



RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2024

CNR Leishmanioses

	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
Organigrammes.....	6
Mission et Organisation	8
Démarche Qualité.....	8
2. Activités d'expertise	9
2.1 Evolution des techniques	9
- Extraction d'ADN.....	9
- Amplification	9
- Séquençage	9
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees	10
Comparaison de troussees/techniques sérologiques adaptées au dépistage chez le chien	10
- Test kit PCR.....	10
- Comparaison de sensibilité entre séquençage NGS et PCR	10
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	10
2.4 Collections de matériel biologique	11
2.5 Activités d'expertises	11
2.6 Activités de séquençage	12
2.7 Partage de séquences produites par les CNR.....	15
3. Activités de surveillance	16
3.1 Description du réseau de partenaires	16
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	18
Déclarations de cas de Leishmaniose faites au CNR	19
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux.....	23
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
Publications nationales	27
Publications internationales.....	27

Communications nationales	27
Communications internationales	27
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux ____	27
Pour le Laboratoire Coordonnateur	28
Coopération avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse	28
Pour le Laboratoire Associé.....	28
8. Programme d'activité pour les années suivantes _____	29
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR _____	32
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	32
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	32
1.3 Locaux et équipements	33
Locaux.....	33
Principaux équipements.....	34
1.4 Collections de matériel biologique	35
1.5 Démarche qualité du laboratoire	35
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR _____	36
2.1 Liste des techniques de référence	36
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR.....	36
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.
4. Annexe 4 : Recensement des collections de matériels biologiques (non destinées à être rendues publiques)	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 humain autochtones sont rares, souvent liés à une immunodépression. Les cas observés sont majoritairement importés, en particulier du Maghreb mais surtout de Guyane où chaque année environ 300 à 500 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 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. 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 2024

- Pour le CNR, déclaration par 45 centres de 246 cas (157 en 2023) dont 15% de formes viscérales et 85% de formes cutanées issues de 20 pays différents. Le Laboratoire de Cayenne a connu en 2024 une recrudescence très significative à la fois des demandes de diagnostic et du nombre de cas positifs par rapport à 2023 (N=142 vs. N=545 en 2023 et 2024 respectivement). Cette variation s'explique par une augmentation très nette des cas dus à *L. guyanensis* et dans une moindre mesure de *L. amazonensis*, évolution également observée par le Laboratoire coordonnateur pour les cas importés en France métropolitaine (N=18 vs. N=90). Cette augmentation est cependant à rapprocher de la variabilité interannuelle généralement observée dans les foyers de leishmaniose guyanais et l'année 2024 peut par exemple être rapprochée de 2020 où le nombre de cas observés est assez similaire (N=309 vs. N=435 pour 2020 et 2024 respectivement). Il n'y a pas de facteur évident pour expliquer ces variations en dehors de conditions climatiques annuelles favorables. Cette évolution est cependant à surveiller.
- 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, 1157 demandes de diagnostics moléculaire, 582 demandes d'identifications moléculaire (10 espèces différentes de *Leishmania* identifiées) et 293 sérologies. Le processus d'accréditation est en cours pour le Laboratoire Associé.
- Poursuite d'une coopération sur 5 ans avec l'Ecole 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 permet 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 réservoirs. 309 chiens ont été prélevés en 2024.
- D'un point de vue technique, 1) développement du séquençage NGS par approches complémentaires long-read (MinION) et short-read (Illumina) pour le séquençage de génomes entier 2) mise en place et évaluation de l'IFAT pour le diagnostic du réservoir canin.

EXECUTIVE SUMMARY

Highlights

Major Public Health Issues

- Leishmaniasis are present in around 100 countries worldwide, with high prevalence rates in human populations. Estimates from 2018 reported 600,000 to 1 million cases of cutaneous leishmaniasis and 50,000 to 90,000 cases of visceral leishmaniasis annually.
- In mainland France, the disease is primarily reported in dogs, while autochthonous human cases are rare and often linked to immunosuppression. Most observed cases are imported, particularly from the Maghreb, but especially from French Guiana, where approximately 200 cases are diagnosed each year. The complexity of diagnosing and treating leishmaniasis may require the support of a specialized center.

Key Focus Areas

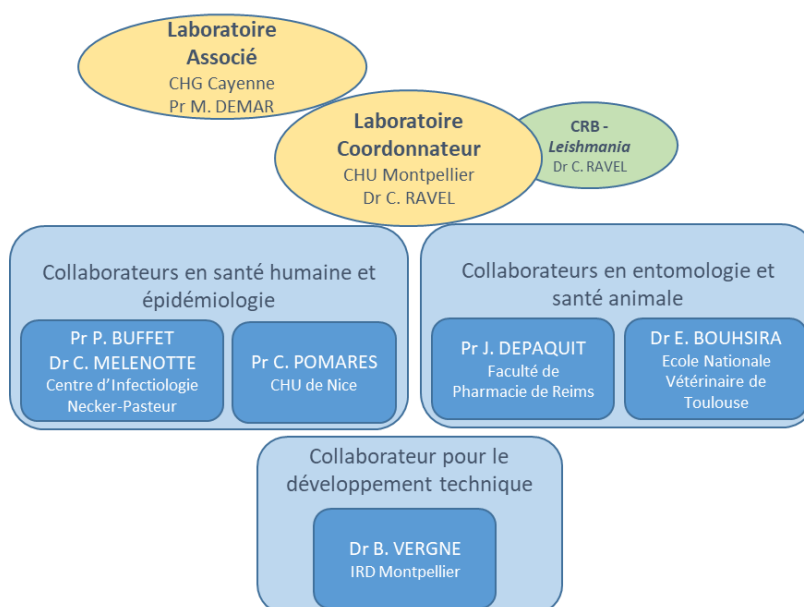
- The number of analysis requests sent to the National Reference Center (NRC) by dozens of centers across the country provides the NRC with a more comprehensive and accurate picture of both autochthonous and imported leishmaniasis cases. In return, the NRC establishes an increasingly dense network of correspondents, fostering advice and information sharing. The Decentralized Prevention and Care Centers play the same role in French Guiana.
- Implementation of surveys to assess canine endemicity in southern France.
- Development of NGS sequencing with diagnostic and typing goals.

