

**MEMOIRE
DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury interrégional

Le 22 Novembre 2004

Par Mademoiselle Eve-Alexa BRASSART

Conformément aux dispositions de l'arrêté

Du 10 septembre 1990 tient lieu de :

**THESE
POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

TITRE

**Application de la PCR en temps réel dans le diagnostic des 4 espèces
plasmodiales au laboratoire de Parasitologie de Nantes.**

Etude rétrospective de 2002 à 2004.

JURY

PRESIDENT : Monsieur le Professeur P. LE PAPE

Faculté de Nantes

MEMBRES :

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur M. MIEGEVILLE

Faculté de Nantes

Noms :

Monsieur le Professeur F. RAFFI

Faculté de Nantes

Monsieur le Professeur D. CHABASSE

Faculté d'Angers

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur LE PAPE,

Vous m'avez fait découvrir la parasitologie sur les bancs de la faculté il y a un certain temps déjà, puis les parasitoses tropicales au sein du service ; vous me faites l'honneur de présider ce jury, que cette thèse soit le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur M. MIEGEVILLE,

Pour m'avoir guidée et soutenue pendant la préparation de cette thèse et pour m'avoir chaleureusement accueillie dans le service. Très tôt dans mon internat (3 ans déjà) vous m'avez proposé ce sujet et je suis ravie de l'avoir accepté.

En remerciements pour votre travail, votre patience, votre dynamisme et cette envie de transmettre votre savoir qui m'ont permis d'apprécier particulièrement la Parasitologie et ces deux semestres passés dans le stage. Merci pour le temps que vous consacrez aux internes et pour votre disponibilité.

En souvenir de la puce chique et du miracidium, mes spécialités théâtrales. Que ce travail soit le gage de ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur F. RAFFI,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail et d'être membre de ce jury en tant que spécialiste des maladies infectieuses. Vous me faites l'honneur de consacrer une partie de votre temps précieux pour analyser ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur D. CHABASSE,

Pour votre enseignement dispensé au cours du DES de parasitologie.

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à cette thèse en tant que membre du jury et de vous être déplacé en cette occasion malgré votre emploi du temps chargé. Que cette thèse soit le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

A Madame le Docteur O.MORIN,

Pour m'avoir acceptée à deux reprises au sein de votre service, pour votre enseignement, votre disponibilité et votre accueil chaleureux au sein du laboratoire. L'ambiance agréable au sein du laboratoire est probablement à l'origine de mon sincère intérêt pour cette discipline. Je garde un très bon souvenir de ces deux stages au laboratoire et vous en remercie encore. Merci de m'avoir fait confiance pour ce travail sur le paludisme. Soyez assurée de ma vive reconnaissance et de mon profond respect.

A Laurence ROUILLER, grande spécialiste de la PCR, pour m'avoir initiée à la biologie moléculaire avec patience et pour avoir guidé mes premiers pas dans ce travail de thèse, sincères remerciements.

A Bernard BESSE, autre spécialiste incontesté de la PCR, pour m'avoir conseillée, aidée et soutenue lors de mes déboires de mise au point de cette PCR en temps réel. Merci d'avoir gardé ton calme ! Je t'en suis très reconnaissante.

A mes deux co-internes, Elodie Amirault-Barre et Claire Lecomte, pour m'avoir permis de finir ma thèse à temps, pour leur oreille attentive et leur soutien moral.

A l'ensemble des techniciennes du laboratoire de Parasitologie, Myriam, Martine, Jacqueline, Cécile, Caroline, Nathalie et Christine, pour avoir supporté mes pitreries. Merci de votre accueil et de votre chaleur humaine.

A ma Mère et mon Père, pour leur affection, pour leur soutien inconditionnel dans mes choix tout au long de ces études, pour leurs encouragements qui m'ont permis d'accéder à ce titre, pour que vous soyez fiers de mon travail. Que cette thèse soit le témoignage de ma gratitude et de mon affection profonde.

A mes frères et à ma soeur, pour m'avoir supportée tout au long de mes études, avec mon stress et mon optimisme légendaires.

A mes grands parents, grands oncle et tante, qu'ils veuillent trouver ici l'expression de ma profonde affection.

A mes amis, pour être toujours là quand il faut. En souvenir de toutes ces années...

Sommaire :

Partie I : Généralités 12

Chapitre 1 : Paludisme..... 12

I.	Introduction	13
II.	Définition.....	14
III.	Historique.....	15
IV.	<i>Plasmodium</i>	16
	1. <i>Plasmodium falciparum</i>	16
	2. <i>Plasmodium vivax</i>	17
	3. <i>Plasmodium ovale</i>	17
	4. <i>Plasmodium malariae</i>	17
V.	Cycle	18
	1. Agent vecteur.....	18
	2. Cycle chez l'homme.....	19
	a. Contamination.....	19
	b. Cycle exo-érythrocytaire = intra-hépatique.....	19
	c. Cycle érythrocytaire.....	20
	d. Sporogonie.....	20
	3. Cycle chez l'anophèle (cycle sexué ou sporogonique).....	21
	4. Mode de transmission.....	21
VI.	Répartition géographique.....	22
VII.	Modalités épidémiologiques.....	25
	1. Indices paludométriques.....	25
	2. Rôle de l'immunité.....	26

VIII. Clinique.....	26
1. Le paludisme de primo invasion à <i>Plasmodium falciparum</i>	26
a. Incubation.....	26
b. Invasion.....	27
2. Accès palustres à fièvre périodique.....	27
a. Accès palustre.....	28
b. Splénomégalie et anémie.....	29
3. Complications.....	29
a. Accès pernicieux.....	29
i. Début.....	30
ii. Etat.....	30
iii. Evolution.....	32
iv. Pronostic.....	32
b. Paludisme viscéral évolutif.....	34
c. Fièvre bilieuse hémoglobinurique	34
IX. Diagnostic biologique.....	35
1. Signes d'orientation.....	35
2. Diagnostic de certitude.....	35
a. Le prélèvement de sang.....	35
b. Techniques microscopiques.....	36
i. Goutte épaisse.....	36
ii. Frottis sanguin.....	37
c. Recherche d'antigènes parasitaires.....	38
i. QBC malaria test.....	38
ii. Détection de l'HRP 2.....	38
iii. Détection de la p LDH (lactate déshydrogénase parasitaire).....	40
d. PCR.....	40
e. Diagnostic indirect = sérologique.....	41

f. Diagnostic d'espèces.....	42
i. Aspect général du frottis.....	42
ii. Aspect de l'hématie.....	43
iii. Aspect morphologique du parasite.....	44
X. Traitement.....	46
1. Accès pernicieux.....	46
2. Accès simple.....	47
a. A <i>P.falciparum</i>	47
b. A <i>P.ovale</i> , <i>P.vivax</i> , <i>P.malariae</i>	47
c. Remarques.....	48
XI. Prophylaxie.....	49
1. Répartition des zones de chimiorésistance selon l'OMS.....	49
2. Prophylaxie individuelle.....	50
a. Réduire le risque de piqûres de moustiques.....	50
b. Prendre une chimioprophylaxie.....	50

Chapitre 2 : la PCR en temps réel..... 53

Introduction.....	53
I. Principe.....	54
1. Rappels sur la PCR.....	54
2. Technologies de la PCR en temps réel.....	57
a. Technologies utilisant des intercalants.....	57
b. Technologies utilisant des sondes.....	58
II. Appareillage.....	60
1. Les systèmes.....	60
a. Systèmes haut débit.....	61
b. Systèmes à moindre débit mais plus flexibles.....	61
2. Thermocycleur et module de détection.....	62

III.	Présentation et interprétation des résultats.....	63
IV.	Applications de la PCR en temps réel.....	65
1.	Microbiologie clinique.....	65
2.	Oncologie clinique.....	66
3.	Expression génique.....	66

Partie II : Application de la PCR en temps réel dans le diagnostic des 4 espèces plasmodiales au laboratoire de Parasitologie de Nantes	 67
--	----------

Introduction.....	68
I. Mise au point de la PCR en temps réel dans le diagnostic des différentes espèces.....	70
A. Matériel et méthode.....	71
1. Source d'ADN.....	71
2. Extraction de l'ADN.....	72
3. Technique d'amplification génique utilisée : PCR en temps réel avec agent intercalant.....	73
4. Conditions de la réaction de PCR en temps réel.....	74
a. Les amorces.....	74
b. La Taq polymérase.....	76
c. Les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP).....	77
d. Le tampon 10X.....	77
e. Le MgCl ₂	78
f. SYBR®Green.....	78
g. Les échantillons d'ADN.....	79
h. Préparation du Mix.....	79
i. Automatisation et cycle de température.....	80

B. Résultats.....	81
1. Mise au point des conditions opératoires de la PCR simplex.....	81
a. <i>Plasmodium falciparum</i> , β globine et SSU.....	82
b. <i>Plasmodium ovale</i>	84
c. <i>Plasmodium malariae</i>	85
d. <i>Plasmodium vivax</i>	87
2. Mise au point des conditions opératoires de la PCR multiplex.....	89
3. Evaluation de la technique.....	95
a. Répétabilité.....	96
b. Reproductibilité.....	101
c. Spécificité.....	106
4. Application de la PCR en temps réel.....	108
a. Résultats obtenus en PCR simplex	108
b. Résultats obtenus en PCR multiplex.....	112
II. Discussion.....	114
Partie III : Annexes	125
Annexe I : Planche de morphologie de <i>P.falciparum</i> et <i>P.vivax</i>	126
Annexe II : Planche de morphologie de <i>P.ovale</i> et <i>P.malariae</i>	127
Annexe III : Zones de chimiorésistance des continents africain et américain.....	128
Annexe IV : Zones de chimiorésistance du continent asiatique et de l'Océanie.....	129
Annexe V : Mode opératoire de l'extraction de l'ADN.....	130
Annexe VI : Principe de fonctionnement du SYBR®Green.....	131
Annexe VII : Description et fonctionnement du Rotor Gene.....	132
Annexe VIII : Courbe de fusion de SSU et <i>P.falciparum</i>	133
Annexe IX : Courbe de fluorescence de SSU et <i>P.falciparum</i>	134
Annexe X : Courbe de fusion de <i>P.ovale</i>	135
Annexe XI : Courbe de fusion de <i>P.malariae</i>	136
Annexe XII : Courbe de fusion de <i>P.vivax</i>	137
Annexe XIII : Protocole opératoire de la PCR simplex en temps réel pour le diagnostic des espèces plasmodiales.....	138
Annexe XIV : Protocole opératoire de la PCR multiplex en temps réel.....	142
Annexe XV : Résultats complets de l'étude.....	145
Annexe XVI : Courbe de fusion de la PCR multiplex.....	148
Annexe XVII : Arbre décisionnel du diagnostic du paludisme.....	149
Références bibliographiques.....	150

Table des tableaux :

Tableau 1 : Signes de gravité d'un paludisme à <i>P. falciparum</i> chez l'adulte et l'enfant (accès grave ou pernicieux), d'après l'OMS.....	33
Tableau 2 : Caractéristiques des amorces (Laboratoire Eurogentec).....	76
Tableau 3 : Premiers essais de mise au point de la PCR <i>P. falciparum</i>	82
Tableau 4 : Essais de mise au point des PCR SSU et <i>P.falciparum</i>	83
Tableau 5 : Essais de température pour <i>P.ovale</i> : Ct obtenus (en nombre de cycles).....	84
Tableau 6 : Gamme d'étalonnage de MgCl ₂ pour <i>P.ovale</i> : Ct obtenus	85
Tableau 7 : Ct obtenus à la température d'hybridation de 64°C pour <i>P.malariae</i> (en nombre de cycles).....	86
Tableau 8 : Gamme de MgCl ₂ pour <i>P.malariae</i> : Ct obtenus (en nombre de cycles).....	86
Tableau 9 : Essais à 58°C pour <i>P.vivax</i> : Ct obtenus en nombre de cycles.....	87
Tableau 10 : Essais de température et de concentration de MgCl ₂ pour <i>P.vivax</i> : Ct obtenus en nombre de cycles	88
Tableau 11 : Essai dans les conditions de la PCR simplex : 63°C et 3 mM MgCl ₂	91
Tableau 12 : Essais de température et de concentration de MgCl ₂ pour la PCR Multiplex...	93
Tableau 13 : Mise au point de la PCR multiplex avec BGO7/BGO8.....	94
Tableau 14 : Répétabilité des PCR SSU et <i>P.falciparum</i>	96
Tableau 15 : Répétabilité des PCR SSU et <i>P.falciparum</i> : Moyennes, variances, écart-types et coefficients de variation.....	97
Tableau 16 : Essais de répétabilité de la PCR <i>P.ovale</i>	98
Tableau 17: Répétabilité de la PCR <i>P.ovale</i> : Moyennes, variances, écart-types et coefficients de variation.....	98
Tableau 18: Essais de répétabilité de la PCR <i>P.malariae</i>	99
Tableau 19: Répétabilité de la PCR <i>P.malariae</i> : Moyennes, variances, écart-types et coefficients de variation	99
Tableau 20: Répétabilité de la PCR <i>P.vivax</i>	100
Tableau 21: Répétabilité de la PCR <i>P.vivax</i> : Moyennes, variances, écart-types et coefficients de variation	100
Tableau 22: Reproductibilité de la PCR SSU et <i>P.falciparum</i>	101
Tableau 23: Coefficients de variation des tests de reproductibilité.....	102
Tableau 24: Reproductibilité de la PCR <i>P.ovale</i>	102
Tableau 25: Reproductibilité de la PCR <i>P.ovale</i> : Moyennes, variances, écart-types et coefficients de variation	103
Tableau 26: Reproductibilité de la PCR <i>P.malariae</i>	103
Tableau 27: Reproductibilité de la PCR <i>P.malariae</i> : Moyennes, variances, écart-types et coefficients de variation.....	104
Tableau 28: Reproductibilité de la PCR <i>P.vivax</i>	104
Tableau 29: Reproductibilité de la PCR <i>P.vivax</i> : Moyennes, variances, écart-types et coefficients de variation.....	105
Tableau 30: Comparaison des résultats obtenus par PCR en temps réel versus technique classique.....	109
Tableau 31: Répartition des espèces plasmodiales.....	109
Tableau 32: Résultats semi quantitatifs de la PCR <i>Plasmodium falciparum</i>	111
Tableau 33 : Résultats de la PCR multiplex.....	112

Table des figures :

Figure 1 : Cycle du parasite Plasmodium (d'après N. Finot)	20
Figure 2. Répartition géographique du paludisme (d'après l'OMS 2002).....	24
Figure 3: Suivi en temps réel d'une réaction PCR. (<i>Tse et al.2003</i>).....	63
Figure 4 : Gel de polyacrylamide 9%	106
Figure 5 : Courbe d'évaluation semi quantitative de la parasitémie	111

Liste des abréviations :

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

Ct: cycle threshold ou cycle seuil

DMSO: diméthyl sulfoxyde

dNTP : Désoxynucléotides tri phosphate

EDTA : Ethylène Diéthyl amine

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

GE : goutte épaisse

HPM : Hématies parasitées par microlitre

HRP-2 : Histidine rich protein 2

ICT: test MalariaQuick®: (ICT Diagnostics, Fumouze)

IP : indice plasmodique

IS : indice splénique

IV : intraveineuse

LCR : Liquide céphalo-rachidien

MGG: May Grünwald Giemsa

Mg²⁺: Magnésium cation divalent

PCR: Polymerase chain reaction

P.falciparum; *P.falci*: *Plasmodium falciparum*

p LDH : lactate déshydrogénase parasitaire

P.malariae: *Plasmodium malariae*

P.ovale: *Plasmodium ovale*

P.vivax: *Plasmodium vivax*

RT-PCR: reverse transcriptase PCR

SG: SYBR Green®

SPILF : Société française de pathologie infectieuse de langue française

T_m : température de fusion

Partie I : Généralités :

Chapitre 1 : Paludisme

I. Introduction.

Le paludisme, ou malaria est la maladie infectieuse la plus mortelle. On évalue à 2 milliards le nombre de personnes à risque, soit 40% de la population mondiale, répartie dans une centaine de pays, tous en zone intertropicale. L'estimation annuelle est de 250 à 400 millions de cas de paludisme et 1 à 2,5 millions de décès par an. (*Pasteur. Le paludisme*)

L'Afrique sud-Saharienne (région afro tropicale) est la zone la plus touchée avec 85% du nombre total des cas de paludisme.

Les moyens de lutte existants sont les médicaments anti-paludéens et la lutte contre les moustiques vecteurs du parasite *Plasmodium*. Mais la situation est d'autant plus préoccupante que depuis plusieurs années, les parasites développent de plus en plus de résistances aux médicaments, et que les moustiques développent des résistances aux insecticides. Aucun vaccin n'est pour l'instant disponible.

II. Définitions :

Le paludisme ou malaria est une parasitose due à des hématozoaires du genre *Plasmodium* et est transmise par des moustiques femelles du genre *Anopheles*. Cette pathologie se présente comme une maladie fébrile, hémolysante, qui constitue un fléau mondial. (*Danis Martin et al; 1991*)

III. Historique :

L'histoire du paludisme se confond avec celle de l'humanité ; dans la littérature on retrouve la trace de fièvres intermittentes et parfois saisonnières d'étiologie inconnue. Parmi les nombreuses croyances populaires l'air émanant des marais (malaria) a longtemps été désigné comme la source de cette affection et a fini par donner son nom à cette maladie : la malaria. (ANOPHEL, 2002)(Wéry, 1995)

Au V^{ème} siècle avant JC, Hippocrate décrit les fièvres tierces et quartes.

En 1630, Don Francisco Lopez constate les vertus de l'écorce de quinquina et les fièvres sont alors divisées en deux groupes, selon leur sensibilité ou leur résistance à ce médicament. En 1820, Pelletier et Caventou isolent à Paris l'alkaloïde actif : la quinine. L'agent pathogène est découvert dans le sang en 1880 par Laveran à Constantine. Marchiafava, Celli et Golgi, distinguent trois espèces parasites de l'homme : *Plasmodium falciparum*, *P. vivax* et *P. malariae*.

De 1895 à 1897, la transmission de cette affection par des moustiques du genre *Anopheles* est soupçonnée par Ross et confirmée par Grassi en 1898. Une quatrième espèce plasmodiale, *P. ovale* est isolée en 1922 par Stephens.

En 1948, Shortt et Garnham mettent en évidence l'existence de parasites exo-érythrocytaires dans le foie et, en 1980, leur découverte est complétée par la caractérisation de formes parasitaires quiescentes dans les hépatocytes (Krotoski et Garnham) , expliquant ainsi les longues incubations et la survenue de rechutes tardives.

En 1976 Trager et Jensen réussissent la première culture continue in vitro de *P. falciparum*.

D'un point de vue thérapeutique, de 1820 jusqu'en 1940 ,aucun progrès n'avait été réalisé mais, à cette époque, le premier antimalarique de synthèse est découvert, prélude à la mise au point de toute une série d'antipaludiques. Les insecticides de contact, à effet rémanent (DDT) sont, dès la fin de la deuxième guerre mondiale, largement utilisés dans la lutte contre le vecteur.

Dès 1960, on met en évidence des souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine (antimalarique de synthèse le plus utilisé) en Asie du Sud-est et en Amérique latine et des souches d'anophèles résistantes aux insecticides.

En 1968, l'OMS renonce au projet irréaliste d'éradiquer le paludisme et se limite au contrôle de la morbidité et de la mortalité.

IV. Plasmodium :

Sur plus d'une centaine d'espèces de *Plasmodium* parasitant des mammifères, des rongeurs, des oiseaux ou même des batraciens, seuls quatre sont spécifiques de l'homme et peuvent déclencher la maladie sous des formes plus ou moins graves. Ce sont :

- *Plasmodium falciparum* à l'origine de la fièvre tierce maligne (espèce prédominante et responsable de 90% de la mortalité due au paludisme).
- *Plasmodium vivax* à l'origine de la fièvre tierce bénigne avec des rechutes à long terme.
- *Plasmodium ovale* à l'origine de la fièvre tierce bénigne avec rechutes à long terme.
- *Plasmodium malariae* à l'origine des fièvres quartes avec des rechutes pouvant atteindre 15 voire 20 ans.

1. *Plasmodium falciparum* :

Il est le plus redoutable, le plus fréquent et le plus intensément réparti. Il est l'agent de la fièvre tierce maligne. Il est responsable de 90% de la mortalité due au paludisme. La malignité du paludisme à *P.falciparum* est liée au fait que la schizogonie intra- érythrocytaire se fait, non pas dans le sang périphérique comme toutes les autres espèces plasmodiales, mais dans les capillaires profonds, en particulier cérébraux.

L'hématie parasitée se couvre de petites protubérances qui la font adhérer à l'endothélium capillaire et l'accumulation de ces micro-thromboses sera la cause première des formes pernicieuses rencontrées avec cette espèce.

Il sévit toute l'année dans les pays équatoriaux où il subit cependant des recrudescences saisonnières mais il ne survient qu'à la période chaude et humide (température > à 18°C) dans les régions subtropicales.

Son incubation est de 7 à 12 jours. Il est responsable de plus de 80% des accès palustres observés en métropole, de l'accès pernicieux et, indirectement, de la fièvre bilieuse hémoglobinoïdique. Il évolue d'une seule tenue, sans rechutes. Il est rare de voir survenir un accès à *P. falciparum* plus de deux à trois mois après le départ d'une zone d'endémie.

2. Plasmodium vivax :

Largement répandu en Asie, en Amérique du sud et à moindre degré en Afrique, cette espèce se rencontre entre les 37^{ème} degré de latitude Nord et 25^{ème} degré de latitude Sud.

L'incubation chez l'homme est d'environ 15 jours mais peut s'étendre à 9 mois ou plus.

P. vivax est responsable de la fièvre tierce bénigne.

Il évolue avec des rechutes (accès de reviviscence) à brève ou longue échéance, suivant les souches. Sa longévité est de 3 ans.

La densité parasitaire dépasse rarement 4%.

3. Plasmodium ovale :

Il sévit en Afrique intertropicale et provoque une fièvre tierce bénigne comme *P. vivax*, dont il est très proche et avec lequel il a longtemps été confondu. Son incubation peut être de 15 jours ou très longue, jusqu'à 4 ans. L'évolution du paludisme due à cette espèce est bénigne, mais les rechutes tardives (ou les incubations longues) sont possibles (5 ans). Schématiquement, on peut dire que *P. ovale* remplace *P. vivax* là où cette dernière espèce n'existe pas.

4. Plasmodium malariae :

Sa distribution géographique est clairsemée. Son incubation est plus longue, environ 3 semaines. Il est responsable de la fièvre quarte et, parfois de néphropathies chroniques (néphrite quartane réalisant un syndrome néphrotique grave).

Sa longévité est grande : 3 ans au moins et jusqu'à 20 ans. Même après un très long délai, il peut apparaître dans le sang (splénectomie...).

La densité parasitaire reste toujours faible.

NB : Les paludismes mixtes ne sont pas exceptionnels et les associations *P.falciparum/P.vivax* et *P.falciparum/P.malariae* se rencontrent dans les zones d'endémie d'Afrique et d'Asie.

Il existe 4 espèces de *Plasmodium* spécifiques à l'homme qui ont chacune leur répartition géographique, une incubation et une évolution propres. *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus dangereuse responsable du neuropaludisme qui sans traitement peut être mortel en quelques heures.

V. Cycle:

Plasmodium a un cycle diphasique : cycle à deux hôtes indispensables, l'homme et l'anophèle, son vecteur biologique. Le paludisme humain n'a pas d'hôte réservoir.

1. Agent vecteur :

C'est un moustique culicidé du genre *Anopheles*. Les espèces vectrices sont nombreuses et d'autant plus redoutables qu'elles ont une affinité pour l'homme (espèces anthropophiles), se nourrissent et se reposent dans les maisons (espèces endophiles ou domiciliaires).

Parmi ces moustiques, seule la femelle hématophage assure la transmission du paludisme. Elle ne pique que le soir et la nuit.

La répartition des anophèles à travers le monde est beaucoup plus étendue que celle du paludisme. Si les conditions favorables de réimplantation dans des foyers actuellement éradiqués survenaient, la transmission s'y établirait de nouveau.

Sur plus de 400 espèces d'anophèles identifiées, moins de 50 sont des vecteurs du paludisme.

L'*Anopheles* femelle est responsable de la transmission du paludisme par piqûre du crépuscule à l'aube.

2. Cycle chez l'homme :

a. Contamination :

Au moment de la piqûre, le moustique infesté injecte dans un capillaire des **sporozoïtes**, formes infestantes contenues dans ses glandes salivaires. Ces sporozoïtes ne font que transiter une demi-heure dans les capillaires sanguins et gagnent le foie pour pénétrer dans les hépatocytes en moins de 24 heures. Toutes les formes qui ne pénètrent pas dans les hépatocytes sont détruites par les macrophages.

b. Cycle exo-érythrocytaire = intra hépatique :

Leur développement et leur multiplication repoussent en périphérie le noyau de la cellule et finit par constituer une masse multinuclée appelée **schizonte** ou **corps bleu**. La cellule éclate, libérant de nombreux **mérozoïtes**.

Certains parasites restent quiescents dans l'hépatocyte, sans se transformer en corps bleu (**hypnozoïtes**). Après un temps variable, génétiquement déterminé, ils entrent en division. Ce phénomène n'existe que dans les espèces *P. vivax* et *P. ovale* expliquant les accès de reviviscence tardifs.

Avec *P. malariae*, il n'y a pas d'hypnozoïtes mais des formes persistent dans le sang pendant de nombreuses années et peuvent être responsables de rechutes (par exemple à la suite d'une splénectomie, d'une contamination accidentelle après transfusion sanguine ou une transplantation d'organe).

Quoi qu'il en soit ce premier cycle hépatique allant du sporozoïte à la première dispersion de mérozoïtes dure au minimum :

- ✦ 7 à 10 jours avec *P. falciparum*
- ✦ 12 jours avec *P. vivax* et *P. ovale*
- ✦ 18 jours avec *P. malariae*.

c. Cycle érythrocytaire :

Les mérozoïtes libérés gagnent la circulation sanguine, pénètrent par endocytose dans une hématie et deviennent chacun un **trophozoïte**. Celui-ci se développe, grossit et son noyau se divise. Il en résulte un schizonte, qui se charge progressivement d'un pigment spécifique d'origine parasitaire, l'hémozoïne ou pigment malarique. La multiplication des noyaux forme dans l'hématie un corps en rosace. Parallèlement, apparaissent dans l'hématie selon l'espèce plasmodiale en cause, des granulations de Schüffner (*P. vivax*, *P. ovale*), des taches de Maurer (*P. falciparum*) ou des ponctuations de Ziemann (*P. malariae*). Le corps en rosace, dilaté et mûr, éclate ; cet éclatement est contemporain de l'accès thermique clinique. L'hémozoïne libérée est phagocytée par des leucocytes qui en deviennent mélanifères. Ils déversent cette charge pigmentaire dans les tissus, au niveau des cellules du système monocyte macrophage (cellules de Küpffer du foie et histiocytes de la rate).

Les mérozoïtes libérés vont parasiter une hématie vierge et poursuivre le cycle intra-érythrocytaire. Chaque cycle schizogonique dure 48 heures (fièvre tierce) ou 72 heures (fièvre quarte).

d. Sporogonie :

Après plusieurs schizogonies, apparaissent dans les hématies des éléments à potentiel sexué, les **gamétocytes**, qui ne poursuivront leur développement que s'ils sont absorbés par un anophèle femelle. Leur présence n'entraîne aucune manifestation clinique mais le sujet devient un réservoir.

Ainsi, chez l'homme, on distingue deux cycles : l'un exo-érythrocytaire intra-hépatique, l'autre intra-érythrocytaire. Ces deux cycles sont asexués ou schizogoniques.

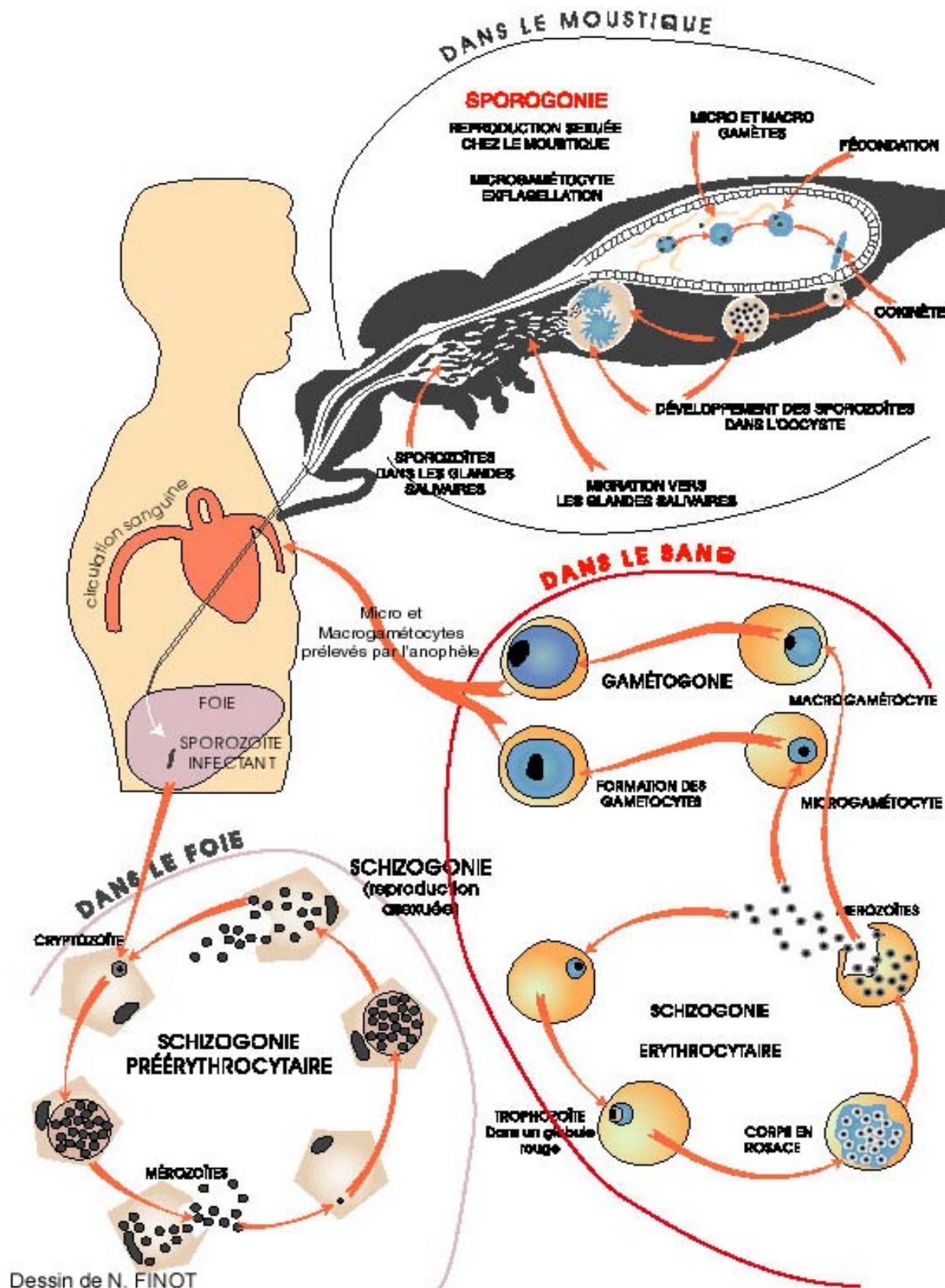


Figure 1 : Cycle du parasite *Plasmodium* (d'après N. Finot).

3. Cycle chez l'anophèle (cycle sexué ou sporogonique) :

Lorsqu'un anophèle femelle absorbe le sang d'un paludéen, il peut ingérer des **gamétocytes** et le cycle se poursuit. Seuls les gamétocytes échappent à la digestion. Les gamétocytes absorbés, à potentiel sexuel mâle ou femelle parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en **gamètes**. Le gamète mâle subit un processus d'exflagellation après lequel les gamètes femelles sont fécondés (gamogonie). Il en résulte un œuf encore appelé **ookinète** ; cet œuf s'implante sous la paroi de l'estomac du moustique en formant un **oocyste**, dans lequel, par division, s'individualisent les sporozoïtes (sporogonie). Comme au cours des processus précédents, c'est l'éclatement de la cellule hôte ou de l'oocyste formé qui libère les éléments mobiles. Ces sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique : à partir de ce réservoir, ils pourront être injectés avec la salive lors d'une piqûre infestante. Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule en 10 à 40 jours, selon la température extérieure et les espèces en cause.

4. Mode de transmission :

Le paludisme est transmis par la piqûre de l'anophèle femelle. Il faut signaler la possibilité de transmission congénitale, transfusionnelle et par greffe d'organes ainsi qu'accidentelle chez le personnel médical manipulant le sang parasité. Ces modalités ne jouent aucun rôle épidémiologique.

La transmission est conditionnée par des conditions géoclimatiques et par l'importance du contact homme/vecteur c'est-à-dire par la proximité des gîtes larvaires, le type d'habitat, ainsi que par les comportements de l'homme et du moustique.

VI. Répartition géographique :

L'épidémiologie du paludisme comporte l'étude de 4 éléments dont la réunion simultanée est indispensable au développement de la maladie.

