



HAL
open science

Prévalence des délétions des gènes pfhrp2 et pfhrp3 chez *Plasmodium falciparum* sur le plateau des Guyanes

Léna Berthelot

► **To cite this version:**

Léna Berthelot. Prévalence des délétions des gènes pfhrp2 et pfhrp3 chez *Plasmodium falciparum* sur le plateau des Guyanes. Parasitologie. 2018. dumas-02018247

HAL Id: dumas-02018247

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02018247>

Submitted on 13 Feb 2019

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

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

UNIVERSITE DES ANTILLES
FACULTE DE MEDECINE HYACINTHE BASTARAUD

ANNEE : 2018

N°2018ANTI0264

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES (D.E.S.)
DE BIOLOGIE MEDICALE

qui, conformément aux dispositions du décret
n° 2003-76 du 23 janvier 2003 (Article 14- 4)
tient lieu de :

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

PRESENTE ET SOUTENU

le 23 avril 2018

PAR

BERTHELOT Léna

**Prévalence des délétions des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3*
chez *Plasmodium falciparum* sur le plateau des Guyanes**

JURY

Président : Madame le Professeur Magalie PIERRE DEMAR

Membres : Madame le Professeur Maryvonne DUEYMES

Monsieur le Professeur Félix DJOSSOU

Madame le Docteur Lise MUSSET

Le Président de l'Université des Antilles : Eustase JANKY

Doyen de la Faculté de Médecine : Raymond CESAIRE

Vice-Doyen de la Faculté de Médecine : Suzy DUFLO

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Bruno HOEN	Maladies Infectieuses CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 15 45
Pascal BLANCHET	Chirurgie Urologique CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 13 95
André-Pierre UZEL	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 14 66
Pierre COUPPIE	Dermatologie CH de CAYENNE Tel : 05 94 39 53 39
Thierry DAVID	Ophtalmologie CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 14 55
Suzy DUFLO	ORL – Chirurgie Cervico-Faciale CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 93 46 16
Eustase JANKY	Gynécologie-Obstétrique CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel 05 90 89 13 89
François ROQUES	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 22 71
Jean ROUDIE	Chirurgie Digestive CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 21 01 - Tel : 05 96 55 22 71
Jean-Louis ROUVILLAIN	Chirurgie Orthopédique CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 22 28
André CABIE	Maladies Infectieuses CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 23 01
Philippe CABRE	Neurologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 22 61

Raymond CESAIRE	Bactériologie-Virologie-Hygiène option virologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 24 11
Maryvonne DUEYMES-BODENES	Immunologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 24 24
Régis DUVAUFERRIER	Radiologie et imagerie Médicale CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 21 84
Annie LANNUZEL	Neurologie CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 14 13
Louis JEHEL	Psychiatrie Adulte CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 20 44
Mathieu NACHER	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention CH de CAYENNE Tel : 05 94 93 50 24
Guillaume THIERY (en disponibilité)	Réanimation CHU de POINTE-A-PITRE/BYMES Tel : 05 90 89 17 74
Magalie DEMAR - PIERRE	Parasitologie et Infectiologie CH de CAYENNE Tel : 05 94 39 53 09
Vincent MOLINIE	Anatomie Cytologie Pathologique CHU de FORT DE FRANCE Tel : 05 96 55 20 85/55 23 50
Philippe KADHEL	Gynécologie-Obstétrique CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 13 20
Michel DEBANDT	Rhumatologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 23 52
Jeannie HELENE-PELAGE	Médecine Générale CHU de Pointe-à-Pitre / Cabinet libéral Tel : 05 90 84 44 40
Karim FARID	Médecine Nucléaire CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 21 67
Mehdi MEJDOUBI	Radiodiagnostic et imagerie Médicale CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 21 84
Rémi NEVIERE	Physiologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 20 00

Christian SAINTE-ROSE

Radiodiagnostic et imagerie Médicale
CHU de FORT- DE - FRANCE
Tel : 05 96 55 20 00

Sébastien BREUREC

Bactériologie & Vénérologie
CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES
Tel : 05 90 89 12 80

Félix DJOSSOU

Maladies infectieuses et tropicales
CH de CAYENNE
Tel : 05 94 39 50 50.

Nicolas VENISSAC

Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
CHU de FORT- DE - FRANCE
Tel : 05 96 55 22 71

Professeurs Associés de Médecine Générale

Franciane GANE-TROPLENT

Médecine générale
Cabinet libéral les Abymes
Tel : 05 90 20 39 37

Maître de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers

Christophe DELIGNY

Médecine Interne
CHU de FORT- DE - FRANCE
Tel : 05 96 55 22 55

Jocelyn INAMO

Cardiologie
CHU de FORT- DE - FRANCE
Tel : 05 96 55 23 72 - Fax : 05 96 75 84 38

Fritz-Line VELAYOUDOM épouse CEPHISE

Endocrinologie
CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES
Tel : 05 90 89 13 03

Marie-Laure LALANNE-MISTRIH

Nutrition
CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES
Tel : 05 90 89 13 00

Narcisse ELENGA

Pédiatrie
CH de CAYENNE
Tel : 05 94 39 77 37

Moana GELU-SIMEON

Gastroentérologie hépatologie
CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES
Tel : 05 90 89 10 10

TABUE TEGUO Maturin

Médecine interne : Gériatrie et Biologie du vieillissement
CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES
Tel : 05 90 89 10 10

BACCINI Véronique

Hématologie
CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES
Tel : 05 90 89 10 10

Chefs de Clinique des Universités - Assistants des Hôpitaux

BANCEL Paul	ORL/Chirurgie maxillo faciale CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : Tél. : 0590 89 14 60
BORJA DE MOZOTA Daphné	Gynécologie-Obstétrique CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tél. : 0590 89 19 80
DARCHE Louis	Chirurgie Digestive et Viscérale CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 00
DE RIVOYRE Benoit	Ophtalmologie CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 14 50 / 0690 00 93 95
DEBBAGH Hassan	Chirurgie thoracique CHU de Martinique Tél. : 0596 55 22 71
DOURNON Nathalie	Maladies infectieuses CHU de Pointe-à-Pitre Tel : 05 90 89 10 10
GALLI-DARCHE Paola	Neurologie CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 00.
GHASSANI Ali	Gynécologie-Obstétrique CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 19 89
CHARMILLON Alexandre	Anesthésie-Réanimation CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 11 82
MARY Julia	Rhumatologie CHU de Martinique Tél. : 0596 55 23 52
MOINET Florence	Rhumatologie-médecine interne CHU de Martinique Tél. : 0596 55 22 55
MONFORT Astrid	Cardiologie CHU de Martinique Tél. : 0596 55 23 72
MOUREAUX Clément	Urologie CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 13 95
GUERIN Meggie	Parasitologie et Mycologie CH "Andrée ROSEMON" de Cayenne Tél. : 0594 39 53 59
PARIS Eric	Réanimation CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 10 10

PIERRE-JUSTIN Aurélie

Neurologie
CHU de Pointe-à-Pitre
Tél. : 0590 89 13 40

SAJIN Ana Maria

Psychiatrie
CHU de Martinique
Tél. : 0596 55 20 44

SEVERYNS Mathieu

Chirurgie orthopédique
CHU de Martinique
Tél. : 0596 55 22 21

Chefs de Clinique des Universités – Médecine Générale

CARRERE Philippe

Médecine Générale
CHU de Pointe-à-Pitre /Cabinet
Tél. : 0590 8084 05 /Fax : 0590 99 33 07

PLACIDE Axiane

Médecine Générale
CHU de Martinique / Cabinet
Tél. : 05 96 75 48 27

NIEMETZKI Florence

Médecine Générale
CH « Andrée Rosemon » de Cayenne/Cabinet
Tél. : 05 94 39 50 50 poste 59 28

MOUNSAMY Josué

Médecine Générale
CHU de Pointe-à-Pitre /Cabinet

Professeurs EMERITES

Georges JEAN-BAPTISTE

Rhumatologie
CHU de FORT- DE - FRANCE
Tel : 05 96 55 23 52 - Fax : 05 96 75 84 44

Serge ARFI

Médecine interne
CHU de FORT- DE – France
Tel : 05 96 55 22 55 - Fax : 05 96 75 84 45

Bernard CARME

Parasitologie
CH « Andrée Rosemon » de Cayenne/Cabinet
Tél. : 05 94 39 50 50

REMERCIEMENTS

Au Professeur Magalie PIERRE DEMAR,

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Notre première rencontre en 2011, lors de mon externat, m'a donné le goût pour les maladies infectieuses et votre parcours m'a grandement inspiré. Merci pour votre disponibilité et vos enseignements, ce fut un plaisir de travailler un semestre au laboratoire de parasitologie.

Au Professeur Félix DJOSSOU,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. C'est lors du passage dans votre service pendant mon externat que j'ai su que je reviendrais en Guyane faire de la médecine tropicale. Merci, ce stage a orienté mes choix durant mes études.

Au Professeur Maryvonne DUEYMES,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Au Docteur Lise MUSSET,

Merci de m'avoir fait confiance pour diriger cette thèse et pour votre aide précieuse tout au long de ce travail. La dernière ligne droite a été intense, merci pour votre patience.

Au Docteur Dominique ROUSSET,

Merci pour tes précieux conseils et ton soutien pendant ces dernières semaines. Merci pour tes enseignements quotidiens, c'est un plaisir de travailler à tes côtés.

Aux équipes de maladie infectieuse et du laboratoire bactério-viro-parasitologie de Guadeloupe, aux équipes des laboratoires de biochimie et d'hématologie de Bordeaux, merci pour ces premiers semestres enrichissants et de découvertes.

A l'équipe du laboratoire de parasitologie du CHAR, Cécile, Denis, Nadia, Magalie, Romain et Max, merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et la bonne ambiance de travail.

Aux équipes de l'IPG des laboratoires de parasitologie : Yassamine, Béatrice, Luana, Nicole et Stéphane, sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour, merci pour votre aide quotidienne et vos précieux conseils, **de virologie : Antoine, Séverine, Laetitia, Bethy, David, Marine et Norma,** j'ai appris beaucoup et pris de plaisir à travailler à vos côtés cette dernière année, merci, **du LBM** merci pour votre gentillesse et votre disponibilité, **à l'équipe d'épidémiologie, Claude** merci de m'avoir fait confiance pour l'enquête et de m'avoir permis de survoler Petit-Saut en hélico, c'était fou, **Camille,** nos conversations le midi vont me manquer, merci beaucoup pour ton soutien et le couchage et gardiennage ces dernières semaines, à bientôt en métropole, **Arielle,** merci pour ton aide, Geneious n'a presque plus de secret pour moi.

Durant mon internat, je me suis souvent senti à l'aise à vos côtés et j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler aux seins de vos équipes, Merci à vous tous j'étais un peu perdu au début de mon internat, maintenant je sais que j'ai fait le bon choix en devenant biologiste.

A mes parents,

Papa, merci de m'avoir donné ton goût pour les sciences et pour la nature,

Maman, merci de m'avoir transmis ta curiosité et ta persévérance.

Merci à vous pour ce chaleureux cocon familial.

A mes sœurs et frère,

Eme, merci pour ta bienveillance, **Mart**, merci pour ton humour, **Flo**, merci pour notre complicité, vous me manquez souvent.

Au reste de la famille qui s'est agrandie ma nièce, **Jade**, mon beau-frère, **Wahé**, quel bonheur de passer du temps à vos côtés, vous avez embellie la famille.

A Nicole, merci pour ton soutien.

A ma grand-mère, **Jeanine**,

A Evelyne et Denis, Remi.

A Dodo et Titi.

A mon parrain, **Vincent** et **Marie** et mes cousines et cousin,

A ma marraine, **Marie Claire**

A Virgile, merci pour tous ces fabuleux moments passés ensemble depuis le début de mon internat et pour ces jolies découvertes. Merci d'être là au quotidien. Ces derniers temps n'ont pas été simple, merci pour ta patience.

Aux pinces, mes frères et sœurs de cœur, Marie, Geoffrey, Henri, Antoine, Arthur, Louise. La distance nous sépare depuis 4 ans maintenant mais l'amitié qui nous lie restera intacte encore bien longtemps.

A Vincent, l'externat à tes côtés c'était super, on était bien trop loin pendant notre internat j'espère qu'on se retrouvera bien prochainement.

A tous mes colocs et amis de Sainte Anne, Petit Bourg : les boulbouls, Nasouty, Casa Thérèse, du Consulat et de Beauséjour,

Elodie, sans toi je n'en serais pas là aujourd'hui, **Nat**, à quand nos retrouvailles dans un autre DOM, **Amélie et Marco**, à très bientôt j'espère pour de nouvelles aventures, **Baba, Jorge, Romain et Gabi, Oliv et Marine, Marianne et Dim**, merci pour notre nid de bois et de verdure, **Ben et Oriane**, super de s'être retrouvés ici et d'avoir partagé ces belles découvertes ; **Juju et Alice**, ravie d'avoir fini mon internat en Guyane à vos côtés, quel plaisir de vivre avec vous,

Merci à vous tous et à ceux que je n'ai pas cité pour ces supers moments passés en votre compagnie, quel plaisir d'être bien entourée quand on est loin de sa famille.

Les filles Pimp, Mar, Cha et Marie, à bientôt en voyage, on s'était donné rendez vous dans 3 ans, enfin il ne reste plus qu'un an et demi....alors on se retrouve où ?

Aux tigresses et à Alex, notre coach, merci à vous pour ces supers moments sportifs et ces 3^{ième} mi-temps renversantes.

A toutes ces belles rencontres en Guyane autour d'une coinche : **Dine, Marie Bro, Marine**, ou plutôt en carbet, **Chris, Dylan, Brioux et Marie, Justine et Fred** ou ailleurs **Vaness, Bruno et Morgane.**

A Saimi, pour ta fidèle compagnie.

A tous les gens croisés sur mon chemin, aux sourires et aux paroles échangés, aux regards partagés, chaque rencontre m'a fait grandir, merci.

RESUME

Depuis 2009, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande de confirmer rapidement toute suspicion de cas de paludisme avant de délivrer un traitement antipaludique adapté en procédant à un diagnostic de certitude basé sur la recherche des plasmodies par microscopie ou test de diagnostic rapide (TDR) avant d'administrer un traitement antipaludique adapté. Cette recommandation a conduit à un essor des TDR qui sont devenus des outils diagnostic de choix dans les zones reculées aux infrastructures limitées. Ces TDR permettent entre autre la détection de *Plasmodium falciparum* par la recherche de la protéine - 2-riche en histidine (Pf-HRP2). Des parasites délétés pour le gène *pfhrp2*, qui code cette protéine, ont cependant été décrits en Amazonie. Le risque est alors d'étiqueter à tort un accès à *P. falciparum* comme un accès à *P. vivax* et de le traiter par chloroquine alors que sur le plateau des Guyanes, 20 à 30% des parasites sont chloroquino-résistants. En raison des flux migratoires et de la place des TDR dans cette région, une surveillance accrue de ces délétions est nécessaire. Ainsi, des isolats collectés entre 2015 et 2017 en Guyane, au Guyana et au Venezuela ont été étudiés selon les recommandations de l'OMS afin d'estimer la prévalence des délétions au niveau des gènes *pfhrp2/3*.

Huit PCR analysant les deux parties, jonction exon 1-2 et exon 2, des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* et leurs gènes adjacents ont ainsi été utilisées. Le protocole d'étude comprenait également une PCR en temps réel comme méthode semi-quantitative permettant d'évaluer la quantité et la qualité de l'ADN des isolats étudiés afin de sélectionner les échantillons analysables.

Un total de 690 isolats a été étudié. Au Venezuela, 39% (IC₉₅ [28,1 – 49,9]) des parasites présentaient une délétion au niveau du gène *pfhrp3* et 2,6% (IC₉₅ [0 – 6,8]) au niveau de *pfhrp2*. Au Guyana (n=265) et en Guyane (n=230), aucun parasite délété pour le gène *pfhrp2* n'a été mis en évidence et respectivement 3,0% IC₉₅ [0,9% - 5,1%] et 0,5% IC₉₅ [0 – 1,5] pour le gène *pfhrp3*.

Ces données robustes mettent pour la première fois en évidence des isolats délétés pour le gène *pfhrp2* au Venezuela et confirme leur absence en Guyane et au Guyana. Par conséquent, la surveillance reste de mise au Venezuela mais les TDR basés sur Pf-HRP2 restent des outils diagnostic adaptés dans ces pays.

SUMMARY

Since 2009, World Health Organization (WHO) recommends the biological diagnostic confirmation by either microscopy or rapid diagnostic test (RDT) of any clinical malaria cases before delivering appropriate antimalarial treatment. This recommendation led to increasing use of RDTs especially in remote areas with limited infrastructures. Most RDTs target the histidine-rich protein-2 antigen (PfHRP2) to detect *Plasmodium falciparum*. However, parasites deleted for the *pfhrp2* gene encoding this protein have been described in Amazonia. The risk is then to misdiagnosed a *P. falciparum* case as a *P. vivax* one and to treat it with chloroquine. In the Guiana Shield, 20 to 30% of parasites are chloroquino-resistant. Due to human migration and the importance of RDTs in this region, increased surveillance of *pfhrp2* deletion is required. Thus, isolates collected between 2015 and 2017 in French Guiana, Guyana and Venezuela were studied according to WHO recommendations to estimate the prevalence of parasites lacking the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes. Eight amplifications analyzed two regions of the genes *pfhrp2* and *pfhrp3*, junction exon 1-2 and exon 2, of the genes and their flanking genes. To assess the sample DNA quality and quantity and to select suitable isolates for molecular analysis, the protocol included a real-time PCR as a semi-quantitative method.

A total of 690 isolates were analyzed. In Venezuela, 39% (IC₉₅ [28.1 - 49.9]) of the parasites were *pfhrp3* negative and 2.6% (IC₉₅ [0-6.8]) *pfhrp2* negative. In Guyana (n = 265) and French Guiana (n = 230), no parasite lacked the *pfhrp2* gene and respectively 3.0% IC₉₅ [0.9% - 5.1%] and 0.5% IC₉₅ [0 - 1.5] were *pfhrp3* negative.

These robust data identify for the first time the presence of deleted *pfhrp2* parasites in Venezuela and confirm their absence in Guyana and French Guiana. Therefore surveillance remains important in Venezuela. However, Pf-HRP2-based RDTs remain suitable diagnostic tools in the countries of this region.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	7
RESUME	9
SUMMARY	10
LISTE DES ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION.....	18
1 BIOLOGIE DU PALUDISME.....	19
1.1. Le parasite.....	19
1.2. Le moustique : vecteur du paludisme	19
1.3. Biologie du parasite chez le moustique vecteur	20
2. DIAGNOSTIC CLINICO-BIOLOGIQUE DU PALUDISME.....	23
2.1. Diagnostic clinique	23
2.2. Diagnostic biologique.....	24
2.2.1.1. Examen microscopique	27
2.2.1.1.1. Le frottis mince	27
2.2.1.1.1. La goutte épaisse.....	28
2.2.1.2. Diagnostic par biologie moléculaire	28
2.2.1.3. Tests immunochromatographiques dits « de diagnostic rapide » (TDR).....	29
2.2.1.3.1. Anatomie du test	29
2.2.1.3.2. Principe des TDR.....	30
2.2.1.3.3. Les différents types de TDR	31
2.2.1.3.4. Epidémiologie des parasites délétés pour les gènes <i>pfhrp2</i> et <i>3</i>	39
3 EPIDEMIOLOGIE et DIAGNOSTIC DU PALUDISME SUR LE PLATEAU DES GUYANES	43
3.1 Epidémiologie et diagnostic en Guyane	44
3.2 Epidémiologie et diagnostic au Guyana	47
3.3 Epidémiologie et diagnostic au Venezuela.....	48

OBJECTIFS	50
MATERIELS	51
1 Souches de référence et gamme de dilution	51
2 Isolats étudiés	51
METHODES	53
1 Extraction d'ADN.....	53
2 Mise au point du protocole d'analyse.....	53
2.1 Développement des techniques de PCR classiques	53
2.2 Utilisation de PCR d'espèce en temps réel.....	56
3 Amplification d'un ou plusieurs gènes en monocopie	57
4 Séquençage du gène <i>pfhrp2</i> et analyse des séquences protéiques.....	57
RESULTATS	59
1 Méthodes et protocole d'étude mis en place	59
2 Prévalence sur le plateau des Guyanes	62
3 Etude des profils protéiques à travers l'analyse des séquences de l'exon 2 du gène <i>pfhrp2</i> ...	66
DISCUSSION	69
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	75
SERMENT D'HIPPOCRATE	84
DEMANDE D'IMPRIMATUR	85

LISTE DES ABREVIATIONS

Aa : acide aminé
Ac : anticorps
Ag : antigène
ACD : Acide citrique Dextrose
ADN : acide désoxyribonucléique
An. : Anophèle
ARS : Agence Régionale de Santé
ARNr : Acide Ribonucléique ribosomique
Ct: Cycle threshold (cycle seuil)
CHAR: Centre Hospitalier Andrée Rosemon
CDPS : Centre délocalisé de prévention et de soins
Cire : Cellule Inter-Régionale d'Épidémiologie
CNR : Centre National de Référence
CRT : Chloroquine Résistance Transporter
°C : degrés Celsius
Ch : chromosome
dNTP : mélange des quatre désoxyribonucléotides
EDTA : Ethylène Diamine Tétracyclique
Ex : exemple
FIND : Fondation pour l'Innovation en matière de Nouveaux Diagnostics
HRP2: Histidine Rich Protein 2
HCSP : Haut Conseil de Santé de Publique
kDA : kilo dalton
µl : microlitre
LDH : lactate déshydrogénase
LHUPM : laboratoire hospitalo-universitaire de parasitologie mycologie
mM : milimolaire
MgCl₂ : Chlorure de magnésium
MGG: May Grünwald Giemsa
Min: minutes
MSP2: Merozoite Surface Protein-2
nM : nanomolaire

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAHO: Pan American Health Organization

P.: *Plasmodium*

Pf.: *Plasmodium falciparum*

Pv.: *Plasmodium vivax*

Pm.: *Plasmodium malariae*

Po.: *Plasmodium ovale*

Pk.: *Plasmodium knowlesi*

PCR: Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne

Pb : paire de base

qPCR : PCR quantitative : PCR temps réel

Sec : seconde

TBE: Tris/Borate/EDTA

TDR: Test de Diagnostic Rapide

TDR: Tropical Diseases, Special Programme for Research and Training

LISTE DES FIGURES

Figure 1- Carte des cas confirmés de paludisme pour 1000 habitants en 2016 dans la région des Amériques.	18
Figure 2- Espèces majoritairement responsables de paludisme selon les pays.....	19
Figure 3- Cycle de développement de <i>Plasmodium falciparum</i>	22
Figure 4- Trophozoïtes de <i>P. falciparum</i> lors de l'observation d'un frottis au microscope à immersion (Coloration MGG).....	27
Figure 5- Représentation schématique d'un TDR en cassette.	29
Figure 6- Principe d'un test immunochromatographique.	30
Figure 7- Exemple d'interprétation des TDR.	32
Figure 8- Résumé des stades synthétisant les différentes protéines plasmodiales recherchées par les tests de diagnostic rapide.	35
Figure 9- Représentation schématique du gène <i>pfhrp2</i>	37
Figure 10- Points de cassures sur le chromosome 8.....	38
Figure 11- Localisation des parasites délétés pour les gènes <i>pfhrp2</i> (en vert) et <i>pfhrp3</i> (en orange) et des parasites doubles délétés (en rouge).	41
Figure 12- Pays d'Afrique où des cas de parasites délétés pour <i>pfhrp2/3</i> (en orange) ont été rapportés.	42
Figure 13- Carte du plateau des Guyanes.....	43
Figure 14- Risque de paludisme en Guyane.....	45
Figure 15- Répartition des centres délocalisés de prévention et de soins en Guyane.....	46
Figure 16- Incidence des cas de paludisme à <i>Plasmodium falciparum</i> au Guyana en 2016 par région épidémiologique.....	47
Figure 17- Incidence des cas de paludisme à <i>Plasmodium falciparum</i> au Venezuela en 2016.	48
Figure 18- Représentation du gène <i>pfhrp2</i> et de ses gènes adjacents avec les couples d'amorces testés.	54
Figure 19- Représentation du gène <i>pfhrp3</i> et de ces gènes adjacents avec les couples d'amorces testés.	54
Figure 20- Photo des gammes de sensibilité testées pour l'exon 2 <i>pfhrp3</i> avec la PCR 3E-2.	59
Figure 21- Protocole pour l'étude de prévalence des délétions de <i>pfhrp</i>	62
Figure 22- Prévalence des parasites délétés pour le gène <i>pfhrp2</i> sur le plateau des Guyanes.	63
Figure 23- Prévalence des parasites délétés pour le gène <i>pfhrp3</i> sur le plateau des Guyanes.	64

Figure 24- Détail des 39 délétions du gène <i>pfhrp3</i>	66
Figure 25- Photo des gammes de sensibilité testées pour la jonction exon 1- 2 du gène <i>pfhrp2</i> avec la PCR 2J-3	81
Figure 26- Photo des gammes de sensibilité testées pour l'exon 2 du gène <i>pfhrp2</i> avec la PCR 2E-1.	81
Figure 27- Photo des gammes de sensibilité testées pour la jonction exon1-2 du gène <i>pfhrp3</i> avec la PCR 3J-2	82
Figure 28- Photo des gammes de sensibilité testées pour les gènes adjacents amont et aval du gène <i>pfhrp2</i> avec les PCR 2AM-1 et 2AV-1.....	83
Figure 29- Photo des gammes de sensibilité testées pour les gènes adjacents amont et aval du gène <i>pfhrp3</i> avec les PCR 3AM-1 et 3AV-1.....	83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1- Caractéristiques des différentes méthodes de diagnostic du paludisme chez l'Homme.....	25
Tableau 2- Les différentes cibles antigéniques en fonction des espèces plasmodiales.....	32
Tableau 3- Prévalence des délétions des gènes <i>pfhrp2</i> et <i>pfhrp3</i> chez <i>Plasmodium falciparum</i> en Amérique du Sud.....	40
Tableau 4- Profil génétique des souches de référence.	51
Tableau 5- Gammes de dilution de <i>Plasmodium falciparum</i> testées.	51
Tableau 6- Matériel biologique analysé.....	51
Tableau 7- Programme d'amplification de l'ADN	54
Tableau 8- Amorces testées pour amplifier le gène <i>pfhrp2</i> et ses gènes adjacents.....	55
Tableau 9- Amorces testées pour amplifier le gène <i>pfhrp3</i> et ses gènes adjacents.....	56
Tableau 10- Code numérique défini par Baker <i>et al.</i> (24) pour l'analyse protéique de Pf-HRP2/3.....	58
Tableau 11- Récapitulatifs des conditions et seuils de sensibilité des PCR utilisées pour étudier les gènes <i>pfhrp2</i> et <i>pfhrp3</i> et leurs gènes adjacents.	60
Tableau 12- Résultats des 48 isolats passés avec les quatre PCR retenues pour étudier les gènes <i>pfhrp2</i> et <i>pfhrp3</i> en fonction du Ct de la PCR temps réel.....	61
Tableau 13- Résultats sur le plateau des Guyanes.	63
Tableau 14- Description des parasites délétés au niveau des gènes <i>pfhrp2</i> et/ou <i>pfhrp3</i>	65
Tableau 15- Représentation des motifs retrouvés dans la protéine Pf-HRP2.	68

INTRODUCTION

Le paludisme est l'infection parasitaire la plus répandue dans le monde. Elle est due à un protozoaire, du genre *Plasmodium*, transmis par un moustique du genre *Anopheles* et dont l'issue clinique peut être fatale.