Highlights of 2024

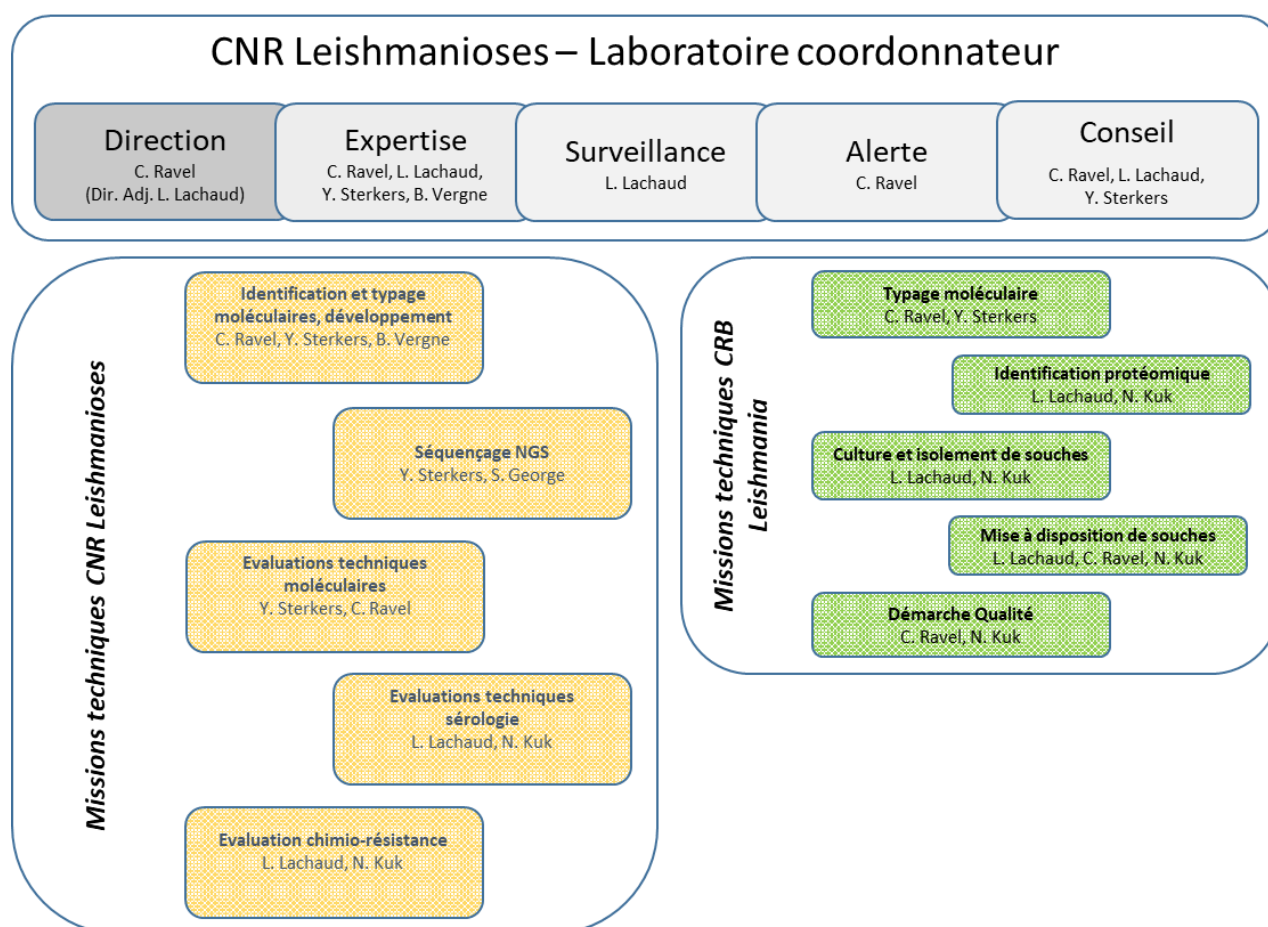
- The NRC received declarations from 45 centers of 246 cases (157 in 2023), including 15% visceral forms and 85% cutaneous forms originating from 20 different countries. The Laboratory in Cayenne experienced a very significant increase in both diagnostic requests and positive cases in 2024 compared to 2023 (N=142 vs. N=545 in 2023 and 2024, respectively). This increase is mainly due to a marked rise in cases caused by *L. guyanensis* and to a lesser extent *L. amazonensis*, a trend also observed by the coordinating laboratory for imported cases in mainland France (N=18 vs. N=90). However, this increase should be interpreted in the context of typical year-to-year variability observed in leishmaniasis hotspots in French Guiana, with 2024 being comparable to 2020 (N=309 vs. N=435, respectively). No obvious factors other than favorable annual climatic conditions have been identified to explain these variations, which nevertheless warrant monitoring.
- All analyses performed by the NRC are audited and accredited under ISO15189. At the request of around 60 centers, the NRC processed 1,157 molecular diagnostic requests, 582 molecular identification requests (10 different *Leishmania* species identified), and 293 serological tests. The accreditation process is ongoing for the Associated Laboratory.
- Continuation of a 5-year collaboration with the National Veterinary School of Toulouse to assess the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Cévennes region — an evaluation not conducted in mainland France for the past 20 years. This study helps estimate human exposure and assess the potential benefits of vaccination and insecticide protection in reservoir dog populations. In 2024, 309 dogs were sampled.
- From a technical perspective: 1) development of NGS sequencing through complementary long-read (MinION) and short-read (Illumina) approaches for whole-genome sequencing, 2) implementation and evaluation of IFAT for diagnosing the canine reservoir.

1. Missions et organisation du CNR

Organigrammes



Organigramme général du Laboratoire Coordonnateur et Centres collaborateurs associés

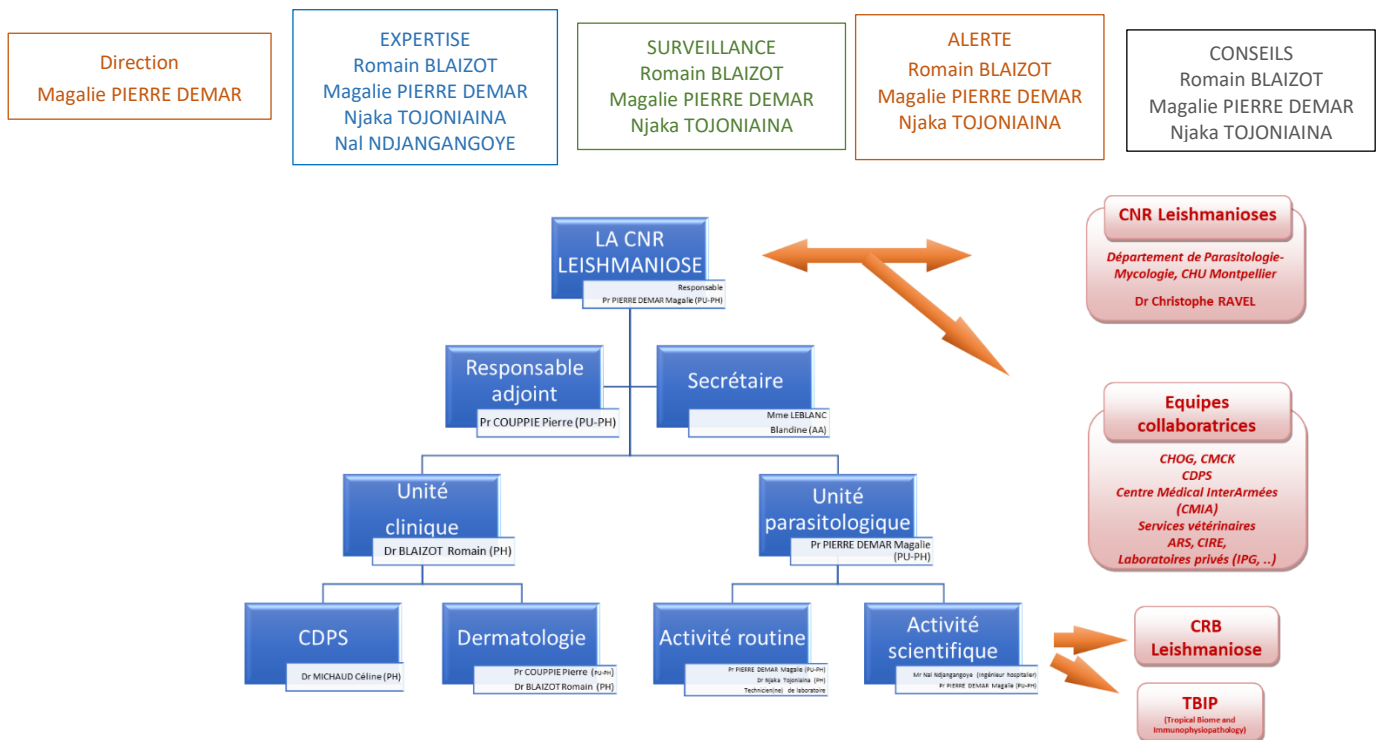


Organigramme interne du Laboratoire Coordonnateur et du CRB Leishmania associé

Pour le Laboratoire Coordonnateur, en 2024, un Centre collaborateurs « développement technique » a été formalisé. Il bénéficie de la contribution du Dr Baptiste Vergne (IRD, Montpellier). En parallèle, le Centre collaborateurs « Santé humaine et épidémiologie » a intégré, au côté du Pr Pierre Buffet, le Dr Cléa Melenotte du Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur pour son expertise en conseil thérapeutique. En interne, le Laboratoire Coordonnateur a recruté M. Simon George, Ingénieur chargé du développement NGS et financé sur la dotation.

