



*Centre René Labusquière*  
*Médecine et hygiène tropicales*



Professeur D Malvy  
Responsable pédagogique  
et Directeur du Centre  
[denis.malvy@u-bordeaux.fr](mailto:denis.malvy@u-bordeaux.fr)

Professeur JL Koeck  
Co-responsable  
pédagogique  
[ilkoeck@gmail.com](mailto:jlkoeck@gmail.com)



Docteur BA Gaüzère  
Coordinateur pédagogique  
Pays de l'océan indien  
[bernard.gauzere@chr-reunion.fr](mailto:bernard.gauzere@chr-reunion.fr)

Madame M Estager  
Administration et Gestion  
des enseignements  
[murielle.estager@u-bordeaux.fr](mailto:murielle.estager@u-bordeaux.fr)

## Capacité de Médecine Tropicale

---

Apport de la PCR LAMP au diagnostic du  
paludisme en zone non endémique : Etude rétrospective  
descriptive des cas de paludisme diagnostiqué au CHU de Lille

---

Présenté par  
**Monsieur le docteur Christian Bogne Yagaka**  
Né le 23/10/1980

Directeur  
**Monsieur le docteur Jordan Leroy**

Rapporteur  
**Monsieur le docteur Pascal Millet**

JURY

---

Président	Pr D. Malvy
Membres	Dr T. Pistone Dr A. Duvignaud Dr E. Ouattara

---

# SOMMAIRE

## RESUME

## INTRODUCTION

1- Généralités sur le paludisme.....	8
1.1- Cycle du plasmodium chez l'Homme.....	8
1.2- Les différentes espèces plasmodiales infectant l'Homme.....	11
1.2.1- Plasmodium falciparum.....	11
1.2.2- Plasmodium vivax.....	11
1.2.3- Plasmodium ovale.....	11
1.2.4- Plasmodium malariae.....	11
1.2.5- Plasmodium knowlesi.....	12
1.3- Le vecteur.....	13
1.4- Les présentations cliniques.....	14
1.4.1- L'accès palustre non compliqué (simple).....	14
1.4.2- Le paludisme compliqué.....	14
1.4.2.1- Le neuropaludisme.....	15
1.4.2.2- Le paludisme viscéral évolutif.....	15
1.4.2.3- La fièvre bilieuse hémoglobinurique.....	16
1.4.2.4- Splénomégalie malarique hyperimmune.....	16
1.5- Méthodes diagnostiques.....	17
1.5.1- Examens microscopiques directs.....	17
1.5.2- Test de diagnostic rapide (TDR).....	18
1.5.3- Méthodes de diagnostics indirectes.....	18
1.5.4- Recherche des acides nucléiques par PCR.....	18
1.6- Les anti malariques.....	20
1.6.1- Les anti malariques naturels.....	20
1.6.2- Les anti malariques de synthèse.....	20
1.6.3- Les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA).....	21
1.7- Chimio prophylaxie et lutte antivectorielle.....	22
2- OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	24

3- MATERIELS ET METHODES.....	25
4- RESULTATS.....	28
4.1- Les situations cliniques détaillées.....	28
4.1.1- Première situation clinique : paludisme à Plasmodium Falciparum.....	28
4.1.2- Deuxième situation clinique : paludisme à Plasmodium Malariae.....	29
4.2- Epidémiologie et présentation clinique des patients inclus.....	30
4.2.1- Description épidémiologie de la population étudiée.....	30
4.2.2- Présentations cliniques initiales dans la population étudiée.....	31
4.3- Résultats biologiques.....	32
4.4- Comparaison des performances diagnostiques de la PCR LAMP aux méthodes microscopiques et identification d'espèce par la biologie moléculaire réalisée au CNR.....	33
4.5- Description des traitements de première intention prescrits.....	33
5- DISCUSSION.....	34
6- CONCLUSION.....	37
BIBLIOGRAPHIE.....	38

## ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique  
BEH : Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire  
CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
CNR : Centre National de Référence  
CMV : Cytomégalovirus  
CRP : protéine C réactive  
CTA : Combinaison thérapeutique à base d'Artémisinine  
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay  
EBV : Epstein-Barr-Virus  
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique  
GE : Goutte épaisse  
Ig : Immunoglobuline  
IFI : Immunofluorescence Indirecte  
Lamp: Loop-mediated isothermal Amplification  
Mg: Milligramme  
mmHg : Millimètre de mercure  
ml : millilitres  
NAAT : Nucleic-acid amplification tests  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PCR : polymerase chain reaction  
pLDH : *Plasmodium lactate* dehydrogenase  
pfLDH : *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase  
pvLDH : *Plasmodium vivax* lactate dehydrogenase  
PfHRP2 : *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein  
*P. falciparum* : *Plasmodium falciparum*  
*P. malariae* : *Plasmodium malariae*  
*P. vivax*: *Plasmodium vivax*  
*P. ovale*: *Plasmodium ovale*  
*P. knowlesi*: *Plasmodium knowlesi*  
PPAV : Protection Personnelle Anti Vectorielle  
QBC : Quantitative Buffy Coat  
Kg : Kilogramme  
SPILF : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française  
TDR : Test de Diagnostic Rapide  
VHA : Virus de l'hépatite A  
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine  
VHB : Virus de l'hépatite B  
VHC : Virus de l'hépatite C  
VHE : Virus de l'hépatite E

## **Remerciements :**

A monsieur le Dr J. LEROY, qui a dirigé ce travail avec beaucoup de disponibilité et pour ses conseils.

A monsieur le Dr P. MILLET, pour m'avoir fait l'honneur d'être le rapporteur de ce mémoire.

A monsieur le Pr B. SENDID, chef du service Parasitologie-Mycologie du CHU de Lille, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et pour ses conseils.

A madame le Dr AS. DELEPLANCQUE, pour sa participation à la réalisation de ce travail.

A l'équipe du laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU de Lille pour son aide et sa gentillesse.

Aux membres du jury : monsieur le Pr D. MALVY, monsieur le Dr T. PISTONE, monsieur le Dr A. DUVIGNAUD, monsieur le Dr E. OUATTARA, pour me faire l'honneur de juger ce travail. Soyez assurés de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

A madame Murielle ESTAGER, pour sa disponibilité et sa gentillesse.

## RESUME :

**Introduction :** Le paludisme est l'une des principales causes de maladie infectieuse chez les voyageurs de retour d'un séjour en zone tropicale. La microscopie optique combinant le frottis/la goutte épaisse (F/GE) et le Test de Diagnostic Rapide (TDR) sont recommandés en routine pour la recherche du paludisme dans les régions de faible endémicité. Les difficultés diagnostiques reposent essentiellement sur la faible parasitémie et le manque de professionnels expérimentés. Dans ce contexte, la SPILF a émis des recommandations en 2018 sur la place de la PCR LAMP dans la stratégie du diagnostic du paludisme. En effet, il s'agit d'une technique sensible avec une bonne valeur prédictive négative.

**Objectif de l'étude :** L'objectif principal de l'étude était d'évaluer l'apport et le positionnement de la PCR Illumigene® Malaria dans le diagnostic du paludisme à la lumière des résultats obtenus avec cette méthode au CHU de Lille. Les deux objectifs secondaires étaient l'analyse des présentations cliniques et paracliniques d'une part ainsi que l'appréciation rétrospective des stratégies thérapeutiques initiées dans les situations de PCR LAMP était positive.

**Matériels et méthodes :** Entre janvier 2016 et décembre 2019, 1254 demandes de recherche de paludisme par F/GE et TDR sur kit PALUTOP +4 (optima®) ont été adressées au laboratoire de microbiologie du CHU de Lille. La PCR Illumigene® MALARIA LAMP était essentiellement réalisée pour toute présomption importante d'accès palustre avec frottis négatif et goutte épaisse négative sur le prélèvement à l'entrée après concertation avec le médecin urgentiste ou infectiologue en charge du patient. Les autres situations pour lesquelles la PCR Illumigene® MALARIA LAMP était utilisée sont : discordance entre le frottis/GE et le test immunochromatographique, pour la sécurité transfusionnelle, le don d'organe, pour tout patient symptomatique sans chimioprophylaxie et enfin en cas de fièvre isolée récurrente sans étiologie retrouvée avec notion de voyage même ancien.

