

RAPPORT ANNUEL

D'ACTIVITE 2023

Année d'exercice 2022

CNR Choisissez un élément.

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire Coordonnateur	CHU Montpellier	Dr Christophe RAVEL
Laboratoire Associé	Centre Hospitalier Andrée Rosemon, Cayenne	Pr Magalie PIERRE DEMAR

Résumé analytique	4
Faits marquants	4
Executive summary	5
Highlights	5
1. Missions et organisation du CNR	6
Organigramme	6
Mission et Organisation	6
Démarche Qualité	6
2. Activités d'expertise	7
2.1 Evolution des techniques	7
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	8
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	9
2.4 Collections de matériel biologique	9
2.5 Activités d'expertises	10
2.6 Activités de séquençage	17
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	19
3. Activités de surveillance	20
3.1 Description du réseau de partenaires	20
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	21
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	22
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	23
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	23
4. Alertes	24
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	24
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	24
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	25
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	25
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	26
6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	26

6.2	Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	27
7.	Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux.....	29
8.	Programme d'activité pour les années suivantes	30
1.	Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	34
1.1	Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	34
1.2	Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.....	35
1.3	Locaux et équipements	35
1.4	Collections de matériel biologique.....	39
1.5	Démarche qualité du laboratoire	39
2.	Annexe 2 : Capacités techniques du CNR.....	41
2.1	Liste des techniques de référence.....	41
2.2	Liste des techniques recommandées par le CNR	41
3.	Annexe 3 : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)	Erreur ! Signet non défini.
3.1	Permanence du CNR	Erreur ! Signet non défini.
3.2	Autorisations MOT	Erreur ! Signet non défini.
3.3	Autorisations d'exercer la biologie médicale	Erreur ! Signet non défini.
3.4	Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo.....	Erreur ! Signet non défini.
3.5	Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition de la subvention versée par Santé publique France.....	Erreur ! Signet non défini.
3.6	Liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR.....	Erreur ! Signet non défini.
3.7	Autres remarques à destination du comité des CNR	Erreur ! Signet non défini.

RESUME ANALYTIQUE

Faits marquants

Enjeux majeurs de santé publique

- Les leishmanioses sont présentes dans une centaine de pays dans le monde, avec des prévalences qui peuvent être très élevées dans les populations humaines, les estimations de 2018 faisant état de 600 000 à 1 million de cas de leishmaniose cutanée et de 50 000 à 90 000 cas de leishmaniose viscérale annuels.
- En France métropolitaine, la maladie est essentiellement décrite chez le chien et les cas humains autochtones sont rares, les cas observés sont majoritairement importés, en particulier du Maghreb mais surtout de Guyane où chaque année environ 200 cas sont diagnostiqués. La complexité du diagnostic et du traitement des leishmanioses peut rendre nécessaire l'aide d'un centre spécialisé.

Axes majeurs

- Le nombre de demandes d'analyses adressées au CNR par des dizaines de Centres sur le territoire, activité qui donne au CNR une vue plus exhaustive et plus juste de la réalité des leishmanioses autochtones et importées ; en retour, le CNR établit un réseau de correspondants de plus en plus dense, favorisant ainsi conseils et transferts d'informations. Les Centres Délocalisés de Prévention et de Soins ont le même rôle en Guyane.
- Mise en place d'enquêtes pour évaluer l'endémie canine dans le sud de la France.
- Développement du séquençage NGS avec des objectifs de diagnostic et de typage.

Fait marquants 2022

- Pour le CNR, déclaration par 45 centres de 125 cas dont 27% de formes viscérales et 73% formes cutanées issues de 24 pays différents. Le Laboratoire de Cayenne a connu son plus bas niveau historique de déclarations (43 leishmanioses cutanées et 2 cutanéomuqueuses). Sur ce territoire, de très grandes variations interannuelles sont observées.
- L'ensemble des analyses utilisées par le CNR sont auditées et accréditées ISO15189 et il a traité, à la demande d'une soixantaine de Centres, 923 demandes de diagnostics moléculaires, 442 demandes d'identifications moléculaires et 254 sérologies. Le processus d'accréditation est en cours pour le Laboratoire Associé.
- 10 espèces différentes de *Leishmania* ont été identifiées. On note en Métropole la diminution des identifications de *L. guyanensis* (provenant de Guyane) et *L. major* (provenant du Maghreb). Identification d'un cas à *L. martiniquensis* en Guadeloupe, signe d'une endémicité à très bas bruit de cette espèce dans les Antilles.
- Mise en place pour 5 ans d'une coopération avec l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse pour faire un bilan de la séroprévalence de la leishmaniose canine dans les Cévennes, évaluation qui n'avait pas été faite en Métropole depuis 20 ans et qui permettra d'estimer l'exposition des populations humaines ainsi que le bénéfice éventuel de la vaccination et de la protection par insecticides sur les populations de chiens.
- D'un point de vue technique, 1) évaluation sur prélèvements biologiques de la sensibilité des approches NGS par rapport à la détection par PCR, 2) identification par metabarcoding (kit Swift Amplicon™) comparée à l'identification par shotgun du génome entier 3) comparaison de la trousse commerciale Quanta Leishmania spp. (Clonit) par rapport à la technique actuellement utilisée en routine par le laboratoire.

EXECUTIVE SUMMARY

Highlights

Major public health issues

- Leishmaniasis is present in around 100 countries worldwide, with prevalence rates that can be very high in human populations, with estimates in 2018 of 600,000 to 1 million cases of cutaneous leishmaniasis and 50,000 to 90,000 cases of visceral leishmaniasis per year.
- In mainland France, the disease is mainly found in dogs, and domestic human cases are rare. Most cases are imported, notably from the Maghreb and French Guiana, where around 200 cases are diagnosed each year. The complexity of leishmaniasis diagnosis and treatment may require the assistance of a specialized reference center.

Major trends

- The number of samples sent to the CNR by dozens of centers all over France is increasing, giving the CNR a more exhaustive and accurate picture of the reality of both domestic and imported leishmaniasis. The CNR is setting up an increasingly dense network of correspondents, promoting advice and the transfer of information. The Centres Délocalisés de Prévention et de Soins plays the same role in French Guiana.
- Surveys have been set up to assess the canine endemic situation in the south of France.
- Development of NGS sequencing for diagnostic and typing purposes.

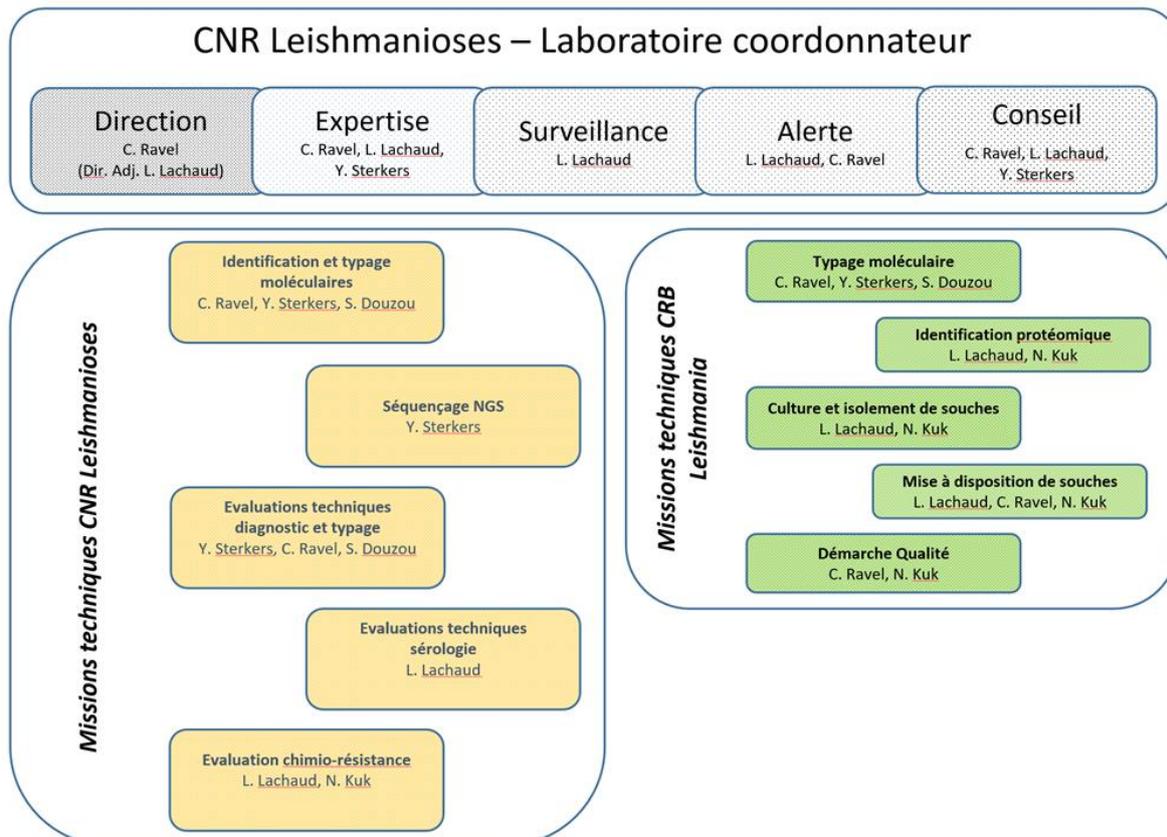
Highlights 2022

- The CNR-L received reports from 45 centers of 125 cases, 27% of which were visceral forms and 73% cutaneous forms, from 24 different countries. The Associated laboratory of Cayenne reported its lowest ever number of cases (43 cutaneous and 2 mucocutaneous leishmaniasis cases). In this territory, very wide inter-annual variations are observed.
- All analyses used by the CNR are audited and ISO15189 accredited, and it has processed 923 requests for molecular diagnostics, 442 requests for molecular identifications and 254 serologies, at the request of some sixty centers. The accreditation process is underway for the Associated Laboratory.
- 10 different species of *Leishmania* have been identified. In mainland France, the number of identifications of *L. guyanensis* (from French Guiana) and *L. major* (from the Maghreb) has decreased. Identification of a case of *L. martiniquensis* in Guadeloupe, a sign of the very low-level endemicity of this species in the West Indies.
- Establishment of a 5-year cooperation agreement with the Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse to assess the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Cévennes region, an assessment that had not been carried out in mainland France for 20 years, and which will enable us to estimate the exposure of human populations, as well as the possible benefits of vaccination and protection by insecticides on dog populations.
- From a technical point of view, 1) evaluation on biological samples (from the routine practice and spiked samples) of the sensitivity of NGS approaches compared with PCR detection, 2) identification by metabarcoding (Swift Amplicon™ kit) compared with whole-genome shotgun identification 3) comparison of the Quanta Leishmania spp. commercial kit (Clonit) with the technique currently used routinely by the laboratory.

1. Missions et organisation du CNR

Organigramme

L'organigramme du Laboratoire Coordonnateur modifié pour faire apparaître demande en précisant que le Pr. L. Lachaud a la fonction de Directeur Adjoint.



L'organigramme du Laboratoire Associé est identique à celui présenté pour le dossier de demande.

Mission et Organisation

Pas d'évolution des missions et de l'organisation du CNR en 2022, voir annexe 1.

Démarche Qualité

En 2022, l'ensemble des analyses moléculaires (diagnostic PCR), sérologiques et morphologiques (diagnostic microscopique) utilisées par le CNR étaient accréditées selon la Norme ISO 15189, seul le typage par PCR-séquençage audité par le COFRAC en décembre 2022 est encore en attente de notification d'accréditation. Cet audit du LBM n'a fait apparaître aucun écart dans le périmètre des analyses utilisées par le CNR.

