



HAL
open science

Leishmanioses à leishmania naiffi et lainsoni : caractéristiques cliniques et phylogénétiques

Océane Ducharme

► **To cite this version:**

Océane Ducharme. Leishmanioses à leishmania naiffi et lainsoni : caractéristiques cliniques et phylogénétiques. Dermatologie. 2019. dumas-02973106

HAL Id: dumas-02973106

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02973106>

Submitted on 20 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DES ANTILLES

2019

FACULTÉ DE MÉDECINE
HYACINTHE BASTARAUD

N°2019ANTI0484

**LEISHMANIOSES A *LEISHMANIA NAIFFI* ET *LAINSONI* :
CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET PHYLOGENETIQUES**

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement
A la Faculté de Médecine Hyacinthe BASTARAUD des Antilles Et
examinée par les Enseignants de ladite Faculté

Le 07 octobre 2019 Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE Par

Océane DUCHARME

Examineurs de la thèse :

M. Pierre COUPPIE

M. Mathieu NACHER

Mme Magalie DEMAR

Mme Emilie BAUBION

M. Romain BLAIZOT

Professeur en Médecine

Professeur en Médecine

Professeur en Médecine

Docteur en Médecine

Docteur en Médecine

Président

Juré

Jurée

Jurée

Directeur

LISTE DES ENSEIGNANTS

Le Président de l'Université des Antilles : Eustase JANKY
 Doyen de la Faculté de Médecine : Raymond CESAIRE
 Vice-Doyen de la Faculté de Médecine : Suzy DUFLO

| Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers | |
|--|--|
| Pascal BLANCHET | Chirurgie Urologique CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 13 95 |
| André-Pierre UZEL | Chirurgie Orthopédique et Traumatologie CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 14 66 |
| Pierre COUPPIE | Dermatologie CH de CAYENNE Tel : 05 94 39 53 39 |
| Thierry DAVID | Ophthalmologie CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 14 55 |
| Suzy DUFLO | ORL – Chirurgie Cervico-Faciale CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 93 46 16 |
| Eustase JANKY | Gynécologie-Obstétrique CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel 05 90 89 13 89 |
| François ROQUES | Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 22 71 |
| Jean ROUDIE | Chirurgie Digestive CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 21 01 - Tel : 05 96 55 22 71 |
| Jean-Louis ROUVILLAIN | Chirurgie Orthopédique CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 22 28 |
| André CABIE | Maladies Infectieuses CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 23 01 |
| Philippe CABRE | Neurologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 22 61 |
| Raymond CESAIRE | Bactériologie-Virologie-Hygiène option virologie |

| | |
|--|---|
| | CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 24 11 |
| Maryvonne DUEYMES-BODENES | Immunologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 24 24 |
| Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers <i>(Suite)</i> | |
| Annie LANNUZEL | Neurologie CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 14 13 |
| Louis JEHEL | Psychiatrie Adulte CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 20 44 |
| Mathieu NACHER | Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention CH de CAYENNE Tel : 05 94 93 50 24 |
| Magalie DEMAR - PIERRE | Parasitologie et Infectiologie CH de CAYENNE Tel : 05 94 39 53 09 |
| Vincent MOLINIE | Anatomie Cytologie Pathologique CHU de FORT DE FRANCE Tel : 05 96 55 20 85/55 23 50 |
| Philippe KADHEL | Gynécologie-Obstétrique CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 13 20 |
| Michel DEBANDT | Rhumatologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 23 52 |
| Karim FARID | Médecine Nucléaire CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 21 67 |
| Mehdi MEJDOUBI | Radiodiagnostic et imagerie Médicale CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 21 84 |
| Rémi NEVIERE | Physiologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 20 00 |
| Christian SAINTE-ROSE | Radiodiagnostic et imagerie Médicale CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 20 00 |
| Sébastien BREUREC | Bactériologie & Vénérologie CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 12 80 |
| Félix DJOSSOU | Maladies infectieuses et tropicales CH de CAYENNE Tel : 05 94 39 50 50 |
| Nicolas VENISSAC | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire CHU de FORT- DE - FRANCE |

| | |
|---|---|
| | Tel : 05 96 55 20 00 |
| Moustapha DRAMÉ | Épidémiologie, Économie de la Santé CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 20 00 |
| Christophe DELIGNY | Médecine Interne CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 22 55 |
| <u>Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers</u> <i>(Suite)</i> | |
| Narcisse ELENGA | Pédiatrie CH de CAYENNE Tel : 05 94 39 77 37 |
| Nadège CORDEL | Dermatologie & Vénérologie CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 10 10 |
| Harold MERLE | Ophthalmologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 20 00 |
| Pierre-Marie ROGER | Maladies infectieuses et tropicales CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 10 10 |
| Maturin TABUE TEGUO | Médecine interne : Gériatrie et Biologie du vieillissement CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 10 10 |

| | |
|---|---|
| <u>Professeur de Médecine Générale</u> | |
| Jeannie HELENE-PELAGE | Médecine Générale CHU de Pointe-à-Pitre / Cabinet libéral Tel : 05 90 84 44 40 |

| | |
|---|--|
| <u>Professeur Associé de Médecine Générale</u> | |
| Franciane GANE-TROPLENT | Médecine générale Cabinet libéral les Abymes Tel : 05 90 20 39 37 |

| | |
|---|---|
| <u>Maître de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers</u> | |
| Jocelyn INAMO | Cardiologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 23 72 - Fax : 05 96 75 84 38 |
| Fritz-Line VELAYOUDOM épouse CEPHISE | Endocrinologie CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 13 03 |
| Marie-Laure LALANNE-MISTRIH | Nutrition CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 13 00 |
| Moana GELU-SIMEON | Gastroentérologie hépatologie CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 10 10 |

| | |
|---|--|
| Véronique BACCINI | Hématologie CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 10 10 |
| <u>Maître de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers</u> <i>(Suite)</i> | |
| Laurent BRUREAU | Urologie CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 10 10 |
| Clarisse JOACHIM-CONTARET | Epidémiologie, économie de la santé et prévention CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 20 00 |

| | |
|--|--------------------------|
| <u>Maître de Conférence des Université de Médecine Générale</u> | |
| Philippe CARRERE | Médecine générale |

| | |
|---|--------------------------|
| <u>Maître de Conférence Associé de Médecine Générale</u> | |
| Franck MASSE | Médecine générale |

| | |
|---|--|
| <u>Chefs de Clinique des Universités - Assistants des Hôpitaux</u> | |
| BROUZENG-LACOUSTILLE Charlotte | Endocrinologie CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 1 010 |
| BUTORI Pauline | Ophthalmologie CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 14 50 / 0690 00 93 95 |
| CHAUMONT Gilles | Neurologie CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 10 10 |
| CHEVALLIER Ludivine | Chirurgie Digestive et Viscérale CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 00 |
| DUDOUIT Sylvain | Chirurgie Orthopédique CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 00 |
| DURTETTE Charlotte | Médecine interne CHU de Martinique Tél. : 0596 55 22 55 |
| HENNO Florent | Anesthésie-Réanimation CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 10 10 |
| HUYGHUES DES ETAGES Gunther | ORL/Chirurgie maxillo faciale CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 14 60 |
| JEREMIE Jean-Marc | Psychiatrie |

| | |
|---|---|
| | CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 44 |
| LEFEVRE Benjamin | Maladies infectieuses CHU de Pointe-à-Pitre Tel : 05 90 89 10 10 |
| MONFORT Astrid | Cardiologie CHU de Martinique Tél. : 0596 55 23 72 |
| PARSEMAIN Aurélie | ORL/Chirurgie maxillo faciale CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 14 60 |
| PASQUIER Jérémie | Maladies infectieuses et tropicales CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 00 |
| <u>Chefs de Clinique des Universités - Assistants des Hôpitaux</u> <i>(Suite)</i> | |
| PERROT Emmanuelle | Urologie CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 10 10 |
| POUY Sébastien | Cardiologie CHU de Martinique Tél. : 0596 55 23 72 |
| RENARD Guillaume | Chirurgie Orthopédique CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 00 |
| ROLLE Amélie | Réanimation CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 10 10 |
| SAINTE-ROSE Vincent | Parasitologie CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 00 |
| SYLVESTRE Emmanuelle | Maladies Infectieuses CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 00 |
| TRAMIER Ambre | Gynécologie-Obstétrique CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 19 89 |
| <u>Assistants des Hôpitaux Universitaires</u> | |
| BLAIZOT Romain | Dermatologie CH de CAYENNE Tel : 05 94 39 53 39 |

| | |
|---|---|
| <u>Chefs de Clinique des Universités – Médecine Générale</u> | |
| BONIFAY Timothée | Médecine Générale CHU de Cayenne, Croix Rouge Tél. : 0594 39 50 50 |
| CARPIN Jamila | Médecine Générale Cabinet du Dr GANE-TROPLENT Tél. : 0590 20 39 37 |

| | |
|------------------------------------|---|
| NIEMETZKI Florence _____ | Médecine Générale CH « Andrée Rosemon » de Cayenne/Cabinet Tél. : 05 94 39 50 50 poste 59 28 |
| PLACIDE Axiane _____ | Médecine Générale CHU de Martinique, Cabinet Tél. : 05 90 72 12 04 |

| | |
|---|--|
| Professeurs EMERITES (au 31/08/2019) | |
| Serge ARFI _____ | Médecine interne CHU de FORT- DE – France Tel : 05 96 55 22 55 - Fax : 05 96 75 84 45 |
| Georges JEAN-BAPTISTE _____ | Rhumatologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 23 52 - Fax : 05 96 75 84 44 |

REMERCIEMENTS

Au président du jury,

Monsieur le Professeur Pierre COUPPIE,

Cher professeur, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de présider ma thèse. Votre passion pour la dermatologie infectieuse est contagieuse, je garde un très bon souvenir de mon stage dans votre service. Votre bienveillance envers les internes vous honore.

Par ces mots je vous témoigne l'assurance de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Aux membres du jury,

Monsieur le Professeur Mathieu NACHER,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger mon travail et je vous en remercie. Merci pour l'attention et le temps que vous avez consacré à cette thèse. Soyez assuré de mon profond respect et de toute ma gratitude.

Madame le Professeur Magalie DEMAR,

Chère Professeur, merci pour votre aide précieuse dans la réalisation de ma thèse. Vous me faites également l'honneur de juger mon travail. Veuillez croire en l'expression de ma plus haute considération.

Madame le Docteur Emilie BAUBION,

Chère Emilie, il y a des personnes qui font l'unanimité, tu en fais partie. Merci pour ta bienveillance, ta bonne humeur et ton accueil durant mes semestres dans ton service. J'ai particulièrement apprécié travailler avec toi. Trouve ici l'expression de mon profond respect et de ma sincère gratitude.

A mon directeur de thèse,

Monsieur le Docteur Romain BLAIZOT,

Merci Romain de ta confiance pour mener à bien ce travail de thèse et de m'avoir accompagnée tout au long de sa réalisation. Merci également pour ta gentillesse, ton humour et la bienveillance que tu as eu à notre égard pendant notre semestre. Je garde un souvenir ému de mon passage en Guyane.

A l'équipe de Dermatologie de Martinique,

Au Docteur Emmanuelle AMAZAN,

Chère Emmanuelle, j'admire ton dynamisme et ta rigueur, c'est avec un grand plaisir que je finis mon internat à tes côtés. Trouve ici l'expression de mon plus grand respect.

Au Docteur Gladys FERRATI-FIDELIN,

Gladys merci pour l'enseignement de tes connaissances et pour ta disponibilité.

Au Docteur Nicola BRIAND,

J'admire ta douceur et ton calme à tout épreuve.

Au Docteur Louise MUGUET-GUENOT,

Tu seras la dernière assistante de mon internat et pas des moindres ! J'ai particulièrement apprécié travailler avec toi. Ta curiosité, ta gentillesse et ton implication sont pour moi un exemple. J'espère que l'on se reverra aux JDP ou ailleurs ;)

Sans oublier Sophie, Sandra, Danièle, Rebecca, Claire et Marie-Renée, merci pour votre bienveillance et votre gentillesse.

A mes Professeurs et chefs de dermatologie de Bordeaux,

Madame le Professeur Marie BEYLOT-BARRY,

Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance durant mon passage à Bordeaux. L'étendue de vos connaissances en dermatologie, votre implication pour la formation des internes, votre dynamisme et votre bienveillance auprès des patients suscitent toute mon admiration. Je suis ravie de pouvoir continuer à travailler avec vous.

Madame le Professeur Anne PHAM-LEDARD,

Chère Lien, j'ai beaucoup apprécié travailler à tes côtés. Je te remercie pour tout ce que tu m'as enseigné. Ta rigueur scientifique et ton implication auprès des patients m'impressionnent.

Madame le Docteur Brigitte MILPIED,

Chère Bribri, Je garde un souvenir ému des réunions dans ton bureau avec Anne et Victoire. Merci pour tout : ton enseignement passionné, ta disponibilité, ta bonne humeur et ton humour. Il me tarde de retravailler avec toi.

A tous les autres : **Madame le Professeur Marie-Sylvie Doutre, Monsieur le Professeur Alain Taieb, Monsieur le Professeur Julien Seneschal, Monsieur le Docteur Olivier Cogrel, Madame le Docteur Caroline Dutriaux, Madame le Docteur Sorilla Prey,** je vous remercie pour vos enseignements lors de mes semestres à Bordeaux.

Léa, mon semestre à 35-36 n'aurait pas été le même sans toi, tu auras été notre rayon de soleil quotidien. **Emilie, Anne-Sophie, Agathe**, merci de m'avoir si bien accompagnée durant mes stages.

A l'équipe de l'U1053,

Monsieur le Professeur Jean-Philippe Merlio,

Merci pour votre accueil dans votre laboratoire durant mon année de master 2. J'admire l'étendue de vos connaissances et la rapidité de vos réflexions. J'espère pouvoir revenir travailler avec vous.

Audrey, merci de m'avoir si bien encadrée durant cette année de M2, si elle s'est aussi bien passée, c'est bien grâce à toi. J'ai aimé travailler avec toi, nos discussions, nos trajets pour nous rendre à Haut-Lévêque. A très vite sur Bordeaux.

Martina, Lamia, Sandrine, vous avez égayé tous mes midis et pauses café.

Julie, mon binôme de master 2, merci pour ton soutien sans faille durant cette année. Je te souhaite plein de bonheur à Paris.

A mes co-internes et amis,

Julie, depuis notre 2^e semestre où on était des bébés internes, en passant par 35-36 à Bordeaux et en finissant en beauté en Martinique ... Tous ces bons moments partagés avec toi à l'hôpital et ailleurs (j'ai le souvenir de belles soirées ;)). Pourvu que ça dure ! A **Nico** et à **Ulysse** bien sûr, je vous souhaite plein de bonheur à tous les 3.

Thib -Thib et Marion (Chat) bien sûr ! Je ne savais pas s'il fallait que je vous place dans les « co-internes », « amis » ou « collocs », tellement on en a fait des choses ensemble ... Merci de faire partie de notre vie. Sans oublier **Tom**

Thomas, mon partenaire de thèse et de semi-marathon, on aura réussi les deux ! **Anne Laure et Carl** pour votre bonne humeur. **Perrine**, équipe de choc en Guyane, on aura mené à bien nos missions « talkie-walkie avis ». Merci pour ta bonne humeur !

Mon Annou, quelle rencontre ... mon petit coup de cœur (en même temps normal pour 2 cancers ;)). J'ai hâte de reprendre nos soirées à discuter autour d'un verre de vin à Périgueux ou à Bordeaux. Et qu'aurais été mon stage à 6A sans toi ma **Vivou**, avant même de se connaître, on se ressemblait déjà. J'ai hâte de reprendre nos fous rires et nos apéros chez Lionel. Je te souhaite plein de bonheur en pays Libournais.

Severine, de débiter mon post internat à tes côtés me rassure. C'est toujours un plaisir de passer du temps avec toi.

A mes amis de Brest et d'ailleurs,

Pauline et Julie, mes BFF, mon trio, mes amours. J'ai tellement de souvenir à vos côtés, la P1, l'externat, les voyages, les soirées, les discussions autour d'un thé. Po, notre super team de 4 au Laos. Ju, ma pince préférée, t'avoir à la maison en Martinique m'a rappelé de très bons souvenirs. A nos prochaines aventures, à Brest, Bordeaux ou ailleurs.

Charlotte, depuis ce fameux stage de FFI en Guadeloupe on ne s'est pas quittée. J'adore toutes nos conversions, nos analyses (et que des bonnes hein!). Tellement de bons souvenirs ! On aura passé le cap des 30 ans ensemble avec brio ! Rendez-vous pour tous les autres caps de nos vies :). Et bien sûr merci **Alex'** pour ces 6 mois de GuyGuy, pour tous tes petits plats, tes caïpi' si bien préparées, nos soirées à 4 !

Mam's, à très vite sur Brest pour se raconter nos voyages, **Charlotte**, c'est toujours un plaisir de te voir, il me tarde que tu me montres ta nouvelle maison et **Servane** pour ton humour, un p'tit godet en rentrant j'espère.

Thomas, ami et beau-frère et ce n'est pas rien. Que des bons souvenirs de tes passages en Martinique ! A nos parties de tarot endiablés ! A **Julie** pour ta douceur !

Aux garçons, Tang, Bapt, Xav, Elou, Laurent, Ben, François, Etienne, à très vite sur Brest pour trinquer !

Hugo, il s'en est passé des choses depuis Coat-Mez et les cours de latin de Mme Hamelin, que de bons souvenirs. Ces 6 mois auront été géniaux, merci Coach !

Delph' merci pour tous ces bons moments passés à bordeaux, pour nos apéros karaoké improvisés.

A tous mes collocs,

Léandre et Maxime, ne t'inquiète pas Maxime j'ai juste mis par ordre alphabétique ;). On aura bien rigolé pendant ses 6 mois, c'était SUPER ! A nos parties de jeux, apéros, soirées films toujours très bien choisis. Merci pour tous ces fous rires ! Et vive les schtroumf qui pique !

Bastien et Juliette, que de bons souvenirs à Schoelcher, puis à Bordeaux, dans les Pyrénées ou à l'île de Ré, grave buen mec ! Gardez-nous une chambre d'amis au chaud ;)

Amélie, Adrien, Anaïs, Delphine, merci pour tous ces bons moments.

A ma Popo d'amour, alors toi, ça doit faire au moins 20 ans que l'on se connaît, et on est toujours là. On a fait les 400 coups ensemble à l'île de Ré et ailleurs ;). Je suis contente que tu aies trouvé ton Roro, on a tous besoin d'un Roro dans sa vie. A très vite

A ma famille,

Papou, merci pour tous ces bons moments passés, je sais que ce n'est toujours facile pour les Ducharme de dire ce que l'on ressent, mais merci d'avoir fait tout ce chemin pour ma thèse (et pour faire du bateau aussi ;)). Je suis très fière de t'avoir comme papa. Merci à **Dorothee** qui te rend heureux au quotidien.

Moumou, merci pour ton amour inconditionnel et ton soutien indéfectible. Merci pour tous ces coups de fils où je te raconte ma vie avec beaucoup de détails, merci de toujours me faire croire que c'est très intéressant. Sans toi je n'y serais jamais arrivée alors merci pour tout. Bien sur merci à **Philou**, pour m'avoir appris à être organisée, à anticiper ;), et pour tous les bons moments passés en Nouvelle-Calédonie, au Relecq, en Corse, en Martinique ...

A mon Théo/Toto, j'ai eu de la chance d'avoir un frère qui se laisse déguiser, qui me laisse dormir dans son lit après 7 jours sans m'être lavée, piquer dans son assiette avec mes doigts sales. Grandir avec toi n'a été que du bonheur et des souvenirs merveilleux. **A Clémence**, pour ta gentillesse et de toujours m'accueillir chez vous avec le sourire.

A mes grands parents, qui comptent beaucoup pour moi

A Martine, Thierry et Clara je suis ravie de faire un peu partie de votre famille.

Romain, merci pour tout l'amour et le soutien que tu m'as apporté depuis toutes ses années.

Sans toi je n'y serai pas arrivée. Pour tout cela et bien plus encore: Merci

A toutes ces belles années qui nous attendent encore,

Sans oublier Chachou,

Et à tous les autres qui ont su rendre mon internat plus doux ...