Près de 3,2 milliards de personnes dans 91 pays et territoires (soit environ la moitié de la population mondiale) sont exposées au risque d'infection par cette maladie. En 2016, 216 millions IC₉₅ [196 – 263] et 445 000 décès ont été rapportés dans le monde en lien avec cette maladie. L'Afrique sub-saharienne était la région du monde qui concentrait le plus de cas de paludisme (90%), loin devant l'Asie du Sud-est (7%) et la région de la Méditerranée orientale (2%)(1).

Dans la région des Amériques (Figure 1), l'incidence du paludisme a diminué entre 2010 et 2016. En 2016, le paludisme restait endémique dans 18 pays, avec 562 800 cas confirmés ayant causés 110 décès. *Plasmodium vivax* était responsable de 69% des cas de paludisme dans cette zone alors que *Plasmodium falciparum* l'était pour 30% d'entre eux. (1). Les cas à *P. malariae* y étaient très rares et ceux à *P. ovale* et *P. knowlesi* absents.

La sous-région amazonienne supporte le plus lourd fardeau du paludisme dans les Amériques. Sur une superficie de plus de 5,5 millions de kilomètres carrés, la forêt amazonienne englobe neuf pays dont la Bolivie, le Brésil, la Colombie, l'Équateur, la Guyane, le Guyana, le Pérou, le Suriname et le Venezuela. A eux seuls, ces pays ont déclaré 92,5% de tous les cas dans les Amériques en 2014. Le paludisme reste une menace pour ceux qui vivent et travaillent dans la forêt tropicale, et pour lesquels le traitement n'est pas facilement accessible (2).

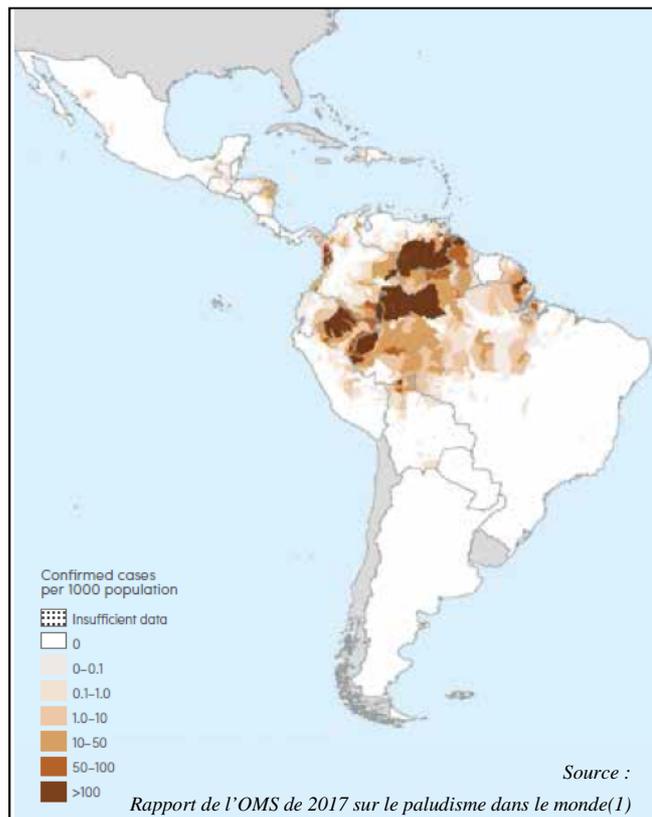


Figure 1- Carte des cas confirmés de paludisme pour 1000 habitants en 2016 dans la région des Amériques.

1 BIOLOGIE DU PALUDISME

1.1. Le parasite

Les parasites responsables du paludisme sont issus de l'embranchement des *Apicomplexa*. Ces parasites intracellulaires sont des protozoaires de la classe des sporozoaires coccidiomorphes (unicellulaires), de la famille des *Plasmodiidae* et du genre *Plasmodium*. Seules cinq espèces sont connues pour être pathogènes chez l'Homme. *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* sont les espèces les plus répandues (Figure 2) mais des infections humaines peuvent aussi être causées par *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, et plus exceptionnellement par *Plasmodium knowlesi*. Cette dernière espèce ne se trouve qu'en Asie du Sud-est chez l'Homme et infecte principalement les primates non humains (3).

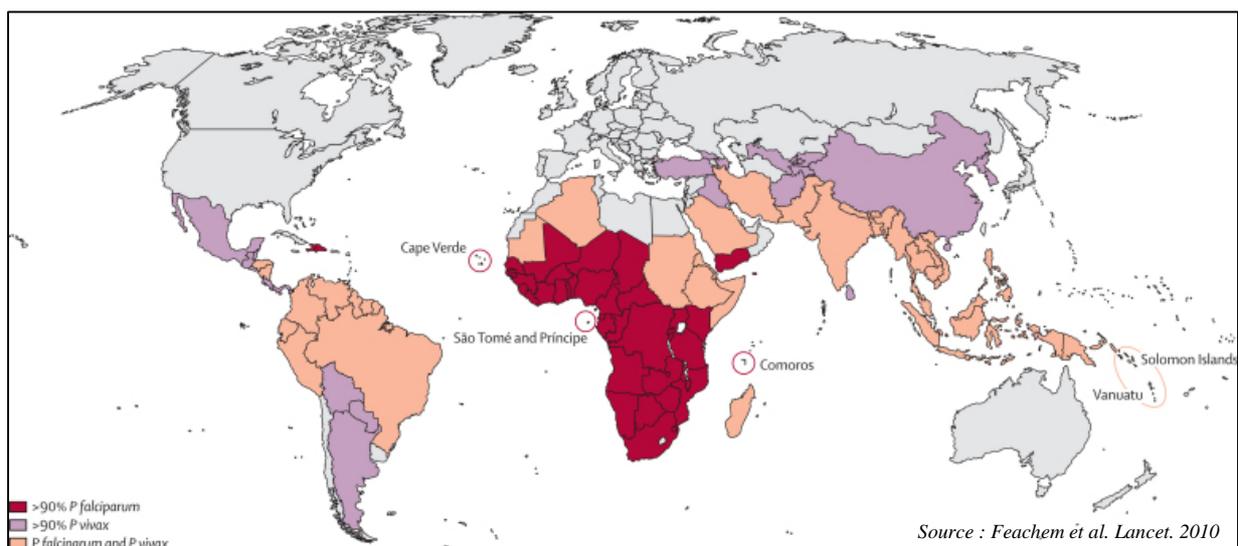


Figure 2- Espèces majoritairement responsables de paludisme selon les pays.

1.2. Le moustique : vecteur du paludisme

Le paludisme humain est transmis exclusivement par des moustiques du genre *Anopheles*. L'anophèle prélève le parasite du genre *Plasmodium* (plasmodies) sous forme de gamétocytes lors de son repas de sang sur une personne infectée. Dans le moustique, le parasite se multiplie et passe dans son estomac, puis dans ses glandes salivaires permettant sa transmission sous forme de sporozoïtes à une autre personne lors du prochain repas. Le genre *Anopheles* appartient à l'ordre des Diptères, à la famille des *Culicidae* et à la sous-famille des

Anophelinae (anophèles). Le genre *Anopheles* regroupe 465 espèces, 70 d'entre elles ont la capacité de transmettre les parasites agents du paludisme à l'Homme. On considère aujourd'hui que 41 espèces vectrices sont dominantes dans le monde (4).

En Amérique du Sud, les neuf espèces vectrices dominantes sont *Anopheles darlingi*, *An. freebomi*, *An. pseudopunctipennis*, *An. quadrimaculatus*, *An. albimanus*, *An. albitarsis*, *An. aquasalis*, *An. marajoara* et *An. nuneztovari* (5).

Anophele darlingi est largement distribué géographiquement sur tout le continent sud-américain. Les gîtes larvaires, ombragés, sont retrouvés dans les masses d'eaux claires naturelles (lagunes, lacs, rivières) et associées à de la végétation (ex : lac post orpaillage revégétalisé). Les femelles moustiques évoluent plutôt dans les zones rurales et forestières et ont recours à des repas de sang principalement sur l'Homme (anthropophile) du crépuscule à l'aube. Leur comportement est variable avec une tendance plus fréquente à l'exophagie (se nourrit à l'extérieur des habitations humaines) et l'exophilie (se repose à l'extérieur des habitations) (6).

Sur le plateau des Guyanes, les deux vecteurs majoritaires sont *Anopheles darlingi* présent le long des cours d'eau principalement et *An. aquasalis* présent dans les eaux saumâtres des plaines côtières. Ils peuvent être tous deux porteurs de *P. falciparum* même si d'autres espèces ont également été signalées comme impliquées dans la transmission(4). Par exemple, d'autres espèces infectées par *P. falciparum* ont été décrites, *Anophele nuneztovari* ou encore *An. intermedius* et *An. oswaldoi* en Guyane et *An. braziliensis* et *An. albitarsis* au Venezuela(7). Ces espèces pourraient donc aussi transmettre le paludisme dans certains environnements spécifiques dont les conditions favorables à leur développement et à la transmission restent à définir (8).

1.3. Biologie du parasite chez le moustique vecteur (9,10)

Chez le vecteur, le cycle sporogonique débute par l'ingestion de gamétocytes mâles et femelles matures qui circulent dans le sang périphérique de l'hôte humain lors du repas sanguin d'un anophèle femelle (Figure 3). Dans son système digestif aura lieu une reproduction sexuée des parasites avec recombinaison méiotique. Si les deux gamétocytes ayant fusionné sont issus de clones différents de parasites (en cas de poly-parasitisme chez l'individu infectant pour le moustique), ceci va générer de la diversité allélique (polymorphisme génétique) par recombinaison génétique. Au niveau de la paroi intestinale,

les gamétocytes fusionnés (zygotes diploïdes) vont se différencier en ookynète puis en oocyste qui contiendra plusieurs milliers de sporozoïtes haploïdes à maturité. Les sporozoïtes ainsi générés lors de cette phase dite « sporogonique » perforent la capsule de l'oocyste et la lame basale et sont libérés dans l'hémolymphe puis ils migrent vers les glandes salivaires, où ils seront inoculés lors d'un prochain repas sanguin. Les sporozoïtes restent infectants dans les glandes salivaires pendant toute la durée de vie du moustique.

1.4. Biologie du parasite chez l'Homme (9,10)

L'infection a lieu lors d'un repas sanguin par un anophèle femelle infectant, c'est-à-dire contenant des parasites présents sous forme de sporozoïtes dans ses glandes salivaires. Ces formes parasitaires infectieuses sont alors injectées avec la salive dans la circulation sanguine. Ils gagnent le foie via la circulation générale où a lieu une première phase de multiplication par reproduction asexuée dans les hépatocytes, dite « schizogonie pré-érythrocytaire » ou « cycle extra-érythrocytaire » : transformation en schizonte pré-érythrocytaire (« corps bleus ») (Figure 3). Cette schizogonie peut être retardée dans certains hépatocytes où les parasites restent en attente (hypnozoïtes) entre un et 18 mois pour les espèces *P. vivax* et *P. ovale*. Au bout de 5 à 8 jours, l'éclatement des schizontes adultes libère des dizaines de milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine. Ils vont ensuite envahir les globules rouges et conduire à la formation de trophozoïtes (forme en anneau). Ces trophozoïtes évoluent en schizontes par reproduction asexuée lors de la «schizogonie érythrocytaire » ou « cycle intra-érythrocytaire ». La rupture des hématies parasitées libère ensuite des dizaines de milliers de nouveaux mérozoïtes dans la circulation sanguine qui vont parasiter d'autres globules rouges lors d'un nouveau cycle érythrocytaire. Le développement de tous les parasites est synchrone chez un même individu et la libération concomitante des mérozoïtes est à l'origine du pic fébrile. La durée du cycle érythrocytaire varie en fonction des espèces plasmodiales et détermine l'intervalle entre chaque pic fébrile. Celui-ci est de 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* (fièvre tierce), 72 heures pour *P. malariae* (fièvre quarte) et seulement 24 heures pour *P. knowlesi*. Plusieurs cycles se succèdent ainsi pouvant conduire à un très grand nombre d'hématies parasitées. La densité parasitaire est d'ailleurs un critère de gravité de la maladie. Après 9 à 11 jours environ, chez *P. falciparum*, certains parasites érythrocytaires asexués évoluent en gamétocytes mâles et femelles lors de la gamétocytogénèse. Les gamétocytes sont les formes sexuées transmissibles et infectantes pour le moustique. Elles peuvent persister dans la circulation périphérique quelques semaines à plusieurs mois après la

guérison. Même si les humains hébergent des formes sexuées de parasites, la multiplication chez l'Homme, hôte intermédiaire est toujours de type mitotique (asexuée). Ainsi les gamétocytes ne peuvent poursuivre leur évolution que lorsqu'ils sont ingérés par des anophèles, hôtes définitifs, qui assurent la pérennisation des espèces plasmodiales en réalisant le cycle sexué des parasites.

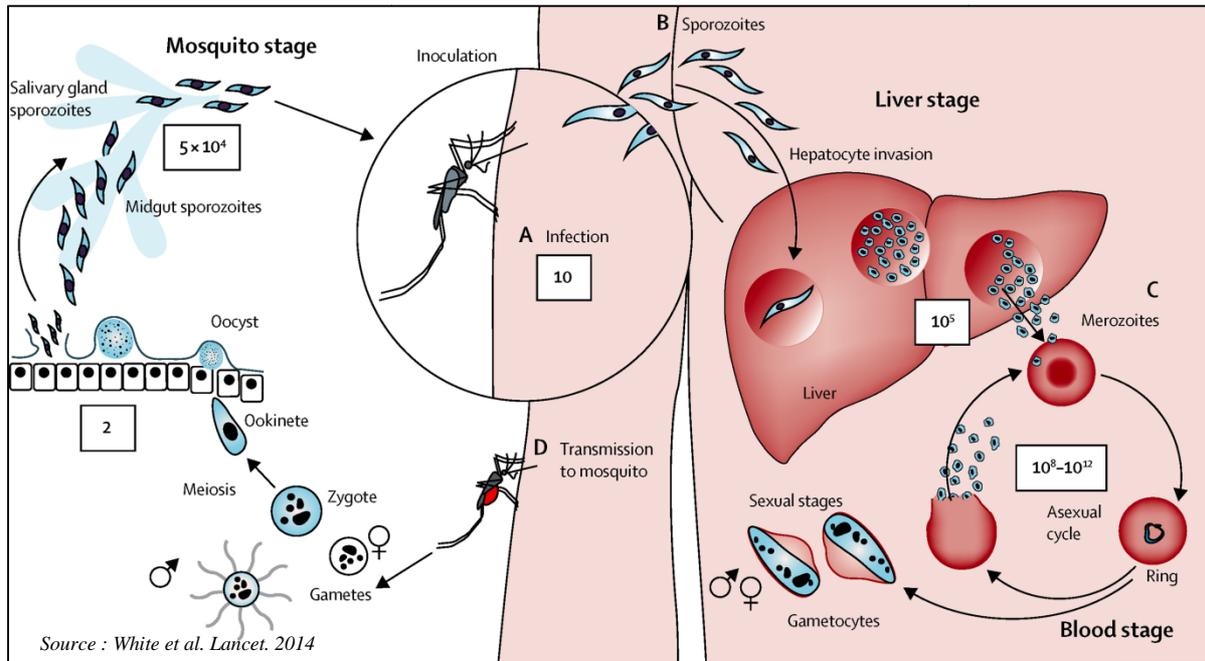


Figure 3- Cycle de développement de *Plasmodium falciparum*.

2. DIAGNOSTIC CLINICO-BIOLOGIQUE DU PALUDISME

Le haut conseil de santé public (HCSP) a rappelé dans un avis rendu le 27 mars 2015 que « le diagnostic clinico-biologique et le traitement du paludisme sont des urgences absolues » (11).

2.1. Diagnostic clinique

Le paludisme est une affection fébrile aiguë. Chez un sujet non prémunisé, les symptômes apparaissent au bout de 7 jours ou plus (généralement 10 à 15 jours) après la piqûre de moustique infectante. Les premiers symptômes – fièvre, maux de tête, frissons et vomissements – peuvent être modérés et difficiles à attribuer au paludisme. S’il n’est pas traité dans les 24 heures, le paludisme à *Plasmodium falciparum* peut évoluer vers une affection sévère parfois mortelle, la forme la plus grave étant le neuropaludisme. Cette atteinte cérébrale se caractérise par des troubles de la conscience, une prostration et des convulsions (12).

Le diagnostic du paludisme est donc une urgence médicale : « en France métropolitaine, toute fièvre chez un patient de retour d’une zone d’endémie palustre est un paludisme jusqu’à preuve du contraire » (13).

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’antipaludiques, facteur favorisant l’apparition de résistance aux traitements, ainsi que le manque de prise en charge des pathologies non palustres à symptomatologie identique en zone endémique (14).

En 2009, les directives de l’OMS soulignent qu’il est important de confirmer rapidement une suspicion de cas de paludisme avant de délivrer un traitement antipaludique adapté en procédant, si possible, à un diagnostic de certitude basé sur la recherche des plasmodies (par microscopie ou test diagnostique rapide) (15). Un diagnostic précis améliore la gestion des maladies fébriles et veille à ce que les médicaments antipaludiques ne soient utilisés que lorsqu’ils sont nécessaires, évitant ainsi les pressions médicamenteuses indirectes inutiles.

2.2. Diagnostic biologique

La haute autorité de santé (HAS) de 2007 a rappeler que le diagnostic biologique du paludisme doit être réalisable 24h/24 et les rendus de résultats transmis en moins de quatre heures après la réception du prélèvement (16). Il existe plusieurs méthodes pour diagnostiquer un accès palustre chez l'Homme. Ces méthodes présentent toutes des avantages et inconvénients résumés dans le tableau suivant (Tableau 1).

Tableau 1- Caractéristiques des différentes méthodes de diagnostic du paludisme chez l'Homme.

	Microscopie (Frottis mince + goutte épaisse)	Test de diagnostic rapide (TDR)	Biologie moléculaire (PCR)
Durée d'exécution et délai de rendu de résultat	30 min à 2 heures => Adaptée au diagnostic d'urgence	10-15min => Adapté au diagnostic d'urgence	Supérieur à 1 heure => Non adaptée au diagnostic d'urgence
Interprétation du résultat	Peu être complexe (essentiellement en cas d'infection mixte ou de la présence de formes âgées ou détériorées par un traitement antipaludique)	Facile	Complexe
Rendu de résultat	Quantitatif: estimation de la densité parasitaire	Qualitatif	Quantitatif/semi-quantitatif par les techniques de qPCR
RESULTATS Spécificité	Diagnostic d'espèce difficile dans certains cas : formes âgées ou formes détériorées par un traitement antipaludique Infection mixte	Résultat faussement positif dans le cas de troubles immunologiques (Facteur rhumatoïde ou anticorps anti-nucléaire) ou infectieux (dengue, hépatite C, toxoplasmose, tuberculose, trypanosomose ou schistosomose)	Performances nettement supérieures pour l'identification d'espèce et dans le cas d'infection mixte mais pour la plupart ne permettent pas de distinguer les formes sexuées des formes asexuées.
Sensibilité	Frottis mince : 100 à 300 parasites/μl Goutte épaisse: 5 à 10 parasites/μl Résultat faussement négatif dans le cas de faible parasitémie ou d'infection mixte	> 100 parasites/μl pour <i>P.falciparum</i> Meilleure performance de Pf-HRP2 > pf-LDH Sensibilité limitée pour les espèces autres que <i>Plasmodium falciparum</i> Résultat faussement négatif dans le cas de faible parasitémie ou d'infection mixte.	Entre 1 et 0,005 parasites/μl
Suivi de traitement	Oui	Seulement possible en cas de recherche des antigènes pLDH (non pour Pf-HRP2)	Non adapté (délai de clairance de l'ADN >30jours après traitement bien conduit)

Tableau 1- Caractéristiques des différentes méthodes de diagnostic du paludisme chez l'Homme (suite)

	Microscopie (Frottis mince + goutte épaisse)	Test de diagnostic rapide (TDR)	Biologie moléculaire (PCR)	
TECHNIQUE	Infrastructure - Matériel	Infrastructure adaptée (laboratoire) Entretien et maintenance des microscopes Alimentation électrique nécessaire	Aucune infrastructure nécessaire Pas d'entretien ni de maintenance Aucune alimentation électrique nécessaire	Infrastructure adaptée (laboratoire) Entretien et maintenance des thermocycleurs Alimentation électrique nécessaire
	« Stabilité » de la technique	Pas de facteur limitant	Vulnérabilité des TDR à des températures élevées et à l'humidité => Condition de transport et de stockage à maîtriser	Conservation des réactifs à maîtriser
	Personnel compétent et formation exigée	Qualification des microscopistes et formation nécessaire (surtout en zone non endémique)	Exécution facile et formation rapide	Qualification des techniciens et formation nécessaire
	Standardisation de la technique	Oui (Protocole de coloration – lecture de frottis mince et goutte épaisse : manuel microscopiste OMS) mais difficile (opérateur dépendant)	Oui - Programme d'évaluation des performances des TDR (FIND + OMS)	Non (techniques diverses et variées)
	Coût	Acceptable	Limité	Elevé (thermocycleurs- réactifs)
CONCLUSIONS	Technique de référence Association d'une technique sensible, la goutte épaisse et d'une technique permettant de faire le diagnostic d'espèce et estimer la parasitémie, le frottis mince. Zone d'endémie palustre: autres parasitoses visibles au frottis mince: babésiose, trypanosomose, microfilaire.	Permet de diagnostiquer un accès palustre dans les zones reculées faiblement ou non équipées Permet de limiter les traitements antipaludiques aux accès palustres documentés.	Valeur prédictive négative élevée, du fait de sa bonne détectabilité : résultat négatif permet d'écarter un accès palustre évolutif au moment du prélèvement Projet de recherche – projet épidémiologique (porteur asymptomatique)	

2.2.1.1. Examen microscopique

Le diagnostic microscopique est considéré comme la technique de référence. L’OMS le maintient comme technique de référence dans les zones où sa réalisation à un niveau de qualité suffisant est possible. 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. Le sang est recueilli sur un tube avec anticoagulant type EDTA ou ACD (pas d’héparine). Il existe deux techniques différentes et complémentaires pour observer les parasites : le frottis mince et la goutte épaisse (16).

2.2.1.1.1. Le frottis mince

Le frottis mince est effectué en étalant quelques microlitres de sang sur une lame de verre afin d’obtenir une seule couche cellulaire. Après séchage, la lame est colorée avec la méthode May-Grünwald- Giemsa (MGG) ou d’abord fixée au méthanol puis colorée au Giemsa. Les parasites, colorés en rouge (noyau) et en bleu (cytoplasme), sont observables au microscope et retrouvés à l’intérieur des hématies.

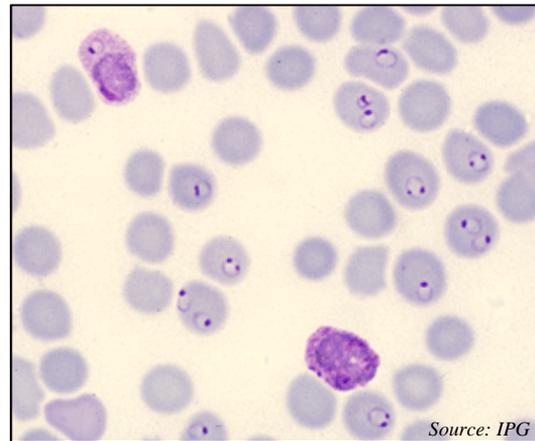


Figure 4- Trophozoïtes de *P. falciparum* lors de l’observation d’un frottis au microscope à immersion (Coloration MGG).
Source: IPG

Cette méthode est la plus adaptée pour l’identification du stade et de l’espèce parasitaire en cause. Le seuil de détection est compris entre 100 et 300 parasites/ μ l selon le niveau d’expertise du lecteur. Selon les préconisations, la lecture avec huile à immersion doit être effectuée pendant au minimum 20 minutes sur 100 à 200 champs et poursuivie jusqu’à 30 minutes avant de rendre un résultat négatif. Cette lecture permet de déterminer la parasitémie. La prise d’antipaludique(s) modifie la morphologie parasitaire et peut être responsable d’erreur de diagnostic, préjudiciable car les mesures thérapeutiques prises pourraient s’avérer insuffisantes (16).