Le CRB Leishmania est intégré au CRB du CHU de Montpellier qui est certifié selon la Norme ISO 20387.

Denier audit mars 2023. La thématique Leishmania ne fait pas encore partie des thématiques certifiées, cette démarche est en cours.

Pour le Laboratoire Associé de Cayenne, en 2022 le diagnostic morphologique de la leishmaniose (diagnostic microscopique) a été accrédité selon la norme ISO 15189. La PCR et la culture de leishmaniose sont en attente de validation par le Cofrac. L'activité du WGS sera proposée dès sa mise en place en routine.

Le LHUPM possède également une collection de souches et d'ADN de Leishmania isolées à partir de patients sur l'ensemble du territoire guyanais. A ce jour, depuis 2019, 266 souches de Leishmania et ADN obtenus à partir de produits pathologiques ou à partir de souches de culture ont été cryoconservés et doivent être transférés au Laboratoire coordonnateur à Montpellier. En effet, toutes les souches sont conservées en azote liquide en duplicata de la Collection de Montpellier. Tous les ADN détectés sont cryoconservés à -80°C .

Bien que l'ayant réalisé durant 4 ans (2019 à 2022), le CRB du Centre Hospitalier de Cayenne n'envisage pas de gérer la collection de souches de Leishmania au sein de ses locaux car il s'agit d'un CRB d'échantillons biologiques et non un CRB type souches de microorganismes, la disposition des pièces ne permettant plus cette cohabitation. Aussi, le LA CNR-L dispose de locaux avec de l'azote liquide et gère la collection des souches de Leishmania sp.

2. Activités d'expertise

2.1 Evolution des techniques

- Extraction de l'ADN

Suite à l'arrêt de la commercialisation du MagNA Pure compact par Roche, nous avons réalisé en 2022 une nouvelle mise au point pour l'extraction des échantillons. Nous avons évalué deux automates, le MP24 Roche et l'EZ2 de Qiagen et avons retenu ce dernier.

Pour le LA-CNR Leishmanioses, les extractions d'ADN étaient réalisées à partir des écouvillons et/ou biopsies cutanés et cutanéomuqueuses, du sang ou de la moelle osseuse en utilisant manuellement les kits QiaAmp DNA Mini Kit® (Qiagen). A partir de mi-2022, l'efficacité de l'automate d'extraction installé au niveau de la plate-forme de biologie moléculaire du laboratoire (QiaSymphony de DSP mini kit (Qiagen) a été testée. Cet automate est utilisé pour réaliser l'ensemble des extractions pour la bactériologie, la virologie. Dans le cas du diagnostic de la leishmaniose, nous l'avons testé avec les réactifs et comparé avec les kits manuels. Cette solution automatisée a été retenue.

- Séquençage

Le laboratoire Coordonnateur héberge un plateau de préparation de bibliothèques partagé avec le séquençage CoVID et a accès aux séquenceurs du Plateau de Médecine Moléculaire et Génomique (PMMG) du CHU de Montpellier. En 2022, pour la leishmaniose viscérale, le laboratoire a évalué comparativement sur prélèvements biologiques la sensibilité des approches NGS par rapport à la détection par PCR. Pour la leishmaniose cutanée, l'identification par metabarcoding a été comparée à l'identification par shotgun du génome entier (voir infra). Une Ingénieure en bio-informatique (Bridlin Barckmann) a participé à développer des pipelines spécifiques.

Entre 2021-2022, le laboratoire du Centre hospitalier de Cayenne a été doté d'un séquenceur Gridion (Oxford Nanopore Technologies). En 2022, le LA-CNR Leishmanioses a initié des travaux de WGS sur quelques souches comme *L. guyanensis* et *L. amazonensis*. Cette activité a été menée essentiellement par l'ingénieur dédié aux activités du LA-CNR.

La stratégie diagnostique reste inchangée avec réalisation d'une PCR maison en point final amplifiant la séquence HSP70 puis séquençage de cette cible par technique Illumina (sous-traitance GenScreen).

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

- Comparaison de trousse sérologiques adaptées au dépistage chez le chien

En 2022, quatre trousse commerciales ont été évaluées sur une population canine de 28 chiens malades avec PCR positive. Deux tests ELISA pour lesquels les antigènes étaient des extraits solubles de *Leishmania infantum* (ID Screen® Leishmaniasis Indirect Test, VET-Innovate ID Diagnostics® et *Leishmania infantum* IgG ELISA®, Bordier® Affinity Products) et deux tests d'immunochromatographie (TDR) (Speed Leish K®, Virbac® et FASTest® LEISH, Megacor®).

L'analyse de performance et de concordance des différents tests a été réalisée dans le cadre de la thèse d'exercice d'Anais Bossa, étudiante vétérinaire à l'ENV de Toulouse.

En prenant comme référence la sensibilité des techniques ELISA, la sensibilité des tests d'immunochromatographie était de 96.5 et 82.7 pour FASTest® LEISH et Speed Leish K® respectivement.

- Comparaison de kit diagnostic PCR

En 2022, le Laboratoire coordonnateur a initié la comparaison de la trousse commerciale quanty *Leishmania* spp. (Clonit) par rapport à la technique actuellement utilisée en routine par le laboratoire (Mary C et al. J Clin Microbiol 2004). L'étude a consisté à vérifier l'efficacité de la PCR, la zone de linéarité, à approcher la limite de détection et à tester les performances de cette PCR sur des échantillons reçues dans l'activité de routine. Les performances analytiques du système Clonit sont bonnes et dans l'ordre de grandeurs de celles données par le fabricant. Cependant la méthode semble n'être pas assez sensible et peut conduire à des résultats faussement négatifs lorsque la charge parasitaire est faible. Il s'agit d'une préoccupation majeure car, dans la pratique de routine, un quart des échantillons positifs ont une charge parasitaire inférieure à 10 *Leishmania*/mL de sang. Ce travail est en cours de révision dans une revue internationale à comité de lecture.

Afin d'optimiser les approches moléculaires diagnostiques, le LA-CNR a comparé 2 techniques de PCR sur des échantillons reçus dans le cadre de la routine. Il s'agit de 2 PCR en point final, la PCR maison utilisant la cible HSP70 (technique actuellement utilisée) et une autre PCR maison utilisant la cible 3' untranslated region ou UTR d'HSP70 type I (JM Requena et al., 2012). L'étude a consisté à vérifier les sensibilités de chacune des techniques les unes par rapport aux autres et les limites de détection. Le choix a porté la 2ème PCR (3'UTR HSP70).

- Comparaison de kit de séquençage NGS

Dans le cadre des études réalisées pour évaluer l'apport du NGS dans le diagnostic moléculaire des leishmanioses, le Laboratoire Coordonnateur a évalué en 2022 les performances du kit SWIFT AMPLICON™ 16S+ITS PANEL (Swift BioScience). Ce kit de metabarcoding doit permettre l'identification de bactéries, d'archaebactéries, de champignon et de protozoaires par amplification multiplexe et séquençage NGS de régions d'ADN ribosomique 16S, ITS1 et ITS2. Le laboratoire a analysé des échantillons de l'activité de routine et des échantillons artificiels mono- et plurimicrobiens et a montré

que les performances étaient insuffisantes avec certains échantillons plurimicrobiens. Ce kit a été retiré du marché et est proposé sous une nouvelle version : Swift Normalase™ Amplicon Panels (SNAP) 16S v2 Panel ITS1 Panel (IDT) qui est en cours d'évaluation par le CNR.

- Comparaison de sensibilité entre séquençage NGS et PCR

Le Laboratoire Coordonnateur a initié en 2022 une étude prospective sur la détermination du seuil de sensibilité du NGS versus la technique de PCR diagnostic de référence utilisée en routine au CNR (Mary C et al. J. Clin. Microbiol., 2004) pour le diagnostic moléculaire de la Leishmaniose viscérale. Un workflow comprenant préparation de librairie, séquençage NGS et analyse bioinformatique a été validé. Une mesure du seuil de sensibilité du NGS a été établie (Cp#30)

Le LA CNR-L n'a pas modifié sa stratégie diagnostique. L'approche NGS du diagnostic sera envisagée secondairement lors de l'acquisition d'un outil de séquençage type Illumina prévue pour 2023-2024.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Pas de techniques transférées en 2022

2.4 Collections de matériel biologique

Souches de Leishmania reçues au Laboratoire Coordonnateur

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Nombre de souches reçues	109	125	37	20	10	24
Origine géographique						
Afrique	8	15	19	10	2	15
Maghreb	7	14	9	10	1	10
Autre/NSP	1	1	10			5
Amérique	94	77	14	8	5	4
GuyaneF.	68	57	13	7	3	
Autres	12	20	1	1	2	4
Europe	2	24	1	2	3	3
France		24		2		2
Espagne	1		1		2	1
Italie	1					
Autre					1	
Moyen-Orient						
Iran						2
Origine inconnue	5	9	3	0	0	0

Centres ayant transmis des souches de Leishmania au Laboratoire Coordonnateur

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
APHP Cochin	2	13	15	2	1	9
APHP Bichat-Claude Bernard	2	2	1	2		
APHP Pitié-Salpêtrière		1	1	1	3	1
CH Cayenne	86	61	12	5		
CHU Montpellier	1	13	4	0		
CHU Nice	7	4	1	9	1	4
CHU Rennes	6	2	2		2	3
CHU Limoges			1		1	
CHU Bordeaux				1		
APHP Bobigny	2					
CHU Tours	1					
H.I.A. Desgenettes	1					
CHU Rouen		1				
CHU Strasbourg	1	1			1	
Dr M. Kasbari (ex-ANSES)		24				
Pr M. Gallego (Univ.de Barcelone)		2				
Pr N. Fasel (Univ.de Lausanne)		1				
CHU Nîmes					1	
Institut Pasteur Tunis 7						7
	109	125	37	20	10	24

Centres ayant reçus des souches du CRB-Leishmania

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Envois externes	6	47	57	28	5	24
Utilisation interne	160	239	135	65	84	151
Total	166	286	192	93	89	175

5 souches ont été transmises à l'Université de Laval au Canada

19 souches ont été transmises à l'Université d'Ostrava en République Tchèque.

Ces envois ont été réalisés en suivant les procédures de cession de matériel biologique du CRB du CHU de Montpellier.

151 souches ont été utilisées en interne pour les activités du CNR (typage et identification).

2.5 Activités d'expertises

Le nombre de demandes d'analyses liées à la leishmaniose adressées au Laboratoire Coordonnateur du CNR a augmenté en 2022. C'est essentiellement la conséquence de l'externalisation de ces techniques par un certain nombre de laboratoires de biologie en France, pour qui elles sont pratiquées rarement et ne justifient pas une demande d'accréditation. Cette activité croissante donne au CNR une vue plus exhaustive et plus juste de la réalité des leishmaniose autochtones et importée ; en retour, le CNR établit un réseau de correspondants de plus en plus dense, favorisant ainsi conseils et transferts d'informations.

Concernant le LA-CNR L, la demande a fortement baissé en 2022 et a atteint les niveaux les plus faibles depuis cette dernière décennie avec 192 demandes tous prélèvements confondus. On note de même de très grande variation selon les années sur la circulation du parasite et sur la répartition de ces espèces avec une alternance entre année à forte activité de diagnostic et année à très faible activité. Ceci pourrait être lié aux variations climatiques avec des années à très forte pluviométrie et d'autres avec un haut niveau de chaleur. Une analyse un peu plus poussée des causes de ces variations en lien avec les événements environnementaux fait l'objet d'un article en cours de rédaction. La présence mensuelle des dermatologues sur différents sites de la Guyane (consultation spécialisées dans les Centres de santé et à l'Hôpital de Saint-Laurent-du-Maroni) permet d'écartier l'hypothèse d'une absence de sensibilisation des personnels de soins ou d'une méconnaissance de la pathologie et donc une sous-estimation.