- La présence d'hommes porteurs dans leur sang périphérique de gamétocytes du *Plasmodium*.
- L'existence d'une population d'anophèles vecteurs qui vont puiser ces gamétocytes lors de leur repas sanguin sur l'homme impaludé, assurer la multiplication sexuée du parasite puis inoculer à l'homme sain lors d'une nouvelle piqûre les sporozoïtes qui sont les formes infestantes du parasite.
- La présence d'hommes réceptifs au *Plasmodium*.
- Des conditions écologiques bien déterminées au premier plan desquelles il faut placer les exigences thermiques de l'anophèle et du *Plasmodium* qu'il héberge.

Actuellement, on observe :

- En **Europe**, le paludisme a été éradiqué. Des réintroductions temporaires peuvent se produire et des cas isolés survenir (paludisme des aéroports). Mais c'est essentiellement le paludisme d'importation (paludisme des voyageurs) qui sévit.
- En **Afrique**, le paludisme existe faiblement en Afrique du Nord, où l'on rencontre les espèces *P. vivax* et *P. malariae*. Il est largement répandu dans toute l'Afrique intertropicale où co-existent *P. falciparum*, *P. ovale* et, pour une moindre part, *P. malariae*.

Dans certaines zones d'Afrique de l'Est, on rencontre aussi *P. vivax*. A Madagascar, on retrouve les quatre espèces. Alors que la transmission est de nouveau établie à l'île Maurice, elle n'existe plus à La Réunion.

- En **Amérique**, l'Amérique du Nord est indemne de paludisme. En revanche, celui-ci existe en Amérique Centrale (*P. vivax* surtout). Il n'existe pas de transmission dans les Caraïbes à l'exception de Haïti. En Amérique du Sud existent d'importants foyers dus à *P. falciparum* (résistants aux amino-4-quinoléines) et à *P. vivax*.
- En **Océanie**, certaines îles sont atteintes : Nouvelle-Guinée, Iles Salomon, Vanuatu ; d'autres, au contraire, en sont totalement dépourvues : Tahiti, Nouvelle-Calédonie, Iles Loyauté... ; l'Australie est indemne.
- En **Asie**, le paludisme sévit modérément en Asie Mineure (Turquie), péninsule indienne (*P. vivax* surtout) et intensément en Birmanie, Chine du Sud, Thaïlande, Viêt-Nam, Cambodge, Laos (*P. falciparum* surtout, avec des souches chimiorésistantes). La transmission a lieu essentiellement en milieu rural sous forme de foyers disséminés.

Malaria, 2002

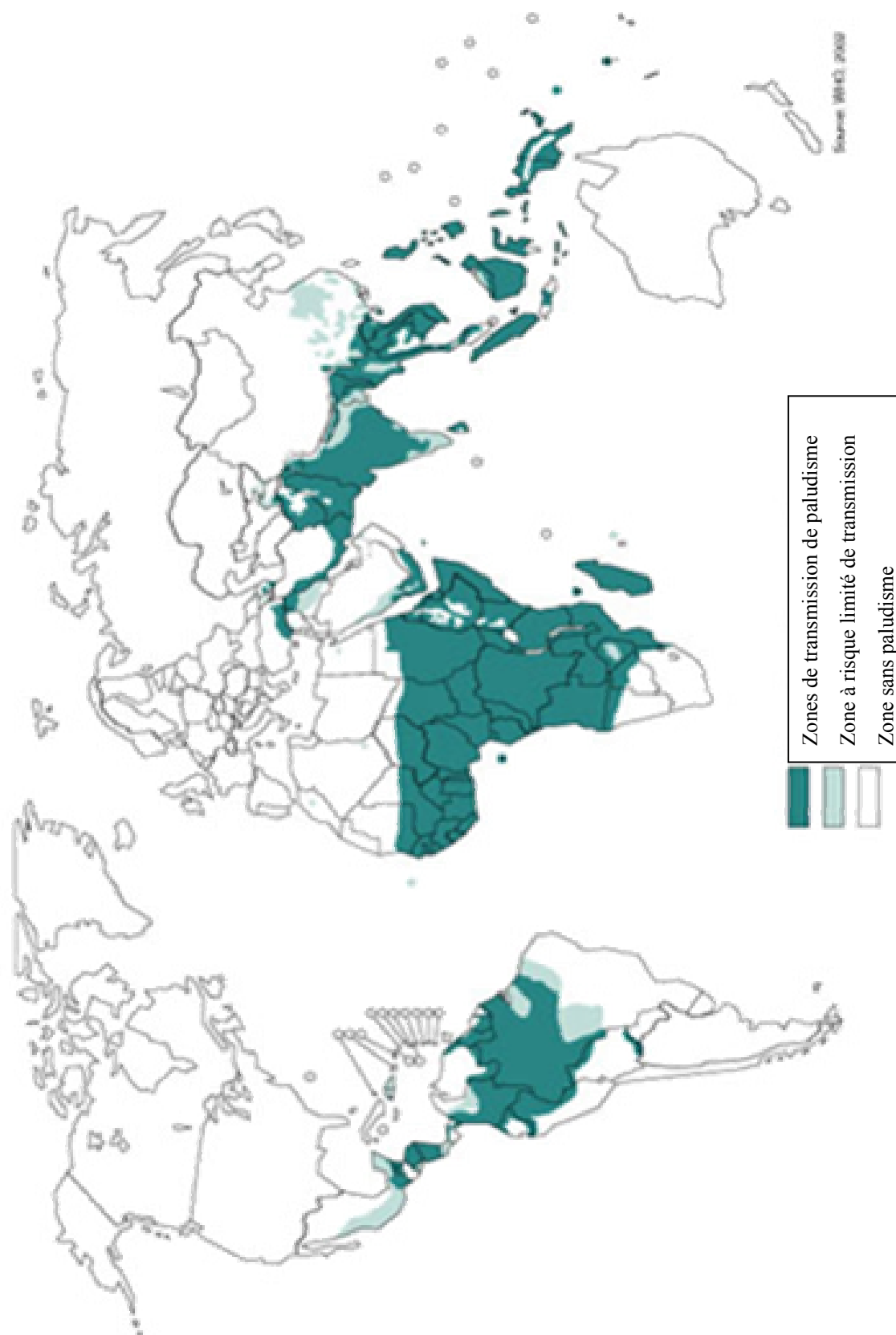


Figure 2. Répartition géographique du paludisme (d'après l'OMS 2002).

VII. Modalités épidémiologiques :

1. Indices paludométriques :

Le paludisme est endémique dans les régions où sa transmission est assurée toute l'année. Dans celles-ci, il subit une recrudescence saisonnière et devient épidémique (au décours de la saison des pluies, par pullulation des anophèles). Ailleurs, il est épidémique à une saison donnée.

Pour permettre à l'épidémiologiste d'évaluer l'endémie palustre, plusieurs indices ont été définis.

- **Indice plasmodique (IP)**: pourcentage des sujets examinés ayant des hématozoaires dans le sang.
- **Indice splénique (IS)** : nombre de splénomégalias par rapport à 100 sujets examinés. C'est surtout en s'appuyant sur ce dernier indice et sur l'indice plasmodique chez les enfants de 2 à 9 ans que le paludisme a été classé selon le niveau d'endémie.

Des enquêtes séro-immunologiques permettent également d'évaluer les taux d'anticorps par tranche d'âge et de suivre leurs variations saisonnières. Leur valeur est plus grande que celle de l'indice splénique car il existe de multiples causes de splénomégalie tropicale.

- **Indices sporozoïtique et oocystique** : pourcentage d'anophèles femelles présentant respectivement des sporozoïtes dans les glandes salivaires et des oocystes sur la paroi externe de l'estomac. Bien qu'il existe de nombreuses espèces de Plasmodium animaux présentes chez les anophèles, ces indices, dans certains cas, peuvent refléter l'anthropophilie du moustique.

2. Rôle de l'immunité :

L'immunité est **acquise** et place à la longue l'hôte et le parasite dans une situation de « paix armée ». Le développement de cette prémunition est démontré en particulier par l'arrivée, en zone impaludée, d'individus neufs chez qui le paludisme fait des ravages et au contraire par la disparition progressive du paludisme clinique chez les autochtones, en fonction de l'âge, et ce d'autant plus vite que la transmission est intense et continue.

Transplantés en zone tempérée, ces sujets ne sont plus soumis à l'infestation. Leur immunité s'affaiblit et disparaît en un à deux ans. A leur retour en région tropicale, ils se présentent alors comme des sujets neufs et sont exposés à un paludisme grave. Ainsi, **l'immunité palustre est précaire et instable** ; elle s'acquiert lentement et dépend du facteur temps et du facteur densité parasitaire. Elle doit être entretenue pour durer ; c'est ce que l'on appelle un **état de prémunition**.

VIII. Clinique :

La réponse de l'hôte aux *Plasmodium* est variable d'un individu à l'autre. Elle dépend de l'espèce plasmodiale et de l'intensité de l'infestation, de l'hôte et de sa prémunition. (Perronne C. ; 2000.)

1. Le paludisme de primo invasion à *Plasmodium falciparum* :

Il atteint un sujet neuf (enfant en zone d'endémie ou européen récemment transplanté).

a. Incubation :

Encore appelée phase pré patente, elle dure au moins 7 jours jusqu'à 20 jours, parfois plusieurs mois et est cliniquement muette. Elle est presque toujours inférieure à 2 mois.

b. Invasion :

Elle est marquée par l'apparition brutale d'une fièvre continue à 39-40°C associée à des céphalées et myalgies. Le tableau clinique est celui d'un embarras gastrique fébrile : anorexie, douleurs abdominales, nausées, parfois vomissements, diarrhée. A l'examen, le foie (surtout chez l'enfant) est parfois augmenté de volume, la rate est normale, les urines sont rares, foncées avec parfois une protéinurie. Le tableau clinique est donc peu évocateur.

Une splénomégalie modérée, élément de bon pronostic, apparaît au bout de quelques jours. Cet accès de primo invasion, s'il n'est pas traité en urgence, peut évoluer vers l'accès pernicieux.

Il est essentiel de faire préciser au malade la zone où il a séjourné récemment. On doit y penser avant toute autre maladie devant un sujet fébrile, au retour d'une zone d'endémie, d'un safari, d'un séjour touristique ou d'un voyage d'affaires en Afrique Noire, en Asie, en Amérique du Sud ou dans quelques îles d'Océanie.

**La symptomatologie classique est un embarras gastrique fébrile.
Le diagnostic est à évoquer devant toute fièvre inexpiquée au
retour d'un séjour en zone d'endémie.**

2. Accès palustres à fièvre périodique :

L'incubation peut être de plusieurs mois ou années pour *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*.

Appelé aussi accès intermittent, il correspond à un accès de reviviscence schizogonique, par « réveil » d'un hypnozoïte intra-hépatique, pour *P. vivax* et *P. ovale*, ou par exacerbation d'une schizogonie sanguine latente pour *P. malariae*.

Cette phase comprend des accès thermiques à rythme régulier et des signes d'accompagnement.

a. L'accès palustre :

Il n'est typique que dans les infestations à *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*. Il peut faire suite à un paludisme de primo invasion. Dans de nombreux cas, il apparaît longtemps après, alors que l'accès fébrile initial a été oublié. Ces accès palustres sont caractérisés par la succession de 3 phases (frissons, chaleur, sueurs) et un rythme particulier.

Précédé de quelques prodromes toujours identiques pour un même malade, l'accès intermittent frappe, souvent le soir, un patient céphalalgique et nauséeux. Il débute brutalement, en fin de journée ou la nuit et dure une dizaine d'heures avec successivement :

- ✓ Stade de frissons : violents frissons, sensation de froid intense, quelque soit la température extérieure, fièvre à 39°C.

La rate s'hypertrophie, la tension artérielle baisse. Ce stade dure une heure environ.

- ✓ Stade de chaleur : les frissons cessent, la peau est sèche et brûlante ; la température atteint 40-41°C ; la rate diminue de volume. Ce stade persiste 3 à 4 heures.

- ✓ Stade de sueurs : des sueurs abondantes baignent le malade qui émet des urines foncées. La température s'effondre brusquement, avec une phase d'hypothermie ; la tension artérielle remonte. Ce stade dure 2 à 4 heures. Il est souvent suivi d'une période d'euphorie et d'une impression de « libération », de bien-être.

Le rythme des accès est variable selon l'espèce plasmodiale. En pratique, il est souvent beaucoup moins régulier que dans les descriptions cliniques où l'on distingue :

- ✓ La fièvre tierce correspond à une schizogonie de 48 heures et se traduit par un clocher thermique survenant aux jours J1, J3, J5, J7..., deux clochers étant séparés par un jour d'apyrexie. La fièvre tierce peut être bénigne et régulière ; elle relève alors d'une parasitémie due à *P. vivax* ou à *P. ovale* ; elle peut être maligne et irrégulière : elle est due dans ce cas à *P. falciparum* et apparaît dans les suites immédiates d'une primo invasion.
- ✓ La fièvre quarte correspond à une schizogonie de 72 heures et se traduit par un accès thermique survenant aux jours J1, J4, J7, J10... chaque accès étant séparé par deux jours d'apyrexie. La fièvre quarte est due à *P. malariae*.

La fièvre quotidienne : il peut s'agir en fait d'accès irréguliers dus à *P. falciparum* ou d'une double tierce alternée relevant peut-être de deux cycles schizogoniques décalés de 24 heures et correspondant à un bi parasitisme.

Cliniquement pour *P.vivax*, *P.ovale*, *P. malariae*, on observe une succession de 3 phases : frissons/chaleur/sueurs. Le rythme de ces accès définit la fièvre tierce ou la fièvre quarte.

- b. **Une splénomégalie et une anémie** progressivement croissantes accompagnent ces accès thermiques

3. Complications :

a. Accès pernicieux :

L'accès pernicieux constitue le grand drame du paludisme. Il est encore appelé neuro-paludisme (cerebral malaria des anglo-saxons) et réalise une encéphalite fébrile aiguë. Il est dû au tropisme cérébral de *P. falciparum* (schizogonie dans les capillaires intra cérébraux). L'accès pernicieux survient à tout âge mais atteint surtout l'enfant et l'expatrié. Il existe des causes déclenchantes et aggravantes (hépatite virale, méningite, rougeole...). (Saïssy J.M. *Paludisme grave*. 2001.)

i. Début :

Il est soit progressif, soit brutal.

- L'accès pernicieux à début progressif est marqué par l'installation d'une fièvre irrégulière, d'un syndrome algique diffus, associé à des troubles digestifs. On parle de fièvre d'invasion mais, déjà, l'examen clinique peut relever une note neurologique qui fait évoquer l'évolution vers l'accès pernicieux et prescrire d'urgence un traitement spécifique.
- L'accès pernicieux à début brutal foudroie surtout le jeune enfant et se traduit par une triade symptomatique faite de fièvre, de coma et de convulsions.

ii. Etat :

Brutal ou progressif, le tableau de l'accès pernicieux se complète, associant : fièvre, troubles neurologiques, manifestations viscérales.

- La **fièvre** est le plus souvent très élevée (40-42°C).
- **Les troubles neurologiques :**
 - ⇒ **Les troubles de la conscience** sont constants dans l'accès pernicieux et vont de l'obnubilation au coma *carus*. Certains exigent pour parler de neuro-paludisme de coma stade II ou plus. En général, le coma est calme, tranquille, accompagné d'une abolition du réflexe cornéen, plus rarement agité, avec des mouvements carphologiques ; parfois, il s'agit d'un simple tephos.
 - ⇒ **Les convulsions** surviennent une fois sur trois et sont parfois inaugurales (forme à début éclamptique). Elles sont soit généralisées, soit localisées à un hémicorps, isolées, ou répétées aboutissant à un état de mal convulsif. Elles coïncident fréquemment avec l'acmé des clochers thermiques mais, par leur répétition (plus de 2 par 24 heures) et la durée de la phase post-critique (supérieure à ¼ d'heure), elles diffèrent de la simple convulsion hyperpyrétique de l'enfant.

- ⇒ **Les troubles du tonus.** Le malade atteint d'accès pernicieux est en règle hypotonique. La survenue d'une hypertonie traduit une rigidité de décérébration ou de décortication ; elle peut être permanente ou paroxystique. Parfois, le tableau clinique est celui d'un coma profond avec hypotonie, entrecoupé de crises de rigidité avec réflexes ostéo-tendineux vifs et polycinétiques. Ce tableau peut être confondu avec un tétanos, dont on connaît la fréquence en zone tropicale. Le pronostic est alors sombre et la mort survient dans plus de 60% des cas.
- ⇒ **Les réflexes ostéo-tendineux** sont souvent abolis. L'absence du réflexe rotulien est considérée comme un signe de mauvais pronostic.
- ⇒ **Les troubles psychiques.** Chez les adultes non comateux, on relève une confusion mentale, une désorientation, du délire ou de l'anxiété. Chez l'enfant, il est plus difficile de les apprécier ; il en est de même des troubles du langage.
- ⇒ **Les troubles cérébelleux.** Ils surviennent au décours du coma chez un tiers des survivants et se traduisent par une démarche ébrieuse avec dysmétrie.
- ⇒ **Les troubles méningés** sont habituellement absents mais l'intensité des céphalées incite cependant à la ponction lombaire. On décèle rarement une lymphocytose dans le LCR et parfois une protéinorachie inférieure à 0,50 g /L.
- **Les manifestations viscérales.**
 - ⇒ **La splénomégalie** manque 2 fois sur 3 dans l'accès pernicieux et, lorsqu'elle existe, elle est souvent modérée et d'apparition tardive. Elle atteste d'une réaction de défense du système monocyttaire, de bon pronostic.
 - ⇒ **L'hépatomégalie** est fréquente surtout chez l'enfant et constitue un signe de mauvais pronostic.
 - ⇒ **Une hypoglycémie** est notée dans 15 à 20% des cas. Elle aggrave la souffrance cérébrale.

- ⇒ **L'ictère** ne survient que dans 10% des cas. C'est un ictère hémolytique avec élévation de la bilirubinémie libre, ou mixte, témoignant de la souffrance hépatique. S'il est intense le pronostic est mauvais.
- ⇒ **L'anémie** est un facteur aggravant des signes neurologiques. Elle est de mauvais pronostic et impose une transfusion d'urgence. Elle est aussi responsable en partie des défaillances cardio-vasculaires.
- ⇒ **L'œdème pulmonaire** avec syndrome de détresse respiratoire aiguë est parfois observé au deuxième ou troisième jour d'évolution sous traitement.
- ⇒ **Le collapsus** est rare : il incite à rechercher une septicémie à Gram négatif.
- ⇒ **L'insuffisance rénale fonctionnelle** est habituelle avec urines rares et foncées. Elle cède à la réhydratation. On observe, chez l'adulte, dans 1 à 2% des cas une insuffisance rénale aiguë organique, oligo-anurique, d'évolution plus prolongée.
- ⇒ **Des troubles de la coagulation** avec hémorragies diffuses sont parfois observés.

iii. Evolution :

Non traité, l'accès pernicieux est fatal en deux à trois jours ; correctement traité, la mortalité reste lourde (10 à 30 %). La guérison se fait sans séquelle, sauf parfois chez l'enfant (troubles neurologiques).

iv. Pronostic :

Les manifestations de mauvais pronostic dans l'accès pernicieux dont une seule suffit à définir la gravité d'un accès à *P. falciparum* sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 1: Signes de gravité d'un paludisme à *P. falciparum* chez l'adulte et l'enfant (accès grave ou perniciox), d'après l'OMS

Valeur pronostique *		Manifestations cliniques ou résultats de laboratoire
Enfants	Adultes	
+	?	Prostration
+++	+	Trouble de la conscience
+++	+++	Détresse respiratoire (acidose respiratoire)
+	++	Convulsions répétées
+++	+++	Collapsus respiratoire (choc)
+++	+++	Edème pulmonaire (radiologie)
+++	+	Saignement anormal
++	+	Ictère
+	+	Hémoglobinurie
+	+	Anémie grave
+++	+++	Hypoglycémie
+++	+++	Acidose
+++	+++	Hyperlactatémie
+/-	++	Hyperparasitémie (>5% ?)
++	++	Insuffisance rénale

**évaluée sur une échelle de + à +++ ; +/- indique une faible valeur pronostique ou une survenue peu fréquente. Observations faites dans les pays tropicaux chez les autochtones.*

L'accès perniciox se présente comme une encéphalite aiguë fébrile entraînant potentiellement des complications neurologiques, hématologiques, métaboliques et viscérales. Il survient chez les sujets non immuns infectés par *P.falciparum*. Il s'agit d'une urgence médicale dont l'issue est rapidement fatale sans traitement.

b.

b. Le paludisme viscéral évolutif :

Encore appelé paludisme chronique, il survient chez des sujets résidant en zones d'endémies et automédiqués de façon insuffisante.

Il associe une anémie avec pâleur, dyspnée, asthénie, souffle anorganique, oedèmes, une splénomégalie majeure avec péricapnité, une élévation thermique variable autour de 37°5-38°C, un retard staturo-pondéral chez l'enfant. La guérison spontanée est rare, l'aggravation fréquente, pouvant réaliser en cas d'infestation à *P. falciparum*, un accès pernicieux secondaire. Dans certains cas, les manifestations sont frustres, ou au contraire, cachectisantes. Sous traitement antipaludique, l'amélioration est lente mais spectaculaire.

c. La fièvre bilieuse hémoglobinurique :

Devenue exceptionnelle, elle ne constitue pas, à proprement parler, une manifestation du paludisme mais seulement un syndrome d'étiologie immuno-allergique. Elle survient chez un ancien paludéen à *P. falciparum* soumis à la chimioprophylaxie par la quinine naturelle ou l'halofantrine, dont le rôle déclenchant immédiat est en règle relevé. Le rôle aggravant du froid est signalé.

Son début est brutal, marqué par des lombalgies violentes et un état de prostration. Une fièvre, des vomissements alimentaires puis bilieux, surviennent. Un ictère hémolytique apparaît avec une anémie, collapsus, oligurie ou oligo-anurie faite d'urines porto (hémolyse intra vasculaire et tubulopathie aiguës).

Le pronostic est fonction de la rapidité à corriger l'anémie et à obtenir la reprise de la diurèse. La mort survient dans 30% des cas.

IX. Diagnostic biologique :

1. Signes d'orientation :

La notion de séjour en zone d'endémie permet d'émettre l'hypothèse d'un paludisme.

**Toute fièvre au retour d'une zone d'endémie doit être
suspecte de paludisme.**

La clinique « d'embarras gastrique fébrile » permet aussi d'y penser.

L'hémogramme montre une thrombopénie presque toujours observée dans le paludisme à *P.falciparum* mais aussi, à moindre degré, lors des accès à *P. vivax* et *P. ovale* et une anémie de type hémolytique d'intensité variable toujours présente, une leucopénie inconstante parfois remplacée par une hyperleucocytose modérée à polynucléaires neutrophiles.

2. Diagnostic de certitude :

C'est un diagnostic d'urgence qui s'appuie sur la mise en évidence des formes sanguines de *Plasmodium*.

a. Le prélèvement de sang :

Il doit être effectué le plus tôt possible. Il consiste à recueillir 1 à 2 gouttes de sang après piqure au doigt, au lobe de l'oreille ou, chez l'enfant, au talon. En pratique, il est souvent préférable pour un médecin non spécialisé d'adresser au laboratoire du sang prélevé par ponction veineuse sur un tube avec anticoagulant comme l'EDTA.

Le traitement devant être instauré en urgence, il convient de faire la recherche dès qu'elle est demandée et de la répéter éventuellement si elle a été négative quelques heures après un accès fébrile.

b. Techniques microscopiques:

La 12^{ème} conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse de la SPILF du 14 avril 1999, a émis des recommandations très précises concernant la prise en charge du diagnostic de paludisme par les biologistes :

« Le diagnostic biologique du paludisme est une urgence. Les résultats doivent être rendus dans un délai maximum de deux heures en prenant contact avec le clinicien. »

« Le jury propose la technique du frottis sanguin mince en première intention... » (*Conférence de consensus ; 1999*).

Les techniques microscopiques restent donc les techniques de référence pour ce diagnostic car elles peuvent être utilisées par tous les laboratoires du fait du faible coût de la technique et de la rapidité de leur réalisation compatible avec l'urgence.

i. Goutte épaisse :

La **goutte épaisse**, technique de micro concentration sur une lame est utile en cas de pauci parasitisme. Le seuil de positivité est évalué à 10 à 20 HPM. L'inconvénient majeur apparaît au moment de la lecture ; en effet la morphologie des parasites est modifiée et les hématies parasitées, dont la morphologie est très utile au diagnostic d'espèce, sont lysées. En outre la numération des parasites n'est pas non plus réalisable. Elle n'est fiable et sensible que lue par une personne expérimentée. (*Martet Gérard et al; 2000*)

ii. Frottis sanguin :

La recherche du parasite s'effectue sur **frottis minces** colorés par la méthode de **May Grünwald Giemsa ou MGG** (cytoplasme bleu et noyau rouge). Le seuil de détection est de 100 hématies parasitées par microlitre (HPM) soit un parasite pour 200 champs.

- ⇒ Avantages : Le frottis permet le diagnostic d'espèce, l'étude de la densité plasmodiale et celle des signes hématologiques associés. Il permet également le diagnostic des autres pathogènes sanguicoles. Il est adapté à l'urgence. Il autorise une lecture différée dans le temps et le lieu, permettant ainsi un contrôle.
- ⇒ Inconvénients : il nécessite une bonne réalisation technique, la lecture est longue (20 minutes), le seuil de détection est élevé et l'apprentissage est indispensable.

La détermination de la parasitémie est un élément primordial à prendre en compte dans la prise en charge du patient ; elle est surtout indispensable dans le paludisme à *P. falciparum*.

La gravité de l'affection palustre est liée au nombre d'hématies parasitées.

Son intérêt est double :

- ♦ Une parasitémie supérieure à 5% est synonyme d'un risque de neuropaludisme en l'absence de traitement, à l'inverse une parasitémie faible n'exclut pas ce risque (présence possible de formes anciennes dans les organes profonds).
- ♦ Surveillance de l'efficacité du traitement surtout en raison de la fréquence de la résistance de *P. falciparum* aux amino-4-quinoléines en Asie du sud-est, en Amérique du sud et en Afrique. On dit qu'un *Plasmodium* est résistant si la diminution de la parasitémie est inférieure à 50% après 24-48 heures de traitement ou s'il a encore des trophozoïtes 72 heures après le début de ce traitement.

c. **Recherche d'antigènes parasitaires :**

(Moody et al; 2000; Moody A; 2002.)

i. **QCB Malaria test® :**

Cette autre méthode de concentration- coloration, par des fluorochromes comme l'acridine orange (**QCB Malaria test ®** : « quantitative Buffy Coat ») de diagnostic rapide et de sensibilité égale à la goutte épaisse, est utilisée mais ne permet pas un diagnostic d'espèce et le coût est élevé. Ce test risque de ne plus être commercialisé dans les prochaines années.

ii. **Détection de l'HRP-2 :**

La détection de l'antigène HRP-2 spécifique (96%) de *P. falciparum* est possible par un test immuno-chromatographique simple, le **New Malaria ICT®**. Le seuil de détection est estimé à 10 HPM. En pratique la recherche d'HRP-2 est toujours positive si la densité parasitaire est $> 0,01\%$. L'HRP-2 est une glycoprotéine spécifique de *Plasmodium falciparum* exposée à la surface des hématies parasitées, et en même temps, activement sécrétée par les parasites intracellulaires. Sa sécrétion est constante au cours du cycle érythrocytaire du parasite avec un pic au moment de la rupture des schizontes.

⇒ **2 tests commercialisés :**

- ♦ **Le test Parasight® -F :** (Becton Dickinson Tropical Diseases Diagnostics)

Il s'agit d'un test manuel sur bandelette nécessitant l'utilisation successive de 3 réactifs. Sa sensibilité est de 93,04% et sa spécificité de 100%.

- ♦ Le test MalariaQuick® : (ICT Diagnostics, Fumouze)
Il est conditionné en trousse de 2, 3,5 et 25 tests et n'utilise qu'un seul réactif liquide. Les tests sont présentés en cartes repliables qui assurent une conservation du test avec possibilité de relecture différée. Sa sensibilité est de 97,39% et sa spécificité de 100%.

- ♦ Principe : (MalariaQuick®)

Le test est réalisé sur sang total et permet à la fois la détection de l'HRP-2 et d'un antigène commun aux 4 espèces plasmodiales. Il utilise 2 anticorps de capture fixés sur la membrane : un des anticorps est dirigé contre l'antigène HRP-2, bande T1. L'autre anticorps détecte l'antigène commun, bande T2. Il existe aussi une bande contrôle permettant de valider le résultat. Ce contrôle doit toujours apparaître dans la fenêtre de lecture (bande C). Le sang est déposé sur la zone de dépôt échantillon imprégnée d'anticorps marqués à l'or colloïdal dirigés contre les antigènes palustres. Dans le cas d'un échantillon positif, les antigènes palustres se lient aux anticorps marqués. Le réactif ajouté permet aux complexes antigène-anticorps formés de migrer le long de la membrane où ils seront capturés par les anticorps de capture. Deux ou trois bandes apparaissent alors dans la fenêtre de lecture. Dans le cas d'un échantillon négatif, seule la bande de contrôle apparaît dans la fenêtre de lecture.

⇒ Avantages : La technique permet le diagnostic d'infection à *Plasmodium falciparum* et/ou à autre espèce. Elle est adaptée à l'urgence et simple d'emploi. La clairance de l'HRP-2 étant plus longue que la clairance parasitaire, la technique permet un diagnostic rétrospectif. Enfin elle autorise une lecture différée dans le temps et dans le lieu.

⇒ Inconvénient : la technique ne permet pas le diagnostic des autres parasites sanguicoles, l'étude de la densité plasmodiale ni des signes hématologiques associés.

⇒ Persistance de l'HRP-2 : Il a été montré qu'on pouvait la détecter après disparition des symptômes du paludisme et du parasite chez l'hôte. *Humar et al. (1997)* ont mis en évidence de l'antigène HRP-2 circulant chez 68% des patients traités au bout de 7 jours et chez 27% au bout de 28 jours.

iii.Détection de la p LDH (lactate déshydrogénase parasitaire):

Ce test permet la mise en évidence de la lactate déshydrogénase spécifique du parasite. Elle est produite par les formes sexuées et asexuées du *Plasmodium*. La version OptiMal2® permet de faire le diagnostic des 4 espèces de *Plasmodium* par la séparation des différents isomères de la LDH. (*Makler M.T et al; 1993*)

L'avantage est que ce test ne donne plus de résultats systématiquement positifs après un traitement efficace.

Ces tests n'ont pas été aussi largement expérimentés sur le terrain que les tests HRP-2 mais ils sont néanmoins déjà commercialisés.

Ce test est simple, sensible, spécifique mais le prix reste élevé.

La sensibilité est de 97% pour une parasitémie >100 parasites/ l.

Il a été montré un parallélisme entre l'activité pLDH et la quantité de parasites viables. (*Piper R.C et al; 1999*).

d. PCR :

La **PCR** utile en cas de faible parasitémie permet de plus le diagnostic d'espèce.

Cette méthode est fondée sur la détection de séquences caractéristiques de l'ADN génomique plasmodial à l'aide d'amorces et/ ou de sondes (selon la technique utilisée) complémentaires de la séquence à amplifier.

Ces techniques ultrasensibles (seuil de détection : 1 parasite dans 10 ml de sang) restent encore peu utilisées en routine dans les laboratoires du fait du coût et du fait que ces techniques ne sont pas adaptées à l'urgence.

Elles sont intéressantes pour :

- Confirmer un paludisme fortement suspecté par le clinicien mais que le biologiste n'a pu mettre en évidence avec les techniques classiques de diagnostic ou inversement infirmer catégoriquement cette hypothèse quand le médecin y croit.
- Confirmer un pluri parasitisme.
- Mettre en évidence une espèce différente de celle suspectée en microscopie (en particulier pour le complexe vivax/ovale) ; ceci remettrait en cause le diagnostic microscopique, dit de certitude.

e. **Diagnostic indirect = sérologique** :

Il s'agit de détecter la présence d'anticorps spécifiques grâce à des techniques immunologiques. Le sérodiagnostic n'est pas une technique d'urgence, il est cependant utile dans certaines circonstances :

- Le diagnostic rétrospectif d'une fièvre tropicale d'origine inconnue ;
- Le diagnostic de paludisme viscéral évolutif ;
- Le contrôle des donneurs de sang ;
- Le suivi de régression des anticorps après un accès aigu ;
- En cas de prise d'antipaludique préalable à la démarche diagnostique ;
- Les enquêtes épidémiologiques mais **jamais pour le diagnostic de l'accès palustre.**

♦ **Techniques utilisées** :

- Immunofluorescence indirecte : cela consiste à détecter les anticorps sériques du patient par un conjugué fluorescent se fixant sur les complexes anticorps sériques / antigènes homologues (*P. falciparum*) ou hétérologues (*P. berghei* : rongeurs) contenus dans un sang parasité étalé sur un frottis.

- Electrosynérèse
- Immunoenzymologie ELISA
- Hémagglutination

Toutes ces réactions sont le témoin de l'infestation palustre mais ne mesurent pas l'immunité protectrice. Elles sont le témoin d'une infection par *P.falciparum* uniquement en ce qui concerne la technique sérologique d'immunofluorescence indirecte utilisée à Nantes.