2.2.1.1.1. La goutte épaisse

Il s'agit d'une technique manuelle de concentration sans étalement qui utilise un volume de sang deux fois plus élevé que le frottis ce qui permet d'augmenter la quantité de sang examinée par un facteur 20 ou 30. Ceci améliore ainsi la sensibilité analytique de l'examen (seuil d'environ 5 à 10 parasites/ μ l après l'observation de 100 champs microscopiques avec 15 à 20 leucocytes par champs) (17).

Cette technique est plus longue et délicate que le frottis : il faut d'abord défibriner le sang (en y appliquant des mouvements circulaires), le sécher puis le colorer au Giemsa (deshémoglobination).

L'aspect des parasites ne permet pas d'identifier facilement l'espèce. Le comptage des parasites se fait en prenant comme référence les cellules leucocytaires et comme unité de mesure le nombre de parasites/ μ l. Cent champs microscopiques sont observés au minimum avant de rendre un résultat négatif (16).

Dans les zones à faibles ressources économiques, le diagnostic microscopique est difficile à maintenir à un haut niveau de performances. Il est alors peu sensible et peu spécifique dû au manque de formation des manipulateurs, principalement dans les cas de faibles parasitémies ou d'infections mixtes. Par ailleurs, le maintien des microscopes en état de fonctionnement optimal est compliqué (18). Enfin, *P. falciparum* peut être séquestré dans les capillaires sanguins et donc par intermittence absent du sang périphérique. Dans ce cas, il peut être difficilement détectable en microscopie.

2.2.1.2. Diagnostic par biologie moléculaire

Les techniques d'amplification génique, dont la sensibilité est plusieurs fois supérieure à la microscopie et aux tests de diagnostic rapides (TDR), sont d'usage de plus en plus courant dans le paludisme d'importation et dans des études nécessitant un dépistage actif des patients porteurs de parasites (19).

La première description d'une technique de biologie moléculaire dans le paludisme remonte à 1993 (20). Les techniques de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) se sont ensuite diversifiées : classique ou en temps réel, multiplex ou avec différentes sondes d'hybridation. On dispose aujourd'hui d'un nouveau type de test moléculaire basé sur la technique

d'amplification isotherme induite par boucle (LAMP) qui nécessite un matériel plus simple et demande moins de temps qu'une PCR conventionnelle (19).

Sur le plan de la sensibilité, la PCR permet de gagner 1 à 3 Log₁₀ par rapport à la goutte épaisse, les seuils de sensibilité annoncés pouvant aller de 1 à 0,005 parasites / µl pour la détection de *P. falciparum*. Sur le plan de la spécificité, la plupart des PCR ont des performances supérieures aux autres techniques pour l'identification d'espèce, surtout utile pour distinguer les espèces autres que *P. falciparum* et dans le cas d'infections mixtes. Cependant elle ne distingue généralement pas les formes asexuées des formes sexuées. L'apport de la PCR notamment LAMP tient dans sa valeur prédictive négative élevée qui permet par un résultat négatif d'écarter un accès palustre évolutif et de limiter largement le temps passé à la lecture des lames négatives notamment comme par exemple en zone d'endémie lors d'une épidémie d'arboviroses ou hors zones d'endémie quand les cas sont rares. Les délais d'exécution actuels de la plupart des PCR hormis pour la technique LAMP ne sont pas compatibles avec le diagnostic d'urgence. De plus, ces techniques souffrent d'une absence de standardisation (13).

2.2.1.3. Tests immunochromatographiques dits « de diagnostic rapide » (TDR).

On les décrit comme des dispositifs diagnostiques de détection d'antigènes *in vitro* par immunochromatographie avec migration latérale. Ils appartiennent à la classe des dispositifs médicaux reconnus par les autorités de réglementation pharmaceutique du monde entier.

2.2.1.3.1. Anatomie du test

Les TDR peuvent se présenter sous différentes formes : une cassette (Figure 5), une bandelette réactive à plonger dans un tube, un hybride ou une carte.

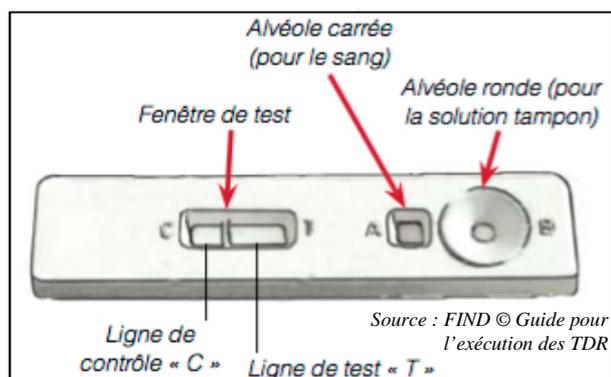


Figure 5- Représentation schématique d'un TDR en cassette.

Ils sont composés d'une membrane de nitrocellulose sur laquelle on retrouve (Figure 6a et Figure 5) :

- ❖ Une fenêtre de test ou zone de lecture: la nitrocellulose à cet endroit contient des « anticorps de capture » (habituellement des immunoglobulines M ou G monoclonales d'origine animale). Ils sont de deux types :
 - Les anticorps spécifiques de l'antigène cible du TDR qui constituent la bande test.
 - Les anticorps ciblant les anticorps marqués par un colorant (anticorps marqués) qui constituent la bande témoin/contrôle.
- ❖ Une zone de dépôt pour le sang : sang d'origine capillaire prélevé au bout du doigt du patient, ou sang veineux.
- ❖ Une zone de dépôt pour la solution tampon : à ce niveau se trouve les « anticorps signaux », anticorps marqués par un colorant et libres qui se fixent sur l'antigène plasmodial recherché par le TDR formant ainsi un complexe anticorps-antigène.

Dans certains tests, les agents permettant la lyse des globules rouges peuvent également être présents au niveau de la zone de dépôt (21).

Une solution tampon accompagne le test. Elle peut contenir les agents de lyse et un tampon entraînant la migration des anticorps libres ou du complexe anticorps-antigène jusqu'à la zone test sur laquelle sont fixés des anticorps de capture.

2.2.1.3.2. Principe des TDR

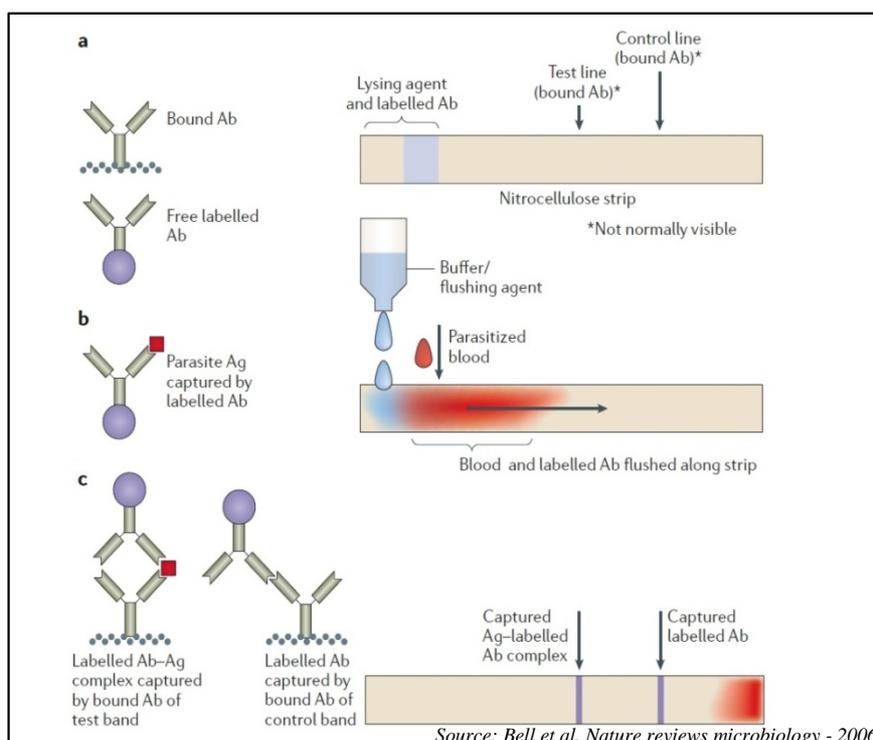


Figure 6- Principe d'un test immunochromatographique.

Phase 1 : Hémolyse et reconnaissance de l'antigène par l'anticorps marqué (Figure 6b)

Une fois le sang transféré dans le puits d'échantillon, la première étape du test consiste à mélanger le sang du patient avec un agent lysant dans le même puits ou dans un puits différent (tampon). La rupture des hématies qui en résulte libère davantage la protéine plasmodiale recherchée. L'anticorps marqué, présent dans le puits ou sur la bandelette peut alors se fixer sur l'antigène cible et former un complexe antigène-anticorps.

Phase 2: Migration du complexe antigène-anticorps et de l'excès d'anticorps marqué libre le long de la bandelette de nitrocellulose (Figure 6b)

Le sang et le tampon déposés sur la bandelette ou dans le puits se mélangent avec l'anticorps marqué et sont entraînés le long de la bandelette jusqu'aux lignes d'anticorps fixés.

Phase 3. Fixation aux lignes test et témoin (Figure 6c)

Si l'antigène est présent, le complexe anticorps-antigène marqué est piégé sur la ligne test. Le reste des anticorps marqués est piégé sur la ligne témoin. Si suffisamment d'anticorps marqués s'accumulent, le marqueur coloré devient visible à l'œil nu et forme une mince ligne. La ligne contrôle est un témoin de la bonne migration des protéines plasmodiales le long de la membrane et permet également d'attester de la bonne conservation du TDR.

2.2.1.3.3. Les différents types de TDR

Depuis leur développement dans le début des années 2000, le nombre de kit commerciaux visant à diagnostiquer le paludisme n'a cessé de croître et atteint aujourd'hui plusieurs dizaines.

Ces kits diffèrent de par : i) les antigènes ciblés, ii) le nombre d'antigènes recherchés, et iii) les industriels qui les commercialisent et les ont mis au point.

Les antigènes ciblés par les TDR paludisme actuellement sur le marché sont les suivants :

- la protéine-2 riche en histidine (HRP2) ;
- la lactate déshydrogénase (LDH) ;
- l'aldolase.

Ces protéines synthétisées par les plasmodies sont identifiées à l'aide d'anticorps de capture qui ciblent des antigènes communs à plusieurs espèces plasmodiales comme l'aldolase ou la pan-pLDH permettant d'écarter ou de confirmer le diagnostic d'accès palustre sans préciser l'espèce (bande dite *Pan*, aspécifique) ou des antigènes spécifiques d'une seule espèce comme par exemple Pf-HRP2 signant un accès à *P. falciparum* ou Pv-pLDH un accès à *P. vivax*. (Tableau 2).

Tableau 2- Les différentes cibles antigéniques en fonction des espèces plasmodiales.

Espèces plasmodiales	Pf-HRP2	pLDH			Aldolase
		Pf-pLDH	Pan-pLDH	Pvom-pLDH	
<i>P. falciparum</i>	X	X	X		X
<i>P. vivax</i>			X	X	X
<i>P. malariae</i>			X	X	X
<i>P. ovale</i>			X	X	X
<i>P. knowlesi</i>			X		X

HRP2: protéine 2 riche en histidine; pLDH: lactate-déshydrogénase plasmodiale; Pf: *Plasmodium falciparum*; pan : ensemble des espèces de *Plasmodium*; Pvom: Antigène spécifique de *Plasmodium vivax, ovale* et *malariae*; Pv: *Plasmodium vivax*.

Les différents types de TDR disponibles sur le marché peuvent être :

- Simples, à deux bandes, une contrôle et une ciblant un antigène,
- Combinés, à plusieurs bandes,
 - o A trois bandes (Figure 7): une bande contrôle, une bande spécifique de Pf, et une autre bande de spécificité variable. Pour la détection de *P. falciparum* les anticorps anti-PfHRP2 ou Pf-pLDH peuvent être utilisés. A cette bande, peut être associée une bande non spécifique d'espèces (bande Pan = anti-pan-pLDH ou anti-aldolase), ou une spécifique d'espèces (ex : anti-pLDH spécifique d'espèces).
 - o A quatre bandes où l'on peut retrouver l'association des trois types d'anticorps : i) bande contrôle, ii) spécifique de *P. falciparum* (bande Pf), iii) non spécifique d'espèce (bande Pan) et, iv) spécifique d'espèce non *falciparum*.

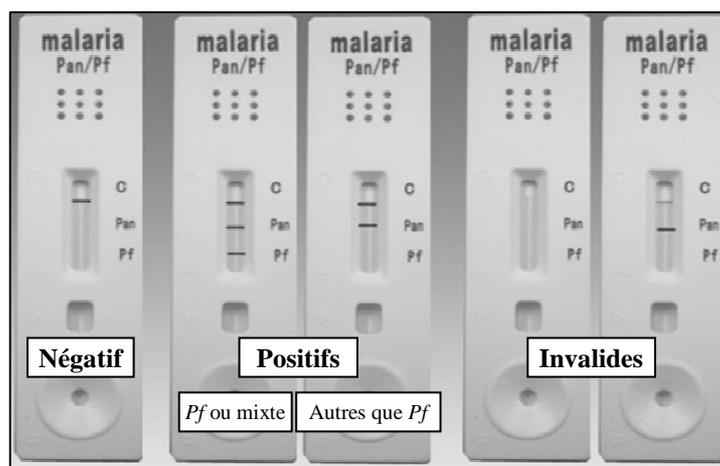


Figure 7- Exemple d'interprétation des TDR.

Des critères de choix du test adéquat ont été définis par l'OMS (21). Pour choisir un TDR du paludisme approprié avant son déploiement, il faut d'abord définir le cadre d'utilisation du test en répondant à trois questions : quoi, où et qui ?

1) Quoi ? Quelles espèces parasitaires sont présentes et donc quels antigènes devront être ciblés ?

- Infection à *P. falciparum* uniquement ou mixte (*Pf* et non-*Pf*)
- Infection à *Pf* et non *Pf* (espèce unique)
- Infection à *P. vivax* uniquement
- Présence confirmée de l'antigène ciblé chez les parasites de la zone

Les pays ont ainsi été classés en trois zones en fonction de l'épidémiologie du paludisme auxquels ils font face (21) :

- La zone 1, dans laquelle *P. falciparum* est prédominant et où les espèces non *falciparum* sont à l'origine d'infections mixtes avec *P. falciparum* (cette zone recouvre la plupart des régions de l'Afrique subsaharienne ainsi que les basses terres de la Papouasie-Nouvelle-Guinée). Il est recommandé dans ces zones d'utiliser des TDR qui ne détectent que *P. falciparum*.

- La zone 2, dans laquelle les infections par *P. falciparum* et non *falciparum* se manifestent fréquemment sous la forme d'infections monospécifiques (cette zone recouvre la plupart des régions d'endémie de l'Asie et des Amériques, y compris le plateau des Guyanes ainsi que certaines zones isolées de l'Afrique, notamment les hauts plateaux éthiopiens). Il est recommandé dans ces zones d'utiliser des TDR combinés dépistant toutes les espèces et distinguant les infections à *P. falciparum* des autres mais pas des TDR qui ne détectent que *P. falciparum*, car cela signifierait que les sujets négatifs sont traités par la chloroquine pour une éventuelle infection à *P. vivax* au lieu d'être reconnus comme n'étant pas des cas de paludisme.

- La zone 3, dans laquelle ne se produisent que des infections par des espèces non *falciparum* (principalement *P. vivax* dans certaines régions de l'Asie orientale, de l'Asie centrale et d'Amérique du Sud et ailleurs, dans des zones de hauts plateaux). Il est recommandé dans ces zones d'utiliser des TDR qui ne détectent que les espèces présentes.

2) Où ? - Expositions à de hautes températures (exemple : milieu tropical, dans ce cas les TDR basés sur Pf-HRP2 sont les plus adaptés car ils sont thermostables) ou environnement à température contrôlée y compris pendant le transport et le stockage.

3) Qui ? Personnel mettant en œuvre les TDR : personnel de laboratoire ou agents de santé hors laboratoire.

Compte tenu du nombre important et croissant de kits commerciaux développés, l'OMS a mis en place un système d'évaluation standardisé des performances des kits de manière à aider les décideurs de santé publique à choisir le meilleur test en fonction de ses performances et de l'épidémiologie du paludisme dans la zone.

En pratique, pour évaluer et comparer l'efficacité des différents tests de diagnostic rapide du paludisme disponibles sur le marché l'OMS intervient par le biais de son programme scientifique collaboratif pour la recherche et la formation concernant les maladies tropicales (aussi appelé TDR) et la Fondation pour l'innovation en matière de nouveaux produits diagnostiques (FIND). Ainsi un programme d'évaluation des TDR a été lancé en 2008. Les résultats des évaluations constituent désormais la base des critères d'achat des kits et de leur éligibilité ou pas à des financements majeurs de lutte contre le paludisme (Fond Mondial de lutte contre le sida, la tuberculose et le paludisme, les gouvernements nationaux et les organisations non gouvernementales...). L'évaluation est destinée à fournir des données comparatives sur les performances des lots de production de chaque produit soumis. Seuls sont recommandés les produits réunissant les quatre critères de performances suivant : i) un score de détection sur le panel de *P. falciparum* (200 plasmodies/ μ l) supérieur à 75% ii) idem pour *P. vivax*, iii) un taux de faux positif inférieur à 10% et, iv) un taux de tests non valables inférieur à 5%. D'autres aspects comme la facilité d'emploi et la stabilité thermique sont également évalués.

Pour faire le choix du bon kit en prenant en compte tous ces aspects, les programmes nationaux ont à leur disposition un guide interactif mis en ligne par l'organisation FIND sur son site internet :

[\(http://www.finddiagnostics.org/programs/malaria/find_activities/product_testing/malaria-rdt-product-testing/\)](http://www.finddiagnostics.org/programs/malaria/find_activities/product_testing/malaria-rdt-product-testing/).

Ces évaluations régulières ont également poussé les industriels à développer des tests de plus en plus robustes et sensibles. Elles sont le moteur des progrès généraux dans la qualité et la fiabilité de ces derniers. Le dernier programme d'évaluation, série 7 (2015-2016) vient d'être publié (22). En plus des performances déterminées lors des tests, il est important de se référer aux études de terrain menées sur les populations parasitaires locales concernées qui ont permis de définir la sensibilité et la spécificité des kits en situation et de tenir compte de l'expérience d'utilisation acquise dans le pays concerné.

Pour revenir aux protéines plasmodiales ou cibles antigéniques, à savoir la PfHRP2, la pLDH et l'aldolase, elles sont produites au cours du cycle de développement des plasmodies chez l'Hôte humain (Figure 8).

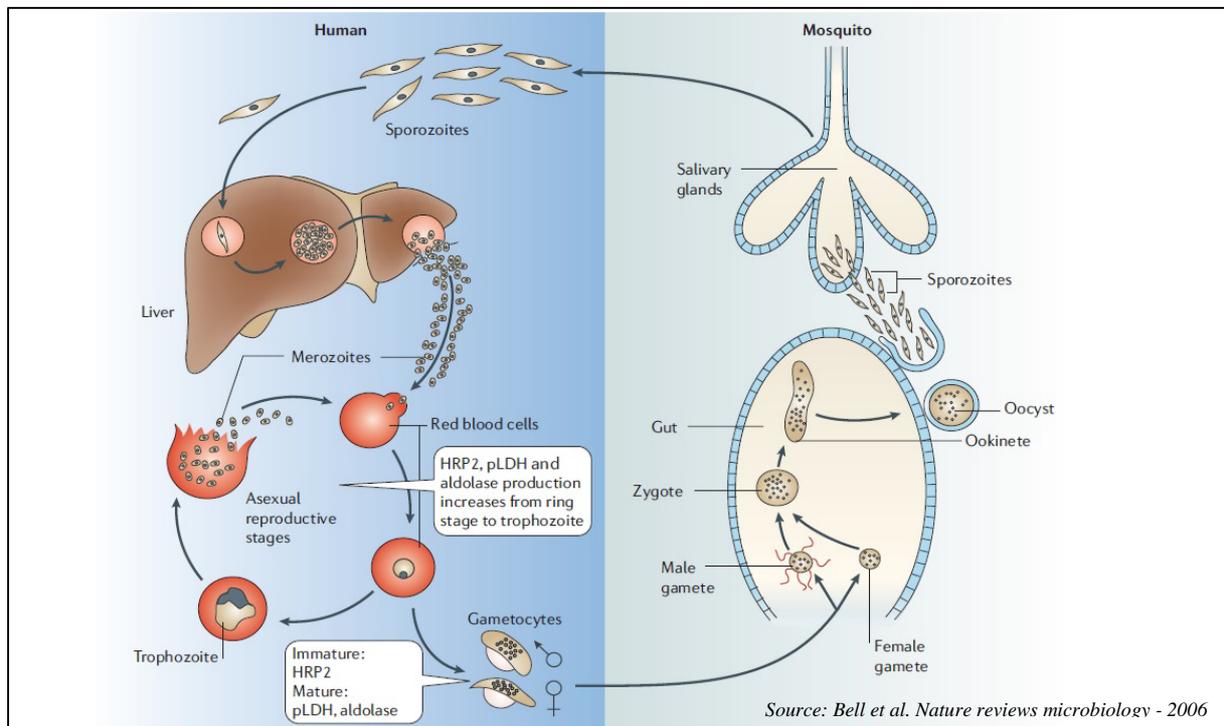


Figure 8- Résumé des stades synthétisant les différentes protéines plasmodiales recherchées par les tests de diagnostic rapide.

- **L'aldolase : une protéine pan-plasmodiales (commune à toutes les espèces de plasmodies)**

L'aldolase est une enzyme clé du cycle du glucose, commune aux cinq espèces de *Plasmodium* contaminant l'Homme. L'aldolase est retrouvée dans les membranes des stades schizontes. Il n'a pas été observé de souches non sécrétrices d'aldolase. Cet antigène commun aux cinq espèces de *Plasmodium* est une cible détectée par certains tests de diagnostic rapide et combinée à la recherche d'un antigène spécifique de *P. falciparum*.

Une des limites de ce type de test mise en évidence par plusieurs études est sa réactivité fréquemment mise en défaut pour détecter *P. ovale* et sa sensibilité modérée dans la détection de *P. malariae* alors que sa capacité à détecter *P. falciparum* et *P. vivax* est bonne (17).

A noter qu'une aldolase spécifique de *P. vivax* (iso-enzyme) est utilisée par quelques fabricants de TDR (16).

▪ **La p-LDH : Protéine lactate déshydrogénase plasmodiale: une protéine pan plasmodiale mais pas que**

La *Plasmodium* lactate déshydrogénase est une enzyme présente chez toutes les plasmodies humaines. Cette enzyme qui est la dernière enzyme impliquée dans le cycle du glucose est synthétisée par les stades érythrocytaires asexués et les gamétocytes matures.

Les isoformes des lactate-déshydrogénases plasmodiales peuvent être différenciées des LDH humaines par leurs épitopes antigéniques ainsi que leurs caractéristiques enzymatiques.

Cela a été démontré pour *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. vivax* qui synthétisent des isoformes de pLDH avec des épitopes propres à chaque espèce et des épitopes communs aux différentes espèces permettant ainsi leur détection par anticorps monoclonaux spécifiques de chaque espèce ou commun.

Les études génétiques ont montré que le gène de la pLDH est constitué de séquences conservées entre les espèces et de séquences variables entre espèces, voire entre sous-espèces: ces variabilités expliquent l'efficacité variable de la détection de la pLDH selon les espèces pour un même anticorps monoclonal.

La pLDH est produite par des parasites viables. Par conséquent sa recherche peut être utilisée pour suivre l'efficacité d'un traitement anti paludique (17).

Il existe des isoformes spécifiques d'espèce(s) plasmodiale(s) :

- la lactate déshydrogénase spécifique de *P. vivax* (pLDH-Pv)
- la lactate déshydrogénase spécifique de *P. falciparum* (pLDH-Pf)
- la lactate déshydrogénase spécifique de *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* (pLDHPvom)

Les limites des tests ciblant ces protéines sont : une diminution de sensibilité avec les faibles parasitémies et des réactions croisées entre pLDH-Pv et *P. knowlesi*.

▪ **Une protéine plasmodiale spécifique : Pf-HRP2 (Protéine-2 Riche en Histidine)**

PfHRP2 est une protéine soluble de 30kDa, stable à la chaleur, synthétisée uniquement par *Plasmodium falciparum* à tous les stades érythrocytaires et par les gamétocytes jeunes. La protéine est libérée lors d'une rupture du schizonte et se trouve donc dans le sang de l'individu infecté (Figure 8). Le rôle exact de cette protéine est inconnu mais elle semble agir comme une hème polymérase qui détoxifie l'hème libre issue de la dégradation de l'hémoglobine de l'hôte en hémozoïne inactive (pigment malarique) dans la vacuole parasitophore (17).