Activité de diagnostic et d'identification

Nombre de dossiers traités en biologie moléculaire

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Dossiers diagnostic moléculaire	731	984	864	934	853	923
Dossiers identification moléculaire	334	533	556	427	391	442
Total	1065	1517	1420	1361	1244	1365

Diagnostic moléculaire

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Recherche PCR leishmaniose	677	916	912	915	870	923
Recherche PCR leishmaniose viscérale	378	481	531	554	534	601
Recherche PCR leishmaniose cutanée	299	435	381	361	336	322

■ Pour le LA-CNR :

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Nombre de demandes de LC (toutes techniques confondues)	344	256	202	686	414	192
Nombre de résultats positifs (toutes techniques confondues)	187	166	64	413	127	48
Nombre d'examens directs lus	159	210	155	503	266	33
Nombre de souches isolées	119	103	17	80	26	6
Nombre de demandes diagnostiques moléculaires	200	238	184	648	389	192
Identifications moléculaires	70	143	49	348	69	43
Nombre de cultures cellulaires techniquées	303	236	76	238	130	59
Identifications MALDI-TOF	121	70	17	80	26	3

Identification moléculaire

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
L. major	48	86	73	36	20	25
L. guyanensis	16	48	14	66	42	8
L. infantum	19	18	31	26	30	30
L. braziliensis	9	17	8	9	20	10
L. tropica	6	4	5	6	6	8
L. naiffi	2	2	4	2	3	1
L. lainsoni	1	4		6		1
L. mexicana	1		3		3	2
L. amazonensis	1	2	3		1	0
L. infantum/L.donovani			2		1	0
L.braziliensis/L.peruviana			1			0
L. aethiopica						1
L. martiniquensis						1
L. panamensis		1				0
	103	182	144	151	126	87

- Pour le LA-CNR :

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
L.guyanensis	62	111	32	309	60	19
L.braziliensis	8	25	14	27	22	21
L. lainsoni	0	1	2	5	1	0
L. naiffi	0	2	-	2	1	1
L.amazonensis	0	4	2	6	2	2
Total	70	143	50	349	86	43
Indéterminée	20	6	9	21	2	0

Diagnostic sérologique

Sérologies leishmaniose	2017	2018	2019	2020	2021	2022
	228	257	255	280	303	254

A ce jour, le diagnostic sérologique n'est pas réalisé en Guyane au sein du LA-CNR-L du fait d'association potentielle avec d'autres protozooses, rendant la spécificité de la sérologie encore plus faible (chagas, toxoplasmose.). Ceci a fait l'objet d'un travail et d'une publication en 2021 (Menu E. 2021).

Déclarations de cas de Leishmaniose faites au CNR

- Nombre de déclarations de cas faites au CNR

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Forme cutanée	155	260	179	195	97	91
Forme cutanéomuqueuse	2	1	0	0	1	2
Forme viscérale	24	23	38	41	39	32
	181	284	217	236	137	125

En 2022, 45 déclarants dont 22 laboratoires de CHU, 17 laboratoires de CH, 5 des laboratoires du Service de Santé des Armées, 1 laboratoire privé.

- Nombre de demandes et cas recensés par le Laboratoire Associé

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Nombre de demandes	344	256	202	686	423	192
Nombre Leishmanioses cutanées	187	166	64	413	127	46
Nombre Leishmanioses cutanéomuqueuses	1	0	0	0	0	2
Nombre Leishmanioses viscérales	0	0	0	0	0	0

Origine géographique des cas de leishmaniose cutanée déclarés au CNR en Afrique et Eurasie

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Algérie	7	11	5	2	1	3
Algérie/Tunisie/Maroc	15	38	19	18	5	10
Maroc	34	30	43	19	4	8
Maroc/Espagne					1	
Tunisie	11	30	29	26	10	9
	67	109	96	65	21	20
Burkina Faso						1
Côte d'Ivoire			1			
Erythrée			1			1
Ethiopie	1				1	
Guinée	1		2			
Mali	1	2	1	1		1
Mauritanie	2	3	2	1		3
Mauritanie / Sénégal	1	1				
Nigeria				1		
Nigeria/Maghreb			1			
Nigeria/Niger/Libye					1	1
République de Centre Afrique						1
Sénégal	5	3	8	1		4
Soudan		1				
	11	10	16	4	2	12
Afghanistan						1
Inde		1	1			
Irak/Iran			1			
Iran	1	1	1			2
Israël	1	1	3	1		
Jordanie						1
Syrie				1		
Turquie		2			1	
	2	5	6	2	1	4
Espagne	3	4	3	4	2	4
France/Espagne	1					
Grèce/Turquie				1		
Italie	1				1	
Portugal	1			1		
	6	4	3	6	3	4

Origine géographique des cas de leishmaniose cutanée déclarés au Laboratoire Coordonnateur du CNR en Amérique du Sud et Centrale

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Amérique du Sud	1	1	13			3
Amérique du Sud/Centrale		11	2	15	7	
Bolivie	2	3	1			2
Brésil	3	4				1
Brésil/Guyane Française	2	1				
Colombie		1				
Costa Rica	2	3	2	1		1
Equateur					1	1
Equateur/Pérou/Bolivie			1			
Guatemala	1	3	2		1	
Guyane F	38	74	20	92	49	15
Guyane F./Brésil/Suriname				1		
Mexique/Guatemala						2
Mexique/Costa Rica/Panama	1					
Mexique	2		2		1	1
Panama		2	1			
Pérou	3	6	1		1	2
Pérou/Salvador			1			
Venezuela					1	
Suriname	2	5	3			
Origine inconnue	12	18	9	9	9	
	69	132	58	118	70	25

Origine géographique des cas de leishmaniose cutanée recensés par le Laboratoire Associé en Amérique du Sud et Amérique Centrale

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
CDPS	96 /185 (51,9%)	83 /166 (49%)	36 /64 (56,3%)	193 /413 (46,7%)	44 /127 (36%)	25 /48 (52%)
Maroni	71	58	27	115	33	23
Oyapock	71	19	9	55	9	2
Arrière-pays(Cacao, Saint-Elie, Saul)	6	6	0	23	2	0
Hôpitaux	79 /185 (42,7%)	58 /166 (34%)	28 /64 (43,7%)	195 /413 (47,2%)	78 /127 (61%)	20 /48 (42%)
SLM	31	1	2	34	16	4
CHC	48	57	26	161	62	16
CMIA	10 (5,4%)	25 (15%)	0 /64 (0%)	14 /413 (3,4%)	5 /127 (3,9%)	3 /48 (6%)
Autres	0	0	0	11 (Labos privés)	0	0

En Guyane, les patients positifs sont répartis sur l'ensemble du territoire, avec une majorité des cas en provenance des CDPS de la région du Maroni (Maripasoula). Les militaires représentent en 2022, 6% du recrutement.

Facteurs de risque associés aux cas de leishmaniose viscérale déclarés au CNR

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Cas autochtones						
VIH	1	0	1	1	1	1
Transplantation/greffe	0	0	0	1	0	3
Traitement immunosuppresseur ou pathologie	1	0	4	0	3	0
Sans facteur de risque	4	8	6	8	9	6
Non spécifié	1	0	3	5	2	5
	7	8	14	15	15	15
Cas importés						
VIH	1	1	3	0	3	1
Transplantation/greffe	0	0	1	0	0	0
Traitement immunosuppresseur ou pathologie	0	0	5	1	1	4
Sans facteur de risque	3	4	7	8	6	2
Non spécifié	5	0	2	4	0	1
	9	5	16	13	10	8
Origine géographique indéterminée						
VIH	0	2	2	0	1	1
Transplantation/greffe	0	0	0	0	1	1
Traitement immunosuppresseur ou pathologie	0	0	1	1	3	2
Sans facteur de risque	4	2	2	3	3	1
Non spécifié	4	6	3	9	5	4
	8	10	8	13	14	9
Total leishmaniose viscérale	24	23	38	41	39	32

Origine géographique des cas de leishmaniose viscérale déclarés au CNR

	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Afrique subsaharienne	1		6	1	3	1
Amérique du Sud/Centrale/Antilles			1			2
Maghreb	2	1	4	1		2
Proche-Orient	1		1	2	1	0
Sud de l'Europe	5	4	4	9	5	6
Asie					1	1
Non déterminée/multiple	8	10	8	13	14	7
	17	15	24	26	24	19

Le LA CNR L ne recense pas de cas de leishmaniose viscérale
Deux cas de leishmanioses cutanées ont été recensés chez des patients VIH positifs.

2.6 Activités de séquençage

Le séquençage de type Sanger est utilisé en routine pour les identifications d'espèces dans le cadre des leishmanioses cutanées. 87 identifications ont été rendues dans ce cadre en 2022. Il est également utilisé pour l'identification de toutes les souches qui entrent ou qui sortent du laboratoire, environ 50 en 2022.

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<p>Le Laboratoire Coordonnateur a accès à un plateau de préparation de librairies mis en place au sein du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie. Il est constitué de pièces dédiées, équipées d'un Bioanalyseur Agilent 2100, d'un spectrofluorimètre de Le CNR-L de Novix DS-11 FX+, d'un thermocycleur, d'une centrifugeuse à plaque et de petits matériels de laboratoire.</p> <p>Pour le séquençage, le CNR a accès au Plateau de Médecine Moléculaire et Génomique (PMMG) du CHU de Montpellier qui est équipé d'un ABI3130XL et 3500XL pour le séquençage Sanger et pour le NGS d'un MiniSeq, d'un MiSeq et d'un Nextseq500. Ce Plateau est engagé dans un processus d'accréditation COFRAC, les utilisateurs sont habilités.</p>

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	<p>Les analyses bio-informatiques sont réalisées en interne par une bio-informaticienne en CDD (B. Barckmann).</p> <p>La qualité des reads est vérifiée par Fastqc v0.11.9. Les adaptateurs sont retirés et un tri de qualité est réalisé par cutadapt v4.0 et trimmomatic v0.39 respectivement.</p> <p>Pour les expériences de métagénomique par séquençage génome entier shotgun, les reads sont alignés par bowtie2 v2.5.1, les séquences de génome humains sont retirées en utilisant le génome de référence Homo_sapiens.GRCh38.dna.toplevel. Les séquences non humaines sont analysées par kraken2 (https://github.com/DerrickWood/kraken2/) puis les Krakentools (https://github.com/jenniferlu717/KrakenTools). Les données sont visualisées par l'outil interactif en ligne Pavian (https://github.com/fbreitwieser/pavian).</p> <p>Pour le métabarcoding, le pipeline pour l'analyse 16S utilise Snap pipeline (https://github.com/swiftbiosciences/16S-SNAPP-py3) et les bases de données interrogées sont RPD 11.59 (https://rdp.cme.msu.edu/) and SILVA v132 qiime release (https://www.arb-silva.de/download/archive/qiime). Pour l'analyse des amplicons ITS sont utilisés q2_its pipeline (https://github.com/swiftbiosciences/q2_ITS) et la base de données Unite v8 dynamic all https://unite.ut.ee/repository.php.</p>

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?