La sérologie ne permet pas de différencier une infection en cours d'un paludisme antérieur.

f. Diagnostic d'espèce :

Cette identification ne peut se faire que sur un frottis de bonne qualité.
(Martet G. et al.2000)

i. Aspect général du frottis :

- *Plasmodium falciparum* : parasitisme souvent intense et monotone, avec des parasites au même stade évolutif, celui de trophozoïte annulaire. Le poly parasitisme de l'hématie est fréquent. Les gamétocytes ou corps en faux, apparaissent un peu plus tard que les trophozoïtes ou après un traitement.
- *Plasmodium vivax* : parasitisme peu dense avec mélange des différents stades évolutifs. Le poly parasitisme est exceptionnel.
- *Plasmodium malariae* : parasitisme peu dense avec mélange des différents stades évolutifs et abondance du pigment palustre.
- *Plasmodium ovale* : parasitisme peu dense avec mélange des différents stades évolutifs et possibilité de poly parasitisme.

ii. Aspect de l'hématie :

- *Plasmodium falciparum* : parasite les hématies de tout âge, dont la taille et la forme ne sont pas modifiées. Les tâches de Maurer, classiques, sont souvent mal mises en évidence par la coloration. Ce sont des tâches de taille irrégulière, peu nombreuses, de couleur brun-rouge, comparées à des éraillures en coup d'ongle.
- *Plasmodium vivax* : parasite de l'hématie jeune qui est augmentée de volume (apparaît pâle car déshémoglobinisée). Elle est parfois déformée et contient un trophozoïte ou un schizonte amoeboïde. On peut rencontrer des rosaces et des gamétocytes. Au stade de trophozoïte âgé et de schizonte, on observe des granulations rondes, de petite taille, très nombreuses, colorées en brun rouge : les granulations de Schüffner.
- *Plasmodium malariae* : parasites de l'hématie âgée qui est diminuée de volume, sans modification de forme avec parfois de fines granulations de Ziemann. Elle est de coloration plus sombre. On retrouve non seulement des trophozoïtes mais encore des schizontes quadrilatères, en bandes équatoriales, des rosaces très régulièrement dessinées et des gamétocytes. Le parasite produit un pigment abondant et foncé.
- *Plasmodium ovale* : parasite de l'hématie jeune dont le volume est modérément augmenté. Elle est souvent ovalisée avec une extrémité frangée. Elle est parfois de teinte pâle, mais surtout il existe de très nombreuses granulations de Schüffner dès le stade trophozoïte jeune.

iii. Aspect morphologique du parasite :

- *Plasmodium falciparum* : (Annexe I figure 1)
 - Le **trophozoïte jeune** est petit (1/4 de la taille de l'hématie). Il est souvent accolé à la paroi de l'hématie et prend l'aspect de bracelet arabe ou casque de walkman (noyau bilobé et cytoplasme fin). Il n'y a pas de pigment palustre.
 - Le trophozoïte âgé est plus volumineux et plus irrégulier (forme de raquette, de filet à papillons).
 - Le schizonte et la rosace ne sont généralement pas rencontrés dans le sang périphérique en dehors des accès de neuro-paludisme à forte parasitémie.
 - Le gamétocyte mature est caractéristique : sa forme en cigare, en banane, déforme l'hématie dont on ne distingue la présence que difficilement. Sa taille est de 8 à 15 µm.

- *Plasmodium vivax* : (Annexe I figure 2)
 - Le trophozoïte jeune occupe le tiers de l'hématie. Le cytoplasme est plus épais que celui de *P. falciparum*. Il n'y a pas de pigment palustre.
 - Le trophozoïte âgé est caractéristique (corps amoeboïde). Le cytoplasme est étiré en tous sens, déformé, très polymorphe. La vacuole nutritive est mal délimitée et le pigment palustre fin.
 - Le schizonte comporte des noyaux irréguliers en taille et en répartition dans le parasite.
 - La rosace est volumineuse : elle occupe toute l'hématie et comporte 12 à 18 mérozoïtes irrégulièrement répartis. Le pigment est rassemblé au centre.
 - Le gamétocyte est arrondi ou ovalaire et occupe la quasi-totalité de l'hématie. Le noyau est excentré et le pigment abondant.

- *Plasmodium malariae* : (Annexe II figure 1)

- Le trophozoïte jeune est comparable en taille et en forme à celui de *P. vivax*, mais à ce stade il possède un grain de pigment.
- Le trophozoïte âgé est plus volumineux. Le pigment est très abondant. On retrouve deux aspects classiques : la bande équatoriale, forme rigide et transversale du parasite dans l'hématie, et la forme hémogrégariniforme où le parasite se replie en vermicule, avec un pigment abondant.
- Le schizonte ne se différencie du trophozoïte âgé que par la division du noyau.
- La rosace est caractéristique par son aspect régulier en marguerite, avec au centre un pigment palustre très abondant et en périphérie 8 à 12 mérozoïtes régulièrement répartis.
- Le gamétocyte est globuleux et possède un abondant pigment palustre. Il occupe presque la totalité de l'hématie.

- *Plasmodium ovale* : (Annexe II figure 2)

- Le trophozoïte jeune est comparable à celui de *P. vivax* mais il possède souvent un fin grain de pigment.
- Le trophozoïte âgé possède du pigment. Le parasite grossit et se déforme. A ce stade, le cytoplasme peut posséder une partie filamenteuse, mais il ne forme jamais de corps amoeboïde.
- Le schizonte ne se différencie du trophozoïte âgé que par la division du noyau.
- La rosace comporte 8 mérozoïtes, parfois plus, répartis plus ou moins régulièrement. Le pigment est dense, mais plus fin que chez *P. malariae*.
- Le gamétocyte ressemble à celui de *P. vivax*, mais il n'occupe pas toute l'hématie.

X. Traitement :

1. Accès pernicieux :

C'est une urgence thérapeutique.

- Traitement antimalarique :

- quinine intraveineuse (Quinimax®, Quiniforme®), avec une dose de charge à J1 à la posologie de 32 mg par kg selon le schéma suivant : 16 mg/kg les 4 premières heures, 8 heures plus tard 8 mg/kg en 4 heures et 8 heures plus tard 8 mg/kg sur 4 heures. A J2, la posologie de 24 mg par kg et par jour (maximum 1,5 à 2 g chez l'adulte) en 3 administrations dans du sérum glucosé isotonique pendant 3 à 6 jours consécutifs, au moins jusqu'à disparition des troubles de la conscience. Elle peut être relayée par la quinine per os après 48 heures (7 jours), la méfloquine (Lariam®) 1 jour ou l'halofantrine (Halfan®) 1 jour s'il existe une possibilité de résistance.
- Des dérivés du Quinghao, spécialement utilisés en Asie pour traiter des souches résistantes à la quinine, en particulier l'artémether (Paluter® en ATU nominative) sont administrés par injection intra-musculaire pendant 5 jours : chez l'adulte (sauf femme enceinte) : 2 ampoules de 80 mg d'artémether le 1^{er} jour suivies d'une ampoule de 80 mg pendant 4 jours consécutifs ; chez l'enfant : 3,2 mg/kg le 1^{er} jour, 1,6 mg/kg les 4 jours suivants.

- Traitement symptomatique :

- Anticonvulsifs
- Anti-infectieux
- Rééquilibre hydro électrolytique, oxygénation, transfusion, épuration extra rénale, en fonction des troubles observés.

2. Accès simple :

a. A *P. falciparum* :

- Chez l'adulte :

En cas d'accès, probablement ou sûrement résistant à la chloroquine, on recourt à la quinine per os (1,5 à 2g par jour en trois prises), au Fansidar® (3 comprimés en 1 fois, 1 seul jour), au Lariam® (1,25 à 1,5 g en 2 à 3 prises sur 24 heures, 1 seul jour), ou à l'Halfan® (1,5 g en 3 prises à 6 heures d'intervalle).
Peuvent être utilisés également la Malarone® (atovaquone + proguanil), 4 comprimés en une prise pendant 3 jours ou du Riamet® (artémether + lumefantrine) à la posologie de 2 comprimés en 2 prises pendant 3 jours. La guérison clinique et parasitologique est obtenue en 2 à 3 jours.

La voie parentérale n'est indiquée qu'en cas d'intolérance digestive ; on administre la quinine IV.

- Chez la femme enceinte : la quinine, ni tératogène, ni abortive, aux doses curatives peut être prescrite.
- Chez l'enfant : on prescrit de préférence la quinine ou le Lariam®. Les posologies sont adaptées en fonction du poids.

b. A *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* :

- Chez l'adulte, 2 schémas thérapeutiques sont utilisés :
 - 500 mg de Nivaquine® (chloroquine) par jour pendant 5 jours consécutifs.
 - 600 mg/j de Nivaquine® les 2 premiers jours, 300 mg/J les 2 jours suivants et enfin 200 mg le 5^{ème} jour.
- Chez l'enfant, préférer la forme Nivaquine® sirop : J1 : 10 mg/kg en 1 prise, puis 5 mg/kg 6 heures plus tard ; les 2^{ème} et 3^{ème} jours : 5 mg/kg en 1 prise.

Il est préférable de renoncer à la voie injectable qui peut donner des collapsus ; au dessous de 5 ans, cette voie est formellement contre-indiquée.

En cas d'accès de reviviscence à *P. ovale* et *P. vivax*, on peut proposer un traitement par primaquine (Primaquine®, ATU nominative) à la posologie de 0,5 mg/kg/j pendant 14 jours. Son emploi est contre-indiqué chez l'enfant de moins de 4 ans.

De très rares résistances à la chloroquine ont été décrites et n'ont pour l'instant pas d'incidence en pratique métropolitaine.

c. Remarques :

A Nantes, contrairement au reste de la France, c'est la méfloquine (52%, contre 19,5% au plan national pour l'année 2000) qui est la molécule la plus utilisée en première intention. La quinine, molécule utilisée dans 45,7% des traitements à l'échelle nationale en 2000, représente 22,7% des cas à Nantes et se trouve en 2^{ème} place derrière la méfloquine. (Dupré C. 2004)

L'halofantrine, qui tient la 2^{ème} place (avec 24,6% des traitements) dans le classement des molécules les plus utilisées en curatif au plan national en 2000, n'est qu'en 3^{ème} position à Nantes avec 18,3% ; l'utilisation de cette molécule étant en baisse à Nantes depuis 2000, conformément aux recommandations de la conférence de consensus de 1999.

En usage pédiatrique, à Nantes comme sur le plan national, l'halofantrine reste dominante (55% des cas à Nantes).

La quinine reste le médicament de référence dans les accès graves et compliqués ; à Nantes 80% des accès graves ont été traités par la quinine.

L'usage de l'association atovaquone-proguanil, à diffusion uniquement hospitalière jusqu'en octobre 2001, est encore minime, mais représente une alternative pour le traitement des accès simples à *P.falciparum*.

D'autre part, une nouvelle molécule dont le nom de code est OZ 277 vient d'être mise au point et sera probablement disponible à partir de l'an prochain.

Elle a été inspirée d'un composant d'une plante chinoise l'artémisine. Cette molécule serait plus puissante et agirait plus longtemps.

XI. Prophylaxie :

1. Répartition des zones de chimiorésistance selon l'OMS :

(Annexes III et IV)

- **Zone A** : Risque généralement faible et saisonnier ; pas de risque dans de nombreuses régions (par exemple zones urbaines). *P. falciparum* **absent ou sensible à la chloroquine**.
- **Zone B** : Risque faible ; la chloroquine protège contre *P. vivax*, prise avec du proguanil, elle confère une certaine protection vis-à-vis de *P. falciparum*.
- **Zone C** : Risque élevé en Afrique, sauf dans quelques régions en altitude. Risque faible en Asie et en Amérique (sauf dans quelques parties du bassin amazonien). *P. falciparum* **résistant à la chloroquine ou multi-résistant. Résistance à la sulfadoxine-pyriméthamine fréquente en Asie**, variable ailleurs.

2. Prophylaxie individuelle :

a. Réduire le risque de piqûres de moustiques :

Sans piqûre d'Anophèle, pas de paludisme : la lutte anti-vectorielle est donc la première ligne de défense dans la prévention du paludisme.

Les anophèles piquent habituellement entre le coucher et le lever du soleil : c'est pendant cette période que la protection doit être maximale.

- Porter vêtements longs le soir, dormir dans des pièces dont les ouvertures (fenêtres, portes) sont protégées par des grillages moustiquaires en bon état, éviter de sortir la nuit sans protection anti-moustiques.
- Utiliser des insecticides le soir dans les chambres.
- Dormir sous une moustiquaire imprégnée de pyréthrinoides.
- Utiliser des répulsifs sur les parties découvertes du corps.

b. Prendre une chimioprophylaxie : (BEH 10 juin 2003)

Pour la **chloroquine** (Nivaquine®) ou l'association **chloroquine-proguanil** (Nivaquine®-Paludrine® ou Savarine®) ou l'association **atovaquone-proguanil** (Malarone®), il faut commencer le traitement la veille ou le jour de l'arrivée dans la zone à risque. Pour la **méfloquine** (Lariam®), il est préférable de commencer au moins 10 jours avant l'arrivée dans la zone à risque afin d'apprécier la tolérance. La chimioprophylaxie antipaludique doit couvrir 4 semaines après le retour sauf dans le cas d'une chimioprévention par l'association atovaquone-proguanil, qui n'est poursuivie que 7 jours après avoir quitté la zone d'endémie.

♦ Pays du groupe 1 : zone sans chloroquinorésistance : (zone A)

⇒ chloroquine (Nivaquine® 100) : 1 comprimé chaque jour pour une personne pesant au moins 50 kilogrammes ou Nivaquine® 300 1 comprimé 2 fois par semaine.

Chez l'enfant : 1,5 mg/kg/j ou 10 mg/kg/semaine.

♦ Pays du groupe 2 : zone de chloroquinorésistance : (zone B)

- ⇒ chloroquine (Nivaquine® 100) ,1 comprimé chaque jour et proguanil (Paludrine®) 2 comprimés chaque jour en une prise au cours d'un repas ou l'association chloroquine- proguanil (Savarine®) 1 comprimé par jour pour une personne de plus de 50 kg.
- ⇒ L'association atovaquone- proguanil (Malarone®) peut être conseillée en alternative à l'association chloroquine- proguanil : 1 comprimé par jour (atovaquone 250 mg + proguanil 100 mg) chez les personnes d'au moins 40 kg). Le traitement peut être commencé la veille ou le jour du départ.
- ⇒ Chez l'enfant, Nivaquine® 1,5 mg/kg/j et Paludrine® 3 mg/kg/j. La Savarine® n'a pas de présentation pédiatrique.
- La Malarone® pédiatrique (atovaquone 62,5 mg + proguanil 100 mg) est maintenant disponible pour les enfants de 11 à 40 kg.
- Posologie : comprimés à prendre au cours d'un repas ou lors de la prise d'une boisson lactée :

- De 11 à 20 kg : 1 comprimé pédiatrique / jour
- De 21 à 30 kg : 2 comprimés pédiatriques / jour
- De 31 à 40 kg : 3 comprimés pédiatriques / jour

♦ Pays du groupe 3 : zone de prévalence élevée de chloroquinorésistance ou multirésistance : (zone C)

- ⇒ Méfloquine (Lariam® 250) 1 comprimé une fois par semaine pour une personne de plus de 50 kg.
- ⇒ Chez l'enfant, 5 mg/kg/ semaine. Le Lariam® n'existant que sous forme de comprimés quadrisécables dosés à 250 mg, il n'est adapté qu'à la prophylaxie des sujets de plus de 15 kg (environs 3 ans).
- ⇒ La Malarone® peut être proposée en alternative (voir posologies ci-dessus).
- ⇒ La doxycycline (Doxypalu®) peut être conseillée dans les régions de méfloquinorésistance (zones forestières de Thaïlande, frontalières du Cambodge, du Myanmar)

(Birmanie) et du Laos ou en cas d'intolérance ou de contre-indication de la méfloquine.

La posologie de l'adulte est de 100mg/jour, débutant la veille du départ et en poursuivant 4 semaines après la sortie de la zone à risque. Elle ne peut être prescrite avant l'âge de 8 ans et est contre-indiquée à partir du deuxième trimestre de grossesse. De plus, elle est susceptible d'entraîner une photosensibilisation cutanée.

Pour ces mêmes régions, la Malarone® peut être une alternative.

NB : Pour les séjours prolongés (plus de 3 mois), il est recommandé aux voyageurs de prendre contact avec un médecin sur place pour évaluer la pertinence et le rapport bénéfice / risque de la chimioprophylaxie.

♦ Cas particulier de la femme enceinte :

- ⇒ Pays de zone 1 : chloroquine (Nivaquine® 100), 1 comprimé par jour.
- ⇒ Pays de zone 2 : soit chloroquine (Nivaquine® 100), 1 comprimé par jour et proguanil (Paludrine®100) 2 comprimés par jour en 1 seule prise au cours du repas, soit chloroquine- proguanil (Savarine®) 1 comprimé par jour.
- ⇒ Pays de zone 3 : il est déconseillé aux femmes enceintes de se rendre en zone de forte transmission du paludisme et de forte résistance. Si un séjour en zone 3 est indispensable, une prophylaxie par Lariam® ou Malarone® peut être envisagée.

Chapitre 2 : la PCR en temps réel :

Introduction :

Le concept technologique de la réaction de polymérisation en chaîne ou PCR, découvert par Mullis en 1987, est devenu un outil quasiment universel dans le domaine de la biologie.

A ce jour, tous les secteurs de la microbiologie sont concernés mais avec des retombées quotidiennes inégales.

L'apport de la PCR pour le diagnostic est très important en virologie, croissant en bactériologie mais moindre en parasitologie. Les raisons de ce retard sont multiples.

La première est la taille et la complexité du génome des parasites et des champignons par rapport aux virus et aux cellules procaryotes. En effet pour beaucoup d'espèces, les séquences génomiques cibles pouvant servir aux techniques d'amplification et de typage ne sont pas identifiées.

La deuxième raison est liée au fait que les méthodes de diagnostic type examens directs, cultures, sérologies sont souvent efficaces, simples et peu onéreuses en parasitologie et en mycologie.

Leur remplacement par les techniques d'amplification génique n'est justifié que lorsqu'elles sont peu performantes ou longues notamment :

- Pour certains diagnostics d'urgence (diagnostic anténatal de la toxoplasmose congénitale, aspergillose invasive, candidose systémique)
- En cas de pauci parasitisme ou pour le diagnostic d'une rechute survenant après traitement (pneumocystose, paludisme) où la recherche du parasite peut parfois être difficile et fastidieuse.
- Pour les études épidémiologiques basées sur le génotype (microsporidies, cryptosporidies)

Le troisième facteur limitant est d'ordre technique et économique en raison du coût du matériel et des réactifs nécessaires.

Enfin, le manque de standardisation des procédures techniques de PCR, l'absence de contrôles de qualité limitent leur application en routine.

Au fur et à mesure des années, les techniques d'amplification génique n'ont cessé d'évoluer en terme de rapidité, d'automatisation, et de détection des produits amplifiés.

La PCR en temps réel est une illustration concrète des progrès réalisés.

I. Principe :

1. Rappels sur la PCR :

La PCR est une méthode permettant la multiplication d'une courte séquence d'ADN ou d'ARN appelée séquence cible à partir d'une infime quantité d'acides nucléiques. (*Tse et al.2003*)

Ces techniques sont basées sur la répétition de réplication in vitro d'ADN à partir d'amorces spécifiques et sous l'action d'une enzyme la Taq polymérase (ADN polymérase thermostable).

Afin d'amplifier par réplications successives une séquence d'ADN désirée, il est nécessaire de choisir 2 amorces oligonucléotidiques synthétiques monobrins qui sont complémentaires chacune d'une des extrémités du fragment à amplifier. Cette complémentarité permet la multiplication de la séquence encadrée par les deux amorces.

Pour réaliser cette opération, il est donc indispensable de connaître au préalable la séquence à amplifier.

D'autre part, le milieu réactionnel tamponné comprend 4 éléments indispensables : les précurseurs trinucleotidiques, le Mg^{2+} qui est le cofacteur de l'enzyme, l'ADN polymérase et les amorces spécifiques.

L'augmentation du nombre de copies est exponentielle puisque les produits d'amplification servent de matrice pour le cycle suivant.

Après 30 cycles, on obtient en moyenne une amplification de 10^6 selon l'équation :

$$N=N_02^n$$

Où N= nombre de molécules amplifiées au final

N_0 = nombre initial de molécules

n = nombre de cycles d'amplification

Dans la pratique, la PCR comprend **3 étapes** : (Bogard M. et al; 1998)

1. **La dénaturation thermique** : l'ADN est chauffé à une température supérieure à sa température de fusion (**T_m**). Cela rompt les liaisons hydrogène ce qui permet de séparer les deux brins d'ADN. On se place en général à 94 ou 95°C car à cette température l'ADN passe de double à simple brin.
2. **L'hybridation ou annealing**: la température est abaissée à une valeur inférieure à la T_m de l'amorce possédant la plus faible T_m afin que les amorces puissent s'hybrider (entre 40 et 70°C en fonction des couples d'amorces utilisées).
3. **L'élongation** : on augmente progressivement la température ce qui a pour conséquence d'activer la Taq polymérase et la néo synthèse du brin complémentaire. La synthèse se fait dans le sens 5' → 3' à 72°C qui est la température optimale.

Au niveau expérimental, la quantité de produit formé dépend d'un facteur primordial qui est **l'efficacité d'amplification (E)** définie comme étant la proportion moyenne des molécules d'ADN cible se dupliquant à chaque cycle d'amplification ($0 < E < 1$).

Dans les conditions expérimentales habituelles $E < 1$ et varie entre 0,78 et 0,98 selon le gène amplifié.

$$N = N_0 (1 + E)^n$$

Une fois l'amplification terminée, la détection des produits de PCR obtenus (amplicons) nécessite une nouvelle étape qui est à l'origine de contaminations du fait de la manipulation des tubes contenant des quantités importantes de cibles.

L'avantage de la PCR en temps réel est qu'elle combine l'amplification de l'ADN cible et la détection des produits dans un même tube réactionnel.

Différentes technologies peuvent être utilisées.

La PCR en temps réel permet l'amplification et la détection de l'ADN cible à analyser au cours d'une seule réaction ce qui limite les risques de contamination par les amplicons et réduit par la même occasion la durée de la PCR.

2. Les technologies de la PCR en temps réel :

a. Technologies utilisant des intercalants :

Le principe est basé sur **l'utilisation de marqueurs se fixant à l'ADN double brin** qui deviennent fluorescents après excitation par des rayonnements ultraviolets. (*Poitras et al., 2002 ; Tse et al., 2003*).

Le marqueur le plus utilisé est le **SYBR Green®** (intercalant vert) car il donne un signal plus puissant que le bromure d'éthidium (*Higuchi et al., 1997 ; Wittwer et al. 1997*).

Lors de la réaction d'amplification par PCR, le SYBR Green® (SG) libre en solution est peu fluorescent.

Durant l'étape d'élongation, l'augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de SG se fixant à l'ADN double brin naissant.

L'émission de fluorescence décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé en simple brin.

Par conséquent, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction.

Le système est **simple, très sensible mais de spécificité essentiellement conditionnée par le choix des amorces** car le SG marque toutes les molécules d'ADN double brin qu'elles soient spécifiques ou non de la séquence d'intérêt.

De ce fait, tous les produits de la PCR non spécifiques ainsi que les dimères d'amorce éventuellement formés vont également engendrer un signal de fluorescence. L'autre inconvénient est lié à l'intensité de fluorescence qui est proportionnelle à la quantité d'ADN double brin et donc à la taille des amplicons.

C'est la technique que nous utilisons ici.

b. Technologies utilisant des sondes :

Le principe de base est le quenching par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). (Clegg ; 1995)

Une **sonde fluorogénique** est un fragment d'ADN monobrin non extensible par l'ADN polymérase, spécifique du fragment cible amplifié et portant 1 ou 2 groupements fluorophores.

On suit par **mesure de l'intensité de l'émission fluorescente** l'hybridation spécifique de la sonde avec chaque molécule d'amplicon généré.

Pour être sûr que la sonde s'hybride bien à sa cible spécifique, on a un deuxième fluorophore (ou **quencher**) qui absorbe plus ou moins l'énergie émise par le premier fluorophore excité et qui réduit voire empêche l'émission de fluorescence lorsque la sonde se trouve libre dans le milieu réactionnel.

Suite à ce transfert d'énergie, la fluorophore donneur excité retourne à son état initial et l'énergie transférée au quencher est soit absorbée par ce dernier, soit dissipée sous forme de chaleur.

Selon la nature du quencher, on a donc plusieurs techniques.

♦ Méthode Taqman :

La **sonde Taqman** est un **fragment oligonucléotidique marqué par 2 groupements fluorophores en ses extrémités 5' et 3'**.

Cette technique exploite **l'activité exonucléasique de l'ADN polymérase** qui permet d'hydrolyser la sonde hybridée à sa cible spécifique lors de l'étape d'élongation des amorces.

Lorsque la sonde se fixe sur sa cible, les 2 fluorochromes sont proches donc il n'y a pas d'émission de fluorescence.

L'énergie du fluorophore excité par la source est transférée par FRET au fluorophore accepteur.

Comme les spectres d'émission et d'excitation ne se chevauchent pas, **le fluorophore accepteur absorbe l'énergie qui lui est transmise sans émettre de fluorescence.**

Au cours de la synthèse du brin complémentaire la Taq polymérase digère la sonde, les 2 fluorophores se séparent, interrompant donc le FRET. Cette séparation aboutit à une émission de fluorescence pendant la double étape d'annealing-élongation.

♦ **Sondes FRET en tandem (sondes Light Cycler®) :**

Le système utilise un couple de sondes d'hybridation très courtes portant chacune un fluorophore. Une fois les sondes fixées sur l'ADN cible, les 2 fluorophores seront distantes de moins de 5 nucléotides.

De plus, le spectre d'émission du fluorophore donneur se chevauche avec le spectre d'excitation du fluorophore accepteur. Une fois les 2 sondes appariées à leur séquence cible, l'énergie libérée par le fluorophore donneur est captée directement par le fluorophore qui est alors excité et émet un signal fluorescent mesurable.

♦ **Sondes Beacons= balises moléculaires :**

La balise moléculaire est une sonde d'hybridation en épingle à cheveux qui porte à son extrémité 5' un groupement fluorophore **reporter** et à celle 3' un groupement fluorophore non fluorescent **quencher**. La boucle est spécifique et complémentaire de la cible à détecter. La sonde possède **une structure complémentaire qui lui permet de se replier sur elle-même.**

En position repliée, il n'y a aucune émission de fluorescence puisque le quencher absorbe toute l'énergie du rapporteur.

En présence d'une séquence cible complémentaire, la sonde spécifique s'apparie de façon spontanée, ce qui implique un changement de conformation qui éloigne les 2 fluorophores et entraîne l'émission de fluorescence mesurable par le rapporteur.

A la différence du système Taqman, le groupement quencher en 3' est une molécule non fluorescente type Dabcyl (rouge de méthyle) qui restitue l'énergie transmise par le rapporteur sous forme de chaleur et non pas sous forme d'émission lumineuse.

Le bruit de fond est alors considérablement réduit d'où une **sensibilité largement supérieure** à celle des systèmes utilisant un quencher fluorescent.

La spécificité de détection du système est telle qu'elle permet de détecter des différences d'une seule base, puisqu'en cas de mésappariement touchant un seul nucléotide, l'hybridation de la sonde n'a pas lieu.

L'inconvénient majeur reste la difficulté de conception des sondes.

II. Appareillage :

1. Les systèmes :

Il existe sur le marché plusieurs types d'instrumentations permettant de pratiquer la PCR en temps réel.

Les appareils actuellement commercialisés peuvent être classés en deux catégories. (**Annexe I**)

a. Systèmes haut débit :

Ils permettent le suivi simultané d'au moins 96 réactions PCR. (Tse et al., 2003)

On trouve :

- Le Gene Amp 5700 Sequence Detector et l'ABI Prism 7000, 7700, 7900 Sequence Detector de chez Applied Biosystems (Tib Molbiol, Berlin, Germany).
- Le MX 4000 Multiplex Quantitative PCR System de chez Stratagene.
- Le i Cyclor de chez BioRad
- Le DNA Engine Opticon commercialisé par MJ Research.

b. Systèmes à moindre débit mais plus flexibles :

Ils autorisent plusieurs technologies différentes.

- Le Light Cyclor commercialisé par Roche Diagnostic (Meylan, France) ; cet automate est plus polyvalent car permet la réalisation des tests d'hybridation. Il est aussi plus rapide en terme d'exécution des tests de PCR.
- Le **Rotor Gene (Corbett research)** que nous détaillerons dans la seconde partie de notre exposé puisque c'est l'appareil utilisé au cours de nos manipulations.
- Le Smart Cyclor (Eurogentec)

2. Thermocycleur et module de détection :

Tous ces appareils combinent un **thermocycleur** et un **module de détection fluorimétrique** pilotés par une station de travail permettant l'acquisition et le traitement des données.

Les systèmes haut débit fonctionnent avec un thermocycleur combinant une résistance électrique et un circuit de refroidissement. Pour compenser les variations de température entre le bord et le centre de l'appareil, on peut l'équiper des bords chauffants.

Certains appareils permettent l'automatisation des étapes de pré et post-PCR par adjonction de station de pipettage.

Les systèmes à moindre débit sont équipés d'un **thermocycleur à air pulsé** qui assurent une répartition plus homogène de la température d'un échantillon à l'autre. Cette homogénéité de la température est un paramètre très important puisqu'elle conditionne la précision et la reproductibilité des mesures.

Le module de détection fluorimétrique est composé d'une source lumineuse d'excitation allant capter les signaux de fluorescence émis. Trois sources lumineuses d'excitation sont utilisées :

- Source laser-argon
- Lampe électronique LED (Light Emitting Diode)
- Lampe halogène à filament de tungstène.

On a aussi 3 types de détecteurs :

- Une caméra CCD (Charge Coupled Device)
- Une barrette de photodiodes
- Un ou plusieurs tubes photomultiplicateurs (PMT) indépendants.

III. Présentation et interprétation des résultats :

La fluorescence émise au cours de la réaction d'amplification est collectée par un système de détection et est monitorée via une station de travail informatique permettant d'acquérir en temps réel et d'afficher immédiatement les données mesurées.

La représentation graphique des résultats se fait sous forme d'une courbe exponentielle ou courbe sigmoïde d'amplification avec en ordonnée l'intensité de fluorescence émise et en abscisse le nombre de cycles de PCR.

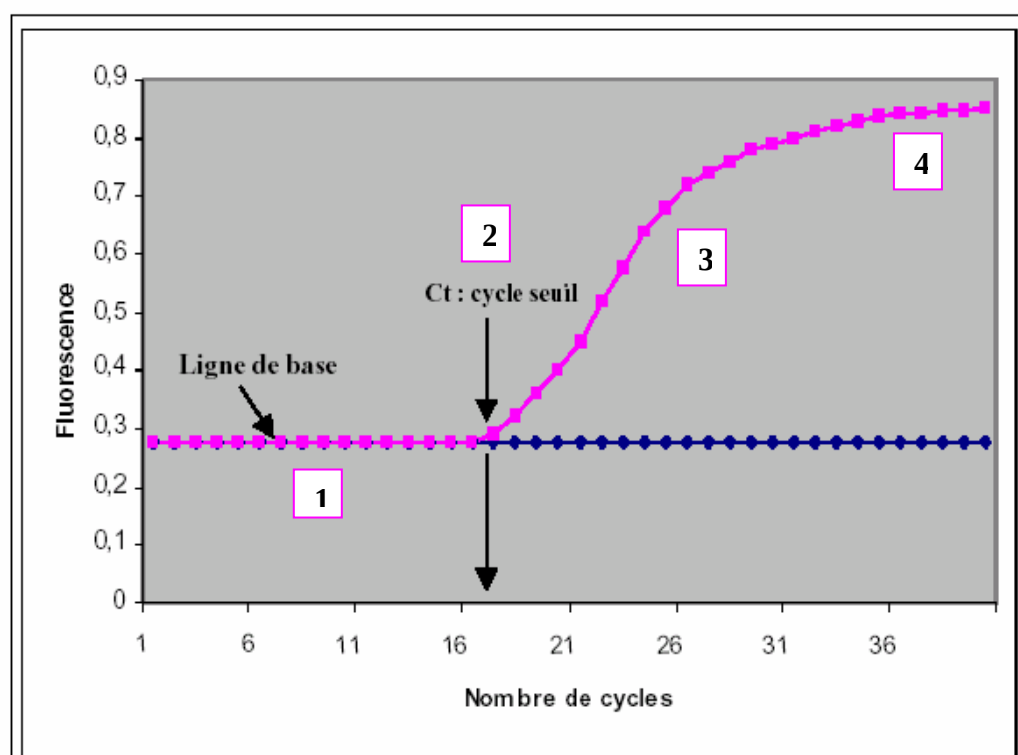


Figure 3: Suivi en temps réel d'une réaction PCR. (Tse et al.2003)

Pendant les cycles précoces de l'amplification, la fluorescence émise est très faible ce qui permet de définir la **ligne de base** de la courbe qui correspond à l'intensité du **bruit de fond** de fluorescence (partie 1 de la courbe).

Après un certain nombre de cycles, l'accumulation des produits de PCR entraîne une **variation mesurable de l'intensité de fluorescence** (partie 3).