Organigramme général du Laboratoire Associé (Guyane)

A Cayenne, l'organigramme du Laboratoire Associé est identique à celui présenté sur le bilan 2023. L'ingénieur du LA-CNR recruté en septembre 2023 a mené les activités du LA-CNR secondés par les techniciens du laboratoire de Parasito-Mycologie adossé au LA-CNR et la technicienne de recherche de l'équipe de recherche TBIP (Tropical Biome and immunophysiopathology) de l'Université de Guyane, cette dernière étant formée et habilitée sur les différentes techniques du LA-CNR Leishmaniose.



Mission et Organisation

Pas d'évolution des missions et de l'organisation du CNR en 2024. A partir de janvier 2025 une partie des activités du Laboratoire coordonnateur (diagnostic biologique en particulier) est relocalisée dans un nouveau bâtiment de Biologie Médicale situé sur le même campus. L'organisation du CRB Leishmania associé reste inchangée.

Démarche Qualité

En 2024, l'ensemble des analyses moléculaires (diagnostic PCR, identification moléculaire), sérologiques et morphologiques (diagnostic microscopique) utilisées par le CNR sont accréditées selon la Norme ISO 15189 au 21/07/2024.

Le CRB Leishmania est intégré au CRB du CHU de Montpellier qui est certifié selon la Norme ISO 20387. La thématique Leishmania ne fait pas partie des thématiques certifiées et nécessite une restructuration avant de demander à s'engager concrètement dans cette démarche. En particulier l'acquisition d'un logiciel de gestion informatique de la collection (MBioLIMS) fin 2024 et l'acquisition de containers neufs en 2025 devraient permettre d'avancer dans ce sens.

Pour le LA-CNR, le diagnostic morphologique de la leishmaniose (diagnostic microscopique) a été accrédité selon la norme ISO 15189 en 2022. La PCR et la culture de leishmaniose sont en attente de validation par le Cofrac : l'audit ayant eu lieu en septembre 2024 a concerné la présentation de l'ensemble des familles d'analyses du laboratoire du CH de Cayenne restantes pour extension, certains écarts sont en cours de gestion.

Depuis 2023, le LA-CNR transfère au CRB du CNR les souches de Leishmania sp. isolées. En 2024, 34 souches ont été transférées. Les ADN obtenus à partir de produits pathologiques ou à partir de souches de culture ont été cryoconservés à -80°C et sont conservés au sein du LA-CNR.

2. Activités d'expertise

2.1 Evolution des techniques

- Extraction d'ADN

En 2024 le Laboratoire Coordonnateur a développé une approche de séquençage long read par MinION qui a nécessité la mise au point de l'extraction d'ADN de très haut poids moléculaire (cf. § séquençage)

Depuis mi-2022, l'extraction des ADN est réalisée par l'automate d'extraction installé au niveau de la plate-forme de biologie moléculaire du laboratoire (QiaSymphony de DSP mini kit (Qiagen). 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 et validé et il est utilisé en routine par le personnel du LA-CNR.

- Amplification

Le LA-CNR a fait évoluer sa PCR maison leishmaniose en point final en utilisant la cible 3' untranslated region ou UTR d'HSP70 type I (JM Requena et al., 2012) qui après validation et comparaison est utilisée depuis janvier 2023. En lien avec l'équipe de recherche TBIP de l'université de Guyane, une qPCR maison utilisant une portion HSP-234 est en cours de validation.

- Séquençage

En 2024 une approche de caractérisation des génomes de *Leishmania* par séquençage long-read a été développée au Laboratoire Coordonnateur par S. George, Ingénieur recruté en janvier 2024.

L'objectif était de produire des génomes de référence complets de *Leishmania* sans s'appuyer sur des génomes déjà existants. La variabilité génomique des espèces au sein du genre *Leishmania* (en particulier nombre de chromosomes différents) oblige à produire une cartographie chromosomique par séquençage long-read (flow cell MinION, Oxford Nanopore) préalablement à un séquençage short-read (Illumina) destiné à corriger les erreurs.

Cette approche demande la production d'ADN de haut poids moléculaire et a permis d'obtenir par souche un million de reads avec une longueur moyenne supérieure à 30Kb, soit plus de 10Gb de données par génome, assemblés en 36 contigs qui correspondent aux 36 chromosomes attendus pour les espèces testées. Les erreurs de séquençage ont été recherchées par comparaison de ces séquences avec des séquences short reads obtenues en Illumina sur plateforme NextSeq 550 et par séquençage Sanger itératif sur différents loci.

Après une première étape de validation sur des souches de références dont la séquence et l'organisation génomique étaient connues cette approche doit permettre au CNR d'établir le génome de n'importe quelle espèce de *Leishmania* ou Trypanosomatidae proche sans génome de référence préexistant.

En 2024, le LA-CNR a relancé une activité de séquençage NGS avec la technique Nanopore (long read), le départ de l'ingénieur hospitalier en 2023 a suspendu les activités de WGS. En phase test, vingt-deux souches correspondant à 8 espèces différentes ont été identifiées par cette technologie en parallèle du séquençage Sanger. La concordance est de 100%. Le protocole est disponible. Toutefois, du fait du coût de revient de l'analyse (32 euros contre 8 euros pour Sanger) et au vu du nombre de diagnostic posé en 2024 (hausse de 123%), nous ne prévoyons pas de déployer l'approche NGS. Le LA-CNR va se concentrer sur les activités WGS en lien avec les activités du laboratoire coordonnateur afin de définir des marqueurs moléculaires discriminants pour l'identification des espèces.

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 Sanger (sous-traitance GenoScreen). Le laboratoire est actuellement en train de s'équiper d'outils de séquençage complémentaires avec l'Illumina pour le séquençage des short-reads (projet FEDER) et technologie Sanger (financement AAP ARS). Ces acquisitions s'intègrent dans un projet plus global à l'échelle de la Guyane avec le développement d'une plate-forme de séquençage portée par les équipes de recherche du territoire dont fait partie le LHUPM et TBIP avec mise à disposition de 2 bio-informaticiens dont 1 évoluant sur l'hôpital de Cayenne.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

- Comparaison de trousse/techniques sérologiques adaptées au dépistage chez le chien

En 2024, dans le cadre de la thèse vétérinaire de Maëli Favier (ENV Toulouse, dir. Dr E. Boushira) trois techniques ont été évaluées en parallèle : western-blot, ELISA (Bordier) et IFAT (maison), afin d'évaluer la séroprévalence dans le foyer cévenole (30 localités échantillonnées et 40 propriétaires, pour un total de 307 chiens). Concernant la technique IFAT, le travail a nécessité la mise au point de la technique, puis de son évaluation.