Cette protéine, codée par le gène *pfhrp2* situé dans la région sub-télomérique du chromosome 8 (Figure 9), contient de multiples répétitions de motifs d'acides aminés composés d'histidine

et d'alanine formant des motifs standard tels que: AHHAHHAAD (type 2) et AHHAAD (type 7). Ces motifs induisent une grande variabilité de la protéine et permettent la détection de la protéine par de nombreux anticorps différents (23, 24). Les TDR basés sur Pf-HRP2 ont pour avantages d'avoir une bonne sensibilité et spécificité pour *Plasmodium falciparum* et d'avoir une meilleure stabilité thermique. En 2010 Baker *et al.* décrivent un grand polymorphisme dans la structure du gène *pfhrp2* mais concluent que la diversité protéique associée ne semble pas être une cause majeure de variation de sensibilité des TDR (24).

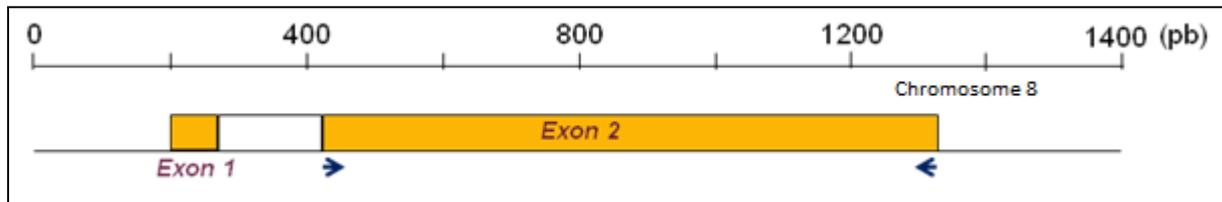


Figure 9– Représentation schématique du gène *pfhrp2*.

De plus, il est décrit une corrélation positive entre la concentration de cette protéine dans le sang, la densité parasitaire et la sévérité clinique (13). Ainsi, Pf-HRP2 pourrait être utilisée comme biomarqueur de la sévérité/gravité d'un accès palustre (25). Cependant elle reste circulante longtemps après la mort/disparition des parasites. Ainsi les TDR basés sur Pf-HRP2 ne peuvent donc pas être utilisés dans le suivi de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques car la protéine persiste jusqu'à 28 jours dans le sang périphérique après l'élimination du parasite (23).

Par ailleurs, ces tests ont plusieurs limites. Il existe des réactions croisées avec la protéine Pf-HRP3, qui a une composition en acides aminés proche de Pf-HRP2 pouvant donc être reconnue par les anticorps anti-Pf-HRP2. En cas de forte parasitémie, l'excès d'antigène peut entraîner un résultat faussement négatif ou faiblement positif, appelé effet prozone. Ce phénomène est dû à la saturation des anticorps fixés sur la membrane, par l'excès d'antigènes libres entraînant un défaut de capture des complexes antigènes - anticorps marqués et donc un défaut de détection (23). Enfin, les programmes d'évaluations et certains auteurs ont décrit une absence totale ou partielle de production de la protéine PfHRP2 par certains isolats de *P. falciparum* due à une délétion du gène *pfhrp2* codant pour cet antigène (26, 27). Ainsi, lors d'un accès palustre à *P. falciparum* impliquant des parasites délétés au niveau du gène *pfhrp2*, le risque est d'étiqueter à tort l'accès à *P. vivax*. Le patient serait alors traité par chloroquine alors que dans certaines zones, des parasites résistants existent (20 à 30% de parasites chloroquino-résistants sur plateau des Guyanes) (28).

Du fait de l'existence de tels parasites à l'échelle mondiale et compte tenu de l'impact en termes de santé publique et de prise en charge, ce problème a retenu l'attention de l'OMS. En effet, pour sa huitième série d'évaluation des TDR, l'OMS a choisi d'ajouter des souches délétées pour le gène *pfhrp2* et de tester parmi les 35 TDR en évaluation, dix spécifiques de *P. falciparum* non basés sur Pf-HRP2 (29). L'OMS recommande aussi une surveillance attentive de la prévalence des parasites délétés en zones d'endémie. Pour ce faire, les procédures standardisant cette surveillance décrivent trois étapes : i) établir une preuve initiale de la présence de parasites délétés, ii) établir une confirmation de la délétion chez les isolats en question, iii) établir la prévalence des parasites délétés dans la zone donnée (27,30,31). La confirmation de la délétion doit se faire au niveau génétique en analysant les deux parties du gène *pfhrp2*, la jonction exon 1-2 et l'exon 2, ainsi que ses gènes adjacents sans plus de précisions sur la partie du gène adjacent à analyser. En analysant ces deux parties du gène ainsi que les gènes adjacents, il est possible de caractériser l'ensemble des délétions de *pfhrp2* et plus particulièrement les points de cassure dans le génome définissant l'extension des régions délétées (27). Les points de cassures se situent préférentiellement dans la partie amont du gène, au niveau de la région subtélomérique du chromosome 8 (Figure 10).

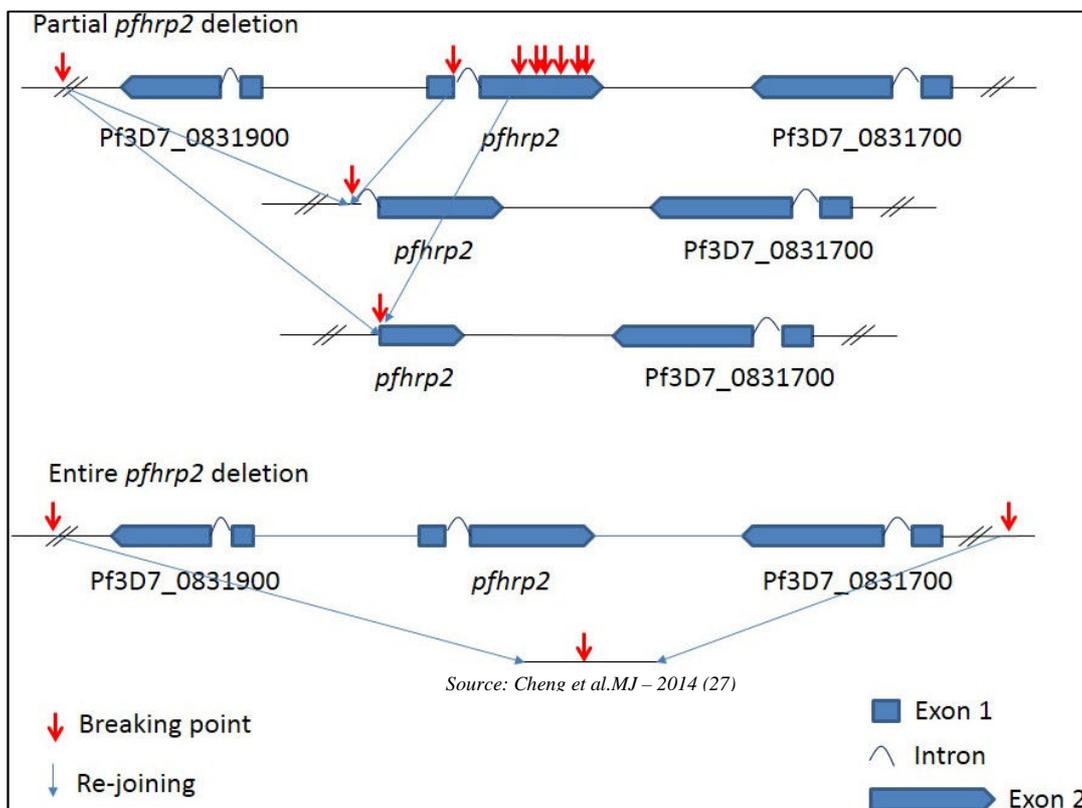


Figure 10- Points de cassures sur le chromosome 8.

Compte tenu de la cross-réactivité de la protéine Pf-HRP3 avec les TDR basés sur Pf-HRP2, du fait de la présence entre autres des motifs 1 et 2 dans les deux protéines, il est également demandé d'étudier la jonction exon 1-2 et l'exon 2 du gène *pfhrp3*, ainsi que ses gènes adjacents. D'autres analyses génétiques sont également requises, au minimum l'amplification de deux gènes présents en monocopie dans le génome de *P. falciparum* pour s'assurer de la qualité de l'ADN analysé et de l'absence de faux négatif de ce fait. La confirmation au niveau protéique de l'absence d'antigène Pf-HRP2, par dosage ELISA ou par une deuxième marque de TDR, est optionnelle (31).

Enfin, les activités d'enquêtes et de surveillance de la prévalence des parasites délétés doivent d'abord cibler les pays où des délétions ont été identifiées, ainsi que les pays frontaliers.

2.2.1.3.4. Epidémiologie des parasites délétés pour les gènes *pfhrp2* et 3

En 2007, dès que les premiers parasites délétés ont été identifiés, le signal d'alerte a été donné. En effet, dans la région de Loreto, au Pérou amazonien, 41% de parasites délétés pour le gène *pfhrp2*, 70% de délétion pour le gène *pfhrp3* et 22% de parasites doubles délétés sur 148 isolats sélectionnés ont été mis en évidence entre 2003 et 2007 (26).

Depuis, plusieurs études ont été conduites en Amérique du Sud de manière à caractériser la zone de circulation de ces parasites délétés (Tableau 3).

Tableau 3- Prévalence des délétions des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* chez *Plasmodium falciparum* en Amérique du Sud.

Pays	Régions	Années	Effectif	<i>Pfhrp2</i>			<i>Pfhrp3</i>			% double délétion	Références
				% délétion	Exon	PCR	% délétion	Exon	PCR		
PEROU	Loreto et Piura	1998-2001	92	21%	Jonction 1-2	Nichée		ND		ND	(32)
	Loreto	2003-2005	96	41%	Jonction 1-2	Nichée		ND		ND	(32)
	Loreto	2003-2007	148	41%	Jonction 1-2 Exon 2 (9 isolats)	Simple Nichée	70%	Jonction 1-2 Exon 2(9 isolats)	Simple Nichée	22%	(26)
	Loreto	2010-2011	74	26%	Jonction 1-2 Exon 2	Simple Nichée	46%	Exon 2	Simple	26%	(33)
COLOMBIE	Cordoba, Valle del Cauca, Narino, Amazonas, Guaviare, Meta	1999-2001	100	18%	Jonction 1-2	Nichée	52%	Jonction 1-2	Nichée	13%	(34)
		2003-2010	253	6%	Jonction 1-2	Nichée	42%	Jonction 1-2	Nichée	6%	(35)
	Antioquia, Choco, Valle del Cauca, Cauca, Narino, Guaviare, Amazonas	2011-2012	112	0%	Jonction 1-2	Nichée	45%	Jonction 1-2	Nichée	0%	(35)
BRESIL	Para	2011-2012	59	0%	Jonction 1-2 Exon 2	Nichée Nichée	51%	Exon 2	Nichée	0%	
	Rondônia	2010-2011	60	3%	Jonction 1-2 Exon 2	Nichée Nichée	18%	Exon 2	Simple	3%	(36)
	Acre	2012	79	32%	Jonction 1-2 Exon 2	Nichée Nichée	38%	Exon 2	Simple	27%	
BOLIVIE	Beni	2010	25	4%	Jonction 1-2 Exon 2	Nichée Nichée	68%	Exon 2	Simple	0%	(36)
HONDURAS	Puerto Lempira	2008-2009	68	0%	Jonction 1-2	Nichée	44%	Jonction 1-2	Nichée	0%	(37)
GUYANE	Totalité	2009-2011	221	0%	Jonction 1-2 Exon 2	Simple Simple	5%	Exon2	Simple	0%	(38)
SURINAME	Para, Brokopondo, Sipaliwini, Marowijne	2009-2011	78	14%	Jonction 1-2	Nichée	4%	Jonction 1-2	Nichée	2,6%	(39)
GUYANA	Barima-Waini, Cuyuni-Mazaruni, Potaro-Siparuni, Essequibo Islands-West Demerara, Upper Demerara-Berbice	2010	97	0%	Jonction 1-2	Nichée	0%	Jonction 1-2	Nichée	0%	(39)

ND : Non déterminé.

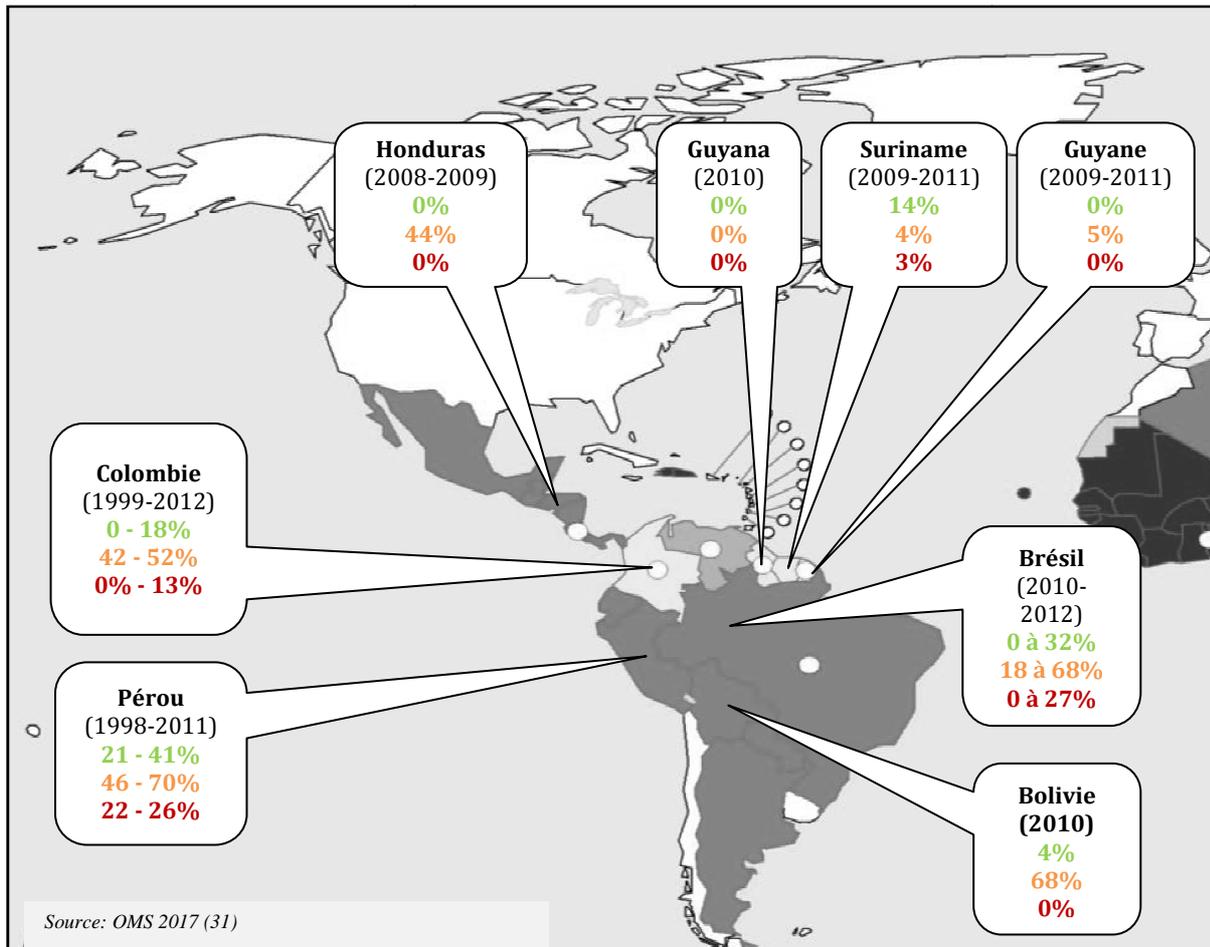


Figure 11- Localisation des parasites délétés pour les gènes *pfhrp2* (en vert) et *pfhrp3* (en orange) et des parasites doubles délétés (en rouge).

En résumé, ces parasites délétés semblent être présents en Amérique du Sud essentiellement au niveau de la région amazonienne ouest, au Pérou, en Colombie et au niveau de l'état brésilien d'Acre (Figure 11). Leur prévalence peut atteindre 41% et semble fluctuer dans le temps. Dans ces régions, un nombre conséquent de parasites doubles délétés (pour les gènes *pfhrp2* et *pfhrp3*) a également été mis en évidence (Tableau 3).

Côté est amazonien incluant le plateau des Guyanes, seul au Suriname des parasites délétés pour le gène *pfhrp2* entre les années 2009 et 2011 ont été observés à la proportion de 14% (n=78). Aucune délétion n'a été observée en Guyane ou au Guyana autour de l'année 2010 (Tableau 3).

Dans le reste du monde, sur le continent asiatique, peu de parasites délétés ont été décrits. Une faible prévalence des délétions *pfhrp2* a été rapportée en Inde (2,4%, n=36/1521) (40) et à la frontière Chine-Birmanie (41).

Sur le continent africain, les premiers parasites délétés pour les gènes *pfhrp2* ont été décrits dans les années 2012-2013 dans l'ouest africain, au Mali et au Sénégal avec une prévalence

d'environ 2% (Figure 12) (42,43). Depuis, des parasites délétés ont été rapportés dans l'est de l'Afrique, avec des prévalences faibles entre 1,6% en Ouganda (n=25/1493) (31) et 1% au Rwanda (n=32/3291) (44). De plus fortes prévalences pouvant aller de 6,4% en République Démocratique du Congo (45) et jusqu'à plus de 9% en Erythrée (46) ont également été décrites. Dernièrement, de nouveaux cas de parasites délétés ont été rapportés au Mozambique, au Kenya ou encore au Bangladesh (31).



Figure 12- Pays d'Afrique où des cas de parasites délétés pour *pfhrp2/3* (en orange) ont été rapportés.

Que ce soit en Amérique du Sud ou en Afrique, il semblerait que ce phénomène d'apparition de parasites délétés soit un phénomène dynamique qui fluctue dans le temps et qui impose une surveillance constante dans les zones où les tests de diagnostic rapide sont utilisés pour diagnostiquer le paludisme. Cette surveillance doit se faire selon le protocole publié par l'OMS afin d'estimer la prévalence des délétions *pfhrp2/3* parmi les échantillons de patients ayant présenté un accès palustre à *P. falciparum* et ayant un TDR faussement négatif. Dans ce guide, l'OMS définit également les effectifs minimums requis lors de cette surveillance (47).

3 EPIDEMIOLOGIE et DIAGNOSTIC DU PALUDISME SUR LE PLATEAU DES GUYANES

Le plateau des Guyanes constitue une région d'Amérique du Sud, bordée sur la côte nord-est par l'océan Atlantique (Figure 13). Il s'agit d'une formation géologique formée au Précambrien il y a entre 2,5 et 1,9 milliard d'années. Elle représente un des plus anciens massifs géologiques toujours visibles sur la planète, composé d'imposants plateaux d'altitude (48).

Le plateau des Guyanes s'étend sur cinq pays, d'ouest en est :

- le Venezuela (états de Bolivar et d'Amazonas), où le plateau est délimité au nord par l'Orénoque ;
- le Guyana, ancienne Guyane britannique ou anglaise ;
- le Suriname, ancienne Guyane néerlandaise ou hollandaise ;
- la Guyane, département français d'outre-mer ;
- le nord du Brésil (états d'Amapa, Roraima et une partie du Para et de l'Amazonas), délimité par l'Amazone.

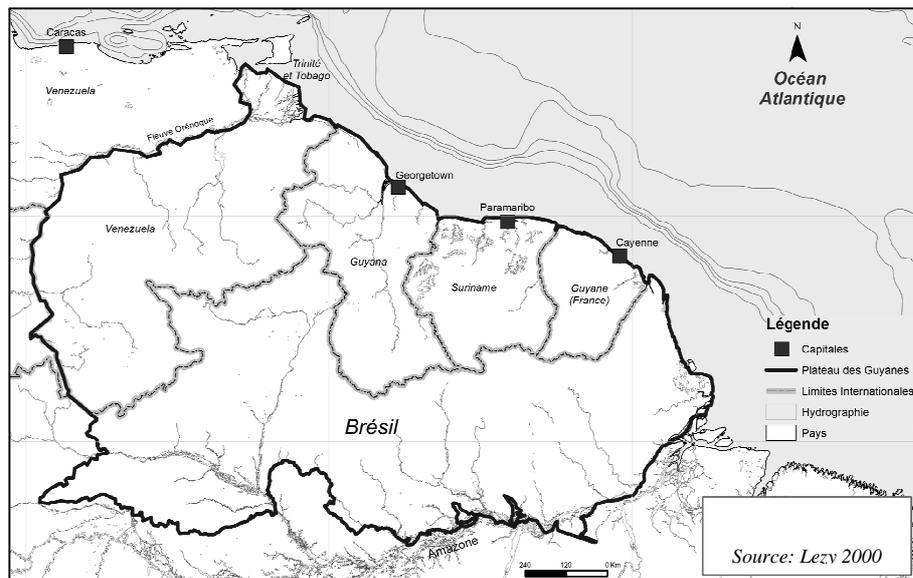


Figure 13- Carte du plateau des Guyanes.

Le plateau des Guyanes, compris dans le monde amazonien, contient le plus grand ensemble de forêt tropicale primaire continu et intact au monde. Il constitue ainsi une zone géographique au fort potentiel écologique dans la lutte contre le réchauffement climatique, du fait de son énorme capacité à capter le dioxyde de carbone. Il contient également près de 15% des réserves d'eau douce du monde, et constitue une zone extrêmement riche pour la biodiversité (flore et faune) et est caractérisé par son endémisme végétal abondant qui a pu évoluer au sein de ce paysage géologique relativement peu affecté par les perturbations

naturelles à grande échelle. Cette région est en outre particulièrement riche en ressources naturelles, parmi lesquelles on note le pétrole, l'or et le diamant, mais aussi l'aluminium, la bauxite, le manganèse, le fer, le cuivre et le nickel (49). Cette richesse a généré une importante exploitation minière dans cette région. La hausse du cours de l'or dans les années 1990 a multiplié par 60 la production annuelle d'or sur le plateau des Guyanes (50). En Guyane, la quantité d'or extraite illégalement chaque année est 5 à 10 fois supérieure à celle produite légalement et ce sont six à dix milles personnes, originaires principalement du Brésil appelés garimpeiros, qui travaillent illégalement sur plus de 600 sites différents (51).

Ces exploitations minières induisent un contexte environnemental propice au développement des Anophèles et à la transmission du paludisme, tout particulièrement du paludisme à *P. falciparum*. Ainsi, sa prévalence sur le plateau est élevée (entre 30 et 45%) comparée à la forte prévalence de *Plasmodium vivax* dans les autres régions sud-américaines (52, 53).

3.1 Epidémiologie et diagnostic en Guyane

Entre 2016 et 2017, le nombre d'accès palustres recensés était en nette augmentation passant de 258 accès palustres en 2016 à 597 en 2017, soit une incidence de 2,3 ‰. La proportion d'accès palustres dus à *P. falciparum* y était respectivement de 28% et 12% (54). La transmission du paludisme en Guyane peut se résumer à deux faciès épidémiologiques.

- des foyers de transmission sporadique et dits « autochtones » dans certains villages situés autour de St Georges de l'Oyapock et le long du Maroni (55),
- une transmission élevée et supposée constante dans certaines zones orpaillées du centre de la Guyane. Ainsi la dernière étude en date en zone orpaillée a inclus entre janvier et juin 2015, 421 orpailleurs, majoritairement des hommes (70,6%), brésiliens (93,8%). La prévalence du portage de plasmodies déterminée par PCR était en moyenne de 22,3% (IC₉₅: [18,3-26,3]), à 84% asymptomatique. Les espèces identifiées étaient principalement *P. falciparum* (47,9%), *P. vivax* (37,2%) et à plus de 10,6% des co-infections *falciparum/vivax* (52). Cette transmission est d'autant plus difficile à contrôler que les populations concernées vivent clandestinement sur le territoire et dans des zones très reculées ayant donc un accès limité aux soins. Ces populations sont par ailleurs très mobiles entre les différents pays du plateau des Guyanes (56).

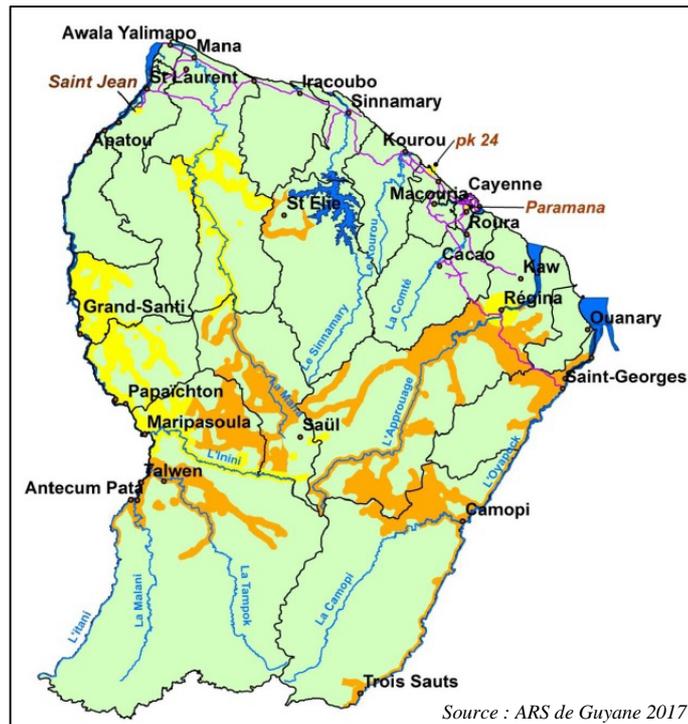


Figure 14- Risque de paludisme en Guyane.