Au cours des derniers cycles d'amplification, la quantité de produits formés tend vers une limite, c'est l'**effet saturation ou effet plateau** (partie 4 de la courbe).

Cette phase de saturation reflète une baisse de l'efficacité d'amplification qui résulte (*Morrison et al., 1994*) :

- En partie de l'inactivation thermique partielle de l'ADN polymérase au cours des derniers cycles.
- La diminution des réactifs (amorces, nucléotides) qui deviennent limitants.
- La réhybridation préférentielle de la cible avec elle-même plutôt qu'avec les amorces.
- L'activation de l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase
- L'accumulation de pyrophosphates (produits de la dénaturation thermique des nucléotides) qui inhibent l'activité de l'enzyme.

La **ligne de seuil ou threshold** est établie arbitrairement. Elle est basée sur la variabilité de la ligne de base.

Le point d'intersection entre la courbe d'amplification et cette ligne seuil est défini comme étant le **Ct** (cycle threshold ou **cycle seuil**) qui est lu sur l'axe des abscisses.

Plus précisément, le cycle seuil optique est le nombre fractionnaire de cycles pour lequel l'intensité de la fluorescence émise a dépassé une valeur seuil significative différente du bruit de fond.

Les résultats sont représentés sous forme d'une courbe sigmoïde que l'on suit sur l'ordinateur en temps réel.

Pour un échantillon donné, le résultat s'exprime par le Ct ou cycle seuil correspondant au nombre de cycle d'amplification à partir duquel l'échantillon est considéré comme positif.

IV. Applications de la PCR en temps réel :

La PCR en temps réel, du fait de sa capacité à rendre des résultats rapides, spécifiques et quantitatifs, trouve de plus en plus d'applications dans différents domaines.

En biologie médicale, les applications les plus importantes se situent en microbiologie clinique, en oncologie et dans l'étude de l'expression des gènes.

1. Microbiologie clinique :

C'est en virologie que ces techniques sont actuellement le plus utilisées pour la détection et la quantification des génomes viraux.

Cela permet d'estimer la concentration d'une cible particulière d'ADN ou d'ARN par rapport à un standard.

Cette technique s'est avérée d'un grand intérêt pour la titration du virus (HIV 1 et HIV 2, HBV, HCV) dans les phases précoces de la maladie mais aussi dans le suivi des sujets infectés et en particulier le suivi des traitements antiviraux.

La détection et la quantification d'agents pathogènes bactériens (mycobactéries, légionnelles, mycoplasmes, *Bordetella pertussis*, chlamydia...), de protozoaires (toxoplasme, *Plasmodium*) et de champignons (*Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*...) par PCR en temps réel ont fait l'objet de plusieurs centaines de publications.

Cet intérêt s'explique par la durée du diagnostic traditionnel qui s'exprime en jours voire semaines et par la grande sensibilité de cette technique parallèlement aux méthodes conventionnelles.

2. Oncologie clinique :

La PCR en temps réel est également très prometteuse dans la recherche et la quantification des gènes suppresseurs de tumeurs (par mutation ou délétion allélique) ou pour la recherche d'activation d'oncogènes.

3. Expression génique :

La quantification par RT-PCR en temps réel est utilisée pour estimer le niveau d'expression de gènes d'intérêt comme les gènes de cytokines ou pour l'analyse des variants d'épissage, ou pour valider les profils d'expression obtenus à l'aide des puces à ADN.

Le développement de la PCR en temps réel est en plein essor et est de plus en plus utilisée dans le diagnostic microbiologique.

Partie II :
**Application de la PCR en
temps réel dans le
diagnostic des 4 espèces
plasmodiales au laboratoire
de Parasitologie de Nantes.**

Introduction :

En France, depuis 1996, on assiste à une recrudescence du paludisme d'importation. Pour les années 1998, 1999 et 2000, le nombre de cas estimés pour la France évoluent de 5940, 7127 à 8056. (*D'après les données du CNREPIA. Dupré Cécilia ; 2004*)

Mais depuis 2001, on observe une diminution du nombre de cas de paludisme d'importation en France métropolitaine ; la décroissance annuelle est d'environ 10% pour 2002 et de 6-7% pour 2003.

Cependant, à Nantes, on diagnostique de plus en plus de cas depuis 1996. En effet, entre 1991 et 1996, on avait entre 25 et 30 cas annuels ; entre 1997 et 2000 : 40 cas annuels ; entre 2001 et 2003 : 54 cas annuels en moyenne (57 cas en 2003).

Dans la plupart des hôpitaux, le diagnostic du paludisme repose sur la méthode de référence basée sur la lecture de la goutte épaisse et du frottis sanguin mais le diagnostic par microscopie requiert de l'expérience et une compétence particulière d'où le développement récent de techniques complémentaires.

Les tests immuno-chromatographiques sont intéressants en deuxième intention dans les cas de faible parasitémie, pour un diagnostic d'urgence en garde, pour les dons d'organes.

D'autre part, les cas de poly parasitisme, de pauci infestation et les cas de morphologie déformée par un traitement antimalarique posent un réel problème de diagnostic.

De ce fait, il a semblé intéressant de développer des techniques de biologie moléculaire assurant à la fois une plus grande sensibilité et une plus grande spécificité.

En effet, quelques équipes ont travaillé sur une PCR nichée (nested PCR) (*Snounou et al. ; 1993a et 1993b ; Roper et al. ; 1996 ; Zalis et al. ; 1996 ; Snounou G. ; 1996 ; Kimura et al. ; 1997 ; Rubio et al. ; 1999 ; Gautret et al. ; 2001 ; Zakeri et al. ; 2002 ; Di Santi et al. ; 2004 ; Montenegro et al. ; 2004 ; Scopel et al. ; 2004*) pour le diagnostic d'une ou des 4 espèces de *Plasmodium* mais cette technique ne permet pas de rendre un résultat avant 8 heures ce qui la rend inadaptée à l'urgence.

D'autres chercheurs se sont penchés sur les techniques d'hybridation avec sondes radiomarquées (*Waters et al; 1989*) ou avec des sondes non isotopiques (*Barker et al. 1992*) couplées avec une détection colorimétrique (*Cicéron et al, 1999*) en microplaques (*Kimura et al. 1995 ; Kawamoto et al; 1996 ; Zhong et al. 1999 ; Calderaro et al; 2004*). D'autre comme *Perandin et al. (2003)* ont utilisé une PCR suivi d'une hybridation par Southern blot.

Cependant, ces techniques sont longues (plus d'une journée) donc inadaptées à l'urgence.

Whiley et al. (2004) ont mis au point une PCR ELAHA qui combine une PCR suivie d'une hybridation couplée à une révélation immunoenzymatique qui dure 5 heures.

Schoone et al. (2000) ont testé une PCR quantitative de type NASBA pour le diagnostic des 4 espèces plasmodiales.

Mc Namara et al. (2004) ont développé une PCR multiplex ligase.

Pour remédier aux désavantages des différentes techniques de PCR, d'autres équipes ont opté pour une PCR en temps réel permettant un résultat dans un délai de 2 heures environs. La plupart ont développé une PCR utilisant la méthode Taq man (*Hermesen et al; 2001 ; Lee et al; 2002 ; Perandin et al; 2004*).

De Monbrison et al. (2003) de même que *Fabre et al. (2003)* et *Berry et al. (2004)* ont préféré utiliser une PCR en temps réel utilisant la technologie des intercalants (ici le SYBR®Green), technique que nous développons aussi par la suite.

La PCR en temps réel représente un réel progrès dans le monde de la biologie moléculaire. Malgré son coût encore élevé en terme d'équipement, de maintenance, de réactifs, elle présente plus d'avantages que de limites :

- La rapidité de la réalisation permet une diminution du délai de réponse : de 8H pour une nested-PCR à <3 H pour une PCR en temps réel.
- La technique assure le suivi en temps réel de l'amplification grâce à l'incorporation d'un marqueur fluorescent (sonde ou intercalant et à la mesure du signal émis après chaque hybridation ou élongation).

- La mesure de la fluorescence en temps réel remplace l'étape de migration sur gel ou les techniques ELISA en ce qui concerne la détection des amplicons. De ce fait, on diminue les problèmes de contamination par des amplicons des réactions antérieures. (*De Monbrison et al; 2003*)
- L'automatisation de la technique permet son utilisation en routine et réduit le temps technicien.
- La PCR en temps réel est reproductible et au moins aussi sensible que les autres techniques (*Morassin et al, 2002*) et assure un diagnostic d'espèce avec certitude.

I. Mise au point de la PCR en temps réel **dans le diagnostic des différentes espèces:**

Le point de départ de nos travaux est le transfert de connaissances entre le laboratoire de Parasitologie de Toulouse du Professeur Séguela et le laboratoire de Parasitologie de Nantes.

En effet, cette équipe a mis au point une PCR en temps réel adaptée au diagnostic de chacune des 4 espèces plasmodiales humaines (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*) ainsi qu'une PCR adaptée à la détection générique de toute espèce plasmodiale humaine (SSU). (*Fabre R. et al., 2003*)

Cependant, le CHU de Nantes dispose d'un Rotor Gene (Corbett Research) dont le principe de fonctionnement (technologie Taq Man ou SYBR®Green) est différent du Light Cycler (Roche Diagnostic) utilisé à Toulouse.

Pour la mise en place de cette PCR en temps réel, il a fallu déterminer les concentrations optimales de la réaction PCR (température, concentration en MgCl₂, concentration en échantillon) en utilisant des échantillons de sang de patient dont le diagnostic de paludisme et surtout le diagnostic d'espèce avait été fait en fonction de la morphologie microscopique.

Cette détermination préalable est indispensable afin de parvenir à une amplification sélective du fragment recherché avec une sensibilité optimale.

A. Matériel et méthode :

1. Sources d'ADN :

Nous avons utilisé des échantillons congelés à -20°C de sang total de patients prélevés sur anticoagulant (EDTA) dont on avait dépisté un paludisme avec les techniques microscopiques d'étude du frottis sanguin. Un minimum de $200\mu\text{L}$ est nécessaire pour l'extraction d'ADN.

Notre étude relève de 2 groupes de patients :

- Une **étude rétrospective** portant sur des patients de **2002 et 2003** (jusqu'à début septembre) : le diagnostic de paludisme a été porté par microscopie. Nous n'avons eu aucune possibilité de reprendre les lames de frottis sanguin pour comprendre les discordances dont nous parlerons plus tard.
- Une **étude sur les prélèvements récents** (septembre 2003 à octobre 2004) avec la possibilité de reprendre les lames de sang.

D'autre part, cette étude ne porte pas sur toutes les demandes de recherche de paludisme entre 2002 et 2004.

En effet, le laboratoire de Parasitologie de Nantes a diagnostiqué 53 paludismes en 2002 et 57 en 2003 pour un nombre total de demandes de 331 pour 2002 et 294 pour 2003. (*Dupré Cécilia ; 2004*)

En ce qui concerne 2004, nous sommes actuellement à 32 paludismes positifs sur 272 demandes.

Entre 2002 et 2004, nous avons retrouvé 13 *P.ovale*, 7 *P.vivax* et 6 *P.malariae* diagnostiqués au laboratoire.

Le budget et le temps impartis à cette étude ne permettaient pas de passer tous les cas de demande de paludisme en revue ; il a donc fallu faire un tri.

Certains échantillons de sang en trop faible quantité ($<200\mu\text{L}$) n'ont pas pu être techniques (souvent le cas des enfants où peu de sang est prélevé).

De ce fait, nous avons pris tous les patients diagnostiqués avec une espèce autre que *P.falciparum* ainsi que certains *P.falciparum* (fortes parasitémiées et un échantillon de parasitémiées $<0,01\%$ qui posent problème avec le diagnostic classique). Nous avons aussi sélectionné des patients diagnostiqués comme négatif mais présentant une sérologie à un titre significatif (>160) ainsi que des négatifs avec un taux d'anticorps inférieur à 40.

Sur les 897 demandes de recherche de *Plasmodium*, dont 142 paludismes diagnostiqués depuis 2002, nous avons sélectionné 122 patients.

2. Extraction de l'ADN :

Le kit d'extraction utilisé est le **High Pure PCR Template Preparation Kit** (Roche Diagnostic) basé sur le principe de la précipitation et de la purification de l'ADN sur colonne. Les étapes d'extraction sont décrites dans l'annexe V.

Cette étape doit se faire dans une pièce différente de celle où l'on prépare les Mix pour éviter les contaminations.

3. Technique d'amplification génique utilisée : PCR en temps réel avec agent intercalant :

Les systèmes permettant la détection des molécules d'amplicon générées après chaque cycle d'amplification font appel soit à un agent intercalant se fixant directement sur l'ADN double brin, soit à une sonde fluorogénique allant s'hybrider. (Tse C. *et al.* 2003)

Le système le plus simple repose sur l'inclusion d'un agent intercalant, le **SYBR® Green I** qui se lie préférentiellement à l'ADN double brin nouvellement synthétisé.

Principe : voir annexe VI

A chaque étape d'hybridation et d'élongation d'un cycle de PCR, le SYBR® Green I s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin et peut émettre un signal de fluorescence lorsqu'il est excité par des rayonnements UV.

La mesure de l'intensité du signal émis à la fin de chaque étape d'élongation permet le suivi cycle par cycle de la réaction de PCR.

Le système est simple, très sensible, mais de spécificité essentiellement conditionnée par le choix des amorces.

Le SYBR® Green I marque toutes les molécules d'ADN double brin qu'elles soient spécifiques ou non de la séquence d'intérêt.

De ce fait, tous les produits de PCR non spécifiques ainsi que les dimères d'amorces éventuellement formés vont également engendrer un signal de fluorescence. Ce défaut de spécificité constitue la limite majeure des systèmes utilisant une sonde fluorogénique pour lesquels la production d'un signal de fluorescence est indépendante de la longueur du produit amplifié et spécifique de l'amplicon détecté.

Néanmoins, le système de détection utilisant le SYBR® Green I est un système très simple qui permet de tester la spécificité d'une réaction PCR par l'établissement d'une courbe de fusion post-PCR puis par la détermination de la température de fusion (**T_m** : melting temperature) des produits amplifiés.

Le SYBR®Green est un agent intercalant qui marque toutes les molécules d'ADN double brin. Après excitation, il émet un signal fluorescent que l'on peut mesurer en temps réel ce qui permet de suivre la réaction de PCR.

4. Conditions de la réaction de PCR en temps réel :

a. Les amorces :

Classiquement, le choix des amorces se fait selon certains critères :

(Bogard M. et al; 1998.)

- Taille entre 20 et 30 paires de bases
- Choisir des amorces de séquences exactement complémentaires du fragment à amplifier (absence de mismatches ou mésappariements)
- Absence d'hybridation des amorces sur elles-mêmes (absence d'auto complémentarité) et entre elles (absence de complémentarité). Les dimères d'amorces résultent de l'hybridation des amorces sens et antisens entre elles.
- Les amorces ne doivent pas faire de boucles sur elles-mêmes
- La température de fusion (ou T_m) des amorces doit être suffisamment élevée (au minimum 55°C quand cela est possible). En effet, plus la T_m est élevée, moins le risque d'hybridation non spécifique est important.

Les amorces choisies ont été sélectionnées par le laboratoire de Toulouse du Pr. Séguela. (Berry et al ; 2004)

- ✦ Le couple d'amorce spécifique du genre *Plasmodium* (amplifiant donc les 4 espèces plasmodiales) est appelé SSU :
 - a. SSU1 : 5'- AGT-TAC-GAT-TAA-TAG-GAG-TAG-3'
 - b. SSU2: 5'- CCA-AAG-ACT-TTG-ATT-TCT-CAT-3'

- ✦ Le couple d'amorces spécifiques de *Plasmodium falciparum* est PF1/PF2 (issues de la petite sous-unité de l'ARN r (ssu rRNA)) :
 - a. PF1 : 5'- GGA-ATG-TTA-TTG-CTA-ACA-C-3'
 - b. PF2 : 5'- AAT-GAA-GAG-CTG-TGT-ATC-3'

- ✦ Le couple d'amorces spécifiques de *Plasmodium ovale* est : PLF/OVR (issues sur le gène mitochondrial de la CoxI du parasite) :
 - a. PLF : 5'- AGT-GTG-TAT-CAA-TCG-AGT-TT-3'
 - b. OVR : 5'-GCA-TAA-GGA-ATG-CAA-AGA-ACA-G-3'

- ✦ Le couple d'amorces spécifiques de *Plasmodium vivax* est : PV1/PV2 (issues sur le gène mitochondrial de la CoxI du parasite) :
 - a. PV1 : 5'- CAC-CAT-TAA-GTA-CAT-CAC-3'
 - b. PV2 : 5'- TGT-TAA-TAC-AAC-TCC-AAT-3'

- ✦ Le couple d'amorces spécifiques de *Plasmodium malariae* est : PLF/MAR : (issues de la petite sous-unité de l'ARN r (ssu rRNA))
 - a. PLF : 5'- AGT-GTG-TAT-CAA-TCG-AGT-TT-3'
 - b. MAR : 5'- GCC-CTC-CAA-TTG-CCT-TCT-3'

- ✦ Le couple d'amorces spécifiques de la Bétoglobine humaine est BGO7/BGO8 :
 - a. BGO7 : 5'- GGT-TGG-CCA-ATC-TAC-TCC-CAG-G-3'
 - b. BGO8 : 5'-TGG-TCT-CCT-TAA-ACC-TGT-CTT-G-3'

Tableau 2 : Caractéristiques des amorces (Laboratoire Eurogentec) :

Amorce	Tm (°C)	Masse moléculaire (g/mol)
SSU1	56	6533,36
SSU2	56	6355,23
PF1	52	5826,88
PF2	50	5562,71
BGO7	70	6711,43
BGO8	64	6667,4
PV1	50	5411,63
PV2	46	5441,65
PLF	54	6162,09
OVR	62	6834,57
MAR	56	5361,55

Nous disposons donc de 6 couples d'amorces dont 4 spécifiques d'espèces plasmodiales, 1 spécifique du genre *Plasmodium* et 1 spécifique de la β globine (témoin d'extraction).

b. La Taq polymérase :

La polymérase utilisée est une « Hot –Start » polymérase, la Hot GoldStar® du laboratoire Eurogentec. Elle est utilisée dans le Mix à une concentration de 0,025U/ L.

Son activation nécessite une incubation à 95°C pendant 10 min ce qui inhibe ainsi toute activité prématurée au cours de la préparation du Mix.

L'enzyme est reconstituée dans du DMSO ce qui permet une conservation à + 4°C.

Il est inutile de mettre trop d'enzyme car avec une quantité trop importante de celle-ci, on obtient un bruit de fond trop important, voire une inhibition de la réaction. (*Bogard M. et al ; 1998.*)

Nous avons, de ce fait, choisi une polymérase de type Hot-Start à 0,025U/ μ L.

c. Les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) :

Les nucléotides sont utilisés à la concentration de 200 μ M chacun.

La concentration de chaque dNTP doit être identique afin d'éviter les risques d'incorporation erronée des nucléotides par erreur de la polymérase.

Des concentrations supérieures à 200 μ M pour chaque dNTP ne doivent pas être dépassées au risque d'augmenter le nombre d'erreurs d'incorporation.

Par contre, des concentrations inférieures à 20 μ M peuvent diminuer le rendement de la réaction d'amplification. (*Bogard M. et al; 1998.*)

d. Le tampon 10X :

Le tampon est constitué de tampon TRIS-EDTA, de 10mM de TRIS-HCl et 0,1 mM d'EDTA. Le pH final est de 8.

e. Le MgCl₂ :

**Le magnésium (Mg²⁺) sert de cofacteur à la Taq polymérase.
La concentration en Mg²⁺ est un paramètre essentiel à la spécificité et à
l'efficacité de la réaction.**

En effet, des concentrations trop élevées favorisent la formation d'ADN double brin. L'ion Mg²⁺ interagit avec les charges négatives de l'ADN et limite les forces de répulsion entre les brins d'ADN. De ce fait, en favorisant et en stabilisant l'hybridation, des appariements non spécifiques peuvent se produire, notamment entre les amorces qui forment alors des dimères.

Au contraire, une concentration trop faible réduit l'activité de la polymérase.

Il existe une relation inverse entre la quantité de dNTP utilisée et la concentration de MgCl₂. En effet, les dNTP chélatent une partie des ions Mg²⁺. Par conséquent une augmentation des dNTP diminue la concentration disponible des ions Mg²⁺ libres.

Ainsi, pour chaque cible et pour chaque couple d'amorces, il faut déterminer expérimentalement la concentration optimale de MgCl₂ pour une concentration donnée de nucléotides puisque ceux-ci complexent le Mg²⁺.

f. SYBR®Green :

La concentration finale dans le Mix en SYBR® Green (SG) doit être comprise entre 1/5000 et 1/ 100000. Une concentration trop forte en SG peut entraîner une inhibition de la réaction puisqu'en tant qu'intercalant de l'ADN, il peut interférer dans la réaction d'amplification.

Par contre, une quantité trop faible de SG ne fournira pas assez de molécules de SG pour marquer les amplicons de façon suffisante. (*Corbett Research.*)

Le kit de PCR d'Eurogentec propose un Mix type qui contient 1/66000 de SG.

**Ici, nous nous sommes placés à une concentration
finale de 1/66000 de SG dans le Mix.**

g. Echantillons d'ADN :

Les échantillons d'ADN sont stockés sous forme d'aliquotes d'ADN pur après extraction. Suite à nos essais, nous ne les utilisons que dilués au 1/4 ou au 1/8. La dilution préalable tend à réduire le risque de diminuer le rendement de la polymérase par la présence éventuelle dans l'échantillon d'ADN extrait de substances inhibitrices. (*Karsai et al; 2002*)

Les échantillons d'ADN sont utilisés dilués au 1/4 ou au 1/8 selon les PCR.

h. Préparation du Mix :

Tous les composants précédemment cités sont compris dans un kit commercial de chez **Eurogentec** ; il s'agit du **qPCR Core Kit for SYBR®Green I – No ROX**.

Nous nous sommes basés sur le modèle de Mix de 50µL conseillé par ce laboratoire pour calculer les concentrations de chaque composant. Nous voulions nous placer à 20µL de Mix final soit 15µL de Mix + 5µL d'échantillon. En effet, le Rotor Gene peut travailler sur ce volume ce qui permet d'économiser du réactif.

En annexe XIII, vous trouverez le détail de la préparation de chaque Mix pour chacune des espèces plasmodiales issu des essais de mise au point notamment pour la concentration de MgCl₂.

i. **Automatisation et cycle de température :**

Le thermocycleur en temps réel utilisé pour cette étude est le Rotor Gene (Corbas Research).

Sa description et son fonctionnement sont exposés en annexe VII.

Le programme de PCR a 2 étapes :

- 1^{er} cycle de température : L'ADN est dénaturé à **95°C** pendant **10 minutes**. Dans un même temps, la Taq polymérase est activée par la chaleur.
- 2^{ème} cycle de température : (répété 40 fois)
 - dénaturation à **94°C** pendant **15 secondes**
 - hybridation et élongation à une température et pendant un temps déterminés expérimentalement.

Pendant une de ces 2 étapes on suit la fluorescence.

B. Résultats :

Pour une PCR, on doit déterminer expérimentalement la concentration en MgCl₂ et la température d'hybridation élongation.

Afin de mettre au point ces paramètres, nous sommes partis de patients (que l'on appellera témoins par la suite) diagnostiqués comme positifs par microscopie pour chaque espèce plasmodiale. Nous nous sommes donc servis d'ADN extrait du sang total congelé de patients diagnostiqués au CHU de Nantes entre 2002 et 2004.

Pour chaque couple d'amorce donc pour chaque espèce plasmodiale, il a fallu déterminer les conditions optimales de la PCR.

Pour chaque essai nous avons préparé le Mix extemporanément en fonction des conditions opératoires à tester.

L'automate de PCR en temps réel étant commun à plusieurs services, il nous a fallu travailler pendant les créneaux horaires disponibles (soir et week-end) ce qui a freiné la progression de cette mise au point.

De plus, le Rotor Gene étant dans une pièce non climatisée, nous avons dû essuyer quelques échecs de manipulations lors de la canicule de l'été 2003. Ceci a contribué aussi à prendre du retard dans nos travaux.

1. Mise au point des conditions opératoires de la PCR simplex :

Pour mettre au point notre PCR nous avons testé diverses conditions opératoires puis nous avons étudié à la fois la courbe de fusion et la courbe brute du suivi de la fluorescence.

Sur la courbe de fusion, nous avons recherché l'apparition d'un pic étroit spécifique de chaque couple d'amorces et donc de chaque espèce plasmodiale à une température donnée dite **T_m**.

Sur la courbe de suivi de la fluorescence en fonction du nombre de cycles de PCR, on peut déterminer le **Ct** qui est le **nombre de cycle d'amplification à partir duquel l'échantillon est considéré comme positif**.

Chaque mise au point, pour chaque espèce plasmodiale, a fait intervenir plusieurs patients.

Pour *Plasmodium falciparum*, nous avons beaucoup d'échantillons, les essais ont été fait sur 4 ou 5 témoins.

Pour les autres espèces, le faible nombre de prélèvement n'a permis des essais que sur 2 ou 3 témoins. De plus, il a fallu limiter la consommation des aliquotes d'ADN pour les espèces autres que *falciparum* puisque nous en avons peu.

a. *Plasmodium falciparum*, β globine et SSU :

Nous disposions d'un grand nombre de prélèvements positifs à *P.falciparum* à des parasitémiés très diverses ce qui a permis de réaliser les essais sur un échantillonnage intéressant de parasitémiés variables.

En se basant sur les conditions opératoires du laboratoire de Parasitologie de Toulouse, nous avons commencé nos essais de PCR à 63°C pour l'étape d'hybridation/élongation avec 3mM de MgCl₂.

Les premiers essais ont été réalisés sur deux échantillons BIA 990 (*P.falciparum* à 2,5%) et SAM 409 (*P.falciparum* à 3,5%) ainsi avec des parasitémiés assez élevées nous pouvions plus aisément mettre au point la technique. Les échantillons sont dilués au 1/4.

Tableau 3 : Premiers essais de mise au point de la PCR *P. falciparum* :

	3 mM MgCl ₂		4 mM MgCl ₂		5 mM MgCl ₂	
	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm
BIA 990	42,14	79,3	38,24	79,6	34,67	79,7
SAM 409	40,02	79,4	34,3	79,4	32,03	79,4

Sur l'aspect de la courbe nous avons opté pour la condition 3 mM de MgCl₂ car à 4 et 5 mM on observe beaucoup de bruit de fond avec des pics parasites qui risquent ensuite de compliquer la réponse.

Ainsi, d'autres essais sont faits sur plusieurs échantillons : BLV 321 (*P.falciparum* 0,40%), MEG 290 (*P.falciparum* 1,20%), OUR 995 (*P.falciparum* : rares gamétocytes), YAG 095 (*P.falciparum* <0,10%), CAA 443 (*P.falciparum* <0,50%).

L'intérêt de cette PCR est de pouvoir faire un diagnostic dans une même PCR de *P. falciparum* et de la présence d'une autre espèce grâce à la PCR SSU. De ce fait, il faut que les PCR *P.falciparum* et SSU marchent à la même température.

D'autre part, pour pouvoir tout combiner dans une même PCR, il faut que la PCR β globine (témoin d'extraction) marche aussi à la même température.

Tableau 4 : Essais de mise au point des PCR SSU et *P.falciparum* :

	SSU		<i>P.falciparum</i>	
	Ct	Tm	Ct	Tm
BLV 321	21,24	81,8	23,02	79,4
MEG 290	17,09	81,9	17,15	79,6
OUR 995	27,15	81,9	23,76	79,4
YAG 095	25,89	81,9	22,18	79,4
CAA 443	21,55	81,9	21,48	79,4

Les courbes étant nettes avec un faible bruit de fond, nous avons donc décidé de garder ces réglages.

Les essais à 63°C étant satisfaisants pour la PCR β globine (Tm $\approx$ 87-88°C), nous avons opté pour rester dans les mêmes conditions que les PCR SSU et *P.falciparum*, ce qui permet en une même PCR de passer les échantillons d'ADN en SSU, *P.falciparum* et β globine.

En annexe VIII se trouve un exemple de courbe de fusion SSU/
P.falciparum.

En annexe IX, vous trouverez la courbe de suivi de fluorescence.

**Pour les PCR *P.falciparum*, SSU et β globine, on se place à 3 mM
MgCl₂, échantillon d'ADN dilué au ¼ et à une température
d'hybridation de 63°C.**

b. *Plasmodium ovale* :

Pour cette espèce, la PCR fonctionnait à une température de 64°C, c'est donc dans ces conditions que nous avons commencé la mise au point.

D'autre part, nous disposons de plusieurs patients diagnostiqués à *P.ovale* en microscopie, ce qui nous a permis de faire des essais sur 6 patients en parallèle. Par la suite, pour ne pas encombrer le texte, nous avons exposé les résultats d'un seul échantillon. Il faut savoir que chaque échantillon donnait des résultats similaires.

Nous avons d'autre part l'idée de faire fonctionner les PCR pour des espèces plasmodiales différentes avec les mêmes cycles de température, soit 63°C si possible comme la PCR *P.falciparum* déjà au point.

Tableau 5 : Essais de température pour *P.ovale* : Ct obtenus (en nombre de cycles):

	62°C			63°C			64°C		
	3mM	4mM	5mM	3mM	4mM	5mM	3mM	4mM	5mM
1/4							33,56	37,3	32,88
1/8	18,38	18,64	19,87	16,96	17,25	17,71	32,25	34,51	30,12

Les pics de T_m étant plus nets à la dilution d'ADN **1/8**, et ce pour l'ensemble des échantillons, nous l'avons gardé pour la suite de la mise au point.

De plus, la température de 63°C donne des pics de T_m plus distincts et des Ct plus faibles.

Il a donc fallu refaire une gamme de MgCl₂ pour trouver la concentration adéquate.

Tableau 6 : Gamme d'étalonnage de MgCl₂ pour *P.ovale* : Ct obtenus (en nombre de cycles):

	3 mM	4 mM	5 mM
Témoin positif	16,96	17,25	17,71

Après étude des pics de T_m et des Ct, la concentration de 3 mM de MgCl₂ est retenue. Cela permet en plus de lancer cette PCR au même cycle de température que la PCR *P.falciparum*.

Vous trouverez en annexe X un exemple de courbe de fusion *P. ovale*.

Pour la PCR *P.ovale*, on se place à 3 mM de MgCl₂, échantillon d'ADN dilué au 1/8 et à une température d'hybridation de 63°C. Cela permet de réaliser les PCR SSU, *P.falciparum* et *P.ovale* au cours d'un même cycle.

c. Plasmodium malariae :

Sur la base de 68°C, température utilisée à Toulouse, nous avons commencé les essais avec les patients diagnostiqués à *P.malariae* (soit 3 patients à l'époque) avec une gamme de MgCl₂ (3-4-5 mM) et 2 concentrations de l'échantillon d'ADN (1/4 et 1/8).

A 68°C, 64°C, 63°C et 62°C, on n'obtient aucune réaction, aucun pic spécifique.

Ces résultats troublants nous ont amené à réfléchir sérieusement sur la cause de cet échec total de la PCR. Ne trouvant pas de solution nous avons été obligés de laisser de côté cette PCR.

L'arrivée dans le service d'un sang avec une forte parasitémie d'un *Plasmodium malariae* de morphologie très typique nous a permis de reprendre nos recherches en se basant sur le postulat d'une erreur de diagnostic pour les 3 patients classés *P.malariae* auparavant.

Nous avons commencé à 64°C avec une gamme de MgCl₂ de 2-3- 4-5-6 mM. Avec ce nouveau témoin positif (MEM 749) nous avons obtenu des pics très nets à un T_m autour de 82°C pour chaque point de gamme.

Tableau 7: Ct obtenus à la température d'hybridation de 64°C pour *P.malariae* (en nombre de cycles):

Dilution ADN	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	6 mM
1/4	28,65	30,93	23,28	26,8	24,67
1/8	39,05	32,19	24,91	27,95	25,03

L'amplitude des pics étant plus grande à la dilution 1/8 nous avons retenu cette condition. D'autre part, la concentration de 5 mM semblait la plus intéressante au niveau de l'amplitude du pic de T_m et du Ct

Nous avons donc fait des essais complémentaires avec une gamme de MgCl₂ sur 2 témoins *P. malariae* (un 2^{ème} sang parasité à cette espèce nous est parvenu entre temps : 749 et 754).

Tableau 8 : Gamme de MgCl₂ pour *P.malariae* : Ct obtenus (en nombre de cycles):

Témoin	4mM	5mM	6mM
749	31,48	31,1	32,25
754	28,82	27,28	27,57

La concentration où le pic de T_m est le plus net et le Ct le plus faible est 5mM de MgCl₂.

Vous trouverez en annexe XI un exemple de courbe de fusion de *P.malariae*.

Pour la PCR *P.malariae*, on se place à 5 mM de MgCl₂, échantillon dilué au 1/8, à une température d'hybridation de 64°C.

d. *Plasmodium vivax* :

En partant de 58°C comme à Toulouse, nous avons commencé la mise au point de la PCR *P. vivax*.

Nous nous sommes servis de 2 témoins *P.vivax* le 736 et le 881.

Tableau 9 : Essais à 58°C pour *P.vivax* : Ct obtenus en nombre de cycles.

