

TABLE DES MATIERES

<u>Liste des Tableaux</u>	5
<u>Liste des Figures</u>	5
<u>Introduction</u>	6
<u>PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</u>	8
<u>1. Epidémiologie du paludisme</u>	8
<u>1.1. Agents pathogènes</u>	8
<u>1.1.1. Morphologie générale</u>	8
<u>1.1.2. Cycle évolutif du parasite</u>	8
<u>1.2. Vecteur</u>	10
<u>1.3. Répartition géographique</u>	11
<u>1.4. Modalités épidémiologiques</u>	12
<u>1.4.1. Classification de l'endémie palustre</u>	12
<u>1.4.2. Faciès épidémiologiques</u>	13
<u>2. Aspects cliniques du paludisme</u>	15
<u>2.1. Accès palustre</u>	15
<u>2.2. Formes graves du paludisme à <i>P. falciparum</i></u>	16
<u>2.3. Paludisme viscéral évolutif</u>	17
<u>2.4. Fièvre bilieuse hémoglobinurique</u>	17
<u>3. Diagnostic biologique</u>	18
<u>3.1. Diagnostic parasitologique</u>	18
<u>3.2. Diagnostic immunochromatographique</u>	18
<u>3.3. Diagnostic moléculaire</u>	18
<u>3.3.1. Polymerase chain reaction (PCR)</u>	18
<u>3.3.2. Loop mediated isothermal amplification (LAMP)</u>	19
<u>DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL</u>	20
<u>1. Méthodologie</u>	20
<u>1.1. Sites d'étude</u>	20
<u>1.2. Type d'étude et période</u>	21
<u>1.3. Considérations éthiques</u>	21
<u>1.4. Populations d'étude</u>	21
<u>1.4.1. Critères d'inclusion des patients</u>	21
<u>1.4.2. Critères de non inclusion</u>	22
<u>1.4.3. Recrutement des patients</u>	22
<u>1.5. Prélèvement des échantillons</u>	22
<u>1.6. Techniques de diagnostic biologique</u>	22
<u>1.6.1. Microscopie</u>	22
<u>1.6.2. <i>Illumigene</i> Malaria</u>	23
<u>1.7. Analyse des données</u>	27
<u>2. Résultats</u>	27
<u>2.1. Microscopie</u>	28
<u>2.2. <i>Illumigene</i> Malaria</u>	28
<u>2.3. Concordances et discordances</u>	30
<u>3. Discussion</u>	30
<u>Conclusion</u>	35

Liste des Tableaux

Tableau I: Résultats de la microscopie et de <i>illumigene</i> Malaria	28
Tableau II: Comparaison entre <i>illumigene</i> S-PREP et microscopie	28
Tableau III: Caractéristiques de la microscopie par comparaison à <i>illumigene</i> S-PREP.....	29
Tableau IV: Comparaison entre <i>illumigene</i> M-PREP et microscopie	29
Tableau V: Caractéristiques de la microscopie par comparaison à <i>illumigene</i> M-PREP	29
Tableau VI: Niveau de concordance entre les différentes techniques	30
Tableau VII: Profils de discordance entre les différentes méthodes.....	30
Tableau VIII: Sensibilité et spécificité de la LAMP au cours de différentes études	34

Liste des Figures

Figure 1: Cycle évolutif des <i>Plasmodium</i>	10
Figure 2: Distribution épidémiologique du paludisme en 2015 dans le monde	12
Figure 3: Faciès épidémiologique du paludisme à <i>P. falciparum</i> en Afrique	15
Figure 4: Principe de la méthode <i>illumigene</i> Malaria	24
Figure 5: Protocole <i>illumigene</i> S-PREP	25
Figure 6: Protocole <i>illumigene</i> M-PREP	26

Introduction

L'endémie palustre représente un problème majeur de santé publique mondiale et constitue une entrave au développement économique des pays pauvres [57].

Globalement, environ 3,2 milliards de personnes sont à risque de contracter le paludisme dont 1,2 milliards sont à risque encore plus élevé. Selon les dernières estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS), 214 millions de cas ont été recensés en 2015 dont 438 000 décès. L'Afrique subsaharienne supporte une part disproportionnée de la charge mondiale où 89% de tous les cas de paludisme et 91 % des cas de décès surviennent ; il en est de même des enfants de moins de 5 ans qui enregistrent 78 % des cas de décès [56].

Ces dernières années, des mesures intensives ont été déployées dans la lutte contre le paludisme, telles que les outils de diagnostic rapide, de traitement et de prévention. C'est ainsi que selon l'Organisation mondiale de la sante (OMS), on a noté une diminution de 37 % de l'incidence palustre et une diminution de 60 % de la mortalité liée à cette maladie entre 2000 et 2015 dans le monde [56]. Cela signifie que chaque année de moins en moins de personnes deviennent infectées.

Au Sénégal, dans le cadre stratégique 2015-2025 du programme national de lutte contre le paludisme (PNLP), l'objectif premier est l'atteinte d'un seuil épidémiologique de pré-élimination du paludisme. Certaines zones du pays comme Saint-Louis, avec une prévalence parasitaire de moins de 1%, est l'une des régions les plus proches de l'atteinte de cet objectif [41].

Dans cet élan de diminution de la prévalence de l'endémie palustre, le défi est de pouvoir diagnostiquer les infections et portages asymptomatiques chez les porteurs de très faibles parasitémiés qui peuvent passer inaperçus à la microscopie. En effet, ces derniers peuvent constituer des réservoirs du parasite [29] et assurer la pérennité de la transmission [2, 18]. Par ailleurs, des contrôles de qualité effectués par l'OMS ont montré qu'à des densités parasitaires faibles, seulement 76% et 42% des tests de diagnostic rapide (TDR) disponibles pouvaient détecter respectivement *P. falciparum* et *P. vivax* [57]. Dans ce contexte, il ressort tout l'intérêt de la biologie moléculaire qui présente comme avantage son extrême sensibilité. Parmi les outils de biologie moléculaire, la PCR (Polymerase Chain Reaction) est la plus largement utilisée. Cependant, la PCR exige une certaine technicité comme la disposition d'un thermocycleur et ne convient donc pas comme technique de routine susceptible d'être déployée facilement sur le

terrain [52]. C'est ainsi qu'une technique d'amplification d'ADN en condition isothermale, ne nécessitant pas un appareillage spécial, a été proposée comme alternative à la PCR [5]. C'est dans ce contexte que l'Université Cheikh Anta Diop à travers le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec en collaboration avec le *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) d'Atlanta (USA) et la compagnie Meridian Biosciences ont pu mettre au point et valider *illumigene* Malaria appliquée au diagnostic et au suivi du paludisme. Nous nous sommes fixés comme objectif de déterminer les infections palustres sub-microscopiques en zone hypoendémique en utilisant *illumigene* Malaria comme méthode de référence. Nos objectifs spécifiques étaient de 1) déterminer la sensibilité de la méthode *illumigene* Malaria et déterminer la spécificité comparativement à la microscopie, 2) déterminer l'efficacité du test *illumigene* Malaria. Notre travail est structuré en deux parties : dans une première partie, nous faisons un rappel bibliographique sur le paludisme et dans une deuxième partie nous présentons notre travail expérimental.

PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1. Epidémiologie du paludisme

1.1. Agents pathogènes

Quatre espèces plasmodiales sont couramment reconnues pathogènes chez l'homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*, auxquelles s'ajoute désormais *P. knowlesi*, espèce zoonotique du singe responsable d'un nombre important d'infections humaines en Asie du Sud-Est [9, 55], c'est l'espèce *P. falciparum* est, à la fois, la plus fréquemment rencontrée (90% des cas en Afrique, 50% en Asie et en Amérique) et responsable de la forme grave du paludisme. Le vecteur responsable de la transmission est la femelle d'un moustique, l'anophèle.

1.1.1. Morphologie générale

Les parasites prennent des formes différentes selon leur stade du cycle évolutif. Les sporozoïtes sont les formes infestantes dans l'hépatocyte tandis que les mérozoïtes sont les formes libres infestantes dans les globules rouges. Les trophozoïtes et schizontes sanguins constituent les formes intracellulaires du parasite et c'est habituellement à ce stade que le diagnostic biologique du paludisme est posé. L'ookinète est un œuf mobile retrouvé chez le vecteur [53].

1.1.2. Cycle évolutif du parasite

Le cycle du développement du parasite se déroule successivement chez deux hôtes : un hôte vertébré (l'homme) et un hôte invertébré (le moustique vecteur) (Fig. 1).

- **Chez l'homme**

Phase exo- érythrocytaire ou hépatique

Lors de la piqûre, les sporozoïtes de *Plasmodium* contenus dans les glandes salivaires du moustique sont injectés dans le derme puis gagnent la circulation sanguine. En quelques minutes, ces sporozoïtes atteignent le foie. Il s'y produit une première reproduction asexuée dans les hépatocytes (schizogonie pré-érythrocytaire), qui libère des dizaines de milliers de mérozoïtes dans le sang. Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, certains sporozoïtes intra-hépatiques restent quiescent (hypnozoïtes) et sont responsables d'une schizogonie hépatique retardée, qui entraîne la libération dans le sang de mérozoïtes plusieurs mois après la piqûre du moustique, expliquant ainsi les reviviscences tardives observées avec ces deux espèces.

[3, 29].

Phase érythrocytaire

Le cycle du parasite devient ensuite érythrocytaire, avec envahissement des hématies par les mérozoïtes, qui se transforment en trophozoïtes. Puis à l'occasion de leur évolution en schizontes, une nouvelle reproduction asexuée a lieu, aboutissant à l'éclatement des hématies parasitées et à la libération de nouveaux mérozoïtes aptes à parasiter de nouveaux globules rouges (schizogonie érythrocytaire).