<input checked="" type="checkbox"/> NON	Non prévu à courte échéance, à réévaluer en fonction d'une évolution du contexte épidémiologique (cas groupés)
<input type="checkbox"/> OUI	

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

Séquençage NGS : afin d'avoir la meilleure résolution phylogénétique, nous avons privilégié le séquençage en 2x300bp sur Miseq. Pour de garder un nombre suffisant de reads par échantillon, nous réalisons un multiplexage de 4 librairies par run. Nous n'avons pas encore réalisé d'analyses phylogénétiques basées sur NGS en 2022, le séquençage Sanger est utilisé pour l'instant.

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

Pas de séquençage dans un contexte d'épidémie à proprement parler, l'activité de séquençage de routine (#90 en 2022) devrait permettre de répondre à cet objectif

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Idem paragraphe précédent

Séquençage systématique des souches et des prélèvements cliniques.

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences : génomes assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Pour le NGS, les données de séquençage sont stockées sur un serveur du CHU pour un stockage à court ou moyen terme. Pour le stockage à long terme, les données sont transférées sur des bandes magnétiques. Les calculs sont effectués sur un cluster à Roscoff (<https://abims.sb-roscoff.fr/>).

Pour le Sanger, une base de donnée interne au CNR rassemblant environ 200 génotypes est utilisées en interne. Les séquences produites au quotidien sont archivées sur un disque NAS interne.

Les données de NGS ne sont pas versées pour l'instant dans des bases publiques.

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Le CNR et le LA-CNR n'ont pas soumis de données de séquençage (Sanger ou NGS) dans les bases de données en 2022. Environ 3600 séquences ont été soumises au cours des années précédentes sur la base du NCBI.

3. Activités de surveillance

Éléments clefs de l'année en termes de surveillance

- 45 centres ont déclaré 125 cas en France métropolitaine, dont 27% de formes viscérales et 73% formes cutanées issues de 24 pays différents. Comparable à 2021 mais nombre de cas plus réduit que les années précédentes (#200/an). Pas d'explication claire, surtout diminution des cas à *L. major* (Maghreb) et *L. guyanensis* (Guyane). Pas de sous-déclaration apparente. La diminution des identifications de *L. guyanensis* observée également par le Laboratoire Associé de Cayenne confirme cette tendance sans l'expliquer autrement que par la variabilité interannuelle des cas associés à cette espèce (variations climatiques).
- Identification d'un cas à *L. martiniquensis* en Guadeloupe, signe d'une endémicité à très bas bruit de cette espèce dans les Antilles.
- 32 leishmanioses viscérales dont 15 autochtones ont été déclarées en 2022, sans évolution quantitative ni qualitative par rapport aux années précédentes.
- En Métropole, une soixantaine de Centres a envoyé des demandes de diagnostic au CNR en 2022, lui permettant d'avoir une vision représentative de la maladie sur le territoire et des cas importés.

3.1 Description du réseau de partenaires

Comme noté plus haut, les demandes croissantes d'analyses liées à la leishmaniose adressées au Laboratoire Coordonnateur donne au CNR une vue plus exhaustive et plus juste de la réalité des leishmanioses autochtones et importée ; en retour, le CNR établit un réseau de correspondants de plus en plus dense, favorisant ainsi conseils et transferts d'informations.

Ainsi la surveillance du CNR s'effectue à travers trois axes : demandes de diagnostic, déclarations de cas et demandes de conseils.

- Les demandes de diagnostic pour des suspicions de leishmaniose viscérale représente 58% des dossiers et sont à 73% externes au CHU de Montpellier. Elles portent à 34% sur un prélèvement de moelle osseuse et à 66% sur un prélèvement sanguin. 9.5% de ces diagnostics sont positifs, ce chiffre intégrant essentiellement des suivis longitudinaux de la parasitémie de leishmanioses non contrôlées (patients immunodéprimés) et de suivi d'efficacité thérapeutique.
- Les demandes de diagnostic pour des suspicions de leishmaniose cutanée représentent 42% des dossiers et proviennent à 80% de Centres extérieurs. La détection lorsqu'elle est positive est systématiquement associée à l'identification moléculaire de l'espèce parasitaire pour orienter le traitement selon les recommandations internationales.
- Les déclarations de cas nous permettent d'être en contact avec environ une cinquantaine de déclarant chaque année (45 en 2022). Il s'agit pour moitié de laboratoires de CHU et pour le reste de laboratoires de CH et de laboratoires du Service de Santé des Armées. Le taux de déclaration des laboratoires de CHU est très bon du fait des relations que nous entretenons avec eux à travers le réseau ANOFEL (Association Française des Enseignants & Praticiens Hospitaliers titulaires de Parasitologie & Mycologie Médicale). L'évaluation des cas de leishmaniose cutanée non déclarés est très difficile à faire car ils concernent des prises en charge médicale et biologiques dans des structures privées (dermatologie de ville). Le recensement des formes viscérales est sans doute plus exhaustif.

- Les demande de conseil portent sur les méthodes diagnostiques et la prise en charge thérapeutique. En 2022, le CNR a répondu à environ 200 appels téléphoniques et demandes par mail. Il faut y ajouter les demandes faites au Pr Pierre Buffet, au Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur, qui assure une part prépondérante des conseils thérapeutiques pour les formes cutanées.

Ce réseau de partenaires n'a pas évolué significativement en 2022. On peut considérer qu'il est représentatif. Du fait de la relative rareté de la maladie, tous les centres qui sollicitent le CNR ne le sollicitent pas tous les ans. Si on cumule les demandes sur plusieurs années, le nombre de partenaires augmente significativement, par exemple les demandes de diagnostic concernent environ 60 centres répartis sur tout le territoire chaque année alors que cumulés sur plusieurs années ils sont environ 200.

- Pour le LA-CNR, 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 (chef de service). Le Dr Blaizot Romain, gère depuis 2018 des missions réalisées dans le cadre des CDPS. La traçabilité des observations, notes et commentaires, notamment sur la thérapeutique, n'est pas faite dans un but statistique (non notifiée sur la fiche de recueil de données) mais dans un but de prise en charge médicale de routine. Toutefois, on estime entre 100 et 200 avis proposés par ce service en plus des consultations de télé-médecine développés dans les centres les plus isolés du territoire.
- A Cayenne, le Service de Dermatologie du CHAR a déployé des missions et des consultations avancées sur les lésions cutané-muqueuses sur l'ensemble du territoire, CDPS et hôpitaux compris. L'ensemble des prélèvements à visée de l'identification des espèces est centralisé par le LHUPM et le LA CNR L. La tendance à la baisse des chiffres de recherches diagnostiques et de déclarations des cas, ne semble pas lié au facteur ressources humaines ou méconnaissance de la pathologie par les professionnels de santé du fait de la pertinence du réseau développé à l'échelle du territoire. Au vu des chiffres des années précédentes, l'explication environnementale avec le facteur climatique doit être de première considération.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

En 2022, 87 identifications moléculaires de *Leishmania* ont permis d'identifier une des espèces. Ce chiffre est en retrait par rapport aux années précédentes, essentiellement par la diminution des identifications de *L. guyanensis* (provenant de Guyane) et *L. major* (provenant du Maghreb).

En 2022, 8 identifications correspondaient à *L. guyanensis* alors que la moyenne sur les 5 années précédentes est de 37/an. On ne retrouve pas une diminution comparable pour *L. braziliensis*, autre espèce habituellement retrouvée chez des patients contaminés en Guyane. En 2022, 10 identifications correspondaient à *L. braziliensis* alors que la moyenne sur les 5 années précédentes est de 12/an. Nous n'avons pour l'instant pas d'explication évidente pour expliquer cette diminution marquée du nombre d'identifications de *L. guyanensis* en métropole.

La comparaison avec le Laboratoire Associé de Cayenne montre que cette évolution n'est pas due à un biais de recrutement : le LA identifie 19 *L. guyanensis* contre 120 en moyenne sur les 5 années précédentes alors que *L. braziliensis* est identifié avec une fréquence similaire (21 en 2022 vs. 19 sur les 5 années précédentes). Il faut noter qu'en 2022 les cas à *L. braziliensis* sont décrits dans la population des orpailleurs principalement.

Parmi les autres espèces d'Eurasie et d'Afrique il faut noter la diminution progressive depuis plusieurs années du nombre de leishmaniose cutanées à *L. major* diagnostiquées au CNR. 25 cas en 2022 avec une moyenne à 52 cas/an sur les 5 années précédentes. Ces cas proviennent essentiellement du Maghreb, il n'y a pas d'explication à cette décroissance, cette espèce est connue pour avoir une incidence

cyclique, liée en particulier aux variations interannuelles des conditions climatiques.

Parmi les 10 espèces différentes trouvées en 2022, il faut noter l'identification d'un cas de *L. martiniquensis* à la Guadeloupe (leishmaniose cutanée multiple chez un patient greffé rénal). Cette espèce du sous-genre *Mundinia*, très éloignée des autres espèces de *Leishmania* (i.e. sous-genres *Leishmania* et *Viannia*), a été mise en évidence dans les Antilles depuis le début des années 2000. Les cas sont sporadiques et décrits essentiellement en Martinique. Le dernier cas identifié par le CNR remonte à 2015. Ceci montre l'endémicité de ce pathogène dans ces régions depuis des décennies malgré la rareté des cas humains. Le cycle de transmission n'étant pas connu, il convient de surveiller son évolution et de chercher à compléter son épidémiologie.

En 2022 le Laboratoire Coordonnateur a réalisé 254 sérologie pour la recherche de leishmanioses viscérales. Cinq sérologies positives ont été détectées (2%). Il n'y a pas d'évolution significative.

Pour la leishmaniose viscérale, 32 cas déclarés en 2022, dont 15 sont autochtones comme en 2019 et 2021. L'anamnèse retrouve en général un séjour en zone d'endémie (sud de la France, Espagne). L'immunodépression reste le facteur de risque le plus évident, sans évolution notable par rapport aux années précédentes.

Pour le LA-CNR-L, en 2022 48 cas de leishmanioses cutanées et cutanéomuqueuses ont été recensées majoritairement chez des patients provenant des Centres de santé à l'intérieur de la Guyane. Les identifications moléculaires ont permis d'identifier 43 souches. La diminution des identifications de *L. guyanensis* observée pourrait être expliquée par la variabilité interannuelle des cas associés aux variations climatiques. Une analyse plus fine de l'épidémiologie en lien avec les événements environnementaux et climatiques semble nécessaire.

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

Actuellement il n'y a pas d'évaluation *in vitro* aux anti-leishmaniens réalisée au Laboratoire Coordonnateur. Cette méthodologie, que le Laboratoire Coordonnateur maîtrise d'un point de vue technique, n'a pas actuellement d'application pratique. La surveillance s'exerce indirectement au travers du conseil thérapeutique.

Pour le LA-CNR-L, les demandes d'évaluation *in vitro* de la résistance sont à l'appréciation des dermatologues et sont réalisées au sein de l'équipe de recherche TBIP à l'Université de Guyane. Aucune demande n'a été exprimée pour 2022.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Le CNR participe au travers de sa collaboration avec le Centre d'infectiologie Necker-Pasteur (Pr P. Buffet) au réseau européen LeishMan.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Enquête de terrain pour l'évaluation de la séroprévalence du réservoir canin

En 2022, le CNR a initié une étude prévue sur 5 ans destinée à évaluer la prévalence de la leishmaniose canine. Les deux premières années cette étude se limitera au foyers des Cévennes, elle pourra être étendue par la suite. L'objectif est de dresser une carte actuelle de l'endémie canine, travail qui n'a pas mené depuis plus de 20 ans et qui permettra d'évaluer l'exposition des populations humaines ainsi que le bénéfice éventuel de la vaccination et de la protection par insecticides sur les populations de chiens. Ce travail est mené en collaboration avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (Dr E. Bouhsira).