En jaune : risque faible de transmission, chimioprophylaxie recommandée au cas par cas. *En orange* : risque fort de transmission, chimioprophylaxie impérative.

Le plan de contrôle du paludisme en Guyane (2015-2018) mis en place par l'ARS a pour buts de diminuer la morbidité et la mortalité liées au paludisme et d'écarter le risque d'émergence de résistances et d'épidémies par une réduction de l'incidence à moins de 1 cas pour 1000 dans chaque localité de Guyane. Pour ce faire, cinq axes stratégiques ont été envisagés i) renforcer la surveillance épidémiologique et entomologique, ii) renforcer la prévention et la lutte anti vectorielle, iii) soigner et accompagner sur l'ensemble du territoire, iiiii) développer la recherche et les connaissances iiiiii) renforcer la coopération internationale en renforçant la coopération transfrontalière à l'échelle du plateau des Guyanes et en optimisant la remontée des données annuelles à l'OMS (57). Le troisième axe de ce plan de lutte vise à favoriser un diagnostic de qualité dans des délais raisonnables, à donner l'accès à des soins de qualité et à garantir l'accès à une prise en charge adaptée en tous points du territoire. En effet, la Guyane est un vaste territoire présentant, dans certaines zones, une faible densité de population et des infrastructures de transport limitées. Ainsi, des difficultés et inégalités d'accès aux soins existent.

Concernant le paludisme, les structures de diagnostic sont les suivantes :

- Laboratoires de biologie médicale privés ou hospitaliers public sur le littoral. Dans ces laboratoires, de ville ou hospitaliers, la microscopie devrait rester la méthode de

référence même si les techniques de biologie moléculaire commencent à faire leur apparition tout comme les TDR en complément diagnostique.

- Centres délocalisés de prévention et de soins (CDPS). Ces centres sont rattachés à l'Hôpital de Cayenne et permettent un maillage sanitaire de tout le territoire (Figure 16). Ils sont ainsi situés essentiellement dans l'intérieur ou sur le littoral dans les zones qui le nécessitent. Ils sont au minimum dotés d'une infirmière et parfois de médecins généralistes et d'aides-soignants. Sur les 17 centres que compte la Guyane, 9 sont accessibles par la route, les 9 autres sont uniquement accessibles par avion et/ou pirogue (3 sont uniquement accessibles par pirogue).

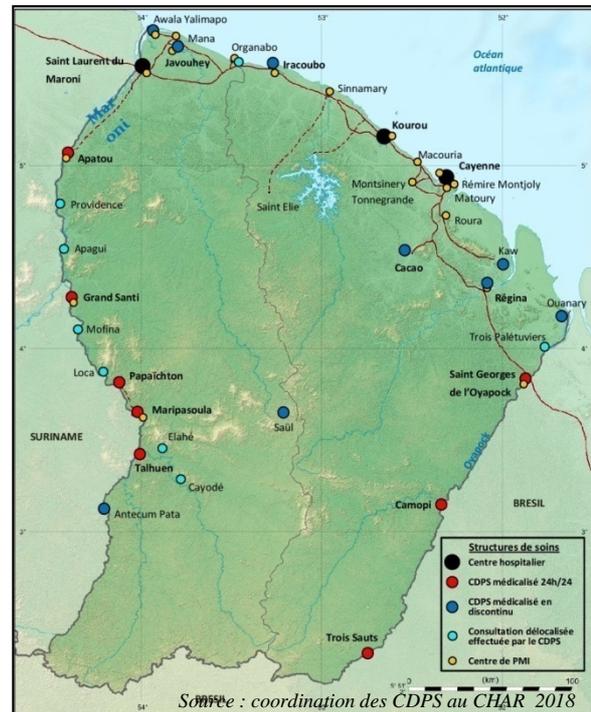


Figure 15- Répartition des centres délocalisés de prévention et de soins en Guyane.

Dans les CDPS, les TDR du paludisme sont les outils diagnostiques les plus adaptés. Ils permettent un diagnostic de qualité dans un délai raisonnable dans un contexte où les infrastructures sont variables et parfois sommaires et le personnel renouvelé régulièrement. Depuis 2011, c'est le TDR combiné SD Bioline® Ag. *Pf/Pan* recherchant les protéines Pf-HRP2 et pan-pLDH qui est utilisé. Les performances de ce TDR ont été évaluées : pour *P. falciparum*, sensibilité de 96,8% et spécificité de 98,8%, et pour *P. vivax*, sensibilité de 86% et spécificité de 99,6% (38). Une des limites de ce test est qu'il ne différencie pas les infections mixtes des infections à *P. falciparum* seul. Une autre limite est le risque de méconnaître un accès à *P. falciparum* si le parasite est délété pour le gène *pfhrp2*. Ainsi le patient serait traité à tort comme un accès à *P. vivax*. Pour limiter ce risque, une surveillance a été mise en place par le laboratoire hospitalo-universitaire de parasitologie-mycologie (LHUPM) de l'Hôpital de Cayenne et le CNR du paludisme. Elle consiste à associer à tous les TDR positifs diagnostiqués dans les centres de santé, l'envoi d'un tube de sang prélevé sur tube EDTA pour la réalisation d'un examen microscopique complémentaire. Ainsi en 2016, 54% des accès à *P. falciparum* ont été diagnostiqués dans les CDPS et 68% d'entre eux ont pu être confirmés microscopiquement. Concernant les délétions du gène *pfhrp* (cf §2.2.1.3.4),

aucun parasite délété pour le gène *pfhrp2* n'a été retrouvé lors d'une étude menée sur des isolats collectés en 2009 et 2010 et seulement 5% de parasites présentaient une délétion pour le gène *pfhrp3* (38).

En 2017, sept CDPS ont diagnostiqué des cas de paludisme à *P. falciparum* : 55,6% à Maripasoula, 27,8% à Saint-Georges de l'Oyapock, 5,6% à Apatou et 2,8% à Camopi, Grand Santi, Régina et Taluen. Maripasoula concentre à lui seul plus de 50% de ces accès (58).

3.2 Epidémiologie et diagnostic au Guyana

Le Guyana ou ex Guyane anglaise compte une population de plus de 700 000 habitants, dont la plupart réside, comme en Guyane, sur une étroite bande côtière.

Selon l'OMS, 12 367 cas de paludisme et 13 décès ont été recensés au Guyana en 2016 (59). *Plasmodium falciparum* a été observé dans 40% des cas, le reste étant attribué à *Plasmodium vivax* (60%). La transmission du paludisme est présente sur tout le territoire guyanien. Cependant elle est majoritairement mise en évidence dans les régions forestières intérieures des états de Barima-Waini (région épidémiologique n°1), Cuyuni-Mazaruni (région épidémiologique n°7) et Potaro-Siparuni (région épidémiologique n°8) (Figure 16). Ces zones sont populaires pour les travailleurs immigrés en raison de l'extraction de l'or et des exploitations forestières (39).

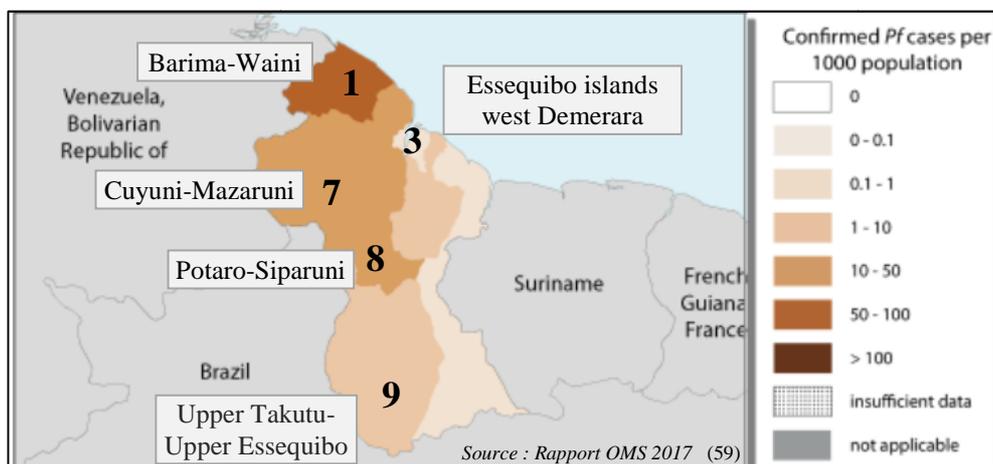


Figure 16- Incidence des cas de paludisme à *Plasmodium falciparum* au Guyana en 2016 par région épidémiologique.

Pour lutter contre le paludisme, le Guyana reçoit un soutien financier du Fond Mondial (2). La microscopie y reste l'outil diagnostique de référence. Avant 2016, les TDR étaient employés de manière sporadique et non homogène dans le secteur privé. Depuis 2016, le TDR combiné CareStart™ Malaria Pf/Pv basé sur les protéines *Pf*-HRP2 et *Pv*-pLDH est utilisé. Ce test a

été évalué dans le Round 7 de l’OMS avec de bons scores de détection sur le panel, 89% pour *P. falciparum* à 200 plasmodies/ μ l et 100% pour *P. vivax* ainsi qu’une bonne stabilité thermique (22). Les limites de ce test sont : i) l’absence de détection des accès palustres à *P. malariae* et, ii) l’absence de détection d’accès palustre à *P. falciparum* délété pour le gène *pfhrp2*. Aucun parasite délétés au niveau des gènes *pfhrp2/3* n’a été retrouvé en 2010 (cf. §2.2.1.3.4) (39). Toutefois les contrôles de qualité de ce test s’avèrent moins satisfaisants que prévu, une évaluation des performances du TDR Carestart[®] Pf/Pan en situation est donc en cours (communication personnelle Programme de contrôle du paludisme Guyana).

3.3 Epidémiologie et diagnostic au Venezuela

Le Venezuela compte plus de 31 millions d’habitants vivant majoritairement dans le nord du pays, sur le littoral (60). La transmission du paludisme se produit surtout dans les états du sud-est du Venezuela, frontaliers avec la Colombie, le Brésil et le Guyana : Amazonas et Bolivar (Figure 17).



Figure 17- Incidence des cas de paludisme à *Plasmodium falciparum* au Venezuela en 2016.

Ces régions isolées et faiblement peuplées sont recouvertes de forêt tropicale humide et correspondent à la partie vénézuélienne du bouclier guyanais. Les populations autochtones vivant dans ces régions sont les plus touchées ainsi que les orpailleurs souvent illégaux et les personnes vivant à proximité des mines (2). Depuis plusieurs années, le Venezuela traverse une crise politique, économique et sociale sans précédent qui a entraîné une défaillance dans le système de contrôle. Ainsi des pénuries de traitements antipaludiques ont des conséquences dramatiques sur l’incidence du paludisme. En effet, alors que le Venezuela était le pays

précurseur en matière de contrôle du paludisme (certifié OMS en 1961 comme le premier pays à avoir éradiqué le paludisme dans ses régions les plus peuplées), il est désormais le seul pays d'Amérique (excepté Haïti mais dans des proportions moindres) à connaître une augmentation de l'incidence du paludisme (+205% entre 2000 et 2014). Depuis trois ans, la situation ne fait qu'empirer puisqu'en 2016, l'OMS recensait 240 613 cas de paludisme. *Plasmodium falciparum* était impliqué dans 25% des cas, le reste étant attribué à *P. vivax* (75%). L'augmentation du nombre de cas de paludisme a été observée dans les régions endémiques mais touche également des zones auparavant indemnes et non endémiques. Comme dans les autres pays du plateau des Guyanes, le paludisme affecte particulièrement les régions minières, où les hommes travaillent le plus souvent illégalement. Ces hommes mobiles sont le relai de la transmission du paludisme dans les villes. Les cas de paludisme chez les mineurs vénézuéliens représentaient environ 47% des cas totaux du pays (53). Finalement au Venezuela, aucune étude de prévalence de parasite délété pour les gènes *pfhrp2/3* n'a été faite. En effet, le diagnostic du paludisme dans ce pays est réalisé par un réseau de microscopiste compétent et performant. Cependant avec l'épidémie actuelle que subit le pays, ce réseau est débordé et un envoi de 200 000 tests rapides a été effectué en 2017 pour palier à l'engorgement des structures de diagnostic par microscopie (communication personnelle PAHO).

OBJECTIFS

De nombreux parasites délétés au niveau des gènes *pfhrp2* et/ou *pfhrp3* circulent dans l'ouest de l'Amazonie et 14% de parasites délétés pour le gène *pfhrp2* ont été décrits au Suriname, sur le plateau des Guyanes (33). En raison des flux migratoires qui existent au sein de cette région, de la place des TDR dans la stratégie diagnostique des pays, une surveillance accrue de ces parasites délétés est nécessaire.

Dans un premier temps, l'objectif de ce travail était de mettre en place un panel de technique permettant le diagnostic et l'identification robuste de *Plasmodium falciparum* délétés pour les gènes *pfhrp2* et/ou *pfhrp3*.

Dans un second temps, ces techniques ont été utilisées pour étudier rétrospectivement la prévalence des parasites délétés au niveau des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* sur le plateau des Guyanes, en particulier en Guyane, au Guyana et au Venezuela entre 2014 et 2017. Enfin, le profil protéique de Pf-HRP2 dans cette région a été analysé à travers l'étude des séquences de l'exon 2 du gène *pfhrp2*.

MATERIELS

1 Souches de référence et gamme de dilution

Pour mettre au point des méthodes d'amplification efficaces, un panel d'extraits d'ADN de souches de référence de *Plasmodium falciparum* 3D7, 7G8, Dd2, D10 et HB3 et de souches de *Plasmodium vivax* ont été utilisées. Ces souches sont caractérisées au niveau des gènes *pfhrp2*, *pfhrp3* et des gènes adjacents amont et aval (Tableau 4) (26).

Tableau 4- Profil génétique des souches de référence.

Souches	MAL7P1.230	<i>Pfhrp2</i>		MAL7P1.228	MAL13P1.485	<i>Pfhrp3</i>		MAL13P1.475
		Exon 1-2	Exon 2			Exon 1-2	Exon 2	
3D7	+	+	+	+	+	+	+	+
7G8	+	+	+	+	+	+	+	+
Dd2	-	-	-	-	+	+	+	+
D10	-	+	-	+	+	+	+	+
HB3	+	+	+	+	-	-	-	-

Pour déterminer les meilleures conditions d'amplification et la sensibilité des PCR mises au point, des gammes d'ADN extraites à partir de 200µl de sang total ou d'un papier buvard contenant un nombre de *P. falciparum* connu ont été utilisées.

Tableau 5- Gammes de dilution de *Plasmodium falciparum* testées.

Gamme B	Sang (parasites/µL d'extrait)	Buvard (parasites/µL d'extrait)
Point 1	1000	200
Point 2	500	100
Point 3	100	20
Point 4	50	10
Point 5	10	2
Point 6	5	1
Point 7	1	0.5
Point 8	0.5	0.1
Point 9	0.1	

2 Isolats étudiés

Au total, 605 isolats ont été étudiés (Tableau 6)

Tableau 6- Matériel biologique analysé.

Pays	Effectif (n)	Type d'isolats	Année de collection
Guyane	230	Sang veineux sur tube	2014-2016
Guyana	298	Sang capillaire sur papier buvard	2016
Venezuela	77	Sang capillaire sur papier buvard	2016-2017

Les parasites de Guyane ont été collectés au Centre national de référence (CNR) pour le paludisme pôle zones endémiques de l'Institut Pasteur de la Guyane, dans le cadre de la surveillance du paludisme en Guyane. Parmi ces 230 isolats, 188 ont été collectés par dépistage passif et 42 par dépistage actif. Ils représentaient 66% des isolats de *P. falciparum* déclarés aux autorités sanitaires guyanaises sur la période. Bon nombre d'entre eux provenaient de personnes contaminées en zones orpaillées (entre 34 et 45%).

Sur les 298 échantillons analysés en provenance du Guyana, 91 provenaient de la région de Barima-Waini (1), 91 de la région Potaro-Siparuni (8), 107 de la région Cuyuni-Mazaruni (7), 7 de la région d'Essequibo islands west Demerara (3) et 2 de la région d'Upper Takutu-Upper Essequibo (9). Les échantillons que nous avons sélectionnés, provenaient tous de patients symptomatiques. Les parasites du Venezuela ont été collectés chez des patients symptomatiques diagnostiqués dans les états d'Amazonas et de Bolivar suite à un examen microscopique.

METHODES

1 Extraction d'ADN

Pour les prélèvements de sang veineux prélevé sur tube EDTA originaires de Guyane, l'ADN a été extrait à partir de 200 µl de sang total à l'aide du kit Qiagen QIAamp® conformément aux recommandations du fabricant.

Pour les prélèvements sang capillaire déposés sur papier buvard en provenance du Guyana et du Venezuela, quatre confettis d'un diamètre de 3mm ont été extraits selon les recommandations des fabricants grâce au système MagMAX™ de chez AppliedBiosystems™ pour les isolats du Guyana et au kit QIAamp® DNA mini kit de chez Qiagen pour les isolats du Venezuela.

2 Mise au point du protocole d'analyse

2.1 Développement des techniques de PCR classiques

Un panel de techniques permettant de mettre en évidence ces parasites déléétés en suivant les recommandations de l'OMS a été mis au point en partant de ce qui était précédemment publié (26, 27, 37) et disponible au laboratoire (38). Plusieurs PCR ont été mises au point et optimisées de façon à analyser différentes parties du génome des parasites :

- la jonction exon1-2 du gène *pfhrp2*,
- l'exon 2 du gène *pfhrp2*,
- le gène adjacent en amont de *pfhrp2*, MAL7P1.230,
- le gène adjacent en aval de *pfhrp2*, MAL7P1.228,
- la jonction exon1-2 du gène *pfhrp3*,
- l'exon 2 du gène *pfhrp3*,
- le gène adjacent en amont de *pfhrp3*, MAL13P1.485,
- le gène adjacent en aval de *pfhrp3*, MAL13P1.475.

Au total, 14 PCR ont été testées et mises au point : sept PCR simples et sept PCR nichées.

Le mélange réactionnel d'amplification prêt à l'emploi « 5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load » de chez Solis BioDyne a été utilisé. Sa composition était la suivante : ADN polymérase HOT FIREPol®, solution tampon 5X, dNTP à 2mM pour chaque, albumine de sérum bovin et colorants bleu et jaune, témoins de migration utilisés lors de la migration

sur gel d'agarose des produits d'amplification. Le volume final de la PCR était de 25µl et deux volumes de matrice d'ADN ont été testés : 1 ou 5µl. De plus, pour optimiser les PCR nous avons testé trois concentrations de MgCl₂ (1,5 nM, 2,5 nM, et 3,5nM) et trois températures d'hybridation (55°C, 58°C et 60°C). Le programme type d'amplification est résumé dans le Tableau 7. Le thermocycleur Mastercycler® d'Eppendorf a été utilisé.

Tableau 7- Programme d'amplification de l'ADN

Etapes	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94	15 min	1
Dénaturation	94	30 sec	35
Hybridation	55 ou 58 ou 60	30 sec	
Elongation	72	1 min	
Elongation finale	72	10 min	1

Les produits de PCR étaient ensuite visualisés après dépôt et migration (1 heure à 150 Volts) sur un gel d'agarose à 2% dans du TBE 0,5X.

Les différents couples d'amorces testés lors de ces mises du point ont été localisés au niveau des gènes dans les Figure 18 et Figure 19 et récapitulés dans le Tableau 8 et Tableau 9.

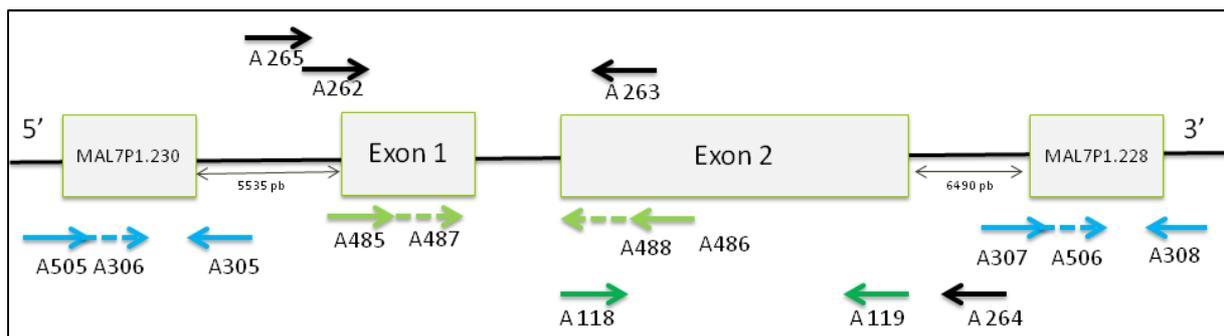


Figure 18- Représentation du gène *pfhrp2* et de ses gènes adjacents avec les couples d'amorces testés.
Amorces retenues pour le gène *pfhrp2* (vert) et les gènes adjacents (bleu),
PCR nichée (flèche pointillée), amorces testées mais non retenues (en noir).

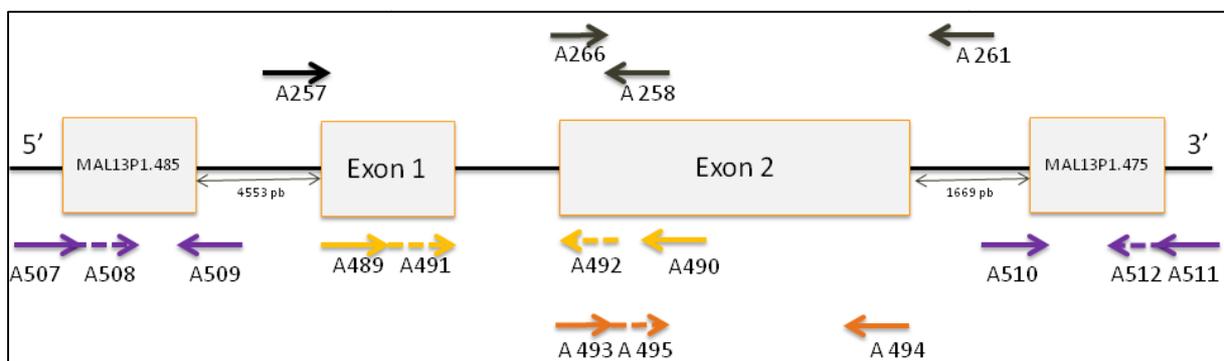


Figure 19- Représentation du gène *pfhrp3* et de ces gènes adjacents avec les couples d'amorces testés.
Amorces retenues pour le gène *pfhrp3* (orange) et les gènes adjacents (violet),
PCR nichée (flèche pointillée), amorces testées mais non retenues (en noir).

Tableau 8- Amorces testées pour amplifier le gène *pfhrp2* et ses gènes adjacents.

Régions	Nom des PCR	Taille fragment (pb)	Amorces	Séquence des amorces	Référence
<i>Pfhrp2</i>	2G-1	1400	A262	5'-TTTAATAAAAAATGGTTTCCTTC-3'	(38)
			A264	5'-AAAATCGCTATCCATAAATTACA-3'	
Junction exon 1-2	2J-1	315	A262	5'-TTTAATAAAAAATGGTTTCCTTC-3'	(38)
			A263	5'-GCTTGAGTTTCGTGTAATAATCT-3'	
	2J-2	903	A265	5'-ATCATACTTCGGTATTTTAAATC-3'	(38,61)
			A263	5'-GCTTGAGTTTCGTGTAATAATCT-3'	
	2J-3*	312	A485	5'-GGTTTCCTTCTCAAAAAATAAAG-3'	(37)
			A486	5'-TCTACATGTGCTTGAGTTTCG-3'	
A487			5'-GTATTATCCGCTGCCGTTTTTGCC-3'		
A488			5'-CTACACAAGTTATTATTAATGCGGAA-3'		
Exon 2	2E-1*	891	A118	5'-TTCCGCATTTAATAATAACTTGTG-3'	(38)
			A119	5'-TAATGGCGTAGGCAATGTGT-3'	
2E-2	1166	A118	5'-TTCCGCATTTAATAATAACTTGTG-3'	(38)	
		A264	5'-AAAATCGCTATCCATAAATTACA-3'		
MAL7PL. 230	2AM-1*	404	A505	5'-GATATCATTAGAAAACAAGAGCTTAG-3'	(26,37)
			A305	5'-TATCCAATCCTTCCTTTGCAACACC-3'	
			A306	5'-TATGAACGCAATTTAAGTGAGGCAG-3'	
			A305	5'-TATCCAATCCTTCCTTTGCAACACC-3'	
MAL7PL. 228	2AV-1*	222	A307	5'-AGACAAGCTACCAAAGATGCAGGTG-3'	(26,37)
			A308	5'-TAAATGTGTATCTCCTGAGGTAGC-3'	
			A506	5'-CCATTGCTGGTTTAAATGTTTTAAG-3'	
			A308	5'-TAAATGTGTATCTCCTGAGGTAGC-3'	

*PCR retenues

Tableau 9- Amorces testées pour amplifier le gène *pfhrp3* et ses gènes adjacents.

