mené en collaboration avec le **CHU de Nice** et deux partenaires du Maghreb : l'**Institut Pasteur de Tunis** (Pr Karim Aoun) et Pr Badre Lmimouni (**Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V, Rabat, Maroc**) et l'IHU méditerrané (Dr Coralie L'Ollivier). Pour cela, environ 110 sérums issus de patients ayant une LV confirmée seront inclus dans l'étude ainsi que 140 sérums témoins provenant de patients n'ayant pas de LV, ceci afin d'obtenir une spécificité et une sensibilité de 95% avec une précision de 4%.

### 8.1.6.4. Projets de recherche du CNR-LA 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.

Les sujets de recherche dans lesquels est impliqué directement ou non le CNR-LA sont :

- L'étude de **corrélations in vivo/in vitro** dans le cadre de collaboration entre le LHUPM et les services cliniques dont le Centre Médical Inter-Armées (CMIA), le service de dermatologie et les CDPS. Il s'agit de décrire les aspects cliniques particuliers ou non en rapport ou non avec la circulation des différentes souches de *Leishmania*. Ce travail de fond contribue à la surveillance épidémiologique.
- **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).
- **Evaluation du diagnostic moléculaire de leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse sur écouvillons.** Ce travail est en cours de réalisation coordonné par le service de Dermatologie et le LHUPM.
- **Epidémiologie des leishmanioses à *Leishmania lainsoni* et *L. naiffi* et typage moléculaire.** Ce travail est en cours de réalisation en collaboration avec le CHU de Nice (équipe du Pr Marty) et le CNR à Montpellier.
- Depuis 2017, le CNR-LA a contribué avec l'Institut Pasteur de Cayenne et le Laboratoire de Parasitologie de la Pitié-Salpêtrière (Pr. R. PIARROUX) au développement d'une

banque de données sur **l'identification des phlébotomes de Guyane française à partir du MALDI-TOF**. L'exploitation des données et la valorisation de ce travail dans le cadre d'une thèse de Sciences est en cours.

- Etude de la **sensibilité des souches de *Leishmania*** (i) aux composés issus de la pharmacopée traditionnelle ou des extraits d'huiles essentielles (projet en cours de financement); (ii) aux drogues habituellement utilisées pour le traitement.
- **Détection et phylogénie moléculaire des *Leishmania* RNA Virus**. Ces virus ont en effet été montrés comme jouant un rôle dans la virulence des espèces présentes en Guyane (*L. guyanensis* et *L. braziliensis*). L'objectif avec Cayenne sera d'évaluer la prévalence des *Leishmania* RNA virus chez *L. guyanensis* et déterminer leur diversité génétique. Il s'agit d'un projet dont le promoteur à Cayenne est l'EPaT ou EA3593 (Université Guyane), en partenariat avec l'Unité Immunologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Cayenne (Eliane Bourreau), le Department of Biochemistry à Lausanne (Suisse) (Pr. N. Fasel et Dr C. Ronet) et le L-A pour les composantes clinique et parasitologique.
- Etude de la **prévalence des différentes espèces de *Leishmania* présentes dans les vecteurs** sur différentes communes de Guyane (Cayenne, Cacao et Saint-Georges) ; projet en collaboration avec l'Institut Pasteur de Cayenne.
- **Epidémiologie moléculaire des plateaux** de Guyane avec typage moléculaire des *Leishmania* isolés dans la région des plateaux.

## 8.2. Conseil, Information, Formation

### 8.2.1. Conseil

Les membres du CNR-L répondront aux **demandes d'expertise** de l'administration en accord avec le Ministère chargé de la Santé. Ils participeront le cas échéant 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, la complexité du sujet cantonne le savoir-faire thérapeutique à de rares spécialistes. Par ailleurs, sauf situation exceptionnelle, aucune des formes cliniques ne requiert de décision urgente.

**Au niveau du LA-CNR**, le service de Dermatologie du CHAR est le service référent de la prise en charge de la leishmaniose cutanée. Les personnes référentes par rapport au conseil thérapeutique sont le Pr Pierre Couppié et le Dr Romain Blaizot (Chef de Clinique Assistant).

### 8.2.2. Information

La **veille d'information** (Internet, bibliographie) doit être 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).

Le **site Internet** du CNR-L et du CRB-Leish fera l'objet d'améliorations.

La version anglaise des deux sites est encore en construction; elle sera mise en place en 2019 de façon à permettre l'accès à une audience internationale.

Des pages spécifiques au CNR-LA seront rédigées et mises en forme par le LA pour être mises en ligne sur le site du CNR à Montpellier, ce qui lui assurerait une meilleure visibilité.

Une réunion scientifique du type "**Journée du CNR-L**" est envisagée en 2019 ou 2020.

### 8.2.3. 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, de typage de souches, et de cryoconservation et stockage.

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.