		2mM	3mM	4mM
736	T _m	78,1	77,8	77,8
	Ct	41,96	34,7	32,78
881	T _m	0	77,8	0
	Ct	0	42,3	0

Suite à ces résultats, nous avons décidé de tester des températures d'hybridation plus élevées : 59°C, 60°C et 62°C avec une gamme de MgCl₂ à 3-4-5 mM qui n'ont donné aucun pic.

Nous avons donc poursuivi avec des températures plus basses.

Tableau 10 : Essais de température et de concentration de MgCl₂ pour *P.vivax* : Ct obtenus en nombre de cycles :

	57°C			55°C			53°C			51°C		
	3mM	4mM	5mM	2mM	3mM	4mM	3mM	4mM	5mM	3mM	4mM	5mM
736	35,73	27,99	0	24,39	19,6	24,34	29,22	25,64	36,85	18,91	22	19,89
881	37,43	31,19	0	29,43	23,71	28,02	34,82	29,25	0	24,62	26,88	25,16

Le pic de T_m étant assez large à 57°C, nous avons tenté de descendre la température d'hybridation à 53°C puis à 51°C. A cette température de 51°C, nous avons des pics étroits avec un T_m autour de 78-79°C. La concentration de 3 mM de MgCl₂ semble le mieux convenir.

Vous trouverez en annexe XII un exemple de courbe de fusion de *P.vivax*.

**Pour la PCR *P.vivax*, on se place à 3mM de MgCl₂,
échantillon dilué au 1/4 et à une température
d'hybridation de 51°C.**

2. Mise au point des conditions opératoires de la PCR multiplex :

En se basant sur le travail de l'équipe de Toulouse de Fabre R., nous avons ensuite entamé la mise au point de la PCR multiplex. (Fabre R. et al., 2003 ; Berry et al., 2004)

Il s'agit en fait de mettre dans un même tube les amorces spécifiques de *Plasmodium falciparum* (PF1/PF2), les amorces spécifiques du genre *Plasmodium* (SSU1/SSU2) et les amorces spécifiques de la β globine (qui sert de témoin d'extraction).

Il a fallu trouver les proportions de différents réactifs du Mix. (Karsai et al; 2002)

L'enjeu est donc de pouvoir en une réaction dire si un patient est parasité par du *Plasmodium falciparum* ou par une autre espèce ou alors écarter totalement le diagnostic de paludisme.

Un patient indemne de paludisme ne présentera que le pic de bétaglobine, témoin d'une bonne extraction de l'ADN.

Un patient atteint par *Plasmodium falciparum* présentera surtout un pic de Tm 78-79°C spécifique de cette espèce.

Un patient atteint par une autre espèce présentera un pic spécifique de genre à Tm 81°C.

La mise au point repose donc sur la recherche des proportions respectives de chaque couple d'amorce permettant d'exprimer chaque amorce séparément.

Pour ce faire, nous avons sélectionné 4 patients : un patient présentant un *Plasmodium falciparum* à 15% (352), un patient avec une autre espèce plasmodiale (*P.ovale* :267), un patient bi parasité (*P.falci* + *P.ovale* :002) et un patient négatif (témoin d'extraction).

Nous avons d'abord cherché la proportion des couples d'amorces à adopter entre SSU1/SSU2 et PF1/PF2 puis nous avons ajouté le couple d'amorces BGO7/BGO8.

Les conditions testées en premier sont celles de l'article de *Berry et al* (2004). Le **rapport d'amorces PF1/PF2/ SSU1/SSU2 = 2,3** avec une concentration de PF1/PF2 = 0,7 M.

Il faut donc jouer sur plusieurs paramètres : (*Henegariu et al*; 1997)

- Le rapport entre les couples d'amorces
- La concentration totale des amorces dans le Mix
- La température d'hybridation- élongation

Dans un premier temps nous nous sommes placés dans les mêmes conditions que la PCR simplex, c'est à dire **63°C** et **3mM** de MgCl₂.

Cependant, Berry se sert d'un kit de PCR en SYBR®Green différent du nôtre donc les quantités respectives des différents composants sont différentes des nôtres. (Toulouse: LC FastStart DNA Master SYBR Green de Roche Diagnostics; Nantes: qPCR Core Kit for SYBR®Green I – No ROX d'Eurogentec)

Nous avons donc décidé tout d'abord de faire un essai dans les conditions de l'article (première ligne du tableau 11) puis de nous baser sur les conditions de notre PCR simplex maintenant mise au point tout en se rapprochant du rapport d'amorces utilisé par Berry.

Il est aussi important de respecter la quantité totale d'amorces au sein du Mix afin de préserver l'équilibre de la réaction de PCR.

Ainsi dans le tableau 11 nous avons répertorié les différents essais réalisés en tenant compte de ces divers points.

Chaque essai comprend le passage des 4 patients sélectionnés. Dans le tableau 11, nous avons présenté les résultats de façon globale puisque les échantillons se comportent de la même façon dans la PCR multiplex.

Soit R le rapport de concentration entre les couples d'amorces :

$$R = [PF1-PF2]/[SSU1-SSU2]$$

Tableau 11 : Essai dans les conditions de la PCR simplex : 63°C et 3 mM MgCl₂ :

	<i>Pic falciparum</i>	<i>Pic SSU</i>
R = 2,3 et [PF1-PF2]=0,75 M	-	-
R = 1,5 et [PF1-PF2]= 0,75 µM	+	-
R = 2 et [PF1-PF2]=0,75µM	-	+
R = 3 et [PF1-PF2]= 0,75 M	+	-
R = 3 et [PF1-PF2]= 0,6 M	+	-
R = 4 et [PF1-PF2]=0,5 µM	+	-
R = 5 et [PF1-PF2]=0,5 µM	-	-
R = 5 et [PF1-PF2]= 0,75 M	+	-

Légende : - : absence de pic ; + : présence d'un pic de T_m.

Ne réussissant pas à sortir les 2 couples d'amorces en même temps, nous avons décidé de faire varier la température d'hybridation élongation en se rapprochant du T_m des amorces PF1/PF2.

Le tableau 12 présente nos résultats d'essais de température dans l'ordre où nous les avons réalisés.

En effet, le T_m du couple d'amorces PF1/PF2 étant autour de 50°C, nous avons commencé par cela. A cette température, seul le pic de SSU sort ; rien pour le pic de *falciparum*.

Ensuite, la démarche a été de jouer de quelques degrés pour trouver la température optimale pour que les deux couples d'amorces sortent.

Tableau 12: Essais de température et de concentration de MgCl₂ pour la PCR Multiplex :

Température	Conditions opératoires		Pic Falciparum	Pic SSU
50°C	R=3	1 mM MgCl ₂	–	+
		1,5 mM MgCl ₂	–	+
		2 mM MgCl ₂	–	+
		2,5 mM MgCl ₂	–	+
		3 mM MgCl ₂	–	+
54°C	R= 3	3 mM MgCl ₂	–	+
	R= 4	3 mM MgCl ₂	–	+
	R= 5	3 mM MgCl ₂	–	+
	R=3	1 mM MgCl ₂	–	+
	R=4	1 mM MgCl ₂	–	+
	R=5	1 mM MgCl ₂	–	+
52°C	R=3	3 mM MgCl ₂	–	+
	R=4	3 mM MgCl ₂	–	+
	R=3	1 mM MgCl ₂	–	–
	R=4	1 mM MgCl ₂	+	–
56°C	R= 3	3 mM MgCl ₂	–	+
	R=4	3 mM MgCl ₂	–	+
	R=5	3 mM MgCl ₂	+	+
60°C	R=3	3 mM MgCl ₂	+	+
	R=4	3 mM MgCl ₂	+	–
	R=5	3 mM MgCl ₂	+	+

A 56°C et R=5, les pics au niveau de la courbe de fusion sont assez larges et étalés ce qui n'est pas satisfaisant. De plus, ils présentent une faible intensité de fluorescence.

A 60°C et R=5, nous avons remarqué que lors des différents essais on ne ressortait pas à chaque fois le pic de *P.falciparum* ce qui est évidemment grave. Nous avons donc décidé d'écarter cette condition opératoire.

A 60°C et R=3, les pics sont bien serrés, aigus, et l'intensité de fluorescence est plus forte.

Suite à ces résultats nous avons choisi de garder comme conditions opératoires **60°C, R = 3 et 3 mM MgCl2.**

L'étape suivante a donc consisté en l'insertion du 3^{ème} couple d'amorce : BGO7/BGO8 (témoin d'extraction).

$$\Omega = [\text{PF1/PF2}] / [\text{BGO7/BGO8}]$$

Dans l'article de *Berry et al. (2004)*, Ω est environ de 9

Tableau 13: Mise au point de la PCR multiplex avec BGO7/BGO8 :

Conditions	<i>P.falciparum</i>	SSU	β globine
$\Omega = 10$	+	+	-
$\Omega = 8$	+	+	+
$\Omega = 5$	+	+	+

Après des essais sur un plus grand nombre de prélèvements (23), nous avons remarqué qu'avec $\Omega = 8$, on obtenait de meilleurs résultats.

En effet, pour $\Omega = 5$, le couple d'amorces BGO7/BGO8 prend trop d'importance au sein de la réaction de PCR et le pic de β globine sort alors que le pic de *falciparum* ou de SSU ne sort plus (compétition entre les amorces trop importante).

En résumé, la PCR Multiplex se réalise à 60°C et à 3 mM de MgCl₂ pour un rapport d'amorces [PF1-PF2]/[SSU1-SSU2]= 3 et [PF1/PF2] / [BGO7/BGO8]= 8

3. Evaluation de la technique :

Pour ces tests d'évaluation, nous avons préparé un Mix global pour chaque PCR d'espèce en quantité suffisante pour faire les 4 essais de répétabilité et les 4 essais de reproductibilité.

Les tests de reproductibilité n'étant pas réalisés le même jour nous avons aliquoté 4 Mix à partir du Mix global (auquel nous n'avons pas ajouté l'enzyme) que nous avons congelé, et ceci pour chaque PCR d'espèce. A chaque essai de reproductibilité, il a donc fallu décongeler le Mix et y rajouter l'enzyme extemporanément.

Nous avons arbitrairement choisi de réaliser 4 essais pour chaque PCR d'espèce pour la reproductibilité et la répétabilité du fait du budget non extensible du travail de thèse (la PCR reste une méthode onéreuse). De plus, cette PCR est qualitative donc les exigences en ce qui concerne le nombre d'essais peuvent être plus souples.

a. Répétabilité :

Pour établir la répétabilité de notre PCR, nous avons passé 4 fois dans une même PCR 2 ou 3 témoins selon l'espèce plasmodiale en question.

Chaque passage est numéroté de 1 à 4 dans les tableaux qui suivent.

♦ *P.falciparum* et SSU:

Pour cette étude 3 témoins ont été passés 4 fois dans une même PCR :

- Un témoin *P.falciparum* fort (312) : 12% de parasitémie
- Un témoin *P.falciparum* faible (748) : <0,01%
- Un témoin *P.ovale* (459) qui doit être négatif en *P.falciparum* et positif en SSU.

Tableau 14 : Répétabilité des PCR SSU et *P.falciparum*:

		SSU				<i>P.falciparum</i>			
		1	2	3	4	1	2	3	4
312	Ct	27,86	27,99	27,38	26,35	21,19	20,37	20,59	21,22
	Tm	82,0	82,0	82,0	82,0	79,7	79,5	79,5	79,5
748	Ct	40,84	40,77	40,98	40,54	35,72	36,3	36,06	35,64
	Tm	82,2	82,2	82,2	82,3	79,5	79,5	79,5	79,5
459	Ct	23,2	23,29	23,28	23,75				
	Tm	81,0	80,8	80,7	80,8	abs	abs	abs	abs

NB : abs = absence de pic sur la courbe de fusion.

Afin de mesurer la dispersion de ces échantillons autour de leur moyenne, nous avons calculé leur variance, écart-type et coefficient de variation:

- ✓ $\mathbf{m}$ (moyenne) = $(Ct1+Ct2+Ct3+Ct4)/4$
- ✓ $\mathbf{S^2}$ (variance)= $1/4((Ct1-m)^2 + (Ct2-m)^2 + (Ct3-m)^2 + (Ct4-m)^2)$
- ✓ $\mathbf{\sigma}$ (écart-type)= $S=\sqrt{S^2}$
- ✓ CV (coefficient de variation) = σ/m

Tableau 15: Répétabilité des PCR SSU et *P.falciparum*: Moyennes, variances, écart-types et coefficients de variation:

	SSU						<i>P.falciparum</i>			
	312		748		459		312		748	
	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm
m	27,4	82,0	40,78	82,2	23,38	80,8	20,84	79,55	35,93	79,5
S²	0,395	0	0,025	0,0025	0,05	0,0125	0,14	0,0075	0,07	0
σ	0,63	0	0,16	0,05	0,22	0,11	0,37	0,09	0,26	0
CV	2,3%	0%	0,4%	0,06%	0,9%	0,1%	1,8%	0,01%	0,7%	0%

La répétabilité de la PCR SSU/ *P.falciparum* est excellente en ce qui concerne le Tm qui est le paramètre essentiel pour interpréter la positivité du prélèvement. Elle est aussi très bonne pour le Ct.

➤ P.ovale :

Pour évaluer la répétabilité de cette PCR, nous avons travaillé sur 2 témoins le 920 et 796, passés 4 fois chacun dans une même PCR.

Tableau 16 : Essais de répétabilité de la PCR *P.ovale* :

		1	2	3	4
920	Tm	84,8	84,8	84,7	84,7
	Ct	33,43	33,17	33,11	31,71
796	Tm	84,7	84,5	84,5	84,5
	Ct	32,60	33,73	33,65	33,39

Tableau 17 : Répétabilité de la PCR *P.ovale*: Moyennes, variances, écart-types et coefficients de variation

	920		794	
	Ct	Tm	Ct	Tm
m	32,9	84,75	33,3	84,55
S²	0,45	0,0025	0,20	0,0075
σ	0,67	0,05	0,45	0,09
CV	2%	0,06%	1,4%	0,1%

Le coefficient de variation est bas pour le Tm et le Ct donc la PCR *P. ovale* est bien répétable.

➤ *P.malariae* :

Pour tester la répétabilité de cette PCR, nous avons travaillé sur les 2 seuls témoins à *P.malariae* que nous avons, passés chacun 4 fois dans une même PCR.

Tableau 18 : Essais de répétabilité de la PCR *P.malariae* :

		1	2	3	4
749	Tm	84,5	84,5	84,5	84,5
	Ct	26,57	26,96	26,69	26,14
754	Tm	84,5	84,5	84,5	84,5
	Ct	29,03	28,92	29,03	32,08

Tableau 19: Répétabilité de la PCR *P.malariae* : Moyennes, variances, écart-types et coefficients de variation :

	749		754	
	Ct	Tm	Ct	Tm
m	26,59	84,5	29,77	84,5
S ²	0,35	0	1,8	0
σ	0,59	0	1,3	0
CV	2,2%	0	4,3%	0

La répétabilité de la PCR *P.malariae* est excellente pour le Tm et bonne pour le Ct.

➤ *P.vivax* :

Pour tester la répétabilité de cette PCR, nous avons travaillé sur 2 témoins le 708 et le 794, passés chacun 4 fois dans une même PCR.

Tableau 20 : Répétabilité de la PCR *P.vivax* :

		1	2	3	4
708	Tm	78,7	78,7	78,7	78,7
	Ct	15,78	16,65	16,95	16,54
794	Tm	78,5	78,7	78,8	78,8
	Ct	22,96	21,4	21,47	21,18

Tableau 21 : Répétabilité de la PCR *P.vivax* : Moyennes, variances, écart-types et coefficients de variation :

	708		794	
	Ct	Tm	Ct	Tm
m	16,48	78,7	21,75	78,7
S²	0,19	0	0,5	0,015
σ	0,44	0	0,7	0,12
CV	2,7%	0	3,2%	0,02%

La répétabilité de la PCR *P.vivax* est excellente pour le Tm et le Ct.

b. Reproductibilité :

Pour évaluer la reproductibilité de notre PCR, nous avons travaillé sur des témoins passés 4 fois dans des PCR différentes à des jours différents.

Pour cela, nous avons préparé un Mix en quantité suffisante pour réaliser tous ces essais puis nous l'avons aliquoté pour chaque PCR. A chaque essai un aliquote a été décongelé puis nous avons rajouté l'enzyme Taq polymérase et l'échantillon à tester.

♦ *P.falciparum* et SSU :

Nous avons décidé de tester 4 témoins :

- 748 : *P.falciparum* à <0,01%
- 562 : *P.ovale*
- 737 : *P.falciparum* à 4%
- 346 : *P.falciparum* à <0,01%

Tableau 22: Reproductibilité de la PCR SSU et *P.falciparum* :

		SSU				<i>P.falciparum</i>			
		Numéro de passage							
		1	2	3	4	1	2	3	4
748	Tm	82,2	81,7	81,8	82,0	79,3	79,3	79,3	79,2
	Ct	23,12	22,43	22,43	22,73	22,26	24,55	24,31	22,76
562	Tm	81,5	81,0	81,2	81,3	absence	absence	absence	absence
	Ct	24,91	25,36	24,87	26,18				
737	Tm	82,0	81,5	81,7	81,8	79,3	79,3	79,2	79,0
	Ct	16,2	16,83	16,91	17,54	15,43	16,86	15,46	16,56
346	Tm	81,8	81,5	81,8	81,8	79,2	79,3	79,2	79,0
	Ct	30,45	29,71	29,35	31,06	31,66	33,39	30,97	33,15

Tableau 23 : Coefficients de variation des tests de reproductibilité :

	SSU		<i>P.falciparum</i>	
	Ct	Tm	Ct	Tm
748	1,2%	1,2%	4,2%	0,06%
562	2,1%	0,22%		
737	2,8%	0,22%	4%	0,15%
346	2,2%	0,16%	3%	0,14%

La reproductibilité de la PCR SSU/ *P.falciparum* est excellente que ce soit en ce qui concerne le Tm ou le Ct.

► *P.ovale* :

Nous avons testé 2 témoins : le 920 et le 796.

Tableau 24 : Reproductibilité de la PCR *P.ovale* :

		Numéro de passage			
		1	2	3	4
920	Tm	85,0	85,0	85,0	85,0
	Ct	24,67	27,32	26,49	24,82
796	Tm	85,2	85,0	85,0	84,8
	Ct	30,06	29,27	29,73	28,86

Tableau 25 : Reproductibilité de la PCR *P.ovale* : Moyennes, variances, écart-types et coefficients de variation :

	920		796	
	Ct	Tm	Ct	Tm
m	25,82	85,0	29,48	85
S²	1,26	0	0,21	0,02
σ	1,12	0	0,46	0,14
CV	4,3%	0	1,6%	0,16%

La reproductibilité de la PCR *P.ovale* est excellente pour le Tm et bonne pour le Ct.

♦ *P.malariae* :

Nous avons testé les 2 seuls témoins positifs à *P.malariae* que nous ayons en les passant 4 fois dans des PCR différentes et à des jours différents.

Tableau 26 : Reproductibilité de la PCR *P.malariae* :

		Numéro de passage			
		1	2	3	4
749	Tm	84,5	84,5	84,8	84,5
	Ct	24,65	24,75	26,51	26,8
754	Tm	84,3	84,3	85,0	84,3
	Ct	23,06	22,97	25,17	25,13

Tableau 27 : Reproductibilité de la PCR *P.malariae* : Moyennes, variances, écart-types et coefficients de variation :

	749		754	
	Ct	Tm	Ct	Tm
m	25,7	84,6	24,1	84,5
S²	0,97	0,0175	1,14	0,0925
σ	0,98	0,13	1,07	0,3
CV	3,8%	0,15%	4,4%	0,36%

Les coefficients de variation des Tm sont excellents et ceux des Ct sont corrects.
La PCR *P.malariae* est bien reproductible.

♦ *P.vivax* :

Nous avons testé 2 témoins positifs à *P.vivax* (708 et 794) passés 4 fois dans des PCR différentes et à des jours différents.

Tableau 28 : Reproductibilité de la PCR *P.vivax* :

		Numéro de passage			
		1	2	3	4
708	Tm	78,3	79,0	78,5	79,0
	Ct	19,88	17,23	18,85	18,4
794	Tm	78,8	78,3	78,5	78,0
	Ct	23,63	21,23	22,53	21,5

Tableau 29 : Reproductibilité de la PCR *P.vivax* : Moyennes, variances, écart-types et coefficients de variation :

	708		794	
	Ct	Tm	Ct	Tm
m	18,59	78,7	22,22	78,4
S²	0,90	0,095	0,90	0,085
σ	0,95	0,31	0,95	0,29
CV	5%	0,4%	4,3%	0,4%

Les coefficients de variation des Tm sont excellents et ceux des Ct sont corrects.
La PCR *P.vivax* est bien reproductible.

c. Spécificité de la PCR en temps réel :

A la fin de la PCR en temps réel, la taille des fragments amplifiés est vérifiée par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 9% (acrylamide/ bisacrylamide : 37,5%/1%).

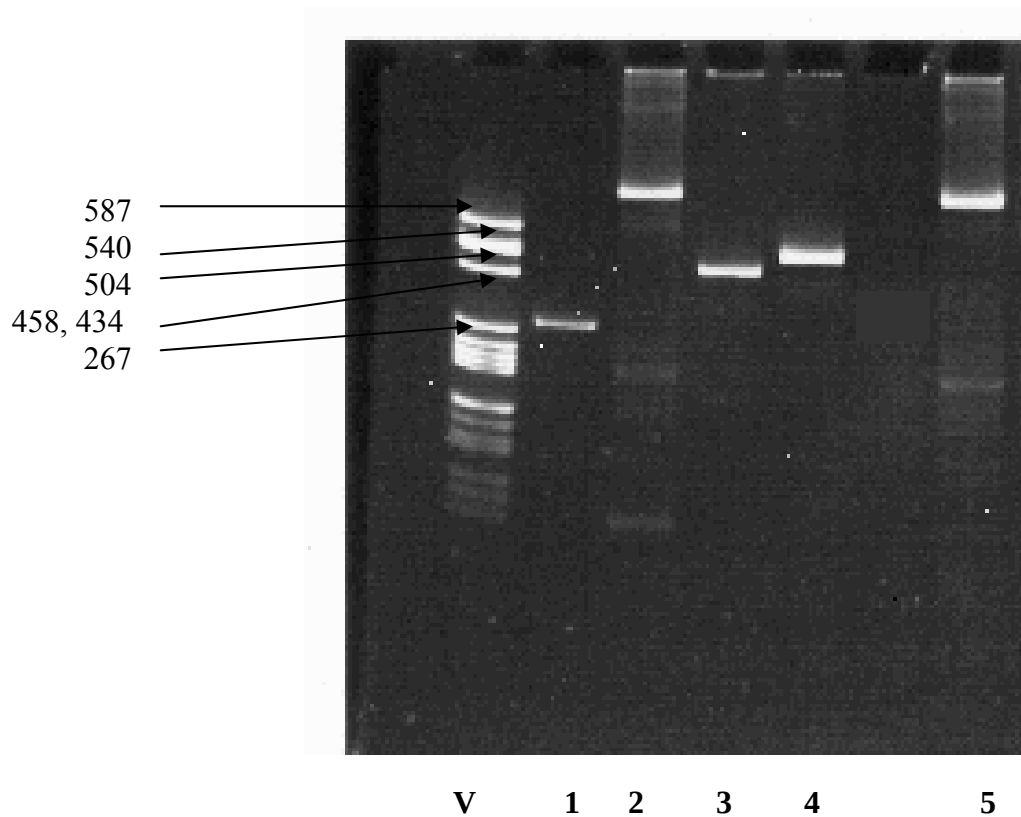


Figure 4 : Gel de polyacrylamide 9%

Légende :

- V : marqueur de taille V de Roche
- 1 : *P.malariae*
- 2 : *P.vivax*
- 3 : *P. ovale*
- 4 : *P. falciparum*
- 5 : *P.vivax*

Dans l'article de *Morassin et al. (2002)*, on retrouve la taille des fragments attendus après amplification :

- *P. ovale* : 463 paires de bases
- *P. malariae* : 269 paires de bases
- *P. vivax* : 871 paires de bases
- *P. falciparum* : 595 paires de bases

La spécificité de la PCR en temps réel est vérifiée par la présence d'une bande unique pour chaque espèce plasmodiale.

A un sang positif correspond une bande unique dont la taille est spécifique à chaque espèce plasmodiale, visible de façon nette sur le gel. Notre PCR en temps réel est donc bien spécifique.

4. Application de la PCR en temps réel :

Les échantillons analysés dans cette étude correspondent à du sang total prélevé sur EDTA issu de patients présentant une clinique évocatrice de paludisme, ayant séjourné en zone d'endémie, pour lesquels une demande de recherche de Plasmodium a été formulée par un médecin du CHU de Nantes, voire des hôpitaux périphériques ou de laboratoires de Biologie Médicale de ville.

Pour l'étude, nous avons sélectionné les paludismes diagnostiqués entre 2002 et 2004 quelle que soit l'espèce plasmodiale ainsi que les examens rendus négatifs par le diagnostic classique mais pour lesquels le médecin insistait pour le diagnostic de paludisme du fait de la clinique. D'autre part, nous y avons inclus aussi des examens directs négatifs avec une sérologie à un seuil significatif évoquant un paludisme récent.

Dans notre démarche nous comparons les résultats obtenus avec les techniques de diagnostic microscopique avec ceux obtenus par PCR en temps réel.

L'étude comporte **122** patients.

a. Résultats obtenus en PCR simplex :

Protocole en annexe XIII

Afin de ne pas surcharger le texte nous avons opté pour des tableaux récapitulatifs donnant les données brutes de notre étude. Les discordances entre la PCR et la microscopie seront expliquées dans la discussion.

Le tableau complet des résultats de l'étude se trouve en annexe XV.
--

Tableau 30 : Comparaison des résultats obtenus par PCR en temps réel versus technique classique.

	Méthode microscopique	PCR en temps réel
Paludisme positif	82	82
Paludisme négatif	40	40
Total	122	

En effet, au niveau du calcul brut des résultats on a autant de positifs et de négatifs en PCR qu'en microscopie. Intéressons nous donc au détail. La répartition des espèces plasmodiales pour les patients diagnostiqués est résumée dans le tableau 31.

Tableau 31 : Répartition des espèces plasmodiales.

		Diagnostic microscopique	PCR temps réel
Mono parasitisme		76	80
	<i>P.falciparum</i>	57*	59*
	<i>P.ovale</i>	9	12
	<i>P.vivax</i>	5	7
	<i>P. malariae</i>	4	2
	<i>Plasmodium non falci</i>	1	0
<u>Bi parasitisme</u>		6	2
	<i>Falci + malariae</i>	3	0
	<i>Falci + ovale</i>	0	2
	<i>Falci + complexe vivax/ovale</i>	2	0
	<i>Ovale + malariae</i>	1	0
Négatif		40	40
Total		122	122

* Ces résultats peuvent paraître choquants mais en fait la différence entre les deux techniques pour le *P.falciparum* notamment est due au fait que la PCR a infirmé des bi parasitismes (colonne de gauche) et que le mono parasitisme dépisté est alors ramené dans la colonne de droite. Les discordances seront expliquées en détail dans la discussion.

Nous avons également testé des patients pour lesquels le frottis et la goutte épaisse sont négatifs. (annexe XV)

Nous avons pensé que la catégorie de sujets la plus intéressante pour rattraper des diagnostics de paludisme était celle des frottis négatifs avec sérologie négative (< 80). En tout début de crise, on peut imaginer que les anticorps ne sont pas encore apparus et qu'en cas de parasitémie très faible le frottis apparaît comme négatif. Chacun des 22 cas de ce type est revenu négatif en PCR.

Ensuite, nous avons choisi des patients ayant un taux d'anticorps important (>320) et pour lesquels le diagnostic direct est négatif (11 cas).

En effet, nous avons pensé que dans cette catégorie de patients, nous pourrions peut-être dépister des positifs en PCR alors que l'examen direct était négatif. Nous n'avons eu de PCR positive pour aucun de ces patients. Aucun parasite n'est détectable même en PCR. (Annexe XV)

Il a semblé aussi intéressant pour l'étude de suivre la cinétique de positivité de la PCR. Cependant, nous nous sommes heurtés au fait que les patients faisant un accès palustre ne sont pas suivis à long terme. Nous avons retrouvé certains patients revenus à distance de l'accès mais malheureusement, il s'agissait d'infections à *Plasmodium* non *falciparum* et donc la positivité de ces PCR même à long terme ne pouvait pas être interprétée. En effet, il peut s'agir soit d'une positivité résiduelle de la première crise palustre, soit d'une nouvelle crise dans le cadre d'un accès de reviviscence.

Des essais d'interprétation semi quantitative paraissaient intéressants pour voir si la parasitémie calculée par microscopie pouvait être corrélée au Ct de la PCR en temps réel. Cette parasitémie étant calculée uniquement pour *Plasmodium falciparum*, nous n'avons travaillé que sur ce type de patients. Nous avons donc sélectionné des sujets avec différentes parasitémies afin d'approcher une gamme de concentrations.

En effet, pour faire du quantitatif, il faut travailler sur des cultures cellulaires de *Plasmodium falciparum* et réaliser des gammes de concentrations en effectuant des dilutions de parasites. Cela pourrait faire l'objet d'une nouvelle thèse.

Tableau 32 : Résultats semi quantitatifs de la PCR *Plasmodium falciparum* :

Parasitémie microscopique	Ct obtenu par PCR
2,5%	18,94
3%	19,65
4%	18,81
12%	15,58
15%	16,62
21%	16,12

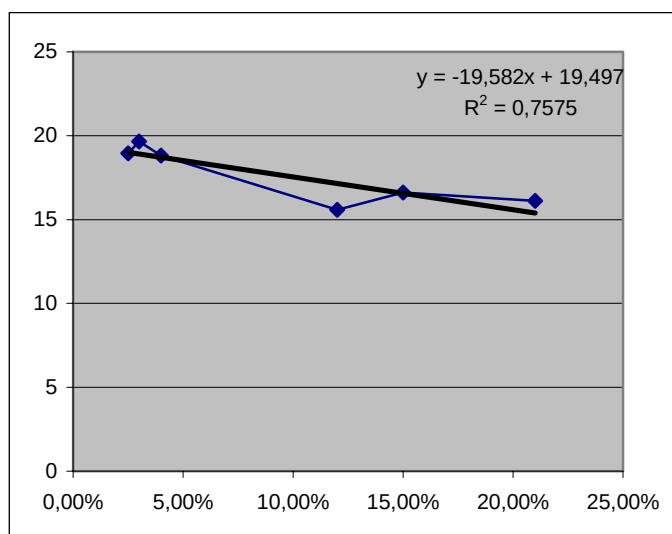


Figure 5 : Courbe d'évaluation semi quantitative de la parasitémie.

Il n'a pas été possible de faire beaucoup de points de gamme notamment pour les faibles parasitémies puisque les résultats rendus sont approximatifs (<0,1%, <0,01% suivant les biologistes).

Cependant, ces résultats donnent de bons espoirs pour la mise au point d'une PCR quantitative en travaillant sur des cultures cellulaires. En effet, le coefficient de corrélation est satisfaisant.

b. Résultats obtenus en PCR multiplex :

Protocole opératoire complet en annexe XIV.

Tableau 33 : Résultats de la PCR multiplex :

Patient	Espèce/Parasitémie		SSU	P.falciparum	BGO
		Ct	Tm	Tm	Tm
CIN 352	PF/15%	12,11	–	79,5	–
ZEM 267	OV	31,23	81,5	–	–
MUF 002	PF/2%	23,87	–	79,8	–
CAJ 966	PF/<0,10%	30,02	–	79,5	–
ALJ 921	PF/<0,10%	35,43	–	79,2	–
DAP 174	PF/<0,10%	23,16	–	79,5	–
DIA 863	PF/ rare	25,81	–	79,5	–
FOB 346	PF/<0,01%	32,45	–	79,5	–
GRA 748	PF/<0,01%	23,63	–	79,5	–
NAR 698	PF/<0,01%	27,5	–	79,5	–
ROJ 612	PF/<0,01%	22,96	–	79,3	–
SYB 380	PF/0,10%	25,13	–	79,5	–
DAP 921*	négatif	35,43	–	–	88,8
TCM 459*	OV	28,7	81,0	–	–
DUN 708*	VIV	27,06	81,7	–	–
AZM 450*	PF/<1%	19,66	81,3	78,6	–
BAV 448*	PF/<0,05%	16,49	81,3	78,5	–
BIA 990*	PF/2,5%	16,33	81,0	78,5	–
CAA 443*	PF/<0,50%	23,85	81,1	78,5	–
CIG 213*	PF/4%	16,88	80,9	78,2	–
CIN 449*	PF/1%	26,37	81,0	78,4	–
EMI 524*	PF/<0,01%	28,36	–	78,5	–
FOD 336*	PF/<0,1%	28,32	–	78,4	–
MEG 600*	VIV	29,39	80,9	–	–

Légende : PF = *P.falciparum* ; OV = *P.ovale* ; VIV= *P.vivax* ; BGO = β

globine ; SSU = Amorce spécifique de genre *Plasmodium*

*résultats issus d'une 2^{ème} PCR d'où les quelques variations des valeurs de Tm puisqu'il s'agit d'un Mix différent.