**Résultats :** Au total 159 PCR LAMP ont été réalisés, 8 patients avaient une PCR LAMP positive. Un patient a présenté un paludisme compliqué et 7 des patients n'ont pas présenté de signes clinico-biologiques de gravité au moment de leur prise en charge. Trois patients avaient une discordance entre le frottis sanguin/goutte épaisse et le TDR. Les cinq autres patients avaient un test microscopique et un TDR négatif. La positivité de la PCR LAMP, était confirmée par le CNR pour 7 patients. L'identification plasmodiale réalisée par le CNR a permis d'identifier *Plasmodium falciparum* (n=3), *Plasmodium malariae* (n=3), et *Plasmodium ovale* (n=1). Six patients ont été traités par Eurartésim®, un patient traité par Chloroquine et un patient secondairement traité par Primaquine après identification par le CNR. Aucun patient n'a présenté de rechute ou d'accès de réviviscence au cours du suivi.

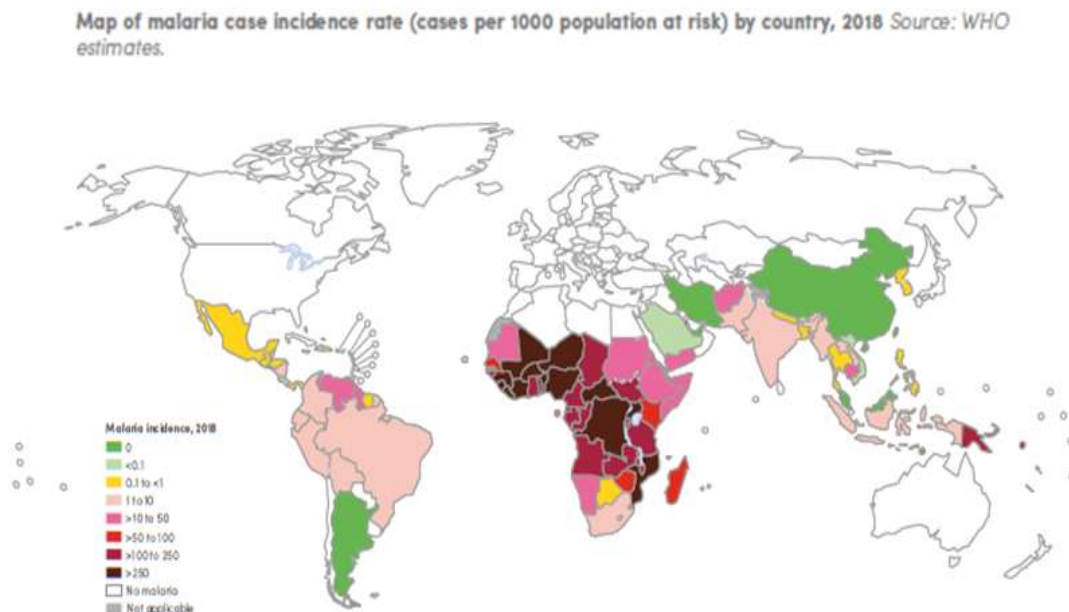
**Conclusion :** Bien que le coût de la PCR LAMP puisse être un frein à son utilisation en routine nos résultats confirment qu'il s'agit d'une technique rapide et très sensible permettant de confirmer lors d'une forte présomption clinique un diagnostic de paludisme, notamment quand la microscopie et/ou le TDR sont négatifs. Les résultats de notre travail confirment l'intérêt de la PCR LAMP dans le diagnostic biologique du paludisme, notamment chez les patients de retour de zones endémiques avec des parasitémies très faibles voire indétectables en microscopie et en cas de forte présomption clinique. Un traitement précoce est justifié lors d'une PCR LAMP positive. En revanche, l'identification d'espèce est indispensable afin d'éviter des accès de reviviscence retrouvés chez *P. ovale* ou *P. vivax*.

## INTRODUCTION

Le paludisme est une parasitose sanguicole due à un protozoaire du genre *Plasmodium*. Celui-ci est transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique, l'anophèle femelle, lors de son repas sanguin. Les protozoaires du genre *Plasmodium* appartiennent au phylum des *Apicomplexa* (*Sporozoa*), à la classe des *Haemosporidea* et à l'ordre des *Haemosporida* [1]. Le paludisme est l'une des maladies infectieuses parasitaires la plus fréquente dans le monde qui sévit de façon endémo-épidémique en zone tropicale et subtropicale. Dans le monde, 2 milliards de personnes sont exposées à cette maladie qui est responsable de 300 à 500 millions de cas dans le monde chaque année (**Figure 1**) [2]. En 2018, l'OMS estimait le nombre de décès par an au niveau mondial à 213 millions de cas et 405 000 décès, 93% de ces décès ont lieu en Afrique subsaharienne [3]. A l'échelle mondiale, 86% des décès imputables au paludisme touchent les enfants de moins de 5 ans la même année [2-3].

Six espèces de *Plasmodium* sont actuellement connues pour infecter l'homme : *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), le *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), *Plasmodium ovale* spp (*P. ovale*) incluant *P. ovale wallikeri* et *P. ovale curtisii*, *Plasmodium malariae* (*P. malariae*) et *Plasmodium knowlesi* (*P. knowlesi*). Des six espèces plasmodiales responsables du paludisme chez l'homme, *Plasmodium falciparum* est la plus répandue et la plus redoutable car responsable de l'accès pernicieux potentiellement mortel [4]. Ainsi, *P. falciparum* est principalement responsable de la morbidité et de la mortalité du paludisme.

**Figure 1 : Carte du taux d'incidence des cas de paludisme par pays en 2018** (OMS : rapport sur le paludisme dans le monde 2019)



# 1- Généralités sur le paludisme

## 1.1- Cycle du Plasmodium chez l'Homme

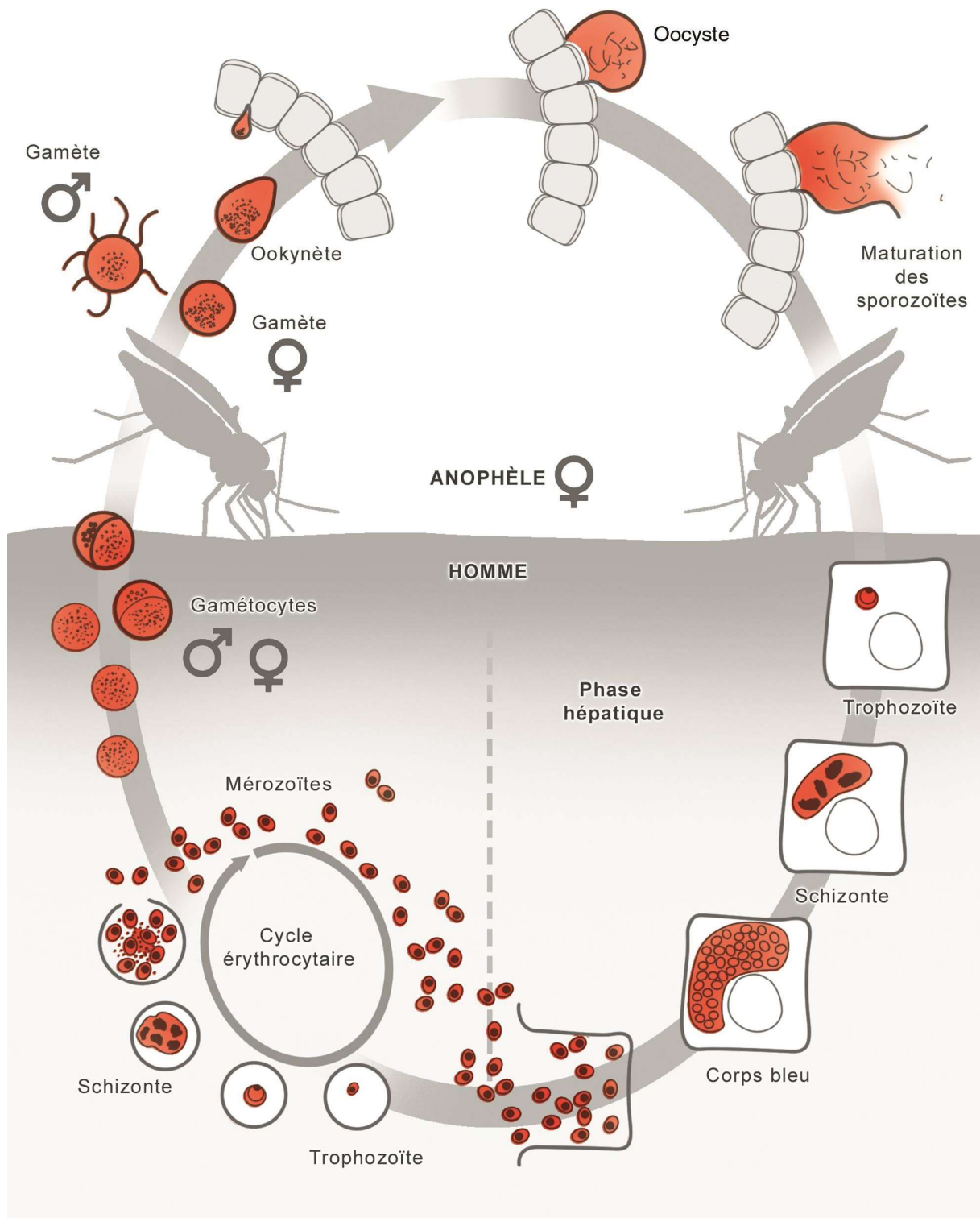
Le cycle évolutif s'effectue chez deux hôtes successifs : l'homme, qui est un réservoir intermédiaire du plasmodium chez qui a lieu la reproduction asexuée ou schizogonie (hépatique et érythrocytaire) ainsi que le vecteur qui est l'hôte définitif, l'anophèle femelle, où se réalise la reproduction sexuée ou sporogonie. Au cours du cycle, le parasite évolue successivement chez l'homme et chez l'anophèle (**Figure 2**) [5]. En microscopie, l'aspect morphologique des stades évolutifs permet le diagnostic d'espèce (**Figure 3 et 4**).