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

## 8.3. Contribution à la surveillance des leishmanioses humaines

### 8.3.1. En France métropolitaine (Montpellier)

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

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.

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

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

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

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 CNR à 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 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 pourrait être favorisée par la forte prévalence de l'infection à VIH en Guyane et par l'importance des migrants en provenance du Brésil. Cela impose une surveillance du fait des mouvements migratoires (homme et animaux). La recherche sera systématique par PCR en temps réel en cas de suspicion clinique, associée à la sérologie classique, avec des indications élargies chez les sujets immunodéprimés.

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

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

### **8.4. Contribution à l'alerte**

Le Laboratoire Coordonnateur, aidé en cela par le Laboratoire-Associé, centralisera et signalera à l'Institut de Veille sanitaire tout événement 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

Nous souhaitons remercier **l'ensemble des personnels du CNR-L**, autant du Laboratoire Coordonnateur que du Laboratoire Associé, pour le travail fourni ainsi que pour la rédaction de ce rapport. Nous remercions également les Centres collaborateurs 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-HP Pitié-Salpêtrière; Pr Pierre Marty, CHU de Nice ; Pr Jérôme Depaquit, Université de Reims ; Pr Gilles Bourdoiseau, ENV de Lyon).

Au nom du CNR-L, nous remercions enfin **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.



## **ANNEXES**



## Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

### 1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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 :

- 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*,
- la collecte et la conservation de souches de *Leishmania* et leur identification (par protéomique ou biologie moléculaire),
- 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 CNR-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 a pour mission de collaborer avec des structures de santé animale afin de mieux décrire, surveiller et circonscrire les nombreux foyers de leishmaniose canine présents en France.

### 1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

*Fournir une description détaillée de l'équipe en renseignant notamment les items suivants :*

- *Equipe : personnels dévolus dans les activités du CNR et laboratoires associés*
- *Fonction, ETP, qualification, statut, organisme payeur*

#### 1.2.1. Organisation générale du CNR

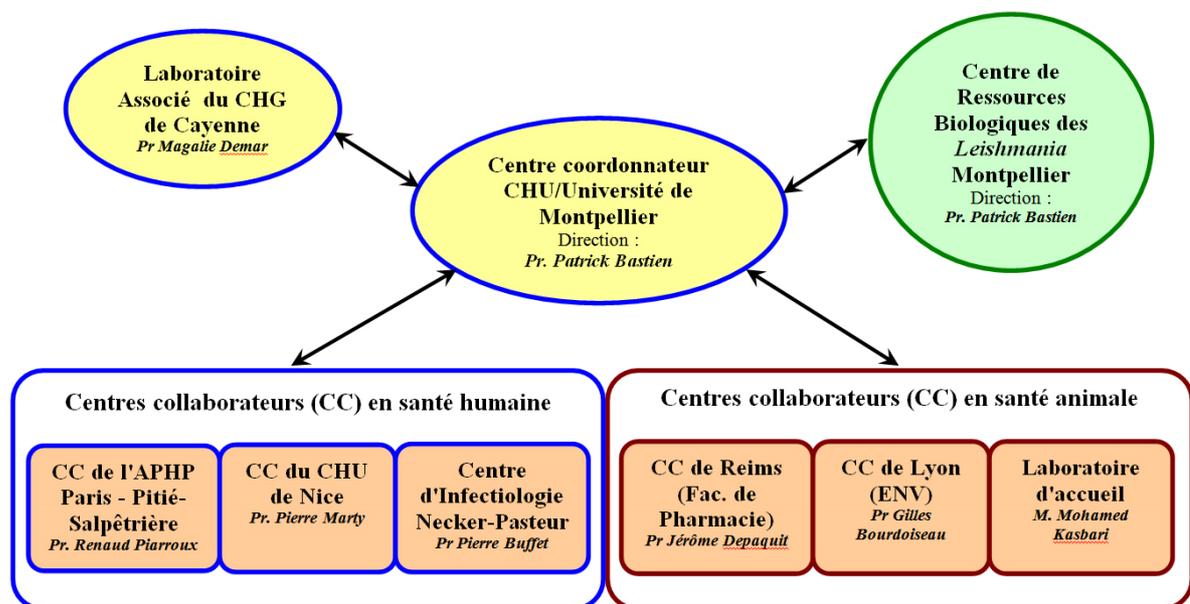
Le CNR-L est dirigé depuis 2010 par le Pr. Patrick Bastien au **Département de Parasitologie-Mycologie (CHRU / UFR Médecine) de Montpellier (DPM)**.

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 déclarés en France proviennent de Guyane Française. Le L-A de Cayenne a une longue expérience de recherche en matière de diagnostic et d'épidémiologie des leishmanioses sud-américaines : niveau d'endémie, facteurs d'exposition, facteurs de risque d'origine environnementale et selon les particularités des

souches parasitaires incriminées. Il est également compétent en matière de culture, de cryoconservation et de typage de souches de Leishmanies. Enfin, il est en relation avec un réseau de Centres de santé lui permettant une vue complète et une compréhension intime de cette endémie en Guyane.