Régions	Nom des PCR	Taille fragment (pb)	Amorces	Séquence des amorces	Référence
Junction exon 1-2	3J-1	680	A257	5'-CTTTGCTTTTAAAGTTTCTAC-3'	(61)
			A258	3'-CTCTTATTTGAATTAAGTCCTTTTGCA-3'	
	3J-2*	311	A489	5'-GGTTTCCTTCTCAAAAAATAAAA-3'	(37)
			A490	5'-CCTGCATGTGCTTGACTTTC-3'	
			A491	5'-ATATTATCCGCTGCCGTTTTTGCT-3'	
	226	A492	5'-CTAAACAAGTTATTGTTAAATTCCGGAG-3'		
Exon 2	3E-1	772	A266	5'-CCGAATTTAACAATAACTTG-3'	(38)
			A261	5'-CCGAATTTAACAATAACTTG-3'	
	3E-2*	719	A493	5'-AATGCAAAAGGACTTAATTC-3'	(37)
			A494	5'-TGGTGTAAGTGATGCGTAGT-3'	
			A495	5'-AAATAAGAGATTATTACACGAAAG-3'	
	675	A494	5'-TGGTGTAAGTGATGCGTAGT-3'		
MAL13P1. 485	3AM-1*	287	A507	5'-TTGAGTGCAATGATGAGTGGAG-3'	(26,37)
			A509	5'-AAATCATTTCTTTTACACTAGTGC-3'	
			A508	5'-GTTACTACATTAGTGATGCATTC-3'	
			A509	5'-AAATCATTTCTTTTACACTAGTGC-3'	
MAL13P1. 475	3AV-1*	260	A510	5'-TTCATGAGTAGATGTCCTAGGAG-3'	(26,37)
			A511	5'-TCGTACAATTCATCATACTCACC-3'	
			A510	5'-TTCATGAGTAGATGTCCTAGGAG-3'	
			A512	5'-GGATGTTTCGACATTTTCGTCCG-3'	

* PCR retenues

2.2 Utilisation de PCR d'espèce en temps réel

Nous avons également utilisé la PCR d'espèce en temps réel disponible au CNR Paludisme de l'IPG pour estimer la quantité d'ADN parasitaire présente dans les isolats et évaluer sa qualité. Cette technique de PCR en temps réel est dérivée de la méthode publiée par Shokoples *et al.* (62) et validée sur le thermocycleur StepOnePlus™ de chez Applied Biosystems. Elle détecte une séquence d'ADN spécifique pour chacune des espèces plasmodiales. Cette PCR est multiplexée permettant l'amplification simultanée de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* et de la $\beta 2$ microglobuline humaine (Mg), utilisée comme contrôle interne d'extraction. La PCR en temps réel a été utilisée afin de sélectionner les échantillons exploitables : échantillons pour lesquels la qualité et la quantité de parasites permettent la distinction entre vraie délétion et défaut d'amplification. 48 échantillons sur papier buvard ont été testés en parallèle en PCR temps réel et avec les quatre PCR nichées afin de définir un Ct seuil au-delà duquel les échantillons sont classés non analysables.

3 Amplification d'un ou plusieurs gènes en monocopie

Au laboratoire de parasitologie, le gène monocopie *pfprt* des parasites *Plasmodium falciparum* est régulièrement étudié : la mutation *pfprt* K76T dans l'exon 2 est en effet associée à la résistance du parasite à la chloroquine (63). Cette mutation a été analysée selon les procédures décrites par Pelleau *et al.* (28).

Par ailleurs, le gène *pfK13* (PF3D7-1343700) situé sur le chromosome 13 d'une taille de 2181pb et qui code pour une protéine en hélice de 726 aa a été analysé. Des mutations dans la région « propeller » de ce gène ont été précédemment décrites comme associées à la résistance de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine (64).

Ces deux gènes présents en monocopie et analysés par le biais de deux PCR ont été choisis pour valider secondairement la qualité des prélèvements étudiés.

4 Séquençage du gène *pfhrp2* et analyse des séquences protéiques

L'exon 2 du gène *pfhrp2* a été séquencé à partir des produits d'amplification issus des PCR 2E-2 et PCR 2E-1 par la compagnie Eurofins. Les séquences nucléotidiques ont été transcrites en séquence d'acides aminés et chaque répétition/motif a été représenté en utilisant le code numérique décrit par Baker *et al.* (24) (Tableau 10).

Tableau 10- Code numérique défini par Baker *et al.* (24) pour l'analyse protéique de Pf-HRP2/3.

Code	Répétition/Motif	PfHRP2	PfHRP3
1	AHHAHHVAD	+	+
2	AHHAHHAAD	+	+
3	AHHAHHAAY	+	-
4	AHH	+	+
5	AHHAHHASD	+	-
6	AHHATD	+	-
7	AHHAAD	+	+
8	AHHAAY	+	-
9	AAY	+	-
10	AHHAAAHHATD	+	-
11	AHN	+	-
12	AHHAAAHHEAATH	+	-
13	AHHASD	+	-
14	AHHAHHATD	+	-
15	AHHAHHAAN	-	+
16	AHHAAN	-	+
17	AHHDG	-	+
18	AHHDD	-	+
19	AHHAA	+	-
20	SHHDD	+	+
21	AHHAHHATY	+	-
22	AHHAHHAGD	+	-
23	ARHAAD	+	-
24	AHHTHHAAD	+	-

Les séquences ont été alignées grâce au logiciel Geneious puis classées en groupe et sous groupe selon leurs similarités (38).

RESULTATS

1 Méthodes et protocole d'étude mis en place

Sur les huit protocoles d'amplification requis, sept PCR nichées, plus sensibles que les PCR simples, ont été mises au point et retenues ainsi qu'une PCR classique, 2E-1, pour amplifier l'exon 2 du gène *pfhrp2* utilisée avec une phase de pré-amplification de 10 cycles avant les 35 cycles finaux. Les conditions de ces huit PCR ainsi que le détail des seuils de sensibilité obtenues à partir d'un ou cinq microlitres de matrice d'ADN figurent dans le Tableau 11.

A titre d'exemple, la photo des gammes de dilution de *Pf* testées avec la PCR 3E-2 avec les deux volumes de matrice d'ADN : 1 μ l et 5 μ l (Figure 20). Les photos de l'analyse des gammes ayant permis de définir les seuils de sensibilité des autres PCR retenues figurent en annexe (cf. Figure 25, Figure 26, Figure 27, Figure 28, Figure 29).

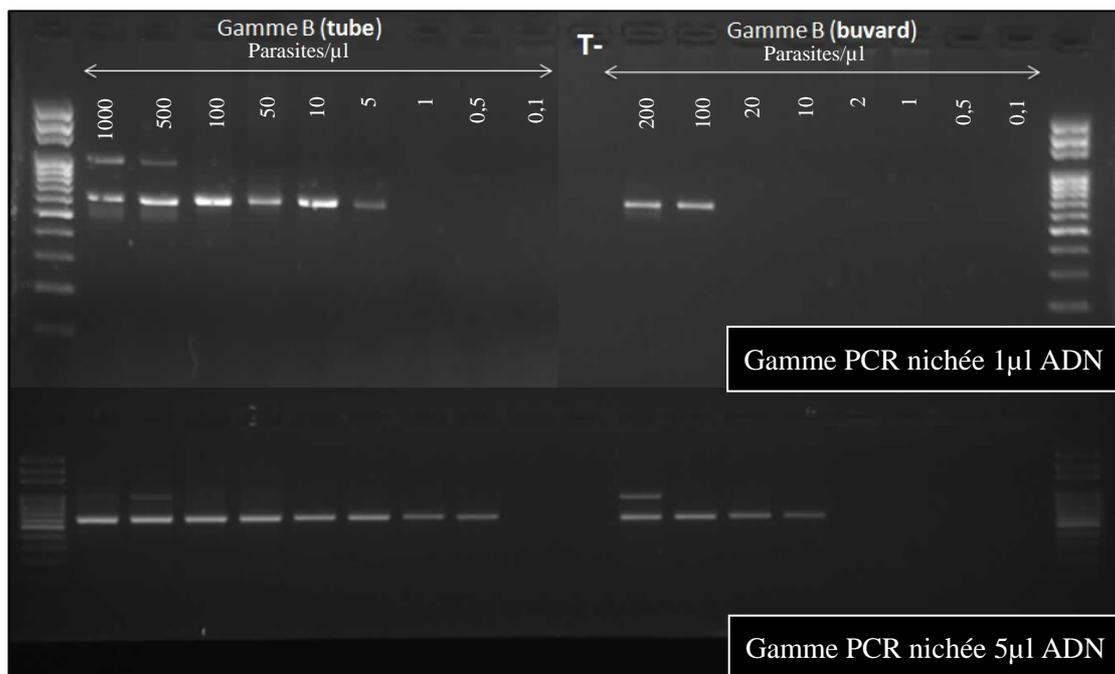


Figure 20- Photo des gammes de sensibilité testées pour l'exon 2 *pfhrp3* avec la PCR 3E-2.

Tableau 11- Récapitulatifs des conditions et seuils de sensibilité des PCR utilisées pour étudier les gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* et leurs gènes adjacents.

Gènes	Régions	Taille du fragment (pb)	Amorces	Conditions PCR				Sensibilité (parasites/ μ l)		
				Réactions	[MgCl ₂] (mM)	Température d'hybridation (°C)	Nombre de cycles	Volume ADN (μ l)	Tubes	Buvards
<i>Pfhrp2</i>	MAL7P1.230 (2AM-1)	404	A505 - A305	Nichée	3,5	60	20	1	5	10
		355	A306 - A305		2,5	58	35			
	EXON 1-2 (2J-3)	312	A485 - A486	Nichée	3,5	60	20	1	5	10
		227	A487 - A488		2,5		35		5	0,5
	EXON 2 (2E-1)	891	A118	Pré-ampli.	2,5	58	10	1	5	100
			A119				35		5	0,5
	MAL7P1.228 (2AV-1)	222	A307 - A308	Nichée	3,5	60	20	1	0,5	20
		197	A506 - A308		3,5	58	35			
<i>Pfhrp3</i>	MAL13P1.485 (3AM-1)	287	A507 - A509	Nichée	2,5	60	20	1	0,5	10
		266	A508 - A509			58	35			
	EXON 1-2 (3J-2)	311	A489 - A490	Nichée	2,5	60	20	1	10	10
		226	A491 - A492				35		5	1
	EXON 2 (3E-2)	719	A493 - A494	Nichée	2,5	55	20	1	5	100
		675	A495 - A494		1,5	60	35		5	0,5
	MAL13P1.475 (3AV-1)	260	A 510 - 511	Nichée	3,5	60	20	1	5	100
		234	A 510 - 512		2,5	58	35			

En grisé, PCR la plus sensible à 1 μ l d'ADN utilisée pour débiter le protocole d'étude.

L'analyse de 48 isolats sur papiers buvards a été réalisée à la fois en PCR temps réel en duplica et avec quatre PCR retenues en utilisant 1 et 5µl de matrice d'ADN. Les échantillons présentant un Ct <37 en PCR temps réel, étaient majoritairement amplifiables par les PCR à partir d'1µl d'ADN voire, à défaut, à partir de 5µl. A l'inverse, pour les échantillons présentant un Ct >37 en PCR temps réel l'amplification étaient médiocre voire inexistante même en utilisant 5µl de matrice d'ADN (cf. Tableau 12).

Tableau 12- Résultats des 48 isolats passés avec les quatre PCR retenues pour étudier les gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* en fonction du Ct de la PCR temps réel.

Gènes	Régions et nom PCR	Volume ADN Déposé (µl)	Ct Pf <37		Ct Pf >37	
			n=37		n=11	
			POSITIF	NÉGATIF	POSITIF	NÉGATIF
<i>pfhrp2</i>	EXON 2 2E-1	1	37	0	5	6
		5	0	0	5	1
	EXON 1-2 2J-3	1	36	1	1	10
		5	1	0	8	2
<i>pfhrp3</i>	EXON 2 3E-2	1	30	7	3	8
		5	5	2	3	5
	EXON 1-2 3J-2	1	35	2	5	6
		5	1	1	4	2

Nous avons ainsi fixé le seuil de sélection des échantillons exploitables et analysables à une valeur de Ct ≤ 37.

Sur la base des différentes mises au point et seuils de sensibilité et de sélection déterminés, le protocole d'étude suivant a été établi (Figure 21). Ce dernier a été défini de manière à réduire au maximum la quantité de matrice d'ADN nécessaire. Les PCR à 1µl ont ainsi été privilégiées. En effet, lorsque des parasites délétés sont identifiés, la série de validation à réaliser est conséquente et induit une consommation importante de matrice.

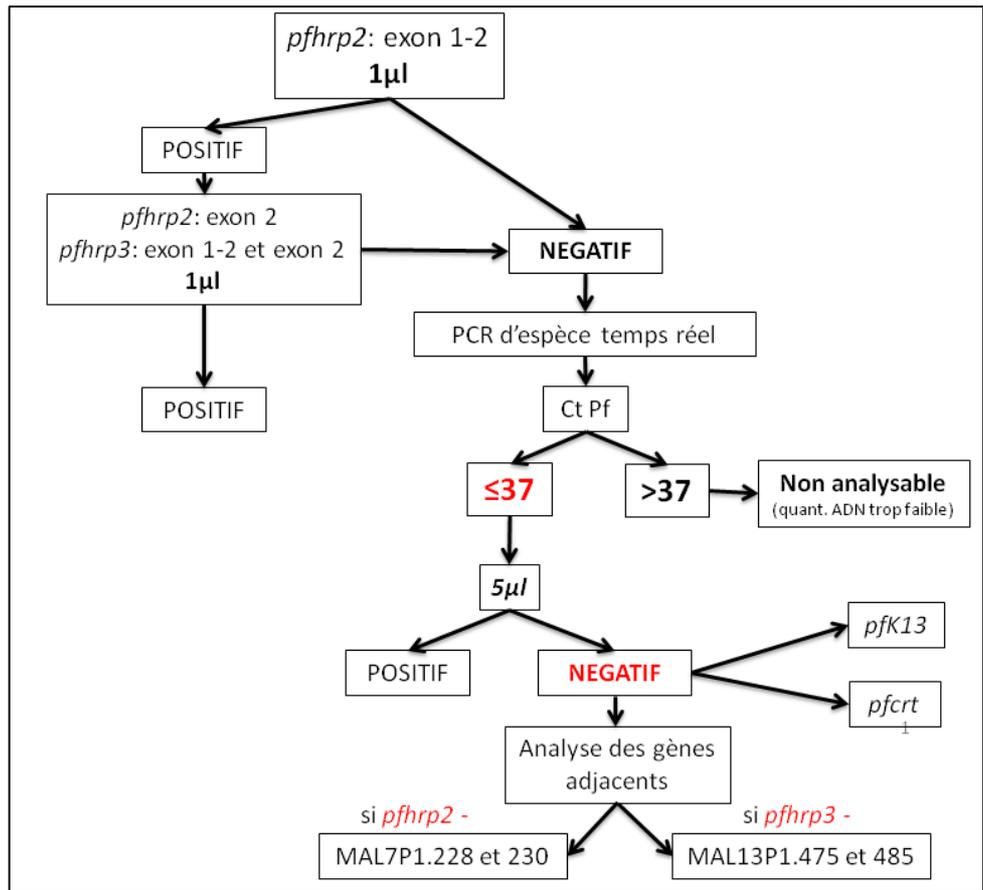


Figure 21- Protocole pour l'étude de prévalence des délétions de *pfhrp*.

Dans un premier temps, les échantillons sont testés avec la PCR 2J-3 qui est la plus sensible, à partir d'ADN extrait de sang veineux ou de sang capillaire sur papier buvard en partant de 1µl de matrice. Si l'analyse est positive, les autres PCR : PCR 2E-1, PCR 3J-2 et PCR 3E-2 permettant d'analyser la totalité des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* sont alors réalisées. Si l'une des quatre PCR est négative, cet échantillon est analysé par PCR en temps réel de manière à évaluer la quantité/qualité de l'ADN présent dans cet échantillon.

Seuls les échantillons ayant un Ct ≤ 37 sont conservés pour l'étude et testés avec 5µl de matrice d'ADN. Si les PCR restent négatives malgré l'augmentation du volume d'ADN, l'isolat est alors considéré comme délété. Les deux gènes, *pfK13* et *pfCRT*, présents en monocopie dans le génome de *Plasmodium falciparum* sont recherchés ainsi que les gènes adjacents au gène *pfhrp* délété.

2 Prévalence sur le plateau des Guyanes

Ce protocole a été appliqué à l'analyse de 605 isolats en provenance du plateau des Guyanes collectés entre 2014 et 2017 (Tableau 13).

Tableau 13- Résultats sur le plateau des Guyanes.

Pays	Nombre isolats (n)	Nombre d'isolats analysables	Nombre de parasites délétés	
			<i>pfhrp2</i>	<i>pfhrp3</i>
Guyane	230	204	0	1
Guyana	298	265	0	8
Venezuela	77	77	2	30
Total	605	546	2	39

Parmi eux, 546 se sont avérés analysables et seuls deux isolats délétés au niveau du gène *pfhrp2* ont pu être identifiés en provenance du Venezuela (2,6% IC₉₅ [0 - 6,8]), soit un pourcentage global de 0,4% IC₉₅ [0,2 - 1,8], (Figure 22).

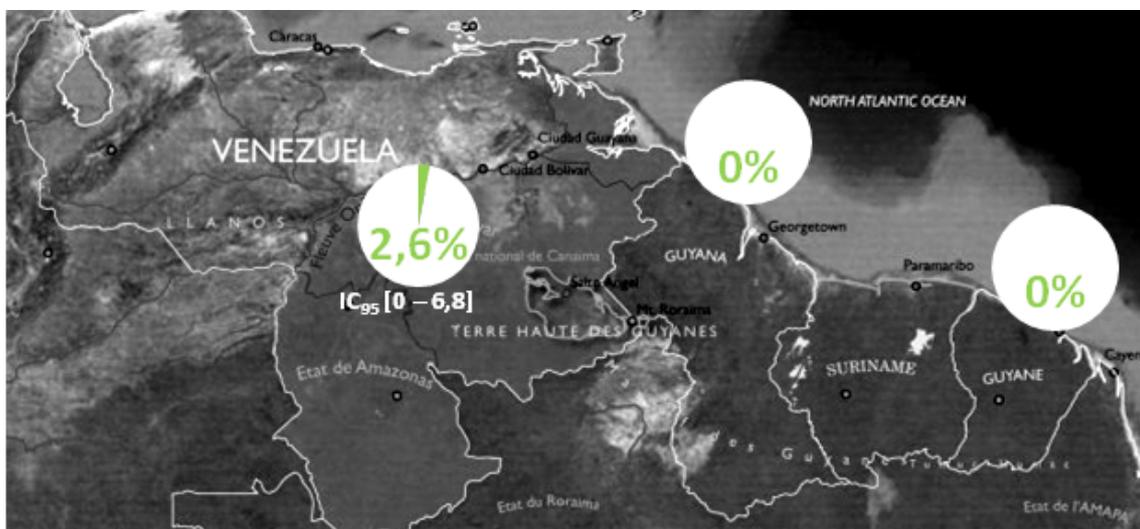


Figure 22- Prévalence des parasites délétés pour le gène *pfhrp2* sur le plateau des Guyanes.

Trente neuf isolats, soit 7,1% IC₉₅ [4,9 - 9,3] du total des isolats ont été identifiés comme délétés pour le gène *pfhrp3* (Figure 23). Ces délétions sont retrouvées dans les trois pays avec une prévalence nettement plus importante (39,0% IC₉₅ [28,1 - 49,9]) au Venezuela (n=30/77, p<0,001). Seuls, 3,0% IC₉₅ [0,9 - 5,1] (n=8/265) de parasites sont délétés pour le gène *pfhrp3* au Guyana et 0,5% IC₉₅ [0% - 1,5] en Guyane (n=1/204).

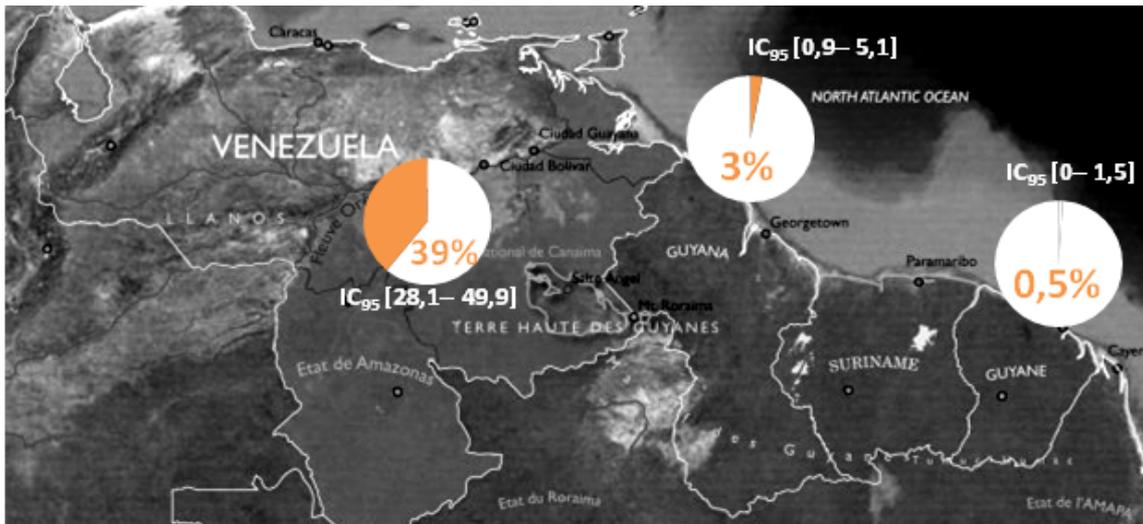


Figure 23- Prévalence des parasites délévés pour le gène *pfhpr3* sur le plateau des Guyanes.

Le détail et l'étendue des délétions au niveau de ces gènes sont détaillés dans le Tableau 14. Les Ct obtenus en PCR en temps réel sont aussi présentés ainsi que les résultats de l'amplification et du séquençage des gènes monocopies *pfK13* et *pfCRT* réalisés en marge de notre étude.

Tableau 14- Description des parasites délévés au niveau des gènes *pfhrp2* et/ou *pfhrp3*.

Pays	Année	N° IPG	Ct Pf	<i>Pfhrp2</i>		<i>Pfhrp3</i>		<i>Séquence</i>	
				Exon 1-2	Exon 2	Exon 1-2	Exon 2	<i>PfK13</i>	<i>pfert</i>
Guyane	2015	S174	24,09	+	+*	-	-	WT	CVMNK
Guyana	2016	T214	33,38	+	+	-	-	WT	SVMNT
		T493	34,31	+	+∞	-	-		
		T581	34,31	+	+	-	-		
		T731	34,33	+	+	-	-		
		T824	35,77	+	+	-	-		
		T267	36,23	+	+	-	-		
		T478	36,67	+	+	+	-		
		T667	36,83	+	+	-	-		
Venezuela	2017	U106	27,95	+	+	-	+	WT	SVMNT
		U089	28,42	+	+	-	-		
		U108	29,06	-	-	-	-		
		U076	29,29	+	+	+	-		
		U066	29,64	+	+	-	+		
		U105	29,81	+	+	-	-		
		U131	29,84	+	+	-	+		
		U084	29,88	+	+	-	+		
		U117	30,00	+	+	-	-		
		U090	30,23	+	+	-	-		
		U128	30,28	+	+	-	-		
		U111	30,55	-	-	-	-		
		U069	30,93	+	+	-	+		
		U075	30,96	+	+	-	-		
		U110	31,46	+	+	-	+		
		U118	31,62	+	+	-	-		
		U112	31,67	+	+	-	-		
		U102	31,69	+	+	-	+		
		U081	31,83	+	+	-	-		
		U085	32,00	+	+	-	-		
		U092	32,08	+	+	-	-		
		U093	32,14	+	+	-	-		
		U095	32,29	+	+	-	-		
		U094	32,66	+	+	-	-		
		U071	32,89	+	+	-	-		
		U080	32,91	+	+	-	-		
		U067	33,24	+	+	-	-		
U127	33,31	+	+	-	-				
U098	35,45	+	+	-	-				
U086	35,52	+	+	-	-				
		U088	35,54	+	+	-	+	Echec	SVMNT

WT : sauvage, + : présence, - : absence.

S: Serine, V: Valine, M: Méthionine, N: asparagine, T: Thréonine, C: Cystéine, K : Lysine.

Séquences exon 2 *pfhrp2* : * inclassable, ∞: référence 1d (38).

Les deux isolats vénézuéliens délétés pour le gène *pfhrp2* sont également délétés pour le gène *pfhrp3*. Les gènes sont délétés dans leur ensemble à savoir, la jonction exon 1-2 et l'exon 2. Ces deux isolats présentent donc des doubles délétions totales *pfhrp2/3*.

Parmi les 39 isolats du plateau des Guyanes délétés au niveau du gène *pfhrp3*, 76,9% IC₉₅ [63,7% - 90,1%] (n=30/39) présentent une délétion totale (jonction exon 1-2 et exon 2) et 23,1% IC₉₅ [9,9% - 36,3%] (n=9/39) une délétion partielle (sept au niveau de la jonction exon 1-2 et deux au niveau de l'exon 2, Figure 24).

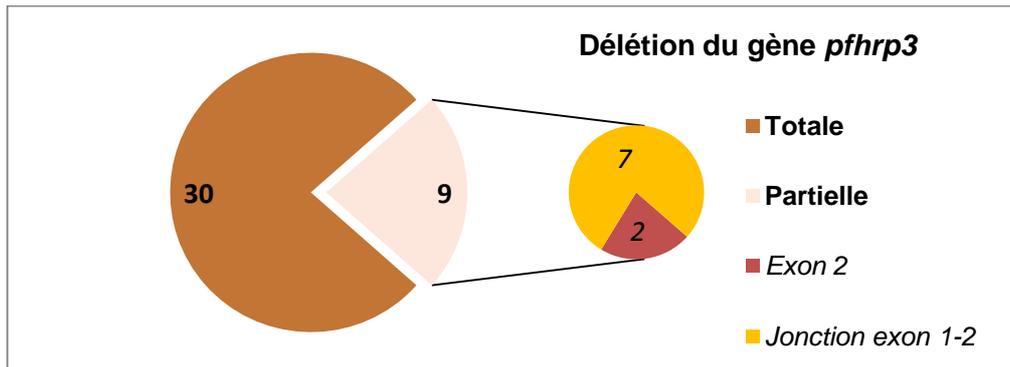


Figure 24- Détail des 39 délétions du gène *pfhrp3*.