Aux patients,

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| RESUME | 15 |
| ABSTRACT | 16 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 17 |
| <u>PARTIE I: INTRODUCTION, REVUE DE LA LITTERATURE : LEISHMANIOSES CUTANEEES EN GUYANE FRANCAISE</u> | 18 |
| 1) GUYANE, PARTICULARITES TERRITORIALES | 18 |
| A) GENERALITES | 18 |
| B) ORGANISATION DES SOINS | 19 |
| 2) LES LEISHMANIOSES EN GUYANE FRANCAISE : GENERALITES ET ASPECTS BIOLOGIQUES | 21 |
| A) GENERALITES | 21 |
| B) CYCLE PARASITAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE | 21 |
| C) VECTEURS ET RESERVOIRS | 22 |
| 3) IDENTIFICATION, TAXONOMIE ET CLASSIFICATION | 24 |
| 4) REPARTITION GEOGRAPHIE ET ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES | 26 |
| A) GENERALITES | 26 |
| B) EN GUYANE FRANÇAISE | 27 |
| 5) ASPECTS CLINIQUES DES LEISHMANIOSES EN GUYANE | 29 |
| A) LEISHMANIOSE CUTANEE LOCALISEE | 30 |
| B) LEISHMANIOSE CUTANEE DIFFUSE ANERGIQUE ET LEISHMANIOSE CUTANEE DISSEMINEE | 30 |
| C) LEISHMANIOSE CUTANEO-MUQUEUSE | 31 |
| 6) METHODES D'IDENTIFICATION D'ESPECES DISPONIBLES AU CENTRE HOSPITALIER DE CAYENNE | 32 |
| A) PCR-RFLP | 32 |
| B) SPECTROMETRIE DE MASSE, MALDI-TOF | 33 |
| C) « BARCODING » OU SEQUENÇAGE D'ADN | 33 |
| 7) TRAITEMENTS REALISES DANS LE SERVICE DE DERMATOLOGIE DU CENTRE HOSPITALIER DE CAYENNE | 34 |
| 8) LEISHMANIOSES A <i>LEISHMANIA VIANNA NAIFFI</i> ET <i>LAINSONI</i>: QUE SAIT-ON ? | 35 |

| | |
|--|-----------|
| A) LEISHMANIOSE CUTANEE A <i>LEISHMANIA VIANNA NAIFFI</i> | 35 |
| B) LEISHMANIOSE CUTANEE A <i>LEISHMANIA VIANNIA LAINSONI</i> | 37 |
| I. GENERALITES ET EPIDEMIOLOGIE | 37 |
| II. VECTEURS ET RESERVOIRS IDENTIFIES | 37 |
| III. FORME CLINIQUE ET ASPECT THERAPEUTIQUE: | 37 |
| 9) OBJECTIFS DE L'ETUDE | 38 |
| 10) REFERENCES | 39 |
| <u>PARTIE II: ETUDE CLINIQUE ET PHYLOGENETIQUE</u> | 46 |
| <u>ANNEXES</u> | 75 |

RESUME

Contexte: En Guyane française, cinq espèces sont à l'origine de leishmanioses cutanées (LC) : *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni* et *Leishmania (Viannia) naiffi*. Bien que les infections à *Leishmania (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* et *L. (L.) amazonensis* aient été largement décrites, peu de données cliniques et génétiques existent sur *L. (V.) lainsoni* et *L. (V.) naiffi*.

Méthodologie: Nous avons étudié les caractéristiques cliniques et épidémiologiques de tous les cas de LC à *L. (V.) naiffi* et à *L. (V.) lainsoni* diagnostiqués en Guyane française entre 2003 et 2019. L'analyse phylogénétique a été réalisée par séquençage d'une portion des gènes *HSP70* et *cyt b*.

Résultats: Cinq cas de *L. (V.) naiffi* et 25 cas de *L. (V.) lainsoni* ont été inclus. Les patients infectés par *L. (V.) lainsoni* étaient significativement plus souvent nés au Brésil qu'en territoire français ($p=0,005$) et étaient généralement des orpailleurs, tandis que ce n'était le cas pour aucun des cinq patients infectés par *L. (V.) naiffi*. Le site de contamination probable était exclusivement la région côtière (100%) pour *L. (V.) naiffi* et principalement la région du Maroni pour *L. (V.) lainsoni* (60%) ($p=0,001$). *L. (V.) lainsoni* présentait un nombre élevé de cas pédiatriques ($n=5$). Un tableau clinique peu bruyant était observé pour tous les cas de *L. (V.) naiffi*. L'analyse phylogénétique a révélé différents génotypes au sein de *L. (V.) naiffi* et de *L. (V.) lainsoni*, mais aucune association entre les caractéristiques phylogénétiques et cliniques n'a été observée.

Discussion: Nos données suggèrent des caractéristiques socio-épidémiologiques distinctes pour ces deux espèces de *Leishmania*. Les patients semblent se contaminer plutôt lors des activités de loisirs pour *L. (V.) naiffi*, en région côtière plus anthropisée, tandis que *L. (V.) lainsoni* partage des caractéristiques communes avec *L. (V.) guyanensis* et *brasiliensis* et semble s'acquérir pendant les activités professionnelles dans des régions forestières primaires. L'analyse phylogénétique a permis de mieux comprendre la complexité de ces deux espèces de leishmanioses, en apportant des informations sur la variabilité génétique intra-espèces et sur la distribution de ces génotypes au niveau géographique.

ABSTRACT

Background: In French Guiana, five species are associated with cutaneous leishmaniasis (CL): *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) lainsoni* and *Leishmania (V.) naiffi*. Though infections with *Leishmania (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* have been extensively described, there are few available clinical and genetic data on *L. (V.) lainsoni* and *L. (V.) naiffi*.

Methodology: We determined the clinical and epidemiological features of all cases of CL due to *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni* diagnosed in French Guiana between 2003 and 2019. Phylogenetic analysis was performed by sequencing a portion of *HSP70* and *cyt b* genes.

Principal findings: Five cases of *L. naiffi* and 25 cases of *L. lainsoni* were reported. Patients infected by *L. (V.) lainsoni* were more frequently born in Brazil than in French territory ($p=0,005$) and were usually infected on gold camps, mostly along the Maroni river (60%) ($p=0.001$), while *L. naiffi* was observed in French patients infected on the coast (100%). A high number of pediatric cases ($n=5$; %) was observed for *L. (V.) lainsoni*. A mild clinical course was observed for all cases of *L. (V.) naiffi*. Phylogenetic analysis revealed different geographical clusters within *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni* but no association were found between phylogenetic and clinical features.

Discussion: Our data suggest distinct socio-epidemiological features for these two *Leishmania* species. Patients seem to get infected with *L. (V.) naiffi* during leisure activities in anthropized coastal areas, while *L. (V.) lainsoni* shares common features with *L. (V.) guyanensis* and *brasiliensis* and seems to be acquired during professional activities in primary forest regions. Phylogenetic analysis has provided information on the intraspecific genetic variability of *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni* and how these genotypes are distributed at the geographic level.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

En français:

ADN: Acide désoxyribonucléique

LC: Leishmaniose cutanée

LCD: Leishmaniose cutanée disséminée

LCDA: Leishmaniose cutanée diffuse anergique

LCL: Leishmaniose cutanée localisée

LCM: Leishmaniose cutanéomuqueuse.

LV: Leishmaniose viscérale

MALDI TOF: Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight

MLEE: Multilocus enzyme electrophoresis

PCR: Polymerase chain reaction

PCR-RFLP: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

En anglais:

CL: Cutaneous leishmaniasis

Cyt b: Cytochrome B

DNA: Deoxyribonucleic acid

Hd: Haplotype diversity

HSP70: Heat-shock protein 70

MALDI-TOF: Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight

MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis

MCL: Mucocutaneous leishmaniasis

PCR-RFLP: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism

RNA: Ribonucleic acid

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

π : Nucleotide diversity

PARTIE I: INTRODUCTION, REVUE DE LA LITTÉRATURE :

LEISHMANIOSES CUTANÉES EN GUYANE FRANÇAISE

1) GUYANE, PARTICULARITÉS TERRITORIALES

a) Généralités

La Guyane est un département-région d'Outre-mer de 83 846 km² situé en Amérique du sud. À l'ouest, le fleuve Maroni qui sépare la Guyane du Suriname, et à l'est, l'Oyapock, entre le Brésil et la Guyane, sont les frontières naturelles de ce territoire inséré dans le plateau des Guyanes (**Figure 1**). Son territoire est recouvert de 98% de forêt tropicale humide. Les pourcentages restants correspondent au littoral qui borde l'Océan Atlantique sur 320 km et qui se compose de marais, savanes, lagunes et mangroves.

Au 1^{er} janvier 2016, la Guyane compte officiellement 269 352 habitants, soit 31 803 personnes de plus qu'en 2011 (1). C'est la plus forte croissance démographique de France, derrière Mayotte. L'Ouest Guyanais est le territoire où la population augmente le plus vite devant l'agglomération de Cayenne. Paradoxalement, la Guyane est une région faiblement peuplée avec en moyenne 3.13 habitants/km², la population se regroupant principalement sur le secteur littoral. Différentes communautés sont présentes sur le territoire guyanais, les communautés créole guyanaise, amérindienne, bushinenge, métropolitaine, Hmong, chinoise et les populations immigrées. Au dernier recensement, plus de 84 000 étrangers sont présents sur le sol guyanais, soit le tiers de la population totale. Cette immigration est avant tout régionale et s'explique par le niveau de vie français, attractif pour les ressortissants des pays environnants, avec en tête, le Suriname, le Brésil et Haïti (2). En 2050, l'INSEE estime que 428 000 habitants résideront en Guyane.

La Guyane est divisée en deux régions écologiques différentes. L'arrière-pays, recouvert de la forêt primaire, à faible densité humaine, est composé principalement de villages et de petites mines d'or. Tandis que la région côtière est plus anthropisée.

La Guyane bénéficie d'un climat à la fois équatorial et tempéré par les alizés. La zone de convergence intertropicale est le phénomène météorologique qui y détermine le climat. Il s'agit de la masse d'air en circulation entre l'anticyclone des Açores et l'anticyclone de Sainte Hélène. Cette zone de convergence intertropicale évolue tout au long de l'année et détermine les saisons de Guyane : une courte saison des pluies de mi-novembre à fin janvier ; une courte saison sèche - le " petit été de mars " – entre début février et mi-mars; une longue saison des pluies d'avril à fin juillet ; et une longue saison sèche de fin juillet à mi-novembre. La

pluviométrie annuelle est d'environ 3 m en moyenne le long du bord de mer, et 2,5 m à l'intérieur. Les variations annuelles d'un site à un autre peuvent être importantes. Cette variabilité interannuelle est en partie liée à au phénomène « El Niño ». Pendant les périodes El Niño, le climat guyanais devient plus chaud et sec (3).

b) Organisation des soins

Il existe deux structures hospitalières publiques en Guyane, le Centre Hospitalier André Rosemon à Cayenne et l'hôpital public de St Laurent du Maroni. Dix-sept centres de santé répartis sur le territoire sont également attachés administrativement à l'hôpital de Cayenne. Huit d'entre eux sont médicalisés en continu et les neuf autres ont une présence infirmière avec des astreintes médicales plus ou moins importantes selon les centres. De nombreux centres ne sont accessibles qu'en pirogue ou en avion, ce qui rend plus difficile l'accès à des services hospitaliers spécifiques comme la dermatologie. Néanmoins, des consultations de dermatologie sont organisées de façon régulière à Maripasoula, St Georges et St Laurent par les praticiens du Centre Hospitalier André Rosemon.

2) LES LEISHMANIOSES EN GUYANE FRANCAISE : GENERALITES ET ASPECTS BIOLOGIQUES

a) Généralités

Le parasite *Leishmania* fut découvert par Sir William Leishman en 1900 dans des frottis de la rate d'un soldat mort en Inde. Alors qu'il publiait ses résultats en 1903, Charles Donovan identifia le même parasite dans une biopsie de rate. Le parasite fut nommé *Leishmania donovani* en leur honneur et la forme amastigote du parasite est communément appelée corps de Leishman-Donovan. La présence de la leishmaniose est attestée dans des périodes anciennes, comme l'indique la découverte d'ADN de *Leishmania Donovani* chez des momies de l'Egypte antique (4).

Les leishmanioses sont un ensemble de maladies causées par des parasites du genre *Leishmania*. Les *Leishmania* sont des protozoaires flagellés de la famille des Trypanosomatidae (*Kinetoplastida*), transmis par la piqûre de petits diptères hématophages, les phlébotomes (*Psychodidae*, *Phlebotominae*). Elles sont caractérisées par une mitochondrie unique visible en microscopie: le kinétoplaste. On distingue les leishmanioses de l'Ancien monde correspondant à l'Europe, Afrique et Asie, et du Nouveau monde correspondant à l'Amérique.

En Guyane Française la leishmaniose fut décrite pour la première fois en 1954 (5). Cinq espèces de leishmanioses, *L. (Viannia) guyanensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) lainsoni* et *L. (Viannia) naiffi* sont associées à des leishmanioses cutanées (LC) ou cutanéomuqueuses (LCM) mais aucune à des leishmanioses viscérales (LV).

b) Cycle parasitaire et physiopathologie

Le cycle des *leishmania* comporte le passage alterné d'un hôte mammifère à un insecte vecteur, le phlébotome, et inversement. Ce sont des parasites dimorphiques présentant deux stades successifs : amastigote intracellulaire dans les cellules du système des phagocytes mononuclées du mammifère, et promastigote flagellé, libre et mobile dans le tube digestif de l'insecte vecteur. Après une phase de multiplication dans la lumière de l'intestin, ils migrent vers la partie antérieure du tube digestif où ils deviennent infestants (les promastigotes métacycliques), qui seront injectés chez un nouvel hôte mammifère lors d'une piqûre ultérieure. Les promastigotes métacycliques sont phagocytés par des macrophages du derme,

et intègrent une vacuole de phagocytose dans laquelle ils repassent en forme amastigote (Figure 2).

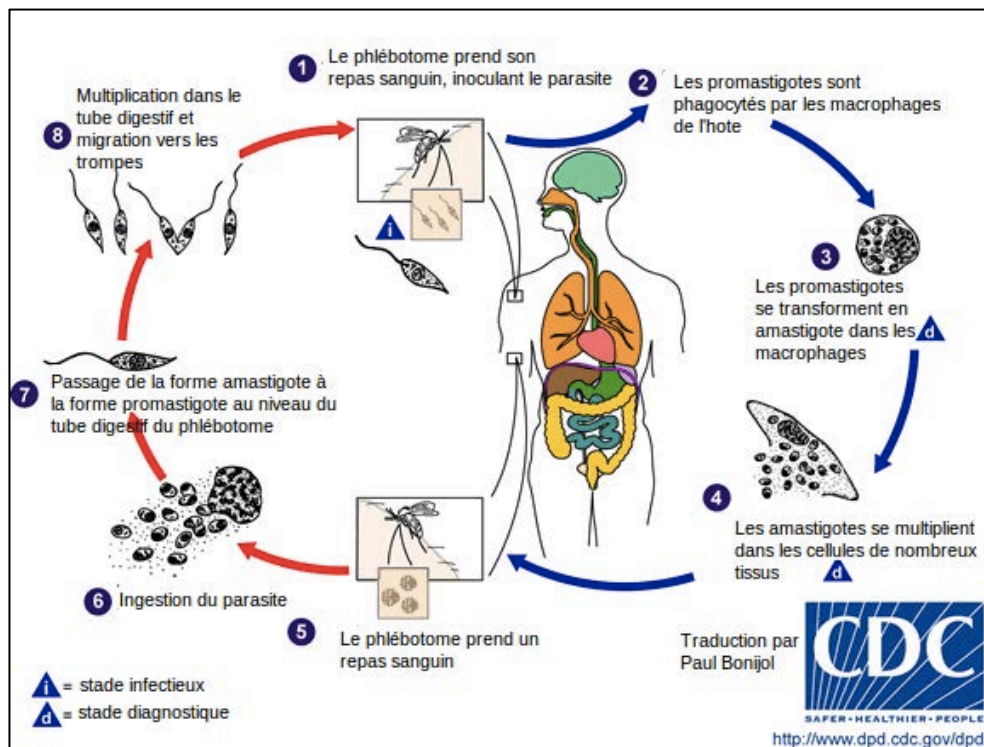


Figure 2 : Cycle parasitaire de la leishmaniose et transmission à l'homme

Source : www.dpd.cdc.gov/dpdx

c) Vecteurs et réservoirs

i. Vecteurs

Les phlébotomes (*Phlebotominae*) sont de petits diptères hématophages de la famille des *Psychodidae*. Ils sont distribués sur les cinq continents excepté l'Antarctique, principalement dans les zones les plus chaudes. Seules les femelles sont hématophages, le repas sanguin étant nécessaire au développement des œufs. *Lutzomya umbratilis* est l'espèce majoritaire et la mieux documentée en Guyane française. Il s'agit du principal vecteur de *L. (V.) guyanensis* en Guyane (6–9). L'abondance de *Lu. umbratilis* augmente du sol vers la canopée, avec un pic d'activité crépusculaire (6). Les femelles infectées se rencontrent près du sol particulièrement à la fin de la saison sèche (8).

Dans une étude de 2006 (9), des phlébotomes sont capturés dans cinq sites représentant les principaux écotopes de la Guyane. Quarante-six espèces de phlébotomes sont identifiées et *Lu. umbratilis* (16,6 % des spécimens), *Lu. infraspinoso* (12,7 %), *Lu. ininii* (8,0 %) et *Lu.*

flaviscutellata (6,1 %) étaient les espèces les fréquentes. *L. (L.) amazonensis* fut retrouvée chez 1/254 phlébotomes de type *Lu. flaviscutellata*.

ii. Réservoirs

Dans le nouveau monde, les leishmanioses sont toutes zoonotiques, impliquant des réservoirs mammifères domestiques et sauvages. De nombreuses études se sont intéressées au réservoir de la leishmaniose en Guyane. Dans une étude de 1981, la leishmaniose à *L. (V.) guyanensis* fut isolée chez 1/7 kinkajou (*Potos flavus*, mammifère arboricole et nocturne de la forêt humide des Guyanes), 7/15 paresseux à deux doigts, *Choloepus didactylus* et 2/19 rongeurs du genre *Proechimys* (10). Puis, la leishmaniose a été recherchée sur 486 mammifères sauvages appartenant à 20 espèces incluant des xénarthres (super-ordre de mammifères comprenant les fourmiliers, tatous et paresseux), des marsupiaux et des rongeurs capturés sur différents sites entre 1981 et 1987. Plusieurs espèces ont été trouvées infectées par *L. (V.) guyanensis* : *Choloepus didactylus* (11/31), *Didelphis marsupialis* (2/122) et *Proechimys sp.*(2/89). *L. (L.) amazonensis* a été détectée chez 3/89 *Proechimus sp.* (11). En revanche aucune *Leishmania* n'a été détectée sur des chauves-souris en Guyane Française (12). D'après ces différentes observations, le paresseux didactyle apparaît être le réservoir principal de *L. (V.) guyanensis* en Guyane. Tandis que pour *L. (V.) braziliensis*, les réservoirs sauvages principaux n'ont pas été clairement identifiés, des études indiquent que des rongeurs et des petits mammifères pourraient être ses réservoirs principaux (13).

iii. Complexes pathogènes

Les études de Dedet et *al.* semblent mettre en évidence des complexes pathogènes spécifiques avec une espèce spécifique de phlébotome qui transporte une espèce spécifique de *Leishmania* dont le réservoir est un mammifère spécifique. Le cycle de *L. (V.) guyanensis* se déroule dans la canopée avec le phlébotome *Lu. umbratilis* comme vecteur et avec au moins un mammifère de la canopée, le plus souvent le paresseux didactyle (*C. didactylus*), comme réservoir. Tandis que *L. (L.) amazonensis* est transmise par le vecteur *Lu. flaviscutellata* localisé au niveau du sol avec au moins, des rongeurs du genre *Proechimus sp.* pour réservoir (14–16).

3) IDENTIFICATION, TAXONOMIE ET CLASSIFICATION

Les *Leishmania*, quel que soit le stade évolutif, ne sont pas distinguables morphologiquement et leur classification a fait l'objet de nombreux travaux. En 1974 Lumsden propose une combinaison de critères pour l'identification des espèces telle que la distribution géographique, l'aspect clinique, l'espèce de phlébotome vectrice, leur possibilité de culture ainsi que leurs caractéristiques immunologiques (17).

La taxonomie cladistique s'est ensuite développée à visée phylogénétique, mettant en évidence des filiations au sein d'une même espèce. Une étape importante a été la distinction de deux sous-genres de *Leishmania* (18). Tout d'abord, le sous-genre *Leishmania* présent à la fois dans l'Ancien et le Nouveau monde et *Viannia* touchant seulement le Nouveau Monde. Ces deux sous-genres sont individualisés sur la base du développement du parasite chez le phlébotome. Les espèces du sous-genre *Leishmania* se développent uniquement dans certaines parties des voies digestives des vecteurs naturels, en amont du pylore, à la jonction de l'intestin moyen et de l'intestin postérieur (développement supra-pylarien), tandis que les espèces du sous-genre *Viannia* se rencontrent aussi bien dans l'intestin moyen que dans l'intestin postérieur (développement péri-pylarien).