En janvier-février 2022, une première enquête de terrain a été organisée par L. Lachaud avec l'aide de Anaïs Bossa, étudiante vétérinaire en cours de Thèse. Au total, 169 chiens ont été prélevés et les données cliniques et épidémiologiques (biotopie) enregistrées. La vaccination éventuelle et les mesures préventives (insecticides externes, colliers) ont également été colligés.

L'ensemble des sérums des 169 chiens a été testé comparativement par quatre techniques sérologiques différentes (cf. supra) permettant d'évaluer la séroprévalence entre 11 et 19% selon la technique utilisée.

Les connaissances des propriétaires de chiens sur la leishmaniose et la prévention ont été évaluées par un questionnaire spécifique.

4. Alertes

Le CNR et le LA-CNR n'a pas déclaré de cas groupés ou de phénomènes anormaux en 2022.

5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Formations des professionnels de santé

- Le CNR a rédigé la nouvelle version (édition n°7) du chapitre « Leishmanioses » du Référentiel en Microbiologie Médicale (REMIC) qui est publié en 2022. Ce document à jour est à usage de tous les Laboratoires de Biologie Médicale en France et sert au quotidien de référence aux Biologistes pour conseiller les prescripteurs sur les examens à demander pour le diagnostic et le suivi. Il est un vecteur très efficace pour le conseil aux Biologistes et permet de propager les bonnes pratiques identifiées par le CNR.
- Le LA-CNR participe à la formation des internes et personnels de santé (médecins, IDE) notamment ceux destinés à exercer dans les CDPS de la Guyane (dispensaire) au travers de cours et de journées formations. Durant ces formations, des supports tels que les vidéos tutoriels sur la réalisation des examens (écouvillons, frottis et biopsies) leurs sont présentés et expliqués.

Diffusion des données de surveillance

- L'information des professionnels de santé est également réalisée à travers le site internet du CNR (<https://cnr-leish.edu.umontpellier.fr/>). C'est généralement le point d'accès initial au CNR, avant contact téléphonique éventuel. En plus des formulaires de déclaration de cas et de conseil thérapeutique le site donne accès au modalités pratique du diagnostic biologique. Il met également à disposition les rapports d'activité et les publications du CNR.

Conseil aux professionnels de santé

- Le Laboratoire coordonnateur répond au quotidien par téléphone aux biologistes et aux médecins qui ont à prendre en charge des cas de leishmaniose. Les conseils portent sur les modalités de diagnostic, le suivi et éventuellement sur la prise en charge thérapeutique.
- En 2022, le CNR a répondu à environ 200 appels téléphoniques et demandes par mail. Il faut y ajouter les demandes faites au Pr Pierre Buffet, au Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur, qui assure une part prépondérante des conseils thérapeutiques pour les formes cutanées (32 conseils thérapeutiques pour des cas de leishmaniose cutanée ou muqueuse, 10 pour des cas de leishmaniose viscérale).
- Les contacts téléphoniques sont un vecteur très important de formation pour cette pathologie plutôt peu fréquente et pourtant très complexe à prendre en charge.
- Pour le LA-CNR, 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 (chef de service) et le Dr Blaizot Romain MCU-PH. Ce service réalise aussi des missions de consultations avancées réalisées sur l'ensemble du territoire, CDPS et hôpitaux compris. La traçabilité des observations, notes et commentaires, notamment sur la thérapeutique, n'est pas faite dans un but statistique (non notifiée sur la fiche de recueil de données) mais dans un but de prise en charge médicale de routine. Par ailleurs, le service de dermatologie, centre référent clinique pour la leishmaniose a mis à disposition une adresse mail hospitalière pour les avis dermatologiques et dispose du dispositif de télé-médecine avec la possibilité d'envois de photos accompagnés d'une fiche de renseignements cliniques.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

En 2022 le CNR n'a pas participé à des expertises auprès des autorités sanitaires.

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

A travers les enquêtes sur la prévalence de l'endémie canine en Cévennes, le CNR a évalué par un questionnaire spécifique les connaissances des propriétaires de chiens sur la leishmaniose et sur la prévention de la maladie chez le chien. Ces actions ont été l'occasion pour communiquer aux éleveurs sur la gestion de ce risque.

Le LA-CNR à Cayenne, en collaboration avec l'équipe de recherche universitaire TBIP (Tropical Biome and ImmunoPhysiopathology), ex-EPaT (EA 3593) a participé en 2022 au projet « la Fête de la Science » qui consiste à animer des stands auprès du public en abordant différentes thématiques de santé dont la leishmaniose.

Par ailleurs, le laboratoire en lien avec TBIP sensibilise les laboratoires vétérinaires sur la nécessité de dépistage des chiens pris en charge par ces structures et participe aux demandes de diagnostics par ces structures.

6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

- Mise en place en 2022 d'une étude de la séroprévalence de la leishmaniose canine dans les Cévennes et comparaison de trousse sérologiques adaptées au dépistage chez le chien

Depuis la Thèse du Dr Kasbari en juillet 2016 (« contribution à l'étude des voies de transmissions non conventionnelles horizontales et verticales des leishmanioses animales et humaines », dir. C. Ravel), le CNR n'a pas poursuivi de coopération spécifique avec des structures de santé animal.

En 2022, une collaboration avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (Dr E. Bouhsira) sur l'évaluation du réservoir canin. Cette étude devrait se prolonger sur 5 ans. En janvier-février 2022, une première enquête de terrain a été organisée par L. Lachaud avec l'aide de Anaïs Bossa, étudiante vétérinaire en cours de Thèse. Au total 169 chiens ont été prélevés.

Comme noté au §2.2, quatre trousse commerciales de sérologie adaptées au chien ont été évaluées sur une population canine de 28 individus malades avec PCR positive dans le cadre de cette thèse d'exercice en collaboration avec l'ENV de Toulouse.

Les résultats ont été intégrés à la thèse d'exercice d'Anaïs Bossa soutenue à l'ENV de Toulouse en 2022, présentés sous forme de poster à la Société Française de Parasitologie en juin 2022 et au congrès international WorldLeish7 en Colombie en aout 2022.

- Comparaison de kit diagnostic PCR

En 2022, le Laboratoire coordonnateur a initié la comparaison de la trousse commerciale quanty *Leishmania* spp. (Clonit) par rapport à la technique actuellement utilisée en routine par le laboratoire (Mary C et al. J Clin Microbiol 2004). L'étude a consisté à vérifier l'efficacité de la PCR, la zone de linéarité, à approcher la limite de détection et à tester les performances de cette PCR sur des échantillons reçues dans l'activité de routine. Les performances analytiques du système Clonit sont bonnes et dans l'ordre de grandeurs de celles données par le fabriquant. Cependant la méthode semble n'être pas assez sensible et peut conduire à des résultats faussement négatifs lorsque la charge parasitaire est faible. Il s'agit d'une préoccupation majeure car, dans la pratique de routine, un quart des échantillons positifs ont une charge parasitaire inférieure à 10 *Leishmania*/mL de sang. Ce travail est en cours de révision dans une revue internationale à comité de lecture.

- Pour le LA-CNR L

- L'ingénieur hospitalier a initié le WGS d'une souche de *L. guyanensis* et *L. amazonensis*. L'objectif étant de séquencer l'ensemble des souches isolées ou des ADN détectés dans le but de caractériser certains gènes d'intérêt notamment sur la résistance médicamenteuse ou des outils d'optimisation diagnostique.

- Les aspects cliniques et épidémiologiques sont analysés à partir des bases de données du laboratoire et du service de dermatologie. Les exploitations sont réalisées dans le cadre des thèses de Médecine (leishmaniose pédiatrique par Melissa Heleine et place de la leishmniose cutanée et cutanéomuqueuse dans les infections cutanées en Guyane française, Valentin J.).

- Le LA-CNR-L et TBIP poursuivent les études sur les tests in vitro et marqueurs de virulence avec des études transcriptomiques (ARN de macrophages traités, RNA de Leishmania RNA virus +/-, etc.). Cette étude est en cours et est réalisée au fil de l'eau avec la détection de nouveaux cas.

- Les services de Dermatologie et le LHUPM développent un réseau de collaboration Guyane-Afrique avec conseils et formations pour les activités de diagnostic de leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse et typage de souches pour des centres tels que les Centres Hospitaliers de Zinder (Niger), Lomé (Togo), Bamako (Mali). Il s'agit d'un projet multi-équipes impliquant le service de Maladies infectieuses de Bordeaux (Pr Malvy), le LA-CNR-L et les services hospitaliers en Afrique. Il est rédigé et mené dans le cadre de la thèse de Sciences du Dr Romain Blaizot. Quelques prélèvements sont parvenus au LA-CNR-L pour tester l'identification de souches africaines. L'ARS Guyane a accepté de financer une partie de ce projet sur 3 ans. Des réunions en visioconférence et des échanges de mail ont permis d'avancer sur les aspects réglementaires en terme de recherche clinique.

6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Trois publications internationales correspondant aux missions du CNR ont été produites en 2022, autant par les membres du Laboratoire Coordonnateur que du Laboratoire Associé de Cayenne. Elles ne mentionnent pas le financement par SpF.

Publications nationales

- Chapitre 108 « Les Leishmanioses » du Référentiel en Microbiologie Médicale (REMIC), C. Pomares, C. Ravel, 7^{ème} édition, 2022.

Publications internationales

- Leishmaniasis epidemiology in endemic areas of metropolitan France and its overseas territories from 1998 to 2020. Pasquier G, Demar M, Lami P, Zribi A, Marty P, Buffet P, Desbois-Nogard N, Gangneux JP, Simon S, Blaizot R, Couppié P, Thiebaut L, Pralong F, Dedet JP, Bastien P, Sterkers Y, Ravel C, Lachaud L; Working Group for the Notification of Human Leishmanioses in France. PLoS Negl Trop Dis. 2022;16(10):e0010745. doi: 10.1371/journal.pntd.0010745.

- Zoonoses and gold mining: A cross-sectional study to assess yellow fever immunization, Q fever, leptospirosis and leishmaniasis among the population working on illegal mining camps in French Guiana. Douine M, Bonifay T, Lambert Y, Mutricy L, Galindo MS, Godin A, Bourhy P, Picardeau M, Saout M, Demar M, Sanna A, Mosnier E, Blaizot R, Couppié P, Nacher M, Adenis A, Suarez-Mutis M, Vreden S, Epelboin L, Schaub R. PLoS Negl Trop Dis. 2022, 15;16(8):e0010326. doi: 10.1371/journal.pntd.0010326.

- Spectrum of skin diseases in Maroon villages of the Maroni area, French Guiana. Valentin J, Niemetzky F, Gaillet M, Michaud C, Carbunar A, Demar M, Couppié P, Blaizot R. Int J Dermatol. 2022; 61(9):1137-1144. doi: 10.1111/ijd.16324.

Communications nationales

- Prévalence de la leishmaniose canine dans les Cévennes. A. Bossa, G. Pasquier, L. Zribi, E. Bouhsira, P. Lami, S. Boufares, H. Hansen, K. Aoun, C. Ravel, L. Lachaud. Poster Société Française de Parasitologie 21-24 juin, 2022, Rouen.

- Variations épidémiologiques et thérapeutiques de la Leishmaniose Cutanée en Guyane, 2017-2021. Blaizot R, Hernandez M, Ginouves M, Prevot G, Nabet C, Carod JF, Couppié P, Demar M.

Communications internationales

Epidemiological survey of canine leishmaniasis in an area of southern France. A. Bossa, P. Lami, N. Kuk, E. Bouhçira, S. Douzou, G. Pasquier, C. Ravel, L. Lachaud. Poster WorldLeish7, 2022, Cartagena, Colombia.