Le cycle sexué (sporogonie) [6] : Lors d'une piqûre chez un hôte impaludé, le moustique absorbe les éléments sanguins incluant les gamétocytes. Les gamétocytes ingérés se transforment en gamètes mâles et femelles. La fécondation va avoir lieu avec la formation d'un ookinète, produit par la fusion du gamète mâle et femelle, qui va évoluer en oocyste après le passage de l'épithélium de l'estomac de l'anophèle. Le parasite se multiplie à l'intérieur de cet oocyste, produisant des centaines de sporozoïtes qui migrent ensuite vers les glandes salivaires du moustique. Selon les conditions climatiques et les espèces plasmodiales, cette étape dure de dix à trente jours et nécessite des températures d'au moins 17°C à 20°C et une hygrométrie supérieure à 60%. Ces sporozoïtes sont les formes infectantes, prêtes à être inoculées avec la salive du moustique lors d'un repas sanguin sur un hôte vertébré.

Le cycle asexué (schizogonie) [6] : Les sporozoïtes contenus dans les glandes salivaires de l'anophèle femelle sont inoculés à l'homme lors de son repas sanguin et restent moins d'une trentaine de minutes dans la peau, la lymphe et le sang avant de gagner les hépatocytes. Les sporozoïtes sont ainsi transportés par la circulation sanguine, où, un certain nombre d'entre eux vont gagner le foie et les sinusoides hépatiques pour atteindre les hépatocytes. Une fois dans l'hépatocyte, le parasite toujours sous sa forme mononucléée prend le nom de trophozoïte. Au cours du cycle exo-érythrocytaire, le parasite subit d'importantes modifications. Le parasite subit une amplification de son ADN au sein du noyau et se divise de façon binaire, alors que son cytoplasme ne se divise pas. Ils évoluent ainsi en schizontes préérythrocytaires (formes multinucléées) qui, après 7 à 15 jours de maturation, éclatent et libèrent des milliers de mérozoïtes uni nucléés ; processus qui prend le nom de schizogonie intrahépatique. Les hépatocytes parasités éclatent et libèrent dans le sang les mérozoïtes, capables d'infecter les hématies. C'est le début de la phase intra-érythrocytaire, responsable de la symptomatologie palustre. Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, certains trophozoïtes intrahépatiques restent quiescents (hypnozoïtes) et sont responsables d'une schizogonie hépatique retardée qui entraîne la libération dans le sang de mérozoïtes plusieurs semaines à plusieurs mois après la piqûre du moustique, expliquant ainsi les accès de reviviscence tardifs observés chez ces deux espèces. Les hypnozoïtes n'existent pas chez *P. falciparum*. Au cours de la phase intra-érythrocytaire, le *Plasmodium* subit une phase de maturation en trophozoïte puis en schizonte, au sein du globule rouge infesté et le cycle s'achève par la lyse de la membrane érythrocytaire en 48 heures pour *P. vivax*, *P. ovale* et *P. falciparum*, ou en 72 heures pour *P. malariae*. Les mérozoïtes ainsi libérés peuvent alors envahir de nouvelles hématies et se transformer en trophozoïtes qui peuvent se différencier en gamétocytes absorbés par le moustique lors d'un repas sanguin ultérieur. La durée de la schizogonie érythrocytaire explique les variations de rythme des accès fébriles en fonction de l'espèce plasmodiale.



**Figure 2 : Cycle évolutif du Plasmodium** (Campus de Parasitologie-Mycologie - Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL))

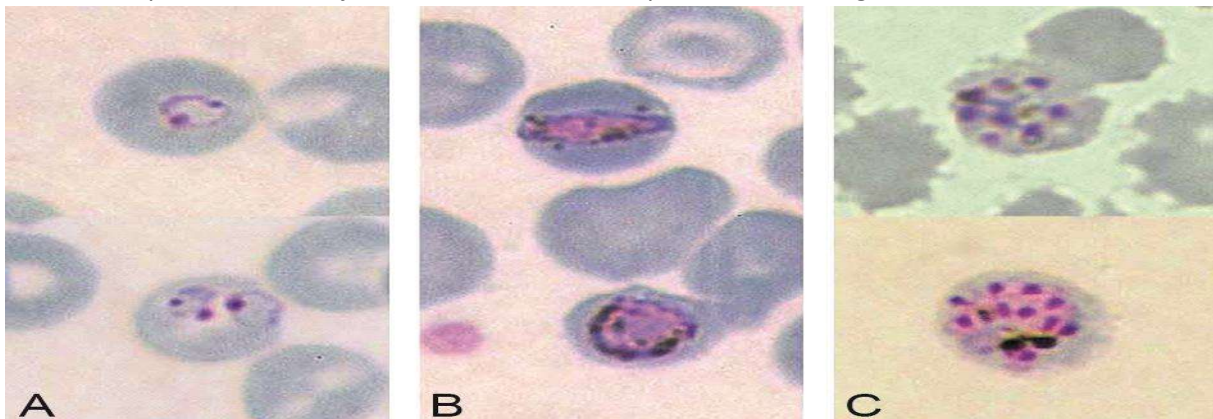


**Figure 3 : Stades évolutifs des différentes espèces plasmodiales** (Zahoor Jan -Published in Multimedia Tools and Applications 2017 : A review on automated diagnosis of malaria parasite in microscopic blood smears)

Species \ Stages	P. Falciparum	P. Vivax	P. Malariae	P. Oval
Ring Stage				
Trophozoite				
Schizont				
Gametocyte				

**Figure 4 : Frottis sanguin de *Plasmodium knowlesi*** (Singh B. et al. : Lancet, 2004 ; 363 : 1017)

A. Trophozoïtes jeunes. B. Trophozoïtes âgés. C. Schizontes.



## 1.2- Les différentes espèces plasmodiales infectant l'Homme

On observe une répartition géographique spécifiques pour chaque espèces plasmodiales dans le monde (**Figure 5**).