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

## Structuration du CNR des Leishmanioses



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

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

(ii) 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.

(iii) le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de la Pitié-Salpêtrière (Pr Renaud Piarroux) pour ses études sur l'épidémiologie et les chimiorésistances de *Leishmania infantum*, ainsi que sur le typage par spectrométrie de masse.

Par ailleurs, le CNR souhaite reprendre et développer des collaborations avec des **des structures expertes en santé animale**, 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 en santé publique, qui travaille depuis plusieurs années sur les leishmanioses animales, et récemment nommé en Martinique, devrait continuer à travailler sur les leishmanioses, bien qu'il ne soit plus rattaché à l'ANSES;

(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, la première concernant l'épidémiologie et la surveillance de la leishmaniose canine, la seconde concernant le contrôle de la maladie, à la fois sur le plan vaccinal et sur le plan de la lutte médicamenteuse, et la troisième sur les aspects vectoriels (Phlébotome), qui concerne autant la leishmaniose humaine que l'endémie canine.

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

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

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

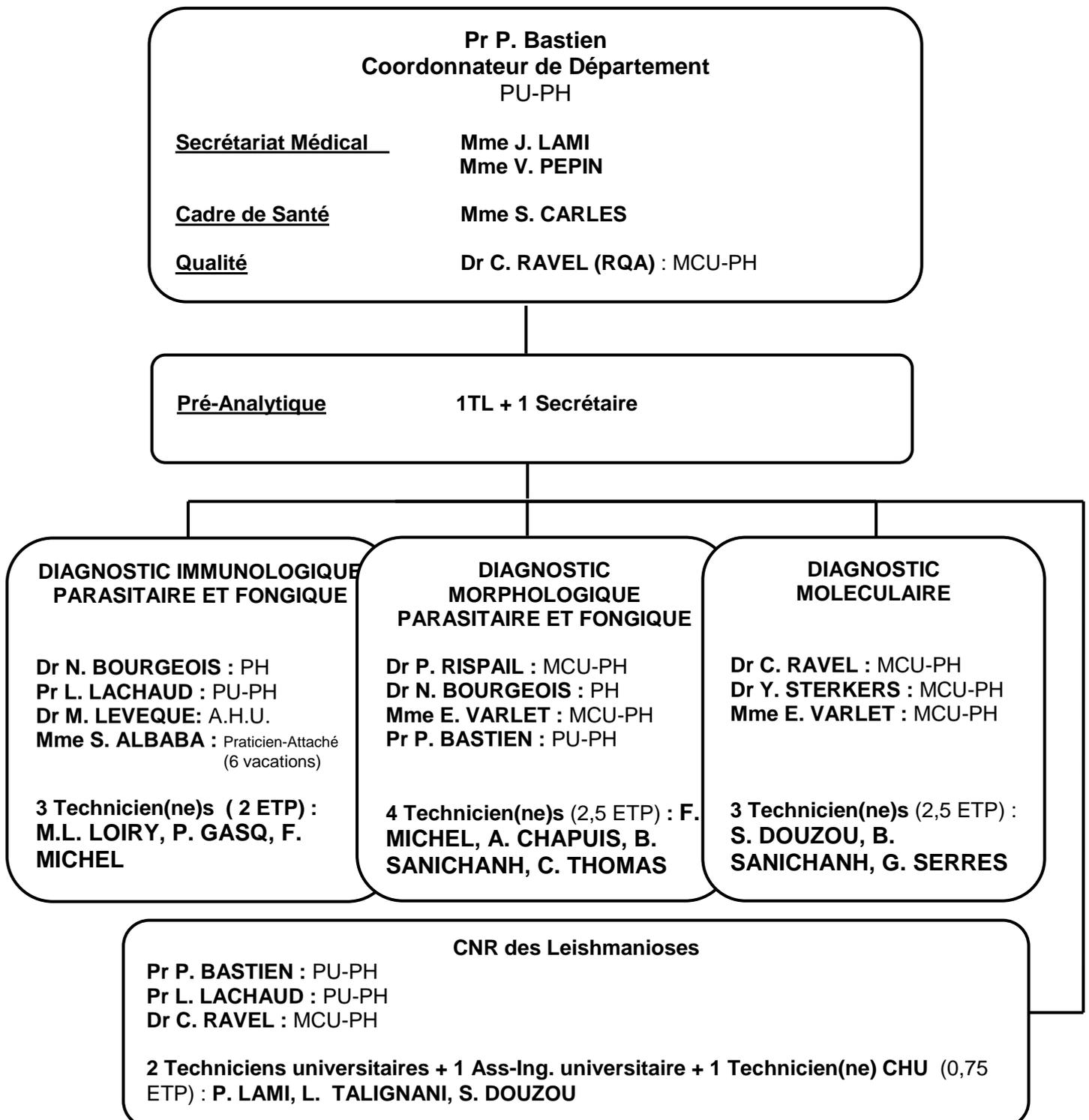
Un organigramme spécifique au Laboratoire Coordonnateur du CNR-L est ensuite présenté au-dessous.

