

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2014

N°

**RÔLES ET LIMITES DES TESTS DE DIAGNOSTIC
RAPIDE DU PALUDISME**

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Le 17 décembre 2014,

par

Anne-Claire LANGLOIS

Née le 28 juin 1989 à Meaux (77),

devant le jury composé de :

Professeur DREYFUSS Gilles

Président

Professeur DARDE Marie-Laure, PU_PH

Juge

Docteur COURTIoux Bertrand, MCU

Juge

Docteur BARALE Jean-Christophe

Juge

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

ANNÉE 2014

N°

**RÔLES ET LIMITES DES TESTS DE DIAGNOSTIC
RAPIDE DU PALUDISME**

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Le 17 décembre 2014,

par

Anne-Claire LANGLOIS

Née le 28 juin 1989 à Meaux (77),

devant le jury composé de :

Professeur DREYFUSS Gilles

Président

Professeur DARDE Marie-Laure, PU_PH

Juge

Docteur COURTIUUX Bertrand, MCU

Juge

Docteur BARALE Jean-Christophe

Juge

“We cannot take recent successes in fighting malaria for granted. Gains are fragile. Sustaining them will require our continued commitment, innovative thinking and financial support ... we will need to push even harder to sustain the benefits of prevention, press further to reduce infections, invest in human capacity and ensure universal access to diagnostics and treatment, all while aiming to eliminate the disease in as many place as possible.”

UN Secretary General Ban Ki-Moon

« Nous ne pouvons pas tenir pour acquises les récentes victoires dans le combat contre le paludisme. Les progrès sont fragiles. Notre engagement prolongé, nos pensées les plus innovantes et notre appui financier seront nécessaires à les préserver. Nous devons même redoubler d'efforts afin de maintenir les bénéfices de la prévention, et les redoubler encore afin de réduire les infections, d'investir dans les capacités humaines et d'assurer un accès universel au diagnostic et au traitement, tout en visant à éliminer la maladie dans le plus de régions possibles. »

Secrétaire général des Nations Unies Ban Ki-Moon

- **Droits d'auteurs**



Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** » disponible en ligne

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



DOYEN DE LA FACULTÉ : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**
1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNÈRE**, Maître de Conférences

PROFESSEURS:

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES

PHARMACEUTIQUES:

MOESCH Christian	HYGIÈNE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	BACTÉRIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

**MAITRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS – PRATICIEN HOSPITALIER DES
DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES:**

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
-----------------------	---------------

MAITRES DE CONFÉRENCES:

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSÉE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE- IMMUNOLOGIE

DEMIOT Claire-Elise
FAGNERE Catherine
FROISSARD Didier
JAMBUT Anne-Catherine
LABROUSSE Pascal
LEGER David
MARRE-FOURNIER Françoise
MERCIER Aurélien
MILLOT Marion
MOREAU Jeanne

PASCAUD Patricia

POUGET Christelle
SIMON Alain
TROUILLAS Patrick

VIGNOLES Philippe

PHARMACOLOGIE
CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
PARASITOLOGIE
PHARMACOGNOSIE
MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-
IMMUNOLOGIE
PHARMACIE GALÉNIQUE –
BIOMATÉRIAUX CÉRAMIQUES
CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE
CHIMIE GÉNÉRALE ET MINÉRALE
BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET
INFORMATIQUE
BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET
INFORMATIQUE

PROFESSEUR:

ROUMIEUX Gwenhaël

ANGLAIS

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE:

PARENT Marianne

PHARMACOTECHNIE, PHARMACIE
GALÉNIQUE

VEDRENNE Nicolas

CHIMIE ANALYTIQUE

MTAKIDI Jean-Pierre

CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

CHEMIN Guillaume

BIOCHIMIE ET TOXICOLOGIE

DÉTACHEMENT à compter du 01/09/2014 pour 2 ans

MARION-THORE Sandrine

CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

PROFESSEUR ÉMÉRITE :

DREYFUSS Gilles

MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE

CHULIA Dominique

PHARMACIE GALÉNIQUE

LOUDART Nicole

PHARMACOLOGIE

Remerciements

Je tiens à remercier Monsieur Gilles Dreyfuss pour m'avoir fait l'honneur de présider et de codiriger ma thèse d'exercice. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour ses conseils, son aide lors de mon orientation vers la recherche en parasitologie et sa sympathie.

Je remercie également Monsieur Bertrand Courtioux pour avoir codirigé ma thèse, pour son intérêt, ses corrections et ses conseils avisés.

Merci à Madame Marie Laure Dardé pour sa participation à mon jury de thèse.

Merci à Jean-Christophe Barale pour son implication dans le projet de doctorat qui promet d'être passionnant, et son intérêt pour ce travail bibliographique préliminaire.

Merci à Didier Ménard pour les opportunités qu'il m'a offertes et son travail dans la mise en place de la thèse à venir.

Merci également à l'accueil de l'équipe de l'Institut Pasteur du Cambodge, aux bonnes rencontres que j'y ai faites et qui resteront longtemps : Maud et Clothilde.

Je remercie l'Institut Pasteur, l'équipe de l'Unité d'Immunologie moléculaire des parasites avec qui j'ai passé un excellent stage de 5^{ème} année.

Merci en particulier Frédéric Arieu pour avoir cru en moi, m'avoir encouragé à voyager et avoir contribué à me donner l'ambition qui me porte désormais.

Un grand merci également à Odile M. Puijalon pour ses bons conseils et ses encouragements.

Merci également à Patrice Lepape pour sa sympathie et son implication dans mon orientation dès le début de mes études.

Je remercie ma famille pour son soutien inconditionnel au cours de ces 7 années d'études, et particulièrement mes parents pour m'avoir donné le goût et la curiosité du voyage.

Je remercie George Laurens ainsi que tous mes amis proches pour m'avoir si bien entourée pendant toutes ces années d'études : Nicolas pour ta bonne humeur et tes dons en culture de biofilms, Léna, Marine, Natacha, Guillaume, Thomas, Bérengère, Cindy, Ariane et tant d'autres.

Merci à la promotion 2014 du Master 2 de Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'Université Pierre et Marie Curie qui avez rempli de cette année de bons moments : Agathe, Lucia, Sacha, Damien DV., Damien B., Kristanto ...

« Savoir s'étonner à propos est le premier pas fait sur la route de la découverte. »

Louis Pasteur

Table des matières

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	12
ABRÉVIATIONS.....	15
I. INTRODUCTION	16
II. GÉNÉRALITÉS.....	18
II.1. EPIDÉMIOLOGIE DU PALUDISME EN 2014	18
II.1.1. Dans le monde	18
II.1.2. En Europe	19
II.2. TRANSMISSION ET CYCLE PARASITAIRE	20
II.2.1. Cycle Parasitaire.....	20
II.2.2. Prévention de la transmission.....	23
II.3. DIAGNOSTIC DU PALUDISME	24
II.3.1. Diagnostic clinique.....	24
II.3.2. Diagnostic microscopique	25
II.3.3. Diagnostic par QBC Malaria © Quantitative buffy coat.....	27
II.3.4. Diagnostic de biologie moléculaire et sérologie	27
II.3.5. Diagnostic par immunochromatographie	27
II.4. LES TRAITEMENTS CURATIFS ACTUELS	28
II.4.1 Directives de l’OMS.....	28
II.4.1.A. Accès non compliqué à <i>P. falciparum</i>	28
II.4.1.B. Accès sévère à <i>P. falciparum</i>	30
II.4.1.C. Accès non compliqué à <i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> , <i>P. malariae</i> et <i>P. knowlesi</i>	30
II.4.2 Les dérivés de l’artémisinine.....	31
II.5. EMERGENCE DE NOUVELLES RÉSISTANCES AUX ANTIPALUDÉENS	32

III.	CARACTÉRISTIQUES ET UTILISATION D’UN TEST DE DIAGNOSTIC RAPIDE DU PALUDISME.....	34
III.1.	MÉCANISME MOLÉCULAIRE	34
III.2.	ANATOMIE D’UN TEST DE DIAGNOSTIC RAPIDE	36
III.2.1	Support du test : exemple de la cassette.....	36
III.2.2	Anticorps de détection	38
III.3	SYSTÈMES DE PRÉLÈVEMENT DU SANG DU PATIENT.....	40
III.4.	AVANTAGES ET APPLICATIONS DES TESTS DE DIAGNOSTIC RAPIDE	40
IV.	DIFFÉRENTES PROTÉINES CIBLES DES TDR	42
IV.1.	HRP2	42
IV.2.	LA LACTATE DESHYDROGENASE (LDH).....	44
IV.3.	L’ALDOLASE	45
IV.4.	RESUME DES CARACTERISTIQUES DES TDR ACTUELS	46
IV.5.	LIMITES COMMUNES	47
IV.6.	COMBINAISONS DE PROTEINES CIBLES.....	47
IV.7.	NOUVEAUX MARQUEURS MOLECULAIRES	48
V.	EVALUATION DE LA QUALITÉ DES TESTS DE DIAGNOSTIC RAPIDE.....	49
V.1.	PRINCIPES D’EVALUATION	51
V.2.	RESUME DES RESULTATS DE LA 5 ^{EME} SESSION D’EVALUATION DES TDR	54
V.3.	DEFI TECHNIQUE DU DISPOSITIF MEDICAL : STABILITE THERMIQUE	56
VI.	IMPLÉMENTATION DES TDR EN ZONE ENDÉMIQUE	58
VI.1.	BENEFICES DE L’IMPLEMENTATION DES TDR	58
VI.2.	MISE EN PLACE D’UN PROGRAMME NATIONAL D’IMPLEMENTATION DES TDR	59
VI.3.	IMPLEMENTATION AU NIVEAU COMMUNAUTAIRE.....	62

VII. LES PORTEURS ASYMPTOMATIQUES DU PALUDISME ET LA DÉTECTION PAR TESTS DE DIAGNOSTIC RAPIDE: UN ENJEU CRUCIAL.	64
VII.1. CHANGEMENTS EPIDEMIOLOGIQUES	64
VII.2. PORTEURS ASYMPTOMATIQUES	66
VII.3. GAMETOCYTES ET TRANSMISSION	67
VII.4. CONCLUSION.....	69
IX. INNOVATIONS DIAGNOSTIQUES	70
IX.1. NOUVELLES FORMES DE TDR : AMPLIFICATION ISOTHERME DE L'ADN INDUITE PAR BOUCLE (LAMP).....	70
IX.2. AMPLIFICATION DU SIGNAL ET QUANTIFICATION DE LA PARASITEMIE : LES NANO FIBRES DE CARBONE (NFC)	73
X. CONCLUSION	75
XI. PERSPECTIVES D'AVENIR DES TDR.....	77
XI.1. TDR ET CONTEXTE MONDIAL DE TRANSMISSION	77
XI.2. EVOLUTION DES BESOINS EN EUROPE.....	79
XI.3. PROJET DE THESE	79
XI.4. AUTRES APPLICATIONS POSSIBLES DES TESTS DE DIAGNOSTIC RAPIDE	81
XII. ANNEXE.....	82
XIII. BIBLIOGRAPHIE	83
XIV. SERMENT DE GALIEN	89

Table des figures et tableaux

- **Table des figures**

Figure 1 : Evolution du taux de mortalité lié au paludisme entre 2000 et 2012. (World Health Organization, 2013).	18
Figure 2 : Cycle parasitaire de <i>Plasmodium falciparum</i> chez l'Homme et le moustique Anophèle (White <i>et al.</i> , 2014).....	20
Figure 3 : Vue microscopique (100x) des stades <i>P. falciparum</i> au cours du cycle de la souche 3445. (Stage de Master 2 – 2014 - Institut Pasteur du Cambodge).	21
Figure 4 : Femelle Anophèle se gorgeant de sang (Center for Disease Control and prevention).....	22
Figure 5 : Vue microscopique d'un frottis sanguin (100x) Trophozoïtes de <i>P. falciparum</i> . (Enseignants de Parasitologie et Mycologie-ANOFEL, 2014).....	25
Figure 6 : Vue Microscopique d'une goutte épaisse (100x) Trophozoïtes de <i>P. falciparum</i> . (Enseignants de Parasitologie et Mycologie-ANOFEL, 2014).....	26
Figure 7 : A) Artemisia Annua (USDA-NRCS PLANTS Database / Britton, N.L.), B) Dérivés de l'artémisinine (Delfino <i>et al.</i> , 2002).....	31
Figure 8 : Modèle de la structure tridimensionnelle du domaine hélicoïdal de la protéine K13 (PF3D7_1343700) montrant les positions des diverses mutations (indiquées par une sphère) liées à la résistance à l'artémisinine. Les mutations annotées sont prédominantes au Cambodge. L'allèle 2 (sphère rouge) est le plus prévalent (Ariey <i>et al.</i> , 2014).	33
Figure 9 : <u>Etape 1</u> : Un anticorps marqué, spécifique de la protéine cible, est présent à l'extrémité de la bandelette de test ou dans un tube en plastique fourni avec le kit. (http://www.wpro.who.int/malaria/sites/rdt/)	34
Figure 10 : <u>Etape 2</u> : Le sang du patient est mélangé avec un agent lysant sur la bandelette. Avec la destruction des globules rouges, davantage de protéines parasitaires sont libérées et accessibles à la détection. (http://www.wpro.who.int/malaria/sites/rdt/)	35
Figure 11 : <u>Etape 3</u> : Si l'antigène est présent, le complexe antigène-anticorps marqué sera capturé par les anticorps liés à la ligne test. (http://www.wpro.who.int/malaria/sites/rdt/).....	35

Figure 12 : Différentes formes de TDR : de gauche à droite, une bandelette réactive (à plonger dans un tube), une cassette, un hybride et une carte (Maltha <i>et al.</i> , 2013).	36
Figure 13 : Vue schématique d'un test immunochromatographique à flux latéral typique (Yetisen <i>et al.</i> , 2013).....	36
Figure 14 : Schéma d'un anticorps IgG (Koivunen and Krogsrud, 2006).	38
Figure 15 : Prélèvement de sang périphérique à l'aide d'une lancette à usage unique. En haut, dévissage de la partie protectrice de l'aiguille. En bas, piqûre peu douloureuse du doigt du patient. (3)	40
Figure 16: Instaurer la confiance : évaluation de la qualité des TDR pour le Paludisme (FIND, https://www.youtube.com/watch?v=COVXZCeITW8 , Ajoutée le 9 décembre 2013 (5)).....	50
Figure 17 : Schéma illustrant l'utilisation d'un puits de contrôle positif (World Health Organization; Foundation for Innovative New Diagnostics, 2014).....	53
Figure 18: Formation des agents de santé à l'utilisation des PCW en Ouganda. Ici, l'étape de prélèvement de l'eau à ajouter à l'antigène sec. (http://www.finddiagnostics.org/programs/malaria-afs/malaria/rdt_quality_control/)	54
Figure 19: Transport et stockage des TDR (http://www.who.int/malaria/publications/atoz/malaria_rdt_central_2009.pdf)	56
Figure 20: Implémentation des TDR : démarche et résultats (Chiodini <i>et al.</i> , 2007; Maltha <i>et al.</i> , 2013; World Health Organization <i>et al.</i> , 2014).	58
Figure 21 : Budget d'implémentation des TDR (M&E : Monitoring and evaluation). (Foundation for Innovative New Diagnostics, 2013)	61
Figure 22 : Comment utiliser les tests de diagnostic rapide du paludisme.....	63
Figure 23 : Progression de l'élimination définie par l'OMS (http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241596084_eng.pdf)	64
Figure 24 : La division de zones impaludées en secteurs peut révéler une variation importante de la prévalence du paludisme (World Health Organization, 2014c).	65
Figure 25 : Le réservoir asymptomatique du paludisme (Lin <i>et al.</i> , 2014).	66

Figure 26 : Gamétocytémie et probabilité d'infection du moustique (Lin *et al.*, 2014).68

Figure 27 : Bandelettes réactives à flux latéral Las-LAMP (Rigano et al., 2014).....71

Figure 28 : Vue en microscopie électronique à différents grossissements (a) 10 μ m (b) 500 nm, de nanofibres de carbone oxydées, fixées sur une bille de verre. Le diamètre moyen des fibres est de 50 nm. (*Gikunoo et al., 2014*).....73

Figure 29 : Vue en microscopie électronique de réseaux de microbilles fixées sur la zone de capture d'une lame de verre avec (a) 0,025 ng/mL et (b) 10 ng/mL de PfHRP-2. (*Gikunoo et al., 2014*)74

Figure 30 : Positionnement des différentes approches diagnostiques par rapport à la morbidité, à la densité, à la prévalence parasitaire, et aux différents stades d'élimination du paludisme (Forte prévalence, faible prévalence, pré élimination et élimination) (The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics, 2011)77

- **Table des tableaux**

Tableau 1 : Caractéristiques des TDR actuels (Mouatcho and Goldring, 2013) 46

Abréviations

ACT : Artemisinin-based Combination Therapy

CNF : Carbon NanoFibers

FIND : Foundation for Innovative New Diagnostic

FITC : Fluorescéine isothiocyanate

HPRT : Hypoxanthine phosphoribosyltransferase

HRP2 : Histidine Rich Protein 2

LAMP : Loop Mediated isothermal amplification of DNA

LDH : Lactate deshydrogénase

MGG : May-Grünwald-Giemsa

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCW : Positive Control Well

ROS : Reactive oxygen species

SDP : Score de Détection sur le Panel

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

TDR : Test de Diagnostic Rapide

WHO : World Health Organisation

I. Introduction

Aujourd'hui, environ la moitié de la population mondiale, vivant en zone d'endémie, est concernée par le risque de paludisme, considéré à ce jour comme la maladie parasitaire la plus fréquente chez l'Homme. Les deux espèces de parasites *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* sont les principales responsables de la mortalité liée au paludisme, estimée à 627 000 décès par an, qui touche majoritairement les enfants de moins de 5 ans en Afrique subsaharienne. Toutefois, grâce aux nombreuses mesures prises par l'OMS dans le cadre des programmes de contrôle et d'élimination du paludisme, le taux d'incidence de la maladie a été réduit de 25 % au niveau mondial et de 31 % en Afrique depuis l'an 2000 (World Health Organization, 2013).

Dans de nombreux pays, où l'endémicité diminue, la transition de la phase de contrôle à la phase d'élimination du paludisme confère une importance croissante à la prise en charge des patients symptomatiques et asymptomatiques afin de réduire, puis d'éradiquer totalement la transmission des parasites (Bousema *et al.*, 2014). Des efforts sont donc encore nécessaires afin d'atteindre les objectifs de diminution de 75% de l'incidence de paludisme d'ici 2015, fixés par l'Assemblée Mondiale de la Santé et le partenariat Roll back Malaria (World Health Organization, 2013).

Les tests de diagnostic rapide (TDR) furent développés dans les années 1990 et accueillis avec un grand enthousiasme afin d'améliorer le diagnostic du paludisme en zone d'endémie (Laurent *et al.*, 2010). Ils ont ainsi joué un rôle prépondérant dans les victoires acquises sur la maladie lors des dernières décennies. Le principal avantage des TDR est leur rapidité d'utilisation, la facilité d'interprétation des résultats, leur faible coût et le fait que leur usage ne requiert ni équipement électrique, ni aménagements de laboratoire. Ces TDR présentent cependant certaines limites, mises en avant par de nombreuses études, en particulier pour diagnostiquer/dépister les porteurs asymptomatiques qui présentent le plus souvent de très faibles parasitémies.

L'essor important du marché des TDR et leur importance dans la réussite de la politique d'élimination/éradication du paludisme rend essentiel de posséder des critères de sélection sévères afin d'évaluer la qualité des produits et ainsi orienter les choix d'approvisionnement des Programme Nationaux de Contrôle du Paludisme dans le monde (4). Pour cela, l'OMS et FIND ont mis en place des sessions annuelles d'évaluation des TDR proposés par les fabricants (World Health Organization *et al.*, 2014). D'autre part, l'implémentation des TDR sur le terrain implique une planification rigoureuse et une bonne coordination à tous les niveaux des organisations de santé. La qualité des diagnostics par TDR dépend alors en grande partie de la formation des agents de santé.

Les tests de diagnostic rapide du paludisme ont un rôle essentiel à jouer afin de relever le défi posé par le contrôle du paludisme. Ce mémoire est destiné à le préciser en s'appuyant sur une présentation actualisée des caractéristiques des TDR, du contexte de transmission et des moyens de les intégrer dans les politiques de santé nationale.

II. Généralités

II.1. Épidémiologie du paludisme en 2014

II.1.1. Dans le monde : Rapport (World Health Organization, 2013).

En 2014, le paludisme reste la première endémie parasitaire mondiale. Chaque année, environ 3,4 milliards de personnes, soit la moitié de la population mondiale, sont exposées au risque de paludisme (**Figure 1**). La transmission est actuellement considérée comme endémique dans 103 pays : les régions intertropicales, la quasi-totalité de l'Afrique, une grande partie de l'Asie du Sud-est, l'Amérique centrale et l'Amérique du Sud sont concernées.

Les estimations de l'OMS font état de 207 millions d'épisodes palustres, ainsi que de 627 000 décès dus au paludisme (avec un intervalle d'incertitude entre 473 000 et 789 000) pour l'année 2012. Dans la région africaine de l'OMS, 90 % de l'ensemble des décès ont été enregistrés, principalement chez les enfants de moins de 5 ans : on estime que 1 300 enfants meurent du paludisme chaque jour.

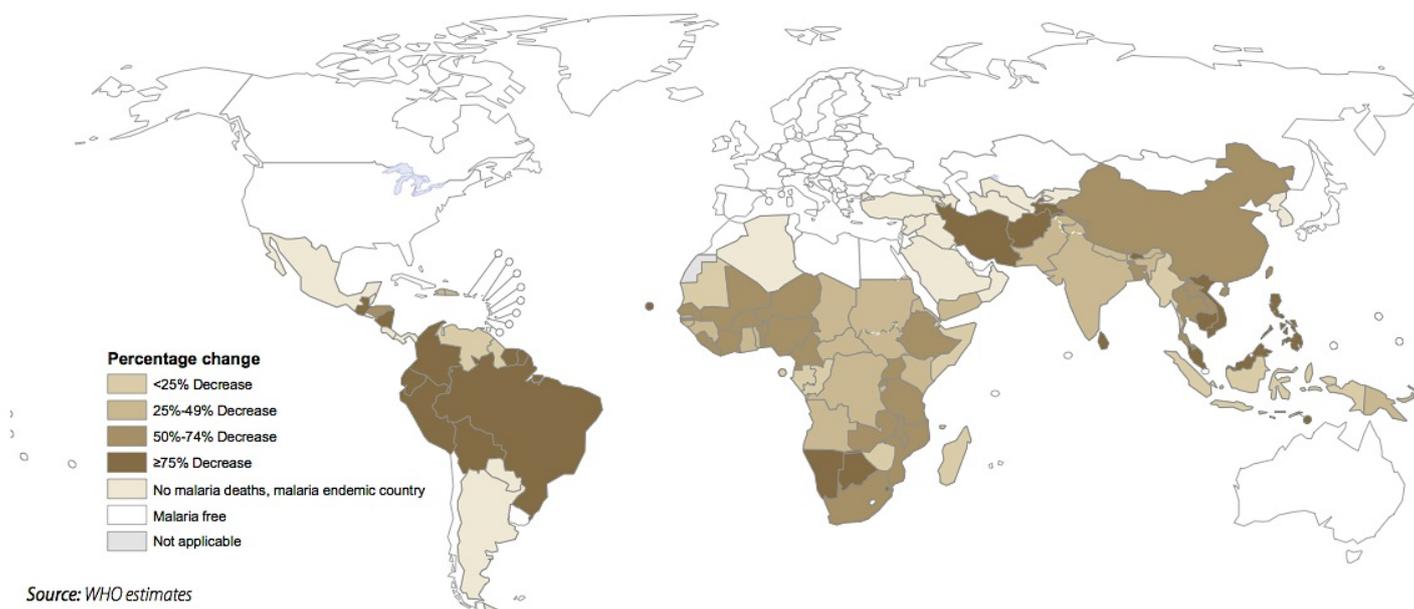


Figure 1 : Évolution du taux de mortalité lié au paludisme entre 2000 et 2012 (World Health Organization, 2013).

Entre 2000 et 2012, le taux de mortalité par paludisme a été réduit de plus de 42 % à l'échelle mondiale, et de 49 % dans la région africaine de l'OMS, grâce au renforcement de la prévention et des interventions de lutte anti vectorielle, de l'utilisation de tests diagnostiques et des thérapies combinées avec un dérivé de l'artémisinine (ACT pour Artemisinin-based combination therapy).

D'après les données soumises, 52 pays sur 103 semblent prêts à atteindre les objectifs fixés par l'Assemblée mondiale de la santé et par le partenariat Roll Back Malaria (« Faire reculer le paludisme ») : réduire de 75 % le nombre de cas de paludisme d'ici à 2015 (**Figure 1**). Il n'est cependant pas possible d'évaluer les tendances dans 41 pays sur 103 étant donné le manque d'exhaustivité des données soumises dans le temps et les modifications dans les pratiques diagnostiques ou le recours aux services de santé.