Epidemiological trends of Cutaneous Leishmaniasis in French Guiana: a 5-year retrospective study. Blaizot R, Hernandez M, Ginouves M, Prevot G, Nabet C, Carod JF, Couppie P, Demar M.

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

Coopération avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Comme noté plus haut, à partir de 2022, un programme d'évaluation de l'endémie canine en France métropolitaine a été mis en place et doit être poursuivi sur plusieurs années (suivi longitudinal sur 5 ans) dans les différents foyers du sud de la France. C'est un paramètre essentiel de l'exposition des populations humaines au parasite. Cet axe va être développé par L. Lachaud qui a déjà mené ce type d'étude il y a une vingtaine d'années et pourra donc faire une évaluation comparative sur cette période. De nouveaux paramètres épidémiologiques comme l'effet de la vaccination ou du port de collier anti-phlébotomes par les chiens pourront être évalués.

La compétence vétérinaire indispensable est assurée par E. Bouhsira et les étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. En 2022, c'est Anaïs Bossa, étudiante vétérinaire en cours de Thèse qui a organisé et participé à une première enquête de terrain dans différents chenils des Cévennes. Les demandes administratives de prélèvement ont été obtenues (agrément n° 2021070114534565). Cette coopération s'est prolongée par une étude comparative de 4 techniques sérologiques pour le diagnostic chez le chien a été réalisée. A. Bossa a pu bénéficier de l'environnement du laboratoire du CNR pour réaliser ses expérimentations.

Il est prévu que cette coopération se poursuive sur 5 ans. Elle pourrait être étendue au foyer des Alpes Maritimes.

Des collaborations avec les Laboratoire Vétérinaires Départementaux sont également envisagés.

Le LA-CNR, en lien avec l'équipe de recherche universitaire TBIP, collabore avec la DAAF (Direction de l'alimentation, de l'agriculture et des forêts) pour les agriculteurs et éleveurs et les cabinets de vétérinaires de Cayenne et Kourou, essentiellement sur un projet des zoonoses d'importance à la fois médicale et vétérinaire (Toxoplasmose, Leishmaniose, Maladie de Chagas, Fièvre Q, Brucellose). L'objectif de ce projet étant de permettre la surveillance épidémiologique de ces zoonoses avec une optimisation de l'approche diagnostique.

8. Programme d'activité pour les années suivantes

1. Activités d'expertise

- le réseau de partenaires

Actuellement un des points fort du laboratoire de Montpellier est d'avoir un réseau de partenaires très étendu au niveau national. C'est une des conséquences du grand nombre de structures (environ une centaine d'établissements de santé publics, privés ou des Armées) qui envoient annuellement environ 900 échantillons à Montpellier pour un diagnostic de leishmaniose et/ou une identification d'espèce. L'identification est devenue un élément important pour la prise en charge des leishmanioses viscérales et les Laboratoires qui ne sont pas en mesure d'assurer cette analyse vont probablement transmettre plus d'échantillons au CNR dans les années à venir.

Des liens se créent également par l'activité de Conseil, soit pour la prise en charge diagnostique ou la prise en charge thérapeutique de patients. De bonnes relations sont établies avec la Guyane (CH de Cayenne et CH de Saint Laurent du Maroni).

Les déclarations de cas, qu'elles soient spontanées ou sollicitées constituent également un moyen de communication privilégié. Un rappel sur l'intérêt des déclarations est fait annuellement par mail à tous les Parasitologues de CHU à travers et l'exhaustivité est améliorée en sollicitant individuellement les principaux CH.

Ainsi, pour le laboratoire coordonnateur, le maintien de ce réseau avec les biologistes et cliniciens passe par sa capacité à prendre en charge des échantillons biologiques en provenance d'un grand nombre de centres. Les capacités techniques du CNR sont donc essentielles pour qu'il conserve cette fonction de recours.

Il en est exactement de même pour le LA-CNR-L de Cayenne qui réalise des diagnostics sur une grande partie du territoire et obtient des déclarations de cas pour cette forte zone d'endémie. Il maintient des contacts avec les prescripteurs, en particulier ceux des CDPS. Une des forces du LA-CNR-L est la synergie qui existe entre les unités cliniques, biologiques et épidémiologiques. Les dermatologues faisant partie intégrante du LA-CNR effectuent directement le diagnostic clinique, les conseils et la formation auprès des prescripteurs.

L'activité assurée par le Pr. Buffet et le Dr. Cléa Melenotte au Centre Médical de l'Institut Pasteur/Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur – Laboratoire support thérapeutique dans ce projet contribue à l'insertion. La culture parasitaire est souvent entreprise à partir d'une biopsie cutanée ou du produit d'une ponction à l'aiguille fine adressées au Laboratoire de Parasitologie Mycologie de l'Hôpital Cochin, qui constitue l'une des sources importantes de souches adressées au CNR et alimentant sa biobanque.

Il en est de même pour le LA-CNR-L de Cayenne qui réalise des diagnostics sur une grande partie du territoire et obtient des déclarations de cas pour cette forte zone d'endémie. Il maintient des contacts avec les prescripteurs, en particulier ceux des CDPS. Une des forces du LA-CNR-L est la synergie qui existe entre les unités cliniques, biologiques et épidémiologiques. Les dermatologues faisant partie intégrante du LA-CNR effectuent directement le diagnostic clinique, les conseils et la formation auprès des prescripteurs.

Sur les questions d'épidémiologie et de risque épidémique, le CNR entretient des relations étroites avec des vétérinaires et des entomologistes. Ce réseau de compétences sera maintenu avec comme correspondants privilégiés le Dr Bouhsira à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse et le Pr Depaquit à l'Université de Reims pour la partie entomologique.

Pour le LA-CNR-L, une approche plus intégrée avec des actions multidisciplinaires (cliniciens,

épidémiologistes, biologistes, entomologistes et vétérinaires) est envisagée chaque année sur un site de militaires (CEFE, centre d'entraînement en forêt équatoriale) qui servira de site pilote pour étudier la circulation de *Leishmania* sp. Cette approche pourra servir de modèle pour l'exploration d'autres épidémies.

- Techniques de détection, d'identification et de caractérisation des agents en développement

Le CNR souhaite développer des techniques de détection, d'identification et de typage des souches par approche NGS et WGS. Ce travail est initié par Y. Sterkers qui intègre déjà ces techniques dans ses activités de recherche. L'une des limites est de parvenir à l'identification du pathogène directement à partir d'échantillons biologiques, l'isolement de la souche de *Leishmania* étant rarement possible et les charges parasitaires pouvant être faibles. Le laboratoire dispose déjà des équipements (constitution des bibliothèques) requis et les séquenceurs sont disponibles sur un plateau technique de génétique. Une ingénieure en bio-informatique (B. Barckmann) est financée pour 3 ans sur des crédits hospitaliers. La collection de 6000 souches dont dispose le CNR à travers son CRB est un atout majeur pour la constitution d'une base de données de séquences couvrant toutes les espèces de *Leishmania* décrites. Durant cette mandature, nous avons prévu de réaliser 30 séquençages par an.

Le LA-CNR-L reste de même dans cette dynamique d'optimisation de ces outils de diagnostic (multiplexe diagnostique) de même que de typage (NGS à développer, WGS à poursuivre) et poursuit le travail initié par l'ingénieur hospitalier sur le WGS couplant l'intérêt recherche à l'intérêt diagnostic avec mise à disposition de séquences nucléotidiques d'intérêt (diagnostic, thérapeutique..).

- Mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections de souches de *Leishmania*

Le CRB-*Leishmania* va poursuivre la mutation de sa base de données de BRC-Lims vers Modul-Bio, logiciel en cours d'acquisition par le CRB.

Les conditions de constitution et mise à disposition des collections seront maintenues. Pour faciliter la mise à disposition, environ 1700 souches qui restent encore conservées en ampoules de verre, difficiles à manipuler et à stocker, seront progressivement re-stockées en cryotubes ; c'est une étape techniquement lourde car nécessitant la remise en culture de chaque souche. L. Lachaud et N. Kuk ont déjà initié ce processus.

Les procédures de cession sont conformes à celles définies par le CRB-CHUM (accrédité ISO 20387) et inclues un Conseil Scientifique. Au cours du prochain mandat, le CRB devrait finaliser son processus d'accréditation selon cette Norme, un Ingénieur CRB-CHUM (A. Dhenaut) va apporter une aide significative.

Le LA-CNR-L poursuit sa démarche de cryoconservation des souches de *Leishmania* et des ADN en accord et confirme le processus de duplication de la collection au niveau de Montpellier.

- Travaux d'évaluation technique envisagés

D'assez nombreux kits de détection commerciaux sont maintenant proposés à travers le monde. Les cibles moléculaires visées sont peu nombreuses (cytochrome B en particulier) ou non décrites. Une évaluation comparative d'un certain nombre de ces kits devrait permettre d'établir s'il existe des différences significatives de sensibilité de détection entre eux. Le système non commercialisé actuellement utilisé au CNR (basé sur la technique développée par C. Mary et al. J Clin Microbiol. 2004, 42, 5249-55) pourra être comparé. Le CNR a accès à une collection importante d'ADN extraits à partir de prélèvements cliniques, cette collection sera un très bon matériel pour établir ces comparaisons. Première étape, en 2022, le laboratoire coordonnateur a comparé le kit Clonit (Quanti *Leishmania* spp. Réf. RT-63q) avec la méthode utilisée en routine.

- Réponse à une situation sanitaire exceptionnelle

De par sa nature, il est peu probable que les cas de leishmaniose puissent augmenter de façon considérable et conduire à une situation sanitaire exceptionnelle. Cependant, l'exposition involontaire au risque de transmission peut concerner au même moment un groupe de population plus ou moins important (e.g. détachement militaire en zone de transmission, tourisme vert, etc.). Cette éventualité devrait pouvoir être traitée dans le cadre du laboratoire hospitalier de Montpellier qui réalise actuellement ces analyses (capacité actuelle 15/semaine pouvant être portée facilement à 30/semaine voire 50/semaine). Les capacités d'identification couvrent tous les Trypanosomatidés et permettent d'envisager la caractérisation d'un

pathogène même s'il est très distant du groupe des *Leishmania* habituellement étudiées.

Le LA-CNR-L se tient prêt à travers son expertise et le LHUPM en capacité sur le diagnostic de routine à faire face à toute situation exceptionnelle telle une augmentation des cas de leishmaniose comme ce qui a eu lieu entre janvier et avril 2020. L'implication directe des dermatologues ayant cette expertise clinique permet très rapidement le signalement de cas. Par ailleurs, une optimisation du recueil de données au travers d'un renforcement du temps secrétariat est faite auprès de l'ARS Guyane ciblant la leishmaniose et la lèpre.

2. Activités de conseil, formation et information

Comme noté plus haut à propos du réseau des partenaires, les activités de conseil ont déjà une place importante, que ce soit pour la prise en charge diagnostique ou thérapeutique des leishmanioses.

Ces conseils permettent une diffusion très efficace des recommandations et informations aux professionnels concernés. Le conseil thérapeutique partagé avec P. Buffet et C. Melenotte (Institut Pasteur) et C. Ravel, parfois sous forme de Réunion de Concertation Pluridisciplinaire clinico-biologiques, permet de pousser très loin le niveau de service rendu pour la prise en charge des patients et doit absolument être maintenu. Le Dr. Ravel et les Pr. Lachaud et Buffet ont participé à la rédaction de recommandations thérapeutiques nationales et internationales et vont contribuer activement aux mises à jour de ce corpus.