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

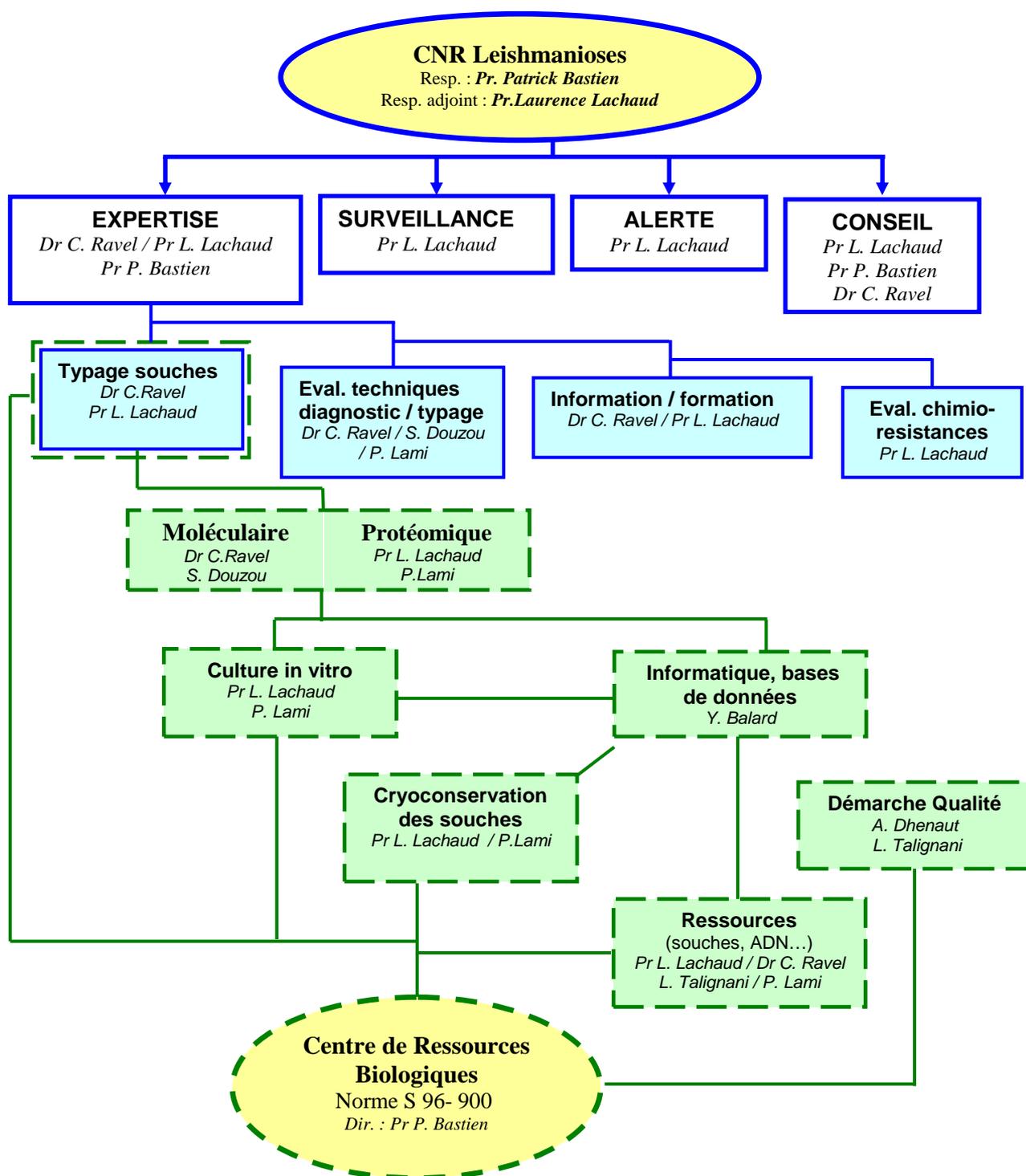
Noms et Prénoms	Qualifications	ETP	Appartenance administrative (pour l'activité au CNR-L)
Bastien Patrick	Médecin (PU-PH)	0,10	CHU-Univ. (50%-50%)
Lachaud Laurence	Médecin (PU-PH)	0,10	CHU-Univ. (50%-50%)
Ravel Christophe	Médecin (MCU-PH)	0,20	CHU-Univ. (50%-50%)
Balard Yves	Assistant-Ingénieur	0,20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

L'implication de ces personnels dans le CNR-L représente **1,4 ETP** : **0,7 ETP** pour le personnel médico-scientifique (incluant un ingénieur informaticien), **0,7 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 Centre National de Référence des Leishmanioses