Ce manque d'exhaustivité pose un problème supplémentaire dans la lutte pour l'élimination de la pathologie menée par l'Organisation mondiale de la Santé.

II.1.2. En Europe

Environ 5000 cas de paludisme d'importation sont recensés chaque année en Europe par l'OMS. Ils sont définis comme «une infection acquise en zone endémique par un individu (touriste ou natif) mais diagnostiquée dans un pays non endémique après apparition des symptômes cliniques ». Mais l'amplitude du problème semble être bien plus importante que ne l'indiquent les statistiques et ne peut être totalement évaluée sur la base des données officielles actuellement disponibles (World Health Organization, 2014a).

Le paludisme était endémique en Europe jusqu'au milieu du XXe siècle où la pathologie a été considérée comme éradiquée dans cette zone. Les programmes d'élimination des cas autochtones, c'est-à-dire de transmission locale, du paludisme restent cependant d'actualité : des voyageurs de retour de zones d'endémie infectent des moustiques locaux qui vont transmettre la pathologie à des habitants de la région. On a ainsi détecté des cas autochtones isolés à *P. vivax* en 1997 en Italie, en 2006 en Corse, et en 2010 en Espagne (Odolini *et al.*, 2012). En 2013, 37 cas de paludisme contractés en Europe ont été rapportés (en Grèce, Tadjikistan et Turquie). L'expérience de la Grèce met en évidence la menace constante de réintroduction du paludisme en Europe et le besoin d'une vigilance continue afin d'assurer la prise en charge rapide des résurgences (World Health Organization, 2014a).

II.2. Transmission et cycle parasitaire

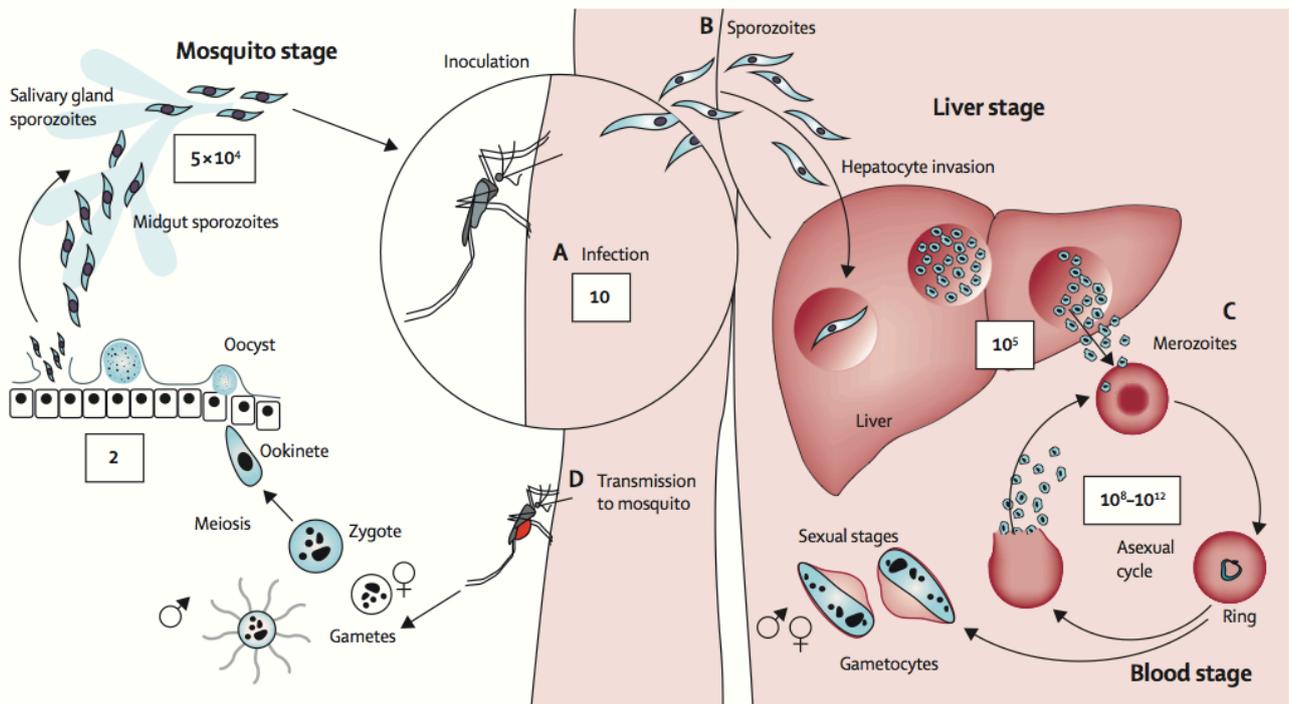


Figure 2 : Cycle parasitaire de *Plasmodium falciparum* chez l'Homme et le moustique Anophèle (White *et al.*, 2014).

II.2.1. Cycle parasitaire

Le paludisme est transmis à l'Homme par la piqûre d'un moustique culicidé du genre *Anopheles* au moment de son repas sanguin. Les espèces hématozoaires transmises par ce vecteur appartiennent au genre *Plasmodium*.

Les 5 espèces *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi* présentent deux phases de reproduction : une reproduction asexuée chez l'Homme (hôte intermédiaire) et une reproduction sexuée chez l'Anophèle femelle (hôte définitif) (**Figure 2**).

- Schizogonie pré-érythrocytaire

Le parasite est inoculé à l'Homme lors du repas sanguin de l'Anophèle femelle sous la forme de sporozoïtes qui vont rapidement infecter les hépatocytes. Ils s'y développent, puis se différencient en schizontes fragmentés qui libèrent par la suite des mérozoïtes dans la circulation sanguine. Cette première phase asymptomatique est unique dans le cycle.

Chez *P. vivax* et *P. ovale*, des formes intrahépatiques (hypnozoïtes) peuvent persister plusieurs mois après la piqûre du moustique sous une forme dormante avant de libérer des

mérozoïtes dans le sang et de causer les reviviscences tardives qui caractérisent ces infections. Les hypnozoïtes n'ont pas été observés dans les infections à *P. falciparum*.

- Schizogonie érythrocytaire

Durant la phase érythrocytaire, les mérozoïtes envahissent les globules rouges et forment une vacuole parasitophore à l'intérieur de laquelle ils se différencient en trophozoïtes (anneau ou « ring ») puis en schizontes, en suivant un développement observé par microscopie dans la **Figure 3** (réalisée en stage de Master 2 par l'auteur).

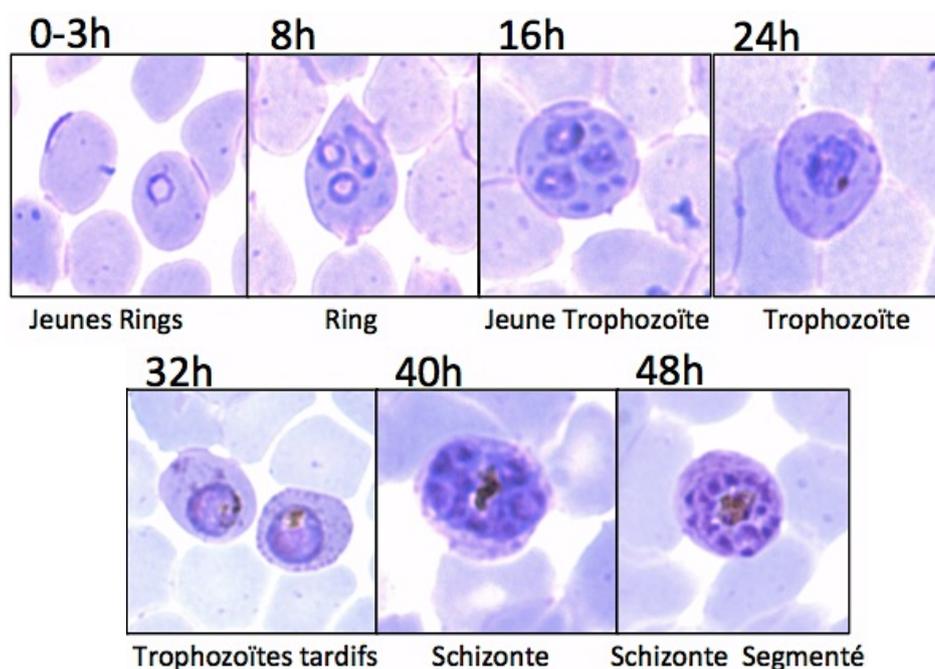


Figure 3 : Vue microscopique (100x) des stades *P. falciparum* au cours du cycle de la souche 3445. Prélèvements effectués toutes les 8 heures pendant 48h après synchronisation des parasites sous forme de ring 0-3h. Frottis et coloration au Giemsa 8% (Stage de Master 2 – 2014 - Institut Pasteur du Cambodge).

De 0 à 3h, on observe de jeunes « rings » sous forme de bagues à chatons, petits et fins, dont l'un est en accolé à la paroi de l'hématie qui vient d'être parasitée. À 8h, le globule rouge observé présente une infection multiple de 3 parasites dans le même globule, ce qui est commun chez *P. falciparum* – surtout en culture.

À 16h, les jeunes trophozoïtes présentent un anneau épaissi et complet. Les taches de Maurer commencent à apparaître. En arrivant à maturité, les trophozoïtes grandissent jusqu'à occuper 2/3 de la cellule (24h puis 32h). La vacuole digestive disparaît alors et l'hémozoïne (tache brune) commence à se former à partir du stade trophozoïte.

À 40h, le schizonte commence à se fragmenter en noyaux multiples qui deviennent totalement indépendants à 48h (schizonte segmenté) et donneront les mérozoïtes. La lyse maîtrisée par le parasite des membranes de la vacuole parasitophore et de l'érythrocyte permet ensuite la libération de 6 à 32 nouveaux mérozoïtes. Ceux-ci pénètrent alors dans de nouveaux globules rouges et initient un nouveau cycle d'infection permettant la progression rapide de la parasitémie et ainsi de la pathologie. La synchronisation des cycles parasitaires au sein de l'hôte infecté entraîne la destruction périodique d'un grand nombre de globules rouges et la libération d'un pigment responsable de la fièvre palustre : l'hémozoïne. Le cycle parasitaire érythrocytaire peut durer 24h (*P. knowlesi*), 48h (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*) et 72h (*P. malariae*). Une petite fraction des mérozoïtes se différencie en précurseurs des cellules sexuées, les micro- et macro-gamétocytes

- chez l'Anophèle femelle



Figure 4 : Femelle Anophèle se gorgant de sang.

(Center for Disease Control and prevention ; <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>)

Seule la femelle hématophage transmet la maladie. Le pic d'activité, et donc l'intensité des piqûres, varie sensiblement au cours de la journée/nuit suivant l'espèce du moustique (41 espèces vectrices du genre *Anopheles*). Lors de son repas sanguin sur un hôte humain infecté (**Figure 4**), l'Anophèle femelle ingère du sang contenant des gamètes mâles et femelles, s'infectant par la même occasion. La fécondation se déroule dans le tractus digestif du moustique vecteur, formant un œuf libre, l'oocinète, qui va aller s'enkyster dans la paroi externe de l'estomac du moustique après l'avoir traversée pour se transformer en oocyste. Les cellules se multiplient alors dans l'oocyste, produisant des sporozoïtes infectants qui rejoindront les glandes salivaires et seront inoculés à un nouvel hôte vertébré durant le repas sanguin du moustique (Enseignants de Parasitologie et Mycologie-ANOFEL, 2014).

Les personnes qui résident à long terme dans des régions où le paludisme est endémique développent une prémunition (c.-à-d. une immunité acquise) secondaire à l'exposition naturelle et constante aux parasites. Cette immunité n'est pas stérile, c'est-à-dire qu'elle protège en général des formes sévères de paludisme mais des infections, avec une densité parasitaire plus faible, peuvent toujours se produire. L'accès aigu de paludisme à *P. falciparum* est une urgence vitale qui peut causer la mort même en présence de traitement (Day and Dondorp, 2007). Cet aspect met en lumière l'importance d'une prise en charge rapide des cas de paludisme afin de fournir des traitements efficaces, d'autant plus pour les cas de parasites résistants.

II.2.2. Prévention de la transmission

Le renforcement de la prévention et des interventions de lutte anti-vectorielle a été une étape décisive dans le recul de la pathologie depuis l'an 2000. À l'échelle individuelle, la prévention du paludisme doit associer une protection physique contre les piqûres de moustiques (via l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides) à une chimioprophylaxie médicamenteuse antiparasitaire (pour les sujets non immuns se rendant en zone impaludée).

À partir du coucher du soleil, la lutte contre les piqûres de moustique comprend :

- le port de vêtements longs, imprégnés d'insecticide si possible,
- l'application de répulsif sur les parties découvertes du corps (DEET 30 à 50%, IR3535 20 à 35% ou picaridine 20 à 30%),
- la pose de moustiquaires imprégnées d'insecticides aux portes et aux fenêtres,
- ou dormir sous une moustiquaire imprégnée.

La chimioprophylaxie est prescrite suivant la zone impaludée où se rend le voyageur, classée en trois groupes d'après des données épidémiologiques de résistance aux médicaments antipaludéens.

II.3. Diagnostic du paludisme

La sensibilité d'un diagnostic est définie comme « la probabilité que le test soit positif si la pathologie est présente ». La spécificité d'un diagnostic est « la probabilité que le test soit négatif si la pathologie est absente ».

II.3.1. Diagnostic clinique

Cette méthode de diagnostic est la moins coûteuse et la plus commune. L'accès palustre sans signe de gravité se déroule suivant la triade « frissons, chaleur, sueurs » survenant tous les deux à trois jours suivant l'espèce de parasite. Il fait suite à un stade de primo invasion non traité, qualifié d'« embarras gastrique fébrile ». Le premier stade de l'accès palustre est caractérisé par des frissons violents pendant environ 1 h suivis d'une forte fièvre à 40°C avec des céphalées et des douleurs abdominales durant 3 à 4 h. La crise se termine par des sueurs profuses, une émission d'urine foncée et un effondrement brusque de la température ; ce stade dure entre 2 et 4 heures.

Chez un sujet non prémuni, tout accès palustre peut s'aggraver en quelques heures sous la forme d'un paludisme potentiellement mortel. L'accès palustre grave peut prendre plusieurs formes cliniques dont la plus importante est le neuropaludisme. Cette atteinte cérébrale se caractérise par des troubles de la conscience, une prostration et des convulsions. Le diagnostic du paludisme est donc une urgence vitale : le malade doit être immédiatement hospitalisé dès l'observation de tout symptôme neurologique (World Health Organization, 2010).

La pratique du diagnostic clinique était plus compréhensible par le passé lorsque des antipaludéens peu chers et bien tolérés, comme la chloroquine, étaient encore efficaces (Wongsrichanalai *et al.*, 2007). Cependant, du fait de la non-spécificité des symptômes, il est difficile de différencier le paludisme des autres pathologies tropicales à accès fébrile. L'approche strictement syndromique apparaît donc comme peu fiable. En effet, cette pratique a entraîné la prescription excessive d'antipaludéens, facteur favorisant l'apparition de la résistance aux traitements, ainsi que le manque de prise en charge des pathologies non palustres à symptomatologie identique en zone endémique (Gwer *et al.*, 2007).

En 2014, les directives de l'OMS soulignent qu'il est important de confirmer une suspicion de cas de paludisme en procédant, si possible, à un diagnostic de certitude en laboratoire avant de délivrer un traitement antipaludique adapté.

Une thérapie dispensée uniquement suite à une suspicion clinique ne doit être envisagée que lorsque les techniques de diagnostic parasitologique ne sont pas accessibles (World Health Organization, 2014b).

II.3.2. Diagnostic microscopique

C'est un diagnostic de certitude qui repose sur la mise en évidence des formes érythrocytaires de *Plasmodium* grâce à l'observation microscopique d'un prélèvement de sang périphérique du patient. Il existe deux techniques différentes et complémentaires : le frottis mince et la goutte épaisse.

- Le frottis mince (**Figure 5**)

Le frottis mince est effectué en étalant quelques microlitres de sang sur une lame de microscope. Après séchage, on effectue une coloration avec la méthode May-Grünwald-Giemsa (MGG) ou par Giemsa après fixation à l'alcool. Les parasites sont alors colorés en rouge (noyau) et en bleu (cytoplasme) et observés au microscope. Cette méthode est la plus adaptée à l'identification du stade et de l'espèce du parasite.

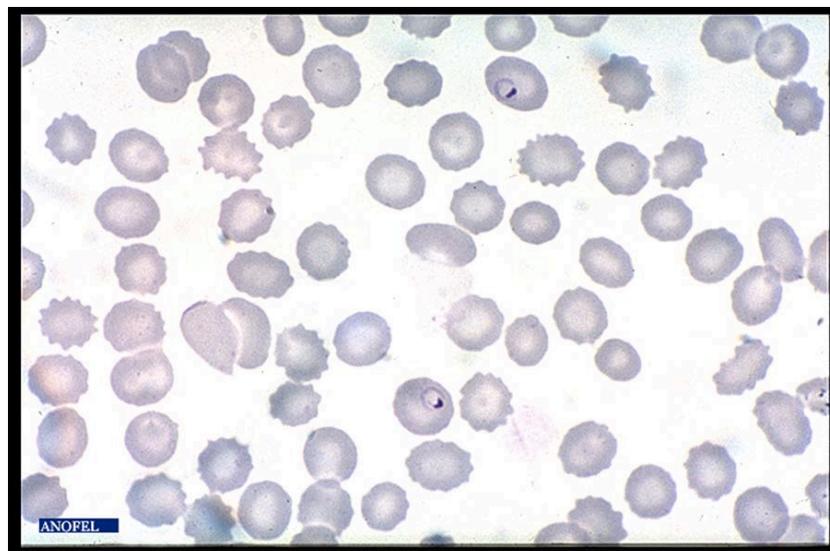


Figure 5 : Vue microscopique d'un frottis sanguin (100x).

Trophozoïtes de *P. falciparum*. Coloration MGG.

(Enseignants de Parasitologie et Mycologie-ANOFEL, 2014)

- La goutte épaisse (**Figure 6**)

Cette technique, considérée comme la technique de référence, est une observation, après hémolyse et coloration au Giemsa, de quelques microlitres de sang sur une lame de microscope. Le dénombrement de parasites pour 200 leucocytes doit être effectué par un manipulateur expérimenté, car la lecture des lames reste assez délicate. Le diagnostic d'espèce n'est pas toujours possible. Du fait de la superposition de plusieurs couches de globules rouges, cette méthode permet à l'examineur d'observer davantage d'érythrocytes afin de déceler des parasites, ce qui permet d'identifier les faibles parasitémies plus facilement qu'avec un frottis sanguin.

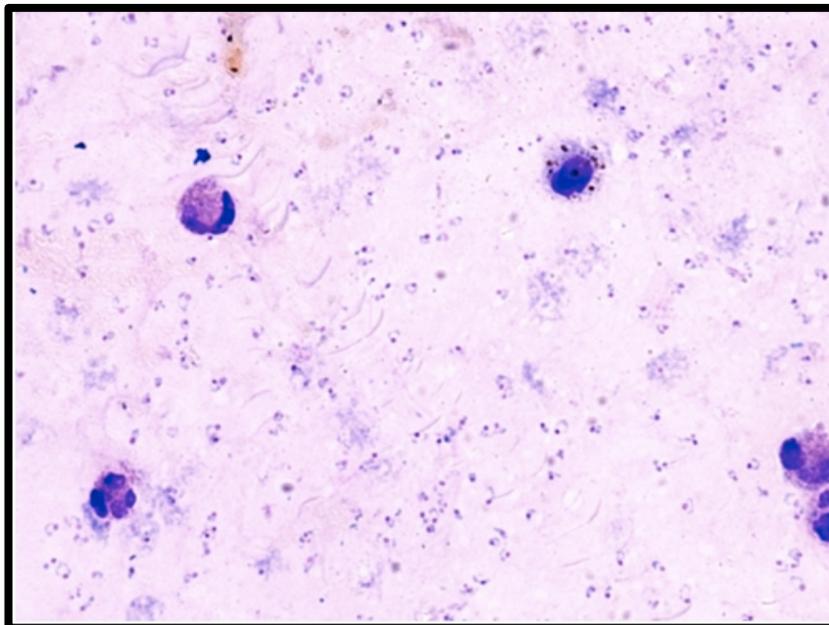


Figure 6 : Vue microscopique d'une goutte épaisse (100x).

Trophozoïtes de *P. falciparum* (Coloration Giemsa)

(Enseignants de Parasitologie et Mycologie-ANOFEL, 2014)

En moyenne, la limite de détection d'un examen microscopique par un examinateur expérimenté est d'environ 10 parasites/ μL (Bejon *et al.*, 2006). Dans les zones à faibles ressources économiques, le diagnostic microscopique reste peu sensible et peu spécifique dû au manque de formation des manipulateurs, principalement dans les cas de faibles parasitémies ou d'infections mixtes. De plus, les parasites peuvent être séquestrés et donc absents du sang périphérique dans les paludismes à *P. falciparum*. Enfin, la majorité des cas de paludisme survient dans les zones rurales où il y a peu ou pas d'accès à des laboratoires de référence et dans de nombreux endroits, la microscopie n'est pas disponible (Chayani *et al.*, 2004).

II.3.3. Diagnostic par QBC Malaria © Quantitative buffy coat

Cette technique consiste à concentrer les parasites par centrifugation dans un tube capillaire après les avoir marqués à l'acridine orange, un fluorochrome. Elle est facile à maîtriser et donne une sensibilité semblable à celle de la goutte épaisse (sans diagnostic d'espèce cependant), mais elle nécessite un matériel spécifique. L'arrêt de sa commercialisation est annoncé.

II.3.4. Diagnostic de biologie moléculaire et sérologie

La technique PCR (Polymerase Chain Reaction = réaction en chaîne de la polymérase) repose sur la détection de l'ADN des parasites circulants afin de pouvoir estimer semi-quantitativement la densité parasitaire sanguine. Cette technique peut être utilisée comme aide au diagnostic, car elle possède une excellente sensibilité et est discriminative d'espèce. Elle peut ainsi détecter jusqu'à 0,5 parasite/mL après concentration de l'échantillon. Cependant, elle nécessite des équipements de pointe (ex. : thermocycleurs, hotte stérile ...) ainsi que des manipulateurs formés, afin d'éviter les contaminations induisant de faux positifs. De fait, elle représente un coût certain, ainsi qu'un temps de réalisation long avant de pouvoir traiter le patient. Cette technique est donc peu adaptée à une utilisation de terrain dans les zones à faibles ressources économiques. La mise au point et la démonstration sur le terrain de technologies PCR, à fort rendement, adaptées aux conditions locales sont nécessaires afin d'améliorer l'utilisation de la PCR en zone endémique (The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics, 2011).

La sérologie du paludisme n'est indiquée que dans le diagnostic rétrospectif de l'accès palustre étant donné que la présence d'anticorps (sérologie positive) signe seulement un contact préalable avec le parasite. Elle peut également être conseillée dans les enquêtes épidémiologiques, le contrôle des donneurs de sang ou d'organes à risque, le diagnostic de paludisme viscéral évolutif ou celui d'une splénomégalie palustre (Enseignants de Parasitologie et Mycologie, 2014).

II.3.5. Diagnostic par immunochromatographie

Ce type de diagnostic est un outil prépondérant dans la lutte contre le paludisme et constituera donc le sujet principal de ce mémoire :

Le diagnostic par immunochromatographie sera donc détaillé ci-après dans la **partie III**.

II.4. Les traitements curatifs actuels

II.4.1. Directives de l’OMS

D’après les directives 2010 de l’OMS, les cas de paludismes doivent être traités suivant les recommandations suivantes (World Health Organization, 2010).

II.4.1.A. Accès non compliqué à *P. falciparum*

⊙ Traitement de première intention

Les thérapies combinées avec un dérivé de l’artémisinine (ACT) constituent le traitement recommandé pour le paludisme non compliqué à *P. falciparum*. Cette thérapie doit comporter au minimum 3 jours de traitement. L’artémisinine et ses dérivés ne doivent pas être utilisés en monothérapie (risque accru d’émergence de résistance).

Les associations suivantes sont recommandées :

- artémether- luméfantrine, artésunate - amodiaquine, artésunate - méfloquine, artésunate plus sulfadoxine - pyriméthamine et dihydroartémisinine - pipéraquine.

Le choix de l’ACT dans un pays ou une région sera basé sur le niveau de résistance à la drogue partenaire de l’association.

⊙ Traitement de seconde intention

Les autres ACT connus pour être efficaces dans la région peuvent être utilisés :

- artésunate plus tétracycline ou doxycycline ou clindamycine; quinine - tétracycline ou doxycycline ou clindamycine.

Ces associations doivent être administrées pendant 7 jours. Une dose unique de primaquine (0,75 mg/kg) peut être ajoutée à un traitement ACT pour le paludisme non compliqué à *P. falciparum* comme traitement anti-gamétocyte, en particulier dans les zones de stade pré-élimination ou élimination.