Chez *P. falciparum*, un cycle érythrocytaire dure environ 2 jours, et la répétition des cycles aboutit à l'augmentation du nombre de globules rouges parasités et à l'apparition de signes cliniques.

Après plusieurs cycles, certains trophozoïtes vont évoluer en gamétocytes mâles et femelles qui ne pourront continuer leur développement que chez le moustique.

- **Chez le vecteur**

A l'occasion d'une piqûre chez un sujet parasité, l'anophèle ingère les différentes formes du parasite. Les gamétocytes se transforment en gamètes mâles et femelles qui se fécondent dans l'estomac du moustique. Cette reproduction sexuée donne alors naissance à un zygote. Le zygote évolue ensuite rapidement en ookinète qui traverse l'estomac de l'anophèle pour gagner l'hémolymph et s'y transformer en oocyste.

Ce dernier produit alors une très grande quantité de sporozoïtes qui migrent vers les glandes salivaires, à partir desquelles ils sont prêts à être injectés à l'homme à l'occasion d'une nouvelle piqûre.

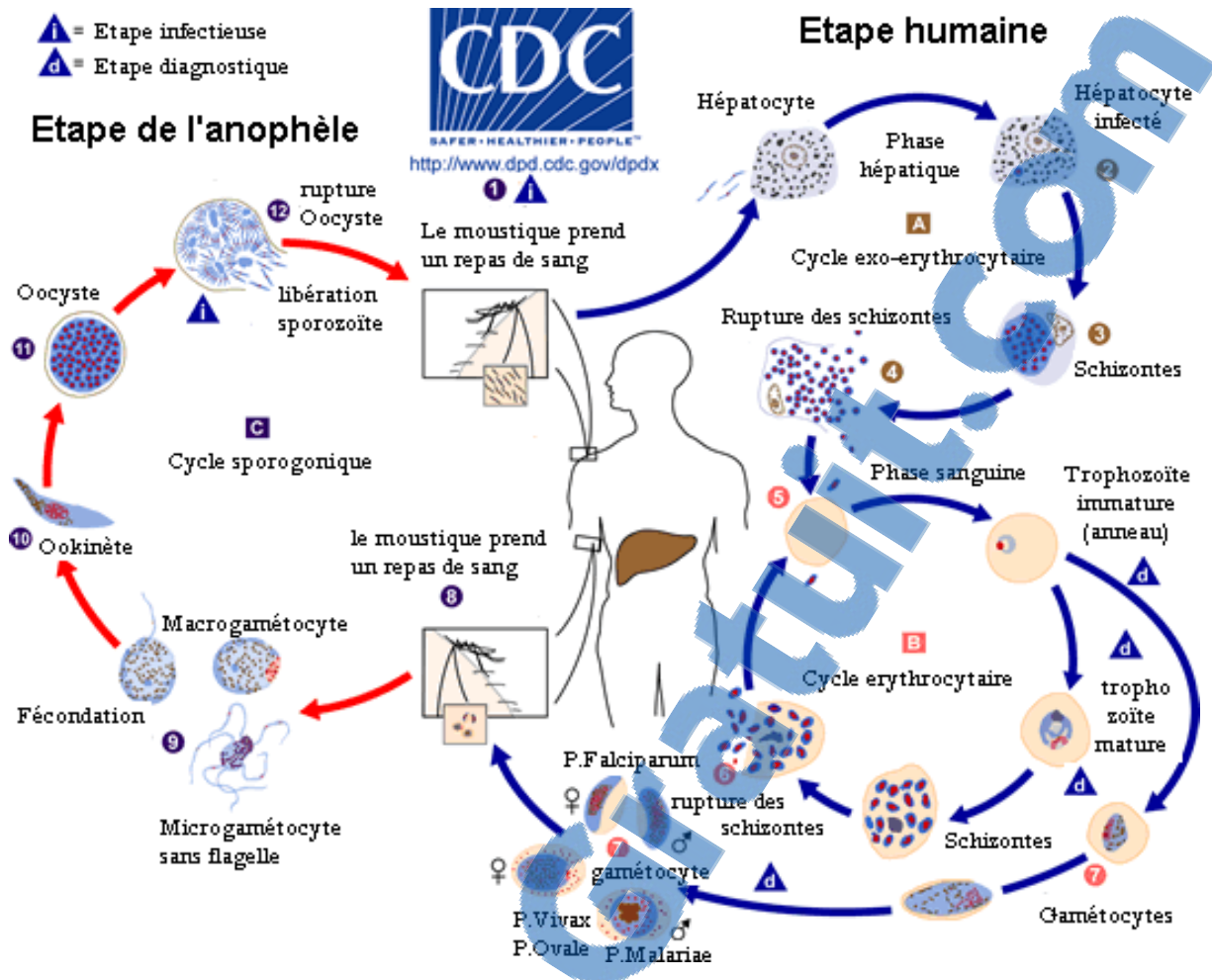


Figure 1: Cycle évolutif des *Plasmodium*

Modalités de transmission

La connaissance du cycle du paludisme permet de comprendre les modalités de transmission de la maladie. Le paludisme est transmis par la piqûre d'un moustique, l'anophèle femelle.

La phase sanguine du cycle rend possible d'autres modes de contamination : transmission congénitale, transfusionnelle. En pratique ces transmissions sont tout à fait exceptionnelles et n'influencent pas l'épidémiologie.

1.2. Vecteur

L'anophèle femelle infestée est le vecteur du paludisme. Parmi les 456 espèces d'anophèles recensées dans le monde, 60 sont reconnues aptes à la transmission du paludisme humain, et *A. gambiae sensu stricto*, *A. funestus* et *A. arabiensis* sont les vecteurs les plus importants en

Afrique Sub- saharienne. Seules les femelles anophèles sont hématophages et piquent l'homme pour assurer la maturation de leurs œufs.

Après 2 jours de digestion (cycle gonotrophique), les œufs sont pondus dans un gîte larvaire d'eau douce de préférence calme, claire, non polluée et d'une température supérieure à 18°C.

De chaque œuf sort une larve qui, après 4 stades larvaires, donne une nymphe d'où émerge un moustique adulte (imago). Le développement dure entre 8 jours (à 31°C) et 20 jours (à 20°C). Les femelles sont ensuite fécondées puis se mettent en quête d'un premier repas sanguin qui survient en général entre le 3ème et le 6ème jour après l'émergence. Leur périmètre d'action est de quelques centaines de mètres seulement. Elles sont plus ou moins endophiles ou exophiles (tropisme ou non pour l'intérieur des habitations humaines), anthropophiles ou zoophiles (certaines se nourrissant surtout sur l'homme, le chien ou le bœuf, d'autres n'ayant pas de préférence marquée), selon les espèces et les régions. Elles piquent principalement entre le coucher et le lever du soleil, et les pics d'agressivité varient également selon les espèces et les régions. Alternant pontes et repas sanguins, leur durée de vie varie de 3 à 12 semaines selon les conditions climatiques. Lorsque celles-ci se font trop dures (absence de gîte, baisse de l'hygrométrie ou de la température), certaines femelles peuvent attendre plusieurs mois le retour de conditions favorables à la ponte [3, 29].

1.3.Répartition géographique

Le paludisme est essentiellement retrouvé dans les zones intertropicales, sur toute l'étendue de l'Afrique Subsaharienne et à une moindre extension l'Afrique australe, l'Asie du Sud-est, les îles du Pacifique, l'Inde et l'Amérique centrale et du Sud (Fig. 2).

P. falciparum est l'espèce prédominante dans les pays endémiques à l'exception de l'Inde et de l'Amérique du Sud où *P. vivax* est plus fréquent. *P. ovale* est essentiellement retrouvé en Afrique de l'Ouest [23].

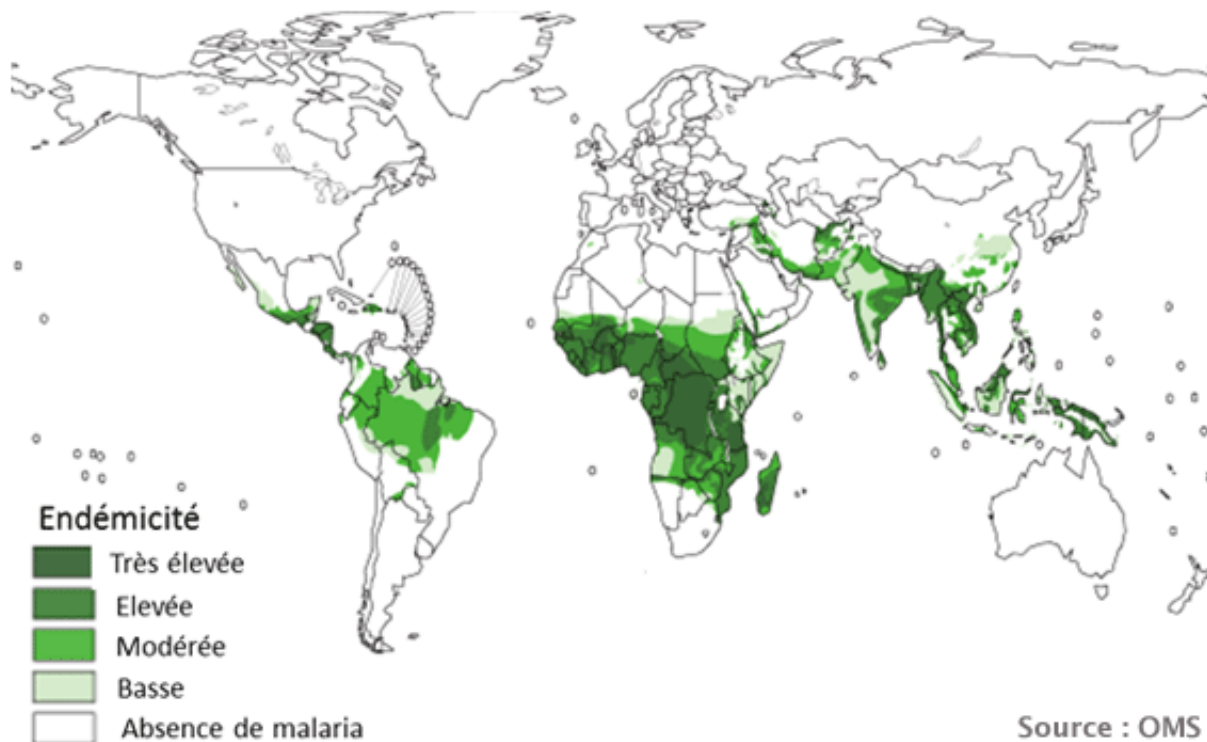


Figure 2: Distribution épidémiologique du paludisme en 2015 dans le monde [56]