### 1.2.3. Laboratoire-Associé de Cayenne

Les personnels scientifiques et techniques du LHUPM du Centre Hospitalier de Cayenne (CHAR) et de la Faculté de Médecine (Université Antilles Guyane) qui, pour partie de leur temps, 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)**

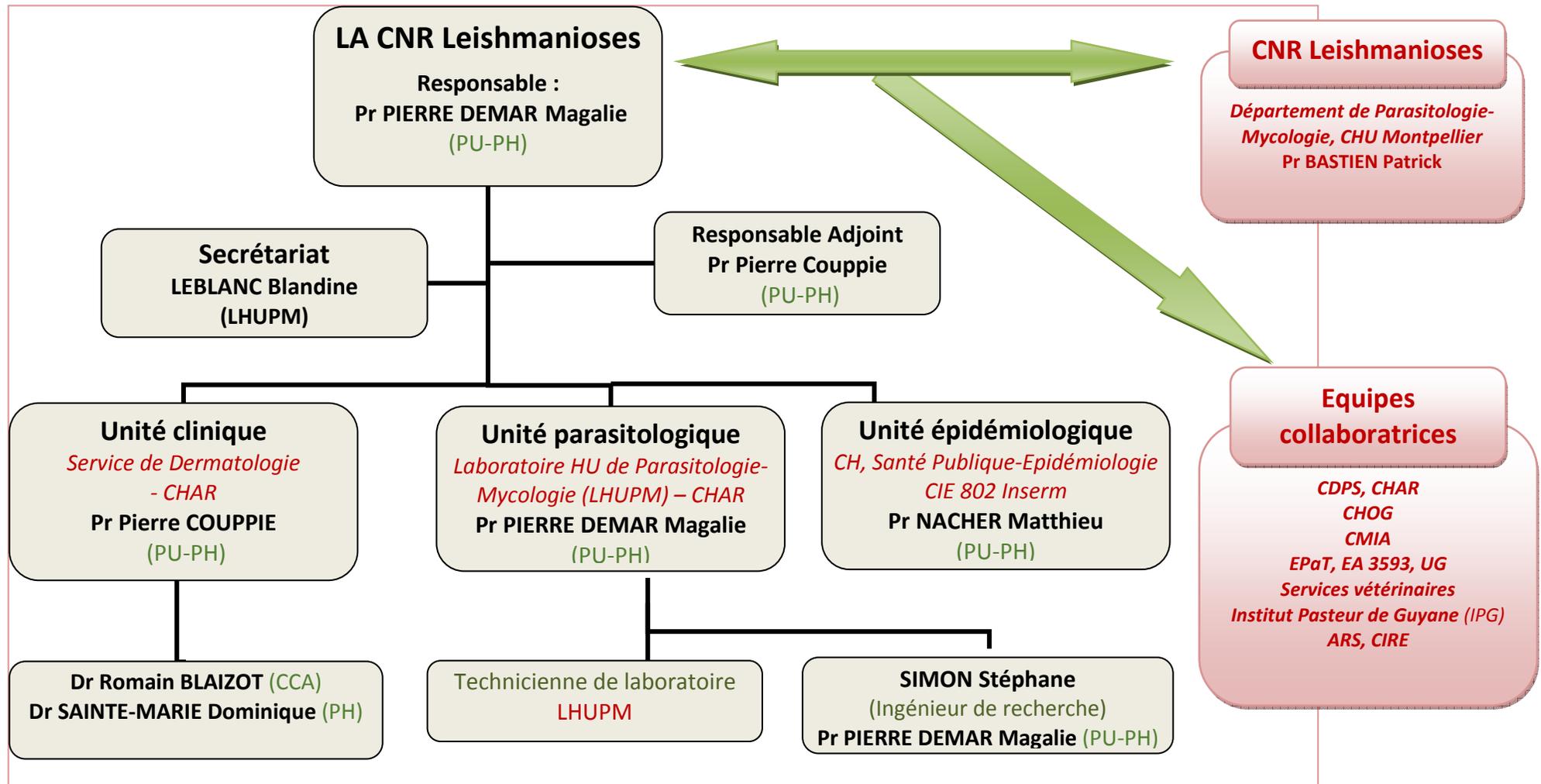
Nom et Prénom	Qualification	ETP	Appartenance administrative (pour l'activité au CNR-L)
Pierre Demar Magalie	Médecin (PU-PH: Parasitologie)	0,25	CH, LHUPM – UAG/ EA 3593 et CIE 802 Inserm
Couppié Pierre	Médecin (PU-PH : Dermatologie)	0,1	CH, Dermato – UAG/ EA 3593
Mathieu Nacher	Médecin (PU-PH : Santé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