On peut donc noter que le *P.falciparum* est détecté pour tous ces patients y compris dans les très faibles parasitémiés (pic de *falciparum* à un Tm $\approx$ 79,5°C pour la 1^{ère} PCR et Tm $\approx$ 78,5 pour la 2^{ème} série de résultats issus de la 2^{ème} PCR).

D'autre part, on peut voir que les espèces autres que *falciparum* sortent aussi (Pic de SSU à un Tm $\approx$ 81°C).

La réaction prépondérante dans le tube est celle avec le couple d'amorces PF1/PF2 ou SSU1/SSU2 ce qui explique la plus forte intensité de fluorescence des pics de SSU et *P.falciparum*.

Le pic de β globine sort comme témoin d'extraction, il ne sort que pour les négatifs, pour les positifs l'intensité de fluorescence du pic de β globine est négligeable par rapport à celle des pics de SSU ou de *P.falciparum*, ce pic n'apparaît alors pas sur la courbe de fusion.

La mise au point de cette PCR multiplex a été difficile, les réglages ont été longs. On peut considérer que les conditions opératoires sont satisfaisantes et qu'il ne reste plus qu'à faire les essais de répétabilité et reproductibilité pour confirmer sa fiabilité.

D'autre part, il serait souhaitable de passer tous les patients passés en PCR simplex pour vérifier la concordance des deux types de PCR. Après cela, la PCR multiplex pourra être utilisée en routine en toute sérénité.

En annexe XVI, vous trouverez un exemple de courbe de fusion de PCR multiplex.

II. Discussion :

A l'heure actuelle, la technique de référence pour le diagnostic du paludisme reste la lecture microscopique du frottis mince et de la goutte épaisse. (SPILF ; 1999)

En effet, ces techniques sont peu coûteuses et de réalisation simple. Leurs indications, leurs performances, ainsi que leurs différents avantages et inconvénients sont parfaitement connus et maîtrisés par les biologistes et les médecins.

Pour les pays de forte endémie palustre, ces méthodes sont les seules à pouvoir être envisagées bien que le diagnostic ne soit souvent fait que sur la clinique. (Hänscheid et al; 2002). Cependant, ce sont précisément dans ces pays où la population est massivement parasitée que la PCR pourrait s'avérer utile.

En effet, selon Hang et al. (1995), la présence de *Plasmodium falciparum* dans le sang transfusé tient de la fatalité puisqu'une grande majorité des donneurs est porteuse de *Plasmodium*. Ainsi, cette équipe Vietnamiennne a mis au point une PCR spécifique de *P.vivax* et *P. falciparum* afin de faire un screening du sang des donneurs puisque l'examen microscopique à si grande échelle est difficile en pratique et la faible parasitémie fréquente est souvent non détectable par microscopie.

Ce problème au niveau des dons de sang existe aussi au Brésil car les critères recommandés par le Ministère de la Santé brésilien pour l'exclusion des donneurs ne sont pas appliqués uniformément dans les différents centres de transfusion du pays.

De ce fait, Montenegro et al. (2004) ont mis au point une PCR nichée pour remédier à ce problème.

Cette perspective d'utilisation pour le screening des dons de sang est abordée dans plusieurs articles : Lee et al. ; 2002, Schindler et al. ; 2001.

Cependant, Hänscheid et al. (2002) considèrent que la PCR n'est pas assez sensible pour être utilisée en screening sur les poches de sang qui ont un volume trop important (450 mL) pour être testées efficacement.

Ces dernières années, de nombreuses études démontrent la supériorité des techniques de biologie moléculaire comme la PCR en terme de sensibilité et spécificité notamment pour les bi parasitismes. (*Tham et al; 1999 ; Humar et al; 1997 ; Zakeri et al; 2002*), pour les pauci infestations (*Roper et al; 1996 ; Zalis et al; 1996*).

Notre étude compare une PCR en temps réel avec la microscopie additionnée des techniques complémentaires que sont les tests immuno-chromatographiques et la sérologie. La microscopie est considérée comme le « Gold Standard » ou référence.

Elle confirme l'intérêt de la biologie moléculaire pour le diagnostic d'espèce dans les cas de faible parasitémie, de biparasitisme, de morphologie modifiée par le traitement et dans le cas du complexe *vivax/ovale*.

Certains auteurs envisagent même de remplacer la microscopie par la PCR dans un avenir proche (*Whiley et al; 2004*)

En cas de faible parasitémie (ce qui est souvent le cas pour les espèces autres que *Plasmodium falciparum*), on est confronté aux limites de la technique microscopique. La détection limite de la microscopie est de 50 parasites par μl de sang en théorie mais la pratique a montré qu'en fait elle serait plutôt à 500 parasites par μl (*Moody A. ; 2002*).

En effet, le frottis mince est souvent négatif et c'est la goutte épaisse qui permet de poser le diagnostic de paludisme. Dans ce cas, le diagnostic d'espèce devient difficile du fait de l'absence des paramètres de taille et de forme de l'hématie qui est lysée par cette méthode et de l'aspect déformé des parasites.

La sensibilité d'une PCR varie selon le type de PCR utilisée : 1,4 parasites/ μL pour la PCR ELAHA décrite par *Whiley et al. (2004)* ; 20 parasites/mL pour la PCR en temps réel (technologie parasite man) de *Hermsen et al. (2001)* ; 1 parasites/ 50 μL pour la PCR + hybridation de *Ciceron et al. (1999)* ; 3 ou 4 parasites/ μL pour la PCR nichée de *Tham et al. (1999)* ; 1 parasite/ μL pour la PCR multiplex ligase de *Mc Namara et al. (2004)*.

La différence importante en terme de seuil de sensibilité de la PCR avec la goutte épaisse et la possibilité d'établir un diagnostic d'espèce plaident en faveur de la PCR.

Cette sensibilité plus grande de la PCR permet la recherche de *Plasmodium falciparum* notamment dans le placenta et sang de cordon chez la femme et son enfant à la naissance en zone d'endémie palustre (Kamwendo et al; 2002 ; Mockenhaupt et al; 2002 ; Mayengue et al; 2004)

Il résulte de notre étude que sur les **122 patients** sélectionnés, notre PCR en temps réel est en désaccord avec la microscopie dans 12 cas (10%). Nous allons détailler ces discordances au cas par cas.

Pour un patient diagnostiqué à *P.falciparum*, le prélèvement de contrôle à J9 a été rendu négatif alors que la PCR détecte encore du *P.falciparum*. Ceci est dû à la plus grande sensibilité de la PCR par rapport au frottis. Selon Ciceron et al. (1999), la clairance du parasite après traitement en microscopie est de 72 heures environs. Cela explique la disparition du *Plasmodium* du frottis à J9.

Pour 2 patients répondus par microscopie comme des **bi parasitismes** *P.falciparum/P.malariae*, la PCR a trouvé un *P.falciparum* seul. Or, pour un de ces deux patients, le prélèvement à J2 a été rendu *P.malariae* seul. Cette confusion pourrait s'expliquer par le fait que des formes plus âgées (schizontes, trophozoïtes âgés) de *P.falciparum* peuvent présenter une pigmentation dorée au centre du cytoplasme du parasite comme pour le *P.malariae*. De plus, ces formes sont rarement retrouvées dans le sang circulant ; il pourrait donc s'agir ici d'un paludisme viscéral.

Cependant, ce ne sont que des spéculations puisque les lames de frottis sanguin de ces patients n'ont pas été gardées, ce qui ne permet pas de savoir quels critères ont pu prêter à confusion.

Comme exemple nous pouvons citer le contrôle qualité national de juillet 2004 qui était un *Plasmodium falciparum* d'un paludisme viscéral et dont la reconnaissance a été de 70% dont un assez grand nombre avec un bi parasitisme.

D'ailleurs, nous avons eu récemment un cas où des trophozoïtes âgés à cytoplasme plus large et une absence de trophozoïtes en bague à chaton a posé un doute sur un éventuel paludisme à *P.falciparum* viscéral. La PCR a confirmé ce point de vue. Le résultat a pu être rendu en toute sérénité.

Pour un patient, il y a eu confusion en microscopie entre un **P.malariae** et un **P.ovale** en PCR. Ceci a déjà été décrit dans l'article de *Humar et al. (1997)*.

Pour un autre, le **bi parasitisme P.ovale/ P.malariae** a été réfuté pour un mono parasitisme à **P. ovale**.

Une autre infection mixte **P.falciparum/P. malariae** a pu être corrigée en **P.ovale seul** par PCR. La réponse a été rendue sur la présence de trophozoïtes de *P. falciparum* et de trophozoïtes et gamétocytes de *P.malariae*. Il est probable qu'il s'agisse d'un cas de faible parasitémie ayant rendue l'identification délicate.

Le *Plasmodium malariae* est donc une espèce qui pose problème au niveau du diagnostic microscopique. D'ailleurs, *Kawamoto et al. (2002)* décrivent deux cas de *P.malariae* dont les trophozoïtes jeunes ont plus la forme d'un *P.vivax* que d'un *P.malariae* typique. Par PCR, ces parasites se sont avérés être des variants morphologiques de *P.malariae*.

La PCR a aussi permis de trancher entre *P.vivax* et *P.ovale* chez un patient pour lequel on avait répondu **complexe vivax/ovale**. La difficulté pour ce patient tenait au fait qu'il s'agissait d'une infection mixte *P.falciparum*/complexe *vivax/ovale* donc que le parasitémie était faible. En microscopie, le *P.falciparum* a été répondu sans problème mais le faible nombre de formes non *falciparum* a gêné l'identification de la deuxième espèce qui était donc du **P. ovale**.

Un autre patient diagnostiqué à **complexe vivax/ovale + P. falciparum** a été repris en PCR qui a donné **P.vivax seul**. La pauvreté du frottis a dû gêner le diagnostic.

Depuis toujours, il existe une difficulté pour différencier la morphologie de *P.vivax* et *P.ovale* ce qui a souvent été résolu par le terme de complexe vivax/ovale quand les caractéristiques morphologiques du parasite ne permettent pas de le classer dans l'une ou l'autre de ces deux espèces. En effet, il est parfois difficile de différencier ces deux espèces quand il n'y a que des trophozoïtes jeunes. (Morassin et al, 2002)

Un patient a pu être dépisté comme impaludé à **P. vivax** grâce à la PCR alors que la microscopie du fait de la très faible parasitémie n'avait pas pu répondre l'espèce plasmodiale en cause (**Plasmodium sp.**). En effet, pour ce patient, le diagnostic a été fait grâce à la goutte épaisse qui laissait apparaître de rares hématozoaires difficilement identifiables.

La PCR en temps réel a permis de trouver un **bi parasitisme** **P.falciparum/P.ovale**, chez un patient étiqueté comme parasité à **P.falciparum** **seul**. Les infections mixtes peuvent passer inaperçues du fait de la faible parasitémie et de la difficulté de faire la différence entre les deux espèces. (Morassin et al.; 2002).

Kimura et al. (1995) met en avant les interactions des parasites entre eux dans les cas de bi parasitisme. Il note qu'une des espèces a tendance à dominer voire à supprimer l'autre espèce ce qui explique la difficulté de faire un diagnostic microscopique de bi parasitisme.

Certaines études relatent le diagnostic de bi parasitisme notamment *P.falciparum/P.vivax* méconnus par la microscopie (Brown et al; 1992 ; Tirasophon et al; 1994 ; Kho et al; 2003)

Il a été pratiqué un test immuno-chromatographique (ICT Malaria test) pour un patient chez qui on n'a pas trouvé de parasite sur le frottis/goutte épaisse ; cet ICT donnait **une bande pour P.falciparum**. La **PCR** est cependant **négative** ce qui correspond donc soit à un faux positif, phénomène décrit par Tham et al. (1999) soit à une ancienne infection pour laquelle l'ICT serait encore positif. Ceci signifierait alors que l'ICT reste positif plus longtemps que la PCR mais aucun article dans la littérature à notre connaissance ne fait état de cette hypothèse.

En effet, la sérologie pour ce patient est à un titre de 320 ce qui indique un contact avec *P.falciparum*.

A l'époque du prélèvement, la positivité de l'ICT et le taux d'anticorps à 320 avait incité à relire le frottis et la goutte épaisse. Une deuxième réponse avait alors été envoyée avec la présence de rares trophozoïtes de *P.falciparum* alors que la PCR s'est avérée négative par la suite. Il s'agit donc probablement d'artéfacts pris pour des trophozoïtes.

Cependant, l'ICT n'étant pas fait systématiquement du fait de son coût (8,70€ / ICT), nous n'avons pas pu faire de concordance entre la durée de positivité de la PCR et celle de l'ICT.

De plus, nous n'avons que rarement des prélèvements à plus de 9 jours après le diagnostic de paludisme ce qui empêché une éventuelle étude sur ces durées de positivité de la PCR et de l'ICT en parallèle.

Un autre cas de discordance avec l'ICT nous est apparu ; un patient chez qui la microscopie a diagnostiqué un *P.ovale* présente un ICT positif à *P.falciparum*. La PCR est positive uniquement à *P.ovale*, aucune trace de *P.falciparum*. Cet échantillon de sang total a été envoyé chez Fumouze afin d'étudier ce problème. Nous attendons les résultats de leur expertise.

Nous n'avons par contre pas eu de faux négatifs en ICT contrairement à ce que d'autres études ont pu montrer (*Pieroni et al; 1998*).

Cette PCR permet aussi d'exclure un diagnostic de paludisme pour les cas où le médecin continue à prescrire pendant plusieurs jours une recherche de paludisme alors que les frottis/ goutte épaisse/ ICT reviennent négatifs à chaque fois. En effet, quand un médecin persiste dans sa conviction de paludisme, la PCR permet de lever définitivement le doute et le médecin peut continuer ses investigations pour rechercher une autre pathologie (*Fabre et al; 2004*). Nous avons eu ainsi dans les 3 derniers mois, 3 cas de ce genre dont un de l'hôpital de Saint Nazaire où la PCR a permis d'exclure un paludisme.

Ainsi, on a remarqué un net changement de mentalité au sein du laboratoire en ce qui concerne la PCR. La méfiance vis à vis de cette technique a fait place à un sentiment de fiabilité de la PCR, elle rassure quand on a un doute sur l'espèce, quand on veut réfuter un paludisme.

Notre PCR est semi quantitative pour *P.falciparum* et qualitative pour les autres espèces. Pour faire du quantitatif, il faut entretenir des cultures cellulaires de *Plasmodium* or ce n'était pas prévu pour cette thèse. De plus, le but de cette thèse était la mise en point d'une PCR, technique complémentaire permettant le diagnostic différentiel des 4 espèces plasmodiales.

La PCR en temps réel n'est utilisée qu'en deuxième ligne au laboratoire, c'est à dire après lecture du frottis sanguin et de la goutte épaisse. L'essentiel est donc qu'elle soit capable de donner un diagnostic d'espèce de certitude.

Une PCR positive associée à un frottis et une goutte épaisse négatifs ne permettant pas la mise en évidence du parasite après une lecture attentive de 20 minutes a forcément une parasitémie très basse. La parasitémie exacte n'est pas essentielle pour la prise en charge du patient.

Cependant, le réglage afin de faire de cette PCR en temps réel une technique quantitative peut faire l'objet d'une autre thèse. Les essais semi quantitatifs sont très encourageants et présagent de la possibilité d'en faire une PCR quantitative sans modifier les conditions opératoires. Il suffit de faire des cultures cellulaires de *Plasmodium* et d'en faire des dilutions et de déterminer la corrélation entre le Ct et la parasitémie.

Un autre inconvénient de cette technique est qu'elle ne permet pas de différencier les stades parasitaires puisqu'elle ne détecte que l'ADN plasmodial sans distinction. Cela peut être ennuyeux pour le *P.falciparum* puisque la présence de gamétocytes dans le sang signe le fait qu'en grand nombre de cycles a eu lieu et peut signer l'évolution vers un neuro-paludisme. (Saïssy ; 2001)

Jarra *et al.* (1998) affirment que seuls les parasites viables sont détectés par PCR puisque l'ADN du *Plasmodium* est éliminé rapidement de la circulation sanguine ; on ne détecte plus d'ADN 48 heures après l'injection de parasites tués chez la souris.

De façon plus globale, la PCR paludisme présente un apport notoire sur plusieurs points.

En effet, la rectification des diagnostics microscopiques des différentes espèces peut changer la répartition géographique des espèces jusque là basée sur la morphologie microscopique.

Par exemple, Bragonier *et al.* (2002) a mis en évidence les 6 premiers cas de *Plasmodium malariae* sur l'île Timor.

Gautret *et al.* (2001) rapportent un cas de *P. vivax* acquis en Afrique de l'Ouest ou Centre Afrique, zone qui en est normalement dépourvue. Rubio *et al.* (1999) ont aussi répertorié des cas de *P.vivax* en Guinée Equatoriale.

Ces données remettent potentiellement en cause le mode de transmission de *P.vivax* puisque dans les pays d'Ouest Afrique la population noire ne possède pas le récepteur Duffy. (Rubio *et al.*; 1999)

L'identification correcte des espèces plasmodiales est fondamentale pour développer des stratégies de contrôle du paludisme dans les zones d'endémie (Scopel *et al.*; 2004).

D'autre part, le diagnostic correct de l'espèce *P.vivax* est très important depuis l'émergence d'une chloroquino-résistance chez ce parasite (Collignon *et al.*; 1991, Ruebush *et al.*; 2003).

D'ailleurs, certaines études épidémiologiques chez le vecteur, l'anophèle, pour rechercher *P.falciparum* utilisent des techniques de PCR (Bell *et al.*; 2004 ; Moreno *et al.*; 2004).

Récemment, Singh *et al.* (2004) ont mis en évidence le fait que le *Plasmodium knowlesi*, parasite du singe *Macaca fascicularis* d'Asie du Sud Est pouvait être transmis à l'homme, spécialement aux populations travaillant au contact de la jungle. Cela se manifeste par un paludisme non mortel pour l'homme mais ce parasite devient un diagnostic différentiel de *P.falciparum* et *P.malariae*. La plupart des PCR mises au point pour le diagnostic du paludisme ne détecte pas ce parasite.

Selon *Cicéron et al. (1999)*, la meilleure sensibilité de la PCR permet le suivi de la réponse aux traitements anti-malariques. L'OMS a défini une classification des résistances (4 grades : S, RI, RII, RIII) basée sur l'évolution de la parasitémie détectée par microscopie.

D'après cette équipe, la PCR pourrait modifier ces critères ce qui permettrait d'espérer une prise en charge plus rapide d'un échec au traitement. Il y aurait échec du traitement en cas de persistance de la positivité de la PCR après 5 à 8 jours de traitement (*Kain et al; 1994*). Cela semble très discutable puisque seule la persistance de trophozoïtes dans le sang circulant signe un échec au traitement or pour l'instant la PCR n'est pas capable de distinguer les stades parasitaires. On peut donc imaginer qu'une PCR positive peut s'expliquer aussi par la présence de gamétocytes qui ne signent pas un échec au traitement.

D'autres auteurs (*Hermesen et al; 2004*) utilisent la PCR pour des essais chez l'homme de vaccins pré-érythrocytiques (utilisables chez voyageur venant d'une zone non endémique) et les vaccins des stades asexués du parasite (utilisable plutôt chez l'enfant en zone d'endémie pour contrôler la parasitémie).

En ce qui concerne la PCR multiplex, les résultats pour les 23 patients testés sont concordants avec ceux de la PCR simplex.

Il ne reste donc plus que les tests de répétabilité et reproductibilité à faire et le passage d'un plus grand nombre d'échantillons pour valider totalement la technique.

En résumé, les PCR simplex SSU, *P.falciparum*, *P.vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et β globine sont opérationnelles, utilisables au laboratoire de Parasitologie. La PCR multiplex fonctionne et pourra bientôt tourner en routine.

Cependant, cette technique est beaucoup plus chère que les autres techniques, il convient donc de l'utiliser avec parcimonie et de définir des critères stricts d'utilisation afin d'éviter une dérive du nombre de demandes de la part des cliniciens qui risquent de trouver confortable ce diagnostic d'exclusion strict.

Le kit de PCR coûte 495,14 € et permet selon le fournisseur 500 tests. L'ICT Now malaria Pf/Pv ® a un prix de 217,24€ pour une boîte de 25 tests. Le frottis sanguin et la goutte épaisse ne reviennent qu'au prix des réactifs de coloration et des lames ce qui est évidemment négligeable à côté des autres techniques. Ainsi, actuellement, la PCR ne peut remplacer la microscopie. Par contre, on peut réfléchir à l'intérêt des autres examens.

Au niveau du laboratoire, la place de la sérologie paludisme peut éventuellement être remise en cause puisque la PCR est plus sensible que le frottis sanguin et la goutte épaisse. La sérologie est utilisée dans le diagnostic rétrospectif d'une crise palustre quand la microscopie s'est révélée négative. La PCR, si elle est réalisée au moment de la crise, sera positive même si la parasitémie est faible.

Le délai de 2-3 heures pour un résultat rend la PCR inadaptée à l'urgence. De plus, il faut être formé à la biologie moléculaire ce qui rend impossible son utilisation en garde.

Le dernier point est que l'on ne peut pas techniquer les prélèvements au rythme de leur arrivée au laboratoire car pour des raisons pratiques, il est plus intéressant de regrouper les tubes de sang à extraire, à moins d'avoir une technicienne à plein temps pour la biologie moléculaire ce qui n'est pas le cas pour l'instant.

La PCR sera donc un outil de 2^{ème} intention pour les paludismes difficiles. En effet, l'expérience que nous avons au laboratoire de cette PCR montre qu'elle est devenue sécurisante pour les cas de diagnostic de paludisme délicats et qu'elle a pris une place à part entière dans le diagnostic. Ainsi, nous pouvons proposer un **arbre décisionnel** afin de trouver sa place au sein de la démarche diagnostique (cet arbre se trouve en **annexe XVII**).

Le rythme de son utilisation reste à définir mais il semble intéressant de l'utiliser pour le diagnostic d'espèce quand la morphologie ne le permet pas, quand on suspecte un bi parasitisme, chez les patients pour qui le diagnostic microscopique est négatif malgré des arguments cliniques et épidémiologiques en faveur.

Nos résultats ont montré son intérêt notamment pour différencier *P. vivax* et *P. ovale*, pour confirmer un diagnostic de *P. malariae* ou l'infirmier en faveur d'un *P. falciparum* viscéral.

La continuité de cette thèse serait l'éventuelle mise au point de sa caractéristique quantitative par développement de cultures cellulaires de *Plasmodium*.

La biologie moléculaire va probablement avoir un rôle croissant dans les laboratoires de parasitologie si l'on en croit son évolution dans les autres secteurs de la microbiologie, il est donc intéressant de développer des techniques de PCR au sein du service afin de préparer le personnel à son utilisation et d'apprendre à en interpréter les résultats.

Partie III : **Annexes**

Annexe I :

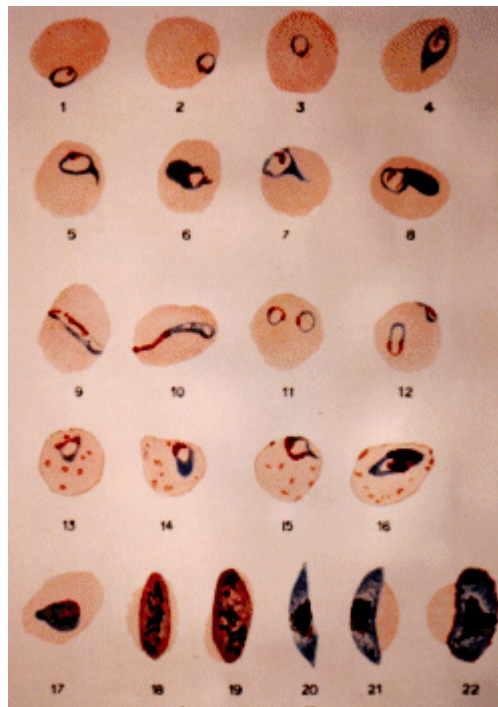


Figure 1 : *Plasmodium falciparum* (d'après G.Villain)

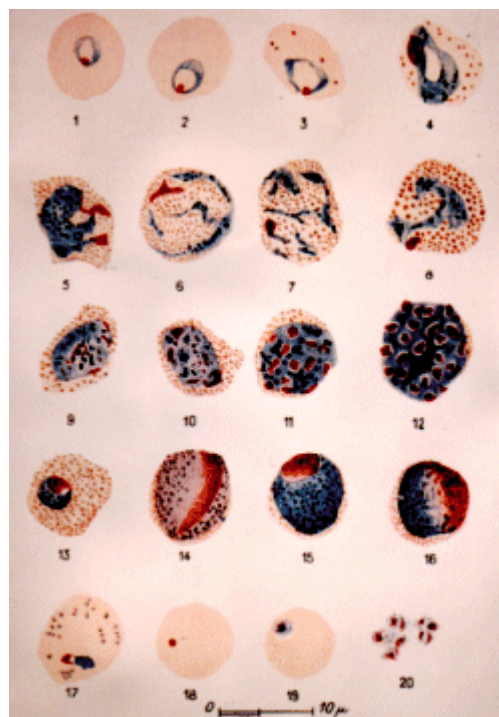


Figure 2 : *Plasmodium vivax* (d'après G.Villain).

Annexe II :

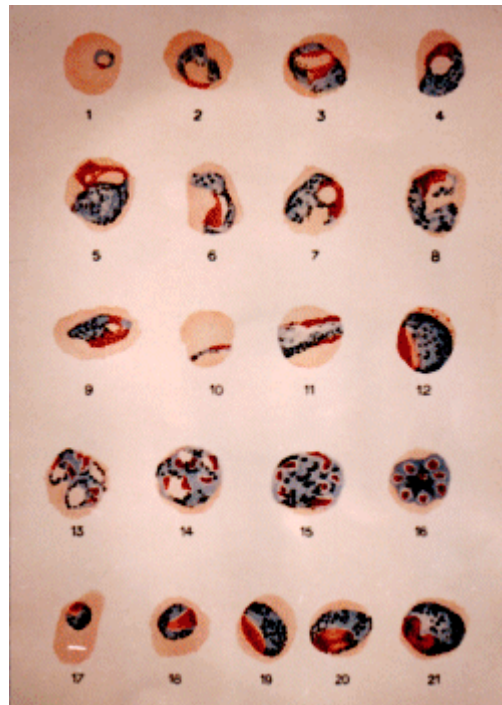


Figure 1: *Plasmodium malariae* (d'après G.Villain).

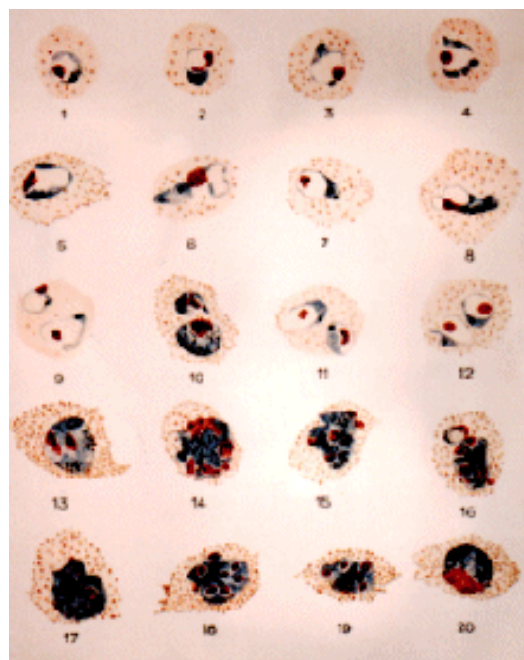


Figure 2: *Plasmodium ovale* (d'après G.Villain).

Annexe III:

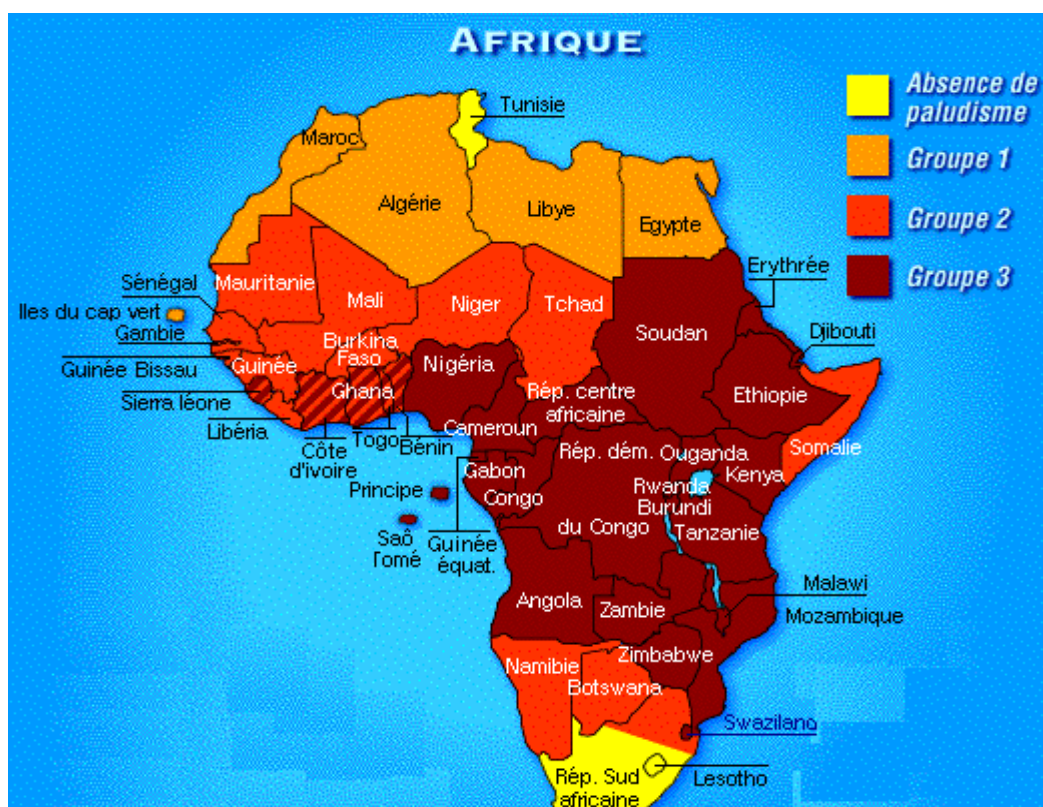


Figure 1 : Zones de chimiorésistance du continent africain.

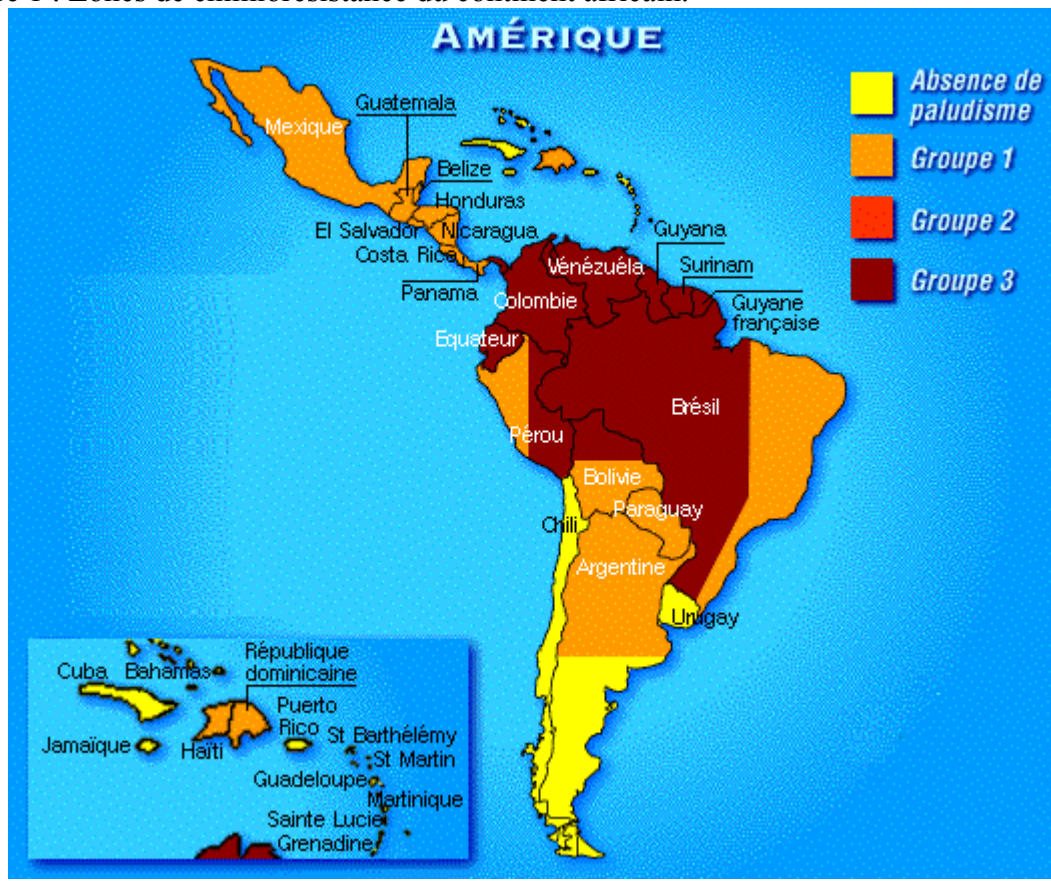


Figure 2 : Zones de chimiorésistance du continent américain.