### 1.2.1- *Plasmodium falciparum*

C'est l'espèce la plus rencontrée en Afrique sub-saharienne et elle est responsable de la majorité des formes cliniques mortelles [7]. En effet, dans la plupart des pays africains, plus de 75% des cas du paludisme sont dus à *P. falciparum*. L'espèce est à l'origine des formes cliniques graves et provoque une fièvre tierce maligne prolongée de primo-invasion sévère pouvant être responsable de la forme neurologique appelée neuropaludisme. Cette fièvre est dite maligne en raison de son caractère pernicieux chez le non prémuni. La perniciosité peut apparaître, même si le frottis sanguin est négatif. Dans les régions équatoriales, la transmission persiste toute l'année avec cependant des recrudescences saisonnières en périodes chaudes et humides. Cette transmission s'interrompt lorsque la température tombe en dessous de 18°C. La phase hépatique dure environ 6 jours et se caractérise par l'absence d'hypnozoïtes et donc de reviviscence schizogonique et on n'observe généralement pas de récurrence.

### 1.2.2- *Plasmodium vivax*

Le *Plasmodium vivax* est répandu en Amérique du Sud et en Asie et rare en Afrique subtropicale [7]. La durée d'incubation est variable, comprise entre 15 jours à plusieurs mois. L'affection à *P. vivax* provoque cliniquement une fièvre tierce bénigne avec, un cycle érythrocytaire de 48 heures [4,5]. C'est la deuxième espèce plasmodiale la plus fréquemment retrouvée dans le monde avec un nombre de cas estimé à 75 millions de personnes chaque année. L'espèce est cependant très rare en Afrique de l'ouest, en raison de la forte prévalence du phénotype Duffy négatif dans cette population humaine. En effet, les érythrocytes du groupe sanguin Duffy négatif observés chez la majorité des sujets originaires d'Afrique de l'Ouest ne possèdent pas le récepteur membranaire nécessaire à l'infection par *P. vivax*. Des rechutes (accès de reviviscence) pouvant aller jusqu'à trois ans après la piqûre ont été décrites.

### 1.2.3- *Plasmodium ovale*

C'est la troisième espèce responsable d'accès palustre chez l'Homme et sévit essentiellement en Afrique noire [7]. Il provoque une fièvre tierce bénigne avec des accès survenant toutes les 48 heures et diminuant progressivement d'intensité. La période d'incubation varie de 15 jours à plusieurs années. L'accès de primo-invasion est souvent frustré et ignoré, voire absent. Il évolue avec des rechutes tardives, parfois plusieurs années après le séjour en zone d'endémie.

### 1.2.4- *Plasmodium malariae*

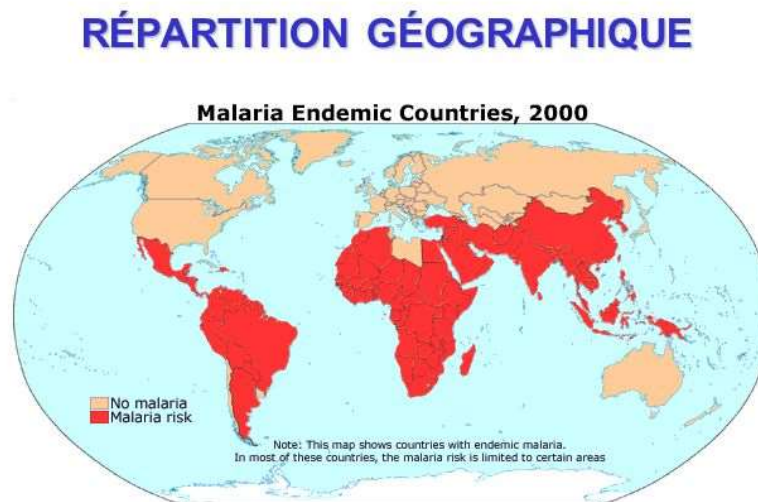
Il sévit en Afrique de manière beaucoup plus sporadique et se distingue des autres espèces par une incubation plus longue (15 à 21 jours), et par une périodicité différente de la fièvre [7]. En effet, le cycle érythrocytaire de 72 heures est responsable d'une fièvre quarte. La primo-invasion passe souvent

inaperçue. L'infection est bénigne mais *Plasmodium malariae* peut parfois entraîner des complications rénales. La durée d'évolution de ce paludisme peut être considérable puisque, des accès apparaissent parfois jusqu'à vingt ans après la piqûre infestante [4,5].

**1.2.5- *Plasmodium knowlesi***

C'est la cinquième espèce plasmodiale responsable du paludisme humain. Il s'agit d'un parasite qui a été identifié chez des primates et initialement considéré comme exceptionnel chez l'homme, mais qu'on sait maintenant fréquent en Asie du Sud-est (Malaisie, Thaïlande, Myanmar, Philippines et Singapour) [8]. Le *Plasmodium knowlesi* a un cycle court de 24 heures et peut être responsable de très fortes parasitémies.

**Figure 5 : répartition des espèces plasmodiales dans le monde** (D'après : The malaria atlas project : <https://malariaatlas.org>)

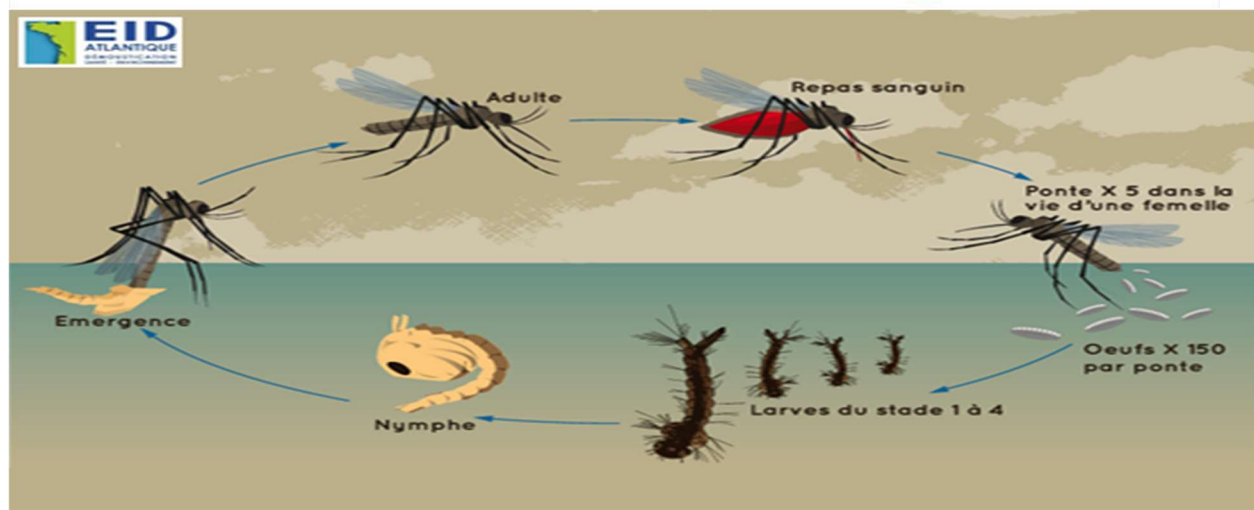
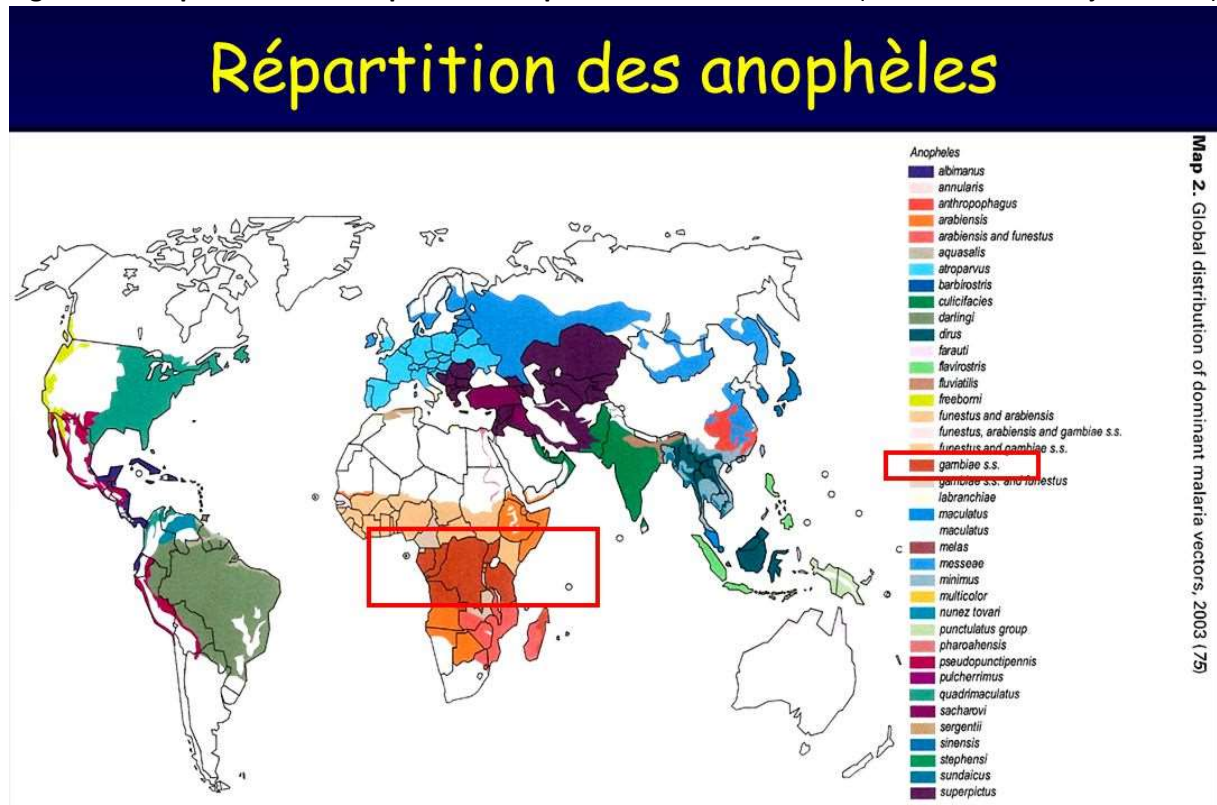