1.4.Modalités épidémiologiques

Classification de l'endémie palustre

L'endémie palustre est estimée par la prévalence, qui correspond à la proportion de sujets porteurs de *Plasmodium* dans un site donné, à une date donnée, et dans une classe d'âge donnée. Cette prévalence a longtemps été mesurée par l'indice splénique (IS), c'est-à-dire le pourcentage d'individus d'une même classe d'âge, classiquement les enfants de 2 à 10 ans, présentant une splénomégalie palpable. Cette mesure étant subjective et peu spécifique, on utilise actuellement l'indice parasitologique (IP), c'est à dire le pourcentage d'individus d'une même classe d'âge, habituellement les enfants de 2 à 10 ans, présentant une parasitémie positive. La mesure dépend de la méthode d'examen utilisée (goutte épaisse, frottis mince, QBC Malaria Test®, biologie moléculaire (PCR)...), et la microscopie reste la méthode de référence au niveau des structures sanitaires.

Une classification des zones d'endémie basée sur l'IP chez les enfants de 2 à 9 ans a été proposée dans les années 50 par Metselaar et Van Thiel [25], définissant les zones holoendémiques (IP toujours > 75% chez les enfants de 1 an, avec forte mortalité infantile et diminution de la densité parasitaire avec l'âge), les zones hyperendémiques (IP toujours > 50%), les zones méso-endémiques (IP de 11% à 50%), et les zones hypoendémiques et épidémiques (IP < 10% mais

pouvant augmenter à certaines saisons et lors des épidémies) (Fig. 2). Cette classification présente cependant un intérêt limité puisque, basée sur la seule prévalence, elle ne prend en compte ni le développement de la prémunition avec l'âge, qui s'accompagne d'une réduction du pourcentage des porteurs de parasites et des malades, ni la composante vectorielle et la transmission [29].

Faciès épidémiologiques

Les lacunes des classifications épidémiologiques ne prenant pas en compte à la fois transmission et endémicité ont conduit Carnevale *et al.* à proposer en 1984 le concept de faciès épidémiologique [7], défini comme un ensemble de lieux dans lesquels le paludisme présente les mêmes caractéristiques, de transmission et de stabilité, d'endémicité et de prévalence parasitaire, de développement de l'immunité et d'incidence clinique. Il traduit ainsi la diversité de la dynamique des relations milieu/vecteur/parasite/maladie [29]. On distingue schématiquement trois zones de stabilité comprenant chacune différents faciès épidémiologiques.

[3, 29] :

- **Les zones à paludisme stable** (équatorial et tropical en Afrique, Fig. 3), où la transmission est forte (plus de 50 piqûres infectantes/personne/an, et parfois jusqu'à 1000) pendant une longue période de l'année. Deux grands faciès sont décrits : le faciès équatorial (forêts et savanes post forestières d'Afrique centrale) et le faciès tropical (savane humide d'Afrique de l'Ouest et de l'Est).
Dans ces zones, la transmission entraîne un paludisme hyperendémique (IP 51-75), voire holoendémique (IP>75%). La prémunition est acquise tôt dans l'enfance. On observe ainsi des formes sévères chez les nourrissons et les enfants, et une fréquence importante de parasitémiées asymptomatiques chez les sujets plus âgés. Les faciès équatorial et tropical représentent la strate I de l'OMS.
- **Les zones de stabilité intermédiaire** (sahélien en Afrique, Fig. 3), où la transmission (entre 2 et 50 pi/pers/an) (OMS, strate II) est à recrudescence saisonnière courte (< 6 mois par an). Le paludisme y est mésoendémique (IP 11-50%). La prémunition est lente à s'établir et la tolérance reste bonne chez les adultes.
- **Les zones à paludisme instable** (sahélo-saharien, désertique et montagnard en Afrique, Fig. 3), où la transmission, de faible niveau et de brève durée (voire absente certaines années) car limitée par une saison des pluies courte et/ou une température peu favorable, subit de façon importante les variations climatiques. Elle entraîne un paludisme

hypoendémique ($IP \leq 10$). La prémunition faible voire nulle. Trois principaux faciès sont décrits : le faciès limitrophe du désert (OMS, strate III), le faciès austral (plateaux du sud de l'Afrique) et le faciès montagnard (zones entre 1 000 et 1 500 mètres d'altitude) (OMS, strate IV).

- **Situations particulières** : Dans chacune des trois zones de stabilité, au sein des différents faciès décrits, on peut observer des écosystèmes particuliers créant de véritables enclaves épidémiologiques. Par exemple, zones lagunaires côtières avec eau saumâtre, zones de riziculture, barrages avec agriculture irriguée, présence d'un fleuve ; il y a en général une augmentation de la transmission anophélienne par rapport à la transmission pré existante. L'homme, par ses actions peut être responsable de ces modifications locales ; c'est le cas des programmes de développement avec en particulier l'agriculture irriguée, que ces programmes soient permanents (OMS, strate VIII) ou temporaires : (OMS, strate IX) Les déplacements de l'homme peuvent avoir un impact important sur le risque d'infection paludéenne. C'est par exemple le cas des « nomades » pouvant séjourner pendant de courtes périodes en zone impaludée (OMS, strate VI), celui des « réfugiés ou déplacés » (OMS, strate XI) ou celui des « visiteurs non immuns » (OMS, strate X).
- Le paludisme urbain : En Afrique, le paludisme est une endémie essentiellement rurale de par les conditions nécessaires au développement des gîtes larvaires anophéliens. En milieu urbain, la transmission est globalement beaucoup plus faible qu'en milieu rural. On assiste depuis quelques années à une urbanisation accélérée en Afrique subsaharienne. De plus en plus de sujets naissent, vivent en permanence dans les villes où la transmission anophélienne est faible voire nulle : ils n'acquerront donc pas d'immunité de prémunition. Ils s'infecteront essentiellement à l'occasion de brefs séjours en zone rurale (véritable paludisme d'importation) ou à l'occasion de déplacements en zone périurbaine et pourront développer, quel que soit l'âge, des formes graves de paludisme et en particulier des neuropaludismes (OMS, strate VII).

Au Sénégal, trois zones à niveau d'endémicité différent sont identifiées [41] :

- Les zones nord, d'endémicité faible (incidence $< 5\%$ habitants) où les objectifs visent une consolidation des acquis en vue d'atteindre la pré élimination.
- Les zones sud du pays où l'endémicité est plus importante (incidence $> 15\%$ habitants), l'intensification de la mise à l'échelle des interventions permettra d'assurer rapidement le contrôle de la maladie et la mise de cette partie sur le chemin de la pré élimination.

- La zone centre ouest d'incidence intermédiaire, où on retrouve l'essentiel du paludisme urbain.



Figure 3: Faciès épidémiologique du paludisme à *P. falciparum* en Afrique [7]

2. Aspects cliniques du paludisme

2.1. Accès palustre

Les manifestations cliniques sont diverses dans leur expression et dans leur gravité et dépendent à la fois du parasite (espèce plasmodiale, densité parasitaire) et de son hôte.

À une incubation variant de 9 à 20 jours en général, succède alors une phase d'invasion, où la fièvre a un rythme irrégulier, mais est progressivement croissante : la parasitémie va elle aussi en augmentant. Des cycles schizogoniques différents se chevauchent et l'on observe donc pour *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* différents stades : trophozoïtes jeunes ou âgés, schizontes jeunes ou âgés simultanément.

Après une dizaine de jours apparaissent alors les accès palustres typiques : fièvre tierce pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* : accès fébrile le premier jour, température normale le deuxième jour, nouvel accès fébrile le troisième jour.

Dans la fièvre quarte due à *P. malariae* la température normale dure deux jours.

L'accès palustre comprend un bref stade de frissons avec sensation de froid, où la température atteint 39 °C. Il est suivi d'un stade de chaleur, de quelques heures avec une température de 40 °C à 41 °C. Enfin un stade de sueurs, de même durée pendant lequel la température redevient normale ou en dessous.

Ces accès correspondent à la durée du cycle schizogonique qui est de quarante huit heures (72 heures pour *P. malariae*). L'accès fébrile correspond à l'éclatement des rosaces, avec présence surtout dans le sang de trophozoïtes jeunes, dont le diagnostic d'espèce est difficile. Ceux-ci pendant l'intervalle entre deux accès, évoluent progressivement en trophozoïtes âgés, schizontes jeunes à 2-4 noyaux, schizontes mûrs ou corps en rosace. Les gamétocytes apparaissent en général après la période d'invasion [32, 53].

2.2. Formes graves du paludisme à *P. falciparum*

Le paludisme à *P. falciparum* du sujet non immun (jeune enfant en zone d'endémie, femme enceinte, voyageur) est potentiellement mortel.

L'accès pernicieux ou neuropaludisme ou paludisme cérébral regroupe toutes les manifestations neurologiques qui ont pour conséquence l'atteinte cérébrale au cours de l'accès palustre : troubles de la conscience, prostration et convulsions.