Les analyses conduites sur les gènes de résistances aux antipaludiques ont confirmées ces délétions sauf peut être pour un isolat qui n'a pu être amplifié au niveau de *pfK13*. En marge de cette étude, le séquençage a permis de montrer que tous les isolats délétés sauf un étaient sauvages pour le gène *pfK13*. L'ensemble des parasites délétés du Guyana et de Venezuela présentaient également une séquence *pfprt* 72-76 SVMNT. L'isolat collecté en Guyane présentait lui la séquence CVMNK.

3 Etude des profils protéiques à travers l'analyse des séquences de l'exon 2 du gène *pfhrp2*

Pour une meilleure connaissance du polymorphisme de la protéine Pf-HRP2 dans la région, 90 isolats ont été sélectionnés pour être séquencés au niveau de l'exon 2. Parmi ceux-ci se trouvaient des échantillons à forte parasitémie ainsi que les isolats délétés au niveau du gène *pfhrp3* collectés au Guyana et en Guyane. Les isolats délétés du Venezuela n'ont pas pu être analysés faute de temps.

Soixante cinq séquences ont ainsi pu être obtenues et converties en code numérique selon leurs répétitions/motifs en acides aminés (24). Au final, 62 séquences ont été regroupées en cinq génotypes (Tableau 15). Les séquences appartenaient essentiellement au génotype 1d,

53,8% IC₉₅ [41,7 - 65,9] (n=35/65) puis par ordre décroissant au génotype 1c, 18,5% IC₉₅ [9,1 - 27,9] (n=12/65), génotype 2a 13,8% IC₉₅ [5,4 - 22,2] (n=9/65), génotype 3b 6,1% IC₉₅ [0,3- 11,9] (n=4/65) et génotype 4 3,1% IC₉₅ [0 - 7,3] (n=2/65) (38). Trois génotypes individuels et non classables ont été observés. Ces derniers nous ont permis, en lien avec la séquence *pfprt*, de redéfinir l'origine géographique de ces échantillons (S174 délété au niveau du gène *pfhrp3* provenant très probablement d'Haïti, T328 en provenance probable des Philippines et S615 en provenance du Cameroun). Dans la séquence de ce dernier, S615, un nouveau motif a été identifié (AHHAND).

Tableau 15- Représentation des motifs retrouvés dans la protéine Pf-HRP2.

Génotypes	Nombre	Par pays			5'	Séquences acides aminés de Pf-HRP2 et motifs entre les deux motifs consensus L ₄₂ NKRL LHETQAHVDD ₅₆ et CLRH	3'
		Guyane	Guyana	Venezuela			
1d	35	23	12	-			
1c	12	10	2	-			
2a	9	1	7	1			
3b	4	-	4	-			
4	2	-	1	1			
S174	1	1	-	-			
T328	1	1	-	-			
S615	1	1	-	-			

DISCUSSION

Il est important de surveiller la prévalence des parasites délétés pour les gènes *pfhrp2/3* sur le plateau des Guyanes car les TDR y sont utilisés comme outil diagnostique et des études antérieures ont décrit des parasites délétés pour les gènes *pfhrp2/3* en Amazonie (cf. §2.2.1.3.4).

Dans un premier temps, l'étude a consisté à mettre en place un panel de techniques pour la détection des parasites délétés au niveau des gènes *pfhrp2/3* en suivant les recommandations de l'OMS (27, 30, 31).

Pour rechercher et décrire avec précision ces délétions, huit PCR ont été mises au point afin d'analyser les jonctions exon 1-2 et les exons 2 des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* ainsi que leurs gènes adjacents amont et aval (27).

Les papiers buvards sont très largement utilisés pour collecter du sang capillaire nécessaire à la surveillance du paludisme en général du fait de leur facilité de stockage et de transport. Ils représentaient 62% de l'échantillonnage de cette étude (n=375/605). L'extraction d'ADN à partir de ce support est difficile et les volumes de sang analysé sont relativement faibles (19). Pour avoir une sensibilité suffisante quelque soit le type de prélèvement, des PCR nichées ont été optimisées.

En parallèle, il était nécessaire de mettre en place une technique permettant de vérifier la qualité des prélèvements afin de pouvoir distinguer les échantillons exploitables des échantillons non analysables. En effet, l'absence d'amplification pouvait être liée à la présence d'une délétion ou à une faible qualité ou quantité de matériel dans le prélèvement. Pour ce faire, les études antérieures utilisaient le plus souvent une PCR nichée du gène 18S ARNr (26, 32, 34–37, 39). Cependant ce gène est présent en plusieurs copies dans le génome de *Plasmodium falciparum*, ce qui augmente artificiellement la sensibilité de la technique par rapport à une technique ciblant un gène monocopie tel que *pfhrp2*. Cette stratégie peut donc entraîner une surestimation du nombre de parasites délétés par surestimation du nombre de prélèvements analysables. Par ailleurs, les techniques de PCR classiques ne sont pas des techniques quantitatives mais en point final. Pour cette étude une PCR en temps réel ciblant également le gène de l'ARNr 18S qui code la petite sous unité des ARN ribosomiaux plasmodiales a été utilisée. Cette dernière présentait cependant l'avantage d'être semi-quantitative. Ainsi, une corrélation a été réalisée de manière à s'assurer qu'en dessous du seuil de Ct fixé, l'ADN était amplifiable même pour un gène monocopie. Ainsi un Ct de 37 a été fixé comme seuil de sélection des échantillons exploitables ou non. Au-delà de ce seuil, les

échantillons étaient considérés comme étant médiocrement amplifiables y compris en augmentant la prise d'essai. Avec ce seuil, l'ensemble des prélèvements du Venezuela, tous réalisés sur papiers buvards, se sont avérés exploitables. De façon plus surprenante le pourcentage d'échantillons non exploitables était similaire (11%) en Guyane et au Guyana, alors que le type de prélèvements était différent, respectivement sang veineux prélevé sur tube EDTA et sang capillaire prélevé sur papiers buvards. Le nombre important d'isolats non exploitable de Guyane pourrait s'expliquer par la présence au sein de l'échantillonnage de prélèvements recueillis dans le cadre d'un dépistage actif du paludisme par PCR nichée du gène 18S ARNr. Ainsi parmi les 26 prélèvements non analysables, 21 provenaient de patients présentant un frottis mince et une goutte épaisse négatifs. Cela témoigne d'une faible parasitémie pour ces prélèvements et confirme que l'utilisation de la PCR nichée du gène 18S ARNr sans aspect semi-quantitatif ne permet pas de valider de façon fiable le caractère analysable d'un gène monocopie. En ce sens, pour s'assurer de la qualité de l'ADN analysé lors de l'étude des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* en dehors de l'utilisation d'un système semi-quantitatif, l'OMS recommande l'amplification de deux gènes présents en monocopie dans le génome de *P. falciparum*.

Le protocole d'étude retenu pour les échantillons aurait pu introduire un biais si le fitness des parasites était impacté par la présence d'une délétion. En effet, si une délétion *pfhrp* est par exemple associée à une parasitémie plus faible, l'exclusion des prélèvements présentant un Ct supérieur à 37 pourrait entraîner une sous estimation du nombre de parasites délétés. Dans la littérature, aucune relation n'a été décrite en ce sens et les parasites délétés pour le gène *pfhrp2* observés dans notre échantillonnage présentaient tous les deux un Ct autour de 30 reflétant une parasitémie importante. Comme le décrit Baker *et al.*(24), la grande diversité de séquence de *pfhrp2* n'est pas associée à un fitness spécifique ou un avantage en termes de survie pour les parasites.

L'algorithme d'analyse ainsi défini avait pour objectif d'optimiser les coûts, les quantités de matrice utilisées et de limiter les biais en excluant les échantillons dont la quantité ou la qualité de l'ADN extrait serait trop faible. Cette approche innovante génère des résultats robustes. Un algorithme d'analyse similaire, incluant des PCR en temps réel, vient d'ailleurs d'être publié très récemment (65).

C'est avec ce protocole que la prévalence des parasites délétés pour les gènes *pfhrp2/3* dans trois pays du plateau des Guyanes a été étudiée, à savoir le Venezuela, la Guyane et le Guyana. Cette étude est d'intérêt à plusieurs égards :

- le panel d'isolats analysé est le plus large (n=605) jamais étudié en provenance de cette région sur un temps aussi court,
- elle est la première à analyser des isolats du Venezuela,
- l'analyse des isolats qui y est faite est complète et recherche précisément les délétions des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3*, jonction exon 1-2 et/ou exon 2. Seule une étude antérieure avait analysé les deux régions des gènes *pfhrp2* ainsi que *pfhrp3* sur seulement neuf isolats en provenance du Pérou (26).

L'analyse du gène *pfhrp2* a confirmé l'absence de parasites délétés en Guyane et au Guyana. Ces résultats sont semblables aux résultats antérieurement obtenus en Guyane entre 2009 et 2011, par Trouvay *et al.* (38) et au Guyana, en 2010, par Akinyi *et al.* (39). Ils divergent, par contre, de ceux du Suriname, où Akinyi *et al.* (39) ont décrit entre 2009 et 2011, 14% de *Plasmodium falciparum* délétés pour le gène *pfhrp2*. On peut cependant s'interroger sur la qualité et la quantité des ADN testés dans cette étude car pour confirmer leurs résultats, les auteurs ont utilisé une PCR nichée du gène codant l'ARNr 18S en point final. Ceci a pu conduire à une validation à tort de délétions. Seul un gène monocopie (*pfmsp2*) a été analysé sur ces isolats. Par ailleurs, les mouvements de populations humaines, en lien avec l'orpaillage, entre le Suriname, la Guyane et les états d'Amapa, du Para et du Maranhão au Brésil laissent à penser que les parasites retrouvés dans la zone de transmission commune à ces trois pays devraient être semblables. Les résultats du Suriname sont difficiles à confirmer aujourd'hui du fait de la très faible transmission du paludisme actuellement dans ce pays.

Cette étude a montré la présence, à faible prévalence, 2,6% (IC₉₅ [0 – 6,8]), de parasites délétés au Venezuela. Les parasites délétés au niveau du gène *pfhrp2* le sont également au niveau du gène *pfhrp3*, il s'agit donc de doubles délétions. C'est à l'ouest de l'Amérique du Sud que se concentre la majeure partie des parasites délétés pour le gène *pfhrp2* (cf. §2.2.1.3.4). Entre 1998 et 2011, la prévalence des parasites délétés pour le gène *pfhrp2* observées au Pérou était élevée et comprise entre 21% IC₉₅ [12,7 – 29,3] et 41% IC₉₅ [33,1 – 48,9]) (26, 32, 33). Plus proche du Venezuela, en Colombie, entre 1999 et 2001, la prévalence des parasites délétés pour le gène *pfhrp2* était de 18% IC₉₅ [10,5 – 25,5], parmi lesquels 13% IC₉₅ [6,4 – 19,6] étaient des doubles délétés (*pfhrp2/3*) (34). Entre 2011 et 2012, cette prévalence avait fortement diminuée (p<0,001) et les parasites délétés semblaient avoir disparus 0% (n=112) (34, 35). Le Venezuela, qui fait partie de la région ouest du plateau des Guyanes, est à l'interface entre la Colombie et le Guyana. Il n'est donc pas surprenant qu'en 2016-2017 la prévalence observée des parasites délétés pour le gène *pfhrp2* y soit intermédiaire. Ces résultats devront cependant être confirmés avec des effectifs plus

conséquent car le nombre d'isolats analysés était faible (n=77) alors que l'OMS recommande d'étudier une population de 350 échantillons pour les pays présentant une prévalence de parasite délété pour le gène *pfhrp2* située autour de 3% (31, 47). De plus, une attention particulière doit être portée à la frontière vénézo-colombienne, zone de crise diplomatique et humanitaire, où les flux migratoires sont remaniés en permanence. En effet, les frontières vénézuéliennes ont été fermées en août 2015 pour réfréner l'expansion du paramilitarisme colombien mais en raison de l'ampleur de la crise économique et politique, de nombreuses personnes quittent actuellement clandestinement le Venezuela. Avec l'épidémie de paludisme qui touche actuellement ce pays et l'intensification des échanges avec la Colombie, les parasites délétés de l'ouest pourraient migrer vers le plateau des Guyanes.

L'Amazonie est devenue, par le développement des axes communications fluviaux et routiers Est-Ouest et Nord-Sud, une zone de passage et d'échange pour les Hommes et les marchandises depuis le début des années 2000. Ce véritable carrefour est une alternative à la route Pan-américaine andine déjà existante (66). Le ministère de la santé du Brésil rapporte dans les états du nord-est, du Para et du Maranhão, de nombreux cas de paludisme importés majoritairement diagnostiqués chez des orpailleurs et provenant des pays proches, à savoir de trois pays du plateau des Guyanes : la Guyane, le Guyana, et le Venezuela (67). Cette circulation de populations peut expliquer l'homogénéisation de la population parasitaire dans un contexte global de faible transmission. Cette homogénéisation est observée depuis les années 2000, au niveau du marqueur moléculaire de résistance *pfcr1* associés à la résistance aux antipaludiques (amino-4-quinoléines) sur le plateau des Guyanes. Le mutant *pfcr1* de type 7G8 (SVMNT) a ainsi atteint un état de fixation (>94%) à la faveur également de la très forte pression médicamenteuse exercée par la chloroquine durant la deuxième moitié du XX^{ème} siècle (68–71). Cette fixation s'observe également dans notre échantillonnage de parasites délétés qui présentent à 97,4% une séquence SVMNT. Par ailleurs, l'étude de 65 séquences du gène *pfhrp2* a montré une diversité protéique limitée chez les isolats du plateau des Guyanes. Ces séquences (n=62) ont pu être regroupées en cinq profils parmi lesquels trois, 1c, 1d et 2, avaient déjà été décrits par Trouvay *et al* (38) sur des isolats de Guyane entre 2009 et 2011. Pour la Guyane, les séquences étaient similaires entre les deux études avec une majorité d'isolats appartenant au groupe 1 : 75,8% IC₉₅ [60,5 – 91,5] en 2009-2011 et 89,2% IC₉₅ [78,9 – 99,1] en 2015-2017 (p=0.13). Au Guyana, seul 53,8% IC₉₅ [33,8 – 72,2] des isolats appartenait à ce groupe 1 (p<0,01). Ceci peut être le reflet des liens Est (Guyane/Suriname) et Ouest (Guyana/Venezuela) unissant les différents pays au sein même du plateau des Guyanes.

Par ailleurs, l'Amazonie est devenue, par la porosité de ses frontières et ses connexions avec les autres zones de transit que sont l'Equateur et le Pérou, une plaque tournante de l'immigration haïtienne comme africaine et asiatique (66). Lors de l'étude des séquences du gène *pfhrp2*, trois séquences se distinguaient en restant inclassables. En recherchant dans les fiches de renseignements cliniques il a été possible de déterminer qu'un isolat provenait du Cameroun, un des Philippines et un autre d'Haïti (S174). Pour ce dernier, seul isolat délété pour le gène *pfhrp3* de Guyane, l'analyse du gène *pfcr1* a mis en évidence une séquence CVMNK aux positions 72 à 76 confirmant ainsi l'origine géographique différente de ce parasite (28).

L'analyse du gène *pfhrp3* a montré quant à elle 39,0% IC₉₅ [28,1 – 49,9] de parasites délétés au Venezuela. Cette prévalence est similaire ($p = 0,881$) à celle décrite en Colombie, en 2011-2012 (45,0% IC₉₅ [35,8 – 54,2]) (35). En revanche on observe une diminution significative du nombre de parasites délétés pour le gène *pfhrp3* en Guyane passant de 4,5 % IC₉₅ [1,8 – 7,2] en 2009-2011 à 0,5% IC₉₅ [0 – 1,5] en 2014-2016 ($p < 0,01$). Aucune différence significative n'a été observée au Guyana entre 2010 et 2016 : 0% en 2010 (39) vs 3% en 2016 IC₉₅ [0,9% - 5,1%] ($p = 0,08$).

Parmi les 39 isolats délétés pour le gène *pfhrp3* du plateau des Guyanes, 77% présentaient une délétion totale de ce gène et 23% une délétion partielle. Ces différents types de délétions ont déjà été décrits par Gamboa *et al.*(26), seuls auteurs à avoir étudié les deux parties du gène *pfhrp3* sur neuf isolats du Pérou. Pour connaître l'étendue des délétions *pfhrp3* et mettre en évidence les points de cassure, l'analyse des gènes adjacents aurait dû être conduite (tout comme pour *pfhrp2*) mais n'a pu se faire faute de temps. Par ailleurs, un dosage ELISA de protéine Pf-HRP3 permettrait de vérifier l'absence d'expression protéique, notamment chez les isolats présentant des délétions partielles.

En présence de délétions et compte tenu de la réactivité croisée entre Pf-HRP2 et Pf-HRP3, les parasites délétés au niveau du gène *pfhrp2* sans délétion associée du gène *pfhrp3* peuvent dans certains cas mais avec une faible sensibilité être détectés par les TDR basés sur Pf-HRP2, car ces protéines ont en commun plusieurs motifs, entre autres les motifs 1, 2, 4, 7 et 20 (24). Le plus souvent, seuls les parasites doubles délétés ne sont pas détectés par les TDR (72). Ainsi, on peut imaginer qu'une délétion du gène *pfhrp3* isolée pourrait entraîner une diminution de la sensibilité des TDR. Ceci n'a pas été mis en évidence *in vitro* lors de la comparaison des performances d'un TDR ultrasensible avec un TDR dit « classique » basés sur Pf-HRP2. En effet, la limite de détection des TDR classiques et ultrasensibles ne semble

pas impactée par la présence d'une délétion du gène *pfhrp3* dès lors où le gène *pfhrp2* est présent (72).

En conclusion, les tests de diagnostic rapide combinés basés sur Pf-HRP2 pour détecter *P. falciparum* restent pertinents en Guyane et au Guyana. Au Venezuela, frontière ouest du plateau des Guyanes et proche de la zone andine de l'Amazonie où des parasites délétés pour le gène *pfhrp2* ont été décrits, des réserves peuvent être émises quant à l'utilisation de TDR basé sur Pf-HRP2. S'ils doivent l'être, les TDR combinés sont à privilégier et une surveillance constante est requise. Fort heureusement, dans ce pays, la microscopie reste l'outil diagnostique de première intention. L'épidémie de paludisme touchant actuellement le pays pourrait cependant remettre en question cette organisation du fait d'un engorgement certain des structures de diagnostic.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. World Health Organization, Global Malaria Programme. World malaria report 2017. 2017.
2. Sanchez JD. Report on the Situation of Malaria in the Americas 2014 | PAHO WHO. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2016.
Disponible sur: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12851%3Areport-on-the-situation-of-malaria-in-the-americas-2014&catid=1233%3Amalaria-program&Itemid=42230&lang=en
3. Singh B, Daneshvar C. Human Infections and Detection of *Plasmodium knowlesi*. Clin Microbiol Rev . avr 2013;26(2):165-84.
Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3623376/>
4. Mouchet J, Carnevale P, Manguin S. Biodiversity of Malaria in the World. John Libbey Eurotext; 2008. 427 p.
5. Sinka ME, Rubio-Palis Y, Manguin S, Patil AP, Temperley WH, Gething PW, et al. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in the Americas: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. Parasit Vectors. 16 août 2010;3:72.
6. Vezenegho SB, Adde A, Pommier de Santi V, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, et al. High malaria transmission in a forested malaria focus in French Guiana: How can exophagic *Anopheles darlingi* thwart vector control and prevention measures? Mem Inst Oswaldo Cruz. sept 2016;111(9):561-9.
7. Moreno JE, Rubio-Palis Y, Páez E, Pérez E, Sánchez V, Vaccari E. Malaria entomological inoculation rates in gold mining areas of Southern Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. août 2009;104(5):764-8.
8. Dusfour I, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, Girod R. Incrimination of *Anopheles (Anopheles) intermedius Peryassú*, *An. (Nyssorhynchus) nuneztovari Gabaldón*, *An. (Nys.) oswaldoi Peryassú* as natural vectors of *Plasmodium falciparum* in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. mai 2012;107(3):429-32.
9. Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJM, Targett GAT. Malaria. Lancet. 23 avr 2005;365(9469):1487-98.
10. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. Lancet. 22 févr 2014;383(9918):723-35.
11. Haut conseil de la santé publique H. Avis relatif aux recommandations de prévention du paludisme pour les voyageurs. Paris; 2015.
12. OMS | Paludisme. WHO.
Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/fr/>
13. Groupe recommandations de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF). Prise en charge et prévention du paludisme d'importation. Mise à jour 2017 des recommandations pour la pratique clinique 2007. 2017;

14. Gwer S, Newton CRJC, Berkley JA. Over-Diagnosis and Co-Morbidity of Severe Malaria in African Children: A Guide for Clinicians. American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 2007.
Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1699/>
15. WHO | Parasitological confirmation of malaria diagnosis. WHO.
Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241599412/en/>
16. Haute Autorité de Santé. Évaluation des actes de diagnostic biologique des infections à *Plasmodium*. 2016.
Disponible sur: https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_2636855/fr/evaluation-des-actes-de-diagnostic-biologique-des-infections-a-plasmodium
17. Houzé S. Les tests de diagnostic rapide pour le paludisme. Bull Soc Pathol Exot. févr 2017;110(1):49-54.
18. OMS | Accès universel aux tests diagnostiques du paludisme. Manuel pratique. WHO.
Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241502092/fr/>
19. OMS | Note d'orientation sur le diagnostic du paludisme dans les contextes de faible transmission. 2014.
Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/policy-brief-diagnosis-low-transmission-settings/fr/>
20. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, et al. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol. oct 1993;61(2):315-20.
21. OMS | Bonnes pratiques relatives au choix et à l'achat des tests de diagnostic rapide du paludisme. WHO.
Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241501125/fr/>
22. WHO | Malaria rapid diagnostic test performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: round 7 (2015-2016). WHO.
Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/978924151268/en/>
23. Mouatcho JC, Goldring JPD. Malaria rapid diagnostic tests: challenges and prospects. J Med Microbiol. oct 2013;62(Pt 10):1491-505.
24. Baker J, Ho M-F, Pelecanos A, Gatton M, Chen N, Abdullah S, et al. Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. Malar J. 17 mai 2010;9:129.
25. Bruneel F, Tubach F, Mira J-P, Houze S, Gibot S, Huisse M-G, et al. Imported *falciparum* malaria in adults: host- and parasite-related factors associated with severity. The French prospective multicenter PALUREA cohort study. Intensive Care Med. oct 2016;42(10):1588-96.
26. Gamboa D, Ho M-F, Bendezu J, Torres K, Chiodini PL, Barnwell JW, et al. A Large Proportion of *P. falciparum* Isolates in the Amazon Region of Peru Lack *pfhrp2* and *pfhrp3*: Implications for Malaria Rapid Diagnostic Tests. PLOS ONE. 25 janv 2010;5(1):e8091.
Disponible sur: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0008091>

27. Cheng Q, Gatton ML, Barnwell J, Chiodini P, McCarthy J, Bell D, et al. *Plasmodium falciparum* parasites lacking histidine-rich protein 2 and 3: a review and recommendations for accurate reporting. *Malar J.* 22 juill 2014;13:283.
28. Pelleau S, Moss EL, Dhingra SK, Volney B, Casteras J, Gabryszewski SJ, et al. Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: Reversal of chloroquine resistance by acquisition of a mutation in *pfert*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 15 sept 2015;112(37):11672-7.
29. World Health Organization. *P. falciparum hrp2/3* gene deletions. Situation Update, Geneva, Switzerland; 2017 mars.
Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/mpac/mpac-mar2017-hrp2-3-deletions-session7.pdf>
30. World Health Organization. *P. falciparum hrp2/3* gene deletions. Conclusions and recommendations of a technical consultation. Geneva, Switzerland; 2016 juill.
Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/mpac/mpac-sept2016-hrp2-consultation-short-report-session7.pdf>
31. Jane Cunningham. Update on *Plasmodium falciparum hrp2/3* gene deletions. Global Malaria Programme - OMS; 2017 mars.
Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/mpac/mpac-mar2017-hrp2-3-deletions-session7-presentation.pdf>
32. Akinyi S, Hayden T, Gamboa D, Torres K, Bendezu J, Abdallah JF, et al. Multiple genetic origins of histidine-rich protein 2 gene deletion in *Plasmodium falciparum* parasites from Peru. *Sci Rep.* 30 sept 2013;3:2797.
33. Maltha J, Gamboa D, Bendezu J, Sanchez L, Cnops L, Gillet P, et al. Rapid diagnostic tests for malaria diagnosis in the Peruvian Amazon: impact of *pfhrp2* gene deletions and cross-reactions. *PLoS ONE.* 2012;7(8):e43094.
34. Murillo Solano C, Akinyi Okoth S, Abdallah JF, Pava Z, Dorado E, Incardona S, et al. Deletion of *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (*pfhrp2*) and Histidine-Rich Protein 3 (*pfhrp3*) Genes in Colombian Parasites. *PLoS ONE.* 2015;10(7):e0131576.
35. Dorado EJ, Okoth SA, Montenegro LM, Diaz G, Barnwell JW, Udhayakumar V, et al. Genetic Characterisation of *Plasmodium falciparum* Isolates with Deletion of the *pfhrp2* and/or *pfhrp3* Genes in Colombia: The Amazon Region, a Challenge for Malaria Diagnosis and Control. *PLoS ONE.* 2016;11(9):e0163137.
36. Viana GMR, Okoth SA, Silva-Flannery L, Barbosa DRL, Oliveira AM de, Goldman IF, et al. Histidine-rich protein 2 (*pfhrp2*) and *pfhrp3* gene deletions in *Plasmodium falciparum* isolates from select sites in Brazil and Bolivia. *PLOS ONE.* 16 mars 2017;12(3):e0171150.
Disponible sur: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0171150>
37. Abdallah JF, Okoth SA, Fontecha GA, Torres REM, Banegas EI, Matute ML, et al. Prevalence of *pfhrp2* and *pfhrp3* gene deletions in Puerto Lempira, Honduras. *Malar J.* 21 janv 2015;14.
Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4308922/>
38. Trouvay M, Palazon G, Berger F, Volney B, Blanchet D, Faway E, et al. High Performance of Histidine-Rich Protein 2 Based Rapid Diagnostic Tests in French Guiana are Explained by the Absence of *pfhrp2* Gene Deletion in *P. falciparum*. *PLOS ONE.* 23 sept 2013;8(9):e74269.