	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. knowlesi</i>
<b>Afrique</b>	+++	-	+	+	+
<b>Amérique</b>	+	+	-	-	-
<b>Asie du SE</b>	+	+	-	-	+

### 1.3- Le vecteur

Le vecteur du paludisme est un moustique *culicidea* du genre *Anopheles*, largement répandu dans les régions intertropicales. L'anophèle femelle hématophage assure la transmission du Plasmodium. Les espèces vectrices sont nombreuses et d'autant plus redoutables qu'elles sont anthropophiles. Il existe plus de 400 espèces de moustiques du genre *Anopheles* dont environ 80 espèces peuvent transmettre la maladie chez l'Homme mais dont une vingtaine d'espèces sont considérées comme des vecteurs prépondérants dans la transmission du paludisme dans le monde (Figure 6) [9]. Le mode de transmission le plus fréquent est la piqûre de l'anophèle femelle. En outre, les transmissions congénitales, transfusionnelles ou par greffe d'organe, sont possibles et sont liées à la phase sanguine du cycle du parasite.

Figure 6 : Répartition des espèces d'anophèles dans le monde (Malaria Atlas Project 2003)



## 1.4- Les présentations cliniques

On distingue deux grandes présentations cliniques en fonction de la gravité clinico-biologique et des espèces incriminées. Le paludisme non compliqué est la forme la plus courante de la pathologie, pouvant être due à l'une ou l'autre des espèces parasitaires. Le paludisme grave se singularise par une atteinte cérébrale, il est presque exclusivement dû à l'infection par *Plasmodium falciparum*.

### 1.4.1- L'accès palustre non compliqué (simple)

En phase de primo-invasion, habituellement on retrouve une fièvre continue, souvent associée à un syndrome algique avec céphalées, myalgies, arthralgies et des troubles digestifs. Cette forme évolue vers des accès périodiques en l'absence de traitement, quelle que soit l'espèce plasmodiale en cause, ou d'emblée vers une forme grave si *Plasmodium falciparum* est en cause [10].

En phase d'état, l'accès de fièvre périodique est précédé d'une phase prodromique associant céphalées, anorexie, nausées et asthénie. La symptomatologie clinique est marquée par l'apparition de fièvre tierce (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. falciparum*) ou de fièvre quarte (*P. malariae*). Chaque accès se déroule en trois périodes successives, soit après une phase prodromique, soit brutalement. Ces trois phases de l'accès palustres sont les suivantes :

- une période froide avec sensation de froid, frissons et malaise intense pendant 1 à 2 heures,
- une période chaude avec fièvre d'ascension rapide à 40°C ou plus, avec pouls rapide ou lent, chez un malade au faciès congestif, pendant 1 à 4 heures,
- une période de repos avec sueurs profuses pendant 1 à 2 heures, accompagnant la défervescence thermique, laissant le patient asthénique et courbaturé.

L'accès simple est en général d'évolution favorable même en l'absence de traitement sauf dans le cas de *Plasmodium falciparum* (fièvre maligne). L'accès se répète tous les deux à trois jours selon l'espèce plasmodiale, mais la périodicité n'est pas toujours régulière. L'hépatosplénomégalie est fonction de la répétition des accès et n'est pas toujours présente.

### 1.4.2- Le paludisme compliqué

On recense plusieurs formes cliniques de complications du paludisme, dont la plus importante est l'atteinte cérébrale. Il s'agit de l'accès pernicieux qui cause 10 à 20% de mortalité. D'autres formes plus rares de complications d'un paludisme chronique ont été décrites : le paludisme viscéral, la fièvre bilieuse hémoglobinurique et la splénomégalie hyperimmune.

### 1.4.2.1- Le neuropaludisme

Le neuropaludisme, aussi appelé accès pernicieux ou grave, est une complication majeure du paludisme à *Plasmodium falciparum*. Il s'agit d'une urgence vitale car le neuropaludisme peut être d'évolution fatale. Il survient surtout chez les personnes non immunisées (tels que les voyageurs), les patients immunodéprimés, ou chez les enfants [11].

Le paludisme grave ou accès pernicieux se définit selon l'OMS par la concomitance d'une forte parasitémie à *Plasmodium falciparum* et la présence d'au moins un des critères cliniques/biologiques suivants [12] :

#### Critères cliniques :

- Coma profond,
- Dysfonctionnement organique (déficience rénale, œdème pulmonaire...),
- Collapsus circulatoire,
- Des hémorragies viscérales ou cutanéomuqueuses (rétine),
- Des troubles digestifs : diarrhées, vomissements,
- Une hémoglobinurie,
- Des infections associées : broncho-pneumopathies, septicémies,
- Un ictère clinique

#### Critères biologiques :

- Un hyper parasitisme (densité > 5% = 250.000HP/μl),
- Une anémie sévère : hémoglobine < 5g/dl, hématocrite < 20%,
- Une insuffisance rénale : chute de la diurèse (<400ml/j), ou élévation de la créatininémie (265μmol/l) ou une élévation de la bilirubine totale (50μmol/l),
- Une hyperthermie de 40,5°C,
- Des désordres hydro électrolytiques (correction parentérale),
- Une hypoglycémie <2,2mol/l ou une chute de tension

### 1.4.2.2- Le paludisme viscéral évolutif

Il concerne surtout *Plasmodium falciparum*. Les autres espèces plasmodiales peuvent plus rarement en être responsables mais n'induisent pas de risque d'aggravation mortelle. Il s'agit d'une manifestation chronique qui atteint très souvent l'enfant de 2 à 5ans vivant en zone d'endémie, mais peut aussi toucher l'adulte non prémuni, exposé à des réinfections répétées. L'apparition de la chloroquino-résistance, l'inobservance fréquente de la prophylaxie et l'automédication en zone d'endémie, sont à l'origine du paludisme viscéral évolutif chez le sujet non autochtone. Sur le plan clinique on retrouve : une anémie importante, une splénomégalie, une fébricule autour de 38° avec parfois des poussées thermiques plus importantes et un retard staturo-pondéral chez l'enfant. Le bilan

biologique montre souvent une faible parasitémie contrastant avec un taux élevé d'Ac IgG dirigés contre le Plasmodium. L'évolution clinique et biologique sous traitement est rapidement favorable et de bon pronostic [13].