⊙ Traitement des groupes à risque

Grossesse :

- Au premier trimestre : L'association quinine plus clindamycine pendant 7 jours. (En cas d'échec du traitement, l'association artésunate - clindamycine pendant 7 jours est conseillée). Un ACT n'est indiqué que si c'est le seul traitement immédiatement disponible, en cas d'échec du traitement de référence ou si l'observance n'est pas assurée pour un traitement de 7 jours.

- Second et troisième trimestres : Les ACT reconnus comme étant efficaces dans le pays/la région où l'association artésunate - clindamycine (ou quinine - clindamycine) doivent être administrés pendant 7 jours.

Femmes allaitantes:

Un traitement antipaludéen standard est préconisé (y compris les ACT) excepté la dapsonne, la primaquine et les tétracyclines.

Les nourrissons et jeunes enfants :

Les ACT sont recommandés en première intention en prenant garde à l'exactitude des dosages et en s'assurant que la dose administrée est bien entièrement absorbée.

Les voyageurs de retour de zones endémiques :

Atovaquone – proguanil ; ou artémether – luméfantrine ; ou quinine - doxycycline ou clindamycine.

Voir Note au chapitre II.5. Émergence de nouvelles résistances aux antipaludéens.

II.4.1.B. Accès sévère à *P. falciparum*

Le paludisme sévère est une urgence vitale : après une évaluation rapide de l'état clinique et une confirmation du diagnostic, des doses complètes d'antipaludéens par voie parentérale doivent être administrées sans attendre, quel que soit le traitement disponible.

⊙ Chez l'adulte : artésunate Intra Veineux ou Intra Musculaire :

L'artémether ou la quinine sont une alternative acceptable si l'artésunate IV n'est pas disponible. Celui-ci devrait cependant être utilisé de préférence à la quinine pour le traitement du paludisme sévère à *P. falciparum*.

⊙ Chez l'enfant : artésunate IV ou IM

L'artémether ou la quinine sont une alternative acceptable si l'artésunate IV n'est pas disponible. Le traitement doit être administré pendant 24 h au minimum (quelle que soit la capacité du patient à tolérer une médication orale préalable) et après cela, il doit être complété par :

- Un ACT,
- L'association artésunate - clindamycine ou doxycycline ; quinine - clindamycine ou doxycycline.

II.4.1.C. Accès non compliqué à *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*

La chloroquine associée à la primaquine est le traitement de choix pour les infections à *P. vivax* sensibles à la chloroquine. Dans les déficiences moyennes à modérées en G6PD, la primaquine à 0,75 mg /kg de masse corporelle doit être administrée une fois par semaine pendant 8 semaines (minimum 14 jours). Dans les cas de déficience sévère en G6PD, la primaquine est contre-indiquée et ne doit pas être utilisée. Dans les zones où *P. vivax* est chloroquino-résistant, les thérapies correspondant à des combinaisons à base d'artémisinine (en particulier celles dont la drogue partenaire présente une longue durée de vie) sont recommandées.

- ⊙ La chloroquine est également utilisée en traitement de première intention pour les infections à *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*.

II.4.2 Les dérivés de l'artémisinine

L'association Artéméther/Luméfantrine (AL) a été la première thérapie combinée à dose fixe à être recommandée par l'OMS en 2001 pour le traitement du paludisme non compliqué à *P. falciparum* (World Health Organization, 2010).

L'artémisinine est une lactone sesquiterpénique issue de l'armoise annuelle *Artemisia annua* (**Figure 7**). Elle possède une activité pharmacologique puissante et rapide, à demi-vie courte (< 1 heure) sur tous les stades parasitaires asexués, augmentant ainsi la clairance parasitaire et diminuant sa biomasse. Ses mécanismes d'action n'ont cependant pas encore été totalement élucidés. La majeure partie de son activité repose sur la présence d'un pont endoperoxide (Moore *et al.*, 2011). La rupture de ce pont, très instable, se fait en présence de fer (II) lié à l'hème, au *cytochrome b* de la mitochondrie ou encore libre dans la cellule. Cette rupture va générer des espèces réactives à l'oxygène (ROS) qui vont augmenter le taux d'oxydation au sein du parasite, induire le débordement de la voie métabolique antioxydante (SOD, ALA ...) et engendrer de nombreuses lésions sur la membrane cellulaire et les organites. De fait, on peut observer une perte du potentiel membranaire de la mitochondrie, pouvant induire sa fragmentation et l'apoptose cellulaire (Antoine *et al.*, 2014).

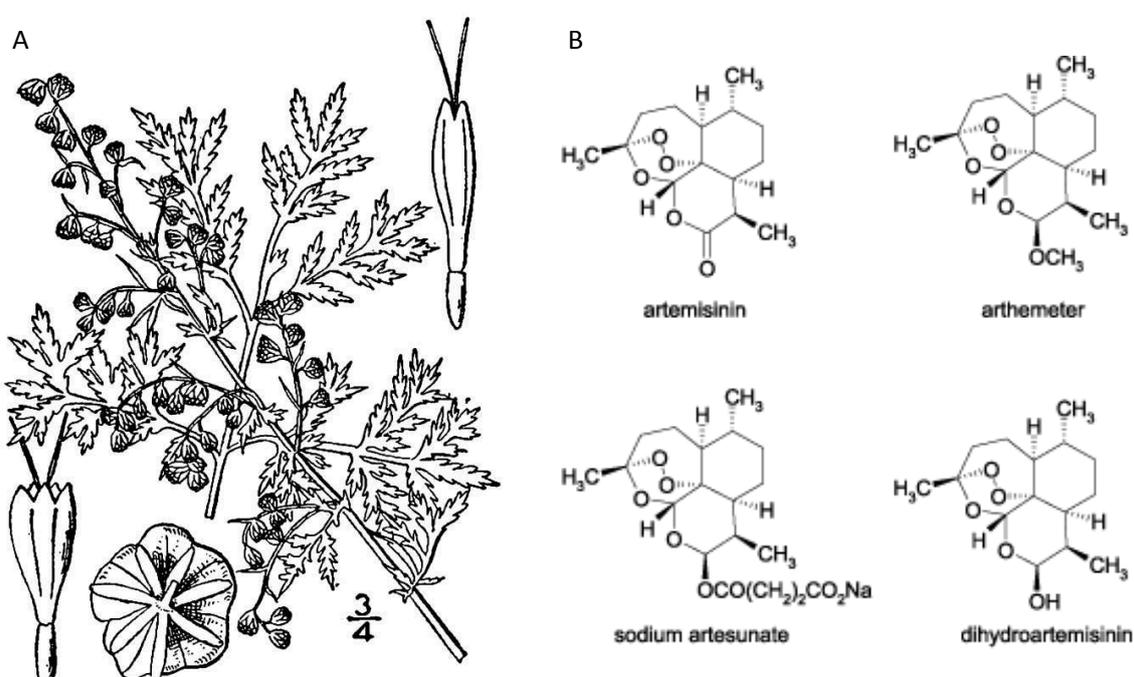


Figure 7 : A) *Artemisia Annua* (USDA-NRCS PLANTS Database / Britton, N.L.),

B) Les dérivés de l'artémisinine (Delfino *et al.*, 2002)

II.5. Émergence de nouvelles résistances aux antipaludéens

Détectée pour la première fois dans la région du Grand Mékong, la résistance aux traitements antipaludiques est un problème récurrent : la résistance de *P. falciparum* aux générations précédentes de traitements, comme la chloroquine et l'association sulfadoxine-pyriméthamine (SP), a émergé à la fin des années 50, puis s'est répandue dans les années 70 et 80, sapant les efforts de contrôle du paludisme et détruisant les progrès dans la survie infantile (Mita and Kazuyuki Tanabe, 2012).

Ces dernières années, la résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine a été détectée dans 4 pays de la sous-région du Grand Mékong : Cambodge, Myanmar, Thaïlande et Viêtnam (Takala-Harrison *et al.*, 2013). Malgré le fait qu'il y ait de nombreux facteurs qui semblent contribuer à l'émergence de la résistance, l'utilisation d'artémisinine en monothérapie par voie orale semble être un élément déclencheur important (Dondorp *et al.*, 2010). Si la résistance à l'artémisinine se développe et se répand à d'autres grandes zones géographiques, les conséquences pour la santé publique pourraient être dramatiques, dues au manque d'alternatives thérapeutiques. L'OMS recommande donc un suivi régulier de la résistance aux traitements antipaludiques.

Dans ce but, des tests permettant de détecter les parasites résistants ont récemment été mis au point. Un test *in vitro*, le « Ring stage Survival Assay » ou RSA (Witkowski *et al.*, 2013) permet de détecter la résistance via la différence du taux de survie des stades anneaux entre souches résistantes et sensibles de *P. falciparum*. Un test moléculaire a récemment été développé grâce à la découverte d'un marqueur moléculaire de résistance, le gène PF3D7_1343700 appelé K13. L'auteur de ce mémoire de thèse a par ailleurs eu la chance de participer à cette découverte, en analysant le polymorphisme du gène K13 dans différentes régions du Cambodge, lors d'un stage à l'Institut Pasteur de Paris aux côtés de Frédéric Arieu.

Le gène K13 présente un domaine hélicoïdal où se concentrent plusieurs mutations liées au phénotype de résistance *in vivo* et *in vitro* (**Figure 8**). Les deux principales mutations C580Y (rouge) et R539T (bleu), observées au Cambodge, sont toutes deux localisées au sein de structures secondaires organisées : dans le feuillet bêta 4, portant probablement atteinte à l'intégrité de l'hélice, et à la surface du feuillet 4, altérant vraisemblablement l'interaction avec une éventuelle protéine Nrf2-like (Arieu *et al.*, 2014).

En effet, ce gène est un orthologue du gène *Keap1* humain dont la protéine interagit avec la protéine Nrf2 au sein de la voie métabolique antioxydante. La protéine K13 pourrait donc jouer un rôle semblable chez le parasite. Cependant, la cascade de réactions dans laquelle la protéine K13 est impliquée demeure, pour l'instant, inconnue.

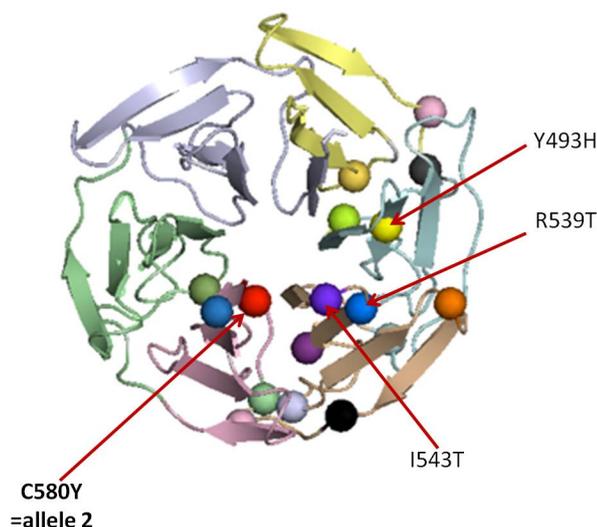


Figure 8 : Modèle de la structure tridimensionnelle du domaine hélicoïdal de la protéine K13 (PF3D7_1343700) montrant les positions des diverses mutations (indiquées par une sphère) liées à la résistance à l'artémisinine. Les mutations annotées sont prédominantes au Cambodge. L'allèle 2 (sphère rouge) est le plus prévalent (Ariey *et al.*, 2014).

En conclusion, la nécessité d'une thérapeutique rationnelle et adaptée face à la menace de résistance aux antipaludiques confère donc une importance croissante à l'exactitude et la précision des méthodes de diagnostic.

Note : Impact sur la prise en charge du paludisme d'importation en France

L'émergence de la résistance à l'artémisinine implique donc des précautions supplémentaires lors de la prise en charge de patients fébriles revenant de zone endémique. En effet, il est nécessaire de prendre connaissance de la provenance géographique du patient : en cas de voyage en Asie du Sud-Est et d'une infection confirmée à *P. falciparum*, il sera nécessaire d'envisager l'hypothèse d'un parasite résistant à l'artémisinine et donc d'administrer un traitement de seconde intention ne comprenant pas de dérivés de l'artémisinine. Afin de connaître le statut de résistance, le protocole permettant de détecter une mutation du gène K13 (via PCR et séquençage) est présent à l'adresse suivante :

<http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/2927>

III. Caractéristiques et utilisation d'un test de diagnostic rapide du paludisme

III.1. Mécanisme moléculaire

Les tests de diagnostic rapide immunochromatographiques à flux latéral reposent sur la migration d'un liquide à la surface d'une membrane en nitrocellulose. L'immunochromatographie est caractérisée par la capture d'un antigène présent dans le sang périphérique à l'aide d'un anticorps conjugué à un liposome contenant des particules d'or ou un colorant au sélénium. Ce complexe, au sein de la phase mobile, sera ensuite capturé au niveau de la ligne de test du dispositif par des antigènes liés au support nitrocellulosique, tenant rôle de phase fixe, et formant ainsi une ligne colorée visible. Une ligne de contrôle permet de s'assurer de la bonne migration des réactifs grâce à un anticorps fixe dirigé contre les antigènes mobiles marqués seuls (Moody, 2002) et (1). Le résultat d'un test, quel qu'il soit, n'est donc valide que si la ligne de contrôle apparaît. Les antigènes du paludisme détectés par ces tests seront présentés dans le **chapitre IV**. Le mécanisme moléculaire et ses conséquences sur le résultat, directement visualisable par l'utilisateur, sont détaillés ci-après (**Figures 9-11**).

- **Étape 1 :**

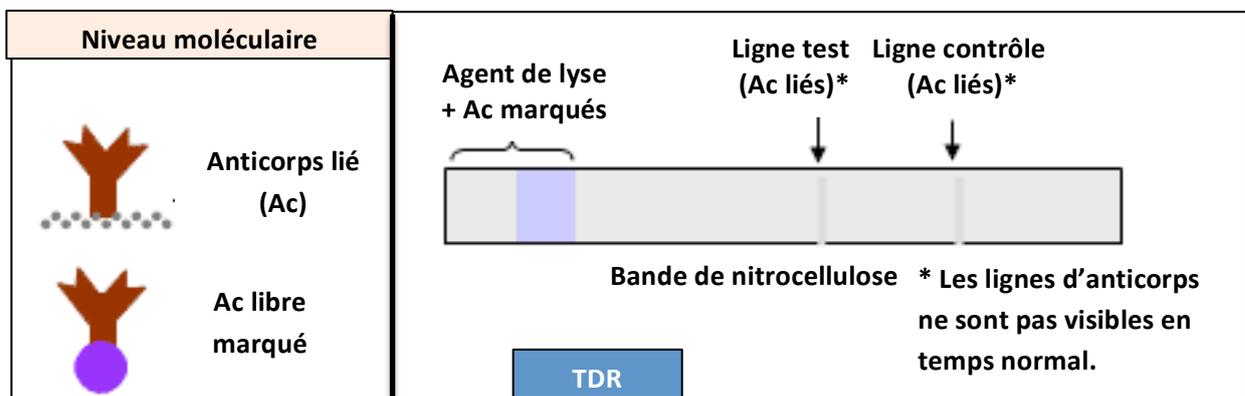


Figure 9 : Étape 1 : Un anticorps marqué, spécifique de la protéine cible, est présent à l'extrémité de la bandelette de test ou dans un tube en plastique fourni avec le kit. L'autre anticorps, spécifique de la même protéine, est fixé à la surface de nitrocellulose au niveau de la ligne de test. Un troisième anticorps, ayant une affinité pour l'anticorps marqué, est lié au niveau de la ligne de contrôle. (<http://www.wpro.who.int/malaria/sites/rdt/>)

- **Étape 2**

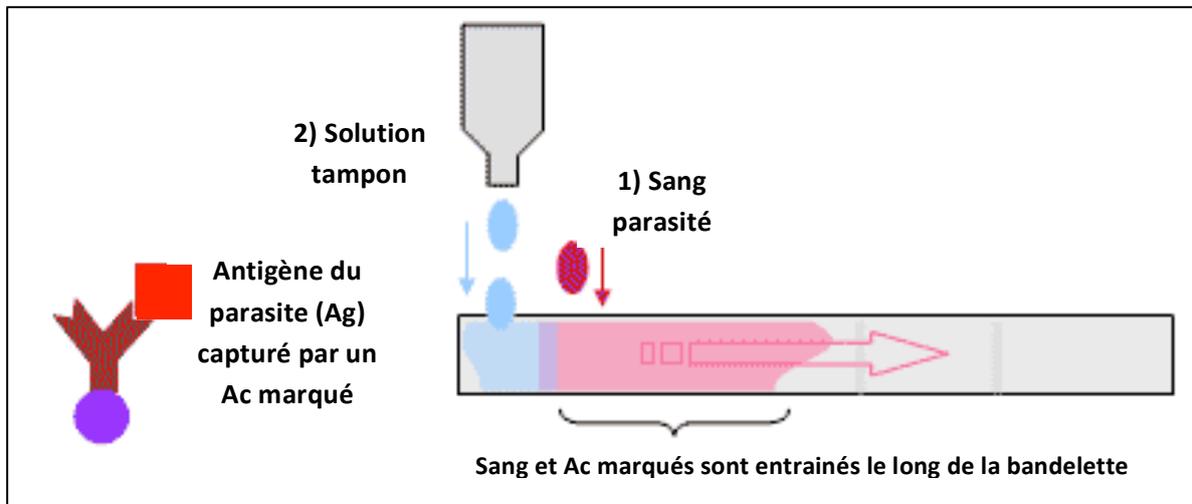


Figure 10 : Étape 2 : Le sang du patient est mélangé avec un agent lysant sur la bandelette. Avec la destruction des globules rouges, davantage de protéines parasitaires sont libérées et accessibles à la détection. Les anticorps marqués vont alors se fixer sur la protéine cible. La solution tampon est ensuite déposée et va entraîner la phase mobile le long de la bandelette, sur les lignes test et contrôle, grâce à la capillarité des fibres de nitrocellulose. (<http://www.wpro.who.int/malaria/sites/rdt/>)

- **Étape 3**

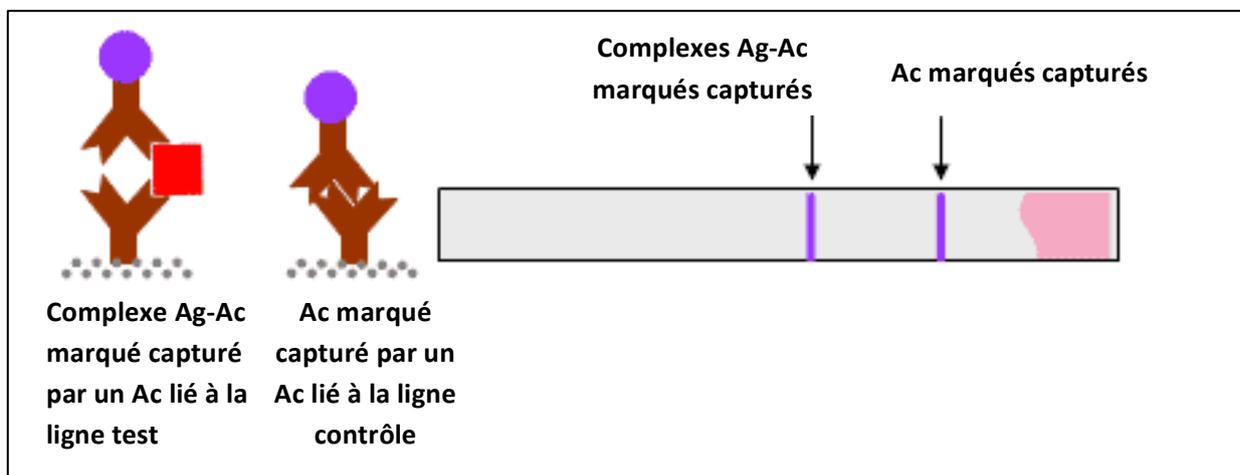


Figure 11 : Étape 3 : Si l'antigène est présent, le complexe antigène-anticorps marqué sera capturé par les anticorps liés à la ligne test. Si un nombre suffisant de ces complexes est présent, les particules marquées s'accumuleront sur la ligne jusqu'à ce qu'elle devienne visible. Si l'antigène est absent, cette bande foncée n'apparaîtra pas. Les anticorps excédentaires (non liés aux antigènes cibles) seront capturés par les anticorps liés de la ligne de contrôle, montrant ainsi que la phase mobile a bien migré et que les capacités de fixation de la dose d'anticorps marqués présente ne sont pas saturées. (<http://www.wpro.who.int/malaria/sites/rdt/>)

III.2. Anatomie d'un test de diagnostic rapide

Les tests de diagnostic rapide se présentent sous différentes formes (**figure 12**).

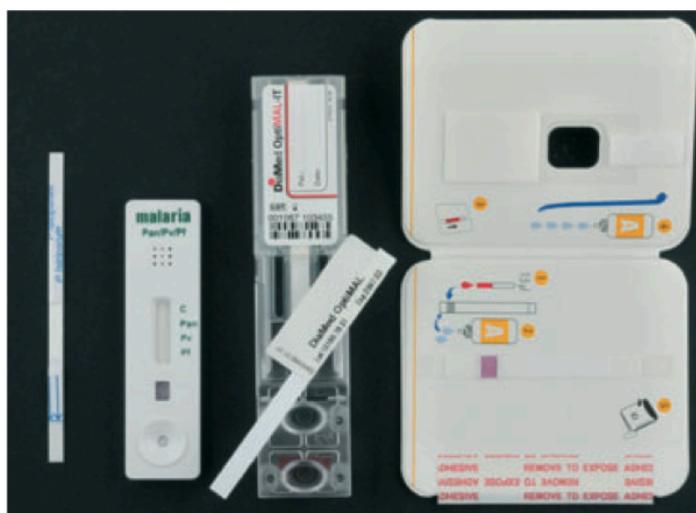


Figure 12 : Différentes formes de TDR : de gauche à droite, une bandelette réactive (à plonger dans un tube), une cassette, un hybride et une carte (Maltha *et al.*, 2013).

III.2.1 Support du test : exemple de la cassette

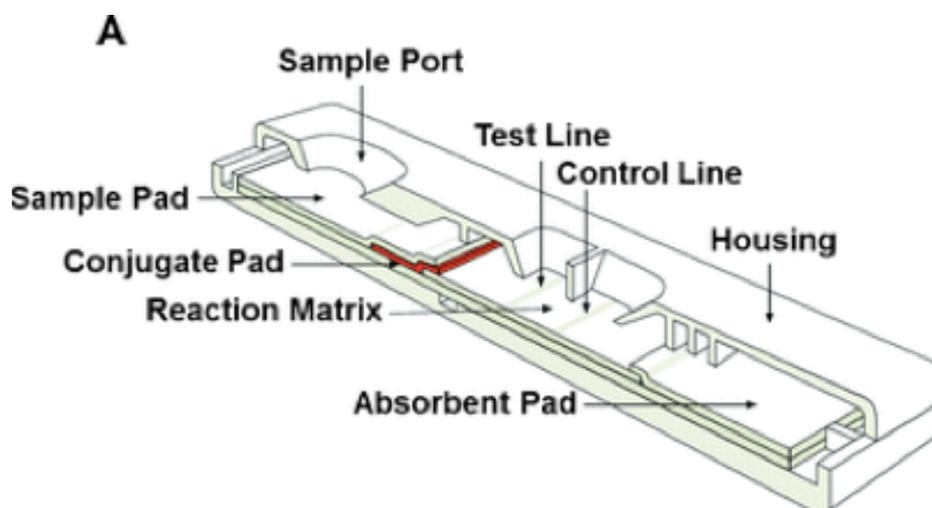


Figure 13 : Vue schématique d'un test immunochromatographique à flux latéral typique (Yetisen *et al.*, 2013). « Sample pad » : tampon échantillon; « sample port » : orifice échantillon; « conjugate pad » : tampon conjugué ; « reaction matrix » : matrice de réaction ; « absorbent pad » : tampon d'absorption ; « test line » : ligne de test ; « control line » : ligne de contrôle ; « housing » : boîtier.

Les tests de diagnostic rapide (**Figure 13**) sont généralement constitués des éléments suivants :

- **Tampon échantillon**

Il sert à moduler la variabilité chimique d'un échantillon brut en le traitant et le libère correctement ajusté. Pour cela, il est imprégné d'une solution tampon, de surfactants, d'agents bloquants, d'additifs (agents lysants) et d'agents desséchants.

- **Tampon conjugué**

Ce tampon est le support d'anticorps marqués, de surfactants et de polymères. Il va permettre la fixation des anticorps marqués sur les antigènes présents dans l'échantillon et la libération de ce complexe qui sera entraîné sur la bandelette par la phase mobile. Il est constitué de fibres de verre, où seront temporairement fixés les anticorps marqués, et de polyesters.

- **Membrane de réaction**

Cette membrane comporte deux lignes (contrôle et test) qui facilitent le mécanisme de capture du complexe anticorps marqués-antigènes et forment des bandes visibles lorsque l'analyte est présent/absent. Elle est constituée de nitrocellulose capable de fixer par absorption irréversible les anticorps de capture grâce à son hydrophobicité, mais également de nylon, de polyvinylidene fluoride et de surfactants.