Cette étude a permis l'évaluation comparative de la séroprévalence, elle montre pour l'ELISA, l'IFAT et le WB des séroprévalences de 12.1%, 13.4% et 19.5% respectivement. Les performances de l'IFAT sont très satisfaisantes et elle a une concordance supérieure à 80% par rapport à l'ELISA. Le WB reste toujours la technique la plus sensible.

Le suivi longitudinal des chiens sur 4 ans montre une stabilité de la séroprévalence sur 4 ans. L'incidence annuelle est mesurée à 6.5%/an.

- Test kit PCR

Le LC-CNR n'a pas réalisé de comparaison de méthode commerciale en 2024. Il a été contacté par le laboratoire SERVIBIO pour l'évaluation d'un kit PCR Leishmaniose CERTEST VIASURE. L'analyse des performances est programmée en 2025.

Pour le LA-CNR-L, en lien avec l'équipe de recherche TBIP de l'université de Guyane, une qPCR maison utilisant une portion HSP70-234 (Graça, G.C. et al., 2012) est en cours de validation. Elle vient compléter la PCR maison utilisant la cible 3' untranslated region ou UTR d'HSP70 type I (JM Requena et al., 2012) validée en janvier 2023.

- Comparaison de sensibilité entre séquençage NGS et PCR

Le Laboratoire Coordonnateur poursuit une étude sur la sensibilité du NGS par rapport à la qPCR. L'approche par séquençage d'amplicons menée en 2023 n'a pas été poursuivie et les tests se sont concentrés en 2024 sur l'approche WGS. Les résultats ne semblent apporter de gain significatif de sensibilité.

Le LA-CNR-L a testé le séquençage NGS par amplicons par technique Nanopore de 22 souches correspondant à 8 espèces par rapport à la technique de PCR 3'UTR HSP utilisée en routine. Comme l'a mentionné le laboratoire coordonnateur, il n'y a aucun gain voire même un surcôt au vu de l'augmentation des diagnostics positifs en 2024.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

En 2024, le Laboratoire coordonnateur n'a pas transféré de technique vers d'autres Laboratoires.

Le LA-CNR poursuit sa collaboration avec les vétérinaires libéraux et de la DAAF (Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt) et réalise les diagnostics demandés pour les animaux domestiques et aussi des élevages de la Guyane.
Pour 2024, le LA-CNR n'a pas dispensé de formation.

2.4 Collections de matériel biologique

=> Cf Annexe 4 pour 2024

2.5 Activités d'expertises

Le nombre de demandes d'analyses liées à la leishmaniose adressées au Laboratoire Coordonnateur du CNR a augmenté en 2024. 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 établi un réseau de correspondants de plus en plus dense, favorisant ainsi conseils et transferts d'informations.

- Nombre de dossiers traités en biologie moléculaire (LC-CNR)

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Dossiers diagnostic moléculaire	731	984	864	934	853	923	1005	1157
Dossiers identification moléculaire	334	533	556	427	391	442	448	582
Total	1065	1517	1420	1361	1244	1365	1453	1739

- Nombre de diagnostics moléculaires (LC-CNR)

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Recherches leishmaniose par PCR	677	916	912	915	870	923	1029	1297
Recherches LV	378	481	531	554	534	601	618	876
Recherches LC	299	435	381	361	336	322	411	421

- Nombre de diagnostics sérologiques (LC-CNR)

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Sérologies leishmaniose	228	257	255	280	303	254	278	293

- Activité LA-CNR

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Nombre de demandes de LV	0	0	0	0	0	0	14	13
Nombre de demandes de LC (toutes techniques confondues)	344	256	202	686	414	192	329	752
Nombre de résultats positifs (toutes techniques confondues)	187	166	64	413	127	48	142	545
Nombre d'examens directs lus	159	210	155	503	26	6	15	498
Nombre de souches isolées	119	103	17	80	389	192	304	28
Nombre de demandes diagnostiques moléculaires	200	238	184	648	69	43	134	710
Identifications moléculaires	70	143	49	348	130	59	106	516
Nombre de cultures cellulaires techniques	303	236	76	238	26	3	15	133
Identifications Maldi-Toff	121	70	17	80	26	3	15	25

Pour le LA-CNR à Cayenne, on note en 2024 une augmentation très significative de l'activité par rapport à 2023 (cf. infra)

- Demandes => +123%
- Positif, toutes techniques confondues => +284%
- Diagnostic moléculaire => +134%
- Identification moléculaire => +285%

2.6 Activités de séquençage

■ Identification moléculaire

En 2024 le Laboratoire Coordonnateur a reçu 515 échantillons issus de 484 patients, de 85 centres ou laboratoires différents. Sur l'année, 167 identifications (séquençage Sanger) ont été rendues et ont permis de distinguer 10 espèces différentes.

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
L. major	48	86	73	36	20	25	15	28
L. guyanensis	16	48	14	66	42	8	18	90
L. infantum/L. donovani	19	18	33	26	31	30	22	19
L. braziliensis	9	17	8	9	20	10	17	7
L. tropica	6	4	5	6	6	8	13	7
L. naiffi	2	2	4	2	3	1	3	4
L. lainsoni	1	4		6		1	2	5
L. mexicana	1		3		3	2	4	2
L. amazonensis	1	2	3		1		1	5
L. baziliensis/L. peruviana			2					
L. aethiopica						1		
L. martiniquensis						1		1
L. panamensis		1						
	103	182	145	151	126	87	95	167

Le séquençage par technologie NGS n'est pas encore utilisé en routine et est traité dans le paragraphe « Evolution des techniques ».

■ Pour le LA-CNR :

Pour le LA-CNR, le séquençage de type Sanger est réalisé en sous-traitance (GenoScreen) pour les identifications d'espèces dans le cadre des leishmanioses cutanées. Sur l'année, 710 diagnostics moléculaires ont été réalisés avec 516 PCR positives ayant permis une identification d'espèce par technique Sanger

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
L. guyanensis	62	111	32	309	60	19	71	435
L. guyanensis / L. shawi	0	0	0	0	0	0	0	19
L. braziliensis	8	25	14	27	22	21	49	25
L. lainsoni	0	1	2	5	1	0	3	13
L. naiffi	0	2	-	2	1	1	2	2
L. amazonensis	0	4	2	6	2	2	9	22
L. martiniquensis	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	70	143	50	349	86	43	134	517
Indéterminée ou non réalisée	20	6	9	21	2	0	2	0

Pour 2024, on note une circulation très intense de *Leishmania* et principalement *L. guyanensis*. C'est la 1ère année où un tel niveau de circulation de cette parasitose est observé depuis au moins 10 ans.

Les espèces habituellement observées en Guyane sont retrouvées avec une prédominance, après *L. guyanensis*, de *L. braziliensis* et *L. amazonensis*.

Il est à noter que cette dernière a un niveau de circulation quasi identique à *L. braziliensis* ce qui n'était jusque-là pas rapporté.

La déclaration par une équipe brésilienne dans les bases de données de *L. shawi* permet de mettre en lumière cette espèce qui a probablement été sous-estimée et nécessite que nous fassions un focus sur l'amélioration de sa caractérisation.