#### **1.4.2.3- La fièvre bilieuse hémoglobinurique**

C'est une complication aiguë exceptionnelle. Il s'agit d'une hémolyse intravasculaire causée par un syndrome immunoallergique d'origine médicamenteuse. La fièvre bilieuse hémoglobinurique survient chez les sujets vivant en zone endémique, anciennement atteints de paludisme à *P. falciparum*, traités de façon répétée, prolongée et irrégulière par la quinine ou d'autres molécules apparentées (halofantrine, méfloquine). Cliniquement elle associe une fièvre élevée à un état de choc avec prostration, un ictère, des urines de couleur rouge porto résultant d'une hémoglobinurie, une anémie et une insuffisance rénale pouvant être mortelle par destruction des tubules rénaux (57). Le pronostic est sévère avec un taux de mortalité de 20% (20). Elle constitue une urgence médicale, au même titre que le neuropaludisme. Le pronostic est fonction de la rapidité à corriger l'anémie et à obtenir une reprise de la diurèse avant l'évolution vers l'insuffisance rénale [14].

#### **1.4.2.4- Splénomégalie malarique hyperimmune**

Anciennement connue sous le nom de splénomégalie tropicale, c'est une forme chronique du paludisme qui touche certains adultes vivant en zones d'endémie se caractérisant par l'absence de fièvre. Elle est retrouvée chez une personne vivant en zone impaludée et s'observe le plus souvent chez l'adulte. Le tableau clinique est caractérisé par une hépato-splénomégalie, des douleurs abdominales et des symptômes liés à l'anémie. Sur le plan biologique, on retrouve une élévation d'IgG et d'IgM anti-palustre, une pancytopenie, une absence du parasite dans le sang. La PCR est d'un intérêt majeur pour le diagnostic évitant la réalisation d'une biopsie hépatique [15,16].



## 1.5- Méthodes diagnostiques

Le diagnostic de paludisme repose sur la mise en évidence direct du parasite ou la détection dans le sang de protéines spécifiques de *Plasmodium*. Il doit être considéré comme une urgence et le prélèvement sanguin réalisé sans retard. En effet, en cas de résultat positif, un traitement antimalarique doit rapidement être initié. Les deux méthodes habituellement utilisées sont l'examen au microscope optique et le test de détection rapide du paludisme (TDR). Les recommandations de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) considèrent les méthodes microscopiques traditionnelles comme techniques diagnostiques de référence du diagnostic biologique du paludisme (**Figure 7**) [17]. Le frottis sanguin permet d'obtenir en moins de 30 minutes l'identification de l'espèce plasmodiale, le stade parasitaire et la parasitémie (pourcentage d'hématies parasitées). Ces trois éléments sont importants dans la décision thérapeutique et l'évaluation de la gravité. La goutte épaisse reste encore actuellement la méthode de référence, permettant un diagnostic sensible et spécifique même en cas de faible parasitémie (jusqu'à 0,0001 %) [17]. Les examens microscopiques sanguins doivent être répétés 12 à 24h plus tard en cas de négativité initiale et de forte présomption clinique d'un paludisme.

Les autres méthodes de diagnostiques sont les méthodes indirectes (ELISA, IFI), la fluorescence directe (QBC Malaria) et la détection des acides nucléiques parasitaires par PCR.

### 1.5.1- Examens microscopiques directs

#### La goutte épaisse :

C'est la technique de concentration la plus utilisée. Elle permet d'observer une quantité de sang 20 à 30 fois plus élevée que le frottis, facilitant ainsi une détection plus rapide du parasite dans l'échantillon. Son seuil de sensibilité est de 10 à 20 hématies parasitées par  $\mu\text{L}$ . L'hémolyse et le séchage de la lame induisent une altération de l'aspect des parasites potentiellement présents dans l'échantillon, d'où la difficulté de faire un diagnostic d'espèce à partir de cette technique [18]. Enfin, la parasitémie peut être réalisée sur la goutte épaisse à partir du nombre de parasites asexués présents par rapport à un nombre fixe de 8000 leucocytes.

#### Le frottis sanguin :

Cette technique permet la mise en évidence du parasite dans les hématies et l'estimation de la parasitémie (en pourcentage d'hématies parasitées). Le frottis sanguin permet le diagnostic d'espèce responsable par l'observation morphologique des parasites dans les hématies [18]. Celui-ci est important pour juger de la gravité de l'accès palustre (risque mortel pour *P. falciparum*), de déterminer le risque de reviviscence (*P. vivax*, *P. ovale*) et d'adapter la stratégie thérapeutique. Le frottis a une sensibilité estimée à 100 hématies parasitées par  $\mu\text{L}$ . Lorsque la parasitémie est inférieure à ce seuil, notamment si le malade non immun a suivi une chimioprophylaxie, le diagnostic devient plus difficile d'où l'observation au préalable par des techniques de concentration plus sensibles comme la goutte épaisse. La parasitémie est calculée à partir du nombre d'hématies parasitées par des formes asexuées du parasite sur au moins 25 champs microscopique à l'objectif 100x [18].

### 1.5.3- Test de diagnostic rapide (TDR)

Ces tests reposent sur la détection des antigènes palustres par technique immunochromatographique. Les tests de diagnostics rapides les plus couramment employés reposent sur la détection de protéines plasmodiales (pLDH/aldolase communes aux 4 espèces, PfHRP2/PfLDH spécifiques de *P. falciparum*, PvLDH spécifique de *P. vivax*). Ces tests ont une sensibilité comprise entre 90 et 100% et une spécificité entre 52 et 99% dépendante de l'espèce [19]. Une goutte de sang déposée sur une bandelette suffit pour obtenir un résultat, une solution tampon est ajoutée afin d'éviter la lyse des hématies et ainsi permettre la migration des complexes antigènes-anticorps au sein de la bandelette. En France, ils sont surtout utilisés en complément des examens microscopiques comme diagnostic de confirmation. Les principaux avantages des TDR sont leur sensibilité (environ 100 parasites/ $\mu$ L pour la majorité des tests détectant *P. falciparum* soit une sensibilité équivalente au frottis sanguin), leur rapidité (15 à 45 minutes) et leur facilité d'exécution et de lecture. Cependant les TDR ne permettent pas d'estimer la parasitémie, et présente un risque de faux négatifs en cas de faible parasitémie ou de souche plasmodiale portant une mutation de l'HRP2 et de faux positifs par la persistance des antigènes du parasite plusieurs semaines après la guérison. Ils sont particulièrement indiqués en dispensaire lorsque la microscopie n'est pas disponible, notamment dans des zones rurales d'endémie palustre, ne disposant ni de matériels ni de personnels formés aux examens microscopiques. Dans ces zones endémiques où le revenu moyen est souvent faible, ils présentent un bon rapport coût-efficacité par rapport au traitement présomptif [19].

### 1.5.3- Méthodes de diagnostics indirectes

Elles n'ont pas d'indication pour le dépistage d'urgence du paludisme. On retrouve parmi ces méthodes : la sérologie par techniques ELISA ou par IFI. Elles sont surtout utilisées pour la surveillance épidémiologique, le diagnostic rétrospectif d'un accès palustre (patient traité en zone d'endémie sans argument biologique de certitude), le diagnostic d'un paludisme viscéral évolutif ou d'une splénomégalie malarique hyperimmune [20].