- **Réservoir de déchets ou tampon absorbant**

Il sert de réservoir pour l'excès d'échantillon afin d'éviter que celui-ci ne subisse un reflux vers la membrane de réaction et ne cause de faux positifs.

- **Support et boîtier**

Le support est situé sous les différents tampons, aide à les maintenir en place et assure la rigidité du dispositif. Fabriqué en plastique à bas-coût, le boîtier préserve la bandelette vis-à-vis des conditions extérieures, empêche la contamination, permet à l'utilisateur d'accéder au tampon échantillon et maintient l'alignement des composants en permettant la visualisation des résultats (Yetisen *et al.*, 2013).

III.2.2 Anticorps de détection

i. Rappels sur les anticorps

Les anticorps sont des protéines de la famille des immunoglobulines produites par les organismes vertébrés afin de se défendre contre un antigène étranger (virus, bactérie, toxine ...) Ils peuvent être caractérisés par leur capacité à se lier à un antigène d'une part et à une cellule spécialisée du système immunitaire d'autre part. Pour cela, leur structure de base présente deux types de domaines (**Figure 14**) : le domaine Fc constant, où sera fixé le colorant de marquage et les deux domaines Fab comportant des régions variables qui se fixeront aux épitopes des antigènes.

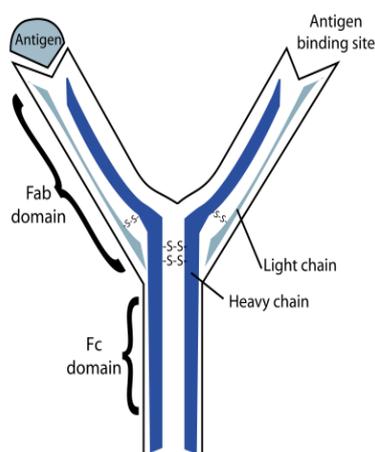


Figure 14 : Schéma d'un anticorps IgG
(Koivunen and Krogsrud, 2006).

ii. Production d'anticorps

Le type d'immunoglobulines utilisées pour la capture de l'antigène influence la sensibilité d'un TDR. Il est possible d'utiliser des IgM ou des IgG mAbs (monoclonaux) au sein d'un TDR. Les IgM sont la première classe d'anticorps produits lorsqu'une personne ou un animal est exposé à des virus, bactéries ou toxines. Les IgM ont une durée de vie très courte et disparaissent quelques jours après l'infection. Ils sont remplacés par des IgG sécrétés en quantité beaucoup plus importante dans les fluides corporels (le sang, la lymphe et les exsudats) (Mouatcho and Goldring, 2013). Actuellement, les IgM mAbs sont majoritairement utilisés.

Les anticorps polyclonaux sont isolés de sérum d'animal immunisé, principalement des lapins. Le sérum contient alors plusieurs sortes d'anticorps présentant chacun une affinité pour différents épitopes du même antigène, une avidité et une spécificité différente. L'avidité d'un anticorps représente la stabilité de son complexe avec l'antigène. Celle-ci est déterminée par son affinité pour l'antigène, le nombre de sites de liaisons possibles à celui-ci et la configuration géométrique du complexe anticorps-antigène (Koivunen and Krogsrud, 2006).

Les anticorps monoclonaux sont plus homogènes en terme de spécificité et d'affinité. En effet, leur méthode de production repose sur l'immunisation de souris (ou de rats et plus rarement d'humains) avec un antigène suivi par l'hybridation de lymphocytes B de la rate avec des cellules de myélome murin (Koivunen and Krogsrud, 2006). L'hybridome produisant l'anticorps souhaité sera ensuite sélectionné parmi les différents hybridomes produits. Il pourra être cultivé indéfiniment et injecté à une souris afin de produire l'anticorps monoclonal choisi en plus grande quantité. Le choix de l'anticorps monoclonal le plus afin pour un antigène donné permet donc d'optimiser la sensibilité d'un test de diagnostic rapide.

iii. Marquage

Les anticorps sont marqués au niveau de leurs chaînes lourdes (=fragment Fc). Le choix de l'or colloïdal comme marqueur s'explique par son fort coefficient d'extinction par rapport aux autres types de colorants. Il est également de très petite taille et peut donc être présent en plus grande quantité sur la ligne de test, ce qui garantit, avec la forte intensité colorimétrique de l'or, une plus grande facilité de discrimination des signaux faiblement positifs (Yetisen *et al.*, 2013).

III.3 Systèmes de prélèvement du sang du patient

De la même façon que pour les gouttes épaisses et les frottis sanguins, il est nécessaire de prélever du sang périphérique chez le patient afin de pouvoir le déposer sur le test. Pour cela, le plus simple est de prélever une ou deux gouttes de sang à l'aide d'un capillaire après avoir piqué le doigt, sur la face latérale de l'annulaire de préférence, avec un dispositif autopiqueur à usage unique de type lancette (**Figure 15**) (Enseignants de Parasitologie et Mycologie-ANOFEL, 2014).



Figure 15 : Prélèvement de sang périphérique à l'aide d'une lancette à usage unique. En haut, dévissage de la partie protectrice de l'aiguille. En bas, piqûre peu douloureuse du doigt du patient. (3)

Cette opération doit être effectuée dans les conditions les plus stériles possibles : le personnel de santé devra porter des gants et désinfecter correctement le patient. Les déchets devront être jetés dans des dispositifs d'élimination spéciaux (DASRI si possible, une boîte spéciale pour objets coupants sinon). Une notice d'utilisation des tests de diagnostic rapide à l'intention du personnel de santé élaborée par les organismes de santé mondiaux figure en **Annexe**.

III.4. Avantages et applications des tests de diagnostic rapide

Les TDR présentent de nombreux avantages. Ce sont des techniques de diagnostic très rapides d'une part : le résultat peut être obtenu en 5 – 20 min maximum. D'autre part, leur utilisation ne demande aucun investissement économique dans des équipements de laboratoire, ni d'électricité. Sa facilité d'utilisation et d'interprétation permet de former directement le personnel de santé en zone endémique.

Un guide a été rédigé par l'organisme FIND en 2013 afin d'aider à l'implémentation des tests de diagnostic rapide dans les programmes de contrôle du paludisme (Foundation for Innovative New Diagnostics, 2013). Ce sujet sera abordé au **chapitre VI** de ce mémoire. De par ces avantages et leur facilité de transport, ils sont très adaptés à une utilisation en zone d'endémie et permettent de tester un nombre important de personnes en un minimum de temps.

Suivant le contexte dans lequel on souhaite l'utiliser, c'est-à-dire le niveau de transmission d'une zone d'endémie, les performances requises pour un test varient. Leur plus grand rôle à jouer pour la santé publique réside dans la gestion des cas au niveau communautaire ou périphérique, où il est difficile de maintenir des examens microscopiques de qualité. Dans ce contexte, un diagnostic efficace du paludisme est essentiel :

- afin de confirmer ou d'infirmer une suspicion de paludisme chez les patients symptomatiques,
- afin d'orienter la prescription des traitements antipaludéens,
- afin de surveiller l'incidence ou la prévalence du paludisme, dans le but de cibler des actions de prévention et d'évaluer les programmes de santé.

Les TDR du paludisme permettent la prise en charge rapide des patients fébriles, soit en posant un diagnostic définitif de paludisme (afin de pouvoir administrer un traitement antipaludéen à temps et de sauver des vies) si le résultat est positif, soit en contribuant à la mise en place rapide d'un diagnostic alternatif et d'une prise en charge de la fièvre si le résultat est négatif.

Cependant, l'achat de ces kits au sein de centres de santé doit se faire avec précautions : ils ne présentent pas tous les mêmes performances et la façon dont la qualité des tests est contrôlée varie suivant le fabricant. Pour cela, depuis 2008, l'OMS et FIND ont mis en oeuvre un programme d'évaluation sur plus de 200 tests actuellement sur le marché (Mouatcho and Goldring, 2013; World Health Organization, 2014b; World Health Organization *et al.*, 2014).

Le **chapitre V** de ce mémoire traitera plus en détail du contrôle qualité des TDR.

IV. Différentes protéines cibles des TDR

Trois types de protéines spécifiques de *Plasmodium*, HRP2 (« Histidine Rich Protein »), la lactate déshydrogénase et l'aldolase, sont actuellement détectées par les tests de diagnostic rapide commercialisés. De nombreuses études ont permis de mettre en avant les avantages et les limites de ces protéines qui seront détaillés ici.

IV.1. HRP2

IV1.1.1. Caractéristiques de HRP2

La protéine riche en histidine HRP2 est une protéine soluble dans l'eau, spécifique de *P. falciparum*, et produite abondamment par les stades asexués et les gamétocytes. Elle est caractérisée par une répétition de séquences adjacentes d'acides aminés, riches en histidine (les motifs AHH et AHHAAD sont les plus courants), ce qui permet la détection par de nombreux antigènes et augmente la sensibilité des TDR (Wellems and Howard, 1986). Cette protéine présente trois isoformes : HRP1, HRP2 et HRP3. HRP2 se situe dans la vacuole parasitophore ainsi que dans le cytoplasme du parasite et contribue à la détoxification de l'hème (Mouatcho and Goldring, 2013). Elle est retrouvée sous forme circulante dans le sang du patient après rupture des schizontes (Baker *et al.*, 2010).

Cette caractéristique et la production abondante d'HRP2 ont été les arguments majeurs de sa sélection en tant que marqueur moléculaire de détection du paludisme. Par ailleurs, c'est une protéine stable dont la concentration dans le sang est corrélée à la biomasse parasitaire (Dondorp *et al.*, 2005).

HRP2 possède un seuil de détection d'approximativement 100 parasites/ μ L. Elle est donc la protéine permettant la détection la plus sensible de tout l'arsenal de tests de diagnostic rapide avec 95 % de sensibilité à *P. falciparum* (Abba *et al.*, 2011; World Health Organization *et al.*, 2014). Cette sensibilité augmente avec la densité parasitaire (Abeku *et al.*, 2008). Le test à PfHRP2 est donc présenté comme une alternative fiable à la microscopie en zone d'endémie à haute transmission et constitue le type de TDR le plus largement utilisé à l'heure actuelle pour *P. falciparum*. Il est également indiqué dans le diagnostic du paludisme placentaire chez la femme enceinte. Lors de la grossesse, le parasite demeure séquestré dans les tissus placentaires et il est alors difficile de le détecter par microscopie. Dans ce contexte, une étude en Ouganda a démontré que la sensibilité et la spécificité des TDR, cependant inférieures à la microscopie, rendaient cet outil intéressant dans la détection du paludisme chez la femme enceinte (Kyabayinze *et al.*, 2011).

IV1.1.1 Limites du TDR spécifique de HRP2

Limites générales de détection

Du fait de son seuil de détection élevé, évalué à 100 parasites/ μL , ce test est très sensible en cas d'infection aiguë par *P. falciparum* mais présente un intérêt limité pour les interventions de pré-élimination chez les porteurs asymptomatiques (Tiono *et al.*, 2014). D'autre part, un effet prozone a été observé lors de l'utilisation de TDR détectant HRP2 : des effets de faux négatifs ou faibles positifs ont été induits par un excès d'antigènes dû à une forte parasitémie. Ce phénomène est dû à un défaut de formation du complexe antigène - anticorps marqué qui ne sera donc pas ou moins capté par l'anticorps fixe et donc moins détecté (Luchavez *et al.*, 2011).

Limites métaboliques

La protéine HRP2 persiste dans le sang jusqu'à deux semaines après le traitement antipaludéen. Elle induit alors un taux de faux positifs important chez les patients guéris, ayant contracté une pathologie aux symptômes fébriles semblables au paludisme. Il n'est donc pas possible de surveiller la clairance parasitaire et de détecter précocement l'efficacité du traitement. Cela peut compromettre le rapport coût/efficacité de ces tests (Abeku *et al.*, 2008).

Limites génétiques

Le polymorphisme observé au sein des séquences répétées du gène *Pf HRP2* pourrait être la cause de la grande variation de sensibilité des TDR entre des isolats provenant du même pays et entre des isolats de pays différents (Baker *et al.*, 2005). Dans une étude menée au Sénégal en 2014, 29 polymorphismes d'un seul nucléotide, des insertions et des délétions ont été détectés au sein des séquences de motifs répétés, utilisées comme épitopes. La diversité nucléotidique observée est semblable à celle des gènes hautement polymorphiques comme le gène *msp1* (*merozoite surface protein 1*), impliqué dans la réponse immunitaire (Deme *et al.*, 2014). Cependant, d'autres études mettent en avant le fait que seule la sensibilité de détection de faibles parasitémies (< 200 parasites/ μL) pourrait être affectée par ces variations génétiques. En effet, en cas de forte parasitémie, il n'existe pas de corrélation entre les performances des tests et le polymorphisme de HRP2 (Baker *et al.*, 2010).

D'autre part, la délétion du gène PfHRP2 a récemment été observée au Pérou, empêchant la détection de *P. falciparum* par les TDR à HRP2 et induisant de faux négatifs (Akinyi *et al.*, 2013; Maltha *et al.*, 2013).

Dans les scénarios où la transmission du paludisme diminue rapidement, l'utilisation exclusive d'un test de diagnostic dont la sensibilité varie avec le nombre d'épitopes HRP2 peut induire une pression évolutive, augmentant ainsi la sélection des souches les moins détectables, donc avec le moins d'épitopes possible (Burton *et al.*, 2014).

IV.2. La lactate deshydrogénase (LDH)

IV1.1.1. Caractéristiques de la LDH

La lactate deshydrogénase ou pLDH, est une enzyme retrouvée dans la voie de la glycolyse chez les stades sexués et asexués de *Plasmodium*. La séquence du gène pLDH est hautement conservée entre les souches de parasites : il n'y a donc pas de polymorphismes au niveau des épitopes antigéniques (Talman *et al.*, 2007). La détection de pLDH est donc, de ce fait, la plus spécifique à 98,5 % contre 95,2 % pour HRP2 (Abba *et al.*, 2011). Le gène *pldh* présente à la fois un motif commun à toutes les espèces de *Plasmodium*, mais également des motifs spécifiques d'espèces. De fait, les TDR basés sur la pLDH peuvent détecter spécifiquement, selon les anticorps mis au point, *P. falciparum* (pf-pLDH), *P. vivax* (pv-pLDH) mais également de façon non spécifique (ou pan spécifique : pan-pLDH) le genre *Plasmodium* (Piper *et al.*, 2011). Ces TDR possèdent un seuil de détection d'approximativement 200 parasites/ μ L. Des études ont montré que les parasites devaient être vivants dans le sang du patient afin qu'il y ait une production de pLDH (Makler and Piper, 2009). Ces tests peuvent également être utilisés dans la détection du paludisme placentaire chez la femme enceinte (Kyabayinze *et al.*, 2011).

Les TDR basés sur pLDH possèdent des avantages sur les TDR à HRP2, comme la clairance rapide de pLDH après un traitement réussi (environ 10 jours) : elle permet d'évaluer la réponse au traitement antipaludéen chez un patient et de prédire les échecs thérapeutiques (Gerstl *et al.*, 2010). D'autre part, les TDR à pLDH ne présentent pas d'effet prozone (faux négatifs par excès d'anticorps dans le cas de forte parasitémie) (Gillet *et al.*, 2011).

IV1.1.1. Limites du TDR spécifique de la LDH

Le seuil de détection des TDR à pLDH (200 parasites/ μ L) restreint cependant leur utilisation optimale aux cas de fortes parasitémies avec une sensibilité de 93,2 % pour *P. falciparum* (Abba *et al.*, 2011). Ils apparaissent donc moins performants que ceux à HRP2 dans les zones de faible transmission (Makler and Piper, 2009).

Les TDR actuels ciblant *P. vivax* présentent des anticorps contre Pv-pLDH. Toutefois, leur seuil de détection reste plus faible que pour *P. falciparum* (Mengi *et al.* 2014). De plus, il n'existe pas de détection spécifique des autres espèces de *Plasmodium* (*P. ovale*, *P. vivax*, *P. knowlesi* ...)

D'autre part, la pLDH est également produite par les stades gamétocytes du parasite, qui ne sont pas éliminés par les traitements ACT conventionnels. Cette observation peut faire craindre une incapacité de ce type de TDR à détecter l'élimination progressive des parasites, ou clairance parasitaire, et donc à conclure à l'efficacité du traitement (Mueller *et al.*, 2007). Cependant, les gamétocytes résiduels sont peu nombreux après traitement et leur densité se situe alors sous le seuil de détection des TDR (Sowunmi *et al.*, 2008).

IV.3. L'aldolase

IV1.1.1. Caractéristiques de l'aldolase

L'aldolase est une enzyme glycolytique retrouvée dans de nombreux tissus de l'hôte humain, où l'on dénombre trois isoenzymes différentes. Au sein du parasite *Plasmodium*, il n'existe qu'une seule sorte d'aldolase de 369 acides aminés chez *P. falciparum* et *P. vivax* (Mouatcho and Goldring, 2013). La séquence du gène codant pour l'aldolase est hautement conservée entre les souches de parasites mais présente cependant une homologie de séquence de 61-68 % avec les aldolases des eucaryotes (Lee *et al.*, 2006). Les anticorps de détection de l'aldolase permettent de détecter spécifiquement *P. falciparum* et *P. vivax* mais aussi les deux espèces ensemble de façon pan-spécifique (Dzakah *et al.*, 2013). La qualité de détection de l'antigène diminuerait en dessous de 500 parasites/ μ L (Ashton *et al.*, 2010). L'antigène persiste moins de 10 jours dans le sang et pourrait donc potentiellement permettre le suivi thérapeutique de l'infection (Dzakah *et al.*, 2013).

IV1.1.1. Limites de l'aldolase

Peu d'études comparatives ont été menées par rapport à HRP2 et à la LDH. La sensibilité générale des tests reste assez basse par rapport aux autres protéines cibles, entre 48 et 80 % pour *P. falciparum* et entre 15 et 83 % pour *P. vivax* (Ashton *et al.*, 2010). Cela peut être dû au fait que l'aldolase est produite en faible quantité par le parasite et que sa détection est donc dépendante de la parasitémie du patient.

Cela peut aussi être dû au faible nombre d'épitopes par parasite (non répétés comme pour HRP2) ou encore à la qualité des TDR (Mouatcho and Goldring, 2013). Enfin, un événement de polymorphisme sur un seul nucléotide (SNP) a été découvert sur des isolats coréens de *P. vivax* mettant en difficulté la spécificité des tests dans ce pays (Abba *et al.*, 2011).

IV.4. Résumé des caractéristiques des TDR actuels

Caractéristiques	HRP2	pLDH	Aldolase
Espèces détectées	<i>P. falciparum</i> seul	<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. ovale</i> , <i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i>
Persistance après clairance parasitaire (jours)	> 28	< 10	< 10
Variations génétiques	Oui	Aucune à l'heure actuelle	Aucune à l'heure actuelle #
Répétition d'épitopes	Oui	Non	Non
Sensibilité pour <i>P. falciparum</i> (%)	95 *	93,2 *	48-80 §
Sensibilité pour <i>P. vivax</i> 2000 parasites/ μ L (%)	Non mentionné	78,9-98,8 §	15-83 §
Spécificité (%)	95,2 **	98,5 **	//
Surveillance de la clairance parasitaire	Non	Oui	Potentielle
Surveillance de l'efficacité du traitement	Non	Oui	Potentielle
Effet Prozone	Oui	Non	Non

Kim *et al.* (2012) ont trouvé une mutation ponctuelle dans des isolats coréens de *P. vivax*

* Abba *et al.* (2011)

** Spécificité pLDH > HRP2 (Abba *et al.*, 2011)

§ Résumé des données de Mouatcho *et al.* 2013

// Données insuffisantes

Tableau 1 : Caractéristiques des TDR actuels (Kim *et al.*, 2012)

Ce tableau décrit les principales caractéristiques de chaque protéine cible à travers leurs variations génétiques, le type d'espèce détecté, leur spécificité et sensibilité, ainsi que les possibilités de surveillance de l'efficacité d'un traitement. Il fait ainsi ressortir les avantages et limites de chacune.

IV.5. Limites communes

Cas de faux positifs

- Faux positifs par réactions croisées avec le facteur rhumatoïde (Lee *et al.*, 2014)
Quatre tests de diagnostic rapide différents, comprenant des anticorps détectant HRP2 et pLDH, ont été évalués en testant 82 patients sains (contrôles), 89 patients infectés par *P. vivax* et 92 patients positifs pour le facteur rhumatoïde mais non infectés par le paludisme. Le taux de faux positifs a été mesuré entre 2,2 % et 13 % pour les patients positifs au facteur rhumatoïde. Un taux élevé de facteur rhumatoïde est donc associé avec des résultats faux positifs lors d'un test de diagnostic rapide du paludisme.
- D'autres cas de faux positifs ont été attribués à des facteurs immunologiques et infectieux tels que l'hépatite C, la schistosomose, la toxoplasmose, la dengue, la leishmaniose, la maladie de Chagas et la trypanosomose africaine (Mouatcho and Goldring, 2013)
- Des réactivités croisées entre les espèces de *Plasmodium* ont été observées (Lee *et al.*, 2014).

IV.6. Combinaisons de protéines cibles

Les tests de TDR peuvent détecter spécifiquement les différentes espèces de parasites en assurant la capture d'une ou plusieurs protéines cibles. Ils peuvent détecter :

- *P. falciparum* (Pf-HRP2 ou Pf-pLDH (rare)) seul.
Exemple : Advanced Quality™ One Step Malaria Pf Test – Intec Product Inc[®]
- *P. vivax* (Pv-pLDH) seul (toujours associé à un pan-LDH dans le commerce).
- **toutes les espèces** de *Plasmodium* (pan-pLDH ou aldolase) en une seule ligne.
Exemple : CareStart™ Malaria pLDH (PAN) – Access Bio Inc[®]

Les trois types de détection peuvent être combinés en :

- **deux** lignes de détection Pv-pLDH ou Pf-pLDH (ou PfHRP2) ou pan-pLDH et un contrôle. Exemple : SD BIOLINE Malaria Antigen Pf - Standard diagnostic Inc[®]
- **trois** lignes de détection pour Pv-pLDH, Pf-pLDH (ou PfHRP2), et un contrôle.
Exemple : Malaria Pf (HRPII) / PV (PLDH) Antigen Detection Test Device - Genomix Molecular Diagnostics Pvt. Ltd.
- **quatre** lignes combinant la détection de PfHRP2, pan-pLDH, Pv-pLDH et un contrôle.
Exemple : ICT Diagnostics™ Malaria Pf/Pv - ICT-Amrad[®]

IV.7. Nouveaux marqueurs moléculaires

De nombreuses études ont été menées afin de trouver de nouveaux marqueurs moléculaires de détection du paludisme destinés à pallier aux limites des biomarqueurs existants.

L'approche protéomique a permis d'identifier de nouvelles protéines candidates : en 2013, une étude a permis de comparer le protéome plasmatique de patients à paludisme moyen, sévère et de patients guéris. On a ainsi pu mettre en évidence 4 protéines de *P. falciparum* qui sont présentes en quantité plus abondante chez les patients infectés par rapport aux patients sains : l'hypoxanthine phosphoribosyltransferase (pHPRT), la phosphoglycerate mutase (pPGM), la lactate deshydrogénase (pLDH), et la fructose- bisphosphate aldolase (pFBPA). À partir de ces recherches, pHPRT a été introduit comme nouveau biomarqueur du paludisme aigu à *P. falciparum* (Maltha *et al.*, 2013). L'utilisation de pHPRT dans le diagnostic du paludisme sévère est en cours de validation.

Le protocole novateur utilisé dans cet article ouvre la porte à la découverte de nombreux marqueurs moléculaires de détection plus pertinents que les anciens.

V. Évaluation de la qualité des tests de diagnostic rapide

Devant le nombre croissant de tests de diagnostic rapide apparus sur le marché et l'augmentation massive de leur utilisation sur le terrain, il est apparu impératif de disposer d'une méthode standardisée d'évaluation de la qualité des TDR afin de pouvoir aider les cliniciens des zones endémiques dans le choix de dispositifs diagnostiques adaptés.

Dans ce cadre, les principales caractéristiques de qualité que l'on doit retrouver dans un test de diagnostic rapide sont :

- La **sensibilité** : afin de détecter tous les cas de paludisme.
- La **spécificité** : afin de discriminer précisément les pathologies fébriles non paludiques et le paludisme, d'assurer une prise en charge correcte des cas et une surveillance précise de la pathologie.
- La **stabilité** : pour maintenir l'exactitude des tests après transport et stockage aux conditions ambiantes.
- La **facilité d'utilisation** et la **sécurité** : afin de permettre une analyse sûre des échantillons et une interprétation exacte des résultats.

Les variations observées dans la qualité des TDR peuvent s'expliquer par leur technique de fabrication d'une part (qualité de conception/fabrication) ou par leur exposition à de fortes températures durant le transport et le stockage d'autre part. Garantir la qualité d'un TDR s'avère essentiel du fait de l'importance vitale de son efficacité dans le diagnostic d'une pathologie potentiellement mortelle. Cette étape est également indispensable au renforcement de la confiance des cliniciens et des patients dans les résultats de ces tests, et donc à l'adhérence de ces derniers au traitement (4).