Le début est soit progressif ou brutal. La phase d'état associe fièvre – troubles neurologiques (coma stade II et/ou convulsions, troubles toniques, signes méningés). L'abolition des réflexes

est considérée comme de mauvais pronostic. L'évolution dépend de la rapidité et de la qualité du traitement. Le taux de létalité reste élevé 10 à 30% [32].

2.3.Paludisme viscéral évolutif

Il s'agit d'une manifestation chronique atteignant préférentiellement l'enfant vivant en zone d'endémie ou l'adulte non prémuni, soumis à des inoculations parasitaires répétées. Cliniquement le tableau associe : une anémie importante (avec pâleur, dyspnée, asthénie, souffle anorganique et oedèmes), une splénomégalie importante, une fébricule autour de 38° avec parfois des poussées thermiques plus importantes et, chez l'enfant, un retard staturo- pondéral. Le parasite est retrouvé dans le sang périphérique du malade (mais la parasitémie peut être très faible et le diagnostic difficile) [32].

2.4.Fièvre bilieuse hémoglobinurique

C'est un syndrome d'hémolyse intra-vasculaire accompagnée d'hémoglobinémie et d'hémoglobinurie survenant occasionnellement dans des cas de paludisme aigu à *P. falciparum* à répétition. Ce syndrome survient chez les sujets prenant irrégulièrement une chimioprophylaxie et / ou des traitements par la quinine. La symptomatologie associe : un début brutal avec lombalgie, pâleur, fièvre avec ictère, oligurie [32].

3. Diagnostic biologique

3.1.Diagnostic parasitologique

L'examen microscopique de la goutte épaisse et du frottis mince a toujours été la méthode de référence dans le diagnostic du paludisme. Il repose sur la mise en évidence du parasite dans le sang en utilisant 2 techniques qui doivent toujours être associées : le frottis mince et la goutte épaisse. Après confection sur une même lame, celle-ci est séchée à l'air libre, le frottis mince est fixé au méthanol tandis que la goutte épaisse est déshémoglobinisée par l'eau. La lame est colorée ensuite au Giemsa et examinée immédiatement au microscope optique. C'est une méthode moins cher, rapide d'exécution et relativement sensible permettant de détecter entre 10 et 50 parasites par microlitre (respectivement pour la goutte épaisse et le frottis mince) [26]. La microscopie permet de faire l'identification des espèces et de déterminer la densité parasitaire. Toutefois, la lecture des lames nécessite un microscopiste expérimenté surtout dans les cas de densités parasitaires faibles ou dans certains cas des risques de confusion des espèces [43].

3.2.Diagnostic immunochromatographique

D'autres méthodes de diagnostic sont utilisées basées sur les méthodes immunologiques, les tests de diagnostic rapides (TDR). Ces tests mettent en évidence des antigènes ou des enzymes du parasite, présents dans le sang. On met en migration un prélèvement de sang sur une membrane ; les antigènes sont capturés par des anticorps monoclonaux fixés sur la membrane et la révélation se fait par de nouveaux anticorps monoclonaux couplés à une particule colorée révélatrice. Les TDR ont été développés dans le but d'augmenter la sensibilité et la rapidité du rendu de résultat [36].

3.3.Diagnostic moléculaire

3.3.1. Polymerase chain reaction (PCR)

Cette technique consiste en l'amplification d'un segment de l'ADN par une réaction enzymatique répétée : PCR ou réaction de polymérisation en chaîne. C'est la méthode la plus sensible (pouvant détecter moins de 5 parasites par microlitre) et la plus spécifique. Avec la PCR nichée ou la PCR semi-nichée ciblant le gène de la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal, on peut détecter toutes les quatre espèces plasmodiales. La PCR présente en outre une meilleure sensibilité pour la détection des infections mixtes [44, 48]. Toutefois, ces PCR dites conventionnelles sont techniquement difficiles à mettre en œuvre et nécessitent un temps d'exécution long. En outre, elles sont souvent sujettes à des contaminations du produit de l'amplification [27]. Par contre, les méthodes de PCR en temps réel, de développement récent,

utilisent un fluorochrome qui permet de suivre la formation des amplicons au cours de la réaction. Les avantages de ces techniques sont : la possibilité de quantification du pathogène, la diminution du risque de contamination et la disponibilité des résultats dans les 3 heures (y compris la préparation de l'échantillon). Quelques études ont établi l'application de cette technique en parasitologie [1, 4, 12, 20, 35, 42].

3.3.2. Loop mediated isothermal amplification (LAMP)

La LAMP est une technique de détection des acides nucléiques qui présente un véritable intérêt dans le diagnostic du paludisme et plus particulièrement dans un cadre qui a pour objectif l'élimination du paludisme. La LAMP diffère de la PCR en plusieurs points. Premièrement, c'est un processus isothermal d'amplification reposant sur la polymérase de *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*). Elle ne nécessite pas de changement cyclique de la température [28] contrairement à la PCR ; cela facilite l'adaptation sur le champ d'étude. Deuxièmement, une réaction positive à la LAMP se traduit par la formation d'un précipité de pyrophosphate de magnésium qui peut être détecté visuellement, par turbidimétrie [28] ou en utilisant un indicateur à base d'ion métallique telle que la calcéine [50], le bleu d'hydroxynaphtol [13] et le pico-green [54].

Depuis sa première description en 2001 [28], de nombreuses recherches ont été effectuées dans le sens d'adapter la LAMP dans le diagnostic du paludisme. La LAMP a été utilisée pour la détection de *P. falciparum* utilisant de l'ADN extrait de façon grossière à partir de sang total [39], ou utilisant une méthode rapide par ébullition et centrifugation [38].

Par la suite, la LAMP a été utilisée pour identifier toutes les espèces de *Plasmodium* [14] y compris *P. knowlesi* [17, 19] et les amorces de LAMP ont été améliorées pour augmenter la sensibilité de sorte que *P. falciparum* [37, 38] et *P. vivax* [21, 34] puissent être détectés. Des kits commerciaux Loopamp ont été validés pour la détection de *P. falciparum* [15], y compris les faibles densités parasitaires [8] et pour la détection indirecte de *P. vivax* utilisant une combinaison d'amorces pan-genres et spécifiques de *P. falciparum* [51]. Toutefois, un haut débit de traitement ferait de la technique LAMP une méthode largement applicable [16] dans le but d'une élimination du paludisme. Quoique pour la plupart des plateformes LAMP, le temps de traitement soit rapide (60-90 min), le haut débit est toujours restreint par la nature de la plateforme utilisée. Par exemple, le kit Loopamp utilisé en turbidimétrie (Eiken Chemical Co) a une capacité de traitement de seulement de 16 échantillons alors que le kit utilisé en bloc

chauffant et ultraviolet en a une capacité de 46 échantillons [8].

En outre, la LAMP pourrait jouer un rôle important dans la détection des cas asymptomatiques dans les régions qui sont proches de l'objectif de pré-élimination. Sur cette même lancée, une technique de Reverse transcriptase-LAMP (RT-LAMP) a été développée pour la détection de gamétocytes dans le sang périphérique ; cette RT-LAMP présente une meilleure sensibilité mais une spécificité identique à celle de la RT-PCR et avec comme avantage le raccourcissement du temps de manipulation [6].

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL

1. Méthodologie

1.1.Sites d'étude

Le recrutement des patients a été effectué sur deux sites de Dakar : le poste de santé « Deggo » de Pikine et l'hôpital Youssou Mbargane Diop de Rufisque.

Pikine est un département situé dans la banlieue de Dakar. Cette ville abrite plus de la moitié de la population de l'agglomération dakaroise. Cette population est majoritairement jeune et la ville fait face à de nombreux défis en matière d'infrastructures sanitaires, d'aménagement et de gestion d'environnement.

Le département de Rufisque est situé à 25 km du centre ville de Dakar. Sa particularité est qu'il est le seul département à comprendre une zone urbaine et rurale. Rufisque enregistre un accroissement rapide de la population, alimenté notamment par l'exode rural et les migrations de Dakar vers Rufisque.

Dans les 2 zones, le paludisme constitue le premier motif de consultation. Sur le plan épidémiologique, les deux sites sont dans une zone hypoendémique de transmission faible. La maladie y sévit selon le mode de paludisme urbain qui est une entité épidémiologique classée comme strate VII de l'OMS. *Plasmodium falciparum* est la principale espèce responsable de paludisme. *Anopheles arabiensis* est le principal vecteur du paludisme [10].

1.2.Type d'étude et période

Il s'agit d'une étude d'évaluation d'une méthode de diagnostic biologique du paludisme. Nous avons sélectionné des échantillons chez des patients suspects de paludisme pendant la saison de transmission palustre (octobre et novembre) de l'année 2015.

1.3.Considérations éthiques

Pour les patients éligibles, nous avons expliqué l'étude au patient ou à son tuteur en incluant les objectifs du projet. Le patient ou son tuteur a ainsi la libre option de participer ou non à cette étude. En cas d'acceptation, une fiche de consentement est signée par le patient, le parent ou tuteur.

Notre protocole d'étude a été approuvé par la commission Ethique du Ministère la Santé et de l'action sociale.

1.4.Populations d'étude

1.4.1. Critères d'inclusion des patients

Nous avons inclus :

- Les patients suspects de paludisme sur la base de la fièvre ou une histoire de fièvre dans les 48 heures
- Les patients de plus de 2 ans
- Les patients ayant un poids corporel supérieur ou égal à 8 kg
- Les accès palustres simples
- Les patients ayant donné un Consentement libre et éclairé

1.4.2. Critères de non inclusion

Il s'agit d'absence de consentement du malade, de ses parents ou de ses tuteurs, les patientes en état de grossesse ou allaitantes.

1.4.3. Recrutement des patients

Cette étude a été réalisée chez les sujets de plus de 2 ans qui ont rempli les critères d'inclusion après accord des parents ou tuteurs.