De nouvelles méthodes moléculaires comme la technique iso-enzymatique développée dans les années 1970, ont permis de nombreux progrès dans l'identification des *Leishmania* (19). L'analyse des iso-enzymes par électrophorèse (méthode MLEE ou *multilocus enzyme electrophoresis*), se base sur l'existence chez ces parasites d'un polymorphisme important s'exprimant sous la forme d'électromorphes stables et spécifiques : les zymodènes. Cette technique est à l'origine de l'identification des souches de leishmanioses. Il est donc possible de caractériser les *Leishmania* par leur profil enzymatique.

L'utilisation de cette méthode dans un cadre cladistique a également permis d'élaborer les premières hypothèses phylogénétiques. L'analyse enzymatique par Rioux et al. (20) a confirmé la plupart des classifications préalables, dont celle de Lainson et Shaw en 1987, attestant la monophylie des sous-genres *Leishmania* et *Viannia*. Récemment, une nouvelle classification de la leishmaniose a été proposée sur les bases de données moléculaires, divisant les espèces de *Leishmania* en deux lignées phylogénétiques principales appelées sections *Euleishmania* et *Paraleishmania* (21).

Il n'y a à ce jour aucun accord universel sur la classification de la leishmaniose ou sur la méthode à utiliser pour la classification phylogénétique. La classification actuellement acceptée de *Leishmania* propose la division en *Euleishmania* comprenant les sous-genres

Leishmania et *Viannia*, et *Sauroleishmania* (Figure 3) (22,23). Dans le cadre de cette proposition, les espèces ne pouvant pas être classées dans l'un ou l'autre de ces sous-genres sont incluses dans la section *Paraleishmania* (Figure 3).

Durant les deux dernières décennies, l'analyse des séquences d'ADN de *Leishmania* a été de plus en plus utilisée à des fins d'identification et d'exploration phylogénétique. En comparaison des techniques enzymatiques, l'utilisation directe de l'ADN présente l'avantage de pouvoir être réalisée rapidement et sur de petites quantités de matériel, sans nécessité d'une culture préalable du parasite. Différentes méthodes d'identification ont été développées, se basant sur l'amplification d'une région génomique par *polymerase chain reaction* (PCR), l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou le séquençage d'une portion d'un gène.

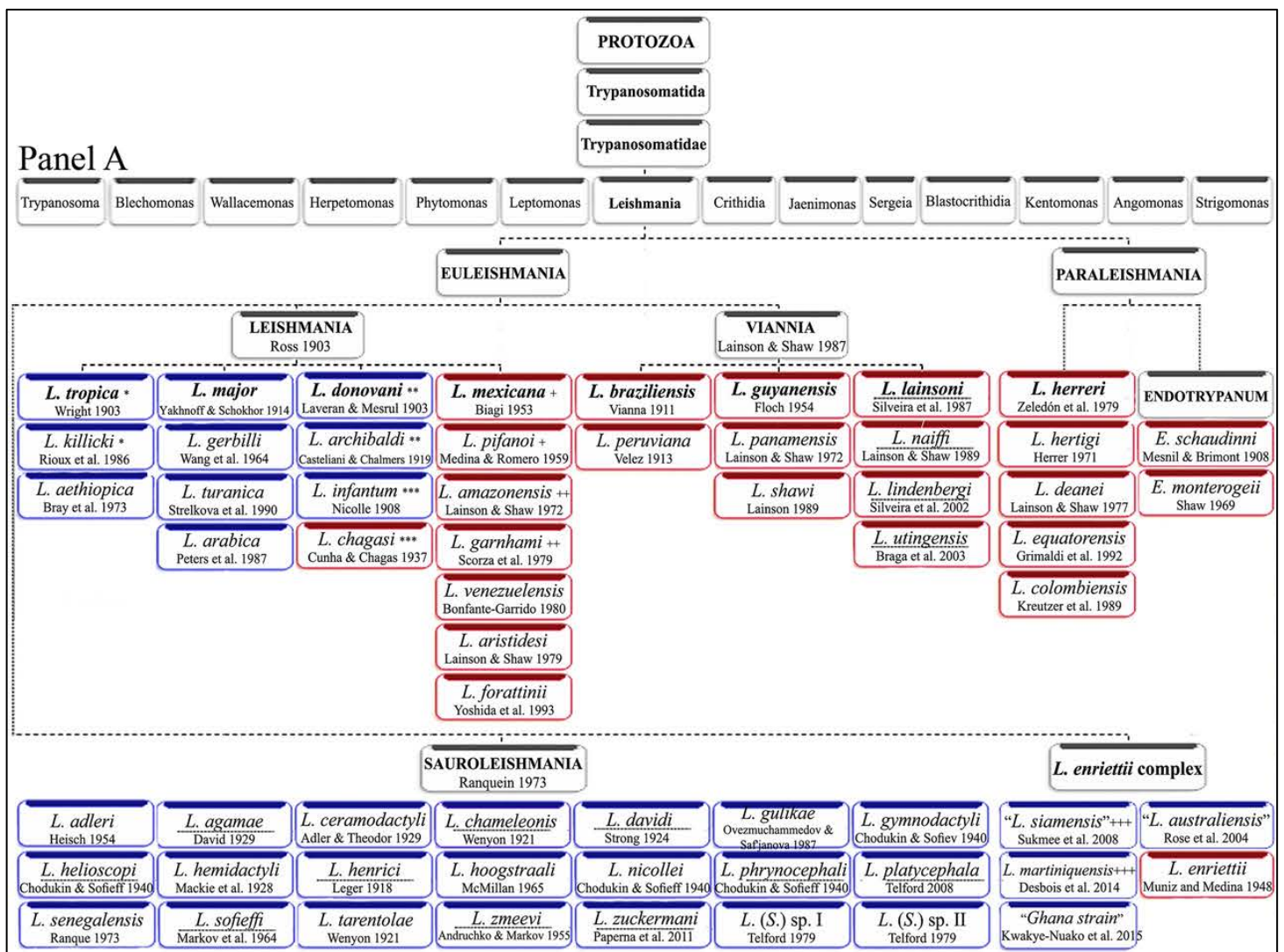


Figure 3 : D'après Akhoundi et al. 2016

En bleu : Espèces appartenant aux leishmanioses de L'Ancien monde. En rouge : celles du Nouveau monde.

4) REPARTITION GEOGRAPHIE ET ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES

a) Généralités

Les leishmanioses sont endémiques dans de vastes zones tropicales, subtropicales et du bassin méditerranéen, incluant plus de 98 pays, où l'on compte au total 350 millions de personnes à risque et 12 millions de cas d'infection (24). Les dix pays où le nombre de cas de LC signalés en 2016 est le plus élevé (Afghanistan, Algérie, Brésil, Colombie, Iraq, Pakistan, Pérou, République arabe syrienne, Tunisie et Yémen) représentent 84% de l'incidence mondiale des LC déclarées (25).

Sur le continent Américain, la LC est présente dans 18 pays (**Figure 4**). En 2017, 49 959 cas ont été signalés à l'Organisation panaméricaine de la santé par 17 pays endémiques (la Guyane française faisant rapport pour la France).

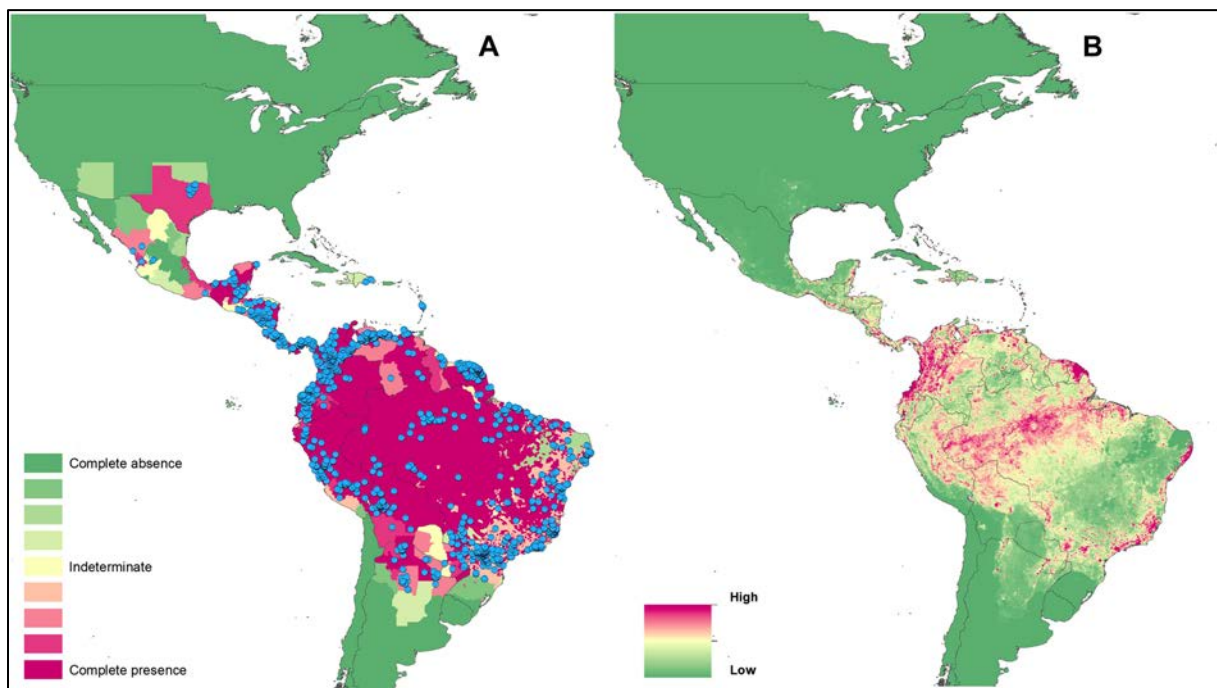


Figure 4. Adapté de Pigott et al. Niveau de consensus pour la présence des leishmanioses cutanées dans le nouveau monde, basé sur la confrontation de sources de données variées (26).

(A) Le consensus sur la présence de la maladie varie du vert (consensus complet sur l'absence) au violet (consensus complet sur la présence). Les points bleus indiquent les points ou centres d'occurrences. (B) Risque prévu de leishmanioses cutanées allant du vert (faible probabilité d'infection) à pourpre (probabilité élevée d'infection).

b) En Guyane française

i. Caractéristiques épidémiologiques

1. *Nombre de cas et caractéristiques de la population*

En Guyane française, les LC sont endémiques sur tout le territoire. Seules les formes cutanées de leishmanioses y sont retrouvées. Les formes viscérales sont présentes dans les pays limitrophes, en particulier au Brésil. En 2004, le taux d'incidence annuel des LC en Guyane française était de 0,20 % (27), une valeur équivalente à celle rapportée entre 1979 et 1986 (0,23 %) (28) et entre 1986 et 2000 (0,15 à 0,20 %) (29). Le taux d'incidence annuel est estimé à 15-20 nouveaux cas pour 10 000 habitants entre 1979 et 2012 (27,30). Récemment, une étude a mis à jour les données épidémiologiques: entre le 1er janvier 2006 et le 31 décembre 2013, 1017 nouveaux cas de leishmanioses ont été diagnostiqués pour un taux moyen de 127 cas par an (31).

Concernant les caractéristiques des populations infectées, une étude sur 219 patients dans les années 1980 mettait en évidence une prédominance de cas chez les sujets masculins, d'âge moyen de $28,8 \pm 9,2$ ans et allant en forêt pour des activités avant tout professionnelles (84,2 %) (28). En 2017, Simon et al. (31) affinent ces données sur 1017 cas de leishmanioses en objectivant une population principalement masculine avec un âge médian de 35 ans. Parmi les patients infectés, 39,6 % avaient une profession extérieure (29,9 % étaient orpailleurs et 22,8 % militaires). Concernant les données épidémiologiques, une récente étude portant sur 123 cas de leishmanioses sur une durée de 6 mois, observe une prédominance de patients Brésiliens (59,3%), suivi de patients nés en Guyane française (28,5%) puis en France métropolitaine (8,9%) (32).

2. *Epidémiologie des espèces*

En Guyane française, cinq espèces de *Leishmania* sont rapportées pour transmettre des LC et des leishmanioses muco-cutanées (LCM) : *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni* and *Leishmania (Viannia) naiffi*.

En 1989, *L. (V.) guyanensis* était responsable de 96,7 % LC (33). L'analyse des leishmanioses observées entre 2006 et 2013 montre une augmentation de l'incidence de la leishmaniose à *L. (V.) braziliensis*. Ainsi, 86,2% des cas étaient dus à *L. (V.) guyanensis* et 9,7% secondaire à *L. (V.) braziliensis* (31).

Les différentes leishmanioses sont réparties sur l'ensemble du territoire (**Figure 5**).

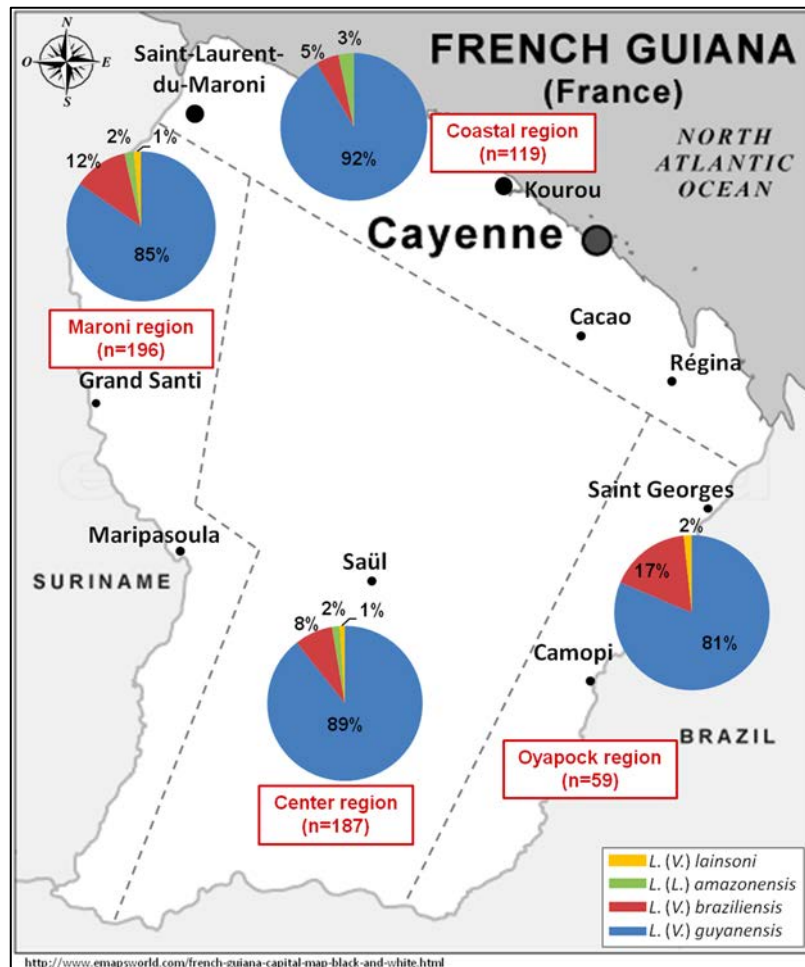


Figure 5 : Distribution des espèces de leishmanioses entre 2006 et 2013 en 4 régions majeures: côtière, de l'Oyapock, du centre et du Maroni.

ii. Climat et leishmanioses

Les périodes principales de transmission se situent durant les mois à basses précipitations, soit d'octobre à décembre (28). Les contaminations ont généralement lieu à la fin de la saison sèche ou au début de la saison des pluies, ce qui rend compte de l'afflux des patients en consultation du début de l'année au mois de mai. Des études réalisées en Guyane française ont mis en évidence l'influence de divers facteurs météorologiques sur l'évolution de la maladie. Il a été rapporté que l'ensoleillement et les rayons ultraviolets pourraient influencer la présentation clinique de la leishmaniose et l'efficacité du traitement par l'iséthionate de pentamidine (34,35). Récemment, une étude de 2013 s'est intéressée à la corrélation entre les variations climatiques et le nombre de cas de leishmanioses (3). Cette étude a mis en évidence une forte corrélation négative entre les précipitations et le nombre d'infections. En moyenne,

les infections à *Leishmania* augmentaient deux mois après une baisse relative des précipitations et cette corrélation suivait la même direction à l'échelle annuelle. En effet, le nombre d'infections était plus élevé durant les années sèches (3). Ce phénomène avait également été rapporté en Colombie, où le nombre de cas de leishmanioses augmentait durant une année « El Niño » (36).

iii. Tendances épidémiologiques et mouvements de population

L'évolution des activités humaines peut impacter les phlébotomes, leur cycle de transmission, et donc entraîner l'émergence d'espèces ayant une clinique et une réponse thérapeutique potentiellement différentes. Ainsi, l'expansion de l'habitat humain proche de milieux sauvages où la leishmaniose circule provoque une augmentation du nombre de cas de leishmanioses. Par exemple, dans la ville de Manaus au Brésil, la construction de banlieues en bordure de forêt a provoqué la mise en contact de la population avec *L. (V.) guyanensis* (37).

Le développement de l'orpillage dans les forêts de Guyane peut également contribuer à une augmentation de l'incidence de LC dans certaines parties de la Guyane. En effet, dans ce contexte, il y a une augmentation du risque d'exposition du fait du travail en forêt. De plus, la pression constante sur l'environnement exercée par la déforestation des futures zones d'orpillage entraîne directement la perturbation des phlébotomes dans leurs sites naturels. Certains villages où l'orpillage est fréquent présentent en effet des taux d'incidence élevés. Ainsi, dans la commune de Saint-Élie en Guyane Française, un taux de 12,4% a été rapporté en 2004 (27,38).

De façon intéressante, depuis 2007, la proportion de *L. (V.) braziliensis* a augmenté de manière significative (7,3 vs 13.3%, $P = 0.005$) (31). La proportion de cas dus à *L. (V.) braziliensis* était plus élevée dans les régions où se trouvaient des mines d'or (31). Deux facteurs peuvent être discutés pour expliquer l'augmentation de la proportion de cas à *L. (V.) braziliensis* : le contexte d'exploitation intensive de l'or et le développement de méthodes d'identification plus précises comme la *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) ou la spectrométrie de masse.

5) ASPECTS CLINIQUES DES LEISHMANIOSES EN GUYANE

Ces maladies se manifestent par différentes formes cliniques chez l'homme, qui dépendent de l'espèce de *Leishmania* et de la réponse immunitaire du patient.

a) Leishmaniose cutanée localisée

La leishmaniose cutanée localisée (LCL) est la forme la plus commune et résulte de la multiplication du parasite au site d'inoculation. Elle est caractérisée par des lésions d'aspect polymorphe, d'évolution lente, chroniques, indolores et classiquement sans signes généraux. Après une phase d'incubation longue allant de un à quatre mois, une lésion apparaît : généralement une papule inflammatoire qui évolue le plus souvent en ulcère couvert d'une croûte et entouré par des papules périphériques (14), elle peut-être unique ou multiple (**Figure 6**). Dans environ 30 % des cas, on observe une extension lymphangitique située sur le territoire drainant la lésion (28). Les lésions sont préférentiellement situées sur les jambes et les avant-bras, zones les plus exposées aux piqûres des phlébotomes (28).



Figure 6. Exemple d'une leishmaniose cutanée localisée.

b) Leishmaniose cutanée diffuse anergique et leishmaniose cutanée disséminée

La leishmaniose cutanée diffuse anergique (LCDA) est à différencier de la leishmaniose cutanée disséminée (LCD). La LCDA est généralement causée par *Leishmania aethiopica* dans l'ancien monde et par *L. (L.) mexicana* ou *L. (L.) amazonensis* dans le nouveau monde. Chez des sujets anergiques ou immunodéprimés, par une infection à VIH par exemple, il peut être observé des formes cutanées diffuses. Dans le cas de la LCDA, l'évolution et la dissémination de l'infection sont relativement rapides, avec un très grand nombre de lésions nodulaires qui peuvent être disséminées sur l'ensemble du tégument, ce qui suggère qu'il

existe une réponse immunitaire à médiation cellulaire minimale contre l'infection par *L. (L.) amazonensis* (39).