<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. 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, de deux MiSeq et d'un Nextseq500. Ce Plateau est engagé dans un processus d'accréditation COFRAC, les utilisateurs sont habilités.</p> <p>Le LA-CNR a accès à une plate-forme de séquençage au sein du laboratoire d'analyses du CHC. Cette plate-forme dispose d'un secteur de biologie moléculaire (automates extraction, centrifugeuse, thermocycleurs) et d'un secteur de séquençage muni d'un bioanalyseur, d'un spectrofluorimètre, d'un Gridion et de matériel de laboratoire. Le laboratoire est actuellement en train de s'équiper d'outils de séquençage complémentaires avec l'Illumina pour le séquençage des short-reads (projet FEDER) et technologie Sanger (financement AAP ARS). Ces acquisitions s'intègrent dans un projet plus global à l'échelle de la Guyane avec le développement d'une plate-forme de séquençage portée par les équipes de recherche du territoire dont fait partie le LHUPM et TBIP avec mise à disposition de 2 bio-informaticiens dont 1 évoluant sur l'hôpital de Cayenne.</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). 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).</p> <p>Les données sont visualisées par l'outil interactif en ligne Pavian (https://github.com/fbreitwieser/pavian). Les reads classifiées sont vérifiées par BLASTN (Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T.L., 2009. BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics 10, 421. https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421).</p> <p>Le LA-CNR travaille en collaboration avec les équipes de Genoscreen à Lille. De même, nous collaborons avec un bioinformaticien en Italie. Dans le cadre du montage de la plateforme de séquençage sur la Guyane impliquant les laboratoires d'analyses de Biologie et les laboratoire de recherche, 2 bioinformaticiens doivent être recrutés dans le cadre de la structuration de la plate-forme de séquençage.</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 OUI, précisez pour quelles activités. Indiquez s'il s'agit d'investigations d'épidémies ou d'investigations intervenues dans le cadre de la surveillance.

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)

Le séquençage Sanger est analysé par BLAST en comparaison avec une base de données interne.
Les analyses NGS sont faites comme décrit supra.

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

Pas de séquençage dans un contexte d'épidémie à proprement parler, vu le nombre des centre demandeurs l'activité de séquençage en routine de prélèvements cliniques (#150/an en moyenne) devrait permettre de répondre à cet objectif.

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

Idem paragraphe précédent, en outre 85 souches ont été typées, soit en réception avant mise en collection (N=15) soit en envoi vers l'extérieur (N=69).

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

Pour le NGS, les données de séquençage sont stockées sur un serveur du CHU de Montpellier 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 données interne au CNR rassemblant environ 200 génotypes est utilisée en interne. Les séquences produites au quotidien sont archivées sur un disque NAS interne avec sauvegarde automatique.

Pour le LA-CNR, les séquences sont analysées sur place et archivées sur le réseau interne du CHC. Pour les séquences NGS et WGS (initiées en 2022), le stockage est effectué aussi sur le réseau du CHC.

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 2024. Environ 3600 séquences ont été soumises par le laboratoire coordonnateur au cours des années précédentes sur la base du NCBI.

Le LA-CNR a soumis les données de séquençage Sanger de *L. naiffi* dans les bases de données 2024.

3. Activités de surveillance

Éléments clefs de l'année en termes de surveillance

45 centres ont déclaré 246 cas dont 15% formes viscérales et 85% de formes cutanées issues de 20 pays différents.

Le nombre de cas déclarés en 2024 (N=246) est plus élevé qu'en 2023 (N=157) mais reste comparable à ce qui était observé jusqu'en 2020 (N=195 en 2020). Le nombre de centres déclarants n'a pas varié significativement (51 vs. 45). Cette évolution est néanmoins à surveiller.

La représentativité des déclarations est bonne pour les formes viscérales, plus difficile à évaluer pour les formes cutanées traitées en médecine de ville.

En 2024 progression très nette des cas de leishmaniose cutanée dus à *L. guyanensis* (et dans une moindre mesure *L. amazonensis*) à la fois en métropole et en Guyane, espèce dont les variations interannuelles (variations climatiques probables impactant les vecteurs) sont régulièrement observées. En métropole, les cas à *L. major* (#60/an jusqu'en 2020, 28 en 2024) restent les plus fréquents pour les patients provenant du Maghreb.

Il est à souligner que plusieurs espèces sont observées avec une intensité faible et cependant apparaissent régulièrement, indiquant que leurs foyers d'endémies (dont les vecteurs et les réservoirs sont souvent inconnus), même s'ils provoquent peu de contaminations humaines, restent actifs et stables.

C'est le cas *L. naiffi*, *L. lainsoni*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* et *L. panamensis* en Amérique du Sud ou de *L. aethiopica* en Afrique de l'Est.

Il faut noter aussi la détection régulière de *L. martiniquensis* (N=2 en 2024), espèce nouvelle, très divergente parmi les *Leishmania* et pour laquelle rien n'est connu.

38 leishmanioses viscérales dont 20 autochtones et une forme muqueuse ont été déclarées en 2024, sans évolution quantitative ni qualitative par rapport aux années précédentes. Pas de cas en Guyane.

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 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.

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

En 2024, les demandes de diagnostic pour des suspicions de leishmaniose viscérale représentent 50% des dossiers et sont à 88% externes au CHU de Montpellier. Elles portent à 35% sur un prélèvement de moelle osseuse et à 65% sur un prélèvement sanguin. 8.7% 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 (40% de PCR positives) représentent 50% des dossiers et proviennent à 88% 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 2024). 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 2024, le CNR a répondu à environ 150 appels téléphoniques et demandes par mail. Il faut y ajouter les demandes faites au Pr Pierre Buffet et au Dr Cléa Melenotte, 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 2024. 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 50 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 Dr Blaizot Romain, MCU-PH qui gère et coordonne 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 télémedecine 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 cutanéomuqueuses sur l'ensemble du territoire, CDPS et hôpitaux compris. L'ensemble des prélèvements à visée d'identification des espèces est centralisé par le LHUPM et le LA-CNR L. Pour 2024, le nombre de demandes a augmenté de façon très significative (+123%). C'est la 1ère année où un tel niveau de circulation du parasite sur le territoire est observé, le nombre de positif ayant augmenté de +285%

Le LA-CNR a créée dans le cadre d'une thèse de Sciences (Dr Blaizot) un réseau de correspondant sur le continent africain avec le Niger, le Mali, le Togo.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Pour 2024, pas d'évolution significative sur la provenance géographique des cas déclarés en Afrique, en Europe et en Asie, à l'exception peut-être de cas Afghans qui ne sont observés que depuis 3 ans ; on ne peut pas dire si existe un lien avec une augmentation de l'endémie ou une augmentation des déplacements.

Pour les cas de leishmaniose cutanée importés en métropole en provenance d'Amérique du Sud on observe un nombre plus important de cas Guyanais (N=99) qu'en 2022 et 2023 (N=15 et N=28 respectivement). Ces chiffres sont à rapprocher des niveaux d'endémie déclarés en Guyane. L'identification des espèces montre que cette recrudescence est attribuable à une augmentation des cas à *L. guyanensis* (N=18 en 2023, N=90 en 2024), même si des valeurs assez superposables ont été observées dans le passé (N=66 en 2020 par exemple).