Le recrutement était fait entre 8h00 du et 14h00. Après un bref interrogatoire suivi de l'examen clinique mené par le clinicien au niveau de la formation sanitaire, celui-ci étudie l'éligibilité du patient à l'étude. Un prélèvement veineux était effectué chez les patients éligibles et suspects de paludisme. Un test de diagnostic rapide était immédiatement effectué. Les prélèvements de sang étaient acheminés au laboratoire de Parasitologie Mycologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec et faisaient l'objet de confection d'un frottis mince et d'une goutte épaisse pour la recherche des plasmodies.

1.5.Prélèvement des échantillons

Le sang des patients ayant rempli les critères de sélection est collecté directement sur tube avec anticoagulant (EDTA) et sur papier buvard. Cette dernière méthode s'accompagne d'une diminution de la sensibilité de la détection des parasites mais présente l'avantage d'être pratique en matière de transport, de coût et d'acceptabilité [11]. Un volume de 50 µl de sang est prélevé et séché sur papiers filtres FTA Whatmann.

Les échantillons sont acheminés par la suite au laboratoire de parasitologie-mycologie de l'hôpital Aristide Le Dantec de Dakar. Le sang est conservé à 4 degrés Celsius si l'analyse est effectuée dans les 7 jours ; au delà, les prélèvements sont congelés à -80 degrés Celsius.

1.6.Techniques de diagnostic biologique

1.6.1. Microscopie

Une goutte épaisse et un frottis mince sont confectionnés sur une même lame et colorés par une solution de Giemsa diluée à 10%. La lame est observée au microscope optique à l'objectif x100 par deux microscopistes. Une observation sur 300 champs est faite avant de déclarer une lame négative. Si la lame est positive, la densité parasitaire est calculée sur la base du rapport du nombre de trophozoïtes sur le nombre de leucocytes en assumant que chaque échantillon contient 8000 leucocytes par microlitre. Si l'écart observé entre les microscopistes est inférieur à 20%, la moyenne des 2 observations est reportée ; si l'écart est supérieur à 20%, la lame est adressée à un troisième lecteur.

1.6.2. *Illumigene* Malaria

- Principe du test

La LAMP utilise des amorces conçues spécialement pour donner une amplification de l'ADN en condition isothermale. Le test a pour cible une région du génome de *Plasmodium* qui est conservée au sein de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. Le kit ***illumigene* Malaria** a pour cible une séquence d'ADN mitochondriale non codante de 214 paires de base de *Plasmodium spp.* Au cours de l'amplification, les extrémités des brins d'ADN se recourbent (par appariement entre 2 séquences complémentaires) et forment des boucles. Ces derniers constituent des points d'initiation pour de nouvelles amorces pour former une nouvelle élongation. Un dérivé de l'amplification est constitué du pyrophosphate de magnésium qui donne une solution trouble. Les caractéristiques de l'absorbance sont détectées et interprétées par un système Incubateur/Lecteur *illumigene pro-10*. Le changement des caractéristiques d'absorbance dus au précipité de pyrophosphate de magnésium indique la présence de la séquence d'ADN cible.

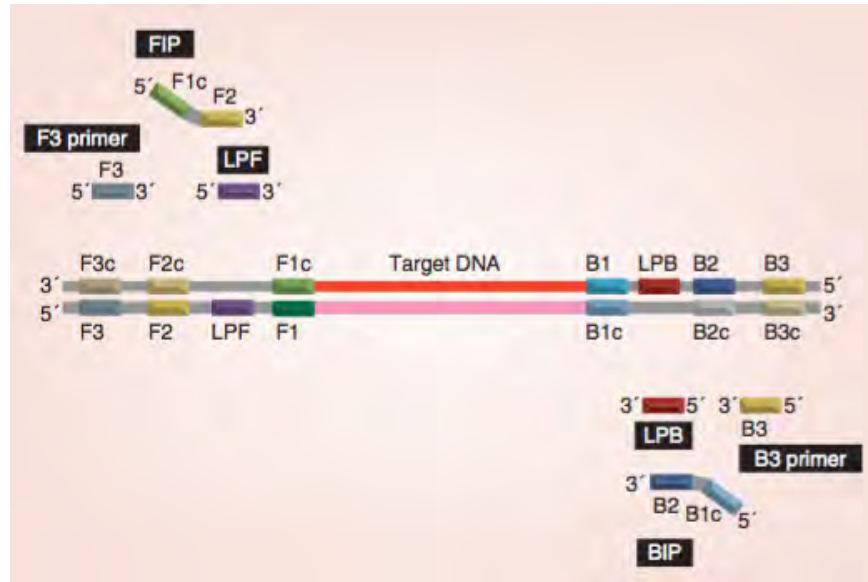


Figure 4: Principe de la méthode *illumigene* Malaria

- Techniques

○ Phase d'extraction de l'ADN

Les deux protocoles testés diffèrent uniquement par la méthode d'extraction de l'ADN : la méthode S-PREP et la méthode M-PREP.

Protocole *illumigene* S-PREP

Le sang total est d'abord traité par un tampon de lyse (Buffer I) ; les cellules sont ainsi lysées et l'acide nucléique est ainsi libéré. Le lysat est ajouté dans une colonne de filtration SMP PREP IV et le filtrat est recueilli dans un tube ; ce filtrat obtenu contient les acides nucléiques prêts pour la phase d'amplification.

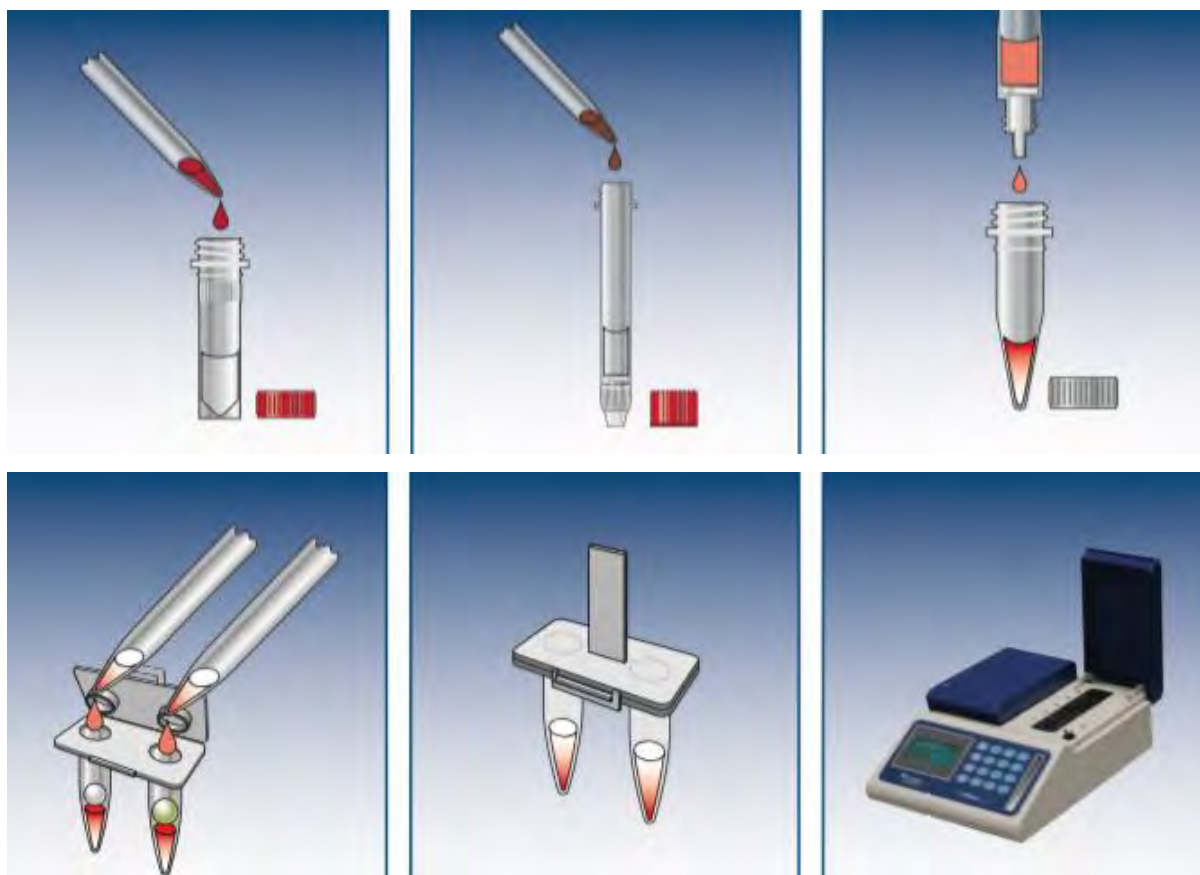


Figure 5: Protocole *illumigene* S-PREP

Protocole *illumigene* M-PREP

Le sang total est soumis à une chromatographie par exclusion de taille pour séparer et purifier les acides nucléiques. Les colonnes M-PREP contiennent la matrice permettant de purifier l'ADN tandis que le tampon qui y est contenu facilite la lyse des cellules et l'élution. Le sang total est d'abord traité par un tampon de lyse (Buffer I) ; les cellules sont ainsi lysées et l'acide nucléique libérée ; le lysat est transféré dans la colonne M-PREP et on laisse s'écouler par phénomène de gravité, les molécules de plus grande taille sont éluées en premier ; le tampon M-PREP Buffer II est ajouté à la colonne facilitant la migration de l'échantillon à travers la matrice de la colonne. Le tampon M-PREP Buffer II contient un colorant non réactif qui sert d'indicateur visuel de l'élution. Le tampon M-PREP Buffer III est rajouté après que Buffer II ait pénétré la matrice du gel ; ce dernier éluât obtenu contient les acides nucléiques purifiés prêts pour la phase d'amplification.