Tandis que la LCD est définie par la présence de plus de dix lésions cutanées de leishmanioses d'aspect polymorphe, papuleuses et/ou acnéiforme, sur au moins deux zones corporelles (**Figure 6**). Plus de 20 et jusqu'à plusieurs centaines de lésions cutanées peuvent se former avec ou sans atteinte des muqueuses. Les espèces les plus fréquemment concernées sont *L. (V.) braziliensis* et *L. (L.) amazonensis* (40), mais des formes de LCD ont également été décrites avec *L. (V.) guyanensis* (41).



Figure 7. Exemple d'une leishmaniose cutanée disséminée

c) Leishmaniose cutanéomuqueuse

Certaines espèces et en particulier *L. (V.) braziliensis*, mais aussi l'espèce *L. (V.) guyanensis* (42) sont responsables d'une forme clinique distincte : la LCM. Il s'agit d'une forme clinique peu fréquente: 5% des leishmanioses cutanées localisées à *L. (V.) braziliensis* se compliquent d'une LCM (43). Récemment, sur 1017 patients atteints de leishmanioses en Guyane, la fréquence des formes muqueuses dues à *L. (V.) guyanensis* était de 0,9% et de 4,2% pour *L. (V.) braziliensis* (31). La LCM semblerait être plus fréquente en cas de co-infection VIH (42). Cette forme est limitée géographiquement au continent sud-américain. Elle se caractérise par une atteinte cutanée initiale classique sous forme de LCL suivie 1 à 40 ans plus tard de

l'apparition de métastases muqueuses de la sphère ORL, potentiellement très délabrantes. Le diagnostic est donc souvent tardif et les lésions cartilagineuses irréversibles (43).

6) METHODES D'IDENTIFICATION D'ESPECES DISPONIBLES AU CENTRE HOSPITALIER DE CAYENNE

En Guyane française, cinq espèces sont donc à l'origine de LC. Il est indispensable de pouvoir identifier ces espèces à partir des lésions cutanées pour permettre un traitement adapté. Néanmoins, ni le frottis cutané, ni la culture ne peuvent fournir une identification d'espèce. L'analyse des iso-enzymes par électrophorèse (méthode MLEE ou *multilocus enzyme electrophoresis*) a longtemps été considérée comme le gold standard, mais cette technique requiert davantage de temps et de personnel. Plusieurs techniques ont été développées pour améliorer la rapidité et la précision du diagnostic d'espèces.

a) PCR-RFLP

Depuis 2005, le laboratoire hospitalo-universitaire de Parasitologie-Mycologie du Centre hospitalier de Cayenne a mis en place une technique d'identification moléculaire par analyse du polymorphisme des fragments de restriction, permettant le diagnostic spécifique des espèces de *Leishmania* du Nouveau Monde : la PCR-RFLP. Cette technique peut être réalisée à partir des cultures et, si elles sont négatives, directement à partir de biopsies ou prélèvements cutanés. Brièvement, la technique RFLP repose sur une phase d'extraction d'ADN des biopsies cutanées. L'ADN extrait est ensuite amplifié avec des amorces conçues pour amplifier une région de 625 paires de bases du gène de l'ARN polymérase II (RPOF2 et RPOR2). Puis, une étape de digestion de l'ADN cible par des enzymes de restriction spécifiques (TspRI et HgaI) est réalisée. L'ensemble du mélange réactionnel est finalement analysé par électrophorèse dans un gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium. Le profil d'électrophorèse est alors spécifique à chaque espèce (31,44).

Une étude sur 112 échantillons de leishmanioses de Guyane montre que cette technique est en mesure de faire la distinction entre les cinq espèces endémiques connues ainsi que deux autres espèces: *L. (L.) major* et *L. (L.) infantum* (44). Les taux d'identification des espèces étaient de 85,7 % pour les échantillons provenant de biopsie cutanée, de 93,1 % pour les frottis positifs et de 100 % pour les échantillons provenant de cultures positives (44).

b) Spectrométrie de masse, MALDI-TOF

Au cours de la dernière décennie, la spectrométrie de masse par *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight* (MALDI-TOF) a été adaptée pour l'identification de micro-organismes, y compris les *Leishmania*. Cette technique comprend des données de spectrométrie de masse pour 33 espèces différentes de *Leishmania* (45). Sa fiabilité et le délai de réponse rapide ont incité les laboratoires à utiliser rapidement cette nouvelle technologie. Un instrument de type MALDI-TOF est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) et un analyseur de temps de vol (TOF), aboutissant à des spectres caractéristiques de chaque espèce. La similitude entre le spectre à identifier et chaque spectre de référence a été évaluée sur une échelle allant de 0 à 100 (100 indique une correspondance parfaite entre les spectres comparés). Les résultats peuvent être exportés sous forme de fichiers Excel avec une valeur de score de similarité pour chacun d'entre eux. Dans l'étude récente de Lachaud et al. sur 231 souches de *Leishmania* analysées par MALDI-TOF, toutes les souches de *Leishmania*, sauf une, ont été correctement identifiées (45).

Depuis 2016, cette technique est utilisée par le laboratoire hospitalo-universitaire de Parasitologie-Mycologie du Centre hospitalier de Cayenne et permet l'identification des espèces sur des cultures de biopsie cutanée positives, même lorsque la PCR-RFLP n'est pas contributive (45).

c) « Barcoding » ou séquençage d'ADN

Depuis 2018, la PCR-RFLP a été remplacée par une analyse de séquence génique de la protéine de choc thermique 70 *HSP70* ou du cytochrome b (*cyt b*) après la PCR sur des échantillons prélevés par écouvillonnage. L'échantillonnage par écouvillonnage a remplacé les biopsies cutanées après 2018, car une sensibilité supérieure a été établie dans plusieurs études d'Amérique du Sud (46–48).

L'identification des espèces est réalisée par séquençage direct des gènes codant pour le gène *cyt b* et *HSP70*. Les séquences obtenues sont ensuite soumises à BLASTn pour rechercher des similitudes avec les séquences de *Leishmania* déposées sur GenBank et ainsi identifier l'espèce en cause.

L'analyse par séquençage d'ADN est actuellement la technique de référence pour le diagnostic d'espèces de leishmanioses.

7) TRAITEMENTS REALISES DANS LE SERVICE DE DERMATOLOGIE DU CENTRE HOSPITALIER DE CAYENNE

Le traitement des leishmanioses est complexe par son coût, la toxicité des produits disponibles et la sensibilité variable des différentes espèces de *Leishmania* aux médicaments disponibles. Le choix du traitement de la leishmaniose se base sur plusieurs facteurs : la présentation clinique (multiples lésions, forme cutanéomuqueuse), le terrain du patient et surtout l'espèce infectante (**Tableau 1**).

Les traitements classiques de la leishmaniose du Nouveau monde comprennent :

- Les sels pentavalents d'antimoine (Glucantime®) qui agissent par inhibition de la synthèse d'adénosine triphosphate.
- L'amphotéricine B liposomale (Ambisome®), un antifongique de la famille des polyènes, qui provoque une altération membranaire par fixation à l'ergostérol.
- La pentamidine (Pentacarinat®), une diamine aromatique agissant par inhibition de la synthèse d'ADN.

La réalisation de prélèvements permettant d'identifier l'espèce est nécessaire avant traitement compte tenu de la fréquence des cas de leishmanioses à *L. (V.) braziliensis* pouvant donner une atteinte cutanéomuqueuse délabrante à distance.

Il ne faut pas oublier de recommander les mesures prophylactiques. Les répulsifs d'insectes s'avèrent d'une efficacité limitée, en raison de l'humidité très élevée en forêt. En revanche, le port de vêtements longs, plus efficace, est recommandé ainsi que l'utilisation de moustiquaires imprégnées à fines mailles (< 2 mm) pour la sieste et la nuit.

Pour les leishmanioses à *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni* et *naiffi*, il n'existe encore aucune recommandation et un traitement par iséthionate de pentamidine semble préconisé en première intention.

Tableau 1. Adapté du référentiel de Buffet *et al.* 2011 pour la prise en charge des Leishmanioses du Nouveau-Monde (49)

| Indication | Options |
|--|--|
| LC à <i>L. (V.) guyanensis</i> | 1. Iséthionate de pentamidine 4mg/kg en 3 injections ou 7mg/kg en dose unique IM. La seconde option, aussi efficace, est à privilégier compte tenu de l'étendue du territoire Guyanais (50) 2. En cas d'échec de 2 cures d'iséthionate de pentamidine: Antimoniote de méglumine (Glucantime®) 20mg SbV/kg/j x 20 jours IVL ou IM ou Amphotéricine B liposomale 20mg/kg sur 2 à 8j |
| LC à <i>L. (V.) braziliensis</i> | 1. Antimoniote de méglumine 20 mg SbV/kg/j x 20 jours IVL ou IM 2. En cas d'échec de 2 cures d'antimoniote de méglumine: Amphotéricine B liposomale 20mg/kg sur 2 à 8j |
| LCM à <i>L. (V.) braziliensis</i> | Antimoniote de méglumine 20mg SbV/kg/j x 28 jours IVL ou IM En cas d'échec : Amphotéricine B liposomale |

IM : Intra-musculaire ; IVL : Intra-veineuse lente

8) LEISHMANIOSES A *LEISHMANIA VIANNA NAIFFI* ET *LAINSONI*:

QUE SAIT-ON ?

Comparativement aux *leishmania* à *L. (V.) guyanensis* et *L. (V.) braziliensis*, les espèces de leishmanioses à *L. (V.) naiffi* et *L. (V.) lainsoni* ont été peu décrites et les données cliniques peu rapportées.

a) Leishmaniose cutanée à *Leishmania Vianna naiffi*

i. Généralités et épidémiologie

La LC à *L. (V.) naiffi* a été décrite pour la première fois au Brésil, dans l'état de Para, en 1989 (51,52). Les auteurs rapportent une culture *in vivo* difficile, l'organisme s'étant peu développé dans la peau du hamster, où il a produit soit une infection cutanée inapparente, soit un nodule peu important contenant des amastigotes très rares et petits. Le parasite présente un

développement typiquement péripylarien, le faisant donc appartenir au sous genre *Viannia* (51,53).

Des cas de LC à *L. (V.) naiiffi* ont été rapportés au Brésil, en Equateur, en Guyane française et au Surinam, laissant supposer que *L. (V.) naiiffi* est probablement plus répandue en Amérique du Sud que ce qui est aujourd'hui rapporté (52,54–56).

ii. Vecteurs et réservoirs identifiés

Cette espèce a été isolée de la peau et des viscères du tatou à neuf bandes, *Dasyus novemcinctus* (51). Quant aux vecteurs supposés, *L. (V.) naiiffi* a été isolé sur plusieurs espèces de phlébotomes au Brésil: *Lutzomia (Lu.) ayrozai*, *Lu. paraensis*, *Lu. squamiventris* (51–53,57). En Guyane française, *L. (V.) naiiffi* a été observée dans une femelle de *Lu. squamiventris* (58), phlébotome déjà signalé comme possible vecteur de *L. (V.) naiiffi* au Brésil (53). En Equateur, deux études suggèrent que *Lu. tortura* est responsable de la transmission de *L. (V.) naiiffi* (59,60).

iii. Forme clinique et aspect thérapeutique

Seuls quelques cas ou petites séries ont été rapportés (54–56,61). Les lésions cutanées sont souvent ulcérées, petites, uniques, localisées sur les bras et les jambes (**Figure 8**) (55). Aucune atteinte muqueuse n'a pour le moment été rapportée. Ces études décrivaient une évolution clinique globalement bénigne avec guérison soit spontanée soit avec des injections de pentamidine. Ces résultats sont soutenus par des études in vitro observant que *L. (V.) naiiffi* présentait le plus faible indice d'infection et la production d'oxyde nitrique la plus élevée par rapport aux autres espèces du sous-genre *Viannia* et semblait donc moins pathogène pour l'homme que les autres espèces (62).

Cependant récemment, deux séries ou *cases-report* suggèrent que *L. (V.) naiiffi* pourrait être plus sévère et résistante aux traitements habituels, avec une faible réponse au traitement par antimonial ou pentamidine (63,64). Certains auteurs discutent de l'association possible entre une mauvaise réponse thérapeutique et la présence de virus à ARN de *Leishmania*, contribuant à l'augmentation de la virulence du parasite et à la modification de la réponse thérapeutique en réduisant la sensibilité au stress oxydatif (64,65). Il est donc intéressant et nécessaire d'analyser d'autres cas de leishmanioses à *L. (V.) naiiffi* pour pouvoir en comprendre les aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques.

b) Leishmaniose cutanée à *Leishmania Viannia lainsoni*

i. Généralités et épidémiologie

La LC à *L. (V.) lainsoni*, appartenant également au sous-genre *Viannia*, a été décrite pour la première fois en 1987 (66) au Brésil, dans l'état de Para. Ces promastigotes diffèrent de ceux appartenant aux *L. (V.) braziliensis* ou *guyanensis* par leur grande taille et leur long flagelles pouvant atteindre 36,42µm (66). *L. (V.) lainsoni* se caractérise également par sa facilité de culture dans des milieux de culture axéniques simples (67). Plusieurs études font état d'un profil phylogénétique atypique avec une lignée distincte, comparé aux autres espèces du sous-genre *Viannia* (67–69).

Cette leishmaniose semble présenter une large répartition en Amérique du Sud avec des cas signalés au Brésil (66), dans les régions Sub-Andines et amazoniennes du Pérou (70,71), des régions climatiques subtropicales et Sub-Andines de la Bolivie (69,72), au Surinam (73), en Guyane française (31,44) et récemment en Equateur (74).

ii. Vecteurs et réservoirs identifiés

L. (V.) lainsoni circule en milieu sylvatique. Les cas d'infection chez l'homme sont rares, probablement du fait d'une faible anthropophilie du vecteur. Le réservoir de *L. (V.) lainsoni* semble être l'Agouti paca (*Rodentia : Dasyproctidae*) (75). Le vecteur suspecté au Brésil est *Lu. (Trichophoromyia) ubiquitalis* (76,77). Des infections de phlébotomes par *L. (V.) lainsoni* ont été détectées chez *Lu. nuneztovari anglesi* en Bolivie (69), et *Lu. auraensis* dans les forêts primaires du Pérou (78). Pour le moment, aucun vecteur ni réservoir n'ont été caractérisés en Guyane française.

iii. Forme clinique et aspect thérapeutique:

Peu de données cliniques et thérapeutiques existent pour cette espèce, mais comme *L. (V.) naiffi*, il semble que *L. (V.) lainsoni* provoque des ulcères ou des lésions nodulaires (**Figure 8**) (66,67), sans atteinte muqueuse décrite.

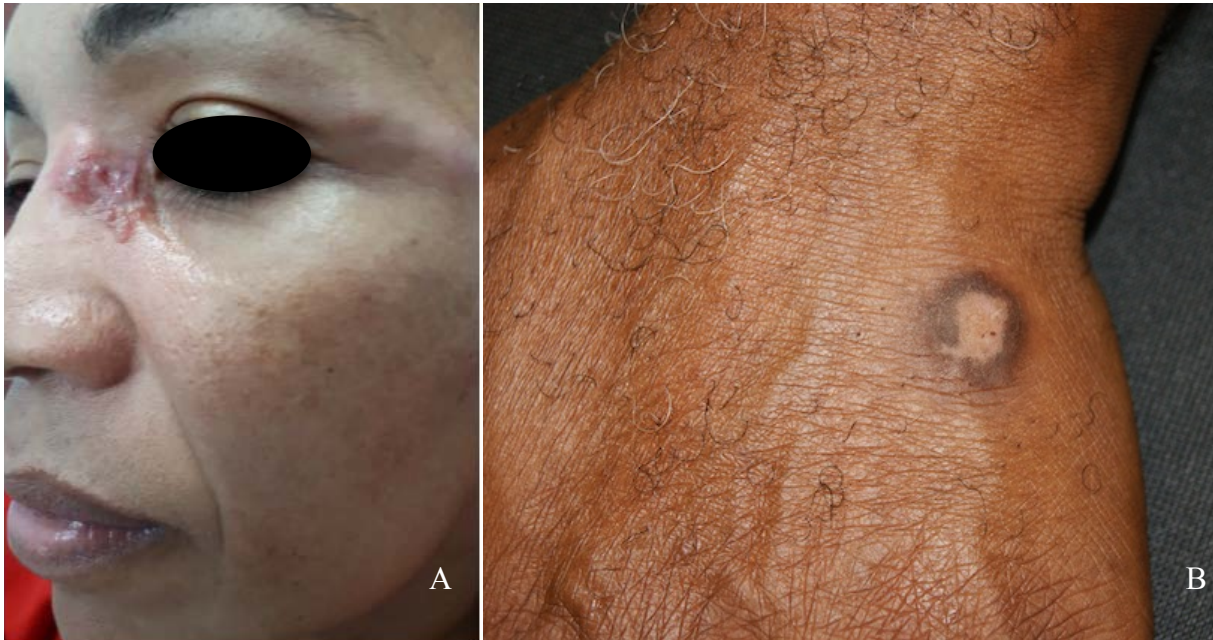


Figure 8. (A) Lésion nodulaire du canthus interne due à *L. (V.) lainsoni*. (B) LC à *L. (V.) naiffi* avec un ulcère peu important de la main.

9) OBJECTIFS DE L'ETUDE

En collectant de façon rétrospective tous les cas de LC à *L. (V.) naiffi* et *L. (V.) lainsoni*, nous souhaitons évaluer la distribution géographique, les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques des LC à *L. (V.) naiffi* et *L. (V.) lainsoni* en Guyane française. Notre deuxième objectif est d'examiner la variabilité génétique intra-espèces par analyse phylogénétique, pour ainsi rechercher de possibles associations entre le polymorphisme génétique et les caractéristiques cliniques ou épidémiologiques de ces espèces.

10) REFERENCES

1. INSEE | Recensement de la population en Guyane. [Internet] [cited 2019 sept 07]. Available from: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/3679865>
2. INSEE | Atlas des populations immigrées en Guyane. [Internet] [cited 2019 sept 07]. Available from: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/1290097>
3. Roger A, Nacher M, Hanf M, Drogoul AS, Adenis A, Basurko C, et al. Climate and leishmaniasis in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Sep;89(3):564–9.
4. Zink AR, Spigelman M, Schraut B, Greenblatt CL, Nerlich AG, Donoghue HD. Leishmaniasis in Ancient Egypt and Upper Nubia. *Emerg Infect Dis.* 2006 Oct;12(10):1616–7.
5. Floch H. [*Leishmania tropica guyanensis* n.sp., pathogenic agent of Guyanese and Central American cutaneous leishmaniasis]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1954;47(6):784–7.
6. Le Pont F, Pajot FX, Reguer R. Preliminary observations on the silvatic cycle of leishmaniasis in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980;74(1):133.
7. Le Pont F—La leishmaniose en Guyane Française. 2. Fluctuations saisonnières d’abondance et du taux d’infection naturelle du vecteur *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis*, Ward et Fraiha, 1977. *Cah ORSTOM Sér Entomol Méd Parasitol*, 1982, 20, 269-277.
8. Pajot FX, Chippaux JP, Geoffroy B & Dedet JP – La leishmaniose en Guyane française. 6. Fluctuations saisonnières de la densité et du taux d’infection naturelle de *Lutzomyia (Nyssomyia) umbratilis* Ward et Fraiha, 1977 en forêt dégradée. *Cah ORSTOM Sér Entomol Méd Parasitol*, 1986, 24, 191-198.
9. Rotureau B, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Fouque F, Carme B. Diversity and ecology of sand flies (*Diptera: Psychodidae: Phlebotominae*) in coastal French Guiana. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Jul;75(1):62–9.
10. Gentile B, Le Pont F, Pajot FX, Besnard R. Dermal leishmaniasis in French Guiana: the sloth (*Choloepus didactylus*) as a reservoir host. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981 Jan;75(4):612–3.
11. Dedet JP, Gay F, Chatenay G. Isolation of *Leishmania* species from wild mammals in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989 Sep;83(5):613–5.
12. Rotureau B, Catzefflis F, Carme B. Absence of *Leishmania* in Guianan bats. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Feb;74(2):318–21.

13. Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikaw EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003 May;97(3):291–6.
14. Dedet JP. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: a review. *Am J Trop Med Hyg.* 1990 Jul;43(1):25–8.
15. Pajot FX, Le Pont F, Gentile B, Besnard R. Epidemiology of leishmaniasis in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1982;76(1):112–3.
16. Rotureau B. [Trypanosomatid (*Protozoa, Kinetoplastida*) parasites of sloths (*Mammalia, Xenarthra*)]. *Bull Soc Pathol Exot* 1990. 2006 Jul;99(3):171–5.
17. Lumsden WH. Letter: Biochemical taxonomy of *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1974;68(1):74–5.
18. Lainson R, Shaw JJ (1987) Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press Inc. 1–120.
19. Gardener PJ, Chance ML, Peters W. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. II: Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. *Ann Trop Med Parasitol.* 1974 Sep;68(3):317–25.
20. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comparée.* 1990;65(3):111–25.
21. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today Pers Ed.* 2000 Apr;16(4):142–4.
22. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. Bañuls A-L, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Mar 3;10(3):e0004349.
23. Harkins KM, Schwartz RS, Cartwright RA, Stone AC. Phylogenomic reconstruction supports supercontinent origins for *Leishmania*. *Infect Genet Evol.* 2016 Mar;38:101–9.
24. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One.* 2012;7(5):e35671.
25. WHO | Leishmaniasis [Internet]. WHO. [cited 2019 sept 07]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
26. Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ, et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. *eLife.* 2014 Jun 27;3.

27. Rotureau B, Couppié P, Nacher M, Dedet JP, Carme B. [Cutaneous leishmaniasis in French Guiana]. *Bull Soc Pathol Exot* 1990. 2007 Oct;100(4):251–60.
28. Dedet JP, Pradinaud R, Gay F. Epidemiological aspects of human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989 Sep;83(5):616–20.
29. Carme B, Aznar C, Pradinaud R. Absence of a proven resurgence of Chagas disease or cutaneous leishmaniasis in French Guiana over the last two decades. *Ann Trop Med Parasitol.* 2001 Sep;95(6):623–5.
30. Dedet J-P, Carme B, Desbois N, Bourdoiseau G, Lachaud L, Pratlong F. Épidémiologie des leishmanioses autochtones en France métropolitaine et d'outre-mer. *Presse Médicale.* 2013 Nov;42(11):1469–81.
31. Simon S, Nacher M, Carme B, Basurko C, Roger A, Adenis A, et al. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: revising epidemiology with PCR-RFLP. *Trop Med Health.* 2017;45:5.
32. Loiseau R, Nabet C, Simon S, Ginouves M, Brousse P, Blanchet D et al. American cutaneous leishmaniasis in French Guiana: an epidemiological update and a study of environmental risk factors. *Int J Dermatol.* 2019, In press.
33. Desjeux P, Dedet JP. Isoenzyme characterization of 112 *Leishmania* isolates from French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1989 Sep;83(5):610–2.
34. Nacher M, Carme B, Sainte Marie D, Couppié P, Clyti E, Guibert P, et al. Seasonal Fluctuations of Incubation, Healing Delays, and Clinical Presentation of Cutaneous Leishmaniasis in French Guiana. *J Parasitol.* 2001 Dec;87(6):1495–8.
35. Nacher M, Couppié P, Carme B, Clyti E, Sainte Marie D, Guibert P, et al. Influence of meteorological parameters on the clinical presentation of cutaneous leishmaniasis in French Guiana and on the efficacy of pentamidine treatment of the disease. *Ann Trop Med Parasitol.* 2002 Dec 1;96(8):773–80.
36. Cardenas R, Sandoval CM, Rodríguez-Morales AJ, Franco-Paredes C. Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in northeastern Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Aug;75(2):273–7.
37. Barrett TV, Senra MS. Leishmaniasis in Manaus, Brazil. *Parasitol Today Pers Ed.* 1989 Aug;5(8):255–7.
38. Rotureau B, Joubert M, Clyti E, Djossou F, Carme B. Leishmaniasis among gold miners, French Guiana. *Emerg Infect Dis.* 2006 Jul;12(7):1169–70.
39. Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused

- by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005 Aug;100(5):525–34.
40. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. Acta Trop. 1994 Apr;56(4):315–25.
 41. Couppié P, Clyti E, Sainte-Marie D, Dedet JP, Carme B, Pradinaud R. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. Am J Trop Med Hyg. 2004 Nov;71(5):558–60.
 42. Darrigade A-S, Sambourg E, Duvignaud A, Sainte-Marie D, Labbé S, Renaux A, et al. Leishmanioses cutanéomuqueuses en Guyane : prédominance de l'espèce *Leishmania guyanensis*. Ann Dermatol Vénérologie. 2014 Dec;141(12):S298.
 43. Fourcade S, Huber FI, Blanchet D, Aznar C, Clyti E, Simon S, et al. [Mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: a case report in an HIV-infected patient]. Med Trop Rev Corps Sante Colon. 2008 Oct;68(5):533–6.
 44. Simon S, Veron V, Carme B. *Leishmania spp.* identification by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010 Feb;66(2):175–80.
 45. Lachaud L, Fernández-Arévalo A, Normand A-C, Lami P, Nabet C, Donnadieu JL, et al. Identification of *Leishmania* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Using a Free Web-Based Application and a Dedicated Mass-Spectral Library. Loeffelholz MJ, editor. J Clin Microbiol. 2017 Oct;55(10):2924–33.
 46. Adams ER, Gomez MA, Scheske L, Rios R, Marquez R, Cossio A, et al. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. Parasitology. 2014 Dec;141(14):1891–7.
 47. Suárez M, Valencia BM, Jara M, Alba M, Boggild AK, Dujardin J-C, et al. Quantification of *Leishmania (Viannia)* Kinetoplast DNA in Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Inter-site and Inter-sampling Variability in Parasite Load. Debrabant A, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Jul 23;9(7):e0003936.
 48. Gomes CM, Cesetti MV, de Paula NA, Vernal S, Gupta G, Sampaio RNR, et al. Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real-Time PCR Using Biopsy and Swab Samples To Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where *Leishmania (Viannia) braziliensis* Is Endemic. Fenwick B, editor. J Clin Microbiol. 2017 Feb;55(2):526–34.

49. Buffet PA, Rosenthal É, Gangneux J-P, Lightburne E, Couppié P, Morizot G, et al. Traitement des leishmanioses en France : proposition d'un référentiel consensuel. *Presse Médicale*. 2011 Feb;40(2):173–84.
50. Roussel M, Nacher M, Frémont G, Rotureau B, Clyti E, Sainte-Marie D, et al. Comparison between one and two injections of pentamidine isethionate, at 7 mg/kg in each injection, in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006 Jun;100(4):307–14.
51. Lainson R, Shaw JJ. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1989;64(1):3–9.
52. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR, Ishikawa EA. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw, 1989. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1990;65(5–6):282–4.
53. Naiff RD, Freitas RA, Naiff MF, Arias JR, Barrett TV, Momen H, et al. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1991 Sep;86(3):317–21.
54. Pratlong F, Deniau M, Darie H, Eichenlaub S, Pröll S, Garrabe E, et al. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania naiffi* is wide-spread in South America. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002 Dec 1;96(8):781–5.
55. van der Snoek EM, Lammers AM, Kortbeek LM, Roelfsema JH, Bart A, Jaspers CAJJ. Spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania naiffi* in two Dutch infantry soldiers. *Clin Exp Dermatol*. 2009 Dec;34(8):e889–91.
56. van Thiel P-PAM, Gool T van, Kager PA, Bart A. First cases of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) naiffi* infection in Surinam. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Apr;82(4):588–90.
57. Grimaldi G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and Classification of Leishmanial Parasites from Humans, Wild Mammals, and Sand Flies in the Amazon Region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1991 Jun 1;44(6):645–61.
58. Fouque F, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Gantier J-C, Ravel C, et al. Phlebotomine sand flies (*Diptera: Psychodidae*) associated with changing patterns in the transmission of the human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Feb;102(1):35–40.
59. Kato H, Gomez EA, Yamamoto Y, Calvopiña M, Guevara AG, Marco JD, et al. Natural infection of *Lutzomyia tortura* with *Leishmania (Viannia) naiffi* in an Amazonian area of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Sep;79(3):438–40.

60. Kato H, Calvopiña M, Criollo H, Hashiguchi Y. First human cases of *Leishmania (Viannia) naiffi* infection in Ecuador and identification of its suspected vector species. *Acta Trop*. 2013 Dec;128(3):710–3.
61. Figueira L de P, Soares FV, JúNior RDN, Vinhote-Silva AC, Silva SS da, Espir TT, et al. New human case reports of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) naiffi* in the Amazon region, Brazil. *Acta Amaz*. 2017 Mar;47(1):47–52.
62. Campos MB, De Castro Gomes CM, de Souza AAA, Lainson R, Corbett CEP, Silveira FT. In vitro infectivity of species of *Leishmania (Viannia)* responsible for American cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2008 Sep;103(4):771–6.
63. Fagundes-Silva GA, Romero GAS, Cupolillo E, Yamashita EPG, Gomes-Silva A, Guerra JA de O, et al. *Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015 Sep;110(6):797–800.
64. Vieira-Gonçalves R, Fagundes-Silva GA, Heringer JF, Fantinatti M, Da-Cruz AM, Oliveira-Neto MP, et al. First report of treatment failure in a patient with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) naiffi* carrying *Leishmania* RNA virus: a fortuitous combination? *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2019 Apr 11 [cited 2019 Sep 1];52(0).
65. Hartley M-A, Ronet C, Zangger H, Beverley SM, Fasel N. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2012 [cited 2019 Sep 1];2.
66. Silveira FT, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa E. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannaia) lainsoni* sp. n., a new parasite from the State of Pará. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987 Jun;82(2):289–91.
67. Corrêa JR, Brazil RP, Soares MJ. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus--a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Oct;100(6):587–92.
68. Cupolillo E, Grimaldi Júnior G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 1995 Jul;73(1–2):145–55.
69. Bastrenta B, Buitrago R, Vargas F, Le Pont F, Torrez M, Flores M, et al. First evidence of transmission of *Leishmania (Viannia) lainsoni* in a Sub Andean region of Bolivia. *Acta Trop*. 2002 Sep;83(3):249–53.
70. Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Carrizales D, Kreutzer RD. *Leishmania (Viannia) lainsoni*: first isolation in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 1994 Nov;51(5):533–7.
71. Veland N, Valencia BM, Alba M, Adauí V, Llanos-Cuentas A, Arevalo J, et al. Simultaneous infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) lainsoni* in a

- Peruvian patient with cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Apr;88(4):774–7.
72. Martinez E, Pont FL, Mollinedo S, Cupolillo E. A first case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001 Jul;95(4):375–7.
73. van der Meide WF, Jensema AJ, Akrum RAE, Sabajo LOA, Lai A Fat RFM, Lambregts L, et al. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Suriname: a study performed in 2006. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Aug;79(2):192–7.
74. Kato H, Bone AE, Mimori T, Hashiguchi K, Shiguango GF, Gonzales SV, et al. First Human Cases of *Leishmania (Viannia) lainsoni* Infection and a Search for the Vector Sand Flies in Ecuador. Taylan Ozkan A, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 May 18;10(5):e0004728.
75. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EE, Souza AA. [Cutaneous leishmaniasis in Amazonia: isolation of *Leishmania (Viannia) lainsoni* from the rodent Agouti paca (*Rodentia: Dasyproctidae*), in the state of Pará, Brazil]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1991 Feb;33(1):18–22.
76. Silveira FT, Souza AAA, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EEA. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis* (*Psychodidae: Phlebotominae*) by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará state, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991 Mar;86(1):127–30.
77. Lainson R, Shaw JJ, Souza AA, Silveira FT, Falqueto A. Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (*Psychodidae: Phlebotominae*), the sandfly vector of *Leishmania (Viannia) lainsoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992 Sep;87(3):437–9.
78. Graf PCF, Lucas CM, De Los Santos MB, Mundal KD, Lescano AG, Baldeviano GC, et al. Natural *Leishmania* Infection of *Lutzomyia auraensis* in Madre de Dios, Peru, Detected by a Fluorescence Resonance Energy Transfer–Based Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Sep 5;87(3):511–7.

PARTIE II: ETUDE CLINIQUE ET PHYLOGENETIQUE

Title: *Leishmania naiffi* and *lainsoni* in French Guiana: clinical features and phylogenetic variability

Océane Ducharme¹, Stéphane Simon², Cécile Nabet^{2,3}, Marine Ginouves², Pierre Couppie^{1,2,4},
Magalie Demar^{2,3,4} Romain Blaizot^{1,2,4}

Authors 'affiliations:

1: Service de Dermatologie, Hôpital Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana,

2: Equipe EA3593, Ecosystèmes Amazoniens et Pathologie Tropicale, Université de la Guyane, Cayenne, French Guiana,

3 : Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana

4: Centre National de Référence des Leishmanioses, laboratoire associé, Hôpital Andrée Rosemon, Cayenne, French Guiana,

Corresponding Author:

Dr Romain Blaizot, Dermatology Department, Hôpital Andrée Rosemon

Abstract word count: 297

Figures and tables: 3 figures, 3 tables

Supplementary Material: 2 figures

Key words: Cutaneous leishmaniasis; *Leishmania Vianna naiffi*; *Leishmania Vianna lainsoni*; French Guiana.

ABSTRACT

Background: In French Guiana, five species are associated with cutaneous leishmaniasis (CL): *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) lainsoni* and *Leishmania (V.) naiffi*. Though infections with *Leishmania (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* have been extensively described, there are few available clinical and genetic data on *L. (V.) lainsoni* and *L. (V.) naiffi*.

Methodology: We determined the clinical and epidemiological features of all cases of CL due to *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni* diagnosed in French Guiana between 2003 and 2019. Phylogenetic analysis was performed by sequencing a portion of *HSP70* and *cyt b* genes.

Principal findings: Five cases of *L. naiffi* and 25 cases of *L. lainsoni* were reported. Patients infected by *L. (V.) lainsoni* were more frequently born in Brazil than in French territory ($p=0,005$) and were usually infected on gold camps, mostly along the Maroni river (60%) ($p=0.001$), while *L. naiffi* was observed in French patients infected on the coast (100%). A high number of pediatric cases ($n=5$; %) was observed for *L. (V.) lainsoni*. A mild clinical course was observed for all cases of *L. (V.) naiffi*. Phylogenetic analysis revealed different geographical clusters within *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni* but no association were found between phylogenetic and clinical features.

Discussion: Our data suggest distinct socio-epidemiological features for these two *Leishmania* species. Patients seem to get infected with *L. (V.) naiffi* during leisure activities in anthropized coastal areas, while *L. (V.) lainsoni* shares common features with *L. (V.) guyanensis* and *brasiliensis* and seems to be acquired during professional activities in primary forest regions. Phylogenetic analysis has provided information on the intraspecific genetic variability of *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni* and how these genotypes are distributed at the geographic level.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is considered as a “neglected tropical disease” by the World Health Organization (1), affecting at least 12 million people in 98 countries (2). It is caused by parasites of the genus *Leishmania*. *Leishmania* flagellates are grouped into two sub-genera, *Leishmania* and *Viannia*, according to their development in the insect digestive tract, confirmed by phylogenetic studies.

In French Guiana, five species of *Leishmania*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni* and *Leishmania (Viannia) naiffi*, are reported to be associated with cutaneous leishmaniasis (CL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL) (3–5). The clinical form will depend on several factors including the infecting species and the host immunological response. *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) braziliensis*, the predominant species in French Guiana, have been well documented in the literature (3,5–7). *L. (V.) braziliensis* is a virulent species that is potentially responsible for mucous involvement, although *L. (V.) guyanensis* has also been incriminated in diffuse clinical presentation and mucosal involvement, to a lesser extent (5,8).

However, *L. (V.) lainsoni* and *L. (V.) naiffi* have been poorly described and the clinical data of these patients were not thoroughly studied. CL due to *L. (V.) naiffi* was described for the first time in Brazil, in Para state, in 1989 (9,10) and has been isolated from both skin and viscera of the nine-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus* (9,11). Since then, only few cases or small series have been reported (12–15). These reports described a benign clinical course with spontaneous healing or a good outcome with pentamidine. However, recent reports suggest that *L. (V.) naiffi* could be more severe and resistant to first-line treatment, with a poor response to meglumine antimoniate or pentamidine (16,17).

CL due to *L. (V.) lainsoni* was first described in 1987 (18) and seems to be widely distributed in South America with cases reported in Brazil, Peru, Bolivia, Surinam, French Guiana and recently in Colombia and Equator (5,19–23). Several studies reported an atypical phylogenetic profile with distinct lineage, compared to other species of the *Viannia* subgenus (24–26). *L. (V.) lainsoni* is also characterized by the ease of cultivation in simple axenic culture media compared to other *Leishmania* from *Viannia* sub-genera (26). Similarly to *L. (V.) naiffi*, it appears that *L. (V.) lainsoni* causes small ulcers or nodules (18,26). However, these data are scarce and deserve further investigations.

This present study aimed to evaluate the clinical features and distribution of *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni* in French Guiana. Our second objective was to examine intra-species genetic

variability by phylogenetic analysis, to look for associations between genetic polymorphism and clinical or epidemiological features.

MATERIALS AND METHODS:

Inclusion criteria

We conducted an observational, retrospective study across French Guiana. All patients with proven diagnosis of *L. (V.) lainsoni* or *L. (V.) naiffi* infections between 01/01/2003 and 01/05/2019 were included. Cases were extracted from the register of the Laboratory of Parasitology of the Cayenne Hospital, which is the referral center for diagnosis of CL in French Guiana.

A new case was defined by the absence of documented history of leishmaniasis in the twelve previous months before the date of consultation. Diagnosis was made either by a positive detection of *Leishmania naiffi* or *lainsoni* using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) on skin biopsies (5,27), by sequencing a portion of *HSP70* gene after PCR on swab samples or on skin biopsies (28), or by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF) from positives cultures (29). The study was conducted in the Cayenne General Hospital and in the health centers for remote areas (**Figure 1**).

According to the French public Health and Bioethical Law by the time of the study period, no ethics committee approval was needed for this observational study on routinely collected biological material (Article L1121-1 and Article R1121-3). This study used only health care data that are routinely used for clinical purposes and is part of the usual research works of the National Reference Center for Cutaneous Leishmaniasis. The identification of *Leishmania* species corresponded to the surveillance and alert mission of the National Reference Center (CNR) of *Leishmania*. All patients were informed (leaflets, posters in several local languages) that data and analysis results may be used for research and scientific publications, and that they had a right to refuse.

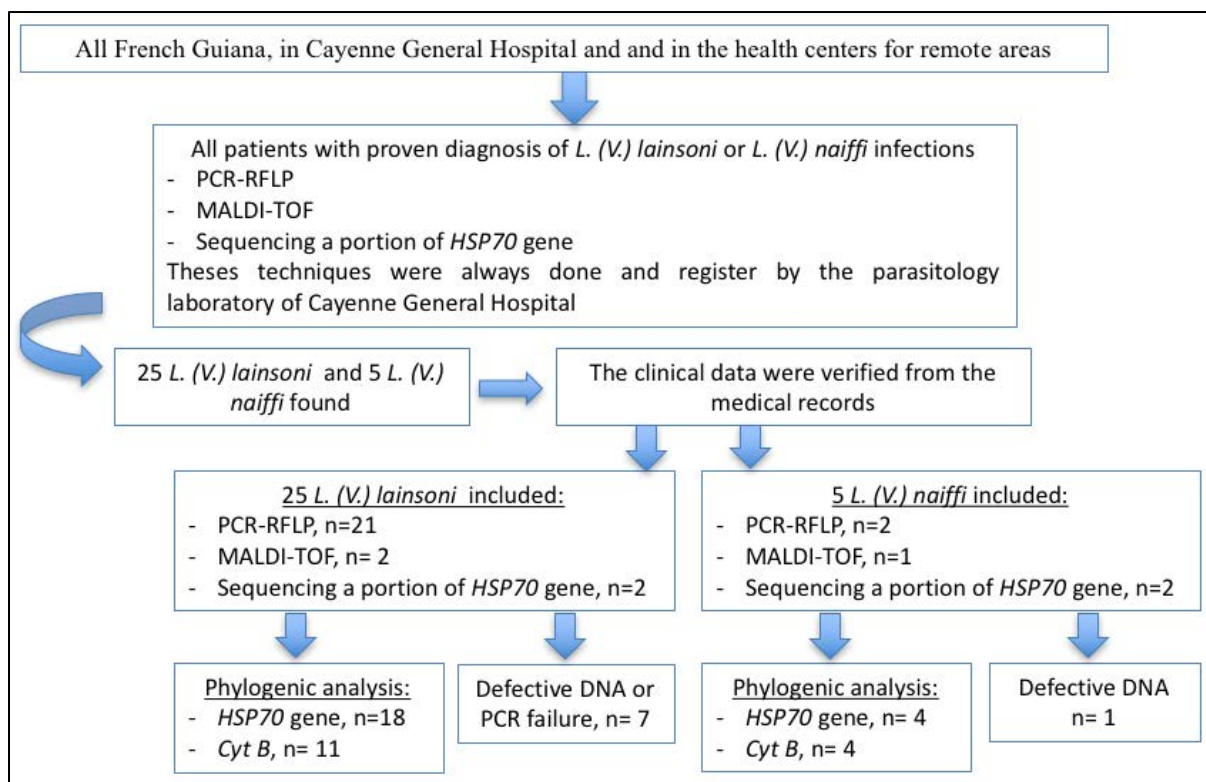


Figure 1. Flow-chart of the study

Study variables

The study variables were collected from medical records of the dermatology and parasitology departments of the Cayenne hospital as follows: age, sex, birth and living places, site of possible contamination, profession and clinical factors: immunodeficiency disease, clinical presentation, number and diameter of lesions, time of evolution before diagnosis, lymphadenopathy and treatment. Places of contamination were classified as in previous studies, by dividing French Guiana in four main regions (5): Coastal region, Maroni region, Center region and Oyapock region.