Depuis 2006, l'Organisation mondiale de la Santé, le Programme spécial de recherche et de formation concernant les maladies tropicales (TDR) et la Fondation pour l'innovation en matière de nouveaux produits diagnostiques (FIND) ont lancé un programme d'évaluation ouvert à tous les fabricants de TDR sous la norme ISO-13485 et publient annuellement les résultats de ces sessions. Il existe trois étapes de contrôle de la qualité comme le décrit la vidéo de la **Figure 16**. Dans un premier temps, le fabricant assure le développement du produit et donne accès à des standards de référence.

Le Contrôle qualité se déroule suivant :

- Étape 1 : Test des produits : Évaluation avant achat de la performance des produits.
- Étape 2 : Confirmation de la qualité des produits à leur arrivée dans le pays avant distribution sur le terrain.
- Étape 3 : Contrôle de qualité au moment de leur utilisation (puits de contrôle positif) : Assure que les TDR ont maintenu leur efficacité au cours du transport et du stockage, avant utilisation.

Utilisateurs : formation appropriée et instructions, prise en charge des résultats positifs et négatifs, surveillance de la prévalence de la pathologie et de l'approvisionnement des produits.

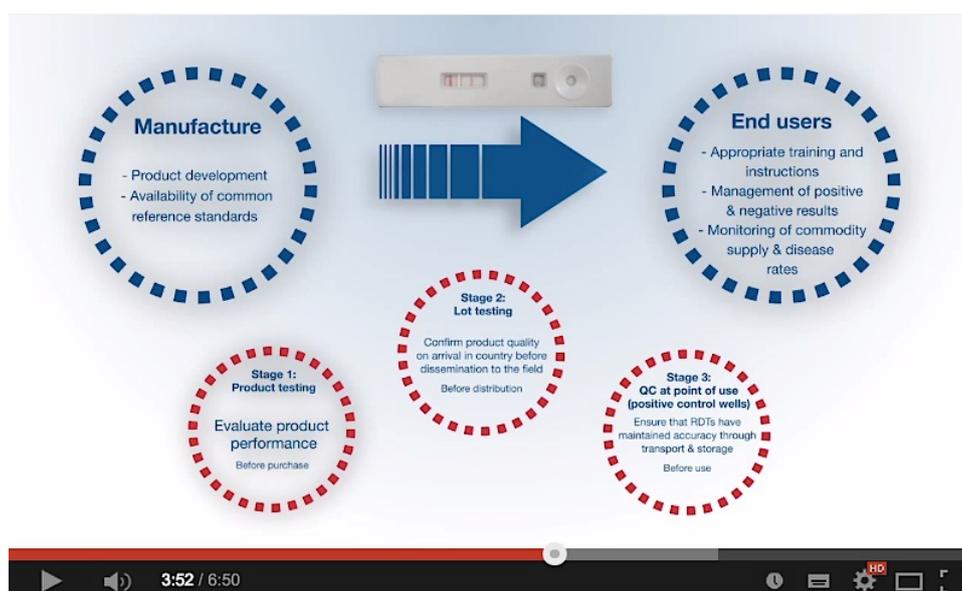


Figure 16: Instaurer la confiance : évaluation de la qualité des TDR pour le Paludisme (FIND, <https://www.youtube.com/watch?v=COVXZCeITW8>, Ajoutée le 9 décembre 2013 (5))

Cette vidéo définit le rôle des TDR et l'importance d'évaluer leur qualité afin de réduire le gaspillage des antipaludéens, les erreurs de traitement des patients, de diminuer le coût des interventions et d'augmenter la confiance dans le système de santé.

Les recommandations sur les critères de sélection et les principes des tests de diagnostic rapide sont régulièrement mises à jour par l'OMS lors de réunions de comités d'experts.

V.1. Principes d'évaluation

❖ Étape 1 : Test des produits avant l'achat.

Les fabricants, sous norme ISO-13485, sont invités à soumettre leurs produits à chaque session de test de produits. Cette étape d'évaluation est actuellement assurée par le CDC (Center for disease control and prevention) aux États Unis. Depuis 2006, 210 produits ont pu être évalués durant 5 sessions de tests du programme. Les échantillons du panel sont issus de souches adaptées en culture et de prélèvements de patients provenant de 12 sites en Afrique, Asie et Amérique du Sud.

La performance d'un TDR est mesurée grâce à un Score de Détection sur le Panel (SDP) qui est le pourcentage d'échantillons sélectionnés dans le panel qui donnent l'un des deux résultats suivants :

- À faible densité parasitaire (200 parasites/ μL), chaque échantillon est testé par deux TDR provenant de deux lots différents : le TDR doit donc montrer un résultat positif pour quatre tests afin que l'échantillon soit positif.
- Pour une forte parasitémie (2000 à 5000 parasites/ μL), le résultat doit être positif pour deux tests (un TDR par lot pour deux lots).

Le score de détection sur le panel est donc la mesure combinée d'un taux de positifs, incorporant des paramètres inter-tests et inter-lots. Par conséquent, ce n'est pas la même chose que la sensibilité clinique d'un TDR, qui est la mesure de la proportion de patients connus comme ayant la pathologie dont le test a donné un résultat positif (World Health Organization *et al.*, 2014).

Les tests de diagnostic rapide doivent être sélectionnés grâce aux critères suivants, admis par le programme de test des TDR du paludisme (World Health Organization, 2014b):

- Pour la **détection de *P. falciparum*** dans toutes les configurations de transmission, le score de détection sur des échantillons du panel de *P. falciparum* doit être au moins égal à 75% pour 200 parasites/ μL .
- Pour la **détection de *P. vivax*** dans toutes les configurations de transmission, le score de détection des échantillons du panel de *P. vivax* doit être au moins égal à 75% pour 200 parasites/ μL .
- Le taux de **faux positifs** doit être inférieur à 10 %.
- Le taux de **tests non valides** doit être inférieur à 5 %.

Seul l'achat de produits validant les 4 critères ci-dessus est recommandé par l'OMS.

La stabilité thermique et la facilité d'utilisation des TDR sont également évaluées au cours de cette première étape de test : ils sont alors testés sur une culture de 200 parasites/ μL dès la réception, puis 60 jours après incubation à 35°C et à 45°C. Les TDR présentant une haute stabilité thermique sont alors recommandés pour l'utilisation dans les zones de forte chaleur (World Health Organization, 2014b).

Il est intéressant de noter que l'organisme FIND a mis en place un guide en ligne destiné à trier les TDR en fonction des besoins d'un programme et des critères de sélection recommandés. Il est basé sur les performances des tests de produits des sessions 2-5 du programme et pourra être trouvé sur leur site (en cours de mise à jour pour les données de la session 5 de test) (World Health Organization, 2014b).

❖ **Étape 2 : Évaluation de la qualité des lots avant la distribution sur le terrain.**

La performance des produits pouvant varier entre les lots avec le temps, l'OMS recommande l'évaluation des lots avant ou après expédition du fabricant à l'acheteur. Cette évaluation est réalisée dans un centre testeur de lots en collaboration avec le programme OMS-FIND d'évaluation des produits TDR pour le paludisme, contribuant ainsi aux bonnes pratiques d'approvisionnement. Deux laboratoires ont actuellement pour mission de contrôler la qualité des lots de produits : l'Institut Pasteur du Cambodge (IPC) et l'Institut de Recherche de Médecine Tropicale aux Philippines. Ils sont financés par l'organisme UNITAID.

Un manuel, rédigé par l'OMS et FIND, fournit des méthodes répétables de production d'échantillons de référence, de parasitémie connue, ainsi que des méthodes d'évaluation des TDR pour le paludisme, semblables à celles de la première étape de test de produits (World Health Organization *et al.*, 2014). Les résultats obtenus en laboratoire ne sont alors extrapolables au terrain que si les conditions de stockage des TDR, ainsi que les espèces et souches de parasites analysées sont similaires aux conditions réelles d'utilisation. C'est pour cela qu'en plus d'un test initial à la réception des TDR, les laboratoires mandatés stockent certains produits du lot et les soumettent à une réévaluation à intervalles de temps réguliers afin de s'assurer de leur fonctionnement optimal jusqu'à la date de péremption, fournissant ainsi des informations précieuses sur leur stabilité. Ces méthodes sont donc adaptées au test des lots après l'achat, avant et pendant la distribution sur le terrain, afin de s'assurer que le lot de produits présente les critères nécessaires à son utilisation optimale (4).

❖ Étape 3 : Contrôle de la qualité avant utilisation

Afin d'assurer l'efficacité optimale des TDR dans la prise en charge des patients, il est important d'évaluer la qualité des dispositifs avant leur utilisation sur le terrain, souvent dans des cliniques éloignées ou dans les villages par des agents de santé. Ainsi, un protocole basé sur des puits de contrôle positif (ou PCW : positive control wells) a été développé afin de s'assurer du bon fonctionnement des TDR après exposition à des conditions de transports et de stockages variables. Ce nouvel outil constitue une méthode peu coûteuse et simple afin de tester les TDR sur le terrain et d'assurer le maintien de la qualité du TDR du fabricant jusqu'à l'utilisateur final (4).

Les PCW sont de petits tubes en plastique recouverts de protéines : HRP2, pLDH et aldolase (les cibles principales des TDR). Une solution d'antigènes recombinants, reconstituée dans le tube grâce à un volume d'eau précis, est ainsi déposée sur un TDR afin de simuler le sang infecté du patient (**Figure 17**). Si une bande de signal positif apparaît sur le TDR, avec l'apparition de la bande contrôle, le lot est alors de qualité suffisante pour être utilisé. Le personnel de santé peut également se servir de la PCW afin d'assurer la qualité des stocks d'un établissement de santé.

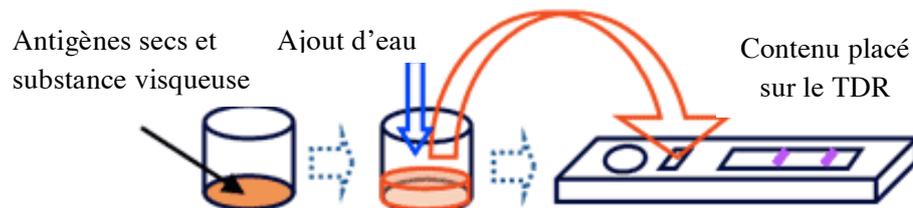


Figure 17 : Schéma illustrant l'utilisation d'un puits de contrôle positif (World Health Organization ; Foundation for Innovative New Diagnostics, 2014).

Actuellement, de nombreux tests sont réalisés afin de sélectionner, pour les PCW, des protéines recombinantes assurant une équivalence de résultats avec de vrais échantillons sanguins contenant des parasites. Depuis 2008, ces tests ont également été évalués par le personnel de santé en zone endémique.

Les questions ont porté sur leur format, leur utilité, la facilité de formation à leur utilisation, l'adhésion du personnel à ce dispositif au cours des soins de santé courants ainsi que leur impact sur l'utilisation des TDR (**figure 18**).



Figure 18: Formation des agents de santé à l'utilisation des PCW en Ouganda.

Ici, l'étape de prélèvement de l'eau à ajouter à l'antigène sec.

[\(http://www.finddiagnostics.org/programs/malaria-afs/malaria/rdt_quality_control/\)](http://www.finddiagnostics.org/programs/malaria-afs/malaria/rdt_quality_control/)

Cette enquête de terrain, menée dans trois régions du monde (Ouganda, Laos et Philippines), est destinée à développer et corriger les méthodes et outils qui peuvent être utilisés dans l'implémentation des PCW. Les données, collectées jusqu'en avril 2014, sont en cours de traitement (4).

V.2. Résumé des résultats de la 5^{ème} session d'évaluation des TDR

Depuis 2006, 210 produits ont pu être évalués durant 5 sessions de tests de TDR, dont 45 en 2013 lors de la cinquième session. Treize instituts de recherche ont été impliqués dans le prélèvement des échantillons ou leur caractérisation afin d'établir le panel d'évaluation. Entre janvier et décembre 2013, approximativement 58 400 TDR ont été testés par le CDC. Les résultats sont résumés dans les tableaux 4 et 5 du rapport de l'OMS (World Health Organization *et al.*, 2014). Les principales conclusions qui en ont été tirées sont les suivantes :

- Les résultats obtenus avec des échantillons de sang infecté et de sang sain, le score de détection sur le panel (SDP), le taux de positifs, le taux de faux positifs et la stabilité à la chaleur étaient similaires à ceux reportés dans les sessions 1-4.

- La moyenne de SDP pour des échantillons de *P. falciparum* à faible parasitémie (200 parasites/ μ L) était de 81,0 %, en adéquation avec les résultats de la session 4 (81,6 %). Cela suggère que la performance des tests aurait atteint un plateau après plusieurs sessions d'améliorations effectuées par les fabricants.
- La SDP de *P. vivax* à faible parasitémie s'est considérablement améliorée depuis la première session, les résultats pour les sessions 2, 3, 4 et 5 étant 75,0 %, 51,4 %, 61,8 % et 65,7 %.
- Les performances des produits varient beaucoup pour les faibles densités parasitaires (200 parasites/ μ L), mais la plupart ont montré un taux de détection important de *P. falciparum* et *P. vivax* à 2000 (ou 5000) parasites/ μ L.
- Les tests pour *P. falciparum* ciblant les antigènes HRP2 présentaient le SDP le plus élevé et les deux produits avec la plus basse performance à 200 parasites/ μ L ciblaient l'antigène pLDH spécifique de *P. falciparum*.
- Les performances des tests variaient indubitablement entre les lots, d'où l'importance des contrôles de qualité après achat.

Un certain nombre de TDR ayant détecté le paludisme à une parasitémie basse avaient peu de faux positifs, étaient stables à température tropicale, avaient une utilisation simple et pouvaient détecter *P. falciparum*, *P. vivax* ou les deux infections, augmentant ainsi le nombre de tests performants disponibles depuis les sessions 1-4. La publication des précédentes sessions d'évaluation de produits par l'OMS a contribué à influencer les pratiques d'approvisionnement des programmes nationaux de santé et des ONG, mais elle a également contribué à pousser le marché des TDR du paludisme vers la production de tests de meilleure qualité (World Health Organization *et al.*, 2014).

V.3. Défi technique du dispositif médical : stabilité thermique



Figure 19: Transport et stockage des TDR

(http://www.who.int/malaria/publications/atoz/malaria_rdt_central_2009.pdf)

Dans les conditions d'utilisation de terrain, les TDR sont généralement transportés et stockés dans des zones où la température ainsi que l'humidité fluctuent énormément (ex. : saison des pluies/saison sèche) (**figure 19**). De plus, tous les bâtiments de stockage ne disposent pas d'air conditionné afin de diminuer ces variations.

Par exemple, au Cambodge : pour une température moyenne de 28°C, les maximales atteignent jusqu'à 40°C en avril-mai et l'humidité atmosphérique peut monter jusqu'à 90 % en saison des pluies. Des études ont montré que ces conditions pouvaient considérablement endommager les tests et altérer leur sensibilité sur le terrain (World Health Organization *et al.*, 2014).

Le fabricant indique donc généralement sur l'emballage une gamme acceptable de températures de transport et stockage ainsi que les températures extrêmes à éviter. La plupart préconisent une température maximale de 30 à 40 °C. D'autre part, l'emballage individuel des TDR, conçu pour résister à l'humidité, contient généralement un agent desséchant afin de ralentir les dommages causés par la présence d'eau en suspension dans l'air (World Health Organization *et al.*, 2014). En pratique, le stockage dans des bâtiments disposant d'air conditionné est recommandé. Si cela n'est pas possible, une surveillance régulière de la température de la pièce de stockage doit être effectuée.

Au cours des sessions d'évaluation de l'efficacité des TDR, l'OMS et les organismes associés testent également la stabilité des produits à la chaleur et à l'humidité, ainsi que la qualité de leur emballage protecteur. Les TDR sont alors maintenus pendant deux mois à température ambiante (< 25 °C) et à 35 °C et 45 °C avec une humidité de 75%. Ils sont ensuite testés avec des échantillons afin d'évaluer leur stabilité à de telles températures (Chiodini *et al.*, 2007). L'importance de la stabilité thermique dépend des conditions dans lesquelles le produit sera transporté et stocké : elle constitue donc un paramètre non négligeable lors de la sélection d'un TDR par chaque programme national de contrôle du paludisme en fonction du pays et des conditions d'utilisation. Cette caractéristique sera moins critique dans des zones fraîches de haute altitude que dans des régions où la température peut atteindre 45°C en saison chaude (World Health Organization *et al.*, 2014).

Les TDR détectant Pf-pLDH ont été décrits comme étant moins résistants aux hautes températures que les tests à HRP2, bien que certains tests Pf-pLDH présentent actuellement une bonne stabilité sur une gamme de température étendue (World Health Organization *et al.*, 2014).

VI. Implémentation des TDR en zone endémique

Le contenu de ce chapitre est inspiré du guide d'implémentation des tests de diagnostic rapide publié par la « Foundation for Innovative New Diagnostics » (2013), ainsi que du site Internet de l'OMS sur les TDR (1).

VI.1. Bénéfices de l'implémentation des TDR

Au sein des objectifs à atteindre pour 2015, le plan d'action global contre le paludisme (GMAP) énonce clairement la nécessité d'une prise en charge de 100 % des patients par des tests diagnostiques de qualité (World Health Organization, 2013). Afin d'atteindre ce but, de nombreuses étapes sont nécessaires, dont la mise en place de bonnes pratiques d'approvisionnement et de contrôle qualité, expliqués dans les chapitres précédents (Figure 20).

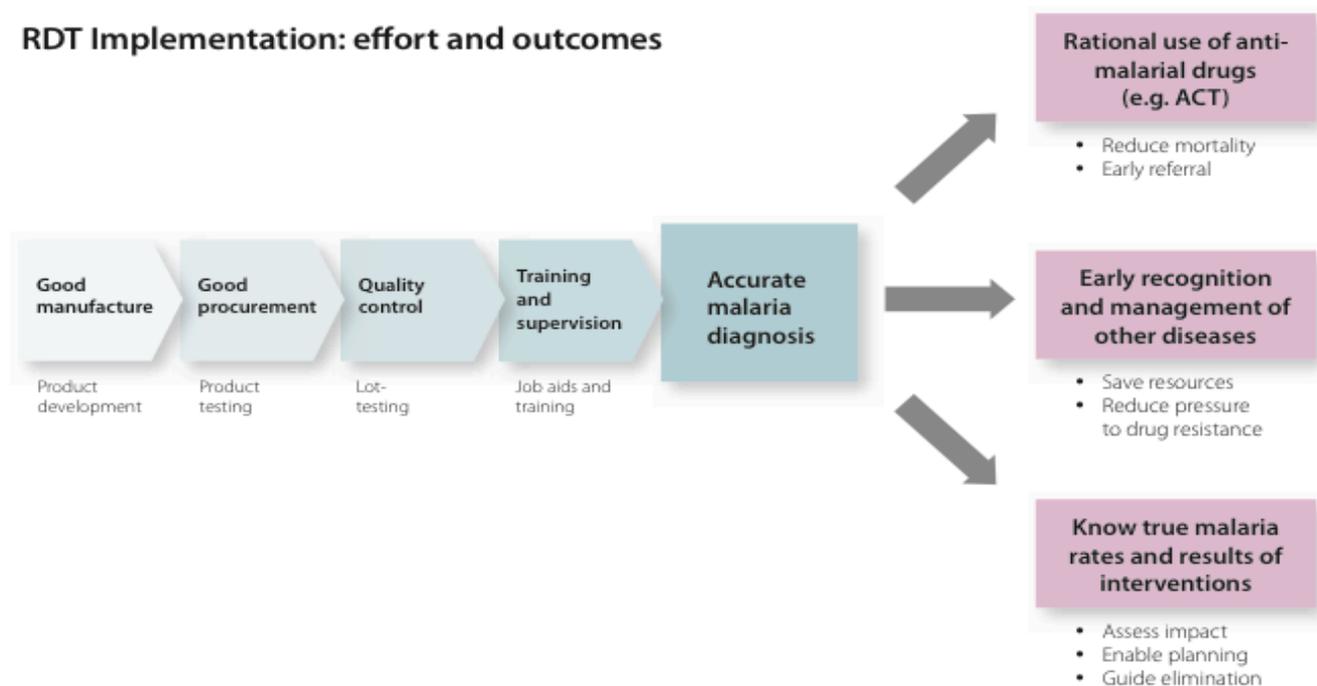


Figure 20: Implémentation des TDR : démarche et résultats (Chiodini *et al.*, 2007; Maltha *et al.*, 2013; World Health Organization *et al.*, 2014).

L'utilisation des TDR à l'échelle d'un pays peut avoir de nombreux avantages (Figure 19) :

- L'usage rationnel des traitements antipaludéens aide à réduire la mortalité en orientant rapidement la thérapeutique vers un traitement du paludisme ou d'autres maladies mortelles de symptômes semblables (méningite aiguë, infections respiratoires aiguës des voies inférieures ...)

- La détection précoce d'autres pathologies et leur traitement permettent d'épargner des ressources (les ACT sont onéreux) et d'éviter de créer une pression de sélection sur les parasites par prescription excessive d'antipaludéens, source d'émergence de la résistance.
- La surveillance épidémiologique de la prévalence de la maladie, en se basant sur des données de terrain, permet d'évaluer son impact, de mettre en place des stratégies afin d'éliminer le paludisme.

C'est pour cela que les programmes nationaux de contrôle du paludisme tendent à introduire progressivement l'utilisation des tests de diagnostic rapide dans les cliniques et au niveau des villages, grâce à la mise en place de programmes d'implémentation des TDR. De nombreux défis apparaissent ainsi, aussi bien dans la gestion logistique, que dans la formation des agents de santé communautaires.

VI.2. Mise en place d'un programme national d'implémentation des TDR

Dans le cadre de programmes de santé publique, les TDR du paludisme ont été utilisés à grande échelle et avec succès en Amérique du Sud, Afrique du Sud et Asie du Sud Est. Dans ces zones et certains pays d'Afrique subsaharienne, les TDR ont ainsi été complètement intégrés aux pratiques de routine lors de la prise en charge des cas de fièvre (p. ex. Sénégal, Zambie, Thaïlande, Cambodge et Afrique du Sud).

En septembre 2013, un guide a été rédigé par la « Foundation for Innovative New Diagnostics » (FIND) afin d'aider à l'implémentation de tests de diagnostic rapide dans les programmes nationaux de contrôle du paludisme.

La clé du succès repose sur la planification préalable de l'implémentation. Elle doit suivre un calendrier clair, efficace, basé sur les données récoltées sur le terrain, afin que les différents composants du programme soient en place au bon moment. Dans chaque pays, les programmes nationaux d'implémentation des TDR installent un groupe central de coordination. Ce groupe est responsable du choix critique du type de TDR utilisé au niveau national. Son rôle est de définir et de planifier les stratégies d'implémentation, c'est-à-dire l'application de directives en terme de prise en charge des patients, de contrôle de la qualité, du fonctionnement des chaînes d'approvisionnement et de logistique.

Enfin, il doit s'assurer que les différents acteurs du projet comprennent le processus et leur rôle au sein de celui-ci, mais également de l'information du public. Sans la mise en place de ces éléments clés de direction et de coordination, les fonds dépensés pour les TDR pourraient être gaspillés et une perte de confiance dans ces méthodes diagnostiques pourrait mettre un frein à la prise en charge appropriée des patients.

Exemple de plan d'implémentation national :

Planification et gestion du programme

- Identifier les différents acteurs, et sécuriser leur engagement vis-à-vis du projet.
- Mettre en place des groupes de travail et développer les directives de référence.
- Identifier les correspondants responsables de la surveillance journalière du plan d'implémentation.

Développer un calendrier et un budget pour l'implémentation

- Identifier les ressources humaines et matérielles nécessaires ainsi qu'une stratégie pour se les procurer.
- Réviser et mettre à jour, si besoin, les algorithmes de prise en charge des cas de paludisme et des autres pathologies fébriles.

Questions politiques et réglementaires

- Rédiger des documents réglementaires appropriés si besoin.
- Enregistrer les produits TDR.

Approvisionnement en TDR

- Rédiger des exigences en termes de caractéristiques des produits et du conditionnement.
- Mettre au point une liste de produits candidats.
- Estimer les besoins, les quantifier.
- Effectuer l'approvisionnement en TDR.
- S'approvisionner en dispositifs d'élimination des déchets coupants, gants, etc.

Dans la **figure 21**, on peut observer un exemple de la répartition du budget d'implémentation entre les différents composants d'un programme de contrôle du paludisme.