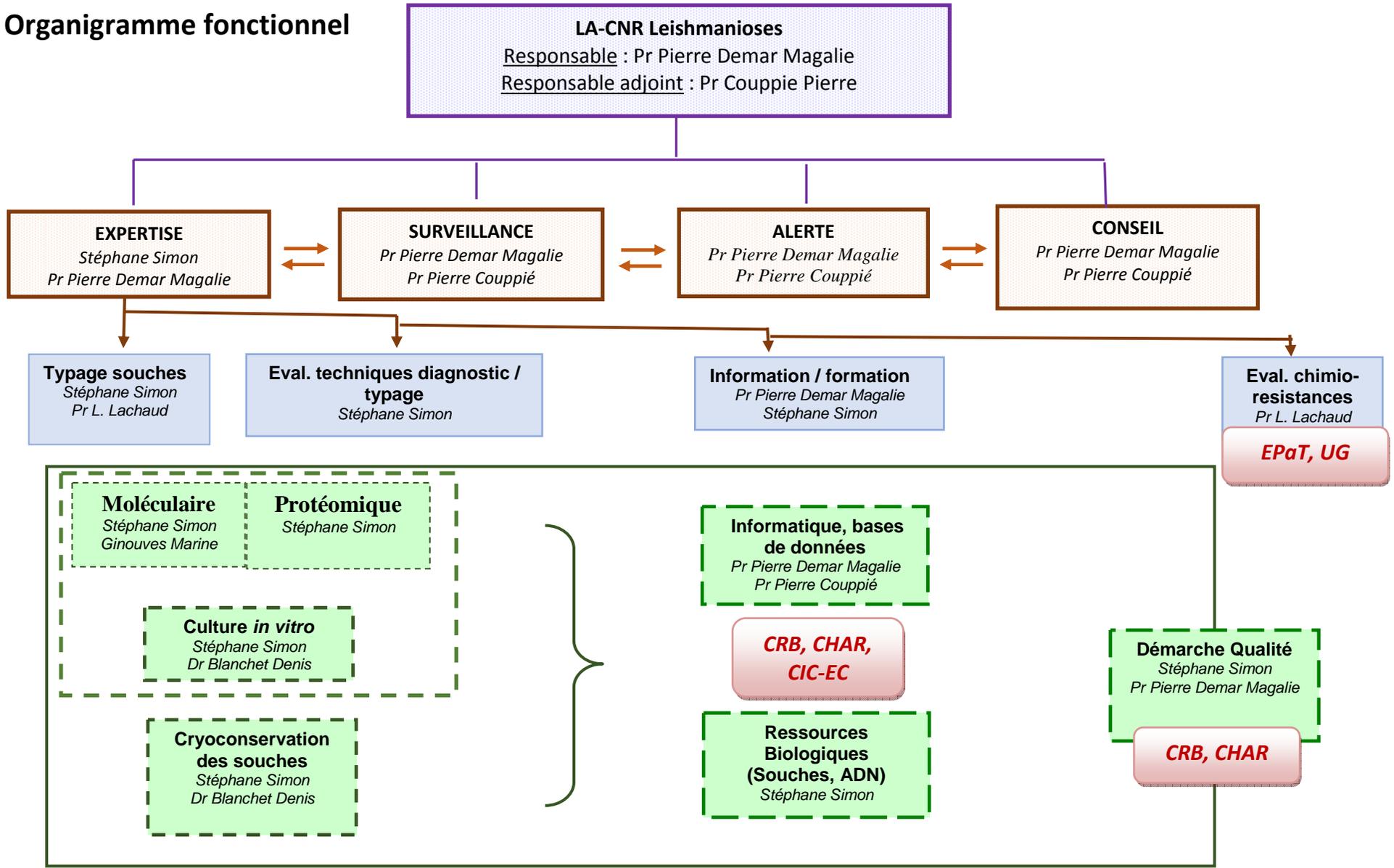
Une aide ponctuelle complémentaire pour les aspects analyse et expertise épidémiologique peut être apportée par l'équipe Inserm CIC-EC Antilles Guyane.

Les schémas suivants illustrent l'organisation du LA-CNR-L.

## Organigrammes du Laboratoire Associé au CNR des Leishmanioses (Cayenne)



# Organigramme fonctionnel



## 1.3 Locaux et équipements (CNR et laboratoires associés)

### 1.3.1. CNR Montpellier

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

Le Département de Parasitologie-Mycologie a déménagé en juillet 2009 pour rejoindre l'un des sites du CHRU, entre l'Hôpital Lapeyronie et La Colombière. Il est installé dans un bâtiment modulaire de 1300 m<sup>2</sup>, répartis sur deux étages, dont la construction a été entièrement prise en charge par le CHRU. Dans ces locaux sont installés à la fois le laboratoire hospitalier de diagnostic, le Centre National de Référence des *Leishmania* et tout ou partie de 3 équipes de recherche faisant partie de l'UMR "MiVEGEC" ("Maladies infectieuses et vecteurs : écologie, génétique, évolution, contrôle") (CNRS / IRD / Université Montpellier), dont le Pr. Patrick Bastien est également Directeur-Adjoint.