Annexe IV :

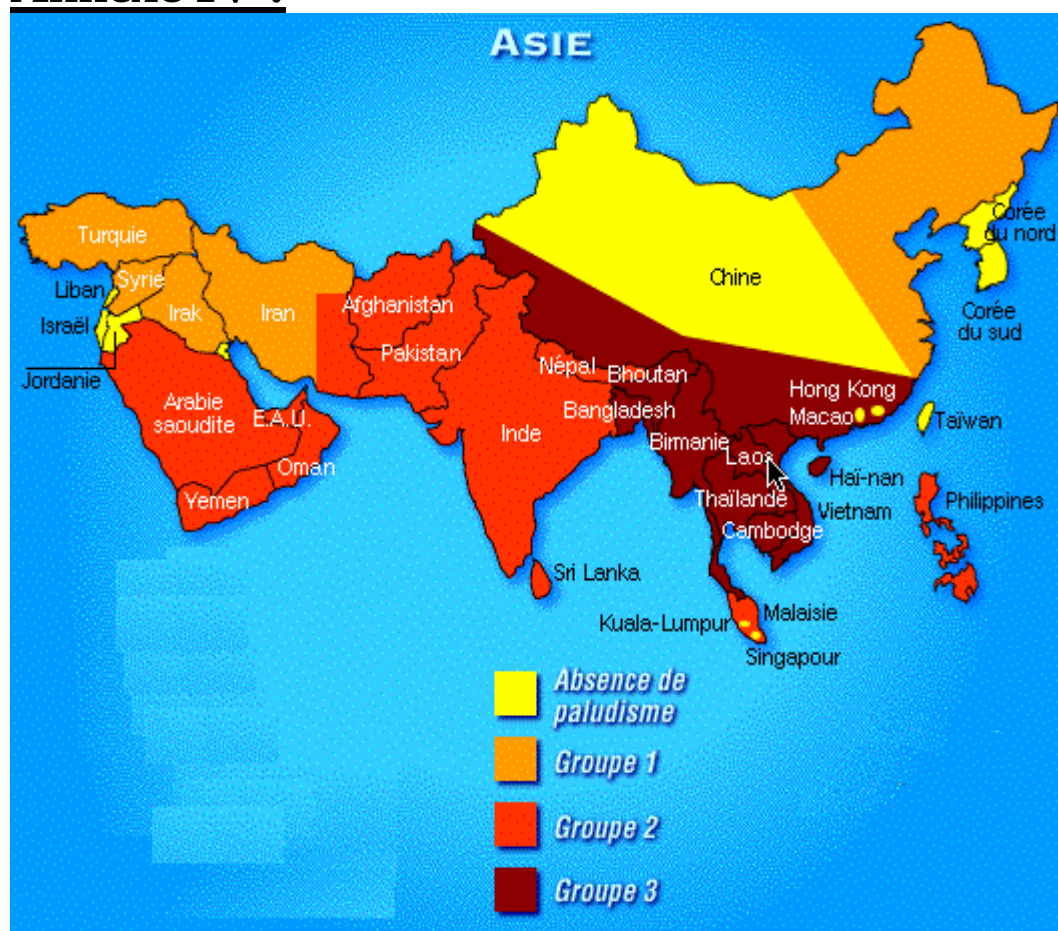


Figure 1 : Zones de chimiorésistance du continent asiatique.

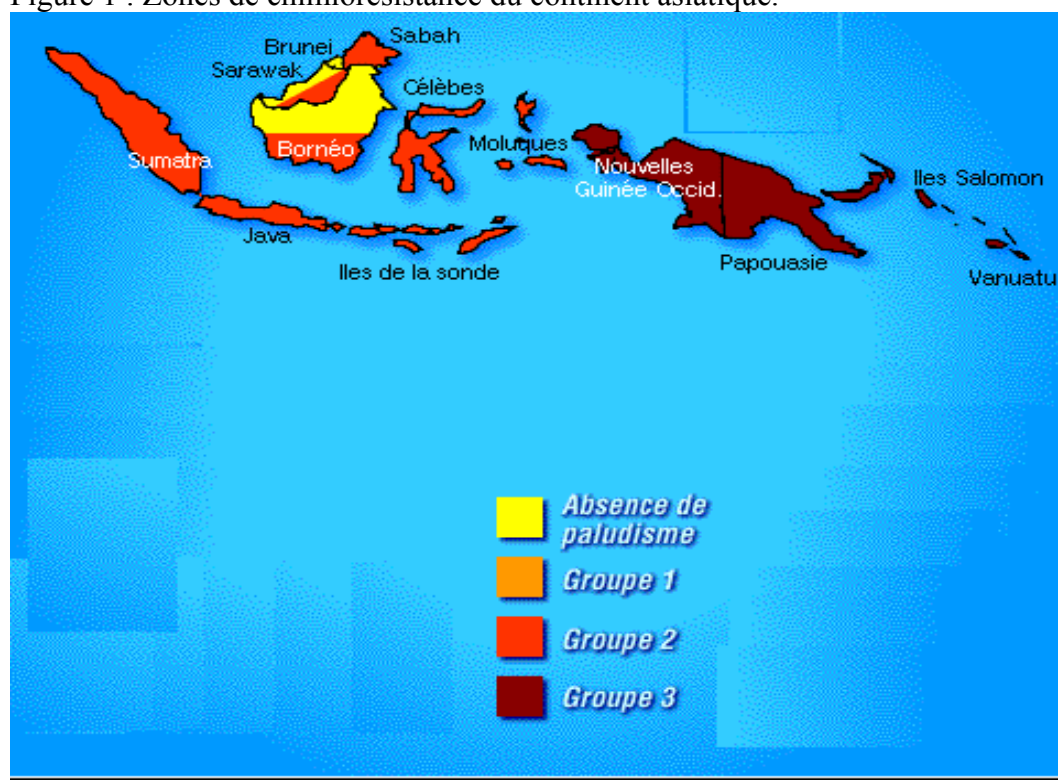
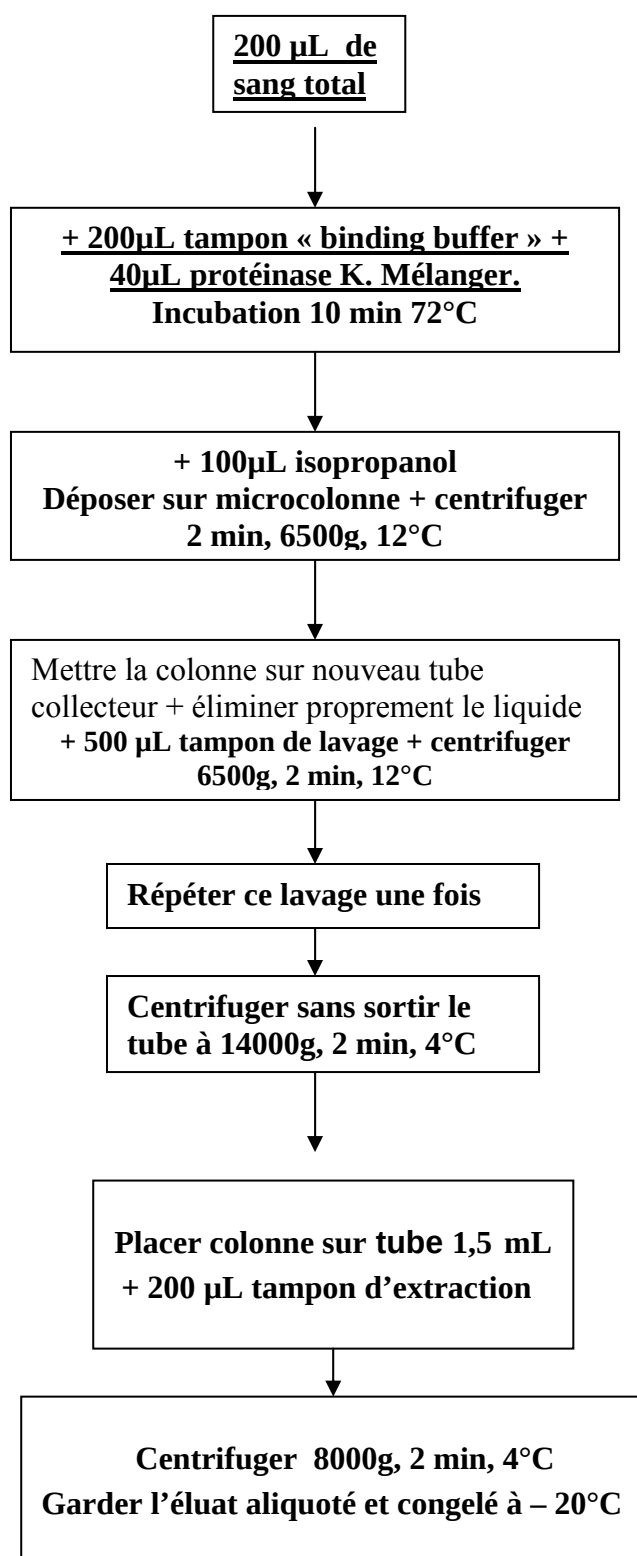


Figure 2 : Zones de chimiorésistance de l'Océanie.

Annexe V : Mode opératoire de l'extraction d'ADN



Annexe VI : principe de fonctionnement du SYBR®Green :

(PCR quantitative, <http://www.ifr56.univ-montp2.fr/LightCycler.htm>)

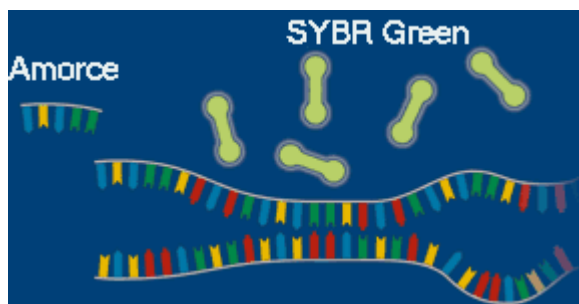


Figure 1 : Au début de l'amplification, le mélange réactionnel contient de l'ADN dénaturé, les amorces et le fluorophore non lié.

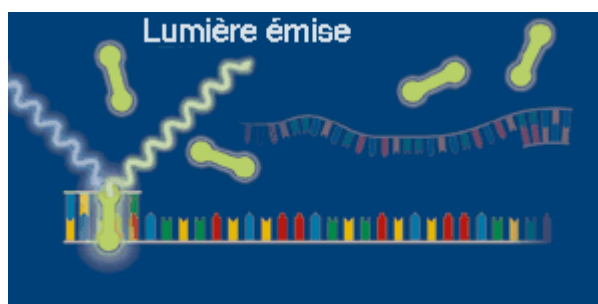


Figure 2 : Après le couplage des amorces, le fluorophore se lie au double brin. La liaison à l'ADN se traduit par une augmentation de la fluorescence.

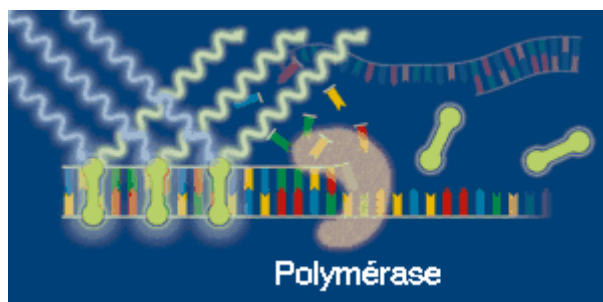


Figure 3 : Pendant l'étape d'élongation, le nombre de molécules de fluorophore lié à l'ADN synthétisé augmente ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle.

Annexe VII : Description et fonctionnement du Rotor-Gene :

Le Rotor-Gene de Corbett Research est constitué de deux éléments principaux.
(<http://www.corbette-research.com>).

♦ Le thermocycleur à air pulsé :

Il existe deux modèles qui comportent 36 ou 72 puits de réaction ;
L'air ambiant est insufflé dans une enceinte hermétique, chauffée au moyen d'une résistance électrique, puis homogénéisé par la force centrifuge.

En effet, pendant son fonctionnement, le rotor tourne aux alentours de 500 rotations par minute pour les montées en température et 1000 tours par minute pour les descentes. La combinaison de l'air pulsé et des mouvements du rotor maintient une uniformité de température supérieure à celle obtenue avec les autres thermocycleurs (+/- 0,01°C entre les puits).

De ce fait, il n'y a quasiment aucune variation de température d'un échantillon à l'autre ce qui est un facteur déterminant dans la précision et la reproductibilité de la PCR.

Ainsi les variations du rendement d'amplification itinérantes à une absence d'uniformité de la température sont éliminées. Ceci explique que le Rotor Gene ne nécessite pas de marqueur de référence passif (ROX).

Avec les autres appareils, ces marqueurs passifs de type ROX sont incorporés dans chaque tube de réaction. Ils permettent de normaliser les variations de fluorescence, qu'ils subissent en même temps que le rapporteur, dues aux variations de température ou d'enregistrement au niveau de la caméra.

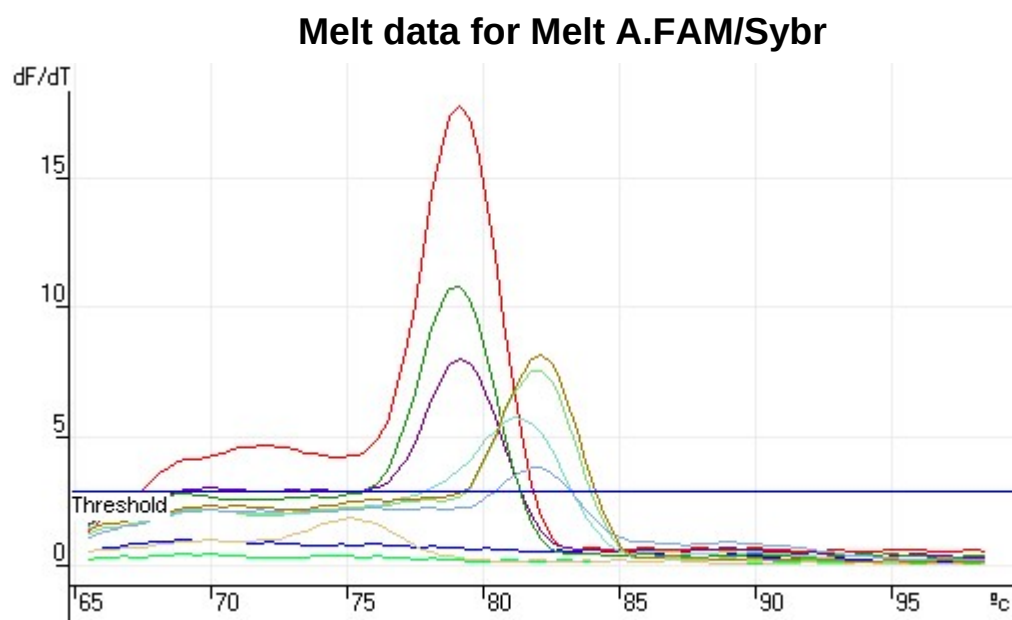
♦ Le module de détection :

Cet automate présente 4 sources lumineuses ce qui permet de réaliser des PCR multiplex avec 4 fluorochromes différents.

A chaque passage devant la cellule de détection, le milieu réactionnel est excité par une source d'énergie lumineuse : une lampe électronique. Elle produit un faisceau lumineux très intense la rendant très sensible.

La fluorescence émise est collectée par photomultiplicateur (la longueur d'onde d'émission est sélectionnée grâce à la présence de canaux munis d'un filtre de détection). Il détecte les signaux émis avec une très grande sensibilité et un faible bruit de fond. Les données sont ensuite envoyées à l'ordinateur et analysées par un logiciel approprié. Il calcule ainsi la moyenne des rayonnements émis de chaque échantillon en fonction du nombre de cycles. Les données s'affichent alors en temps réel sur l'écran.

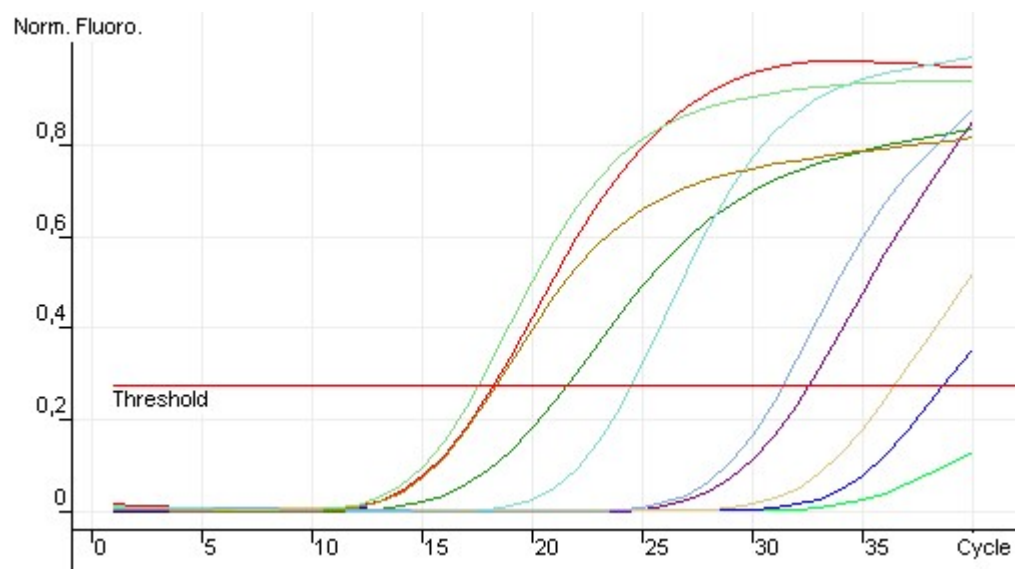
Annexe VIII : Courbe de fusion SSU/ *P.falciparum* :



No.	Colour	Name	Type	Peaks
1	■	T - Falci	NTC	
2	■	T+ 352	Sample	72,0, 79,2
3	■	T + 796	Sample	
4	■	957	Sample	70,0, 79,3
9	■	409	Sample	79,0
13	■	T - SSU	NTC	
14	■	T+ 352	Sample	82,0
15	■	T + 796	Sample	81,3
16	■	957	Sample	82,0
21	■	409	Sample	82,0

Annexe IX: courbe de fluorescence de SSU/ *P.falciparum*:

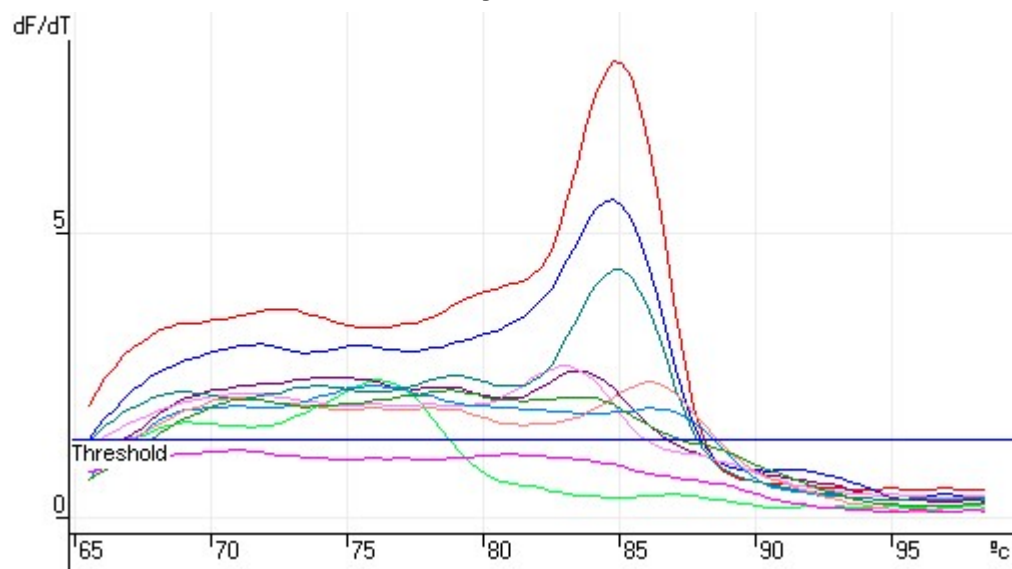
Quantitation data for Cycling A.FAM/Sybr



No.	Colour	Name	Type	Given Conc. ()	Calculated Conc. ()	% Variation	Ct	Ct Std. Dev.
1	Green	T - Falci	NTC					
2	Red	T+ 352	Sample				18,25	
3	Blue	T + 796	Sample				38,68	
4	Purple	957	Sample				32,58	
9	Dark Green	409	Sample				21,58	
13	Yellow	T - SSU	NTC				36,44	
14	Light Green	T+ 352	Sample				17,55	
15	Cyan	T + 796	Sample				24,52	
16	Light Blue	957	Sample				31,39	
21	Brown	409	Sample				18,38	

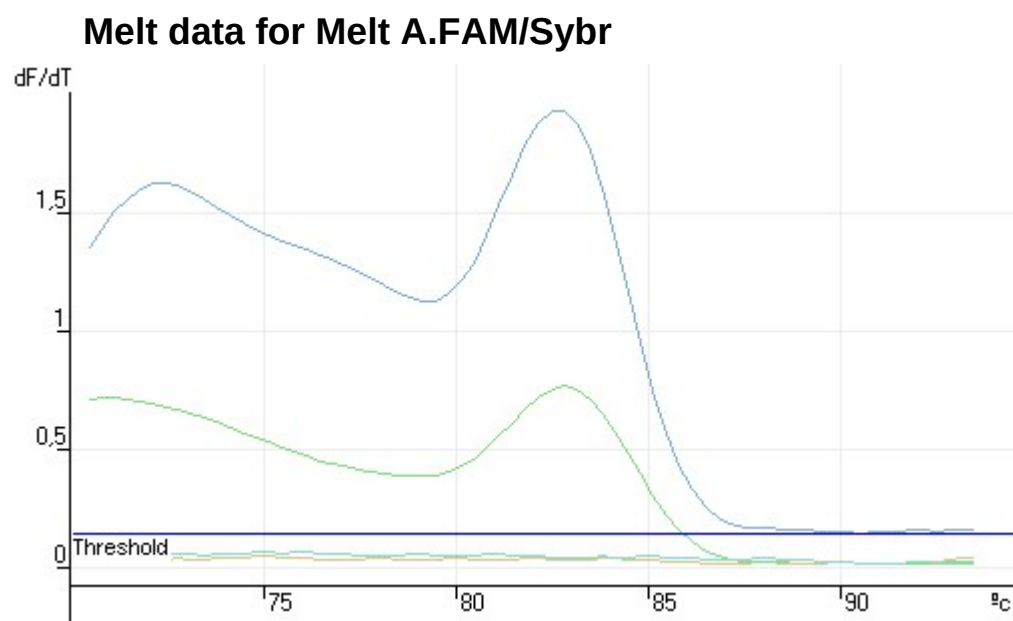
Annexe X: courbe de fusion de *P.ovale*:

Melt data for Melt A.FAM/Sybr



No.	Colour	Name	Type	Peaks
1	Green	T - Ovale	NTC	69,3, 76,3
2	Red	T + 920	Sample	72,5, 85,0
3	Blue	T + 796	Sample	71,5, 75,5, 84,8
4	Purple	159600	Sample	74,5, 78,5, 83,5
5	Pink	187742	Sample	71,0, 77,5, 83,0
6	Light Blue	192662	Sample	70,5, 76,0, 86,3
7	Teal	206180	Sample	69,0, 74,0, 79,0, 85,0
8	Light Red	203828	Sample	71,0, 78,0, 86,2
9	Dark Green	203863	Sample	71,5, 78,5, 83,5
10	Magenta	200411	Sample	

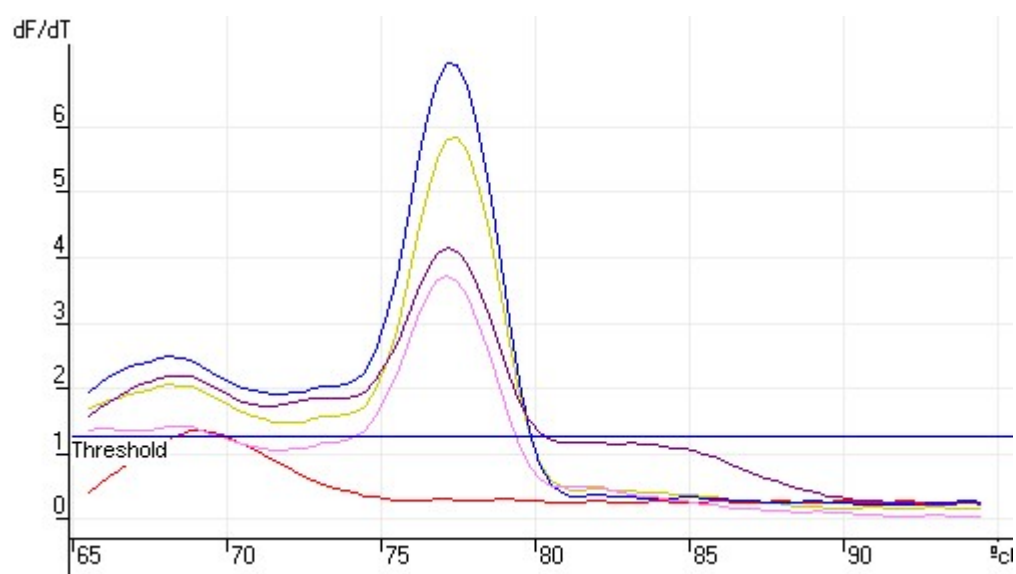
Annexe XI: courbe de fusion de *P.malariae*:



No.	Colour	Name	Type	Peaks
13	Orange	T- 5 mM	NTC	
14	Green	749 T+ 1/8	Sample	82,8
15	Yellow	868 1/8	Sample	
16	Blue	754 1/8	Sample	72,5, 82,7

Annexe XII : Courbe de fusion de *P.vivax* :

Melt data for Melt A.FAM/Sybr



No.	Colour	Name	Type	Peaks
1	Red	T- 3 mM 1/4	NTC	69,0
2	Yellow	736 1/4	Sample	68,3, 77,5
3	Blue	794 1/4	Sample	68,3, 77,3
4	Purple	881 1/4	Sample	68,5, 73,3, 77,2
5	Pink	520 1/4	Sample	68,5, 77,2

Annexe XIII: Protocole opératoire de la PCR simplex en temps réel pour le diagnostic des espèces plasmodiales :

1. Objet :

Extraction et amplification de l'ADN plasmodial à partir du sang total ainsi que suivi en temps réel de la réaction.

2. Domaine d'application :

Concerne l'ensemble des techniciens de laboratoire et internes formés à la biologie moléculaire.

3. Prélèvements concernés :

Sang total prélevé sur EDTA et congelé à -20°C . Un minimum de 200 μl est nécessaire à l'extraction.

4. Extraction :

Le sang total est décongelé à température ambiante. Un aliquot de 200 μl est utilisé pour l'extraction selon le protocole en annexe V.

5. Témoins :

Deux contrôles sont introduits dans chaque série de PCR.

- Témoin négatif de la réaction où l'échantillon est remplacé par de l'eau distillée stérile.
- Témoin positif qui est en fait un sang de patient diagnostiqué à une espèce par la méthode classique.

6. Préparation du Mix :

Le Mix a un volume total de 20 µl avec une prise d'essai de 5 µl pour le témoin ou l'échantillon à analyser.

	Pour un tube réactionnel		
	Concentration initiale	Volume en µl	Concentration finale
Tampon 10 X	10X	2	1X
MgCl₂	50 mM	1,2	3 mM
dNTP	5 mM	0,8	200 µM
Amorce SSU1/SSU2 ou PF1/PF2 ou PLF/OVR ou PV1/PV2 ou BGO7/BGO8	5 µM	3.28	820 nM
Hot GoldStar enzyme	5 U/ µl	0,1	0,025 U/µl
Eau distillée stérile		7,02	
SYBR®Green I	1/2000	0,6	1/66000
Échantillon*		5**	
Volume final en µl	20		

*échantillon dilué au ¼ pour SSU1/SSU2, PF1/PF2, PV1/PV2 et BGO7/BGO8
au 1/8 pour PLF/OVR

** On met donc 5µL d'échantillon dilué au ¼ ou 2,5µL d'échantillon dilué au ¼
+ 2,5µL d'eau stérile (= dilution au 1/8)

	Pour un tube réactionnel		
	Concentration initiale	Volume en µl	Concentration finale
Tampon 10 X	10X	2	1X
MgCl₂	50 mM	2	5 mM
dNTP	5 mM	0,8	200 µM
Amorce PLF/MAR	5 µM	3,28	820 nM
Hot GoldStar enzyme	5 U/ µl	0,1	0,025 U/µl
Eau distillée stérile		6,22	
SYBR®Green I	1/2000	0,6	1/66000
Échantillon au 1/8		5	
Volume final en µl	20		

7. Protocole d'amplification :

Le programme d'amplification est préenregistré sur le Rotor Gene. Il se déroule en 2 étapes :

- 1^{er} cycle de température : L'ADN est dénaturé à **95°C** pendant **10 minutes**. Cette étape permet d'activer l'enzyme par chauffage.

- 2^{ème} cycle de température : (répété **40 fois**)
 - dénaturation à **94°C** pendant **15 secondes**
 - hybridation et élongation à **63°C** pendant **60 secondes** pour **PF1/PF2, SSU1/SSU2 et PLF/OVR**

- ou hybridation à **64°C** pendant **15** secondes puis élongation à **72°C** pendant **20** secondes pour PLF/MAR
- ou hybridation à **51°C** pendant **15** secondes puis élongation à **72°C** pendant **35** secondes pour PV1/PV2

8. Résultats :

L'étude de la courbe de fusion (ou melting curve) permet le diagnostic d'espèce.

Ainsi, un **résultat** est **positif** pour une espèce plasmodiale donnée quand il y a un pic au niveau de la courbe de fusion à la température de fusion spécifique du couple d'amorces de l'espèce étudiée. Soit :

- PF1/PF2 : $T_m \approx 78-79^\circ\text{C}$
- SSU1/SSU2: $T_m \approx 81^\circ\text{C}$
- PLF/OVR: $T_m \approx 84-85^\circ\text{C}$
- PLF/MAR: $T_m \approx 82-83^\circ\text{C}$
- PV1/PV2: $T_m \approx 77-78^\circ\text{C}$

Le témoin positif sert de référence pour la valeur du T_m de l'espèce.

Un **résultat** est **négatif** si aucun pic ne se dégage à la température du T_m sur la courbe de fusion.

Annexe XIV: Protocole opératoire de la PCR multiplex en temps réel:

1. Objet :

Extraction et amplification de l'ADN plasmodial à partir du sang total ainsi que suivi en temps réel de la réaction.

2. Domaine d'application :

Concerne l'ensemble des techniciens de laboratoire et internes formés à la biologie moléculaire.

3. Prélèvements concernés :

Sang total prélevé sur EDTA et congelé à -20°C . Un minimum de 200 μl est nécessaire à l'extraction.

4. Extraction :

Le sang total est décongelé à température ambiante. Un aliquot de 200 μl est utilisé pour l'extraction selon le protocole en annexe V.

5. Témoins :

Deux contrôles sont introduits dans chaque série de PCR.

- Témoin négatif de la réaction où l'échantillon est remplacé par de l'eau distillée stérile.
- Témoin positif qui est en fait un sang de patient diagnostiqué à une espèce par la méthode classique.

6. Préparation du Mix :

Le Mix a un volume total de 20 µl avec une prise d'essai de 5 µl pour le témoin ou l'échantillon à analyser.

Toutes les amorces sont mises dans le même Mix.

	Pour un tube réactionnel		
	Concentration initiale	Volume en µl	Concentration finale
Tampon 10 X	10X	2	1X
MgCl₂	50 mM	1,2	3 mM
dNTP	5 mM	0,8	200 µM
Amorce PF1/PF2	5 µM	3	750 nM
Amorce SSU1/SSU2	5 µM	1	250 nM
Amorce BGO7/BGO8	1 µM	0,38	95 nM
Hot GoldStar enzyme	5 U/ µl	0,1	0,025 U/µl
Eau distillée stérile		5,92	
SYBR®Green I	1/2000	0,6	1/66000
Échantillon au 1/4		5	
Volume final en µl	20		

7. Protocole d'amplification :

Le programme d'amplification est préenregistré sur le Rotor Gene. Il se déroule en 2 étapes :

- 1^{er} cycle de température : L'ADN est dénaturé à **95°C** pendant **10 minutes**. Cette étape permet d'activer l'enzyme par chauffage.

- 2^{ème} cycle de température : (répété **40 fois**)
 - dénaturation à **94°C** pendant **15 secondes**
 - hybridation à **60°C** pendant **20 secondes**
 - élongation à **72°C** pendant **40 secondes** (acquisition à cette température)

8. Résultats :

L'étude de la courbe de fusion (ou melting curve) permet le diagnostic d'espèce.

Ainsi, un résultat est positif pour une espèce plasmodiale donnée quand il y a un pic au niveau de la courbe de fusion à la température de fusion spécifique du couple d'amorces de l'espèce étudiée. Soit :

- PF1/PF2 : $T_m \approx 78-79^\circ\text{C}$
- SSU1/SSU2: $T_m \approx 81^\circ\text{C}$
- BGO7/BGO8 : $T_m \approx 88^\circ\text{C}$

Le témoin positif sert de référence pour la valeur du T_m de l'espèce.

Un résultat est négatif si seul le pic de β globine sort sur la courbe de fusion.

Si aucun pic ne se dégage de la courbe de fusion, c'est que l'extraction n'a pas marché et qu'il n'y a donc pas d'ADN dans le tube.