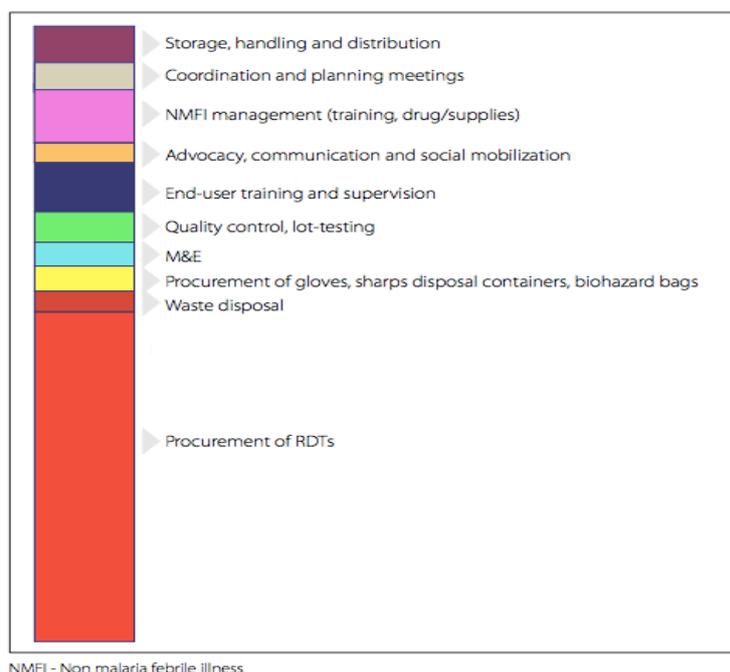


Figure 21 : Budget d'implémentation des TDR (M&E : Monitoring and evaluation)(Foundation for Innovative New Diagnostics, 2013)

Sans un financement adéquat de chacun de ces composants, il est probable que la mise en place d'un programme d'implémentation échouera.

Des échanges bilatéraux sont effectués entre le groupe central de coordination et les structures provinciales et locales. Les groupes centraux de coordination aident à la formation sur le terrain en fournissant une planification de l'implémentation, des directives adaptées et de la documentation. Les acteurs de terrain sont chargés d'apporter des informations pour le développement et la transposition de ces plans et directives aux différents niveaux du système de santé - des laboratoires et cliniques jusqu'aux agents de santé des villages- à travers des outils et des interventions auprès des patients.

Le plan doit être adapté aux besoins de chaque niveau du système de soin et de chaque zone géographique. Cependant un haut niveau d'uniformité est également indispensable afin d'assurer le maintien des directives qui permettra le suivi des résultats.

VI.3. Implémentation au niveau communautaire

Avant l'introduction des TDR sur le terrain, il est important que les communautés soient totalement sensibilisées aux raisons d'un diagnostic basé sur le parasite, l'efficacité attendue des TDR, leur interprétation et l'utilisation des résultats.

Face à la pénurie de travailleurs professionnels de santé à laquelle doivent faire face de nombreux pays, les agents de santé communautaires s'imposent comme un choix logique afin d'agir pour l'implémentation de l'usage des TDR. Cependant, les instructions fournies par les fabricants de TDR apparaissent souvent confuses et inadéquates, et fournissent trop peu d'informations pour les utilisateurs impliqués sur le terrain. Au sein des politiques de santé, il est donc essentiel d'inclure une formation sous une forme et dans une langue que les utilisateurs locaux comprennent ainsi que des supports documentaires adaptés. Ces compétences pratiques sont indispensables à acquérir pour une implémentation durable des TDR, afin de garantir la bonne préparation et de la bonne interprétation des tests et donc leur efficacité.

Des manuels d'instruction (World Health Organization/FIND, 2008) ainsi que des modes d'emploi pour réaliser un TDR (*P. falciparum* seul, test combiné ... Cf. **Annexe** pour *P. falciparum* seul) ont été rédigés par FIND, en partenariat avec l'OMS, afin d'améliorer les techniques de préparation et d'interprétation des tests de diagnostic rapide du paludisme, mais également de garantir la sécurité de l'utilisateur durant le déroulement du test. Ils sont destinés aux professionnels de santé qui formeront ensuite, sur le terrain, les agents de santé communautaires dans les districts et les villages.

Chaque participant doit posséder un mode d'emploi auquel il se réfèrera à chaque utilisation des TDR. La formation dispensée est à la fois théorique, sur le fonctionnement des tests, leur importance dans le traitement du paludisme et leurs limites, mais également pratique avec des notions de contrôle de la qualité et de gestion des stocks afin d'assurer un diagnostic précis. Une formation de 3 heures est suffisante pour rendre les agents de santé opérationnels, à condition d'être réalisée avec le mode d'emploi qui l'accompagne.

Toutefois, l'utilisation des TDR devra faire l'objet d'un suivi sur le terrain afin d'assurer une bonne pratique diagnostique et la sécurité du prélèvement (Foundation for Innovative New Diagnostics, 2013).

L'utilisation correcte des TDR ne représente qu'une partie de la prise en charge du paludisme. Les agents de santé doivent également connaître les procédures à appliquer en cas de résultats positifs ou négatifs. La politique nationale de traitement du paludisme diffère suivant les pays ainsi que les causes de la fièvre. Les agents communautaires de santé devront donc suivre une formation supplémentaire sur la politique de traitements antipaludéens recommandés par leur pays afin de prendre rapidement le patient en charge, en fonction des résultats de TDR, avec un traitement du paludisme ou d'autres pathologies de symptômes semblables, potentiellement mortelles.



**Figure 22 : Comment utiliser les tests de diagnostic rapide du paludisme.
Guide pour la formation au niveau des villages et du district (World Health
Organization) Voir Annexe.**

VII. Les porteurs asymptomatiques du paludisme et la détection par Tests de Diagnostic Rapide: un enjeu crucial.

VII.1. Changements épidémiologiques

L'OMS a élaboré une schématisation de la progression dans l'élimination du paludisme afin d'aider les programmes de lutte en pays d'endémie à déterminer leur statut de transmission, en utilisant les valeurs d'incidence du paludisme (**figure 23**). Les pays avec un taux de frottis sanguins positifs pour le paludisme (SPR : blood-slide positivity rate) parmi les cas de fièvres de $> 5 / 1000$ habitants à risque sont considérés comme étant au stade de contrôle de la maladie ; les pays avec un taux de < 5 et > 1 cas/1000 sont en phase de pré-élimination ; et à des taux < 1 cas / 1 000 sont classés comme étant dans la phase d'élimination.

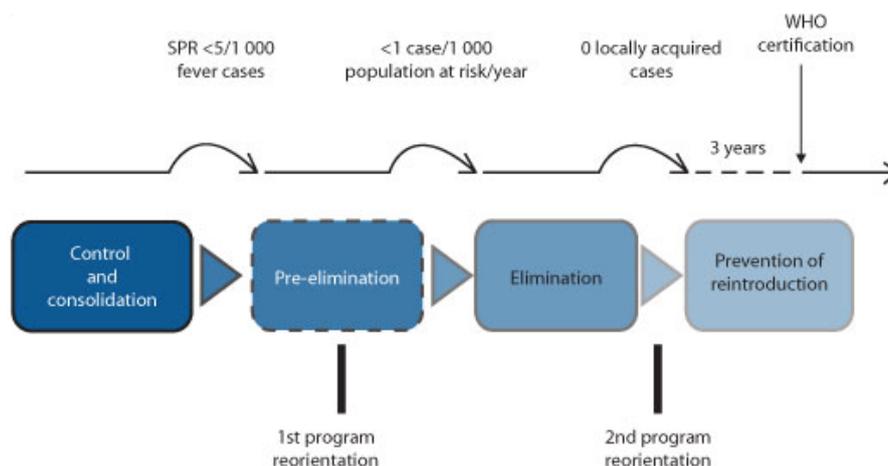


Figure 23 : Progression de l'élimination définie par l'OMS

(http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241596084_eng.pdf)

Au cours de la phase de contrôle, la détection passive des cas constitue la pierre d'angle des politiques nationales de lutte contre le paludisme en permettant le traitement des patients symptomatiques, se déclarant spontanément auprès des services de santé. Des données démographiques et épidémiologiques peuvent ainsi être rassemblées, permettant la surveillance des avancées dans le contrôle du paludisme. Après transition en phase d'élimination, ce type de détection permet le diagnostic rapide des cas d'importation et de transmission locale. Dans ce contexte, la détection active des cas devient alors cruciale afin de dépister les infections lors de campagnes d'intervention dans les groupes à haut risque et les réservoirs asymptomatiques (Lin *et al.*, 2014).

L'extension des interventions d'élimination a réduit l'incidence du paludisme et sa transmission dans bon nombre de pays depuis l'an 2000. Les programmes nationaux de lutte contre le paludisme doivent donc s'adapter à une épidémiologie plus complexe et cibler, avec une précision croissante et des outils de diagnostic et d'élimination adaptés, les réservoirs de parasites persistants dans des zones géographiques de plus en plus localisées (**Figure 24**). À très faible intensité de transmission, l'élimination du paludisme peut impliquer de chercher et de traiter les infections individuelles (Sturrock *et al.*, 2013).

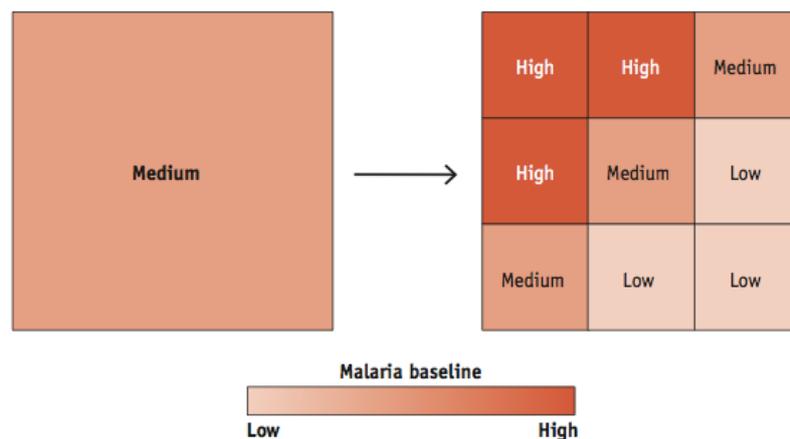


Figure 24 : La division de zones impaludées en secteurs peut révéler une variation importante de la prévalence du paludisme (World Health Organization, 2014c).

Différents phénomènes épidémiologiques sont apparus dans les pays en phase d'élimination, entretenant la persistance de la transmission.

- Les populations à risque sont désormais définies par des facteurs comportementaux les mettant en contact avec le vecteur infectant (travail en extérieur ...) plutôt que par un statut immunitaire comme précédemment (jeunes enfants très touchés ...) On observe une atteinte majoritaire des adultes avec beaucoup d'infections asymptomatiques à faible densité parasitaire, rapportées comme faisant office de réservoir infectieux, responsable des épidémies saisonnière.
- D'autre part, les cas d'importation, comme mentionnés en introduction, constituent une menace importante pour la réussite de l'éradication du paludisme, surtout pour les pays frontaliers à des zones de fortes endémies. L'intensification du tourisme par voie aérienne est également en cause (Cotter *et al.*, 2013).

- Enfin, des petits groupes de population à risque, souvent des sociétés locales pauvres vivant dans des zones géographiques difficiles d'accès, constituent des foyers de haute transmission appelés « hot spots ». Afin de prendre en charge ce problème, il est important d'assurer un accès équitable aux soins de santé à l'ensemble de la population (Cotter *et al.*, 2013).

Ces données mettent en avant l'importance de l'utilisation d'outils sensibles de diagnostic moléculaire, dont les TDR, afin de comprendre l'épidémiologie du paludisme localement et de pouvoir contrôler la transmission (Bousema *et al.*, 2014).

VII.2. Porteurs asymptomatiques

Avec une parasitémie faible et une absence de symptômes, les patients asymptomatiques restent peu diagnostiqués et constituent donc un réservoir infectieux certain. En effet, ils sont porteurs du parasite au stade gamétocyte, responsable de la transmission du paludisme lors de son ingestion par le moustique.

Pour *P. falciparum* et *P. vivax*, la plupart des infections au sein d'une population en zone d'endémie sont sans doute asymptomatiques (Owusu-Agyei *et al.*, 2002) et **Figure 25**.

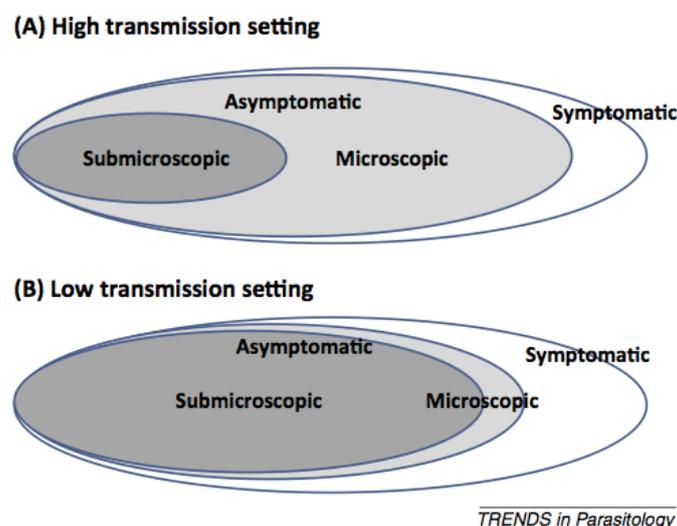


Figure 25 : Le réservoir asymptomatique du paludisme (Lin *et al.*, 2014).

En accord avec ce postulat, des modèles mathématiques suggèrent que l'inclusion des porteurs asymptomatiques lors d'interventions d'administration massive de traitements à des communautés aura un impact largement plus important sur la prévention de la transmission par rapport aux interventions ciblant les cas symptomatiques seuls (Okell *et al.*, 2011).

L'interruption de la transmission passe donc par l'identification et le ciblage du réservoir infectieux constitué par les patients asymptomatiques (Bousema *et al.*, 2014).

Si une campagne de diagnostic était menée auprès de ces patients, une quantité significative des infections pourrait présenter une densité inférieure à celle du seuil de détection microscopique (<10 parasites par μL de sang) ou des TDR (< 50-100 parasites/ μL). Elles sont qualifiées de submicroscopiques (Cotter *et al.*, 2013). Le réservoir asymptomatique est composé de parasitémies microscopiques et submicroscopiques, réparties différemment suivant le contexte de transmission (**Figure 25**) (Lin *et al.*, 2014). Les variations importantes de la parasitémie au sein d'une même zone endémique peuvent paraître surprenantes.

Or, on sait que la densité parasitaire de l'hôte infecté est contrôlée par l'immunité acquise formée au cours d'expositions répétées au paludisme. En zone de faible transmission, les individus exposés à des « hotspots » présenteraient donc une plus faible parasitémie que les individus non exposés de la même zone (Moshia *et al.*, 2013), d'où l'apparition de parasitémies submicroscopiques.

VII.3. Gamétocytes et transmission

Bien que les infections symptomatiques soient majoritairement responsables de la transmission du paludisme, 20-50% des épisodes de transmission sont causés par des infections submicroscopiques en zone de faible endémie (Okell *et al.*, 2012). Cependant, les gamétocytes, stades sexués assurant la transmission de l'Homme au moustique, ne sont habituellement pas détectés par microscopie de routine, car, chez *P. falciparum*, ils représentent moins de 5% de la biomasse parasitaire. Comment expliquer alors le potentiel infectieux des infections submicroscopiques ?

Des études sont actuellement menées afin de déterminer à quel seuil la concentration sanguine en gamétocytes présente un potentiel infectieux. Ces connaissances sont importantes afin de définir le seuil de détection nécessaire aux outils diagnostics, tout stade parasitaire confondu, dans le but d'interrompre efficacement la transmission. Elles permettraient ainsi d'orienter le choix de ces outils ainsi que leur possible optimisation au cours des travaux de recherche. Bien qu'il y ait certaines évidences que les individus à paludisme submicroscopique puissent infecter les moustiques, la transmission serait bien moins susceptible de survenir si les gamétocytes sont à cette faible densité (Lin *et al.*, 2014).

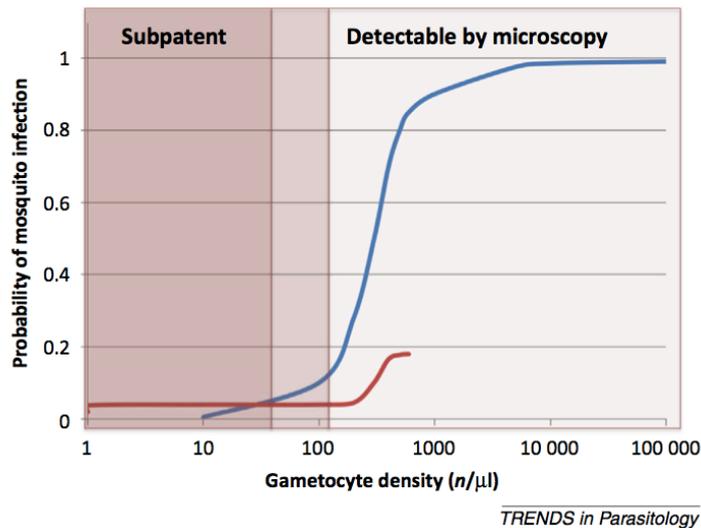


Figure 26 : Gamétocytémie et probabilité d'infection du moustique (Lin *et al.*, 2014).

Dans la **figure 26** est représenté le potentiel infectieux de l'humain au moustique en fonction de la densité de gamétocytes circulants à partir d'échantillons d'Afrique de l'Ouest (bleu) et d'échantillons provenant d'enfants après traitement au Burkina Faso et au Kenya (bleu). Les deux courbes montrent que les probabilités d'infection sont très basses à faible parasitémie jusqu'à ce que le parasite asexué soit détectable par microscope.

Dans certains contextes, les densités submicroscopiques de gamétocytes induisent fréquemment l'infection du moustique, alors que dans d'autres, seules les densités de gamétocytes détectables par microscopie permettent la transmission (Churcher *et al.*, 2013). Cette variation dans la probabilité d'infection du moustique dépend de nombreux facteurs comme la réponse immunitaire individuelle et son influence sur l'efficacité de transmission, aussi bien que la susceptibilité du vecteur à l'infection (Bousema *et al.*, 2014). Un grand nombre d'études suggère que la concentration sanguine des gamétocytes peut grandement varier et a un impact certain sur la taille du réservoir infectieux (Lin *et al.*, 2014).

En dépit du faible taux d'infection des moustiques à partir de porteurs de gamétocytes à densité submicroscopique, la forte prévalence de ces individus dans la population endémique suggère leur importante contribution au réservoir infectieux humain (Churcher *et al.*, 2013). Il est donc indispensable de comprendre les mécanismes par lesquels ces individus transmettent l'infection aux moustiques, sachant que cela nécessite l'ingestion d'un gamétocyte mâle et d'un gamétocyte femelle lors d'un repas sanguin de 2–3 μL .

Dans la plupart de ces infections, la gamocytémie est habituellement bien inférieure à ce seuil. Cela suggère donc une grande hétérogénéité de distribution des gamétocytes dans le sang humain.

→ Cette hétérogénéité pourrait être causée par la formation d'agrégats de gamétocytes dans les vaisseaux sanguins de l'Homme et donc dans le repas de sang du moustique (Pichon *et al.*, 2000).

VII.4. Conclusion

Les interventions et stratégies actuelles ne sont pas aptes à répondre aux changements épidémiologiques observés dans de nombreux pays en transition d'une phase de contrôle à une phase d'élimination du paludisme (Cotter *et al.*, 2013). En effet, elles devraient cibler les infections symptomatiques et asymptomatiques afin de réduire et in fine, d'éliminer totalement la transmission. Connaissant la sensibilité des tests diagnostiques de terrain disponibles, l'administration massive de traitement devrait être évaluée en tant qu'alternative ou en complément de détection active dans les contextes de faible transmission (Lin *et al.*, 2014).

De nouvelles techniques de diagnostic sont donc nécessaires afin de comprendre les changements épidémiologiques du paludisme et leur dynamique, en détectant toutes formes d'infections, y compris les parasitemies submicroscopiques, généralement manquées par les techniques de détection conventionnelles (Cotter *et al.*, 2013). Leur déploiement dans les zones d'endémies, sous forme de screening large des populations, permettra la surveillance épidémiologique et l'identification des foyers d'infections asymptomatiques, qui pourront ainsi être spécifiquement ciblés (Bousema *et al.*, 2014). Idéalement, ces techniques diagnostiques devront détecter toutes les espèces de parasites avec un fort rendement, même en cas de faible densité parasitaire, être peu coûteuses et utilisables sur le terrain (Okell *et al.*, 2009).

IX. Innovations diagnostiques

Depuis l'apparition des TDR, les techniques de biologie moléculaire n'ont cessé de s'améliorer et de nouvelles techniques de détection et d'amplification du signal ont été mises au point. Deux d'entre elles vont ainsi être présentées dans ce chapitre.

IX.1. Nouvelles formes de TDR : amplification isotherme de l'ADN induite par boucle (LAMP)

Actuellement au cœur des efforts de recherche, la technique LAMP (Loop mediated isothermal amplification of DNA) est une méthode de biologie moléculaire destinée à amplifier une séquence d'ADN cible dans un échantillon à l'aide d'une ADN polymérase Bst (*Bacillus stearothermophilus*) et de deux couples d'amorces (internes et externes). Cette technique présente une efficacité d'amplification et une spécificité très importante grâce à la reconnaissance de 6 séquences ADN différentes sur le gène cible, sans que son activité soit affectée par des contaminations ADN ou des inhibiteurs présents dans le sang (contrairement à la PCR) (Notomi, 2000). La LAMP est simple d'utilisation, une fois que les amorces ont été correctement dessinées, et s'effectue à température constante : elle ne requiert donc pas de thermocycleur, juste un bloc chauffant ou un bain-marie. De plus, il est possible d'amplifier de l'ARN en couplant la technique avec une transcription inverse (World Health Organization, FIND, 2008).

À partir de quelques copies d'ADN matrice, cette technique permet d'obtenir jusqu'à 10^9 copies en moins d'une heure, ce qui rend une réaction positive facilement détectable (World Health Organization, FIND, 2008). En effet, une quantité importante d'ions pyrophosphates est produite parallèlement et entraîne l'accumulation d'un précipité blanc. L'observation de la présence ou de l'absence de ce précipité permet donc facilement de savoir si l'amplification a eu lieu et donc si le gène est présent dans l'échantillon de départ. Grâce à ce système de détection simple, purement qualitatif mais spécifique d'espèce, cette technique pourrait être utilisable comme test de diagnostic rapide du paludisme sur le terrain en évitant les désavantages de la PCR (cités dans les Généralités). D'autres méthodes de détection ont également été développées afin d'effectuer des mesures plus fiables et quantitatives.

Par exemple, la libération d'un fluorophore dans le milieu lors de la polymérisation de l'ADN, ou encore l'augmentation conséquente de la turbidité peuvent également être mesurées et rapportées à une concentration d'ADN et donc, à une densité parasitaire (Notomi, 2000).

Récemment, la technique LAMP a été adaptée sous forme de bandelettes immunochromatographiques à flux latéral (Lateral flow dipstick ou LFD). Le mécanisme de détection repose sur l'agglutination des amplicons de LAMP par des anticorps anti-FITC marqués avec des particules d'or : le complexe formé se fixe ensuite directement sur le support grâce à une protéine fixant la biotine (la biotine est présente sur l'amplicon). Une ligne rouge apparaît alors sur la ligne de test lorsque la réaction a eu lieu et que le résultat est positif (Notomi, 2000) et **Figure 27**.

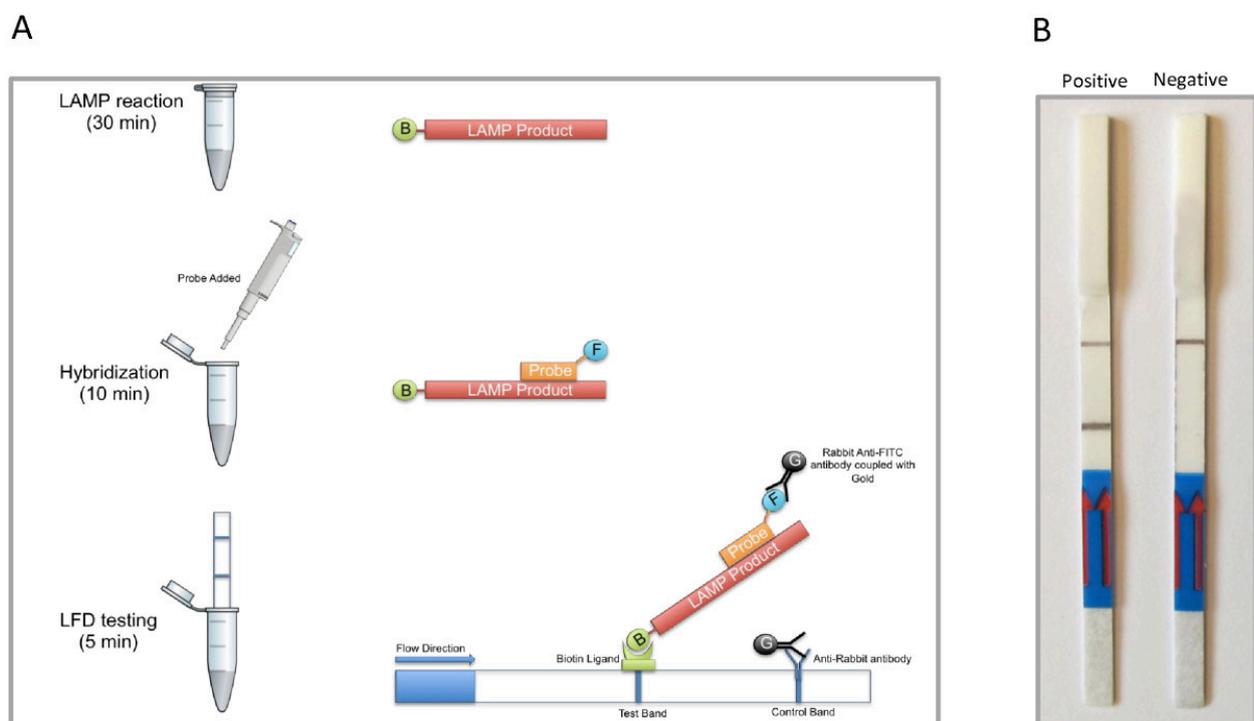


Figure 27 : Bandelettes réactives à flux latéral Las-LAMP :

A. La réaction LAMP est réalisée en incubant 5 amorces et une amorce FIP biotinylée pendant 30 min à 65°C. Une amorce spécifique marquée à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) est ensuite ajoutée au mélange lors d'une incubation de 10 min et se fixe à l'amplicon. Enfin, des anticorps couplés à de l'or colloïdal sont ajoutés. La bandelette réactive est ensuite insérée dans le tube. Lors d'une réaction positive, les anticorps anti-FITC se lient aux amplicons et le complexe formé se fixe sur la ligne de test après migration du mélange le long de la bandelette. Une bande sombre apparaît alors. Une ligne de contrôle retient les anticorps non liés et devrait toujours être visible afin de garantir la validité du test.