### 1.5.4- La recherche des acides nucléiques par PCR

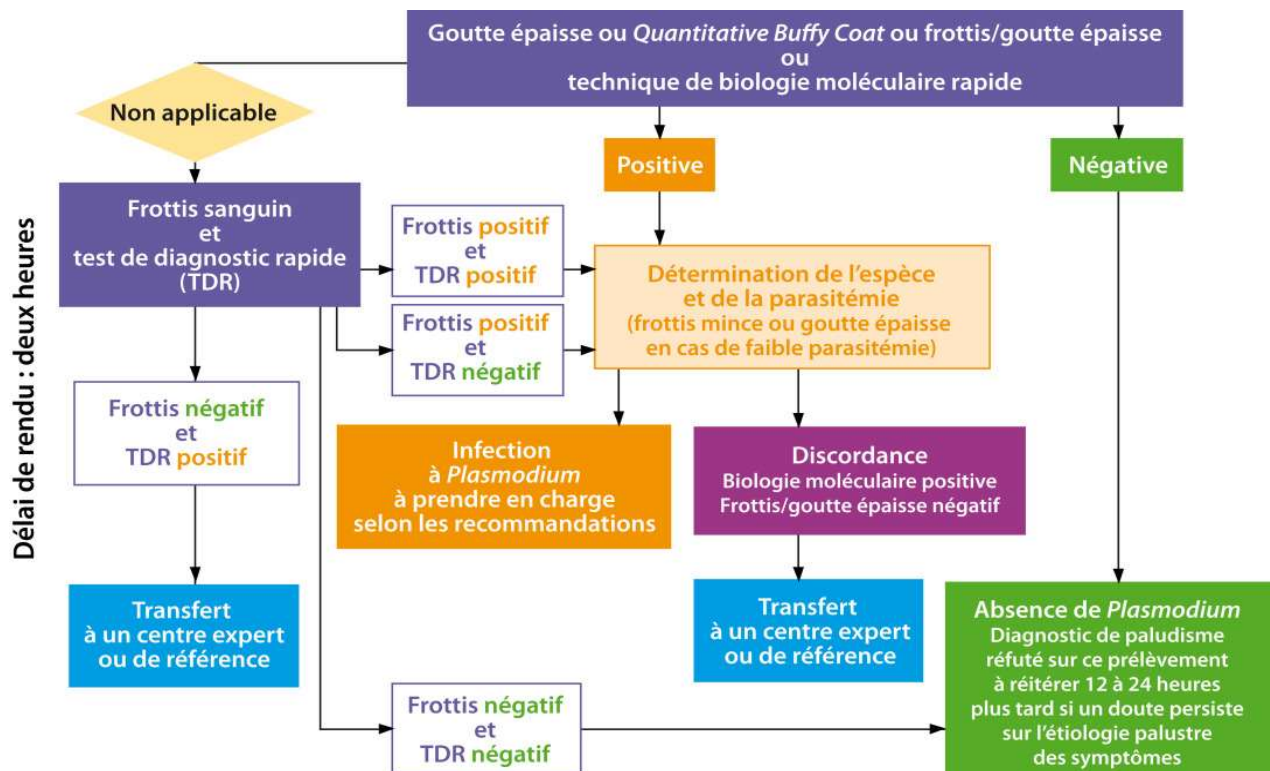
#### PCR en temps réel :

Cette technique permet le diagnostic positif du genre et d'espèce plasmodium. La VPN (Valeur Prédictive Négative) est très élevé. Elle est très sensible, le seuil de détection est de 0,5 à 0,0005 parasites/ $\mu$ L de sang. Cette méthode possède la meilleure sensibilité, permettent de diagnostiquer des infections mixtes, de quantifier l'ADN plasmodial et également de rechercher des marqueurs de résistance aux antipaludéens [20]. Cependant, la technique est très coûteuse et nécessite des équipements spécifiques, de l'électricité et un personnel hautement qualifié. De plus le résultat est difficile à rendre en 2h. Elles ne sont donc pas utilisées en routine mais peuvent être utilisées en diagnostic de recours en cas de difficultés diagnostiques dans les cas de très forte suspicion de paludisme [20]. Toutefois, des faux négatifs peuvent être observés sur la séquence amplifiée si la souche plasmodiale présente des mutations. On observe aussi une positivité prolongée d'environ 35 jours après le traitement, ce qui implique que ce test n'est pas adapté au suivi post-thérapeutique.

PCR LAMP :

La technique d'amplification de l'acide nucléique (NAAT) par la PCR en temps réel reste inaccessible dans les structures à ressources limitées et les sites éloignés car elle nécessite une infrastructure, des réactifs coûteux et une expertise technique. Récemment, la technique de diagnostic moléculaire isotherme telle que l'amplification isotherme induite par boucle (LAMP) allie une grande sensibilité analytique (2 parasites/ $\mu\text{L}$ ) à des spécifications techniques qui facilitent leur mise en œuvre dans des zones rurales ou éloignées des structures hospitalières. La technique LAMP permet un résultat après 50 minutes pour un coût nettement moins élevé que la PCR en temps réel. Toutefois, cette méthode ne permet qu'un diagnostic du genre plasmodial. Ainsi, son apport essentiel réside dans son excellente valeur prédictive négative évaluée à 98%. Enfin, tout comme la PCR en temps réel la présence d'ADN du plasmodium ne permet pas de différencier une infection récente d'une infection plus ancienne [20,22].

**Figure 7 : Logigramme du diagnostic biologique du paludisme selon les recommandations de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) (Marie-Fleur Durieux : Diagnostic biologique du paludisme <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2018.01.006>)**



## 1.6- Les anti malariques

Le traitement de l'accès palustre est un traitement d'urgence. La prise en charge du paludisme d'importation, y compris de l'accès non compliqué, est en règle conduite ou au moins inaugurée en milieu hospitalier. Les raisons principales, en sont la gravité potentielle de la maladie chez un patient non immun.

Les molécules utilisées dans le traitement curatif sont entre-autres : les anti malariques naturels ou d'hémisynthèse, les anti malariques de synthèse.

### 1.6.1- Les anti malariques naturels

On retrouve dans ce groupe la quinine, l'artémisinine et ses dérivés (Artéméther, Artésunate, Dihydroartémisinine, Artémotil). La quinine agit principalement sur les trophozoïtes matures de l'hématozoaire mais n'empêche ni la séquestration ni le développement ultérieur des stades annulaires circulants de *P. falciparum*. L'artémisinine est un puissant schizonticide sanguin à action rapide qui est actif contre toutes les espèces de Plasmodium. Il a une action aussi bien sur les stades annulaires jeunes que sur les schizontes [23].

### 1.6.2- Les anti malariques de synthèse

#### Les amino-4-quinoléines :

Il regroupe la chloroquine et l'amodiaquine. La chloroquine n'est pratiquement plus utilisée contre le *Plasmodium falciparum* à cause d'une résistance très répandue, mais elle reste néanmoins efficace contre les infestations à *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium malariae* [24]. L'amodiaquine est efficace contre certaines souches de *P. falciparum* chloroquino-résistantes.

#### Les amino-8-quinoléines :

On retrouve la primaquine et la tafénoquine qui sont des gamétocides, schizonticides sur les formes intra hépatiques et érythrocytaires.

#### Les amino-alcools :

Ce groupe regroupe les molécules comme l'halofantrine, la luméfantrine et la méfloquine. Elles sont schizonticides sur les formes érythrocytaires de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium ovale*.

#### Les Sulfonamides :

Ce sont les sulfamides retard (Sulfadoxine), les sulfones (dapsoné). Les Sulfonamides sont des Schizonticides érythrocytaires par inhibition de la dihydrofolate réductase.

#### Diaminopyrimidines Biguanides :

On dispose de la pyriméthamine et de la proguanil qui ont la même action que les sulfonamides.

### 1.6.3- Les Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine (CTA)

C'est une combinaison qui consiste à associer un antipaludique à courte durée d'action (un dérivé de l'artémisinine) et un autre antipaludique à action prolongée (amodiaquine, luméfantine, méfloquine, sulfadoxine pyriméthamine...) en vue de mettre à profit l'association synergique ou additive des molécules afin d'améliorer leur efficacité thérapeutique et de retarder l'apparition d'une résistance.

D'après les directives OMS pour le traitement du paludisme, les CTA recommandées actuellement sont les suivantes [25] :

-Coartem®/Riamet® (Artéméther-luméfantine) : cette combinaison est actuellement disponible sous forme de comprimés contenant chacun 20 mg d'artéméther et 120 mg de luméfantine. L'avantage de cette association est que la luméfantine n'est pas disponible en monothérapie et n'a jamais été utilisée seule pour le traitement du paludisme.

-ASAQ®/Coarsucam® (Artésunate-amodiaquine) : Ces produits sont actuellement disponibles en association fixe sous la forme de comprimés sécables séparés contenant respectivement 25/67,5 mg, 50/135 mg ou 100/270 mg d'artésunate et d'amodiaquine.

-Arsudar® (Artésunate-sulfadoxine pyriméthamine) : cette association est actuellement disponible sous forme de comprimés sécables séparés contenant les uns 50 mg d'artésunate et les autres 500 mg de sulfadoxine et 25 mg de pyriméthamine.

-ASMQ® (Artésunate-méfloquine) : cette association est actuellement disponible sous forme de comprimés sécables séparés contenant l'un 50 mg d'artésunate et l'autre 250 mg de méfloquine base.