Figure 6: Protocole *illumigene* M-PREP

○ Phase d'amplification de l'ADN

Les acides nucléiques obtenus après extraction sont placés dans 2 chambres d'un dispositif. Ce dispositif contient une bille de réactifs d'amplification lyophilisés dans chacune des 2 chambres : une chambre TEST avec des amorces spécifiques de *Plasmodium spp.*, et une chambre CONTROLE avec des amorces spécifiques de l'ADN mitochondrial humain. Cette dernière chambre joue le rôle de contrôle interne du test ; en effet, durant le traitement de l'échantillon, l'ADN mitochondrial humain est extrait en même temps que celui de *Plasmodium spp.* Le contrôle interne permet ainsi de suivre l'extraction d'ADN, l'inhibition de l'amplification, la performance des réactifs et l'efficacité du traitement des échantillons. Le contrôle doit être amplifié et détecté dans la réaction finale sinon le test est considéré comme non valide et le résultat non reporté.

Le dispositif est ensuite placé dans l'appareil *illumipro-10* qui est un système à la fois incubateur et lecteur. En effet, l'appareil est réglé à 65 degrés Celsius qui est la température constante d'amplification et permet aussi de suivre les modifications des caractéristiques d'absorbance en mesurant la transmission de la lumière à travers la solution de réaction. Il calcule cette transmission entre le début (signal initial Si) et la fin (signal final Sf) du test et il compare le

rapport à une valeur seuil prédéfinie. Des valeurs seuils prédéfinies pour la chambre TEST sont utilisées pour présenter les résultats des échantillons. Les rapports Sf/Si inférieurs à 70% dans la chambre test sont présentés comme résultats positifs et les rapports Sf/Si supérieurs à 70% sont présentés comme résultats négatifs.

Des valeurs seuil prédéfinies pour la chambre CONTROLE sont utilisées pour valider le test. Les rapports Sf/Si inférieurs à 90% dans la chambre CONTROLE sont présentés comme valides et conduisent à la présentation des résultats de la chambre TEST (POSITIF, NEGATIF). Les rapports Sf/Si supérieurs à 90% sont présentés comme non valides et empêchent la présentation des résultats dans la chambre TEST.

Des critères d'exclusion plus stricts sont appliqués à la réaction de la chambre CONTROLE pour s'assurer que l'amplification n'est pas inhibée, que les réactifs fonctionnent comme prévus et que l'échantillon a été traité de manière appropriée.

Aucune réfrigération des réactifs de *illumigene* Malaria n'est nécessaire et toute la procédure et la conservation se fait à température ambiante entre 20 et 40 ° C.

1.7. Analyse des données

Les caractéristiques de performance de la microscopie ont été comparés à *illumigene* Malaria utilisée comme méthode de référence. Les variables mesurées sont : vrais positifs (VP), vrais négatifs (VN), faux positifs (FP), faux négatifs (FN). La sensibilité a été calculée comme étant le rapport $VP/(VP + FN)$, la spécificité comme étant le rapport $VN/(VN + FP)$. L'intervalle de confiance à 95% a été calculé selon la formule $p \pm 1.96 \times \sqrt{p(1-p)/n}$ où p est la sensibilité (ou spécificité) et n est le nombre d'échantillons positifs (ou, pour la spécificité, d'échantillons négatifs). Les données ont été saisies sur Microsoft Excel 2016 et l'analyse a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism.

2. Résultats

Au total 200 échantillons ont été examinés en microscopie et traités par la méthode *illumigene* Malaria.

2.1. Microscopie

Les résultats de la goutte épaisse et du frottis mince ont permis de noter 123 échantillons positifs sur les 200 suspects de paludisme soit un taux de positivité de 61,6% et 77 échantillons négatifs (38,4%) (Tableau I). Parmi les échantillons positifs, un seul était à *Plasmodium ovale*, tous les autres étant à *P. falciparum*. Les densités parasitaires variaient entre 16 et 404000 parasites par microlitre de sang avec une moyenne de 36942.

2.2. *Illumigene* Malaria

Avec le protocole S-PREP, nous avons noté 137 échantillons positifs (67,8%) et 62 échantillons négatifs (32,2%) ; 1 échantillon est sorti non valide même après répétition de l'analyse.

Avec le protocole M-PREP, nous avons noté 148 échantillons positifs (73,9%) et 52 échantillons négatifs (26,1%) (Tableau I). Il existait ainsi 11 échantillons qui étaient positifs avec le protocole M-PREP alors qu'ils étaient négatifs avec le protocole S-PREP. Ces 11 échantillons étaient également négatifs à la microscopie. L'échantillon qui était non valide avec le protocole S-PREP était positif avec le protocole M-PREP. Au total, 189 échantillons étaient concordants entre les 2 protocoles (94,5%) et 11 échantillons présentaient de discordances (5,5%).

Tableau I: Résultats de la microscopie et de *illumigene* Malaria

Tests	Positif	Négatif	Non valides
Microscopie	123 (61,6%)	77 (38,4%)	0 (0,0%)
<i>illumigene</i> S-PREP	137 (67,8%)	62 (30,8%)	1 (0,7%)
<i>illumigene</i> M-PREP	148 (73,9%)	52 (26,1%)	0 (0,0%)

En considérant *illumigene* S-PREP comme méthode de référence, nous avons noté une sensibilité de la microscopie de 90%, une spécificité de 100% et une concordance entre les deux méthodes pour 182 échantillons sur les 200 testés soit 91,1% (Tableaux II et III). Au total le taux positivité sub-microscopique est de 10% en utilisant le protocole S-PREP comme méthode de référence.

Tableau II: Comparaison entre *illumigene* S-PREP et microscopie

Protocole S-PREP

Microscopie	Positifs	Négatifs	Total
Positive	123	0	123
Négative	14	62	76
Total	137	62	199

Tableau III: Caractéristiques de la microscopie par comparaison à *illumigene* S-PREP

	Pourcentage	Nombres	IC 95%
Sensibilité	90,0%	123/137	100-100%
Spécificité	100,0%	62/62	70,5-93,1%
Concordance	93,1%	182/200	88,8-97,4%
Taux d'échec (non valides)	0,7%	1/200	0,0-1,6%

Avec *illumigene* M-PREP, nous avons noté une sensibilité de 83,3%, une spécificité de 100% et une concordance entre les deux méthodes pour 175 échantillons sur les 200 testés soit 87,7% (Tableaux IV et V). Ainsi le taux positivité sub-microscopique est de 16,7% en utilisant le protocole S-PREP comme méthode de référence.

Tableau IV: Comparaison entre *illumigene* M-PREP et microscopie

	Protocole M-PREP		
Microscopie	Positifs	Négatifs	Total
Positive	123	0	123
Négative	25	52	77
Total	148	52	200

Tableau V: Caractéristiques de la microscopie par comparaison à *illumigene* M-PREP

	Pourcentage	Nombres	IC 95%
Sensibilité	83,3%	123/148	96,9-100%
Spécificité	100,0%	52/52	52,9-82,7%
Concordance	87,7%	175/200	82,0-93,4%

Taux d'échec (non valides)	0,0%	0/200	0,0-1,8%
----------------------------	------	-------	----------

2.3. Concordances et discordances

Le maximum de concordance a été noté entre *illumigene* S-PREP et *illumigene* M-PREP (94,5%) et le minimum a été noté entre microscopie et *illumigene* M-PREP (87,7%) (Tableau IX).

Tableau VI: Niveau de concordance entre les différentes techniques

	Nombre	Pourcentage
Microscopie/illumigene S-PREP	182/200	92,5%
Microscopie/ illumigene M-PREP	175/200	87,7%
Illumigene S-PREP/illumigene M-PREP	189/200	94,5%

Globalement, 25 échantillons présentaient au moins une discordance. Le profil de discordance le plus fréquent est celui pour lequel la microscopie seule est négative (12/25) suivi de celui pour lequel *illumigene* M-PREP seule est positive (10/25) (Tableau X).

Tableau VII: Profils de discordance entre les différentes méthodes

Positifs	Négatifs	Nombres
M-PREP, S-PREP	Microscopie	12/25
M-PREP	Microscopie, S-PREP	10/25
M-PREP, S-PREP	Microscopie	1/25

3. Discussion

Les deux protocoles de *illumigene* Malaria que nous avons décrit ont été validés au laboratoire de CDC Atlanta en utilisant comme méthode de référence une technique récente de PCR quantitative qui est la PET-PCR.

Au niveau des structures sanitaires des pays endémiques, la microscopie et les tests de diagnostic rapide (TDR) constituent les outils pour évaluer la prévalence du paludisme. Or quand le niveau de transmission de la maladie est très bas, il est estimé que les portages sub-microscopiques sont à l'origine de 20 à 50 % de la transmission homme-moustique [30]. Nous avons évalué les taux d'infections palustres sub-microscopiques à Dakar. La région de Dakar se trouve dans une situation d'endémicité faible du paludisme avec un taux d'incidence de 8,1 pour 1000 habitants [41].

L'essentiel des études portant sur la détermination des parasitémiés sub-microscopiques a été fait par l'utilisation d'une technique de PCR [30]. Dans notre cas, la détermination des infections sub-microscopiques a été réalisé par l'utilisation d'une technique d'amplification isothermale d'ADN plasmodial, *illumigene* Malaria qui a rendu ce processus plus simple, plus accessible et facilement déployé sur le terrain, dans les zones périphériques. Cet outil aiderait ainsi le programme national de lutte contre le paludisme dans l'évaluation de la vraie incidence du paludisme et, dans le contexte de diminution de la transmission, le diagnostic des réservoirs résiduels de faibles parasitémiés.