Leishmania species identification

Due to the presence of several *Leishmania* species in French Guiana and the clinical implications of species identification, several techniques have been developed during the last decade to improve the speed and precision of parasitic diagnosis. Since 2005, the development of a PCR-RFLP technique targeting a 615-bp region of the RNA polymerase II gene has allowed a precise species identification of most cases of cutaneous leishmaniasis. (5,27). Since 2016, another technique based on MALDI-TOF has been developed and allows species identification on positive skin biopsy cultures, even when PCR-RFLP is not

contributive (29). Since 2018, PCR-RFLP has been replaced by a gene sequence analysis of heat-shock protein 70 (*HSP70*) after PCR on swab samples (28). Sampling with swabs replaced skin biopsies after 2018, as a superior sensitivity was established in several studies throughout South America (30–32).

A retrospective research was performed to retrieve all samples of *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni* identified since 2007 with any of these three techniques (**Figure 1**). For all retrieved strains and DNA samples, a diagnostic confirmation was then obtained by PCR and sequencing of the same portion of the *HSP70* and *cyt b* genes (**Figure 1**).

DNA extraction and PCR amplification for *Leishmania* identification

DNA extraction was performed using QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Primers Hsp70sen (5'-GACGGTGCCTGCCTACTTCAA-3') and Hsp70ant (5' CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3') (28) were used to amplify *HSP70* fragment. PCR conditions were 95°C for 5 min. following by 35 cycles of 95°C for 1min, 60°C for 1min and 72°C for 1.5min, with a final extension at 72°C for 5min. For the *cyt b* gene, LCBF1 (5'-GGTGTAGGT TTTAGTTTAGG3') and LCBR2 (5'-CTACAATAAACAAATCATAATATAACAATT-3') (33) were used with the following PCR conditions: 95°C for 5 min. and 35 cycles of 95°C for 1min, 58°C for 1min and 72°C for 1.5min, with a final extension at 72°C for 5min. PCR products were checked using the 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) and were sent to Eurofins (Ivry sur seine, France) for sequencing. Obtained gene sequences were subjected to BLASTn on GenBank (NCBI web site) to search similarity with the *Leishmania* sequences.

Sequences alignment and phylogenetic analyses

The sequences were aligned by using CLUSTALX 2.1 software. Using MEGA software 7.0 (Penn State University, PA, USA), a phylogenetic tree was then built for each gene. Distances from nucleotide sequences were estimated with the Kimura-2 parameter model (34), and trees were built with the maximum likelihood (ML) method and bootstrap resampling was used across 1000 replicates.

The database for phylogenetic analyses consisted of *HSP70* gene sequences from *L. (V.) lainsoni* (GenBank accession number: FN395047; FN395049; LN907839; GU071179; FN395050), *L. (V.) naiffi* (FR872767; GU071183; FN395056; KX573968), *L. (V.) guyanensis* (FN395052), *L. (V.) braziliensis* (FN395043) *L. (L.) donovani* (KX061893), *L. (L.) infantum*

(JX021433), *L. (L.) tropica* (KX061899), *L. (V.) peruviana* (EU599089), *L. (L.) amazonensis* (EU599090), *L. (L.) major* (HF586346), *T. cruzi* (KC959990).

The database for phylogenetic analyses consisted of *cyt b* gene sequences from *L. (V.) lainsoni* (GenBank accession number: LC153271), *L. (V.) naiffi* (LC153257), *L. (V.) guyanensis* (AB095969), *L. (V.) braziliensis* (AB095967), *L. (V.) panamensis* (AB095968), *L. (L.) amazonensis* (EF579902), *T. vivax* (KM386446).

Lastly, sequence genetic diversity and haplotype diversity were calculated for *cyt b* and *HSP70* genes using DNAsp v.5.0 (23).

Statistical analysis

The relationship between clinical-demographic variables and the infecting *Leishmania* species was analyzed using Fisher's exact test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (v 6.01, San Diego, USA) with a significance bilateral threshold of 0.05.

RESULTS:

Identification of *Leishmania* species

Between 01/01/2003 and 01/05/2019, five cases of *L. (V.) naiffi* and 25 cases of *L. (V.) lainsoni* were diagnosed in French Guiana. Concerning *L. (V.) naiffi*, all cultures were positive and the initial species identification was made by PCR-RFLP in two patients, MALDI-TOF in one of them and by *HSP70* gene sequencing in two others. These results were later confirmed by sequencing analysis performed on a fraction of *HSP70* gene for four patients (**Figure 1**). For one of them, PCR failed and a subsequent phylogenetic analysis was not achievable.

Concerning *L. (V.) lainsoni*, 14 (56%) cultures were positive, seven were negative and this information was missing for four patients. Species identification was performed by PCR-RFLP for 21 patients, by MALDI-TOF for two and by sequencing a portion of *HSP70* gene for two patients. Sequencing analysis performed on a fraction of *HSP70* gene confirmed the results for 18 patients (**Figure 1**). Amplification of *HSP70* gene failed for 7 of these samples. Concerning phylogenetic analysis of *cyt b*, amplification was achievable for 4 patients with *L. (V.) naiffi* and 11 samples of *L. (V.) lainsoni* (**Figure 1**)

L. (V.) naiffi and L. (V.) lainsoni had distinct clinico-epidemiological features (Table 1)

Between 2003 and 2019, thirty patients were included: five with a proven diagnosis of *L. (V.) naiffi* and twenty-five of *L. (V.) lainsoni*. The median age of the 30 patients at diagnosis was 33,5 years [range 0 to 63] and the sex ratio was 1,5 (18 men/12 women). Most patients were born in Brazil (n=17, 57%), followed by patients born in French Guiana (n=5, 17%) and French mainland (n=5, 17%).

Patients infected by *L. (V.) lainsoni* were significantly more frequently born in Brazil than in French territory (including French mainland, French Guiana and French Caribbean) (p=0,005). Eight of the 30 patients (27%) patients had an outdoor occupational profession, 20% were gold miners, 3% foresters and 3% military. For nine patients (30%), professional data were missing. Concerning *L. (V.) naiffi*, none of the five-recorded patients worked as a gold miner. Only one of them belonged to the military and was likely to work in primary forest. In total, the Maroni region was the most frequent site of probable contamination (n=15, 50%), followed by the coastal region (n=9, 30%), then the center region (n=4, 13%) and the Oyapock region (n=2, 7%). The site of possible contamination was exclusively the coastal region (100%) for *L. (V.) naiffi* and mostly the Maroni region for *L. (V.) lainsoni* (60%) (p=0,001).

HIV serology was positive for two patients infected with *L. (V.) lainsoni* but for none of the patients infected with *L. (V.) naiffi*. These two patients had several large lesions up to 4cm and 3cm respectively.

The median duration of symptoms before diagnosis was two months [range 0.5 - 59]. The lesions were mainly ulcers (80%), involving uncovered areas. *L. (V.) lainsoni* was more frequently responsible for multiple lesions (11 cases) than *L. (V.) naiffi* (0 case). Indeed, for *L. (V.) naiffi*, a mild clinical course was usually observed, with no regional lymph node; only one lesion per patient was described, involving exclusively the limbs. Socio-demographic and clinical characteristics of patients infected by *L. (V.) naiffi* are detailed in **Table 2**. There was no case of mucosal involvement in the study population.

Tableau 1 - Main findings according to *Leishmania* species

| Characteristics | Total n=30 | <i>Leishmania naiffi</i> n=5 | <i>Leishmania Lainsoni</i> n= 25 |
|---|---------------|---------------------------------|---|
| Sex, n (%) | | | |
| <i>Male</i> | 18 (60) | 5 (100) | 13 (52) |
| <i>Female</i> | 12 (40) | 0 (0) | 12 (48) |
| Place of Birth, n (%) | | | |
| <i>French mainland</i> | 5 (17) | 3 (60) | 2 (8) |
| <i>French Guiana</i> | 5 (17) | 1 (20) | 4 (16) |
| <i>French Caribbean</i> | 1 (3) | 1 (20) | 0 (0) |
| <i>Brazil</i> | 17 (57) | 0 (0) | 17 (68) |
| <i>Surinam</i> | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Other</i> | 1 (3) | 0 (0) | 1 (4) |
| <i>Unknown</i> | 1 (3) | 0 (0) | 1 (4) |
| Occupation, n (%) | | | |
| <i>Gold miner</i> | 6 (20) | 0 (0) | 6 (24) |
| <i>Forester</i> | 1 (3) | 0 (0) | 1 (4) |
| <i>Military</i> | 1 (3) | 1 (20) | 0 (0) |
| <i>Other</i> | 13 (43) | 4 (80) | 9 (36)* |
| <i>Unknown</i> | 9 (30) | 0 (0) | 9 (36) |
| Age at diagnosis | | | |
| Median (range) (y) | 33,5 (0-63) | 39 | 31 (0-63) |
| < 16, n (%) | 5 | 0 (0) | 5 (20) |
| ≥16, n (%) | 25 | 5 (100) | 20 (80) |
| Site of probable contamination | | | |
| <i>Coastal region</i> | 9 (30) | 5 (100) | 4 (16) |
| <i>Maroni region</i> | 15 (50) | 0 (0) | 15 (60) |
| <i>Center region</i> | 4 (13) | 0 (0) | 4 (16) |
| <i>Oyapock region</i> | 2 (7) | 0 (0) | 2 (8) |
| Time of evolution before diagnosis, median (range) (m) | 2 (0,5 – 59) | 2 (1 – 59) | 1,75 (0,5 – 7) |
| Type of lesion, n (%) | | | |
| <i>Ulcer</i> | 24 (80) | 4 (80) | 20 (80) |
| <i>Papule</i> | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Nodule</i> | 3 (10) | 1 (20) | 2 (8) |
| <i>Plaque</i> | 0 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Unknown</i> | 3 (10) | 0 (0) | 3 (12) |
| Number of lesions, n (%) | | | |
| <i>Unique</i> | 17 (57) | 5 (100) | 12 (48) |
| <i>Two</i> | 7 (23) | 0 (0) | 7 (28) |
| ≥3 | 4 (13) | 0 (0) | 4 (16) |
| <i>Unknown</i> | 2 (7) | 0 (0) | 2 (8) |
| Localization, n (%) ** | | | |
| <i>Head/Neck</i> | 4 (12) | 0 (0) | 4 (16) |
| <i>Trunk</i> | 0 | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Upper limbs</i> | 14 (42) | 3 (60) | 11 (44) |
| <i>Lower limbs</i> | 14 (42) | 2 (40) | 12 (48) |
| <i>Unknown</i> | 1 (3) | 0 (0) | 1 (4) |
| Regional lymph node, n (%) | 7 (23) | 1 (20) | 6 (24) |
| Lymphangitis, n (%) | 2 (7) | 0 (0) | 2 (8) |
| First line treatment, n (%) | | | |
| <i>Abstention</i> | 5 (17) | 3 (60) | 2 (8) |
| <i>Pentamidine</i> | 16 (53) | 2 (40) | 14 (56) |
| <i>Meglumine antimoniate</i> | 1 (3) | 0 (0) | 1 (4) |
| <i>Liposomal amphotericin</i> | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| <i>Unknown</i> | 8 (27) | 0 (0) | 8 (32) |

* 5 patients were children; others included one teacher, one medical resident, one was build worker, and one patient had no job; ** Some patients had multiples lesions

Therapeutics and follow-up data

L. (V.) lainsoni

The first line therapy was pentamidine for 14 (56%) of patients, meglumine antimoniate (mean dose of 20 mg antimony/kg/day) for one and abstention for two patients (**Table 1**). During the follow-up, six patients (35%) required a second therapeutic line by a new injection of pentamidine for five patients and meglumine antimoniate for one.

Leishmania (Viannia) naiffi

Two subjects were initially treated with pentamidine and three individuals were initially not treated. One patient experienced a poor response to pentamidine therapy and required a second line by meglumine antimoniate (mean dose of 20 mg antimony/kg/day) therapy (**Table 2**).

Tableau 2 - Demographic and clinical data of patients infected with *Leishmania (Viannia) naiffi*

| Patient ID | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| Gender | M | M | M | M | M |
| Place of Birth | French mainland | French mainland | French Caribbean | French Guiana | French mainland |
| Age at diagnosis | 38 | 57 | 39 | 53 | 39 |
| Occupation | Teacher | Military | Building and public work | Office worker | Deliverer |
| Site of probable contamination | Coastal region (St Laurent du Maroni) | Coastal region (Primary forest) | Coastal region (Cayenne) | Coastal region (Regina) | Coastal region (Remire Montjoly) |
| Time-to-diagnosis, months | 2 | 1 | 59 | 2 | 3 |
| Number of lesion, (n) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Semiology | Ulcer | Ulcer | Nodule | Ulcer | Ulcer |
| Localization | Upper limb | Lower limb | Upper limb | Upper limb | Lower limb |
| Adenopathy | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lymphangitis | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| First line treatment | Abstention | Pentamidine | Pentamidine | Abstention | Abstention |
| Outcome | Cure | Cure | Failure | Cure | Cure |
| Second line treatment | None | None | Meglumine antimoniate | None | None |
| Outcome | - | - | Cure | - | - |

A high rate of pediatric cases was observed with *L. (V.) lainsoni*

L. (V.) lainsoni presented a high rate of pediatric cases. Indeed, five patients (20%) were children (<16 years old) (**Table 1**), with three children under two years old. They were predominantly born in French Guiana (4/5) and one in Brazil. Three Boys and two girls were affected. They lived preferentially in rural areas, two on gold mining sites near the Maroni river, one at Saint-Elie, one at Cacao and the last one at Saint-Laurent. Their places of living were the presumptive contamination sites. Children presented a median of one lesion per patient [range: one to three]. Time-to-diagnosis was less than three months for all children. Ulcers were the unique lesion type with presence of regional lymph node in two patients. Two children presented lesions located on the head. Among the five children, three were initially treated with a unique pentamidine injection with a healing of cutaneous lesions. The youngest child was not treated (with self-disappearance of lesions) and the last one was lost to follow-up.

Phylogenetic analysis finding

We performed sequencing analysis on a fraction of *HSP70* gene for four *L. (V.) naiffi* and 18 *L. (V.) lainsoni*. Concerning *cyt b* gene analysis, four *L. (V.) naiffi* and 11 *L. (V.) lainsoni* were studied (**Figure 1**). These sequencing analysis confirmed the identification made by PCR-RFLP and MALDI-TOF.

The sequences obtained from the *HSP70* and *cyt b* genes were aligned and a robust phylogenetic reconstruction was carried out. The results with *HSP70* showed differentiated clusters corresponding to *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni*, which were also, separated from all other *Leishmania* species (**Figure 2**). It was also possible to show that within the clusters of *L. (V.) lainsoni* and *L. (V.) naiffi*, intra-species divergence occurred (**Figure 2**).

The common term of haplotype is a specific group of mutations or a collection of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in the orthologous gene of the parasite. The diversity analysis performed for the *HSP70* gene, in 24 and 8 sequences analyzed, showed a total of 3 and 23 polymorphic sites and 3 and 23 mutations for *L. (V.) lainsoni* and *L. (V.) naiffi* respectively (**Table 3**). Based on the haplotype (Hd) and nucleotide diversity indexes (π), for each species, *L. (V.) naiffi* showed a higher genetic diversity (Hd = 0,893) and nucleotide diversity ($\pi = 0,00519$), than *L. (V.) lainsoni*, which showed a moderate genetic diversity (Hd = 0,598) and nucleotide diversity ($\pi = 0,00055$) (**Table 3**). Regarding the *cyt b* gene, haplotype and nucleotide diversity indexes also revealed that *L. (V.) naiffi* had higher values

(Hd = 0,700, π = 0,00357), compared to *L. (V.) lainsoni* (Hd = 0,318, π = 0,00132) (**Table 3**).

Table 3. Genetic diversity parameters of *Leishmania HSP70* and *Cyt b* genes sequences

| <i>HSP70</i> gene | | | | | | |
|-------------------------|----|----|-----|-------|---------|-------|
| Species | N | S | Eta | Hd | π | K |
| <i>L. (V.) Lainsoni</i> | 24 | 3 | 3 | 0,598 | 0,00055 | 0,688 |
| <i>L. (V.) naiffi</i> | 8 | 23 | 23 | 0,893 | 0,00519 | 6,464 |
| <i>Cyt b</i> gene | | | | | | |
| Species | N | S | Eta | Hd | π | K |
| <i>L. (V.) Lainsoni</i> | 12 | 5 | 5 | 0,318 | 0,00132 | 1,106 |
| <i>L. (V.) naiffi</i> | 5 | 7 | 7 | 0,700 | 0,00357 | 3,000 |

N = Number of sequences. S = Number of polymorphic sites.

Eta = Total number of mutations.

Hd = Haplotype diversity. π = Nucleotide diversity.

K = Average number of nucleotide differences.

For *L. (V.) naiffi*, the sequences obtained with *HSP70* were closed to Brazilian strains (cluster I). We noticed that patient n°2 corresponding to cluster II (light blue shading) differed from the others and from the Brazilian strains, individualizing two different genotypes within *L. (V.) naiffi* (**Figure 2**). Analysis with *cyt b* gene supports these results (**Supplementary Figure S1**).

For *L. (V.) lainsoni*, phylogenetic analysis performed with *HSP70* gene highlighted two profiles, cluster III (red) constituted by seven patients and cluster IV (yellow) constituted by eleven patients (**Figure 2**). These two clusters were distinguished by a mutation concerning a single nucleotide c.675G>A (**Supplementary Figure S2**).

Cluster III strains were similar to strains from Peru, Brazil and Bolivia. Conversely, cluster IV was only made by French Guiana strains. Though phylogenetic analysis with *cyt b* did not yield any significant results due to poorly successful PCR, there were no clearly discordant results between phylogenetic trees obtained with *Hsp70* and *cyt b*. (**Supplementary Figure S1**). Patients from cluster III were contaminated along the Maroni and the Oyapock rivers for five and two patients respectively. In cluster IV, the site of probable contamination was the coastal region and the center region for four and two patients respectively, and the Maroni river for five patients. The sites of probable contamination of all different clusters are detailed in **Figure 3**.