B. Évaluation des résultats sur bandelettes.

D'après (Rigano *et al.*, 2014).

Cette technique a été évaluée dans le diagnostic du paludisme afin de savoir si elle constituait une solution intéressante pour un test de diagnostic rapide (Yongkiettrakul *et al.*, 2014). De nombreux points positifs ont été relevés : l'analyse peut être réalisée en moins de 1,5 h comparé aux 3-4 h conventionnellement requises par la PCR. De plus, elle présente une grande sensibilité de détection, semblable à celle de la PCR, et une spécificité d'espèce dans le cas du gène *dhfr-ts* ici. Enfin, aucune instrumentation de pointe n'est nécessaire à sa réalisation. La technique LAMP-LFD est donc un candidat compétitif en tant que test qualitatif de terrain.

Cependant, la préparation des bandelettes et de la détection représentent un coût temporel et économique important comparé aux TDR classiques. Dans les futures étapes de développement, il serait nécessaire d'obtenir un produit qui ne nécessite pas l'ouverture du tube de mélange de réactifs, évitant ainsi tout risque de contamination, et assurant la fiabilité du TDR (Rigano *et al.*, 2014).

Pour conclure, la LAMP est une technique très sensible qui présente également un plus faible coût par rapport à la PCR, mais toujours supérieur à celui du TDR (Ordre d'idée approximatif des coûts : LAMP : 1\$ (prévisions) / PCR : 0,88 \$ / TDR : 0,70\$).

L'association de tests HRP2 et de LAMP pourrait être une solution intéressante à explorer (Tiono *et al.*, 2014). Cependant, des techniques de mesure efficace de la réaction sont encore au seuil de leur développement (Zhang *et al.*, 2014). L'incorporation de la LAMP aux technologies microfluidiques, ou laboratoires sur puce, pourrait permettre dans le futur l'utilisation d'un outil diagnostique de biologie moléculaire sur le terrain, grâce à la mise au point de composants miniaturisés de détection (Mori *et al.*, 2001).

IX.2. Amplification du signal et quantification de la parasitémie : Les Nano Fibres de Carbone (NFC)

Afin de pallier les problèmes de faible intensité des signaux des TDR en cas de parasitémie basse, qui rend leur interprétation difficile, des équipes de recherche ont tenté de mettre au point des immunosenseurs capables d'amplifier ce signal dans le but d'améliorer les performances des tests. Ce paragraphe s'inspire de l'article de (Gikunoo *et al.*, 2014). Dans cette étude, les colorants situés à l'extrémité des anticorps labiles de détection ont été remplacés par des réseaux de millions de nanofibres de carbone (CNF pour Carbon Nanofiber) fixées sur des microbilles de verre (NMB). Les microbilles jouent le rôle de substrat et de transporteurs légers des CNF qui, de leur côté, présentent une grande capacité de fixation des biomolécules grâce à leur surface très importante et les propriétés liées à leur composition.

Au cours de la fabrication du TDR, les nanofibres sont déposées directement sur les billes de verre grâce à un procédé thermique de dépôt chimique en phase vapeur (CVD) d'acétylène à 570°C.

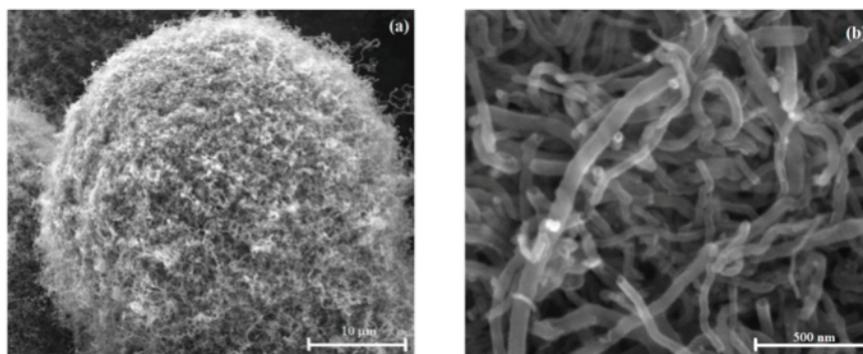


Figure 28 : Vue en microscopie électronique à différents grossissements (a) 10 µm (b) 500 nm, de nanofibres de carbone oxydées, fixées sur une bille de verre. Le diamètre moyen des fibres est de 50 nm (Gikunoo *et al.*, 2014).

Les nanofibres forment un réseau (**figure 28**) ayant une très haute affinité pour les biomolécules : elles vont ainsi servir de support de liaisons covalentes avec des anticorps. Les billes sont ensuite recouvertes d'oxyde de polyéthylène afin de saturer les autres sites de liaison et d'inhiber toute réaction de faux positif. Dans cet article, la technique a été appliquée à la détection du paludisme sous la forme de TDR. Des nanofibres conjuguées avec des anticorps polyclonaux de lapin contre PfHRP-2 ont été préparées et utilisées dans la détection de PfHRP-2 pour des solutions étalons de 0,01 à 10 ng/mL.

Le complexe antigène – anticorps fixé à une microbille est ainsi typiquement capturé au niveau de la ligne test du TDR par un antigène fixe, formant un « sandwich ». On observe ainsi la formation d'un réseau interconnecté (**Figure 29**).

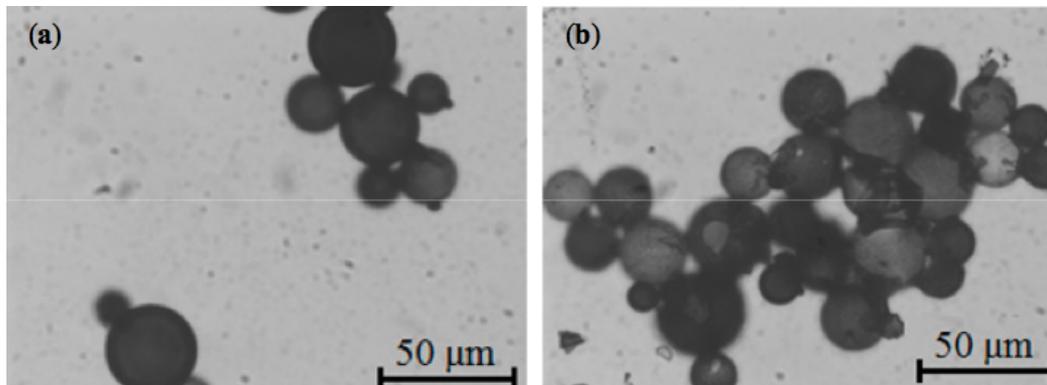


Figure 29 : Vue en microscopie électronique de réseaux de microbilles fixées sur la zone de capture d'une lame de verre avec (a) 0,025 ng/mL et (b) 10 ng/mL de PfHRP-2 (Gikunoo *et al.*, 2014).

La taille des billes et leur agrégation facilitent la détection visuelle de la réaction: la limite observée ici était de 0,025 ng/mL. La limite de détection à l'œil nu la plus basse pour PfHRP-2, rapportée dans la littérature à ce jour, est de 0,36 ng/mL, soit 10 fois supérieure. La grande sensibilité et la bonne visibilité du résultat de la réaction éliminent donc les risques de mauvais diagnostic de la pathologie. Une relation linéaire a pu être observée entre la surface recouverte par les NMB et la concentration en PfHRP2 dans l'échantillon, due à leurs grandes sélectivité et spécificité en environnement aqueux. La détection peut donc être effectuée avec différents types de mesures quantitatives : résistivité électrique (conductivité des CNF), colorimétrique, de masse ... La méthode est également capable de détecter sélectivement deux antigènes cibles avec deux lignes de test et les mêmes immunosenseurs, permettant ainsi hypothétiquement la détection de plusieurs espèces de *Plasmodium* simultanément.

Simplicité, vitesse, spécificité et ultra-sensibilité de cette approche en font un outil puissant de diagnostic rapide du paludisme, qui élimine ainsi les limites propres aux TDR. La possibilité d'une mesure quantitative est, par ailleurs, l'atout majeur de cette technique.

X. Conclusion

De grandes avancées dans la lutte contre le paludisme ont pu être effectuées grâce aux tests de diagnostic rapide actuels (ou TDR). Leur principal avantage est d'être facile et rapide à utiliser, de faible coût, avec une interprétation simple des résultats, sans lourde formation préalable des manipulateurs. Ils constituent donc un outil idéal de diagnostic de terrain permettant de prendre en charge rapidement un grand nombre de patients en zone d'endémie, surtout indispensable à la poursuite des objectifs d'éradication.

Adaptée à chaque système de santé et à chaque zone géographique, l'implémentation des TDR doit être méticuleusement planifiée à toutes les échelles, de la coordination centrale à la formation communautaire, avant toute tentative d'application sur le terrain. Elle doit suivre un calendrier clair, efficace, basé sur les données récoltées en amont dans la zone d'endémie concernée. Dans ce cadre, les résultats du programme d'évaluation annuel des TDR, lancé par l'OMS et FIND, permettent des décisions d'achat raisonnées et stimulent, par la même occasion, l'amélioration de la qualité de fabrication des TDR (World Health Organization *et al.*, 2014). Le contrôle de la qualité des dispositifs et de leur utilisation joue également un rôle majeur dans la garantie de la justesse des résultats, indispensable à une prise en charge thérapeutique adéquate des patients, ainsi qu'à une surveillance épidémiologique efficace.

Cependant, les TDR présentent plusieurs limites contraignantes devant les objectifs actuels de contrôle et d'élimination du paludisme :

i) un seuil de détection médiocre toutes espèces de *Plasmodium* confondues (50-100 parasites/ μ L au minimum pour *P. falciparum*) ne permettant pas le diagnostic des patients à faibles parasitémies asymptomatiques, réservoirs de la transmission du parasite,

ii) une faible spécificité dans l'identification de *P. vivax* alors même que les problèmes de santé publiques posés par ces espèces deviennent prioritaires et une absence de détection des autres espèces (Mengi *et al.* 2014).

Ce dernier défaut est une limite rédhibitoire, en particulier dans les zones de pré-élimination, où la détection de toutes les infections à *Plasmodium* et leur prise en charge sont impératives dans la stratégie actuelle d'éradication du paludisme (The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics, 2011).

D'autre part, l'apparition de la résistance à l'artémisinine menace les efforts de contrôle de la pathologie en Asie du Sud-Est. La technique PCR développée pour la détection du nouveau marqueur de résistance à l'artémisinine nécessite du matériel de laboratoire de pointe, ainsi que des opérateurs formés et représente également un coût important (Ariey *et al.*, 2014). De ce fait, elle est difficilement transposable aux zones d'endémies où le risque d'émergence de la résistance est pourtant accru. La nécessité d'une thérapeutique rationnelle face à la menace de résistance aux antipaludiques confère donc une importance croissante à l'exactitude et la précision des méthodes de diagnostic.

Le traitement des porteurs asymptomatiques identifiés précocement grâce à la surveillance épidémiologique par des TDR plus sensibles et spécifiques permettrait de réduire significativement le réservoir parasitaire et ainsi la transmission de *Plasmodium* au cours d'une saison des pluies – lorsque les moustiques sont présents - et d'une saison des pluies à l'autre, diminuant d'autant l'incidence du paludisme (Bousema *et al.*, 2014; Laishram *et al.*, 2012). En effet, les patients asymptomatiques, présents en large majorité en zone de faible endémie, constituent le réservoir parasitaire qu'il est nécessaire de prendre en charge afin d'éradiquer l'épidémie palustre dans ces régions de transmission saisonnière.

En conclusion, il apparaît aujourd'hui nécessaire de développer des outils innovants afin de contrôler la transmission dans les zones faiblement impaludées (WHO Guidelines, 2010), mais également la propagation de la résistance à l'artémisinine afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients. D'autre part, de nouvelles méthodes de détection prometteuses ont vu le jour et pourraient être utilisées dans ce but (LAMP ...)

XI. Perspectives d'avenir des TDR

XI.1. TDR et contexte mondial de transmission

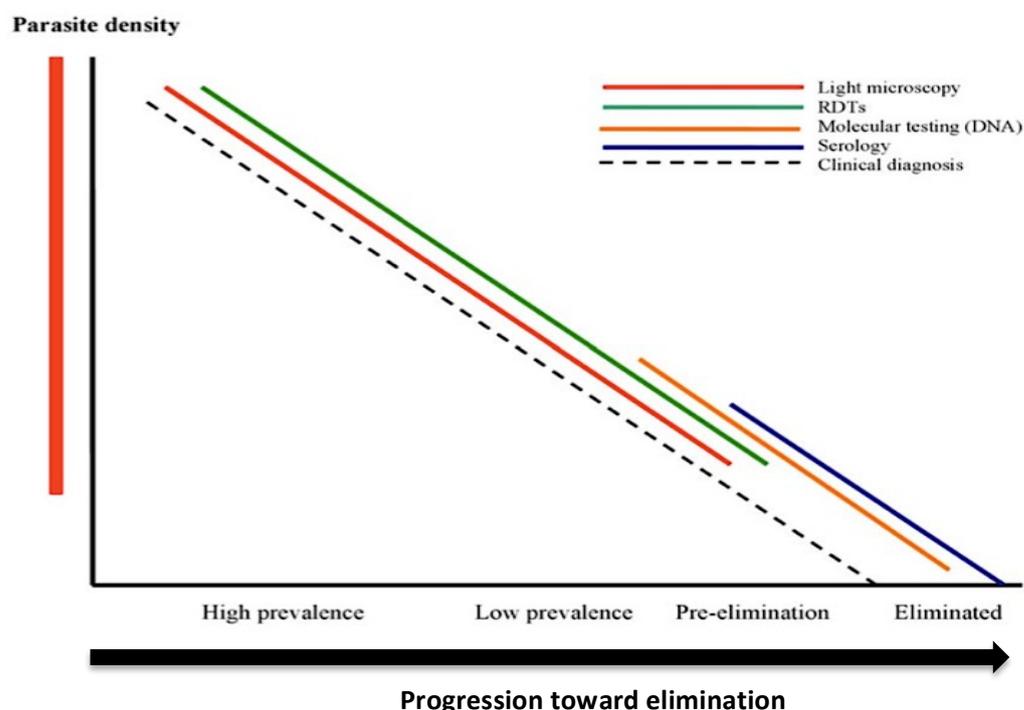


Figure 30 : Positionnement des différentes approches diagnostiques par rapport à la morbidité, à la densité, à la prévalence parasitaire, et aux stades d'élimination du paludisme (forte prévalence, faible prévalence, pré élimination et élimination) (The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics, 2011).

Alors que la transmission du paludisme diminue, les priorités diagnostiques changent et l'on distingue désormais deux stades qui se chevauchent entre le traitement des cas cliniques (faible prévalence) et la surveillance épidémiologique (pré-élimination, cf **Figure 30**) (The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics, 2011).

D'après la **Figure 30** et l'étude bibliographique menée ici, on observe donc que dans cette zone de chevauchement, la sensibilité des TDR et de la microscopie commencent à être limitées alors que les techniques de biologie moléculaire restent pertinentes. Cependant, comme expliqué précédemment, celles-ci engendrent des besoins techniques, humains, et économiques importants qui ne peuvent être envisagés dans les zones de faibles ressources. Depuis la création des tests de diagnostic rapide dans les années 1990, les techniques de biologie moléculaire se sont considérablement développées et les TDR pourraient être révisés à la lumière des connaissances actuelles afin d'améliorer leurs performances.

La technique LAMP en est un exemple qui sera bientôt adapté à l'utilisation sur le terrain.

Ces problèmes ont été abordés au cours de la réunion du Malaria Policy Advisory Committee (ou commission consultative sur le paludisme de l'OMS) du 10 septembre 2014. Les impératifs mis en avant, au delà de l'horizon 2015 et des objectifs du Global Malaria Action Plan, encouragent l'innovation et la recherche de TDR détectant de faibles parasitémies asymptomatiques, mais aussi de TDR présentant une meilleure spécificité d'espèce pour les espèces autres que *P. falciparum* (Cf. Présentation 10/09/14 [2]). De plus, un screening large des populations en zone de faible transmission doit impérativement être effectué dans le but d'éliminer les réservoirs parasitaires, comme en fait part l'organisme Unitaid (Unitaid, 2014).

Les conclusions tirées ici, grâce à la synthèse de nombreux articles scientifiques traitant de l'utilisation des TDR, mettent bien en évidence les problèmes soulignés par les organismes internationaux de lutte contre le paludisme. Elles vont également dans le sens d'une nécessité de mise au point de nouveaux outils de diagnostic rapide. Les futurs TDR devront être adaptés à la surveillance épidémiologique de la maladie (communauté et migrants), en étant capables de détection sensible à fort rendement afin de pouvoir diagnostiquer de larges franges de population. Ils devront également assurer une détection active des cas de paludisme en tant qu'outil de prise en charge directe du patient. En plus de leurs sensibilité et spécificité accrues envers les différentes espèces de *Plasmodium*, ces outils devront détecter des antigènes non persistants afin de pouvoir surveiller l'efficacité du traitement, être de bas coûts, faciles à manipuler, et permettre une utilisation durable sur le terrain (The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics, 2011).

Afin d'augmenter cette sensibilité, certains articles montrent qu'il est possible d'utiliser une technique de concentration des échantillons, dans le cas d'HRP2, à l'aide de billes magnétiques présentant une affinité pour l'histidine grâce à des résidus ni-NTA (Davis *et al.*, 2014). Cette technique ne paraît néanmoins pas applicable au terrain et ne constitue donc pas une solution fiable aux problèmes de sensibilité des TDR.

Pour mettre en place ces nouveaux outils, il sera indispensable de posséder des contrôles standards à bas coût (les PCW) afin de garantir qualité des résultats du test.

Il sera également nécessaire de clarifier les exigences d'implémentation afin d'assurer l'impact voulu sur le terrain (The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics, 2011).

XI.2. Évolution des besoins en Europe

Dans la zone européenne, les tests de diagnostic rapide peuvent présenter un intérêt certain au sein des structures de santé ne disposant pas de professionnels formés à l'examen microscopique de la goutte épaisse et à la détection de parasites. Comme il a été énoncé précédemment, l'utilisation de TDR serait alors un moyen facile et rapide de diagnostiquer une pathologie peu habituelle à cette zone géographique et donc difficilement identifiée. Elle concernerait majoritairement le paludisme d'importation, estimé à 5 000 cas par ans en Europe, et, en cas d'épidémies, les cas autochtones (Grèce, Turquie, Tadjikistan) (2014a).

D'ici à 2100, on estime que la température du globe aura augmenté de 1,0 à 3,5°C. À plus forte température, on a observé que la mortalité des vecteurs était plus réduite durant l'hiver et que leur prolifération était alors amplifiée (temps diminué d'incubation des larves de moustiques ...) De nouvelles zones deviennent donc adaptées à la transmission du paludisme (Githeko *et al.*, 2000). De fait, la présence des vecteurs Anophèles sur le pourtour méditerranéen, le retour de voyageurs infectés comme sources de parasites et le changement climatique pourraient induire la réapparition de cas autochtones de paludisme en Europe, dans des pays où la pathologie avait été éradiquée comme, récemment, la Grèce (Odolini *et al.*, 2012).

Dans ce cas, un programme de lutte contre le paludisme devra être mis en place, en assurant la surveillance épidémiologique, la prise en charge clinique, le diagnostic, la surveillance entomologique, le contrôle des vecteurs et la communication afin d'empêcher la transmission et de contrôler la pathologie à long terme (Odolini *et al.*, 2012). Les tests de diagnostic rapide joueront alors un rôle prépondérant dans cette politique de prise en charge et il convient donc de maintenir les efforts de développement et d'amélioration des dispositifs.

XI.3. Projet de Thèse

Dans ce contexte, je participe actuellement à l'élaboration d'un projet de doctorat en collaboration avec l'industriel Bio Rad, leader mondial des techniques de diagnostic, et l'Institut Pasteur, acteur majeur de la recherche sur le terrain, s'inscrivant dans les objectifs d'éradication du paludisme définis par l'OMS.

Le but de ce projet est de concevoir et de développer un nouveau test de diagnostic rapide du paludisme très sensible, en mesure de détecter les antigènes les plus pertinents de *P. vivax* et *P. falciparum*, les espèces responsables de la majorité des décès liés. La sélection de ces antigènes sera fondée sur un choix éclairé d'échantillons, répondant à des critères pertinents d'inclusion à l'étude, suivi d'analyses protéomiques, métabolomiques et génétiques. À partir de cette stratégie, notre objectif final est d'améliorer la sensibilité et la spécificité d'espèce de la détection de *P. vivax* et *P. falciparum* par rapport aux TDR actuellement commercialisés, jusqu'à une détection submicroscopique (<10 parasites / μL). Ce nouveau TDR sera conçu en collaboration entre les Laboratoires Bio-Rad et les Instituts Pasteur du Cambodge et de Paris. Les essais cliniques se dérouleront au Cambodge, ainsi que dans d'autres contextes épidémiologiques, comme Madagascar et la Guyane française. Les performances du nouveau TDR (en terme de sensibilité, de spécificité d'espèce de *Plasmodium* et de valeurs prédictives positives et négatives) seront comparées à d'autres tests de diagnostic rapide, ainsi qu'à des méthodes de référence telles que l'examen microscopique et la détection par PCR, référence quant à la sensibilité, à partir d'échantillons de terrain prélevés chez des patients symptomatiques et asymptomatiques.

À partir de la définition précise des besoins actuels, des limites des TDR commercialisés, et des données retrouvées dans la bibliographie, nous avons déterminé les critères idéaux d'une protéine cible de TDR :

- Forte abondance dans les isolats parasitaires : détection sensible même en cas de faible parasitémie.
- Forte spécificité d'espèce : entre espèces de *Plasmodium*, et contre les autres pathogènes afin de minimiser les réactions croisées, et donc les faux positifs.
- Production constante au cours du cycle parasitaire, y compris par les formes gamétocytes qui sont circulantes et permettent ainsi une détection plus sensible chez les patients asymptomatiques responsables de la transmission, car de nombreux parasites demeurent séquestrés.
- Grande conservation de la séquence du gène entre les populations de la même espèce : pas d'isoformes, afin de garantir une grande affinité des anticorps de détection pour toutes les populations parasitaires), gène essentiel à la survie du parasite.
- Disparition rapide de l'antigène à la fin du traitement antipaludéen : protéine à clairance rapide permettant la surveillance de l'efficacité du traitement.

XI.4. Autres applications possibles des tests de diagnostic rapide

Dans le futur, d'autres applications, liées au contexte de transmission actuel, pourraient également être investiguées afin d'améliorer la prise en charge du paludisme...

- **Mise au point de tests non invasifs**

Des tests non invasifs, basés sur d'autres prélèvements tels que la salive ou l'urine, permettraient une meilleure acceptation du test diagnostique par les patients mais également un temps de formation réduit du personnel de santé communautaire et une diminution des risques d'accident d'exposition au sang (VIH, hépatite C ...) Des études métabolomiques et protéomiques pourraient être effectuées sur différents milieux afin de rechercher des protéines ou des fragments parasitaires en concentration abondante. La demi-vie de ce biomarqueur devra également être brève afin de permettre la surveillance de l'efficacité d'un traitement.

Des tests ont, par ailleurs, déjà été effectués grâce à la technique LAMP, explicitée dans le chapitre «Innovations diagnostiques» (Yongkiettrakul *et al.*, 2014).