Au cours de notre étude, nous avons noté un taux de positivité élevé (61,6%) des gouttes épaisses et frottis mince. En effet, l'étude s'est déroulée au cours de la saison de transmission palustre à Dakar sur deux sites présentant des gîtes larvaires (Pikine et Rufisque). Au cours d'une étude d'évaluation de la méthode NINA-LAMP en Ethiopie, Sema et al. [46] avaient noté un taux de positivité de la microscopie plus faible que celui de notre étude (15%) ; Toutefois ils [46] avaient effectué leur collecte au cours d'une période de très faible transmission en Ethiopie (Mars-Avril) ; cette même étude permettait de noter des parasitémiés variant entre 420 et 180800 parasites par microlitre avec une moyenne de 9800 parasites. Ainsi notre étude a enregistré à la fois les densités parasitaires plus faibles et plus élevées et une moyenne de la parasitémie plus élevée. Cook et al. [8], avaient évalué la LAMP à Zanzibar dans ce contexte et avaient une sensibilité de 83,3% et une spécificité de 99,7%. En Ouganda, l'évaluation d'un kit LAMP avait permis d'obtenir une sensibilité et une spécificité comparables à celles de notre étude [15].

Au cours de notre étude, 99% des échantillons était constitué de *P. falciparum*, le test a pu détecter aussi les souches de *P. ovale* et *P. malariae*. Sema et al. [46] avait noté la majorité de leur échantillons positifs à *P. vivax* (56,7%). Cependant, à CDC lors de la validation les tests

effectués avec *illumigene* Malaria ont permis de détecter efficacement *P. vivax* et *P. knowlesi*. Au cours de leur étude, Sema et al. [46], le taux d'infection sub-microscopique était similaire à celui de notre étude ; en effet, 9,8% des échantillons étaient positifs à la LAMP alors qu'ils étaient négatifs à la microscopie.

En Inde, Deepak et al. [31], au cours d'une étude d'évaluation comparative entre microscopie, TDR OptiMAL et PCR multiplex ciblant le gène de l'ARN ribosomal 18S, avait noté un taux de positivité de 52,1%, sensiblement inférieur à celui de notre étude ; dans cette étude la majorité des échantillons positifs était constituée de *P. vivax* (46,5%).

Matha et al. [24] avait noté un taux de positivité de 63,6%, identique à celui de notre étude ; toutefois pour cette étude, 14,9% des échantillons présentaient des espèces différentes de *P. falciparum*. Il faut noter qu'en Inde la prévalence de *P. vivax* est très élevée, ce qui explique la proportion importante d'espèces autres que *falciparum* [24].

Poon et al. [39] ont été les premiers à développer une méthode moléculaire simple, relativement peu coûteuse basée sur la LAMP et détectant un gène hautement conservé de la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal de *P. falciparum*. L'avantage majeur d'une telle technique inclut l'absence de réactions croisées avec les autres parasites responsables du paludisme humain, la réduction du coût et du temps (en éliminant l'étape préliminaire d'extraction de l'ADN), l'utilisation d'instruments basiques et la possibilité de lecture visuelle des résultats positifs.

Plusieurs études ont proposé de déterminer la sensibilité et la spécificité de la LAMP utilisant différents protocoles et des méthodes de référence différentes (Tableau XI). Poon et al. [39] avaient évalué la méthode LAMP à partir de culot globulaire et avaient obtenu une bonne sensibilité et une bonne spécificité comparativement à la PCR (95% et 99% respectivement).

D'autres études ont montré que la LAMP présentait la même sensibilité et une spécificité meilleure que celle de la microscopie et qu'elle présentait la même fiabilité que la PCR nichée pour la détection des quatre espèces plasmodiales humaines [14] ;

Dans une étude qui comparait la LAMP à la microscopie, au TDR et à la PCR nichée, il a été montré une sensibilité et une spécificité plus faible de la LAMP. Il a même été noté au cours de cette étude une sensibilité inférieure à celle de la microscopie [33]. Par contre, au nord de la Thaïlande, il a été rapporté une sensibilité et spécificité de 100% de la LAMP alors que celles de la microscopie étaient de 92% et 93% respectivement, par comparaison à la PCR nichée [40] ;

cette dernière étude montre la fiabilité de la LAMP dans le diagnostic du paludisme qui est supérieure à celle de la microscopie. Au nord ouest de l’Ethiopie, Sema et al. [46] avaient montré une sensibilité et une spécificité comparable à cette dernière étude (96,8% et 84.3% respectivement) comparativement à la PCR nichée.

Bien que notre étude ait été effectuée à partir de sang total, des auteurs ont montré qu’à partir de sang prélevés sur papier filtre on notait une sensibilité et une spécificité équivalente à celle de la microscopie [14]. En effet, cette étude a montré un taux de positivité de 56,2% avec un taux de parasitemies sub-microscopique de 4,3% sensiblement inférieur à celui de notre étude. Toutefois, la collecte a été effectuée dans une zone hyperendémique où les parasitemies faibles sub-microscopiques sont moins observées qu’en zone hypoendémique.

La LAMP a été évaluée aussi pour la différenciation des quatre principales espèces plasmodiales : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* [14]. C’est ainsi que Tao et al. [49], à partir d’échantillons de sang sur papier filtre ont évalué la LAMP dans la détection de *P. vivax* ; les résultats avaient montré une sensibilité de 98% et une spécificité de 100% par comparaison à la microscopie et aucun cas de parasitemie sub-microscopique. Lau et al. [19] avaient pu détecter *P. knowlesi* avec des sensibilités et spécificités de 100% tout comme lors de la validation de illumigene Malaria au CDC Atlanta ont permis de détecter des dilutions de parasitemies de 0,2 parasites par microlitre pour *P. falciparum* et 0,06 pour *P. vivax*.

Notre évaluation de illumigene Malaria a consisté à utiliser des échantillons de sang total. Yamamura et al. [58] avaient développé une méthode moléculaire basée sur la LAMP et utilisant des papiers filtres et dont l’interprétation du résultat est basée sur l’analyse de la courbe de fusion de la réaction d’amplification contrairement à notre étude où l’analyse était faite en point final. Le système développé par Yamamura et al. [58] avait montré une sensibilité de 85,7% de la microscopie soit un taux d’infection sub-microscopique de 14,7%, sensiblement supérieur à celui de notre étude. En Thaïlande, Sirichaisinthop et al. [47], avaient évalué la LAMP à partir d’échantillons de sang capillaire prélevé sur tube hépariné et sur papier filtre ; cette étude avait montré, comparativement à la microscopie, une sensibilité voisine de celle de notre étude mais la spécificité était plus élevée (100%).

En outre, contrairement aux études précitées, notre protocole a utilisé des réactifs lyophilisés, ce qui facilite la conservation et le transport vers les zones reculées où le paludisme sévit le plus. Le

processus de lyophilisation a également l'avantage de préserver la stabilité des réactifs.

Au total, la validation au CDC Atlanta a permis de noter la détection de *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. vivax*. Ces résultats ont été conformes avec ceux de la PET-PCR et du séquençage.

Tableau VIII: Sensibilité et spécificité de la LAMP au cours de différentes études

Espèces	Echantillons	Taille	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Méthode de référence	Référence
<i>P. falciparum</i>	Culot d'hématies	202	95,0	99,0	PCR	[39]

<i>P. falciparum</i>	Sang total EDTA	115	79,1	58,3	PCR nichée	[33]
			77,6	100,0	TDR (HRP2)	
			73,1	100,0	Microscopie	
<i>Plasmodium spp.</i>	Sang séché	121	98,5	94,3	Microscopie	[14]
<i>P. falciparum</i>	Sang séché	97	97,8	85,7	Microscopie	[58]
<i>P. falciparum, P. vivax</i>	Sang total EDTA	130	100,0 96,0	100,0 100,0	PCR nichée	[40]
<i>P. falciparum</i>	Sang total EDTA	106	96,7 98,9	91,7 100,0	Microscopie PCR nichée	[22]
<i>Plasmodium spp.</i>	Sang capillaire hépariné	110	98,3	100,0	Microscopie	[47]
	Sang séché					
<i>P. vivax</i>	Sang séché	89	98,3	100,0	Microscopie	[49]
<i>P. knowlesi</i>	Sang total EDTA	74	100,0	100,0	PCR nichée	[19]
<i>Plasmodium spp.</i>	Sang total EDTA	380	95,0	80,0		[15]
<i>Plasmodium spp.</i>	Sang capillaire	997	83,3	99,7	PCR	[8]

Conclusion

Toutes les observations décrites sont en phase avec l'utilité et l'applicabilité de la méthode

Illumigene Malaria comme un nouvel outil de détection des *Plasmodium* aussi bien dans le cadre diagnostique que dans la surveillance épidémiologique. *Illumigene* Malaria présente un véritable avantage sur la microscopie. Un seuil de détection de 0,2 et 0,06 parasite par microlitre (*P. falciparum* et *P. vivax* respectivement) était noté lors de la validation à CDC Atlanta avec détection des cinq espèces plasmodiales. Dans le contexte d'endémicité faible, nous avons noté entre 10 et 16% (selon le protocole *illumigene* Malaria utilisé) d'infections palustres qui passaient inaperçus à la microscopie. Le diagnostic du paludisme par l'utilisation d'une technique *illumigene* Malaria qui combine simplicité, rapidité et un bon rendement représente une approche efficace. La LAMP *illumigene* Malaria simplifie les aspects techniquement compliqués des autres méthodes de biologie moléculaire et peut contribuer largement au programme de lutte contre le paludisme du fait de sa bonne sensibilité et de sa bonne spécificité dans la détection des *Plasmodium* qui peuvent passer inaperçus à la microscopie. A l'avenir, cette méthode pourrait même être proposée comme outil de diagnostic sur place et constituer une alternative au TDR et à la microscopie dans un contexte d'endémicité faible ou de pré-élimination.

En perspective, nous envisageons d'utiliser la technique *illumigene* Malaria au nord du Sénégal pour le suivi épidémiologique des portages de faibles densités parasitaires, ceci dans un contexte où il est envisagé d'introduire la primaquine dans le but d'élimination.