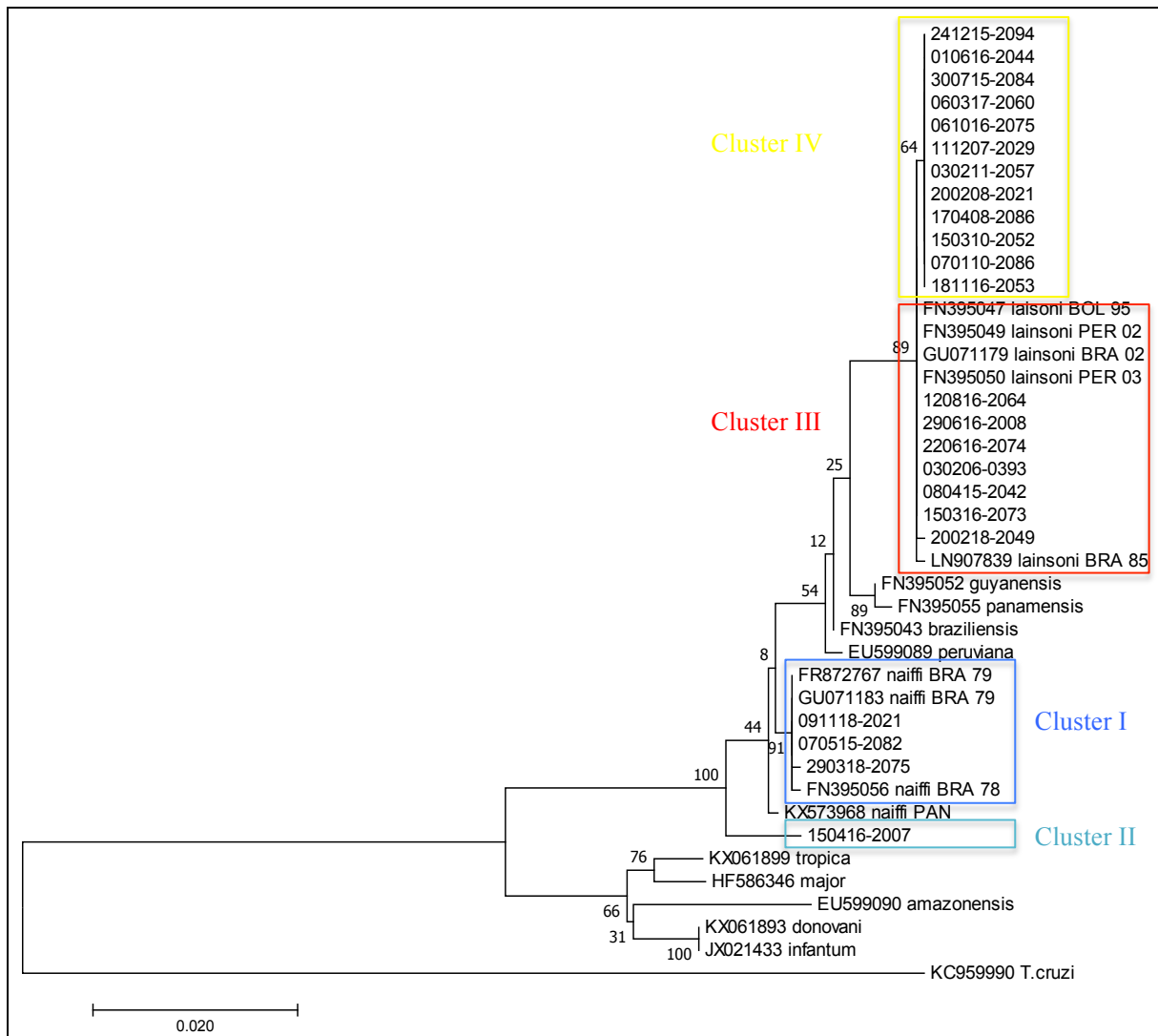


Figure 2. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method for HSP70

The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model (35). The tree with the highest log likelihood (-3176.92) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 42 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 1242 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (36).

Dark blue shading represents patients from cluster I; Light blue shading represents patients from cluster II.

Red shading indicates patients from cluster III and yellow shading indicates patients from cluster IV. A patient from cluster IV has two strains analyzed.

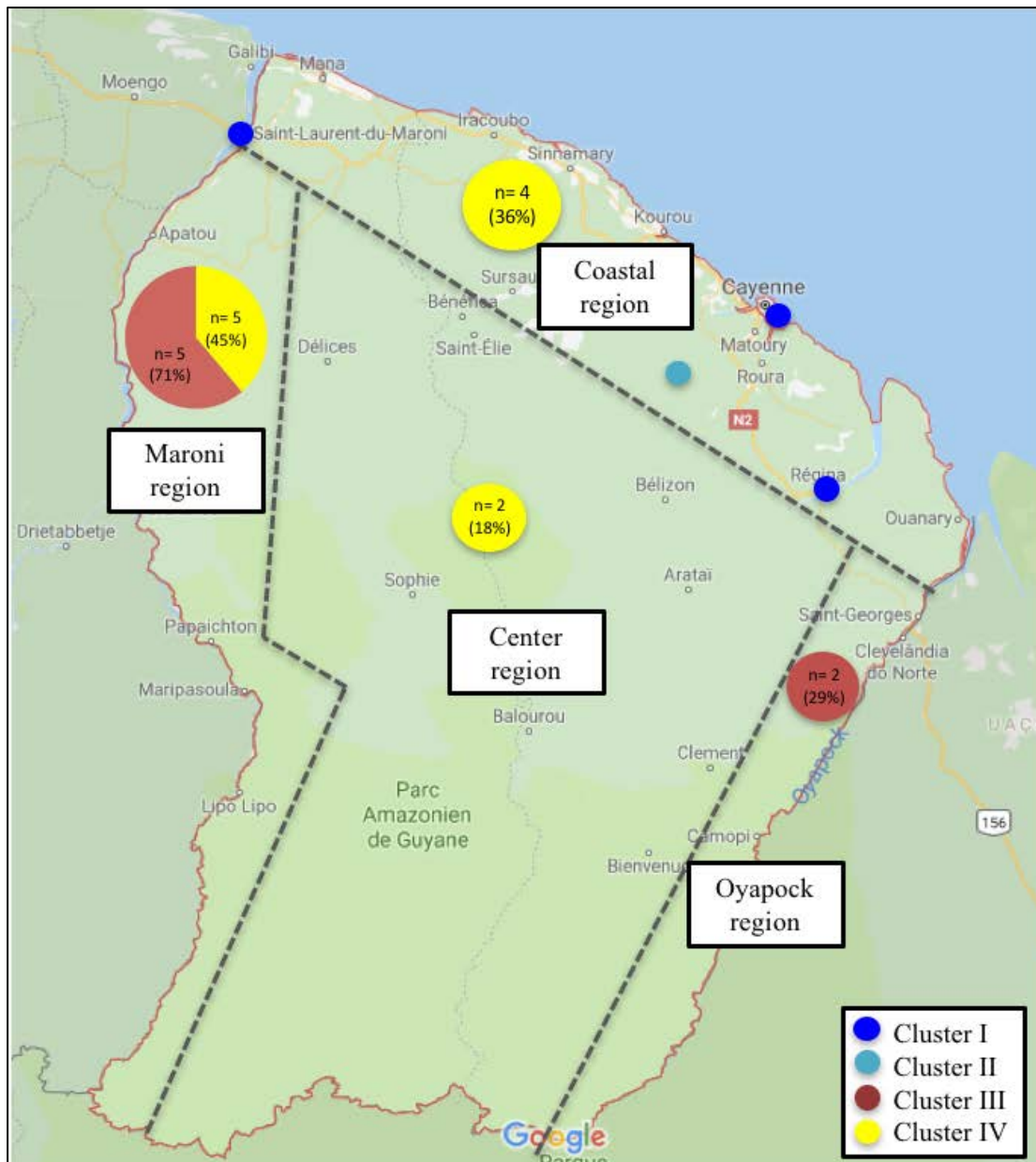


Figure 3. Geographical distribution of the different genotypes within the 18 *L. (V.) lainsoni* and the 4 *L. (V.) naiffi* in French Guiana (drawn with Google Maps software, Google Inc. Mountain View, CA)

Each dark blue circle represents one patient from the cluster I. The light blue circle represents the only patient from cluster II. The exact contamination site of the only patient from cluster II is uncertain, but is located somewhere in the primary forest of the coastal region.

DISCUSSION

So far, *Leishmania Viannia lainsoni* and *naiffi* had not been strongly evaluated. This study offers new comprehensive data concerning the clinico-epidemiological features of CL due to *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni* in French Guiana.

French Guiana is divided in two different ecological regions, the hinterland covered by primary rain forest, where small gold mines and Amerindian villages are the only human settlements. On the other hand, the coastal region covers the north of the territory and is more anthropized (6,37,38). Interestingly, our results suggest distinct socio-epidemiological features for *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni*. The analysis of species at the regional level showed different patterns of geographic distribution between *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni*. In fact, patients seemed to get infected with *L. (V.) naiffi* during leisure activities in anthropized coastal areas, while *L. (V.) lainsoni* seemed to be acquired during professional activities (such as gold mining) in primary forest regions (37). *L. (V.) lainsoni* was also reported mainly in rain forest regions in Peru (39).

Besides, our cohort of *L. (V.) naiffi* comprised no Brazilian patient and no gold miner, though Brazilian gold miners are known to make up most of the population of CL in French Guiana (5,38). On the other hand, infections with *L. (V.) lainsoni* involved Brazilian patients in 68% of cases. Only 24% declared themselves as gold miners, but this activity was probably under-declared, as it is illegally performed on French territory. Therefore, the epidemiology of *L. (V.) lainsoni* in French Guiana seems to present epidemiological features that are very similar to *L. (V.) guyanensis* or *L. (V.) braziliensis* (4,5,7,40).

A mild clinical course was observed for all cases of *L. (V.) naiffi* in this study. These findings are supported by experimental studies showing that *L. (V.) naiffi* frequently causes discrete or even non-apparent infections on hamsters' skin (9). In vitro analysis have also demonstrated that *L. (V.) naiffi* had the lowest infection index and the highest nitric oxide production compared with other species of the *Viannia* subgenus and consequently was possibly less pathogenic in human than other species (41). Only one patient had a chronic presentation with an ulcerated lesion that had progressed for 59 months before the isolation of *L. (V.) naiffi*.

It is also possible that *L. (V.) naiffi* infection is under diagnosed, as patients with self-limited skin problem may not present themselves in medical consultation. Besides, the arrivals of new techniques such as sequencing analysis allow a better identification and consequently more

cases of *L. (V.) naiffi* could be expected. Indeed, *L. (V.) naiffi* could be improperly identified in previous studies.

Conversely, *L. (V.) lainsoni* appears to be responsible for a louder clinical course than *L. (V.) naiffi*. Indeed, 44% of patients had more than one lesion and a lymphangitis was present for 24% of them. Clinical data on *L. (V.) Lainsoni* in the literature are scarce. It has been reported that *L. (V.) Lainsoni* causes small single cutaneous ulcers similarly to other *Leishmania* parasites belonging to the *Viannia* subgenus (18,26). Recently, atypical manifestation with crusting scab that presented irregular edges has been reported in one patient in Peru (42).

To date, *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) Lainsoni* have never been incriminated in mucosal involvement (12–15,18,19,26). Our data seem to support these findings.

Interestingly, *L. (V.) Lainsoni* appears to be associated with a high rate of pediatric cases, n=5. In the literature, one case of CL in children under 12 years old caused by *L. (V.) Lainsoni* was reported in Manaus, Brazil (43). Information on the clinical spectrum, burden and efficacy of treatment for CL in children is scarce. In our cohort, 3/5 children lived in particular exposed areas, near gold mining sites where deforestation occurs and vectors are brought close to human dwellings (44). The immune response may differ in adults and children. It has been reported that children with CL showed exaggerated delayed-type hypersensitivity. This form of cellular immunity is related to a long time of exposure in children living in endemic zones (44,45). The presence of an intra-familial CL case was found to be an important risk factor (46). However, there was no element in our data to support the hypothesis of intra-domiciliary contamination, as all patients belonged to different families. However, ancient infections in parents could have been unnoticed. Several studies make the assumption that adults could serve as both the reservoir and the source of infection for children (46). Concerning the other clinical features of *L. (V.) lainsoni*, our results were similar to previous reports, the predominant presentation being a unique ulcer, localized on the face or the extremities (44,45,47).

Among the 4 children with available data on treatment, one had a spontaneous healing and three were cured with pentamidine, contrasting with several studies which reported high proportions of treatment failure (48–50). Additionally, initial treatment by meglumine antimoniate has been reported as a risk factor of therapeutic failure in children (49), which primarily stems from a higher antimony clearance rate (51). Our data may suggest that pentamidine could be an adequate treatment for pediatric CL with *L. (V.) lainsoni*.

Concerning therapeutic data in adults, only one patient with *L. (V.) naiffi* presented a therapeutic failure with pentamidine and required meglumine antimoniate. This patient had particular clinical features with a chronic leishmaniasis presentation. The other patients had benign clinical course with spontaneous healing or after pentamidine, as reported in several series (12–15). Recent reports suggested that *L. (V.) naiffi* could be resistant to usual treatment, with a poor response to meglumine antimoniate or pentamidine therapy (16,17). Goncalves et al. (17) discussed the possible association between poor therapy response and the presence of the *Leishmania* RNA virus that could contribute to increased parasite virulence by reducing the sensitivity to oxidative stress (52). Further studies are needed to understand the factors associated with treatment failure.

Regarding *L. (V.) Lainsoni*, therapeutic data in the literature are lacking. In our cohort, the first line therapy was pentamidine for 14 (56%) of patients. Among these patients, 10 were cured or had a partial amelioration, one had no improvement and the data are missing for three patients. Our data seems to indicate a pentamidine-sensitive disease.

Phylogenetic analysis of 4 and 18 cases of *L. (V.) naiffi* and *lainsoni* respectively offers new insight on their intra-species genetic variability. In this study, we used *HSP70* and *cyt b* genes sequencing to study genetic diversity among *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni*. Sequencing of these two targets identified higher intra-species variability in *L. (V.) naiffi* than for *L. (V.) lainsoni* (**Table 3**). In a previous study, estimates of divergence among five different species also identified *L. (V.) naiffi* as the most polymorphic one (53). However, these findings should be confirmed with a higher number of samples.

When examining possible associations of the genotypic groups with epidemiological and geographical data, several links could be observed. We noticed that the only patient from cluster II (patient 2) belonged to the military and consequently worked in primary forest and could be infected on his workplace, whereas patients from cluster I were contaminated in the coastal region during leisure activities. These two distinct *L. (V.) naiffi* population observed may have originated in two different ecologically regions with different vectors or reservoirs. Indeed, the coastal region is typically divided in multiple distinct ecotopes such as beaches, mangroves, coastal swamps, and small patches of primary rainforests. It has been reported in Ecuador that the peri-domiciliary ecotope showed higher diversity of sand flies and higher number of infected sand flies than the forest ecotope (54) due to the high diversity of blood sources (such as humans, chickens, cows, and dogs) available on the coast (55). It is therefore essential to determine if domesticated animals are reservoirs of this disease, as the risk of

infection would be higher in these areas than in the forest.

While patient 2 remained separated, strains from Cluster I were closely related to previously published Brazilian ones. However, clinical features could not be compared with previous works as these studies did not mention any symptom or therapeutic response (53,56,57). As for Panamanian strains, to the best of our knowledge, human infection with *L. (V.) naiffi* has not yet been reported in Panama, all strains being isolated in animals. Thus, we were not able to compare these strains and shed light on their different phylogenetic profiles.

Concerning *L. (V.) lainsoni*, cluster III strains were similar to their counterparts from Peru, Brazil and Bolivia, while cluster IV was made up only by French Guiana strains. We noticed that in cluster IV, the site of probable contamination was the coastal region and the center region for four and two patients respectively, whereas these regions were never involved in patients from cluster III, who all got infected along the Maroni and the Oyapock, these two rivers being the natural borders between French Guiana, Surinam and Brazil. Therefore, a genetic proximity with Brazilian strains could be expected. Indeed, it has been suggested that a degree of similarity was higher between strains whose geographical origins were closer (58). Unfortunately, there was no available sequence from Surinam to allow a genetic comparison of the Maroni strains. These results may suggest the existence of specific strains of French Guiana (Cluster IV), along with a trans-border circulation of less specific ones (Cluster III). However, we report no clinical, epidemiological or therapeutic difference between these two clusters of *L. (V.) lainsoni*.

However, the fact remains that the different clinical expressions of CL depend on both intra-species genetic diversity of *Leishmania* and host immune status (59). In addition to the intra-species genetic variability of *Leishmania*, host immune reaction performs a significant function in the clinical presentation of CL. For instance, patients with T cell defect frequently present an anergic condition named anergic diffuse CL characterized by multiple nodular lesions full of amastigotes (60).

Among *Viannia* parasites, reports have indicated that genetic variations were extensive, with some clones widely distributed and others localized to a particular endemic focus, with specific transmission cycles, probably reflecting an adaptation of different clones to the vector species involved (61,62). Other results have suggested that their distribution was related to the origin of the gene pool as well as to present vector and reservoir movements (63). The genetic polymorphism among strains of *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni* could be associated with the

eco-epidemiology of the areas, as reported for *L. (V.) braziliensis* (62,63). These findings should be confirmed with a higher number of positive samples for these species.

Epidemiological features reported in his study suggest that *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni* circulate in two ecologically different regions, an hypothesis which is supported by several studies of vectors and reservoirs in South America. Indeed, *L. (V.) naiffi* has been isolated from the nine-banded armadillo, *Dasypus novemcinctus* (9,11) and has been associated with a number of different sand fly species in Brazil: *Lutzomia (Lu.) ayrozai*, *Lu. paraensis*, *Lu. squamiventris* (9,11,64,65), *Lu Tortura* in Ecuador (66) and only one so far, in French Guiana *Lu. squamiventris*, (67). The *Lu. (Psy.) squamiventris maripaensis* female was collected in the savanna area of Sinnamary (67), in the coastal region, which reinforce our results and our idea that *L. (V.) naiffi* transmission occurs mostly on the coast of French Guiana.

L. (V.) lainsoni was first isolated from a wild mammal in 1991, from the Agouti paca (*Rodentia: Dasyproctidae*), in the state of Pará, Brazil (68) Natural infections with *L. (V.) lainsoni* in sand flies have been detected in *Lu. ubiquitalis* in primary forest of Brazil and Ecuador (54,69,70), in *Lu . nuneztovari anglesi* in Bolivia (20), and in *Lu . auraensis* particularly abundant in the southeastern rainforest in Peru (71). Though vectors of *L. (V.) lainsoni* have not yet been identified in French Guiana, reports from neighboring countries offer explanations to our epidemiological features, *L. (V.) lainsoni* being well adapted to primary forest environments and therefore likely to infect gold miners working in these settings.

There are several limitations to our study. We conducted a retrospective inclusion and the number of our patients remained small, which did not allow us to perform a thorough statistical analysis. Besides, clinical data of patients seen in remote health centers were filed in by general practitioners and not by dermatologists, inducing a possible bias. Missing data regarding outcome after treatment limited our results. Indeed, most of illegal gold miners are Brazilian, from the poorest states of Brazil with difficult access to health care (72). Besides, this population is characterized by a high level of self-medication with many drugs circulating on the black market (72). Finally, correlations between clinical data and genetic features must always be interpreted with caution, particularly when dealing with small-size samples. A larger study with more genetic markers could unravel more of the intra-species genetic diversity.

Despite these limitations, this study reports important clinico-epidemiological features of these two rare *Leishmania* species and bring new insight into the intra-species genetic

variability. To our knowledge this is the largest study covering the cases of *L. (V.) lainsoni* and the first study analyzing the genetic diversity of these species in French Guiana. These findings will be of great help to enhance the management of CL to *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni* in French Guiana and to develop new studies. For further studies, it is mandatory to conduct Whole Genome or Exome Sequencing of these parasites to obtain a suitable picture of intra-species variability.

CONCLUSION

L. (V.) naiffi and *L. (V.) lainsoni* are significantly present in French Guiana and probably across South America. Our data suggest distinct socio-epidemiological features for these two *Leishmania* species. Patients seem to get infected with *L. (V.) naiffi* during leisure activities in anthropized coastal areas, while *L. (V.) lainsoni* shares common clinical and epidemiological features with *L. (V.) guyanensis* and *brasiliensis* and seem to be acquired during professional activities in primary forest regions. *L. (V.) lainsoni* seems to infect children more frequently than other species, a feature that deserves further investigation. A mild clinical course was observed for all cases of *L. (V.) naiffi*.

Phylogenetic analysis has given new insights into the complexity of these populations, by providing information on the possible ecology of these *Leishmania* species. Consequently, determination of vector–parasite–reservoir relationships is needed to understand the transmission dynamics of these species and implement control strategies. We showed the identification of different genotypes within *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lainsoni* and how these genotypes are distributed at the geographic level.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work did not receive any special funding.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: RB, MD and OD

Formal Analysis: RB and OD performed statistical analysis; SS, CN, MG and RB performed molecular analysis.

Investigation: SS, CN and MG performed biological experiments; OD, RB and PC collected clinical data.

Writing - Original Draft Preparation: OD, SS and RB

Writing - Review and Editing: MD and RB

REFERENCES

1. WHO | Leishmaniasis [Internet]. WHO. [cited 2019 sept 07]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*. 2012;7(5):e35671.
3. Dedet JP. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: a review. *Am J Trop Med Hyg*. 1990 Jul;43(1):25–8.
4. Rotureau B, Couppié P, Nacher M, Dedet JP, Carme B. [Cutaneous leishmaniases in French Guiana]. *Bull Soc Pathol Exot* 1990. 2007 Oct;100(4):251–60.
5. Simon S, Nacher M, Carme B, Basurko C, Roger A, Adenis A, et al. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: revising epidemiology with PCR-RFLP. *Trop Med Health*. 2017;45:5.
6. Dedet JP, Pradinaud R, Gay F. Epidemiological aspects of human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1989 Sep;83(5):616–20.
7. Rotureau B, Ravel C, Nacher M, Couppie P, Curtet I, Dedet J-P, et al. Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) guyanensis* in French Guiana. *J Clin Microbiol*. 2006 Feb 1;44(2):468–73.
8. Couppié P, Clyti E, Sainte-Marie D, Dedet JP, Carme B, Pradinaud R. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. *Am J Trop Med Hyg*. 2004 Nov;71(5):558–60.
9. Lainson R, Shaw JJ. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasyurus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1989;64(1):3–9.
10. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR, Ishikawa EA. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw, 1989. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1990;65(5–6):282–4.