Le Laboratoire Associé de Cayenne observe par rapport à 2023 une évolution similaire et aussi marquée, avec une augmentation très significative des cas sur la Guyane pour 2024. Le niveau de circulation est exceptionnel avec une augmentation du diagnostic positif de +285% et du diagnostic moléculaire de +134%. *L. guyanensis* reste très majoritaire avec 84% des cas. De façon similaire, *L. amazonensis* est identifiée dans 4% des cas ce qui est nettement plus élevé que les années précédentes. A l'inverse des années précédentes, les cas à *L. braziliensis* sont en décline (sous 10%) ainsi que les cas où.

Pour la leishmaniose viscérale, 38 cas déclarés en 2024, dont 5 sont autochtone, ce qui est comparable aux 5 années précédentes (moyenne=13.4). L'anamnèse retrouve en général un séjour en zone d'endémie (sud de la France, Espagne, Portugal, Italie). En dehors de thérapeutiques immunosuppressives qui révèlent la maladie, ces cas ne font pas apparaître de facteur de risque particulier, l'âge de survenue n'évolue pas. En 2024 le Laboratoire Coordonnateur a réalisé 293 sérologies pour 284 patients dans le cadre de recherche de leishmanioses viscérales. Douze sérologies positives ont été détectées (4.2%). Il n'y a pas statistiquement d'évolution significative.

Aucun cas de Leishmaniose viscérale observé en Guyane française.

Déclarations de cas de Leishmaniose faites au CNR

■ Nombre de déclarations de cas faites au CNR

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Forme cutanée	155	260	179	195	97	91	117	207
Forme cutanéomuqueuse	2	1	0	0	1	2	0	1
Forme viscérale	24	23	38	41	39	32	40	38
	181	284	217	236	137	125	157	246

En 2024, 45 déclarants (51 en 2023) dont 23 laboratoires de CHU, 16 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	2023	2024
Nombre de demandes	344	256	202	686	423	192	329	752
Nombre Leishmanioses cutanées	187	166	64	413	127	46	139	545
Nombre Leishmanioses cutanéomuqueuses	1	0	0	0	0	2	3	0
Nombre Leishmanioses viscérales	0	0	0	0	0	0	0	0

■ Origine géographique des cas de leishmaniose cutanée déclarés au CNR pour l'Afrique et l'Eurasie

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Algérie	7	11	5	2	1	3	2	4
Algérie/Tunisie/Maroc	15	38	19	18	5	10	7	7
Maroc	34	30	43	19	4	8	6	13
Maroc/Espagne					1			
Tunisie	11	30	29	26	10	9	6	17
	67	109	96	65	21	20	21	41
Burkina Faso						1		
Côte d'Ivoire			1					
Erythrée			1			1		
Ethiopie	1				1			
Guinée	1		2				1	
Mali	1	2	1	1		1		
Mauritanie	2	3	2	1		3	3	4
Mauritanie / Sénégal	1	1						1
Nigeria				1				
Nigeria/Maghreb			1					
Nigeria/Niger/Libye					1	1		
République de Centre Afrique						1		
Sénégal	5	3	8	1		4	2	9
Soudan		1						
	11	10	16	4	2	12	6	14
Afghanistan						1	4	6
Inde		1	1					
Sri Lanka							1	
Irak/Iran			1					
Iran	1	1	1			2		
Israël	1	1	3	1				1
Jordanie						1	1	
Palestine								1
Pakistan								2
Syrie				1				
Turquie		2			1		1	1
	2	5	6	2	1	4	7	11
Espagne	3	4	3	4	2	4	2	1
France/Espagne	1							
Grèce/Turquie				1			1	
Martinique								1
Italie	1				1		1	1
Portugal	1			1			1	1
	6	4	3	6	3	4	5	4

- Origine géographique des cas de leishmaniose cutanée recensés par le Laboratoire Associé pour l'Amérique du Sud et l'Amérique Centrale

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Amérique du Sud	1	1	13			3	7	1
Amérique du Sud/Centrale		11	2	15	7		2	2
Bolivie	2	3	1			2	1	
Brésil	3	4				1	1	
Brésil/Guyane Française	2	1						
Colombie		1					3	2
Costa Rica	2	3	2	1		1	7	1
Equateur					1	1	3	1
Equateur/Pérou/Bolivie			1					
Guatemala	1	3	2		1		1	
Guyane F	38	74	20	92	49	15	28	99
Guyane F./Brésil/Suriname				1				
Mexique/Guatemala						2		
Mexique/Costa Rica/Panama	1							
Mexique	2		2		1	1	4	
Panama		2	1					1
Pérou	3	6	1		1	2	4	1
Pérou/Salvador			1					
Venezuela					1			
Suriname	2	5	3					
Origine inconnue	12	18	9	9	9			
	69	132	58	118	70	25	61	108

- Origine géographique des cas en Guyane

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
CDPS	96 /185 (51,9%)	83 /166 (49%)	36 /64 (56,3%)	193 /413 (46,7%)	44 /127 (36%)	25 /48 (52%)	138 /329 (42%)	355 46%
Maroni	71	58	27	115	33	23	100	227
Oyapock	71	19	9	55	9	2	34	108
Arrière-pays (Cacao, Saint-Elie, Saul)	6	6	0	23	2	0	2	20
Non identifié	0	0	0	0	0	0	2	0
Hôpitaux	79 /185 (42,7%)	58 /166 (34%)	28 /64 (43,7%)	195 /413 (47,2%)	78 /127 (61%)	20 /48 (42%)	178 /329 (54%)	352 46%
SLM	31	1	2	34	16	4	25	66
CHC	48	57	26	161	62	16	152	284
CHK	0	0	0	0	0	0	1	2
CMA	10 (5,4%)	25 (15%)	0 /64 (0%)	14 /413 (3,4%)	5 /127 (3,9%)	3 /48 (6%)	11 /329 (3%)	58 8%
Autres	0	0	0	11 (Labos privés)	0	0	2 (UCSA)	0

En Guyane, les patients positifs sont répartis sur l'ensemble du territoire, avec autant de patients provenant de l'intérieur de la Guyane (majoritairement du Maroni) que vivant sur le littoral. Les militaires représentent en 2024, 7,6% du recrutement contre 3% en 2023. Il s'agit pour une grande partie de cas groupés de personnels exposés dans des camps d'entraînement.

■ Origine géographique des cas de leishmaniose viscérale déclarés au CNR

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Afrique subsaharienne	1		6	1	3	1	2	2
Amérique du Sud/Centrale/Antilles			1			2		
Maghreb	2	1	4	1		2	1	1
Proche-Orient	1		1	2	1	0		
Sud de l'Europe	5	4	4	9	5	6	5	6
Asie					1	1		
Non déterminée/multiple	8	10	8	13	14	7	8	1
	17	15	24	26	24	19	16	10

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

	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
Cas autochtones								
VIH	1	0	1	1	1	1	1	
Transplantation/greffe	0	0	0	1	0	3	0	
Traitement immunosuppresseur ou pathologie	1	0	4	0	3	0	1	2
Sans facteur de risque	4	8	6	8	9	6	12	13
Non spécifié	1	0	3	5	2	5	4	5
	7	8	14	15	15	15	18	20
Cas importés								
VIH	1	1	3	0	3	1	2	
Transplantation/greffe	0	0	1	0	0	0	1	1
Traitement immunosuppresseur ou pathologie	0	0	5	1	1	4	0	2
Sans facteur de risque	3	4	7	8	6	2	4	5
Non spécifié	5	0	2	4	0	1	1	1
	9	5	16	13	10	8	8	9
Origine géographique indéterminée								
VIH	0	2	2	0	1	1	1	1
Transplantation/greffe	0	0	0	0	1	1	0	
Traitement immunosuppresseur ou pathologie	0	0	1	1	3	2	1	
Sans facteur de risque	4	2	2	3	3	1	3	5
Non spécifié	4	6	3	9	5	4	3	3
	8	10	8	13	14	9	8	9
Total leishmanioses viscérales	24	23	38	41	39	32	34	38

Le LA-CNR L ne recense pas de cas de leishmaniose viscérale en 2024

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 en 2024.