Annexe XV : Résultats complets de l'étude :

Patient	microscopie	PCR TEMPS REEL					%	Ac	ICT	Formes
		SSU	Falci	Ov	Mal	Viv				
AGD 642	négatif	-	-	-			-	20		-
ALJ 921	Falci	+	+	-	-	-	<0,10%			
ALJ 737	Falci	+	+	-			4,00%			
AZM 450	Falci	+	+	-	-	-	<1%			
BAO 421	négatif	-	-					320		
BAV 448	Falci	+	+	-	-	-	<0,05%			
BAF 729	négatif	-	-					<20		
BAC 951	négatif	-	-					20		
BES258	Viv	+	-	-	-	+	forte		NF+	
BIA 990	Falci	+	+	-	-	-	2,50%			
BIB 854	négatif	-	-		-	-		320		
BLV 321	Falci	+	+	-	-	-	0,40%			
BLV 761	négatif	+	+		-					
BOM 920	Ov + Falci	+	-	+	-	-				TF3
BON 054	négatif	-	-					<20		
BOZ 929	négatif	-	-					<20		
CAJ 966	Falci + Mal	+	+	+	-	-	<0,10%	80		
CAA 443	Falci	+	+	-	-	-	<0,50%			
CHM874	négatif	-	-					<20		
CIG 213	Falci	+	+	-	-	-	4%	>40		
CIM 448	Falci	+	+	-	-	-	3%			
CIM957	Falci	+	+	-	-	-				GF
CIN 352	Falci	+	+	-	-	-	15%			
CIN 449	Falci	+	+	-	-	-	<1%	80		
COZ 796	Falci + Mal	+	-	+	-	-				TF + TM + GM
COZ 592	parasitisme	+	-	+	-	-				TO
COZ 952	négatif	-	-					non réalisé		
COZ 662	négatif	-	-	-				<20		
DAP 174	Falci	+	+	-	-	-	<0,10%			
DAB 914	négatif	-	-		-			320	F+	
DAP 921	négatif	-	-					320		
DIA 863	Falci	+	+	-	-	-	rare			
DIA 140	Falci	+	+	-	-	-	1,50%			
DIS 094	négatif	-	-					<20		
DUN 708	parasité	+	-	-	-	+	0,50%			
EMI 524	Falci	+	+	-	-	-	<0,01%		F+ et NF+	
ESA 172	Falci	+	+	-			2,50%	40		
EXG 737	négatif	-	-					40		
FOB 346	Falci	+	+	-	-	-	<0,01%			
FOD 336	Falci	+	+	-	-	-	<0,1%			
FOH 338	Falci	+	+	-	-	-	4%			
FRG 866	Falci	+	+	-	-	-	2%			
GAP 691	négatif	-	-					<20		
GAM 313	Falci	+	+	-	-	-	2%			
GAO 312	Falci	+	+	-	-	-	12%			
GAS 673	négatif	-	-					<20		

GEP 735	négatif	-	-					<20		
GIS 322	Falci	+	+	-	-	-	1%			
GOV 888	Falci	+	+	-			1%	<20		
GRA 748	Falci	+	+	-	-	-	<0,01%			
GUC 663	parasitisme	+	-	+	-	-		<20		
HAI 127	Falci	+	+	-	-	-	<1%			
JOC 022	négatif	-	-	-				640		
JOM 886	négatif	-	-	-				<20		
KAM 449	négatif	-	-	-	-	-		640		
KEK 754	Mal	+	+	-	+	-		2560		
KIB 971	négatif	-	-	-				80		
KIN 184	négatif	-	-					320		
KOA 354	négatif	-	-					40		
KUJ 621	Falci	+	+	-	-	-				
LED 754	Falci	+	+	-	-	-	1%		NF+	
LEC 562	parasitisme	+	-	+	-	-			-	
LEO 272	Falci	+	+	-	-	-	21%			
LOB 232	Falci + Mal	+	+	-	-	-	<1%			T2F+G2F+T1M
MAM 849	Falci visc	+	+	-	-	-				SAF + JGF
MAR 643	négatif	-	-	-						
MAG 770	Falci	+	+	-	-	-	<1%			
MBM 063	négatif	-	-		-		clinique ++			
MET 879	négatif	-	-					<20		
MEM 749	Mal	+	-	-	+	-		20	NF+	T2V+ G2V
MEG 600	parasité	+	-	-	-	+	0,50%		NF+	
MEG 736	parasité	+	-	-	-	+		<20		
MEG 742	négatif	-	-	-				<20		
MIF 756	négatif	-	-	-				<20		
MEP 290	Falci	+	+	-	-	-	1,20%			
MOL 932	Falci	+	+	-	-	-				
MOK 484	Falci	+	+	-	-	-	9%			
MOK 775	Falci	+	+	-	-	-	rare	320		
MUF 002	Falci+cpx V/O	+	+	+	-	-	2%			TF+SOV
MUY 962	parasitisme + Mal	+	-	+	-	-	<0,10%			T1O+S1M
NAR 698	Falci	+	+	-	-	-	<0,01%	160		
NDF 771	Falci	+	+	-	-	-	<1%			
NGP 791	négatif	-	-	-				non réalisé	-	
NGR 737	Mal	+	-	+	-	-				
NGJ 244	négatif	-	-	-	-	-		1280		
NGE 411	Falci	+	+	-	-	-	3%	<20		
NGE 180	parasitisme	+	-	+	-	-				
NOC 735	parasitisme	+	-	+	-	-				
NSM 465	négatif	-	-	-				<20		
NZM 104	Falci	+	+	-	-	-	0,40%	80		
OUM 842	négatif	-	-	-				20		
OUR 995	Falci	+	+	-	-	-				
PRV 520	Plasm sp	+	-	-	-	+		40	identif impossible	
RIR 950	Falci	+	+	-	-	-	goutte épaisse+			
ROF 881	parasité	+	-	-	-	+			NF+	
ROF 794	Falci+cpx	+	-	-	-	+	<0,10%			

	V/O									
ROJ 612	Falci	+	+	-	-	-	<0,010%			
ROJ 586	Falci	+	+	-	-	-	<0,10%			
ROJ 547	Falci	+	+	-	-	-	<1%			
SAD 444	Falci	+	+	-	-	-	1,50%			
SAM 409	Falci	+	+	-	-	-	3,50%			
SAR 205	négatif	-	-	-	-	-	rare	320		
SAR 401	Falci	+	+	-				160		
SAY 501	Falci	+	+	-	-	-	8%			
SFM 646	Falci	+	+	-	-	-				
SIS 887	négatif	-	-	-			clinique ++			
SUA 011	Falci	+	+	-	-	-	0,80%			
SYB 380	Falci	+	+	-	-	-	<0,1%	640		
SYB 898	négatif	-	-	-						
SYB 346	Falci	+	+	-	-	-	<0,1%			
TCM 459	Falci + parasitisme	+	-	+	-	-			F+	
TCM 480	Falci + parasitisme	+	-	+	-	-		320		
TON 868	Falci + Mal	+	+	-	-	-	<1%			T1F+S1M
TON 008	Mal	+	+	-	-	-				S1M
TOO 083	négatif	-	-	-				<20		
TRG 420	négatif	-	-	-			clinique ++			
TSJ 840	négatif	-	-					>1280		
TSJ 020	négatif	-	-					>2560		
VIJ 572	négatif	-	-	-				>320		
YAG 095	Falci	+	+	-	-	-	<0,10%			
ZEM 267	parasitisme	+	-	+	-	-	0,40%	40		
ZOP 828	Falci	+	+	-	-	-	rare			

Légende:

TF = trophozoïtes de falciparum

TM = trophozoïtes de malariae

GM = gamétocytes de malariae

TO = trophozoïtes d'ovale

SO = schizontes d'ovale

SAF = schizontes âgés de falciparum

GJF= gamétocytes jeunes de falciparum

GF= gamétocytes de falciparum

TV = trophozoïtes de vivax

GV= gamétocytes de vivax

1 = rare

2=quelques

3= nombreux

4=très
nombreux

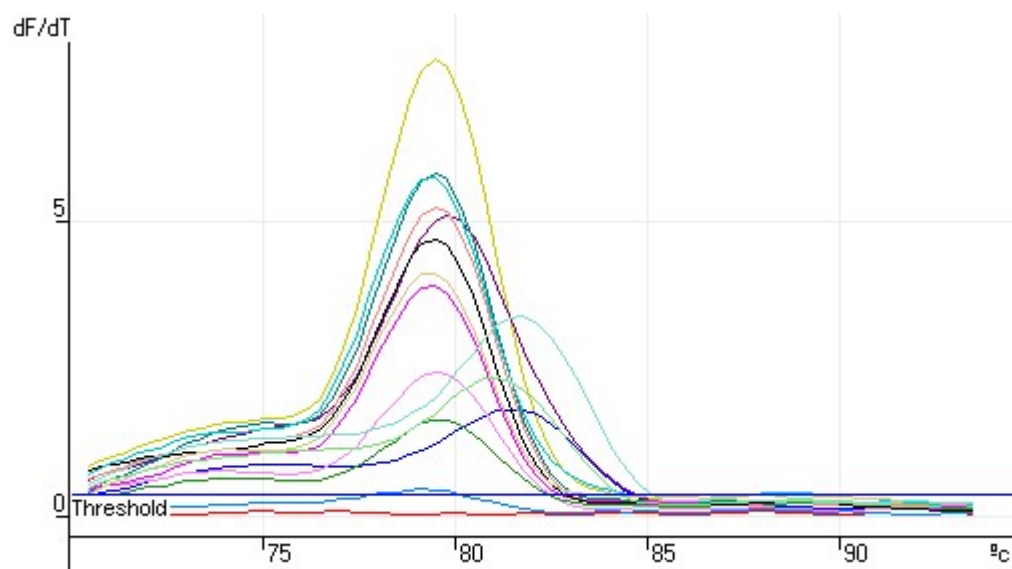
NF+ = ICT + à une espèce autre que falciparum

F+ = ICT + à falciparum

SOV= schizontes du
complexe vivax/ovale
SM schizonte de malariae

Annexe XVI : Courbe de fusion de la PCR multiplex :

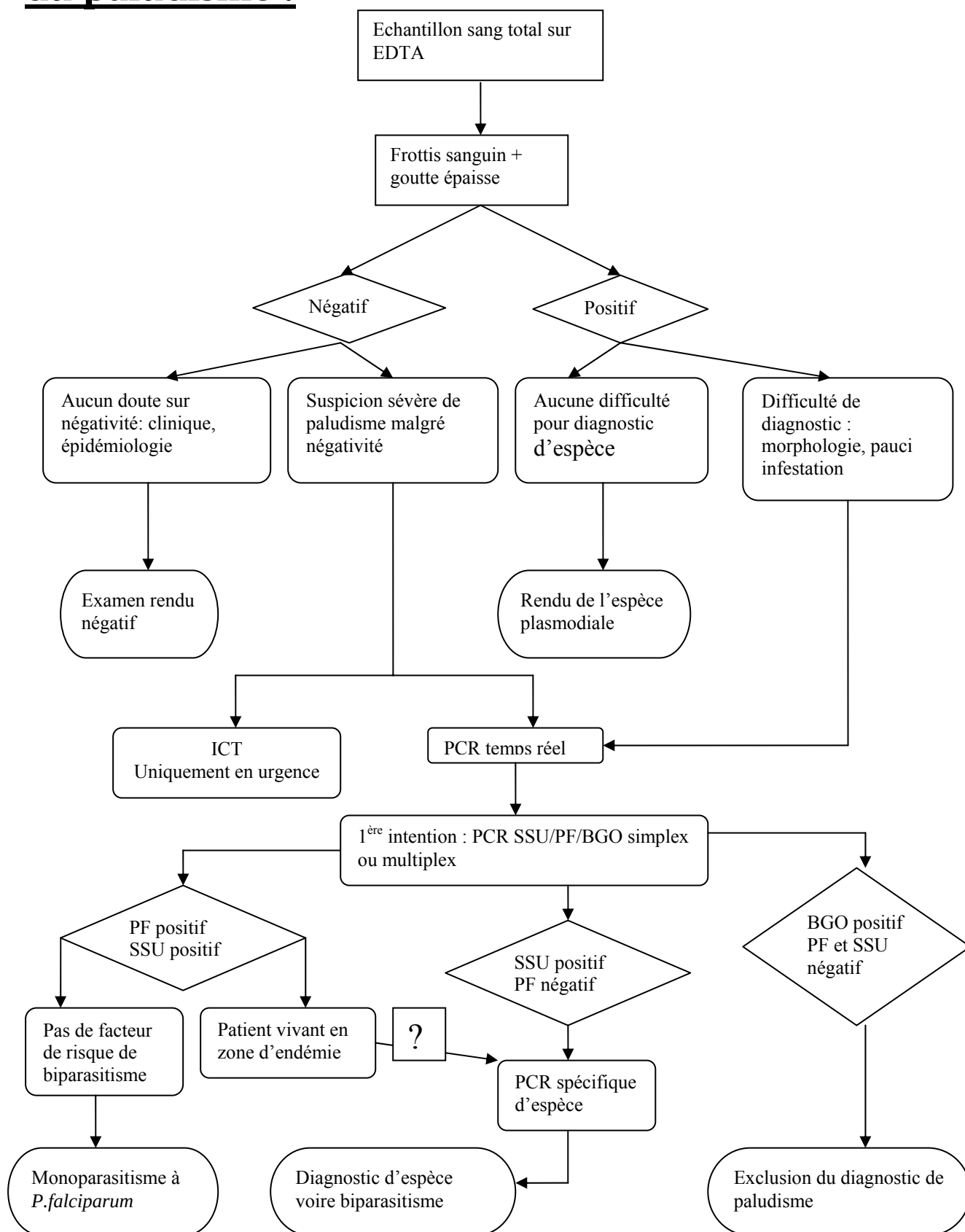
Melt data for Melt A.FAM/Sybr



No.	Colour	Name	Type	Peaks
1	Red	T - multiplex	NTC	
2	Yellow	352	Sample	79.5
3	Blue	267	Sample	75.2, 81.5
4	Purple	002	Sample	79.8
5	Pink	966	Sample	74.0, 79.5
6	Light Blue	921	Sample	79.2
7	Teal	174	Sample	75.3, 79.5
8	Light Red	863	Sample	79.5
9	Green	346	Sample	74.2, 79.5
10	Magenta	748	Sample	75.0, 79.5
11	Black	698	Sample	79.5
12	Cyan	612	Sample	79.3
13	Gold	380	Sample	74.0, 79.5
14	Light Green	459	Sample	81.0
15	Light Blue	708	Sample	81.7

This report generated by Rotor-Gene Real-Time Analysis Software
 (C)Corbett Research 2000
 (R)All Rights Reserved

Annexe XVII: Arbre décisionnel de diagnostic du paludisme :



BIBLIOGRAPHIE

ANOPHEL. Parasitologie mycologie. 7^{ème} édition. Collection référence.2002.

Barker R.H. Jr, Banchongaksorn T., Courval J.M., Suwonkered W., Rimwungtragoon K., Wirth D.F. 1992. A simple method to detect *Plasmodium falciparum* directly from blood samples using the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 46(4): 416-26.

Bell A.S., Ranford – Cartwright L.C. 2004. A real- time PCR assay for quantifying *Plasmodium falciparum* infections in the mosquito vector. *Int. J. Parasitology*; 34:795-802.

Berry A., Fabre R., Cassaing S., Benoit-Vical F., Séguéla J.F., Magnaval J.F. Avril 2004. Diagnostic du paludisme d'importation par PCR multiplex compétitive sur LightCycler. *Journal d'information biomédicale* ; 68 :32-34.

Bogard Marc, Lamoril Jérôme. Biologie moléculaire en biologie clinique.I. Méthodes. Collection Option-Bio. Editions Elsevier 1998.

Bragonier R., Nasveld P., Auliffe A. Dec. 2002. *Plasmodium malariae* in East Timor. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*; 33(4):689-90.

Brown A.E., Kain K.C., Pipithkul J., Webster H.K. Nov. - Dec. 1992. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *P.vivax* infections undetected by conventional microscopy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 86 (6):609-612.

Calderaro A., Piccolo G. Zuelli C., Galati L., Ricci L., Perandin F., Dell'Anna M.L., Arcangeletti M.C., Manca N., Dettori G., Chezzy C. April 2004. Evaluation of a new plate hybridization assay for the laboratory diagnosis of imported malaria in Italy. *New Microbiology*; 27 (2): 163-171.

Ciceron L., Jaureguiberry G., Gay F. Danis M. 1999. Development of a *Plasmodium* PCR for monitoring efficacy of antimalarial traitement. *J. Clin. Microbiol*; 37(1): 35-38.

Clegg R.M. 1995. Fluorescence resonance energy transfert. *Current Opinion in Biotechnology*; 6: 103-110.

Collignon P. 1991. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *J. Infect. Dis.*; 164:222-223.

Corbett Research. Real-Time amplification on the Rotor-Gene. Manuel d'utilisation du Rotor-Gene.

Corbett Research: <http://www.corbettresearch.com>

Danis M., Mouchet J. Paludisme. Edition Ellipses / Aupelf 1991.

Dupré Cécilia. Etude rétrospective des cas de paludisme à Nantes de 1999 à 2003. *Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie.*2004.

De Monbrison F., Angei C., Staal A., Kaiser K., Picot S. 2003. Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in

human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg*; 97:387-390.

Di Santi S.M., Kirchgatter K., Brunialti K.C., Oliveira A.M., Ferreira S.R.S., Boulos M. Jul.-Aug.2004. PCR-based diagnosis to evaluate the performance of malaria reference centers. *Rev.Inst.Med.trop.S.Paulo*; 46(4):183-7.

Fabre R., Berry A., Magnaval J.F. 2003. Diagnostic du paludisme d'importation par PCR multiplex compétitive sur LightCycler. *Pathologie biologie* ; 51:44-46.

Fabre R., Berry A., Morassin B., Magnaval J.F. Jan. 2004. Comparative assessment of conventional PCR with multiplex real-time PCR using SYBR Green I detection for the molecular diagnosis of imported malaria. *Parasitology*; 128(1):15-21.

Farcas G.A., Zhong K.J.Y., Mazzulli T., Kain K.C. Feb.2004. Evaluation of the RealArt Malaria LC Real-Time PCR Assay for Malaria Diagnosis. *J.Clin.Microbiol.*; 42(2): 636-8.

Gautret P., Legros F., Koulmann P, Rodier M.H, Jacquemin J.L. 2001. Imported *Plasmodium vivax* malaria in France: geographical origin and report of an atypical case acquired in Central or Western Africa. *Acta tropica*;78:177-181.

Hang V.T., Be T.V., Tran P.N., Thanh L.T., Hien L.V., O'Brien E., Morris G.E. 1995. Screening donor blood for malaria by polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medecine and Hygiene*; 89:44-47.

Hänschied T., Valadas E., Grobusch M.P. Aug. 2002. Polymerase chain reaction for screening blood donors at risk for malaria: safe and useful? *Emerging Infectious Diseases*; 8(8): 872. (Letter)

Hänschied T., Grobusch M.P. Sept.2002. How useful is PCR in the diagnosis of malaria? *Trends in Parasitology*; 18(9): 395-8.

Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H., Vogt P.H. Sept. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*; 23(3): 504-11.

Hermesen C.C., Telgt D.S.C., Linders E.H.P., van de Locht L.A.T.F., Eling W.M.C., Mensink E.J.B.M., Sauerwein R.W. 2001. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR. *Molecular and biochemical Parasitology*; 118:247-251.

Hermesen C.C., De Vlas S.J., Van Gemert G.J.A., Telgt D.S., Verhage D.F., Sauerwein R.W. 2004. Testing vaccines in human experimental malaria: statistical analysis of parasitemia measured by a quantitative real-time polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 71(2):196-201.

Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*; 10:413-7.

Humar A., Ohrt C., Harrington M.A., Pillai D. and Kain K.C. 1997. ParaSight® F test compared with the polymerase chain reaction and microscopy for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travellers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 56:44-48.

Jarra W., Snounou G. August 1998. Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malaria infections by drug treatment or immune responses. *Infection and immunity*; 66(8): 3783-87.

Kain K.C., Kyle D.E., Wongsrichanalai C., Brown A.E. 1994. Qualitative and semiquantitative polymerase chain reaction to predict *Plasmodium falciparum* treatment failure. *J. Infect. Dis.*; 170: 1626-1630.

Kamwendo D.D., Dzinjalama F.K., Snounou G., Kanjala M.C., Mhango C.G., Molyneux M.E., Rogerson S.J. March-April 2002. *Plasmodium falciparum*: PCR detection and genotyping of isolates from peripheral, placental, and cord blood of pregnant Malawian women and their infants. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; 96 (2):145-9.

Karsai A., Müller S., Platz S., Theres Hauser M. April 2002. Evaluation of a Home-made SYBR®Green I Reaction Mixture for Real-Time PCR Quantification of Gene Expression. *Biotechniques*; 32:790-796.

Kawamoto F., Miyake H., Kaneto O., Kimura M., Dung N.T., Liu Q., Zhou M., Dao L.D., Kawai S., Isomura S., Wataya Y. 1996. Sequence variation in the 18S rRNA gene, a target for PCR-based malaria diagnosis, in *Plasmodium ovale* from Southern Vietnam. *J. Clin. Microbiol.*; 34(9): 2287-2289.

Kawamoto F., Win T.T., Mizuno S., Lin K., Kyaw O., Tantulart I.S., Mason D.P., Kimura M., Wongsrichanalai C. April 2002. Unusual *Plasmodium malariae*-like parasites in Southeast Asia. *J. Parasitology*; 88(2): 350-7.

Kho W.G., Chung J.Y., Sim E.J., Kim M.Y., Kim D.W., Jongwutiwes S., Tanabe K. 2003. A multiplex polymerase chain reaction for a differential diagnosis of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Parasitology international*; 52: 229-236.

Kimura M., Miyake H.; Kim H.S; Tanabe M.; Arai M.; Kawai S.; Yamane A.; Wataya Y. 1995. Species-specific PCR detection of malaria parasites by Microtiter Plate Hybridization: clinical study with malaria patients. *J. Clin. Microbiol.*; 33(9): 2342-2346.

Kimura M., Kaneko O., Liu Q., Zhou M., Kawamoto F., Wataya Y., Otani S., Yamaguchi Y., Tanabe K. 1997. Identification of the four species of human malaria parasites by nested PCR that targets variant sequences in the small subunit rRNA gene. *Parasitology International*; 46:91-95.

Lee S.H., Kara U.A., Koay E., Lee M.A., Lam S., Teo D. Aug. 2002. New strategies for the diagnosis and screening of malaria. *Int. J. Hematol.*; 76 suppl.1: 291-3.

- Lee M.A., Tan C.H., Aw L.T., Tang C.S., Singh M., Lee S.H., Chia H.P., Yap E.P.** Nov.2002. Real time fluorescence-based PCR for detection of malaria parasites. *J.Clin. Microbiol.*; 40(11):4343-5.
- Makler M.T., Hinrichs D.J.** 1993. Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitémie. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*; 48:205-210.
- Martet G., Peyron F.**2000. <http://asmt.louis.free.fr>.
- Mayengue P.I., Rieth H., Khattab A., Issifou S., Kremsner P.G., Klinkert M.Q., Ntoumi F.** Sept. 2004. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections and multiplicity of infection in matched peripheral, placental and umbilical cord blood samples from Gabonese women. *Trop. Med. Int. Health*; 9(9): 949-58.
- Mockenhaupt F.P., Ulmen U., von Gaertner C., Bedu-Addo G., Bienzle U.** Jan. 2002. Diagnosis of placental malaria. *J. Clin. Microbiol.*; 40 (1): 306-308.
- Montenegro L.M.L., Montenegro R.A., Lima A.S., Carvalho A.B., Schindler H.C., Abath F.G.C.** 2004. Development of a single tube hemi-nested PCR for genus- specific detection of *Plasmodium* in oligoparasitemic patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medecine and Hygiene* ;98: 619-625.
- Moody A.** Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. Jan.2002. *Clinical Microbiology reviews*: 66-78.
- Moody A.H., Chiodini P.L.** 2000. Methods for the detection of blood parasites. *Clin.lab.haem.*; 22:189-202.
- Morassin B., Fabre R., Berry A., Magnaval J.F.** 2002. One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *Am. J. Trop.Med. Hyg.*; 66(5):503-508.
- Moreno M., Cano J., Nzambo S., Bobuakasi L., Buatiche J.N., Ondo M., Micha F., Benito A.** 2004. Malaria panel assay versus PCR: detection of naturally infected *Anopheles melas* in a coastal village of Equatorial Guinea. *Malaria journal*; 3: 20-25.
- Morrison C., Gannon F.** 1994. The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochim.Biophys.Acta*; 1219:493-8.
- Mullis KB., Faloona FA.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods enzymol.*; 155:335-50.
- Mc Namara D.T., Thomson J.M., Kasehagen L.J., Zimmerman P.A.** Jun 2004. Development of a multiplex PCR-ligase detection reaction assay for diagnosis of infection by the four parasite species causing malaria in humans. *J. Clin. Microbiol.*; 42 (6): 2403-10.
- Pasteur.** Le paludisme. <http://www.pasteur.fr/actu/presse/documentation/Paludisme.html>
- Perandin F., Manca N., Piccolo G., Calderaro A., Galati L., Medici M.C., Arcangeletti M.C., Dettori G., Chezzi C.** Jan 2003. Identification of *Plasmodium falciparum*, *P.vivax*,

P. ovale and P. malariae and detection of mixed infection in patients with imported malaria in Italy. *New Microbiology*; 26(1):91-100.

Perandin F., Manca N., Calderaro A., Piccolo G., Galati L., Ricci L. Medici M.C., Arcangeletti M.C., Snounou G., Dettori G., Chezzi C. 2004. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* ; 42(3) :1214-9.

Perronne Christian. Maladies infectieuses 2. Collection InterMed. Edition Doin. 2000.

Pieroni P., Dawn Mills C., Ohrt C., Harrington A., Kain K.C. 1998. Comparison of the ParaSight®-F test and the ICT Malaria Pf® test with the polymerase chain reaction for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travellers. *Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene*; 92:166-169.

Piper R., Le Bras J., Wentworth L., Hunt Cooke A., Houze S., Chiodini P., Markler M. 1999. Immunocapture diagnostic assay for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* ; 60 : 109-118.

Poitras E., Houde A. Dec.2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology*.; 2(2):2-11.

Roper C., Elhassan I.M., Hviid L., Giha H., Richardson W., Babiker H., Satti G.M., Theander T.G., Arnot D.E. April 1996. Detection of very low level *Plasmodium falciparum* infections using the nested polymerase chain reaction and reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 54:325-31.

Rubio J.M., Benito A., Roche J., Berzosa P.J., Garcia L., Mico M., Edu M., Alvar J. 1999. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for the detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*;60(2):183-187.

Rubio J.M., Benito A., Berzosa P.J., Roche J., Puente S., Subirats M., Lopez- Vélez R., Garcia L., Alvar J. 1999. Usefulness of Seminested Multiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *J. Clin. Microbiol.*;37(10): 3260-3264.

Ruebusch II T.K, Zegarra J., Cairo J., Andersen E.M., Green M., Pillai D.R., Marquino W., Huilca M., Arevalo E., Garcia C., Solary L., Kain K.C. 2003. Chloroquine – resistant *Plasmodium vivax* malaria in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*;69 (5): 548-552.

Saïssy J.M. Paludisme grave. Edition Arnette.2001.

Schindler H.C., Montenegro L., Montenegro R., Carvalho A.B., Abath F.G.C., Jaureguiberry G. 2001. Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 65(4): 355-361.

Schoone G.J., Oskam L., Kroon N.C.M., Schallig H.D.F.H, Omar S.A. 2000. Detection and quantification of *Plasmodium falciparum* in blood samples using quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *J.Clin. Microbiol.*; 38(11): 4072-5.

Scopel K.K.G., Fontes C.J.F., Nunes A.C., Horta M.F., Braga E.M. 2004. High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacàs-Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Tropica*; 90:61-64.

Scopel K.K.G., Fontes C.J.F., Nunes A.C., Horta M.F., Braga E.M. 2004. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears: an epidemiological retrospective study among subjects with low parasitemia in an endemic area of the Brazilian Amazon region. *Malaria journal*; 3:8-13.

Singh B., Sung L.K., Matusop A., et al. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*; 363: 932-37.

Snounou G., Viriyakosol S., Jarra W., Thaithong S., Brown K.N. April 1993(a). Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Molecular and biochemical Parasitology*; 58(2):283-292.

Snounou G., Viriyakosol S., Zhu X.P., et al. 1993b. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and biochemical Parasitology*; 61:315-320.

Snounou G. 1996. Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification. *Methods Mol. Biol.* ; 50 : 263-91.

SPILF. 12ème conférence de consensus thérapeutique anti-infectieuse de la société française de pathologie infectieuse de langue française (SPILF). 14 avril 1999.
<http://www.infectiologie.com/public/documents/consensus/palu-99.html>

Tham J.M., Hee Lee S., Tan T.M.C., Ting R.C.Y., Kara U.A.K. May 1999. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: comparison with microscopy and with ParaSight-F and ICT Malaria Pf Tests in a clinical environment. *J.Clin.Microbiol.*; 37(5):1269-1273.

Tirasophon W., Rajkulchai P., Ponglikitmonkol M., Wilairat P., Boonsaeng V., Panyim S. 1994. A highly sensitive, rapid, and simple polymerase chain reaction – based method to detect human malaria (*Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*) in blood samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 51(3): 308-13.

Tse C., Capeau J. 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann. Biol. Clin.* ; 61 :279-93.

Waters A.P., Mc Cutchan T.F. 1989. Rapid, sensitive diagnosis of malaria based on ribosomal RNA. *Lancet*;1(8651): 1343-6.

Wéry. Protozoologie médicale. Edition De Boeck université 1995.

Whiley D.M., LeCronc G.M., Baddeley A., Savill J., Syrmis M.W., Mackay I.M, Siebert D.J., Burns D., Nissen M., Sloots T.P. 2004. Detection and differentiation of *Plasmodium* species by polymerase chain reaction and colorimetric detection in blood

samples of patients with suspected malaria. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease*; 49: 25-29.

Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*; 22:130-8.

Zakeri S., Najafabadi S.T.; Zare A.; Djadid N.D. 2002. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: Evidence of highly mixed infections in Chahbahar district. *Malaria journal*; 1:2.

Zalis M.G., Ferreira-da-Cruz M.F., Balthazar-Guedes H.C., Banic D.M., Alecrim W., Souza J.M., Druilhe P., Daniel-Ribiero C.T. 1996. Malaria diagnosis: standardization of a polymerase chain reaction for the detection of *Plasmodium falciparum* parasites in individuals with low- grade parasitemia. *Parasitology Research*; 82:612-6.

Zhong K.J.Y.; Kain K.C. 1999. Evaluation of a colorimetric PCR-based assay to diagnose *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. *J.Clin Microbiol.*; 37(2): 339-341.

Vu, Le Président du Jury

Vu, Le Directeur de Thèse

Vu, Le Directeur de l'U.E.R.

Nom et prénoms : BRASSART Eve-Alexa, Emilie.

Titre de la thèse :

**Application de la PCR en temps réel dans le diagnostic des 4 espèces plasmodiales au laboratoire de Parasitologie de Nantes.
Etude rétrospective de 2002 à 2004.**

Résumé de la thèse:

Le diagnostic de paludisme est une urgence diagnostique et thérapeutique. Afin d'améliorer les inconvénients du diagnostic microscopique pour les 4 espèces plasmodiales humaines (*Plasmodium falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale*, *P.malariae*), nous avons mis au point une PCR en temps réel simplex spécifique de chaque espèce, et une PCR multiplex sur Rotor Gene (Corbett Research) utilisant un agent intercalant fluorescent, le SYBR®Green.

Nous avons ensuite effectué une enquête rétrospective sur 122 cas de paludisme diagnostiqués entre 2002 et 2004 par la technique microscopique sur frottis et goutte épaisse.

Les discordances entre la PCR et la microscopie ont permis de mettre en évidence le rôle primordial de la biologie moléculaire pour le diagnostic de paludisme en complément des techniques classiques notamment pour les bi parasitismes, la différenciation des espèces du complexe *vivax/ovale*, les pauci infestations, les *Plasmodium* à morphologie déformée, ou pour infirmer de façon catégorique un diagnostic de paludisme vis à vis du clinicien.

Ainsi, nous avons pu proposer un arbre décisionnel à appliquer au sein du laboratoire de Parasitologie du CHU de Nantes afin de déterminer la place de la PCR dans la démarche diagnostique de la recherche de *Plasmodium*.

MOTS CLES :

**PCR TEMPS REEL/ PLASMODIUM/ DIAGNOSTIC D'ESPECE/
SYBR®GREEN/ PCR MULTIPLEX/ ETUDE RETROSPECTIVE**

JURY :

PRESIDENT : Monsieur le Professeur P. LE PAPE	Faculté de Nantes
ASSESEURS : Monsieur le Docteur M. MIEGEVILLE	Faculté de Nantes
Monsieur le Professeur F. RAFFI	Faculté de Nantes
Monsieur le Professeur D. CHABASSE	Faculté d'Angers

Adresse de l'auteur : BRASSART Eve-Alexa
6 cours Sully, Résidence Le Magellan, Bâtiment 3
44000 NANTES