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

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

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

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

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

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

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

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

### 1.3.2. Laboratoire Associé de Cayenne

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

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

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

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

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

## 1.4 Collections de matériel biologique

### 1.4.1. 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, 100 à 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 (FBRM) d'un logiciel commun de gestion des échantillons et de saisie des données dénommé BRC-LIMS. Ce projet, financé par le GIS IBSA et auquel le CNR-L a largement contribué, a été coordonné par Chantal Bizet, Institut Pasteur<sup>1</sup>. Ce logiciel a remplacé ModulBio et a définitivement été adopté en routine en 2014 (cf. plus bas).

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

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

Le CNR-L participe au réseau européen BBMRI ("*Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure*"), à l'organisation européenne ECCO ("*European Culture Collections Organisation*", <https://www.eccosite.org/>), au Réseau français des CRB de Microorganismes (<http://www.fbrm.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, le cas échéant, du donneur de la souche. Un catalogue réduit de 242 souches disponibles dans la collection est présenté sur le nouveau site Internet dédié au CRB (<https://crb-leish.edu.umontpellier.fr/en/accueil/>). Le choix a été fait de mettre au catalogue un seul échantillon représentatif par espèce, pays de contamination et hôte d'origine de la souche (insecte

---

<sup>1</sup> Demey, S., Begaud, E., Chaïbi, N., Gallais, J., Raynal-Melchy, E., Clermont, D., Talignani, L., Helloin, E., Casaregola, S., Favel, A., Briand, M., Valence-Bertel, F., Darde, M.-L., Villena, I., Guyonneaud, R., Pressigout, M., Bizet, C. (2014). *BRC-LIMS : applications for the management of French Biological Resource Centres of Microorganisms*. Presented at the International Network "Paving the way for Research on Global Health and One Health", Paris, 10-13 Sept. 2014.

vecteur ou mammifère réservoir). Les autres souches sont aussi disponibles à la demande mais après avoir contacté le CNR. 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 de Cayenne 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.

#### **- 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, également poussés **pour être en conformité avec les exigences de la norme de certification NF S96-900, à réaliser un site Internet spécifique pour le CRB-*Leishmania* en 2018**. Il permet une présentation 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.

**Le site dédié au CNR est maintenant indépendant de celui du CRB mais l'utilisateur peut passer de l'un à l'autre "en un seul clic"**. A noter que le site ne permet pas la notification directe en ligne des cas de leishmaniose par les services ou les laboratoires.

La version anglaise des deux sites est encore en construction; elle est nécessaire pour permettre l'accès à une audience internationale.

#### **- 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.

#### **- Description de l'infrastructure informatique**

##### **-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. Une personne ressource de l'UM aide à la mise en place des deux sites cités ci-dessus et veillera aux futures mises à jour.

Le Laboratoire hospitalier est lui dans un environnement purement C.H.U., comprenant des règles de sécurité maximales en matière de contact avec l'extérieur. Seule l'activité d'expertise diagnostic et typage 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.

## **-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 processus 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.

### **1.4.2. L-A de Guyane (CH de Cayenne)**

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  $-80^{\circ}\text{C}$ .

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.

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.

## 1.5 Démarche qualité du laboratoire

*Rappeler ici l'organisation mise en place par le CNR en termes de démarche qualité du laboratoire (GBEA, participation à un contrôle qualité externe, accréditation, certification, ...).*

*Les techniques du CNR étant spécifiquement accréditées à échéance de l'année N doivent être mentionnées dans l'annexe 2.*

### 1.5.1. 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 dans ce cadre. Plusieurs audits ont accompagné ce processus depuis 2014. Le Laboratoire a accrédité le **diagnostic moléculaire de la Leishmaniose** en 2017 (visite du COFRAC en novembre 2016, et notification officielle en juillet 2017) et la sérologie Toxoplasmose, la recherche d'antigènes aspergillaires et la recherche de paludisme en 2018. La visite de suivi par le COFRAC a lieu du 8 au 11 avril 2019.

Le dossier déposé en 2019 comprend l'ensemble de la Mycologie.

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 et surtout de l'aide de Andreia Dhenaut, responsable Qualité du CRB du CHU. Loïc Talignani, RQA pour la Collection de *Leishmania*, avance dans ce travail accompagné par Andreia Dhenaut, Ingénieur Qualité pour le CRB du CHU; cependant, en 2017, son affectation partielle dans une autre structure a

notablement freiné la démarche Qualité. **Le dépôt de dossier de certification de la Collection de souches de *Leishmania* a été reporté en raison de ce ralentissement.**

A ce jour :

La traçabilité des 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.

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,
- Homogénéisation des procédures de gestion des non-conformités et des axes d'améliorations avec ceux déjà existants 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.