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

En 2024, le CNR a poursuivi une étude initiée en 2023 et prévue pour 5 ans, destinée à évaluer la prévalence de la leishmaniose canine. Pour l'instant cette étude se limite aux 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 été 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 2024, la troisième enquête de terrain a été organisée avec l'aide de Maëli Favier, étudiante vétérinaire en cours de Thèse. Au total, 307 chiens ont été prélevés (192 en 2023 et 169 en 2022) et les données cliniques et épidémiologiques (biotope) enregistrées sur une aire géographique plus étendue que l'année passée. La vaccination éventuelle et les mesures préventives (insecticides externes, colliers) ont également été colligés.

L'ensemble des sérums des 309 chiens a été testé comparativement par différentes techniques sérologiques permettant à la fois d'évaluer la dynamique de l'infection par rapport aux données de l'année passée (72 chiens en suivi) et d'évaluer la séroprévalence entre 19.5% et 12.1% selon la technique utilisée (respectivement western-blot et ELISA). Ces résultats permettent de calculer une incidence de 6.5% dans la population des chiens suivis.

D'autre part il n'a pas été mis en évidence d'interférence avec la réponse sérologique associée à la vaccination par Letifend®.

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

4. Alertes

Le CNR n'a pas déclaré de cas groupés inattendus ou de phénomènes anormaux en 2024.

Le LA-CNR en collaboration avec le Centre Médical des Armées (CMIA) a géré en 2024 des cas groupés de leishmaniose cutanée à *L. guyanensis*. Dix-neuf légionnaires ont été atteints et pris en charge entre novembre 2024 à janvier 2025, tous venant d'un centre de formation de l'Armée de Terre, le CEFE (Centre d'Entraînement en Forêt Equatoriale). Les légionnaires ont bénéficié du protocole thérapeutique et du suivi médical mis en place par le service de Dermatologie. Il n'y a pas eu d'investigation environnementale.

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

- En 2024 le laboratoire coordonnateur a formé trois étudiants en 5^{ème} année de Pharmacie au diagnostic sérologique des leishmanioses (formation pratique sur 1 mois et production de résultats).
- 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.
- Depuis 2023, à l'initiative du Dr Romain Blaizot à Cayenne (Service de Dermatologie), ont été mises en place (visioconférences sur une base mensuelle) des réunions de concertation pluridisciplinaire (RCP) pour la prise en charge diagnostique et thérapeutiques de patients principalement guyanais. En plus des praticiens intéressés, ces réunions regroupent plusieurs membres du laboratoire coordonnateur et du laboratoire associé ainsi que des Internes en formation au CH de Cayenne.
- 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 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 télémedecine avec la possibilité d'envois de photos accompagnés d'une fiche de renseignements cliniques.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

En 2024 le CNR a été contacté par le Dr Adrian KRICHE (ARS) pour évaluer une éventuelle recrudescence de cas dans le sud de la France ; en lien avec un article de La Marseillaise signalant un "envahissement" par des phlébotomes dans le piémont cévenol.

D'autre part, le CNR a été contacté par le Dr Marie-Claire PATY (SpF) sur les cas humains déclarés depuis 2019 dans la région Bourgogne Franche-Comté ; en lien avec une enquête entomologique.

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, y compris par des conseils auprès des sociétés de chasse.

Le LA-CNR à Cayenne, en collaboration avec l'équipe de recherche universitaire TBIP (Tropical Biome and Immuno-Physiopathology), ex-EPaT (EA 3593) a participé en 2024 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

▪ Pour le Laboratoire Coordonnateur

- Etude de la séroprévalence de la leishmaniose canine dans les Cévennes et comparaisons de techniques sérologiques.

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 a été initiée par L. Lachaud 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 2024, comme noté plus haut, 309 chiens (192 en 2022) ont été prélevés (72 chiens en suivi). L'aire géographique étudiée a été plus étendue que l'année passée. Les données cliniques et épidémiologiques (biotope) sont enregistrées ainsi que la vaccination éventuelle et les mesures préventives (insecticides externes, colliers). La séroprévalence est mesurée entre 19.5% et 12.5% selon la technique utilisée (respectivement western-blot et ELISA). Ces résultats permettent de calculer une incidence de 6.5% dans la population des chiens suivis. D'autre part il n'a pas été mis en évidence d'interférence avec la réponse sérologique associée à la vaccination par Letifend®.

La technique de sérodiagnostic IFAT a été développée à l'occasion de cette thèse et testées comparativement à l'ELISA et au Western-blot.

Les résultats ont été intégrés à la thèse d'exercice de Maëli Favier soutenue à l'ENV de Toulouse en 2024.

▪ Pour le Laboratoire Associé

- Projet de séquençage WGS des souches circulantes en Guyane notamment sur des souches mal catégorisées à ce jour *L. shawi* et *L. lindenbergi*. 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. Cette activité se tiendra avec l'équipe de recherche TBIP et le LC-CNR à Montpellier.
- Projet d'étude sur les déterminants bioclimatiques pouvant expliquer les variations dans la circulation de la maladie en Guyane française. Il s'agit d'analyser au travers des données météorologiques les impacts potentiels des changements climatiques et d'évaluer leurs influences sur la répartition et la circulation du parasite en Guyane française.
- 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. Elle est réalisée avec l'équipe TBIP de l'Université de Guyane
- 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 a été rédigé et mené dans le cadre de la thèse de sciences du Dr Romain Blaizot et la collaboration se poursuit.

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

Publications nationales

- A. Méheut, C. Cordier, C. Couvreur, A. Rousseau, C. Ravel, F. Vuotto. Palatal lesion in a snoring traveler. Médecine et Maladies infectieuses Formation, Elsevier 2024.

Publications internationales

- Fatal case of imported visceral leishmaniasis in a dog caused by *Leishmania infantum* in French Guiana. Saout M, Pinheiro T, da Costa V, Savin M, Balmelle B, Lefort S, de Thoisy B, Matoute A, Hernandez M, Ravel C, Sterkers Y, Prévot G, Demar M, Ginouvès M. Vet Parasitol Reg Stud Reports. 2024;55:101108. doi: 10.1016/j.vprsr.2024.101108.
- Cutaneous leishmaniasis in sub-Saharan Africa: a systematic review of *Leishmania* species, vectors and reservoirs. Blaizot R, Pasquier G, Kone AK, Duvignaud A, Demar M. Parasit Vectors. 2024, 24;17(1):318. doi: 10.1186/s13071-024-06381-8.

Communications nationales

- C. Melenotte, C. Rouges, N. Dahane, F. Arieu, N. Saidani, B. Hoellinger, L. Lachaud, C. Ravel, P. Buffet. Leishmaniose viscérale multi-récurrente du sujet immunodéprimé : une impasse thérapeutique en émergence. 25èmes Journées Nationales d'Infectiologie, 12 au 14 juin 2024.