Disponible sur: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0074269>

39. Akinyi Okoth S, Abdallah JF, Ceron N, Adhin MR, Chandrabose J, Krishnalall K, et al. Variation in *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2 (*Pfhrp2*) and *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 3 (*Pfhrp3*) Gene Deletions in Guyana and Suriname. PLoS ONE. 2015;10(5):e0126805.
40. Bharti PK, Chandel HS, Ahmad A, Krishna S, Udhayakumar V, Singh N. Prevalence of *pfhrp2* and/or *pfhrp3* Gene Deletion in *Plasmodium falciparum* Population in Eight Highly Endemic States in India. PLoS ONE. 2016;11(8):e0157949.
41. Li P, Xing H, Zhao Z, Yang Z, Cao Y, Li W, et al. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in the China-Myanmar border area. Acta Trop. déc 2015;152:26-31.
42. Koita OA, Doumbo OK, Ouattara A, Tall LK, Konaré A, Diakité M, et al. False-Negative Rapid Diagnostic Tests for Malaria and Deletion of the Histidine-Rich Repeat Region of the *hrp2* Gene. Am J Trop Med Hyg. 1 févr 2012;86(2):194-8.
Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3269266/>
43. Wurtz N, Fall B, Bui K, Pascual A, Fall M, Camara C, et al. *Pfhrp2* and *pfhrp3* polymorphisms in *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal: impact on rapid malaria diagnostic tests. Malar J. 24 janv 2013;12:34.
44. Kozycki CT, Umulisa N, Rulisa S, Mwikarago EI, Musabyimana JP, Habimana JP, et al. False-negative malaria rapid diagnostic tests in Rwanda: impact of *Plasmodium falciparum* isolates lacking *hrp2* and declining malaria transmission. Malar J. 20 2017;16(1):123.
45. Parr JB, Verity R, Doctor SM, Janko M, Carey-Ewend K, Turman BJ, et al. *Pfhrp2*-Deleted *Plasmodium falciparum* Parasites in the Democratic Republic of the Congo: A National Cross-sectional Survey. J Infect Dis. 14 nov 2016;
46. Menegon M, L'Episcopia M, Nurahmed AM, Talha AA, Nour BYM, Severini C. Identification of *Plasmodium falciparum* isolates lacking histidine-rich protein 2 and 3 in Eritrea. Infect Genet Evol. nov 2017;55:131-4.
47. World Health Organization. Protocol for estimating the prevalence of *pfhrp2/pfhrp3* gene deletions among symptomatic *falciparum* patients with false-negative RDT results. 2018 févr. Disponible sur: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/260140/1/WHO-CDS-GMP-2018.03-eng.pdf>
48. Musset L, Pelleau S, Girod R, Ardillon V, Carvalho L, Dusfour I, et al. Malaria on the Guiana Shield: a review of the situation in French Guiana. Mem Inst Oswaldo Cruz. août 2014;109(5):525-33.
Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4156445/>
49. de Vilhena Silva G. Litiges transfrontaliers sur le plateau des Guyanes, enjeux géopolitiques à l'interface des mondes amazoniens et caribéens. L'Espace Politique Revue en ligne de géographie politique et de géopolitique 18 avr 2017;(31).
Disponible sur: <http://journals.openedition.org/espacepolitique/4242>

50. Hammond DS, Gond V, de Thoisy B, Forget P-M, DeDijn BPE. Causes and consequences of a tropical forest gold rush in the Guiana Shield, South America. *Ambio*. déc 2007;36(8):661-70.
51. Small-Scale Gold Mining in the Amazon.
Disponible sur: <http://studylib.net/doc/8333349/small-scale-gold-mining-in-the-amazon>
52. Douine M, Musset L, Corlin F, Pelleau S, Pasquier J, Mutricy L, et al. Prevalence of *Plasmodium spp.* in illegal gold miners in French Guiana in 2015: a hidden but critical malaria reservoir. *Malar J*. 9 juin 2016;15.
Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4899929/>
53. Recht J, Siqueira AM, Monteiro WM, Herrera SM, Herrera S, Lacerda MVG. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. *Malar J*. 4 juill 2017;16.
Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5496604/>
54. Ardillon V. Situation épidémiologique du paludisme en Guyane. Point au 20 janvier 2017. 2018.
Disponible sur: <http://invs.santepubliquefrance.fr/fr/Publications-et-outils/Points-epidemiologiques/Tous-les-numeros/Guyane/2017/Situation-epidemiologique-du-paludisme-en-Guyane.-Point-au-20-janvier-2017>
55. Mutricy R, Mosnier E, Guarmit B, Douine M, Renaud M, Ville M, et al. Le paludisme en Guyane Française, deux populations : l'une liée à l'activité d'orpaillage et celle des peuples autochtones. *JNI*; 2015.
Disponible sur: http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/JNI/JNI15/posters/2015-poster-JNI-TROP_03.pdf
56. Douine M, Mosnier E, Le Hingrat Q, Charpentier C, Corlin F, Hureau L, et al. Illegal gold miners in French Guiana: a neglected population with poor health. *BMC Public Health*. 17 juill 2017;18.
Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5513330/>
57. Plan de lutte contre le paludisme en Guyane. 2015-2018.
Disponible sur: <https://www.guyane.ars.sante.fr/system/files/2017-06/palu%20plan%202015-2018.pdf>
58. Bilan d'activité des Centres Délocalisés de Prévention et de Soins de Guyane. 2017.
59. World Health Organization. Country profiles- Guyana. 2017.
Disponible sur: http://www.who.int/malaria/publications/country-profiles/profile_guy_en.pdf
60. Venezuela • Fiche pays • PopulationData.net. PopulationData.net.
Disponible sur: <https://www.populationdata.net/pays/venezuela/>
61. Sullivan DJ, Ayala YM, Goldberg DE. An unexpected 5' untranslated intron in the *P. falciparum* genes for histidine-rich proteins II and III. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 20 déc 1996;83(2):247-51.
Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016685196027685>

62. Shokoples SE, Ndao M, Kowalewska-Grochowska K, Yanow SK. Multiplexed Real-Time PCR Assay for Discrimination of *Plasmodium* Species with Improved Sensitivity for Mixed Infections. *J Clin Microbiol.* avr 2009;47(4):975-80.
Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2668309/>
63. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell.* oct 2000;6(4):861-71.
64. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2 janv 2014;505(7481):50-5.
65. Parr JB, Anderson O, Juliano JJ, Meshnick SR. Streamlined, PCR-based testing for *pfhrp2*- and *pfhrp3*-negative *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 2 avr 2018;17(1):137.
66. Granger S. L'Amazonie brésilienne, nouvelle interface migratoire entre les caraïbes et l'Amérique du sud ? 2014;
Disponible sur: <http://www.scielo.br/pdf/mercator/v13n1/1676-8329-mercator-13-01-0007.pdf>
67. Ministère de la santé du Brésil. Programme national de lutte contre le paludisme. 2018.
68. Legrand E, Yrinesi J, Ekala M-T, Péneau J, Volney B, Berger F, et al. Discordant temporal evolution of *Pfprt* and *Pfmdr1* genotypes and *Plasmodium falciparum* in vitro drug susceptibility to 4-aminoquinolines after drug policy change in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2012;56(3):1382-9.
69. Best Plummer W, Pinto Pereira LM, Carrington CVF. *Pfprt* and *pfmdr1* alleles associated with chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* from Guyana, South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* juin 2004;99(4):389-92.
70. Chenet SM, Okoth SA, Kelley J, Lucchi N, Huber CS, Vreden S, et al. Molecular Profile of Malaria Drug Resistance Markers of *Plasmodium falciparum* in Suriname. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2017;61(7).
71. Griffing S, Syphard L, Sridaran S, McCollum AM, Mixson-Hayden T, Vinayak S, et al. *pfmdr1* amplification and fixation of *pfprt* chloroquine resistance alleles in *Plasmodium falciparum* in Venezuela. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2010;54(4):1572-9.
72. Das S, Peck RB, Barney R, Jang IK, Kahn M, Zhu M, et al. Performance of an ultra-sensitive *Plasmodium falciparum* HRP2-based rapid diagnostic test with recombinant HRP2, culture parasites, and archived whole blood samples. *Malar J.* 17 mars 2018;17(1):118.

ANNEXES

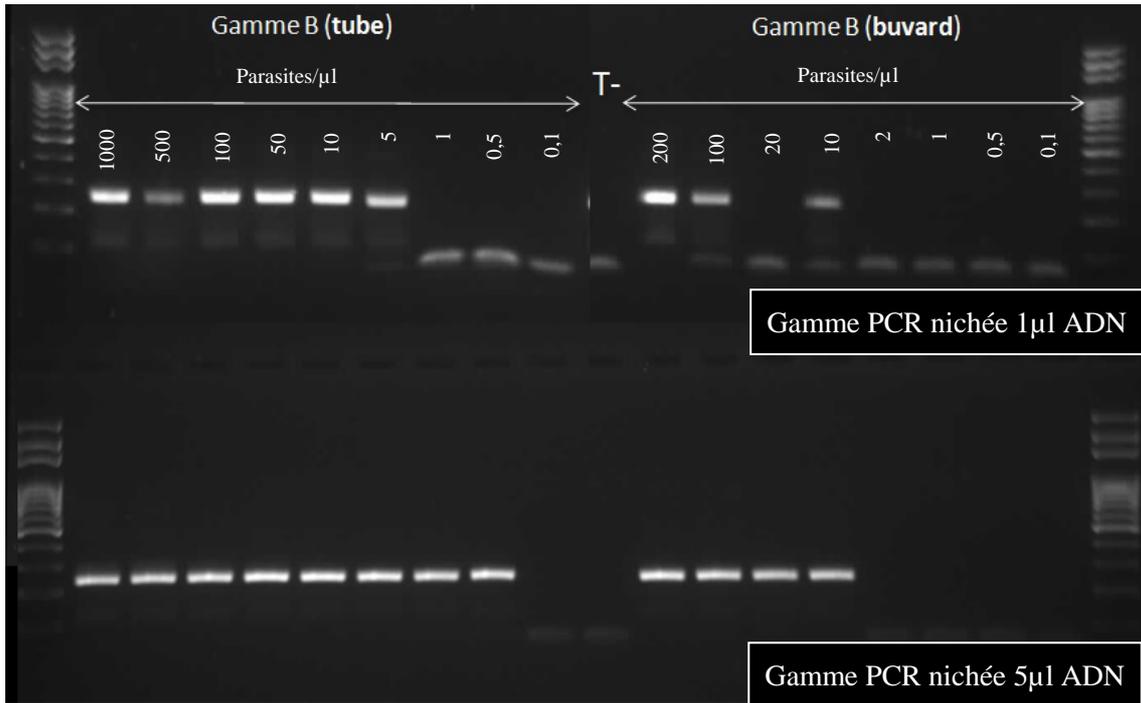


Figure 25- Photo des gammes de sensibilité testées pour la jonction exon 1- 2 du gène *pfhrp2* avec la PCR 2J-.3

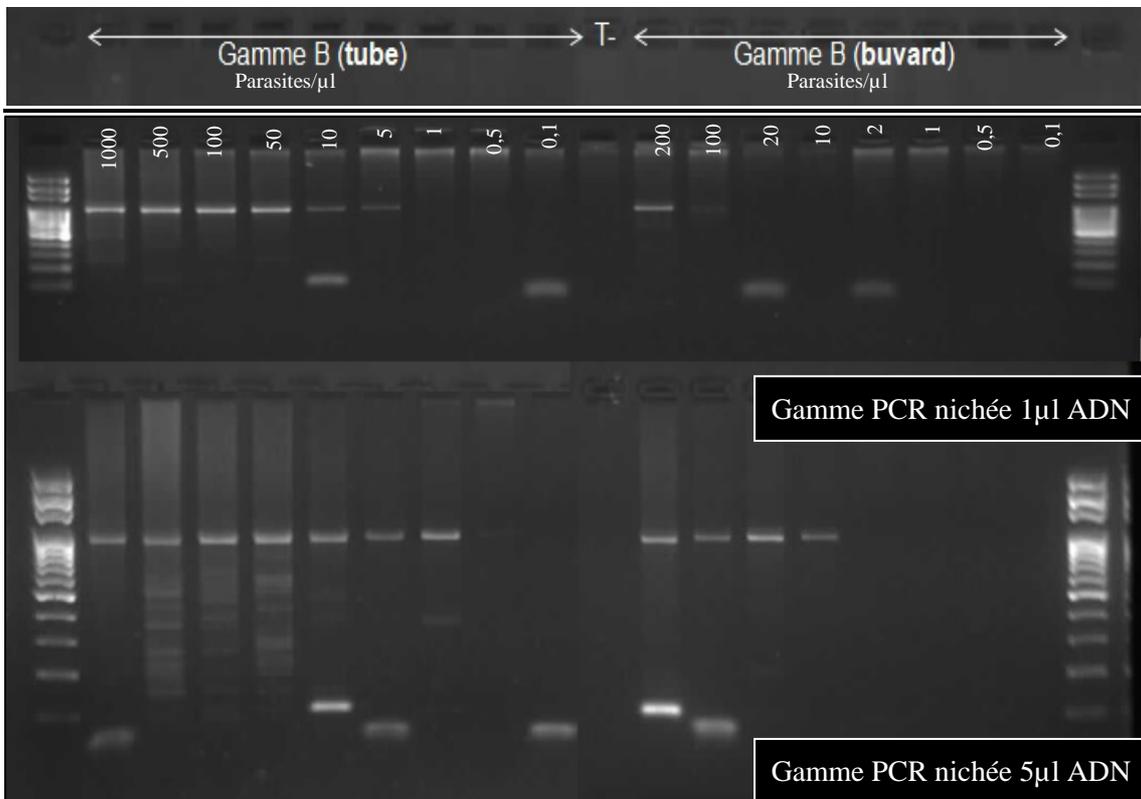


Figure 26- Photo des gammes de sensibilité testées pour l'exon 2 du gène *pfhrp2* avec la PCR 2E-1.

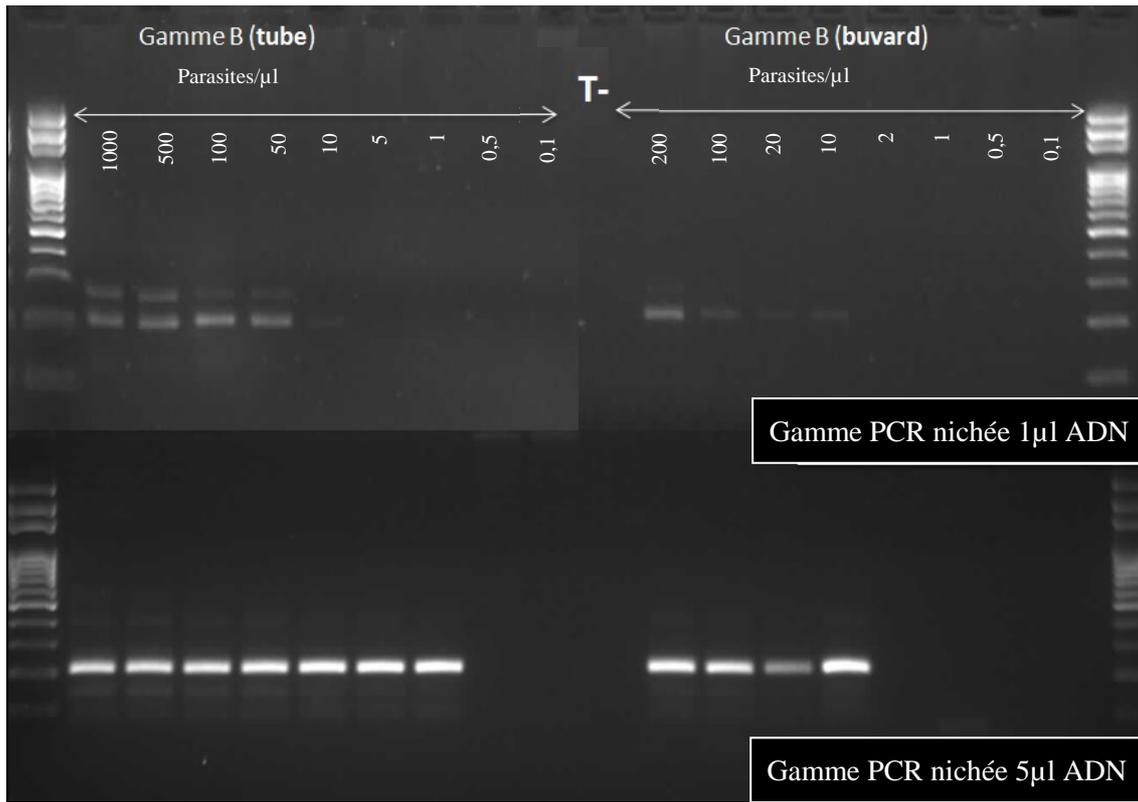


Figure 27- Photo des gammes de sensibilité testées pour la jonction exon1-2 du gène *pfhyp3* avec la PCR 3J-2

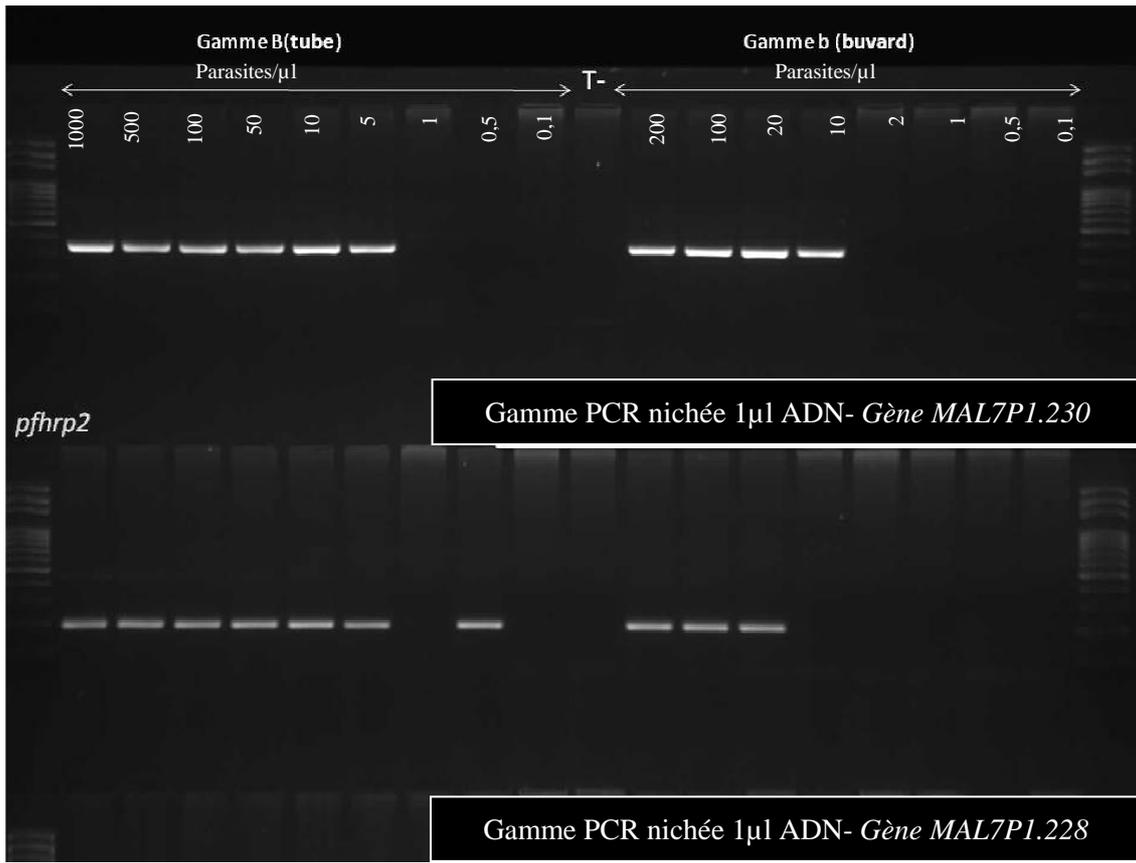


Figure 28- Photo des gammes de sensibilité testées pour les gènes adjacents amont et aval du gène *pfhrp2* avec les PCR 2AM-1 et 2AV-1.

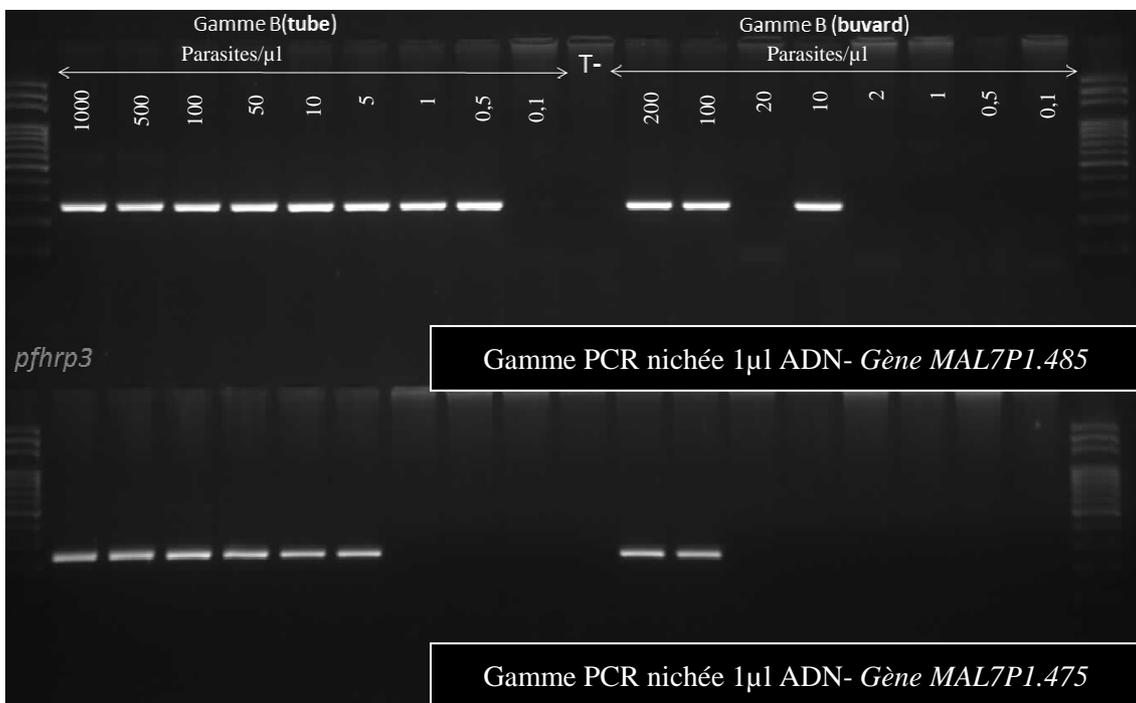


Figure 29- Photo des gammes de sensibilité testées pour les gènes adjacents amont et aval du gène *pfhrp3* avec les PCR 3AM-1 et 3AV-1

SERMENT D'HIPPOCRATE

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

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

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

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

J'informerai les patients de décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer leurs consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.
Je ne me laisserai influencer ni par la recherche du gain ni par la recherche de la gloire.

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

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

Et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances, sans acharnement.

Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

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

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

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

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

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

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

**UNIVERSITE DES ANTILLES
FACULTE DE MEDECINE HYACINTHE BASTARAUD**

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Médecine
(Spécialité - Médecine Spécialisée)

Présentée par :

Melle BERTHELOT Léna

Né(e) le

à

Département :

Pays :

Et

Intitulée *Prévalence des délétions pshrp2 et pshrp3 chez Plasmodium falciparum* sur le plateau des Guyanes

Jury proposé

Président : Mme le Professeur Magalie PIERRE DEMAR

Juges : Mme le Professeur Maryvonne DUYEMES

M le Professeur. Félix DJOSSOU

Mme le Docteur Lise MUSSET

<p>Vu Cayenne, le 26/03/2018 Le Président de Thèse Centre Hospitalier de Cayenne N° FINESS 970302022</p> <p>Professeur Magalie PIERRE DEMAR</p>	<p>Pour accord Pointe-À-Pitre, le 26/03/2018 Le Doyen de la Faculté de Médecine</p> <p>Professeur Raymond CESAIRE</p>
<p align="center">AUTORISE A SOUTENIR ET A IMPRIMER LA THESE</p> <p align="center">Pointe-À-Pitre, le</p> <p align="center">Le président de l'Université des Antilles Pour le Président de l'UA et par délégation Le Vice-Président du Conseil d'Administration</p> <p align="center">Professeur Eustase JANKY</p>	

(1) Cet imprimé doit être obligatoirement dactylographié