### **1.5.2. 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).

## **Annexe 2 : Capacités techniques du CNR**

Rappeler ici les informations suivantes (pour la plupart déjà disponibles dans votre dossier de candidature) en les mettant si nécessaire à jour :

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

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 en première intention par MALDI-TOF, et si nécessaire en seconde intention 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. En raison de sa rapidité et de son coût, l'identification par MALDI-TOF a aujourd'hui remplacé en routine la biologie moléculaire.

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). La projet de validation de la méthode est en cours en collaboration avec le CNR de Montpellier (Dr Lachaud) et le Centre collaborateur de Marseille (Pr Piarroux)

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

#### **2.1.2. 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.

La méthode a été accréditée par le COFRAC en 2017 (visite du COFRAC en novembre 2016, et notification officielle en juillet 2017).

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

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

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

### 2.1.3. Identification moléculaire

Au **Laboratoire coordonnateur**, l'identification moléculaire est réalisée depuis fin 1998 sur tout prélèvement provenant de leishmanioses tégumentaires ou viscérales et positif en PCR diagnostique. 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<sup>2</sup> : il a mis 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 essentiellement aux échantillons biologiques de patients, ce qui permet un typage même en cas de culture négative ou contaminée par des éléments fongiques ou bactériens. Elle est également nécessaire pour les souches cultivées quand le MALDI-TOF manque de finesse en matière de typage.

Par contre, toutes les souches reçues ou décongelées sont a priori typées en MALDI-TOF.

- Le **LHUPM de Cayenne** a également développé depuis 2006 une technique d'identification moléculaire par PCR-RFLP (HgaI et TspRI) spécifique pour le diagnostic d'espèce des *Leishmania* du Nouveau Monde. Cette technique peut être réalisée à partir des cultures et, le cas échéant, directement à partir de biopsies de lésions cutanées<sup>3</sup>. L'identification moléculaire permet notamment la différenciation rapide de toutes les espèces de *Leishmania* et a été intégrée dans le management thérapeutique des patients à la demande du Service de Dermatologie (Pr Couppié). Elle est appliquée à partir de prélèvements cliniques (biopsies cutanées ou muqueuses, produits de grattage, sang, moelle osseuse) et aussi sur les biopsies en culture n'ayant pas poussé (en cas de négativité ou de contamination).

---

<sup>2</sup> El Baidouri F, Diancourt L, Berry V, Chevenet F, Pralong 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.

<sup>3</sup> Simon S, Veron V, Carme B. *Leishmania* species identification by PCR-RFLP analysis and its applications in French Guiana. *Diag. Microbiol. Infect. Dis*. 2010

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

#### 2.1.4. Identification par protéomique

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 donné lieu à publication<sup>4</sup>.

Le niveau de résolution obtenu par cette méthode d'identification est excellent jusqu'au niveau de l'espèce. Le CNR, toujours avec la collaboration de Renaud Piarroux, a travaillé à une nouvelle base de données de spectres (MSI2) avec un nouvel algorithme, disponibles en ligne. Elle est devenue la technique de routine du typage des souches de *Leishmania* reçues ou décongelées au CNRL.

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

L'analyse isoenzymatique des souches, robuste mais lourde et d'interprétation subjective, a été quasiment abandonnée. Elle peut encore être réalisée aujourd'hui grâce au maintien des compétences de Patrick Lami (technicien universitaire) et de Francine Pratlong (émérite). Elle se fait par électrophorèse en gel épais d'amidon utilisant 15 systèmes enzymatiques selon Rioux et coll., Ann. Parasitol. hum. Comp., 1990, 65 : 111-115.

Elle reste une technique de référence en épidémiologie des leishmanioses mais est de plus en plus rarement demandée, par des équipes françaises ou ailleurs dans le monde.

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

#### 2.1.6. 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).

#### 2.1.7. Evaluation de la sensibilité aux anti-infectieux

---

<sup>4</sup> 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.

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 tests de chimiosensibilité du parasite sont réalisés de façon ponctuelle au CNR, en général à la demande de cliniciens, qui restent cependant exceptionnelles.

## 2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

### 1) Diagnostic

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

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

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

### 2) Typage

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

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

Les autres méthodes publiées ne sont pas recommandées.

Au cours des 2 dernières années, le CNR a mis au point, avec le centre collaborateur de Marseille, la méthode de typage par MALDI-TOF pour *Leishmania* (cf. § 6.1.3). Le nombre important de souches typées à ce jour a permis d'établir une base de données ("banque de spectres") fiable qui est disponible via une application Internet (MSI1 puis MSI2) et accessible après obtention de login et mot de passe auprès du webmaster. En 2017, seuls quatre centres avaient la possibilité de se connecter. En Mars 2019, l'application est en accès libre pour toute la communauté scientifique, après demande de codes d'accès au Pr Renaud Piarroux. Elle est devenue la technique de routine du typage des souches de *Leishmania* reçues au CNRL.

### 3) Sensibilité aux anti-infectieux

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