11. Naiff RD, Freitas RA, Naiff MF, Arias JR, Barrett TV, Momen H, et al. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991 Sep;86(3):317–21.
12. Pratloug F, Deniau M, Darie H, Eichenlaub S, Pröll S, Garrabe E, et al. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania naiffi* is wide-spread in South America. Ann Trop Med Parasitol. 2002 Dec 1;96(8):781–5.
13. Van Der Snoek EM, Lammers AM, Kortbeek LM, Roelfsema JH, Bart A, Jaspers CAJJ. Spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania naiffi* in two Dutch infantry soldiers. Clin Exp Dermatol. 2009 Dec;34(8):e889–91.
14. Van Thiel P-PAM, Gool T van, Kager PA, Bart A. First cases of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) naiffi* infection in Surinam. Am J Trop Med Hyg. 2010 Apr;82(4):588–90.
15. Figueira L de P, Soares FV, Júnior RDN, Vinhote-Silva AC, Silva SS da, Espir TT, et al. New human case reports of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) naiffi* in the Amazon region, Brazil. Acta Amaz. 2017 Mar;47(1):47–52.
16. Fagundes-Silva GA, Romero GAS, Cupolillo E, Yamashita EPG, Gomes-Silva A, Guerra JA de O, et al. *Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015 Sep;110(6):797–800.
17. Vieira-Gonçalves R, Fagundes-Silva GA, Heringer JF, Fantinatti M, Da-Cruz AM, Oliveira-Neto MP, et al. First report of treatment failure in a patient with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) naiffi* carrying *Leishmania* RNA virus: a fortuitous combination? Rev Soc Bras Med Trop [Internet]. 2019 Apr 11 [cited 2019 Jul 14];52(0).
18. Silveira FT, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa E. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp. n., a new parasite from the State of Pará. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1987 Jun;82(2):289–91.
19. Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Carrizales D, Kreutzer RD. *Leishmania (Viannia) lainsoni*: first isolation in Peru. Am J Trop Med Hyg. 1994 Nov;51(5):533–7.
20. Bastrenta B, Buitrago R, Vargas F, Le Pont F, Torrez M, Flores M, et al. First evidence of transmission of *Leishmania (Viannia) lainsoni* in a Sub Andean region of Bolivia. Acta Trop. 2002 Sep;83(3):249–53.
21. Van Der Meide WF, Jensema AJ, Akrum RAE, Sabajo LOA, Lai A Fat RFM, Lambregts L, et al. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Suriname: a study performed in 2006. Am J Trop Med Hyg. 2008 Aug;79(2):192–7.

22. Kato H, Bone AE, Mimori T, Hashiguchi K, Shiguango GF, Gonzales SV, et al. First Human Cases of *Leishmania (Viannia) lainsoni* Infection and a Search for the Vector Sand Flies in Ecuador. Taylan Ozkan A, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2016 May 18;10(5):e0004728.
23. Patino LH, Mendez C, Rodriguez O, Romero Y, Velandia D, Alvarado M, et al. Spatial distribution, *Leishmania* species and clinical traits of Cutaneous Leishmaniasis cases in the Colombian army. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Aug;11(8):e0005876.
24. Cupolillo E, Grimaldi Júnior G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol. 1995 Jul;73(1–2):145–55.
25. Eresh S, de Bruijn MHL, Mendoza-León JA, Barker DC. *Leishmania (Viannia) lainsoni* occupies a unique niche within the subgenus *Viannia*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995 Mar;89(2):231–6.
26. Corrêa JR, Brazil RP, Soares MJ. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus--a mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005 Oct;100(6):587–92.
27. Simon S, Veron V, Carme B. *Leishmania* spp. identification by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism analysis and its applications in French Guiana. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010 Feb;66(2):175–80.
28. Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. J Clin Microbiol. 2004 May 1;42(5):2294–7.
29. Lachaud L, Fernández-Arévalo A, Normand A-C, Lami P, Nabet C, Donnadiou JL, et al. Identification of *Leishmania* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Using a Free Web-Based Application and a Dedicated Mass-Spectral Library. Loeffelholz MJ, editor. J Clin Microbiol. 2017 Oct;55(10):2924–33.
30. Adams ER, Gomez MA, Scheske L, Rios R, Marquez R, Cossio A, et al. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. Parasitology. 2014 Dec;141(14):1891–7.
31. Suárez M, Valencia BM, Jara M, Alba M, Boggild AK, Dujardin J-C, et al. Quantification of *Leishmania (Viannia)* Kinetoplast DNA in Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Inter-site and Inter-sampling Variability in Parasite Load. Debrabant A, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Jul 23;9(7):e0003936.

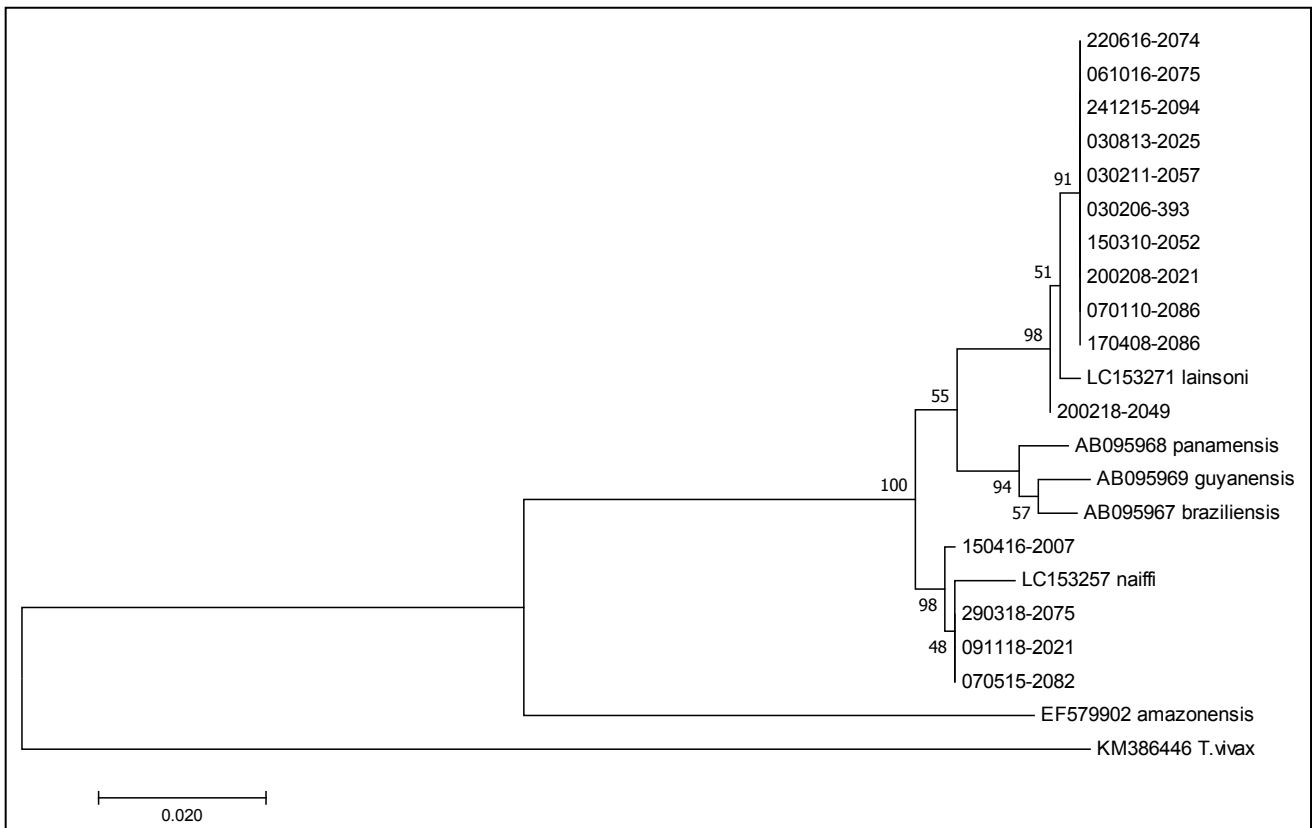
32. Gomes CM, Cesetti MV, de Paula NA, Vernal S, Gupta G, Sampaio RNR, et al. Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real-Time PCR Using Biopsy and Swab Samples To Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where *Leishmania (Viannia) braziliensis* Is Endemic. Fenwick B, editor. J Clin Microbiol. 2017 Feb;55(2):526–34.
33. Luyo-Acero GE, Uezato H, Oshiro M, Takei K, Kariya K, Katakura K, et al. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. Parasitology. 2004 May;128(Pt 5):483–91.
34. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol. 1980 Dec;16(2):111–20.
35. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol. 1993 May;10(3):512–26.
36. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol. 2016 Jul;33(7):1870–4.
37. Rotureau B. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. Am J Trop Med Hyg. 2006 Jan;74(1):81–96.
38. Loiseau R, Nabet C, Simon S, Ginouves M, Brousse P, Blanchet D et al. American cutaneous leishmaniasis in French Guiana: an epidemiological update and a study of environmental risk factors. Int J Dermatol. 2019, In press.
39. Kato H, Cáceres AG, Seki C, Silupu García CR, Holguín Mauricci C, Castro Martínez SC, et al. Further insight into the geographic distribution of *Leishmania* species in Peru by cytochrome b and mannose phosphate isomerase gene analyses. Brodskyn CI, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2019 Jun 20;13(6):e0007496.
40. Martin-Blondel G, Iriart X, El Baidouri F, Simon S, Mills D, Demar M, et al. Outbreak of *Leishmania braziliensis* Cutaneous Leishmaniasis, Saül, French Guiana. Emerg Infect Dis. 2015 May;21(5):892–4.
41. Campos MB, De Castro Gomes CM, de Souza AAA, Lainson R, Corbett CEP, Silveira FT. In vitro infectivity of species of *Leishmania (Viannia)* responsible for American cutaneous leishmaniasis. Parasitol Res. 2008 Sep;103(4):771–6.
42. Rojas-Jaimes J, Rojas-Palomino N, Pence J, Lescano AG. *Leishmania* species in biopsies of patients with different clinical manifestations identified by high resolution melting and nested PCR in an Endemic district in Peru. Parasite Epidemiol Control. 2019 Feb;4:e00095.

43. Dietze R, Talhari S, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, de Oliveira Penna G, et al. Randomized Controlled Clinical Trial to Assess Efficacy and Safety of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2011 Feb 4;84(2):255–60.
44. Paniz-Mondolfi AE, Talhari C, García Bustos MF, Rosales T, Villamil-Gomez WE, Marquez M, et al. American cutaneous leishmaniasis in infancy and childhood. *Int J Dermatol.* 2017 Dec;56(12):1328–41.
45. Delgado O, Silva S, Coraspe V, Ribas MA, Rodriguez-Morales AJ, Navarro P, et al. American cutaneous leishmaniasis in children and adolescents from Northcentral Venezuela. *Trop Biomed.* 2008 Dec;25(3):178–83.
46. Ampuero J, Urdaneta M, Macêdo V de O. Factores de riesgo para la transmisión de leishmaniasis cutánea en niños de 0 a 5 años en un área endémica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Cad Saúde Pública.* 2005 Feb;21(1):161–70.
47. Blanco VM, Saravia NG, Cossio A, Martinez JD. Clinical and Epidemiologic Profile of Cutaneous Leishmaniasis in Colombian Children: Considerations for Local Treatment. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Aug 7;89(2):359–64.
48. Grajalew LF, Ochoa MT, Palacios R, Osorio LE. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Mar 1;64(3):187–93.
49. Castro M del M, Cossio A, Velasco C, Osorio L. Risk factors for therapeutic failure to meglumine antimonate and miltefosine in adults and children with cutaneous leishmaniasis in Colombia: A cohort study. Satoskar AR, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Apr 5;11(4):e0005515.
50. Uribe-Restrepo A, Cossio A, Desai MM, Dávalos D, Castro M del M. Interventions to treat cutaneous leishmaniasis in children: A systematic review. Laouini D, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Dec 14;12(12):e0006986.
51. Cruz A, Rainey PM, Herwaldt BL, Stagni G, Palacios R, Trujillo R, et al. Pharmacokinetics of Antimony in Children Treated for Leishmaniasis with Meglumine Antimonate. *J Infect Dis.* 2007 Feb 15;195(4):602–8.
52. Hartley M-A, Ronet C, Zangger H, Beverley SM, Fasel N. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2012 [cited 2019 Sep 1];2.
53. Da Silva LA, de Sousa CDS, da Graça GC, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania*

- species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2010 Jan;10(1):77–83.
54. Quiroga C, Cevallos V, Morales D, Baldeón ME, Cárdenas P, Rojas-Silva P, et al. Molecular Identification of *Leishmania spp.* in Sand Flies (*Diptera: Psychodidae, Phlebotominae*) From Ecuador. *J Med Entomol.* 2017 Nov 7;54(6):1704–11.
 55. Anaguano DF, Ponce P, Baldeón ME, Santander S, Cevallos V. Blood-meal identification in phlebotomine sand flies (*Diptera: Psychodidae*) from Valle Hermoso, a high prevalence zone for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta Trop.* 2015 Dec;152:116–20.
 56. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin J-C, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2010 Mar;10(2):238–45.
 57. Odiwuor S, Veland N, Maes I, Arévalo J, Dujardin J-C, Van der Auwera G. Evolution of the *Leishmania braziliensis* species complex from amplified fragment length polymorphisms, and clinical implications. *Infect Genet Evol.* 2012 Dec;12(8):1994–2002.
 58. Macedo AM, Melo MN, Gomes RF, Pena SDJ. DNA fingerprints: a tool for identification and determination of the relationships between species and strains of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 1992 Jul;53(1–2):63–70.
 59. Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CEP. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009 Aug;31(8):423–31.
 60. Silveira FT. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2019 May 29;
 61. Cupolillo E, Momen H, Grimaldi Jr G. Genetic Diversity in Natural Populations of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998 Sep;93(5):663–8.
 62. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito MEF, Falqueto A, et al. Genetic Polymorphism and Molecular Epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from Different Hosts and Geographic Areas in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003 Jul 1;41(7):3126–32.
 63. Ishikawa EAY, Silveira FT, Magalhães ALP, Guerra RB, Melo MN, Gomes R, et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002 Apr;96:S111–21.

64. Grimaldi G, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and Classification of Leishmanial Parasites from Humans, Wild Mammals, and Sand Flies in the Amazon Region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 Jun 1;44(6):645–61.
65. Vieira VR, Azevedo ACR, Alves JRC, Guimarães AE, Aguiar GM. Ecological Aspects of Phlebotomine Sand Flies (*Diptera, Psychodidae, Phlebotominae*) in Areas of American Cutaneous Leishmaniasis, in the Municipality of Paraty, Rio de Janeiro, Brazil. I-Index of Abundance by Location and Type of Capture. *J Med Entomol.* 2015 Sep;52(5):886–95.
66. Kato H, Calvopiña M, Criollo H, Hashiguchi Y. First human cases of *Leishmania (Viannia) naiffi* infection in Ecuador and identification of its suspected vector species. *Acta Trop.* 2013 Dec;128(3):710–3.
67. Fouque F, Gaborit P, Issaly J, Carinci R, Gantier J-C, Ravel C, et al. Phlebotomine sand flies (*Diptera: Psychodidae*) associated with changing patterns in the transmission of the human cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Feb;102(1):35–40.
68. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EE, Souza AA. [Cutaneous leishmaniasis in Amazonia: isolation of *Leishmania (Viannia) lainsoni* from the rodent Agouti paca (*Rodentia: Dasyproctidae*), in the state of Pará, Brazil]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1991 Feb;33(1):18–22.
69. Silveira FT, Souza AAA, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EEA. Cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: natural infection of the sandfly *Lutzomyia ubiquitalis (Psychodidae: Phlebotominae)* by *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Pará state, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991 Mar;86(1):127–30.
70. Lainson R, Shaw JJ, Souza AA, Silveira FT, Falqueto A. Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis (Psychodidae: Phlebotominae)*, the sandfly vector of *Leishmania (Viannia) lainsoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1992 Sep;87(3):437–9.
71. Valdivia HO, De Los Santos MB, Fernandez R, Baldeviano GC, Zorrilla VO, Vera H, et al. Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia auraensis* in Madre de Dios, Peru, detected by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Sep;87(3):511–7.
72. Douine M, Mosnier E, Le Hingrat Q, Charpentier C, Corlin F, Hureau L, et al. Illegal gold miners in French Guiana: a neglected population with poor health. *BMC Public Health [Internet].* 2018 Dec [cited 2019 Aug 13];18(1).

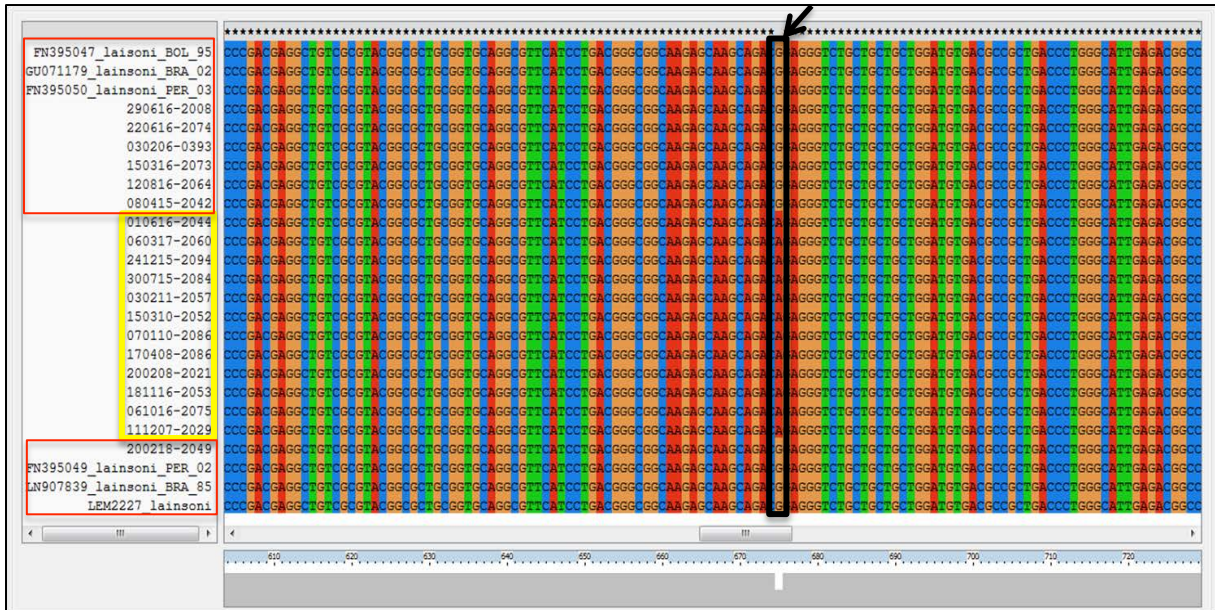
SUPPLEMENTARY DATA



Supplemental Figure S1. Molecular Phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method for *cyt b*

The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura-Nei model (35). The tree with the highest log likelihood (-2154.36) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 22 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 840 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 (36).

Like with *HSP70* gene analysis, it was also possible to show that within the clusters of *L. (V.) naiffi*, intra-species divergence occurred. However there were no significant results with *L. (V.) lainsoni* due to poorly successful PCR.



Supplemental Figure S2. For *L. (V.) lainsoni*, phylogenetic analysis performed with *HSP70* gene highlighted two profiles or haplotypes, cluster III (red). These two haplotypes were distinguished by a mutation concerning a single nucleotide: c.675G>A (black box and arrow).

ARTICLE STATUS

The article is formatted for the journal “Plos Neglected Tropical Disease”.

ANNEXES

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, en présence des maîtres de cette école et de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité qui la régissent.

Mon premier souci sera, de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous les éléments physiques et mentaux, individuels collectifs et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients de décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer leurs consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai influencer ni par la recherche du gain ni par la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés.

Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers.

Et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances, sans acharnement.

Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.

Que je sois modéré en tout, mais insatiable de mon amour de la science.

Je n'entreprendrai rien qui ne dépasse mes compétences ; je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses,

Que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.