Bibliographie

1. Blessmann J, Buss H, Nu PA, Dinh BT, Ngo QT, Van AL, Alla MD, Jackson TF, Ravdin JI, and Tannich E. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:4413–4417.
2. Bousema JT, Gouagna LC, Drakeley CJ, Meutstege AM, Okech BA, Akim IN, et al.

Plasmodium falciparum gametocyte carriage in asymptomatic children in western Kenya. *Malar J.* 2004;3:18.

3. Boutin JP, Pradines B, Pages F, Legros F, Rogier C et Migliani R. Epidémiologie du paludisme. *Rev. Prat.* 2005;55:833-40.
4. Bretagne S. Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003;9:505–511.
5. Britton S, Cheng Q, Sutherland CJ and McCarthy JS. A simple, high-throughput, colourimetric, field applicable loop-mediated isothermal amplification (HtLAMP) assay for malaria elimination. *Malar J.* 2015;14:335.
6. Buates S, Bantuchai S, Sattabongkot J, Han ET, Tsuboi T, Udomsangpetch R, Sirichaisinthop J, Tanariya P. Development of a reverse transcription- loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for clinical detection of *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Parasitol. Int.* 2010;59:414–420.
7. Carnevale P, Robert V, Molez JF et Baudon D. Epidémiologie générale : faciès épidémiologiques des paludismes en Afrique Subsaharienne. *Etudes Méd.* 1984;3:123-133.
8. Cook J, Aydin-Schmidt B, Gonzalez IJ, Bell D, Edlund E, Nassor MH, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. *Malar J.* 2015;14:43.
9. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ et Singh B. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis* 2008;46(2):165-71.
10. Diallo A, Dos Santos S, Lalou R, Le Hesran JY. Perceived malaria in the population of an urban setting: a skipped reality in Dakar, Senegal. *Malar J.* 2012; 11: 340.
11. Eboumbou Moukoko EC, Bogreau H, Briolan S. et al. Marqueurs moléculaires de résistance de *Plasmodium falciparum*. *Médecine Tropicale* 2009;606-612.
12. Farcas GA, Zhong KJ, Mazzulli T, and Kain KC. Evaluation of the Real Art Malaria LC real-time PCR assay for malaria diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:636–638.
13. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue.

Biotechniques. 2009;46:167–72.

14. Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H. Detection of four *Plasmodium* species by genus and species-specific loop mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2007;45:2521–8.
15. Hopkins H, Gonzalez IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asiimwe C, et al. Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. *J Infect Dis*. 2013;208:645–52.
16. Hsiang MS, Greenhouse B, Rosenthal PJ. Point of care testing for malaria using LAMP, loop mediated isothermal amplification. *J Infect Dis*. 2014;210:1167–9.
17. Iseki H, Kawai S, Takahashi N, Hirai M, Tanabe K, Yokoyama N, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method as a tool for diagnosis of infection by the zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2509–14.
18. Karl S, Gurarie D, Zimmerman PA, King CH, St Pierre TG, Davis TM. A sub-microscopic gametocyte reservoir can sustain malaria transmission. *PLoS One*. 2011;6:e20805.
19. Lau YL, Fong MY, Mahmud R, Chang PY, Palaeya V, Cheong FW, Chin LC, Anthony CN, Al-Mekhlafi AM, Chen Y. Specific, sensitive and rapid detection of human *Plasmodium knowlesi* infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in blood samples. *Malar. J*. 2011;10:197.
20. Limor JR, Lal AA and Xiao L. Detection and differentiation of *Cryptosporidium* parasites that are pathogenic for humans by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol*. 2002;40:2335–2338.
21. Lu F, Gao Q, Zhou H, Cao J, Wang W, Lim CS, et al. Molecular test for *vivax* malaria with loop-mediated isothermal amplification method in central China. *Parasitol Res*. 2011;110:2439–44.
22. Lucchi NW, Demas A, Narayanan J, Sumari D, Kabanywany A, Kachur SP, Barnwell JW, Udhayakumar V. Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the diagnosis of malaria. *PLoS One* 2010;5, e13733.
23. Luxemburger C, Ricci F, Nosten F, Raimond D, Bathet S, White NJ. The epidemiology

of severe malaria in an area of low transmission in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997;91(3):256–62.

24. Maltha J, Gillet P, Bottieau E, Cnops L, van Esbroeck M and Jacobs J. Research Evaluation of a rapid diagnostic test (CareStart™ Malaria HRP-2/pLDH (Pf/pan) Combo Test) for the diagnosis of malaria in a reference setting. *Malaria J.* 2010; 9:171.
25. Metselaar D et Van Theil PM. Classification of malaria. *Trop Geogr Malaria* 1959;11: 157-161.
26. Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002;15:66–78.
27. Morassin B, Fabre R, Berry A and Magnaval JF. One year's experience with the polymerase chain reaction as a routine method for the diagnosis of imported malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002;66:503–508.
28. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;289:150–4.
29. Mouchet J, Carnevale P, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard-Lenoble D et Sircoulon J. Biodiversité du paludisme dans le monde. Paris: *John Libbey Eurotext* 2004.
30. Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouedraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. *Nat Commun.* 2012;3:1237.
31. Pakalapati D, Garg S, Middha S, Kochar A, Subudhi AK, Arunachalam BP, Kochar SK, Saxena V, Pareek RP, Acharya J, Kochar DK, Das A. Comparative evaluation of microscopy, OptiMAL and 18S rRNA gene based multiplex PCR for detection of *Plasmodium falciparum* & *Plasmodium vivax* from field isolates of Bikaner, India. *Asian Pac J Trop Med.* 2013;6:346-351.
32. Parasites sanguins, Cahier de formation de biologie médicale, Bioforma, N° 23, Décembre 2001.
33. Paris DH, Imwong M, Faiz AM, Hasan M, Yunus EB, Silamut K, Lee SJ, Day NP, Dondorp AM. Loop-mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of *falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007;77:972–976.
34. Patel JC, Oberstaller J, Xayavong M, Narayanan J, Debarry JD, Srinivasamoorthy G, et

- al. Real-time loop-mediated isothermal amplification (ReaLamp) for the species-specific identification of *Plasmodium vivax*. *PLoS One* 2013;8:e54986.
35. Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, Medici MC, Arcangeletti MC, Snounou G, Dettori G and Chezzi C. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 2004;**42**:1214–1219.
36. Playford EG, and Walker J. Evaluation of the ICT malaria P.f/P.v and the OptiMal rapid diagnostic tests for malaria in febrile returned travellers. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40:4166–4171.
37. Polley SD, Gonzalez IJ, Mohamed D, Daly R, Bowers K, Watson J, et al. Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria. *J Infect Dis.* 2013;208:637–44.
38. Polley SD, Mori Y, Watson J, Perkins MD, González IJ, Notomi T, Chiodini PL, Sutherland CJ. Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48, 2866–2871.
39. Poon LL, Wong BW, Ma EH, Chan KH, Chow LM, Abeyewickreme W, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. *Clin Chem.* 2006;52:303–306.
40. Pöschl B, Waneesorn J, Thekisoe O, Chutipongvivate S, Karanis P. Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy nested PCR, and LAMP in northern Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010;83, 56–60.
41. Programme National de Lutte Contre le paludisme. Bulletin épidémiologique annuel du paludisme au Sénégal. Fev 2015.
42. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, and Jaton K. Detection of Four *Plasmodium* Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42:5636–5643.
43. Rubio JM, Benito A, Berzosa PJ, Roche J, Puente S, Subirats M, Lopez-Velez R, Garcia L, and Alvar J. Usefulness of seminested mul- tiplex PCR in surveillance of imported malaria in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 1999;**37**:3260–3264.
44. Rubio JM, Benito A, Roche J, Berzosa PJ, Garcia ML, Mico M, Edu M, and Alvar J. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria

- parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999;60:183–187.
45. Sachs JD. Macroeconomics and health: investing in health for economic development. Report of the Commission on Macroeconomics and Health. Geneva, *World Health Organization* 2001.
 46. Sema M, Alemu A, Bayih A, Getie S, Getnet G, Guelig D and al. Evaluation of non-instrumented nucleic acid amplification by loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP) for the diagnosis of malaria in Northwest Ethiopia. *Malar J.* 2015;14:44.
 47. Sirichaisinthop J, Buates S, Watanabe R, Han ET, Suktawonjaroenpon W, Krasaesub S, Takeo S, Tsuboi T, Sattabongkot J. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malaria diagnosis in a field setting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011;85:594–596.
 48. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S and Brown KN. 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. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993;58:283–292.
 49. Tao ZY, Zhou HY, Xia H, Xu S, Zhu HW, Culleton RL, Han ET, Lu F, Fang Q, Gu YP, Liu YB, Zhu GD, Wang WM, Li JL, Cao J, Gao Q. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection. *Parasit. Vectors* 2011; 4:115.
 50. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc.* 2008;3:877–82.
 51. Vallejo AF, Martinez NL, Gonzalez IJ, Arevalo-Herrera M, Herrera S. Evaluation of the loop mediated isothermal DNA amplification (LAMP) kit for malaria diagnosis in *P. vivax* endemic settings of Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9:e3453.
 52. Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep.* 2004;5, 795–800.
 53. Viviane G. Biologie médicale pratique : parasitologie sanguine. *De Boeck*, 2008
 54. Wastling SL, Picozzi K, Kakembo ASL, Welburn SC. LAMP for Human African trypanosomiasis: a comparative study of detection formats. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e865.

55. White NJ. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clin Infect Dis* 2008; 46(2): 172-3.
56. World Health Organisation, World Malaria Report, Geneva 2015.
57. World Malaria Report 2014. Global Malaria Programm, World Health Organization.
58. Yamamura M, Makimura K, Ota Y. Evaluation of a new rapid molecular diagnostic system for *Plasmodium falciparum* combined with DNA filter paper loop-mediated isothermal amplification, and melting curve analysis. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2009;62, 20–25.