- **Détection de la résistance à l'artémisinine chez *P. falciparum***

Devant l'émergence de la résistance à l'artémisinine, il apparaît intéressant de pouvoir mettre au point un test de diagnostic rapide capable de détecter les parasites mutés afin d'orienter la prise en charge thérapeutique de chaque patient. Une étude des différences de protéome entre les souches résistantes de terrain et les souches sensibles pourrait être menée afin de sélectionner une protéine cible, spécifique de la résistance à l'artémisinine.

- **Détection du stade gamétoocyte de *P. falciparum***

D'autre part, les gamétoocytes de *P. falciparum* peuvent persister après l'administration d'un traitement antipaludéen au patient infecté et favoriser la transmission du paludisme. Il peut donc être utile de détecter ces formes parasitaires afin d'initier un traitement à la primaquine qui les cible spécifiquement. Il n'existe actuellement aucun test de diagnostic rapide capable de détecter le gamétoocytes. Il pourrait être pertinent de rechercher de protéines spécifiques du stade gamétoocyte, présentes en quantité abondante et permettant la détection.

XII. Annexe

I. Comment effectuer le test de diagnostic rapide du paludisme (FIND 2010)

Comment effectuer le test diagnostique rapide du paludisme

Modifié aux fins de formation à l'utilisation du **test générique** de détection de *P. falciparum* pour diagnostiquer le paludisme à *P. falciparum*



Rassemblez :

- Un **NOUVEAU** sachet de test **non ouvert**
- Un **NOUVEAU** tampon imbibé d'alcool **non ouvert**
- Une **NOUVELLE** lancette **non ouverte**
- Une **NOUVELLE** paire de gants à jeter
- Une solution tampon
- Une montre ou un minuteur

 Tampon imbibé d'alcool
 Lancette
 Test dans son sachet fermé
 Gants jetables
 Minuteur
 Solution tampon

LISEZ CES INSTRUCTIONS ATTENTIVEMENT AVANT DE COMMENCER

- Vérifiez la date de péremption sur le sachet du test.



Date de péremption
- Enfilez les gants. Enfilez une nouvelle paire de gants pour chaque patient.


- Ouvrez le sachet du test et retirez :

a. Le test



b. Le tube capillaire



c. Le dessicatif


- Inscrivez le nom du patient sur le test.


- Prenez fermement le 4e doigt de la main gauche du patient. Désinfectez le doigt au moyen du tampon imbibé d'alcool. Laissez sécher le doigt avant de piquer.


- Sortez la lancette de son sachet. Piquez le doigt du patient pour obtenir une goutte de sang.


- Jetez la lancette dans la boîte à aiguilles immédiatement après avoir piqué le doigt. **Ne posez pas la lancette avant de la jeter.**


- Utilisez le tube capillaire pour recueillir la goutte de sang.


- Utilisez le tube capillaire pour mettre la goutte de sang dans l'alvéole carrée marquée « A ».


- Jetez le tube capillaire dans la boîte à aiguilles.


- Ajoutez la solution tampon dans l'alvéole ronde marquée « B ».



Comptez le nombre exact de gouttes
- Attendez **15 minutes** après avoir ajouté la solution tampon.


- Lisez les résultats du test. (REMARQUE : Pour lire le test, vous devez attendre **15 minutes** après avoir ajouté la solution tampon. Sinon, vous risquez d'obtenir de FAUX résultats.)

14. Comment lire les résultats du test :

POSITIF

Une ligne rouge dans la fenêtre « C » ET une ligne rouge dans la fenêtre « T » signifient que le patient EST EFFECTIVEMENT ATTEINT du paludisme à *P. falciparum*.



P. falciparum

Le test est POSITIF même si la ligne rouge dans la fenêtre « T » est peu visible.



P. falciparum (peu visible +)

NEGATIF

Une ligne rouge dans la fenêtre « C » et PAS DE LIGNE dans la fenêtre « T » signifient que le patient N'EST PAS ATTEINT de paludisme à *P. falciparum*.



Négatif

RESULTAT INVALIDE

PAS DE LIGNE dans la fenêtre « C » et une ou aucune ligne dans la fenêtre « T » signifient que le test est invalide.



Recommencez le test avec un nouveau matériel si aucune ligne de contrôle n'apparaît.

Si aucune ligne n'apparaît dans la fenêtre « C », recommencez le test en utilisant un **NOUVEAU test dans son sachet fermé** et une **NOUVELLE lancette dans son sachet fermé**.

- Jetez les gants, le tampon imbibé d'alcool, le dessicatif et l'emballage dans une poubelle normale – pas dans une boîte à aiguilles.



- Inscrivez les résultats du test sur votre registre d'agents de santé communautaires. Jetez la cassette dans une poubelle normale.



REMARQUE : Chaque test ne peut être utilisé **QU'UNE SEULE FOIS**. N'essayez pas d'employer le test plus d'une fois.



XIII. Bibliographie

Abba, K., Deeks, J.J., Olliaro, P., and Naing, C.M. (2011). Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries. The Cochrane database of systematic reviews. (7), CD008122. doi:10.1002/14651858.CD008122.pub2

Abeku, T.A., Kristan, M., Jones, C., Beard, J., Mueller, D.H., Okia, M., Rapuoda, B., Greenwood, B., and Cox, J. (2008). Determinants of the accuracy of rapid diagnostic tests in malaria case management: evidence from low and moderate transmission settings in the East African highlands. *Malaria Journal* 7, 202.

Akinyi, S., Hayden, T., Gamboa, D., Torres, K., Bendezu, J., Abdallah, J.F., Griffing, S.M., Quezada, W.M., Arrospide, N., De Oliveira, A.M., (2013). Multiple genetic origins of histidine-rich protein 2 gene deletion in *Plasmodium falciparum* parasites from Peru. *Scientific Reports* 3.

Antoine, T., Fisher, N., Amewu, R., O'Neill, P.M., Ward, S.A., and Biagini, G.A. (2014). Rapid kill of malaria parasites by artemisinin and semi-synthetic endoperoxides involves ROS-dependent depolarization of the membrane potential. *Journal Antimicrobial Chemotherapie* 69, 1005–1016.

Ariey, F., Witkowski, B., Amaratunga, C., Beghain, J., Langlois, A.-C., Khim, N., Kim, S., Duru, V., Bouchier, C., Ma, L., (2014). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 505, 50–55.

Ashton, R.A., Kefyalew, T., Tesfaye, G., Counihan, H., Yadeta, D., Cundill, B., Reithinger, R., and Kolaczinski, J.H. (2010). Performance of three multi-species rapid diagnostic tests for diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in Oromia Regional State, Ethiopia. *Malaria Journal* 9, 297.

Baker, J., Ho, M.-F., Pelecanos, A., Gatton, M., Chen, N., Abdullah, S., Albertini, A., Ariey, F., Barnwell, J., Bell, D., (2010). Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. *Malaria Journal* 9, 129.

Baker, J., McCarthy, J., Gatton, M., Kyle, D.E., Belizario, V., Luchavez, J., Bell, D., and Cheng, Q. (2005). Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. *Journal of Infectious Diseases* 192, 870–877.

Bejon, P., Andrews, L., Hunt-Cooke, A., Sanderson, F., Gilbert, S.C., and Hill, A.V.S. (2006). Thick blood film examination for *Plasmodium falciparum* malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density. *Malaria Journal* 5, 104.

Bousema, T., Okell, L., Felger, I., and Drakeley, C. (2014). Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. 1–8.

Burton, R., Tietje, K., Ebels, K., and LaBarre, P. (2014). Challenges in optimizing the histidine rich protein 2-detecting rapid diagnostic test. *Malaria Journal* 13, P20.

Chayani, N., Das, B., Sur, M., and Bajoria, S. (2004). Comparison of parasite lactate dehydrogenase based immunochromatographic antigen detection assay (optimal) with microscopy for detection of malaria parasites. *Indian Journal Medical Microbiology* 22, 104–106.

Chiodini, P.L., Bowers, K., Jorgensen, P., Barnwell, J.W., Grady, K.K., Luchavez, J., Moody, A.H., Cenizal, A., and Bell, D. (2007). The heat stability of *Plasmodium* lactate dehydrogenase-based and

histidine-rich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. *101*, 331–337.

Churcher, T.S., Bousema, T., Walker, M., Drakeley, C., Schneider, P., Ouédraogo, A.L., and Basáñez, M.-G. (2013). Predicting mosquito infection from *Plasmodium falciparum* gametocyte density and estimating the reservoir of infection. *Elife* *2*, e00626.

Cotter, C., Sturrock, H.J., Hsiang, M.S., Liu, J., Phillips, A.A., Hwang, J., Gueye, C.S., Fullman, N., Gosling, R.D., and Feachem, R.G. (2013). The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. *The Lancet* *382*, 900–911.

Davis, K.M., Gibson, L.E., Haselton, F.R., and Wright, D.W. (2014). Simple sample processing enhances malaria rapid diagnostic test performance. *Analyst* *139*, 3026–3031.

Day, N., and Dondorp, A.M. (2007). The management of patients with severe malaria. *American Journal of Tropical Medicine*

Deme, A.B., Park, D.J., Bei, A.K., Sarr, O., Badiane, A.S., Gueye, P.E.H.O., Ahouidi, A., Ndir, O., Mboup, S., Wirth, D.F., (2014). Analysis of pfhrp2 genetic diversity in Senegal and implications for use of rapid diagnostic tests. *Malaria Journal* *13*, 34.

Dondorp, A.M., Desakorn, V., Pongtavornpinyo, W., Sahassananda, D., Silamut, K., Chotivanich, K., Newton, P.N., Pitisuttithum, P., Smithyman, A.M., White, N.J., (2005). Estimation of the Total Parasite Biomass in Acute Falciparum Malaria from Plasma PfHRP2. *PLoS Med* *2*, e204.

Dondorp, A.M., Yeung, S., White, L., Nguon, C., Day, N.P.J., Socheat, D., and Seidlein, von, L. (2010). Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nature Review Microbiology* *8*, 272–280.

Dzakah, E.E., Kang, K., Ni, C., Wang, H., Wu, P., Tang, S., Wang, J., Wang, J., and Wang, X. (2013). Plasmodium vivax aldolase-specific monoclonal antibodies and its application in clinical diagnosis of malaria infections in China. *Malaria Journal* *12*, 199.

Enseignants de Parasitologie et Mycologie, des, A.F. (2014). Polycopié National 2014. 1–411.

Enseignants de Parasitologie et Mycologie-ANOFEL, des, A.F. (2014). Paludisme. 1–27.

Foundation for Innovative New Diagnostics (2013). *Malaria Rapid Diagnostic Tests: An Implementation Guide*. 1–88.

Gerstl, S., Dunkley, S., Mukhtar, A., De Smet, M., Baker, S., and Maikere, J. (2010). Assessment of two malaria rapid diagnostic tests in children under five years of age, with follow-up of false-positive pLDH test results, in a hyperendemic falciparum malaria area, Sierra Leone. *Malaria Journal* *9*, 28.

Gikunoo, E., Abera, A., and Woldesenbet, E. (2014). A novel carbon nanofibers grown on glass microballoons immunosensor: a tool for early diagnosis of malaria. *Sensors (Basel)* *14*, 14686–14699.

Gillet, P., Scheirlinck, A., Stokx, J., De Weggheleire, A., Chaúque, H.S., Canhanga, O.D., Tadeu, B.T., Mosse, C.D., Tiago, A., Mabunda, S., (2011). Prozone in malaria rapid diagnostics tests: how many cases are missed? *Malaria Journal* *10*, 166.

Githeko, A.K., Lindsay, S.W., Confalonieri, U.E., and Patz, J.A. (2000). Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bulletin of World Health Organisation*. *78*, 1136–1147.

Gwer, S., Newton, C.R.J.C., and Berkley, J.A. (2007). Over-Diagnosis and Co-Morbidity of Severe Malaria in African Children: A Guide for Clinicians. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77, 6–13.

Kim, J.-Y., Kim, H.-H., Shin, H.-L., Sohn, Y., Kim, H., Lee, S.-W., Lee, W.-J., and Lee, H.-W. (2012). Genetic variation of aldolase from Korean isolates of *Plasmodium vivax* and its usefulness in serodiagnosis. *Malaria Journal* 11, 159.

Koivunen, M.E., and Krogsrud, R.L. (2006). Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Laboratory Medicine* 37, 490–497.

Kyabayinze, D.J., Tibenderana, J.K., Nassali, M., Tumwine, L.K., Riches, C., Montague, M., Counihan, H., Hamade, P., Van Geertruyden, J.-P., and Meek, S. (2011). Placental *Plasmodium falciparum* malaria infection: operational accuracy of HRP2 rapid diagnostic tests in a malaria endemic setting. *Malaria Journal* 10, 306.

Laishram, D.D., Sutton, P.L., Nanda, N., Sharma, V.L., Sobti, R.C., Carlton, J.M., and Joshi, H. (2012). The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malaria Journal* 11, 29.

Laurent, A., Schellenberg, J., Shirima, K., Ketende, S.C., Alonso, P.L., Mshinda, H., Tanner, M., and Schellenberg, D. (2010). Performance of HRP-2 based rapid diagnostic test for malaria and its variation with age in an area of intense malaria transmission in southern Tanzania. *Malaria Journal* 9, 294.

Lee, J.-H., Jang, J.W., Cho, C.H., Kim, J.Y., Han, E.T., Yun, S.G., and Lim, C.S. (2014). False-positive results for rapid diagnostic tests for malaria in patients with rheumatoid factor. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 3784–3787.

Lee, N., Baker, J., Bell, D., McCarthy, J., and Cheng, Q. (2006). Assessing the genetic diversity of the aldolase genes of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* and its potential effect on performance of aldolase-detecting rapid diagnostic tests. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 4547–4549.

Lin, J.T., Saunders, D.L., and Meshnick, S.R. (2014). The role of submicroscopic parasitemia in malaria transmission: what is the evidence? *Trends in Parasitology* 30, 183–190.

Luchavez, J., Baker, J., Alcantara, S., and Belizario, V., Jr (2011). Laboratory demonstration of a prozone-like effect in HRP2-detecting malaria rapid diagnostic tests: implications for clinical management. *Malaria Journal*

Makler, M.T., and Piper, R.C. (2009). Rapid Malaria Tests: Where Do We Go After 20 Years? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 81, 921–926.

Maltha, J., Gillet, P., and Jacobs, J. (2013). Malaria rapid diagnostic tests in endemic settings. *Clinical Microbiology Infectious* 19, 399–407.

Mita, T., and Kazuyuki Tanabe (2012). Evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance: implications for the development and containment of artemisinin resistance. *Journal of Infectious Diseases* 1–11.

Moody, A. (2002). Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 66–78.

Moore, C.M., Hoey, E.M., Trudgett, A., and Timson, D.J. (2011). Artemisinins act through at least two targets in a yeast model. *FEMS Yeast Research* 11, 233–237.

Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., and Notomi, T. (2001). Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289, 150–154.

Mosha, J.F., Sturrock, H.J.W., Greenhouse, B., Greenwood, B., Sutherland, C.J., Gadalla, N., Atwal, S., Drakeley, C., Kibiki, G., Bousema, T., (2013). Epidemiology of subpatent *Plasmodium falciparum* infection: implications for detection of hotspots with imperfect diagnostics. *Malaria Journal* 12, 221.

Mouatcho, J.C., and Goldring, J.P.D. (2013). Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. *Journal of Medical Microbiology* 62, 1491–1505.

Mueller, I., Betuela, I., Ginny, M., Reeder, J.C., and Genton, B. (2007). The sensitivity of the OptiMAL rapid diagnostic test to the presence of *Plasmodium falciparum* gametocytes compromises its ability to monitor treatment outcomes in an area of Papua New Guinea in which malaria is endemic. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 627–630.

Notomi, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 28, 63e–63.

Odolini, S., Gautret, P., and Parola, P. (2012). Epidemiology of imported malaria in the mediterranean region. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases* 4, e2012031.

Okell, L.C., Bousema, T., Griffin, J.T., Ouédraogo, A.L., Ghani, A.C., and Drakeley, C.J. (2012). Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nature Communication* 3, 1237.

Okell, L.C., Ghani, A.C., Lyons, E., and Drakeley, C.J. (2009). Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Infectious Disease* 200, 1509–1517.

Okell, L.C., Griffin, J.T., Kleinschmidt, I., Hollingsworth, T.D., Churcher, T.S., White, M.J., Bousema, T., Drakeley, C.J., and Ghani, A.C. (2011). The potential contribution of mass treatment to the control of *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Infectious Diseases*. 6, e20179.

Owusu-Agyei, S., Smith, T., Beck, H.-P., Amenga-Etego, L., and Felger, I. (2002). Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* infections among asymptomatic inhabitants of a holoendemic malarious area in northern Ghana. *Tropical Medicine and International Health* 7, 421–428.

Piper, R.C., Buchanan, I., Choi, Y.H., and Makler, M.T. (2011). Opportunities for improving pLDH-based malaria diagnostic tests. *Malaria Journal* 10, 213.

Rigano, L.A., Malamud, F., Orce, I.G., Filippone, M.P., Marano, M.R., do Amaral, A.M., Castagnaro, A.P., and Vojnov, A.A. (2014). Rapid and sensitive detection of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by loop mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *BMC Microbiology* 14, 86.

Sowunmi, A., Balogun, S.T., Gbotosho, G.O., and Happi, C.T. (2008). *Plasmodium falciparum* gametocyte sex ratios in children with acute, symptomatic, uncomplicated infections treated with amodiaquine. *Malaria Journal* 7, 169.

Sturrock, H.J.W., Hsiang, M.S., Cohen, J.M., Smith, D.L., Greenhouse, B., Bousema, T., and Gosling, R.D. (2013). Targeting asymptomatic malaria infections: active surveillance in control and elimination. *PLoS Medicine* 10, e1001467.

Takala-Harrison, S., Clark, T.G., Jacob, C.G., Cummings, M.P., Miotto, O., Dondorp, A.M., Fukuda, M.M., Nosten, F., Noedl, H., Imwong, M., (2013). Genetic loci associated with delayed clearance of *Plasmodium falciparum* following artemisinin treatment in Southeast Asia. *PNAS* 110, 240–245.

Talman, A.M., Duval, L., Legrand, E., Hubert, V., Yen, S., Bell, D., Le Bras, J., Ariey, F., and Houze, S. (2007). Evaluation of the intra- and inter-specific genetic variability of *Plasmodium lactate* dehydrogenase. *Malaria Journal* 6, 140.

The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics (2011). A Research Agenda for Malaria Eradication: Diagnoses and Diagnostics. *PLoS Medicine* 8, e1000396.

Tiono, A.B., Ouédraogo, A., Diarra, A., Coulibaly, S., Soulama, I., Konaté, A.T., Barry, A., Mukhopadhyay, A., Sirima, S.B., and Hamed, K. (2014). Lessons learned from the use of HRP-2 based rapid diagnostic test in community-wide screening and treatment of asymptomatic carriers of *Plasmodium falciparum* in Burkina Faso. *Malaria Journal* 13, 30–39.

Unitaid (2014). Stratégie 2013-2016. 1–102.

Wellems, T.E., and Howard, R.J. (1986). Homologous genes encode two distinct histidine-rich proteins in a cloned isolate of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 83, 6065–6069.

White, N.J., Pukrittayakamee, S., MD, P.T.T.H., PhD, P.M.A.F., FWACP, P.O.A.M., and MD, P.A.M.D. (2014). Seminar on Malaria. *The Lancet* 383, 723–735.

Witkowski, B., Amaratunga, C., Khim, N., Sreng, S., Chim, P., Kim, S., Lim, P., Mao, S., Sopha, C., Sam, B., (2013). Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infectious Disease*.

Wongsrichanalai, C., Barcus, M.J., Muth, S., Sutamihardja, A., and Wernsdorfer, W.H. (2007). A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 77, 119–127.

World Health Organization (2010). Guideline for the treatment of Malaria. 1–210.

World Health Organization (2013). World Malaria Report 2013. 1–286.

World Health Organization (2014a). Malaria in the WHO European region

World Health Organization (2014b). Information note on recommended selection criteria for procurement - September 2014. 1–13.

World Health Organization (2014c). From malaria control to malaria elimination: a manual for elimination scenario planning. 1–67.

World Health Organization, FIND, CDC (2014). Malaria Rapid Diagnostic Test Performance- Results of WHO product testing of malaria RDTs : Round 5 (2013). 1–144.

World Health Organization, FIND (2008). Comment utiliser les tests diagnostiques rapides du paludisme - *Un guide pour la formation au niveau du village et du district.* 1–48.

World Health Organization, Foundation for Innovative New Diagnostics (2014). Methods manual for laboratory quality control testing of malaria rapid diagnostic tests. 1–299.

Yetisen, A.K., Akram, M.S., and Lowe, C.R. (2013). Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab Chip* 13, 2210–2251.

Yongkiettrakul, S., Jaroenram, W., Arunrut, N., Chareanchim, W., Pannengetch, S., Suebsing, R., Kiatpathomchai, W., Pornthanakasem, W., Yuthavong, Y., and Kongkasuriyachai, D. (2014). Application of loop-mediated isothermal amplification assay combined with lateral flow dipstick for detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Parasitology International* 63, 777–784.

Zhang, X., Lowe, S.B., and Gooding, J.J. (2014). Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors and Bioelectronic* 61, 491–499.

Sites internet

- (1) <http://www.wpro.who.int/malaria/sites/rdt/> - Consulté en octobre 2014
- (2) <http://www.mjhid.org/article/view/341/466> - Consulté en octobre 2014
- (3) <http://www.sarstedt.com/> - Consulté en octobre 2014
- (4) http://www.finddiagnostics.org/programs/malaria-afs/malaria/rdt_quality_control/ Consulté en octobre 2014
- (5) FIND, <https://www.youtube.com/watch?v=COVXZCeiTW8>, Ajoutée le 9 décembre 2013 – Consulté en octobre 2014

XIV. SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

« RÔLES ET LIMITES DES TESTS DE DIAGNOSTIC RAPIDE DU PALUDISME »

Par LANGLOIS Anne-Claire, Odette, Marie José

Résumé :

Avec 627 000 décès en 2012, le paludisme est la maladie parasitaire la plus meurtrière chez l'homme et menace environ la moitié de la population mondiale. Toutefois, de grandes avancées dans la lutte contre cette pathologie ont pu être effectuées grâce, entre autre, à l'intégration des tests de diagnostic rapide (TDR) dans les programmes nationaux de contrôle de la pathologie. Ces tests constituent un outil idéal de diagnostic de terrain permettant de prendre en charge rapidement un grand nombre de patients en zone d'endémie. Ils présentent cependant des limites, rapportées par de nombreuses études, en particulier pour diagnostiquer les porteurs asymptomatiques avec une très faible parasitémie. D'autre part, il est devenu essentiel, dû à l'essor important du marché des TDR, d'établir des critères de sélection afin d'évaluer la qualité des produits et ainsi d'orienter les choix d'approvisionnement. Enfin, la transition de la phase de contrôle à la phase d'élimination du paludisme dans de nombreux pays confère une importance croissante à la prise en charge des réservoirs de parasites en zone de faible incidence, cela afin d'interrompre totalement la transmission. L'implémentation des TDR sur le terrain implique alors une planification rigoureuse et une bonne coordination à tous les niveaux des organisations de santé. Les tests de diagnostic rapide possèdent donc un rôle essentiel à jouer dans la lutte pour le contrôle du paludisme. Ce mémoire est destiné à préciser ce rôle en s'appuyant sur une connaissance actualisée du contexte de transmission du paludisme, des caractéristiques des TDR, et des moyens de les intégrer aux politiques de santé nationale.

Mots clés : PALUDISME, TEST DE DIAGNOSTIC RAPIDE, TRANSMISSION

« ROLE AND LIMITS OF MALARIA RAPID DIAGNOSTIC TESTS »

Abstract :

Approximately one-half of the global population is at risk of malaria, currently considered as the most deadly parasitic disease in humans with 627 000 deaths in 2012. However, great successes have been achieved in the fight against this disease, partly due to the integration of rapid diagnostic tests (RDT) into malaria national programs across the world. These tests constitute an ideal tool for point of care diagnosis and rapid treatment of patients in endemic areas. Several studies nevertheless show that RDT have certain detection limits, especially to diagnose asymptomatic patients with low parasitemia. On another hand, due to the significant growth of the RDT market, it has become essential to implement rigorous selection criteria to assess the quality of the products and guide the procurement choice. Moreover, the transition from control phase to elimination phase of malaria in many countries gives increasing importance to the management of parasite reservoirs in low endemicity areas, in order to interrupt transmission totally. Thus, the field implementation of RDT implies careful planning and coordination at every level of health care organizations. Rapid diagnostic tests therefore have a key role to play in the fight to control malaria. This report is designed to specify this role, based on an updated knowledge on the context of transmission, RDT's characteristics and ways to integrate them into national health policies.

Keywords : MALARIA, RAPID DIAGNOSTIC TEST, TRANSMISSION

Université de LIMOGES - Faculté de Pharmacie
2 rue du Docteur Marcland - 87 025 LIMOGES CEDEX