Outre son utilité médicale directe, cette activité de conseil, répond à une demande de correspondants du CNR qui apprécient de bénéficier de l'éclairage d'experts sur les cas à la prise en charge desquels ils contribuent. L'activité d'expertise contribue donc à la motivation des correspondants. Elle renforce en outre le recueil d'information par croisement des sources (biologistes et cliniciens) et peut contribuer de façon réactive à la mission d'alerte.

Dans le contexte de la leishmaniose cutanée, où de nombreux diagnostics ne reposent que sur un examen direct ou une analyse histologique sans isolement du parasite ni amplification de ses acides nucléiques, les cas correspondants sont drainés vers le CNR directement par cette activité d'expertise clinique.

Le LA-CNR L continuera ses actions de sensibilisation et de formation au travers d'une forte proximité et disponibilité dans les CDPS (missions, consultations, etc.) et qui ont porté leurs fruits au cours des années précédentes. Il cherchera aussi à améliorer le recueil de données épidémiologiques et cliniques concernant les cas de leishmaniose au travers d'une formation, et information claire et précise auprès des membres du réseau.

Le chapitre 108 « Leishmaniose » du Référentiel en microbiologie Médicale (REMIC) 7^{ème} édition, 2022, rédigé par C. Pomares et C. Ravel devrait clarifier la prise en charge diagnostique en France métropolitaine pour l'ensemble des Biologistes médicaux. L'évolution du site internet du CNR devrait y participer.

3. Contribution à la surveillance épidémiologique

Un programme d'évaluation de l'endémie canine en France métropolitaine a été initié en janvier 2022 et doit être poursuivi sur plusieurs années (suivi longitudinal sur 5 ans) dans les différents foyers du sud de la France. C'est un paramètre essentiel de l'exposition des populations humaines au parasite. Cet axe va être développé par L. Lachaud qui a déjà mené ce type d'étude il y a une vingtaine d'années et pourra donc faire une évaluation comparative sur cette période. De nouveaux paramètres épidémiologiques comme l'effet de la vaccination ou du port de collier anti-phlébotomes par les chiens pourront être évalués. Les outils sont disponibles au sein du CNR, du laboratoire hospitalier et plus largement du CHU. La compétence vétérinaire indispensable est assurée par E. Bouhsira et les étudiants de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse. Les demandes administratives de prélèvement ont été obtenues (agrément n° 2021070114534565). D'autre part, un PHRC conduit par C. Pomares et auquel participe L. Lachaud est en cours, il devrait préciser l'importance du portage sain chez l'homme, paramètre important pour anticiper et modéliser l'impact des traitements immunosuppresseurs sur la survenue de leishmanioses patentées.

Pour le LA-CNR-L, un programme de surveillance épidémiologique sur le site militaire du CEFE (Centre d'entraînement en forêt équatoriale) est envisagé sur une durée de 3 ans avec une approche intégrée (cliniciens, épidémiologistes, biologistes, entomologistes et vétérinaires). Ce site servira de site pilote pour étudier la circulation de *Leishmania* sp. dans cette région et pourra servir de modèle pour l'exploration d'autres épidémies en terme de surveillance épidémiologique.

Le LA-CNR-L envisage de même une optimisation de sa surveillance épidémiologique avec un logiciel de déclaration des cas à mettre à disposition auprès des praticiens, totalement éclatés sur le territoire. La demande ayant été faite auprès de l'ARS-Guyane.

4. Contribution à l'alerte

Aidé du Laboratoire Associé de Cayenne et des experts médicaux associés de l'Institut Pasteur, le Laboratoire Coordonnateur centralisera et signalera à l'Institut de Veille sanitaire tout évènement anormal concernant l'augmentation du nombre de cas, l'existence de cas groupés, ou une modification éventuelle des formes cliniques, en France métropolitaine, dans les DROM ou à l'étranger.

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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

Un des points principaux à retenir est l'augmentation constante des demandes d'expertise diagnostique adressées au CNR par les établissements extérieurs. Cette évolution renforce considérablement la vision que le CNR a des cas traités en France, autant d'un point de vue épidémiologique (identification moléculaire systématique, exhaustivité des déclarations) que clinique (développement du dialogue pour la prise en charge diagnostique et thérapeutique). Le CNR est aujourd'hui en capacité d'identifier toutes les espèces de *Leishmania* et d'un façon générale tous les pathogènes du groupe des Trypanosomatidés, pouvant ainsi détecter et signaler l'émergence d'espèces atypiques ; ces recherches sont effectuées de façon systématique sur tous les prélèvements reçus.

En 2022, le laboratoire coordonnateur a traité environ 900 demandes de diagnostic avec ou sans identification moléculaire et environ 250 demandes de sérologies, provenant de près d'une centaine d'établissements de santé sur le territoire national. Cette évolution résultant notamment 1) d'un transfert d'analyses rares ne justifiant pas une demande d'accréditation par des laboratoires hors zone d'endémie et 2) d'un service rendu sur l'identification moléculaire de l'espèce qui contribue à la prise en charge thérapeutique.

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

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

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Etat des emplois du Laboratoire Coordonnateur

Noms et Prénoms	Qualifications	ETP	Appartenance administrative
Ravel Christophe	Médecin (MCU-PH)	0,25	CHU-Université Montpellier
Lachaud Laurence	Médecin (PU-PH)	0,15	CHU-Université Montpellier
Sterkers Yvon	Médecin (PU-PH)	0,05	CHU-Université Montpellier
Kuk Nada	Technicienne	0,60	Université Montpellier
Douzou Sylvie	Technicienne	0,05	CHU Montpellier
Pépin Virginie	Secrétaire	0,05	CHU Montpellier
A recruter	Ingénieur	1	CHU Montpellier

Le recrutement d'un Ingénieur est rendu indispensable à la fois par 1) la survenue récente de départs à la retraite non remplacés 2) par la nécessité d'un binôme pour N. Kuk et 3) par les exigences des développements technique projetés pour les années à venir.

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

Nom et prénom	Qualification	ETP	Appartenance administrative
Pierre Demar Magalie	Médecin PU-PH	0.15	CHC-UA
Couppié Pierre	Médecin PU-PH	0.05	CHC-UA
Ouedrago Lamine	Médecin PH	0.3	CHC-UA
Blaizot Romain	Médecin PH	0.3	CHC
Céline MICHAUD	Médecin PH	0.1	CHC
Blandine LEBLANC	Adjoint administratif	0.2	CHC
Hernandez Miguel	Ingénieur hospitalier	1	CHC
Technicien de laboratoire	Technicien de laboratoire	0.3	CHC
Ginouves Marine	Assistant ingénieur études	0.1	TBIP/UG

1.3 Locaux et équipements

Le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie est accrédité pour l'ensemble de ses analyses selon la Norme ISO15189 ce qui permet de sécuriser l'environnement du CNR.

Locaux

Le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie est implanté depuis 2009 dans un bâtiment neuf et indépendant de 1300m² répartis sur deux étages, sur le campus hospitalier Lapeyronie-La Colombière. Dans ces locaux sont installés à la fois le laboratoire hospitalier de diagnostic, le Centre National de Référence des Leishmanioses et une équipe de recherche de l'UMR5290 MiVEGEC (équipe BioGEPPE Biologie, Génétique et Pathologie des Eucaryotes Unicellulaires, dirigée par Y. Sterkers). Dans ce bâtiment, le CNR-L dispose de pièces spécifiques et partage des pièces techniques communes à diverses activités, ce qui permet une réelle synergie avec les missions de CNR.

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

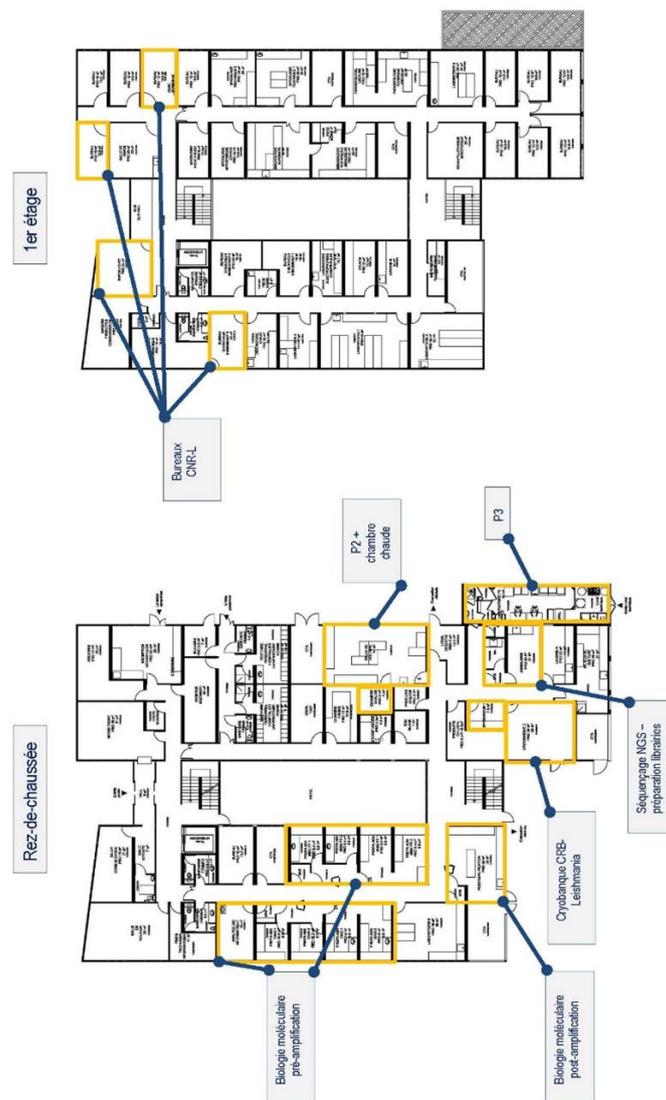
- une unité de culture de niveau P2 de 45m², équipée de 3 enceintes de sécurité et d'une chambre

chaude de 7m² pour la culture de Leishmania (24-26° C) ;

- à cette unité de culture, s'ajoute une enceinte confinée de niveau P3 de 40m², pour la culture des espèces de Leishmania classées en L3 (*L. donovani* et *L. braziliensis*).
- une unité de cryoconservation (CRB Leishmania) avec un local spécifique de 30m², aux normes de sécurité pour la manipulation de l'azote liquide. Un contrat de livraison hebdomadaire d'azote liquide existe avec Air Liquide Santé, avec mise à niveau des containers.
- un plateau technique regroupant 9 pièces partiellement en miroir pour un total de 130 m² réservé à la biologie moléculaire, partagé avec l'équipe de recherche et l'équipe hospitalière. Une division de ces locaux dédiés à la PCR et au séquençage Sanger permet une séparation physique des différentes étapes (extraction des ADN, préparation des mélanges réactionnels, étapes post-amplification) avec sas d'entrée, pressions différentielles adaptées, séparation complète des matériels. De plus, une organisation en miroir permet une séparation des activités de diagnostic en routine des activités en développement.
- une pièce de 20m² avec sas pour la préparation de librairies pour le séquençage NGS.
- un local hébergeant un MALDI-TOF pour l'identification protéomique des Leishmania, partagé avec l'activité hospitalière d'identification des champignons.
- 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...).

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

Annexe 1 - Plan des locaux CNR au sein du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier



Principaux équipements.