Communications internationales

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

Pour le Laboratoire Coordonnateur

Coopération avec l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Comme noté plus haut, à partir de 2022, un programme annuel 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 est 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 sont évalués.

La compétence vétérinaire indispensable est assurée par E. Bouhsira et les étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. En 2024, c'est Marco Guarino, étudiant vétérinaire en cours de Thèse qui a organisé et participé à une quatrième enquête de terrain dans différents chenils des Cévennes. Les demandes administratives de prélèvement ont été obtenues (agrément n° 2021070114534565).

Marco Guarino a pu bénéficier de l'environnement du laboratoire du CNR pour réaliser ses expérimentations.

Pour le Laboratoire Associé

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).

Le projet LabVet bénéficie d'un financement FEDER. L'objectif de ce projet étant de permettre la surveillance épidémiologique de ces zoonoses avec une optimisation de l'approche diagnostique.

A signaler qu'il n'existe pas de laboratoire vétérinaire départemental. Les prélèvements sont transmis dans différents laboratoires en métropole.

En janvier 2023, un cas de leishmaniose viscérale létale a été diagnostiquée par TBIP en lien avec le LA-CNR. L'alerte a été donnée auprès des instances ARS-Guyane et DAAF. Un article a été publié en 2024.

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 1700 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), des réunions de concertation pluridisciplinaire sont organisées sur une base mensuelle entre les cliniciens de Guyane, le LA-CNR et le LC-CNR.

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 le réseau ANOFEL 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 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 bio-banque.

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'Ecole 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 s'est engagé en 2023 dans le développement de techniques de détection, d'identification et de typage des souches par approche NGS et WGS. Le laboratoire dispose déjà des équipements (constitution des bibliothèques) requis et les séquenceurs sont disponibles sur un plateau technique de génétique. Un Ingénieur recruté en 2024 va continuer à contribuer au développement du séquençage long-read sur plateforme MinION analyser le génome d'espèces de *Leishmania* très éloignées des espèces habituellement étudiées (e.g. *L. colombiensis*, *L. deanei*, etc.).

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

Le CRB-*Leishmania* a acquis en décembre 2024 le logiciel Biobanking Modul-Bio, son paramétrage et sa mise en production se feront en 2025.

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 et qui va se prolonger sur plusieurs années. Le logiciel ModulBio et l'achat de 2 cryocuves en 2025 devrait aider à restructurer cette collection.

Le LA-CNR-L reprend son processus de cryoconservation des souches de *Leishmania* et des ADN et confirme le processus de duplication de la collection au niveau de Montpellier par l'envoi des souches ayant débuté en 2024

- 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. La caractérisation par NGS est maintenant intégrée dans cette capacité.

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, 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 sera maintenu. Le CNR a participé à la rédaction de recommandations thérapeutiques nationales et internationales et va 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.

Pour la prise en charge diagnostique, le chapitre 108 « Leishmaniose » du Référentiel en microbiologie Médicale (REMIC) 7^{ème} édition, 2022, rédigé par C. Pomares et C. Ravel et un article dans le n°556 de la Revue Francophone des Laboratoires en 2023, devraient clarifier la conduite 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, 5^{ème} année en 2026) dans les différents foyers du sud de la France, en particulier avec une extension à la région de Nice en 2025 (Pr C. Pomares). C'est un paramètre essentiel de l'exposition des populations humaines au parasite. 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'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

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 Santé publique France tout événement anormal concernant l'augmentation du nombre de cas, l'existence de cas groupés, ou une modification éventuelle des formes cliniques, en France métropolitaine, dans les DROM ou à l'étranger.

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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 a aujourd'hui la capacité d'identifier toutes les espèces de *Leishmania* et d'une façon générale tous les pathogènes du groupe des Trypanosomatidae, pouvant ainsi détecter et signaler l'émergence d'espèces atypiques ; ces recherches sont effectuées de façon systématique sur tous les prélèvements reçus.

En 2024, le laboratoire coordonnateur a traité environ 1700 demandes de diagnostic avec ou sans identification moléculaire et environ 280 demandes de sérologie, provenant de près d'une centaine d'établissements de santé sur le territoire national. Cette évolution résulte notamment 1) d'un transfert d'analyses rares ne justifiant pas une demande d'accréditation par des laboratoires hors zone d'endémie 2) d'un service rendu sur l'identification moléculaire de l'espèce qui contribue à la prise en charge thérapeutique 3) d'un service rendu par le conseil sur la prise en charge diagnostique et 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)	0,15	CHU-Université Montpellier
Lachaud Laurence	Médecin (PU-PH)	0,10	CHU-Université Montpellier
Sterkers Yvon	Médecin (PU-PH)	0,05	CHU-Université Montpellier
George Simon	Ingénieur	0.8	CHU Montpellier
Pépin Virginie	Secrétaire	0,05	CHU Montpellier
Douzou Sylvie	Technicienne	0.05	CHU Montpellier
Kuk Nada	Technicienne	0,10	Université Montpellier

S. George, Ingénieur recruté en janvier 2024. En formation pour acquérir les compétences en culture de souches. Ses compétences antérieures sont en particulier la préparation de bibliothèques NGS.

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
Nal Kennedy Ndjangangoye	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

Locaux

En 2024, le CNR était complètement hébergé dans les locaux du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, bâtiment indépendant de 1300m² répartis sur deux étages, sur le campus hospitalier Lapeyronie-La Colombière. Dans ces locaux étaient 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).

Un déménagement vers un bâtiment unique de biologie des activités de biologie médicale (dont le diagnostic sérologique et moléculaire de la leishmaniose) a eu lieu en février 2025. Le CRB *Leishmania* est maintenu dans le bâtiment initial, en attente de la réorganisation de la cryobanque (achat de cryocuves, réorganisation du stockage), à terme il pourrait rejoindre les locaux dédiés du CRB CHU Montpellier.

Dans le bâtiment initial, 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 réservé à la biologie moléculaire, partagé avec l'équipe de recherche.
- une pièce de 20m² avec sas pour la préparation de librairies pour le séquençage NGS.
- un bureau spécifique dévolu au CNR-L et une salle de réunion

Dans le nouveau bâtiment, le CNR-L dispose de locaux dédiés à la PCR et au séquençage Sanger avec 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.

- 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 par le CHU.

Principaux équipements.

Environnement P2 et P3 pour le CRB *Leishmania* et notamment accès aux équipements suivants :

- 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 parasites 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

=> Renseigner pour l'année 2024 l'annexe 4

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 31/07/2025), en particulier les lignes PM04 (PCR et identification moléculaire de *Leishmania*) et MG01 (sérologie leishmaniose).

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 participe annuellement à des contrôles externes de la qualité (diagnostic de leishmaniose par PCR, sérologie leishmaniose). Le CNR organise annuellement 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

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

2.1 Liste des techniques de référence

- 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 (type MLST)(accréditation Iso 15189 depuis 21/07/2023)
- 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
- Séquençage NGS sur MinION (flow cell MinION , Oxford Nanopore)

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, elles ont été reprises dans le n°556 de la Revue Francophone des Laboratoires publié en 2023.

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 par 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 cutanéomuqueuse doit en outre associer une sérologie et une recherche par PCR de parasites dans le sang (recherche d'une forme viscérale associée).