La maintenance et le renouvellement décennal des équipements courants sont assurés par le Service Biomédical du CHU

- 3 PSM
- 1 autoclave
- 1 automate d'extraction d'ADN MagNA Pure
- Pour la préparation de librairies NGS, appareil d'électrophorèse capillaire BioAnalyzer et sonicateur Bioruptor Pico
- 1 MALDI-TOF pour l'identification protéomique des Leishmania, partagé avec l'activité hospitalière d'identification des champignons
- 2 appareil de PCR en temps réel LC480
- 12 conteneurs à azote liquide pour assurer la cryoconservation d'environ 6000 souches de Leishmania stockées dans environ 30000 cryotubes (1x 350 L (CF350 M), 2x 2200 L (LO 2200), 1x 330 L (Espace 331), 1x 150 L (Espace 151), 1x 110 L (Arpege 110), 6x 140 L).
- Petits équipements : centrifugeuses, balances, microscopes, générateurs, bains secs, plaques UV, pH-mètres, congélateurs - 20°/- 80° C, etc.).

Concernant le Laboratoire Associé du CNR

Locaux : Les zones d'activité où s'exercent les activités du LA-CNR-L se répartissent sur 2 sites : principalement, le CHC avec les secteurs de plate-forme de biologie moléculaire et le LHUPM et accessoirement au sein de l'équipe TBIP sur le campus universitaire.

- Les secteurs de biologie moléculaire et le LHUPM sont installés dans le secteur des laboratoires. Les locaux du LA-CNR sont en grande partie intégrante au LHUPM avec une pièce spécifique à l'activité de séquençage et des pièces techniques communes à diverses activités diagnostiques, ce qui permet une réelle synergie avec les missions de CNR. Ces locaux comprennent une/un/des/la :

Au sein du LHUPM

- Unité de culture de niveau P2 destinée aux cultures d'agents parasitaires tels que Toxoplasma sp. 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.
- Pièce pour réalisation et lecture des gels de migration pour la PCR point final.
- Pièce avec PSM pour la réalisation du séquençage
- 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 affectés au LA du CNR-L.
- Secteur de lecteur sur microscope inversé situé en salle de parasitologie directe.

Au sein du secteur de Bactériologie

- Secteur partagé avec le secteur de bactériologie et mycologie contenant le spectromètre de masse, MALDI-TOF permettant l'identification des espèces de Leishmania sp.

Au sein de la Plate-forme de biologie moléculaire

- Plate-forme de biologie moléculaire comportant les salles d'extraction des acides nucléiques, l'amplification et détection et la préparation des mix.

L'équipe TBIP est basée sur le Campus universitaire dans un bâtiment de 2 étages et partage certains bureaux avec du personnel de la faculté de Médecine, et d'autres équipes universitaires. Il comporte un plateau technique réservé à la biologie moléculaire, au séquençage, un secteur de culture cellulaire, un secteur de microbiologie et un secteur de technique sérologie, prétraitement des échantillons de l'environnements....

Principaux équipements.

Le LA-CNR-L utilise les équipements du laboratoire du CHC qui sont des

- Equipements courants du laboratoire : PSM, étuves, centrifugeuses, congélateurs (-80°C), microscopes optiques,...
- Equipements spécifiques à activités partagées avec le laboratoire:

MALDI-TOF pour l'identification protéomique des Leishmania, partagé avec l'activité hospitalière d'identification des champignons et des bactéries

- Equipement de biologie moléculaire : appareils de PCR en temps réel (Applied 7500, Rotor gene, ABX, BD Max), thermocycleur conventionnel, automates d'extraction d'ADN (Qiasymphony, Strarlet, BD Max), Gridion de Nanopore, bio Analyzer)
- Equipements indispensables et spécifiques à l'activité :
 - 2 containers de 80 litres d'azote liquide,
 - microscope inversé
 - étuve
 - Cuves à électrophorèse, générateurs, chambre noire

La maintenance et le renouvellement des équipements courants sont assurés par le Service Biomédical du CHC.

1.4 Collections de matériel biologique

Le CNR a à sa disposition une collection exceptionnelle de souches de Leishmania. Ce CRB-Leishmania comporte 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 %). Actuellement la collection est en cours de certification selon la Norme ISO 20387 (cf. infra).

La mise à disposition des souches peut se faire au travers d'un catalogue de 242 souches disponibles dans la collection est présenté sur le site Internet du laboratoire (<https://crb-leish.edu.umontpellier.fr/>). Les souches sont destinées à des projets scientifiques ou à des développements techniques (vaccins, méthodes diagnostiques, etc.). L'accord de cession est donné par le Conseil Scientifique du CRB-CHUM. Une Convention de Transfert de Matériel (MTA) est établie, 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. Les conditions de mise à disposition du CRB-Leishmania des souches du Laboratoire Associé sont définies. Une collection d'ADN de Leishmania constituée depuis 2003 à partir de produits pathologiques (environ 2300) ou de souches de culture (environ 750) est déclarée (IRB Accreditation number: 198711).

Le LA CNR L possède également une collection de souches et d'ADN de Leishmania isolées à partir de patients sur l'ensemble du territoire guyanais. A ce jour, depuis 2019, 266 souches de Leishmania et ADN obtenus à partir de produits pathologiques ou à partir de souches de culture ont été cryoconservés et doivent être transférés au Laboratoire coordonnateur à Montpellier. En effet, toutes les souches sont conservées en azote liquide en duplicata de la Collection de Montpellier. Tous les ADN détectés sont cryoconservés à – 80°C.

Bien que l'ayant réalisé durant 4 ans (2019 à 2022), le CRB du Centre Hospitalier de Cayenne n'envisage pas de gérer la collection de souches de Leishmania au sein de ses locaux car il s'agit d'un CRB d'échantillons biologiques et non un CRB type souches de microorganismes, la disposition des pièces ne permettant plus cette cohabitation. Aussi, le LA CNR L dispose de locaux avec de l'azote liquide et gère la collection des souches de Leishmania sp.

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Le Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Montpellier (laboratoire coordonnateur) réalise des analyses de routine, y compris à la demande de nombreux Laboratoires de Biologie Médicale extérieurs. Il s'agit de PCR diagnostiques leishmaniose, d'identifications moléculaires de Leishmania et de sérologies leishmaniose. L'ensemble des lignes de portée du Laboratoire sont accréditées selon la Norme ISO EN 15189 (accréditation COFRAC N° 8-3401 rév. 14 du 08/09/2021 au 31/07/2024), en particulier les lignes PM04 (PCR et identification) et MG01 (sérologie). Les analyses PCR diagnostique Leishmaniose et

sérologie leishmaniose ont été auditées par le COFRAC et l'ajout de l'identification moléculaire de Leishmania est déposé depuis novembre 2019 (pas d'audit pendant la période COVID).

Par ailleurs, la collection CRB-Leishmania est l'une des composantes du CRB du CHU de Montpellier (CRB-CHUM). Ce CRB qui est certifié pour plusieurs de ses composantes selon la norme spécifique CRB ISO 20387. La composante Leishmania n'est pas encore incluse dans cette certification même si elle applique déjà la plupart des processus communs au CRB-CHUM (système documentaire intégré, Conseil Scientifique pour les cessions, etc.).

Le CNR participent annuellement à des contrôles externes de la qualité (diagnostic de leishmaniose par PCR, sérologie leishmaniose). Le CNR organise des comparaisons inter-laboratoires avec des laboratoires homologues pour l'identification moléculaire de Leishmania.

Pour la réalisation d'enquêtes vétérinaires sur l'endémie canine, les demandes administratives de prélèvement ont le numéro d'agrément n° 2021070114534565.

Pour le LA-CNR, le LHUPM réalise des analyses de routine notamment pour les CDPS, le CMIA (Centre Médical Interarmées). Il s'agit de l'examen direct sur lame, culture parasitaire de biopsies, PCR diagnostiques leishmaniose, d'identifications moléculaires de Leishmania. Le diagnostic direct a été accrédité en 2022 et la culture, l'identification en spectrométrie de masse sont proposés en rajout selon la Norme ISO EN 15189 (ligne portée MG07 et MG011) (accréditation COFRAC N° 8-3837). La PCR est en cours de demande d'extension en portée B et en attente de validation par le Cofrac.

Le LA CNR L participe aux contrôles de qualité externe organisés par le centre collaborateur (PCR leishmaniose) type comparaisons inter-laboratoires. De plus, le LA CNR L a mis en place en 2022 une évaluation externe de la qualité avec le laboratoire hospitalier de Saint-Laurent du Maroni qui effectue les diagnostics par recherche directe. Il s'agit d'une comparaison inter-laboratoire. Le projet visant à étendre à tous les laboratoires privés et hospitaliers de la Guyane proposant le diagnostic par recherche directe.

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

- Diagnostic moléculaire des leishmanioses par PCR à partir de différentes matrices (sang, moelle, biopsie, ponction, etc.) (accréditation Iso 15189 depuis mars 2017)
- Identification moléculaire de Leishmania par PCR/séquençage (accréditation Iso 15189 en attente de notification, audit COFRAC décembre 2022)
- Sérologie de la leishmaniose (ELISA et confirmation par western-blot) (accréditation Iso 15189 depuis septembre 2021)
- Diagnostic morphologique microscopique de leishmanioses après coloration (accréditation Iso 15189 depuis août 2019)
- Isolement de souches de Leishmania par culture, non accrédité
- Identification par Maldi-TOF des Leishmania isolées en culture, non accrédité
- Séquençage NGS sur MiSeq, paired end, 300 bp, en développement, non accrédité
-
-

Pour le LA-CNR

- Diagnostic moléculaire des leishmanioses par PCR à partir de différentes matrices (sang, moelle, biopsie, ponction, etc.) (accréditation Iso 15189, extension en cours mai 2022)
- Identification moléculaire de Leishmania par PCR/séquençage (sous-traitance)
- Diagnostic morphologique microscopique de leishmanioses après coloration (accréditation Iso 15189 depuis mai 2022)
- Isolement de souches de Leishmania par culture, (rajout effectué en mai 2022)
- Identification par Maldi-TOF des Leishmania isolées en culture, (rajout effectué en mai 2022)

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Pour les Laboratoires les recommandations sont traitées dans le chapitre 108 « Les Leishmanioses » du Référentiel en Microbiologie Médicale (REMIC), C. Pomares, C. Ravel, 2022.

En synthèse,

Leishmaniose viscérale

Les techniques de diagnostic moléculaire commerciales sont globalement peu sensibles (cibles moléculaires peu répétées) et il est conseillé d'adresser les prélèvements à des centres maîtrisant des techniques de référence basées sur la détection de l'ADN kinétoplastique (par exemple la technique décrite Mary C. et al. J Clin Microbiol. 2004;42(11):5249-55).

Le diagnostic de la leishmaniose viscérale doit reposer en première intention sur l'association PCR sur sang périphérique et sérologie. Si ces tests sont douteux ou si une très forte suspicion persiste, il faut reprendre ces analyses et réaliser une PCR sur moelle osseuse. Pour la sérologie, la réalisation systématique d'un Western-blot de confirmation

Les autres techniques (recherche de parasites au microscope sur frottis de moelle, mise en culture) peuvent apporter des éléments au cas par cas et peuvent être sollicitées si elles sont disponibles. L'évaluation d'une parasitémie est un élément important du bilan initial et du suivi thérapeutique.

Les techniques

Leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse

En première intention, l'analyse la plus sensible est la détection du parasite par PCR suivie d'un séquençage

pour permettre l'identification moléculaire de l'espèce de Leishmania en cause. Cette identification fait partie des recommandations pour la prise en charge thérapeutique. Les autres techniques (recherche de parasites au microscope après appositions, mise en culture) peuvent apporter des éléments au cas par cas et peuvent être sollicitées si elles sont disponibles.

Le diagnostic de la forme cutanée-muqueuse doit en outre associer une sérologie et une recherche par PCR de parasites dans le sang (recherche d'une forme viscérale associée).