## 1.7- Chimio prophylaxie et lutte antivectorielle

En zone endémique la prévention du paludisme repose sur la protection contre les piqûres de moustiques au niveau individuel et collectif. Chez le voyageur en zone d'endémicité en plus de la protection contre les piqûres de moustiques, une chimio prophylaxie adaptée au risque selon le type de voyage (destination, période, ...) et ses conditions de déroulement doit être envisagée [12].

La protection antivectorielle collective et individuelle repose sur l'utilisation de moustiquaire imprégnée d'insecticides à longue durée d'action ou moyennant la pulvérisation d'insecticide à effet rémanent à l'intérieur des habitations, de répulsif cutané, et le port de vêtements longs idéalement imprégnés. Les recommandations de chimio prophylaxie prennent essentiellement en compte le risque d'infection par *P. falciparum*. Elles s'adressent spécifiquement aux voyageurs, non aux résidents, sauf cas particuliers (femmes enceintes, transmission saisonnière ou très localisée). Elle doit donc être envisagée de manière systématique pour tout sujet se rendant en zone impaludée.

**Tableau 1** : Médicaments recommandés pour la chimioprophylaxie du paludisme (BHE 2019)

Molécule	Présentations	Posologies enfant et adulte	Durée, indications, précautions d'emploi, contre-indications
<b>Atovaquone-Proguanil</b>	Cp* pédiatrique (cpP) à 62,5 mg/25 mg  Cp* adulte (cpA) à 250 mg/100 mg	<b>Enfant :</b> 5-7 kg : dose équivalente à ½ cpP/j (hors AMM, préparation magistrale nécessaire) 8-<11 kg : dose équivalente à ¾ cpP/j (hors AMM, préparation magistrale nécessaire) 11-<21 kg : 1 cpP/j 21-<31 kg : 2 cpP/j 31-<40 kg : 3 cpP/j >40 kg : 1cpA/j <b>Adulte :</b> 1 cpA/j	<ul style="list-style-type: none"> <li>- À prendre au cours d'un repas ou avec une boisson lactée, à heure fixe</li> <li>- <b>Début du traitement</b> : 24 à 48 h avant le jour d'entrée dans la zone à risque ou le jour d'entrée selon les indications du fabricant</li> <li>- À prendre pendant le séjour et 1 semaine après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme</li> <li>- <b>La restriction de son utilisation au-delà de 3 mois a été levée</b></li> <li>- Peut-être envisagé, si nécessaire, chez la femme enceinte</li> <li>- <b>Effets indésirables</b> : augmentation de l'INR** pour les patients sous AVK***</li> </ul>
<b>Chloroquine</b>	Sirop à 25 mg=5 ml Cp* sécable à 100 mg	<b>Enfant :</b> <b>1,7 mg/kg/j</b> <10 kg : 25 mg 1 j/ 2. ≥10-16 kg : 25 mg/j >16-33 kg : 50 mg/j >33-45 kg : 75 mg/j >45 kg : 1 cp/j <b>Adulte :</b> 1 cp/j	<ul style="list-style-type: none"> <li>- À prendre le jour du départ, pendant le séjour et pendant 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme</li> <li>- Ne doit pas être utilisée chez la femme enceinte ou qui allaite sauf en l'absence d'alternative plus sûre</li> <li>- Contraception nécessaire chez les hommes et femmes en âge de procréer pendant le traitement et jusqu'à 8 mois après l'arrêt du traitement (cf. rubriques 4.6 et 4.3 du RCP mis à jour le 24/07/2018)</li> <li>- Attention aux intoxications accidentelles</li> </ul>
<b>Chloroquine-Proguanil</b>	Cp* à 100 mg/200 mg	<b>Enfant :</b> à partir de 15 ans et >50 kg : 1 cp/j <b>Adulte :</b> 1 cp/j	<ul style="list-style-type: none"> <li>- À prendre en fin de repas, au moins 24 h avant le départ, pendant le séjour et 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme</li> <li>- Réservé aux adultes et adolescents de 15 ans et plus et pesant au moins 50 kg</li> <li>- Pour la femme enceinte ou qui allaite : se référer aux modalités préconisées pour la chloroquine</li> <li>- <b>Effets indésirables</b> : augmentation de l'INR** pour les patients sous AVK***</li> </ul>
<b>Doxycycline</b>	Cp* à 50 mg Cp* à 100 mg Cp* sécable à 100 mg	<b>Enfant :</b> ≥8 ans et <40 kg : 50 mg/j >8 ans et ≥40 kg : 100 mg/j <b>Adulte :</b> 100 mg/j :	<ul style="list-style-type: none"> <li>- À prendre pendant le repas du soir au moins 1 heure avant le coucher, la veille du départ, pendant le séjour et 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme</li> <li>- <b>Contre-indications</b> : femme enceinte, enfant âgé de moins de 8 ans</li> <li>- <b>Effets indésirables</b> : <ul style="list-style-type: none"> <li>• photosensibilisation</li> <li>• potentialisation de l'effet des AVK*** par modification de la flore saprophyte</li> </ul> </li> </ul>
<b>Méfloquine</b> (Voir encadré ci-dessous)	Cp* sécable à 250 mg	<b>Enfant :</b> <b>5 mg/kg/semaine</b> 5-14 kg : 5 mg/kg/sem, (= 1/8 cp/sem), (hors AMM) 15-19 kg : ¼ cp/sem >19-30 kg : ½ cp/sem >30-45 kg : ¾ cp/sem >45 kg : 1 cp/sem <b>Adulte :</b> 1 cp/sem	<ul style="list-style-type: none"> <li>- À commencer 10 jours avant le départ jusqu'à 3 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme</li> <li>- Pour les sujets n'ayant jamais pris de méfloquine : première prise 10 jours avant l'exposition au risque afin de vérifier l'absence d'effets secondaires lors de la deuxième prise, soit 3 jours avant l'entrée dans la zone à risque</li> <li>- Ce délai de 10 jours n'est pas indispensable pour les sujets connus pour supporter la méfloquine et n'ayant pas de contre-indication apparue à la date de la nouvelle prise</li> <li>- <b>Contre-indications</b> : convulsions, troubles neuropsychiques</li> <li>- <b>Déconseillé en cas de pratique de la plongée</b></li> <li>- Peut-être administré à la femme enceinte</li> </ul>
<b>Proguanil</b>	Cp sécable à 100 mg	<b>Enfant âgé de 1 à 12 ans :</b> <b>3 mg/kg/j</b> 9-17 kg : ½ cp/j > 17-33 kg : 1cp/j >33,5-45 kg : 1cp ½ /j <b>Adulte et enfant âgé de plus 12 ans :</b> 200 mg/j	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uniquement en association avec la chloroquine</li> <li>- À prendre pendant le séjour et 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme</li> <li>- Pour la femme enceinte: appliquer les nouvelles modalités d'emploi dès leur publication (RCP en cours de révision), en raison de l'association avec la chloroquine</li> <li>- <b>Effets indésirables</b> : augmentation de l'INR** pour les patients sous AVK***</li> </ul>

\* Cp : comprimé. Avant l'âge de 6 ans pour des raisons pratiques, il peut être nécessaire d'écraser les comprimés.  
\*\* INR : *International Normalized Ratio*.  
\*\*\* AVK : anti-vitamine K (warfarine, acénocoumarol, fluindione).

## 2- OBJECTIFS DE L'ETUDE

La PCR Illumigene® MALARIA par méthode LAMP est un test diagnostique sensible, fiable, avec une excellente valeur prédictive négative qui permet un diagnostic d'urgence en 50 minutes environ. Les situations d'absence de personnels qualifiés, de très faible parasitémie sont autant d'arguments en faveur de ce test diagnostique du paludisme. Cependant, cet examen ne permet pas l'identification d'espèce ni la détermination de la parasitémie et du stade parasitaire.

L'objectif principal de ce travail est :

- de réaliser au CHU de Lille une comparaison des performances diagnostiques de la PCR Illumigene® MALARIA LAMP aux méthodes microscopiques ainsi qu'à l'identification d'espèce par la biologie moléculaire réalisée au CNR.

Les objectifs secondaires sont les suivants :

- identification des présentations cliniques des cas de PCR LAMP positives (accès grave, accès simple, récurrence)

- appréciation rétrospective des stratégies thérapeutiques initiées notamment lorsque la PCR LAMP était positive et les méthodes microscopiques négatives.



### 3- MATERIELS ET METHODES

#### Type d'étude

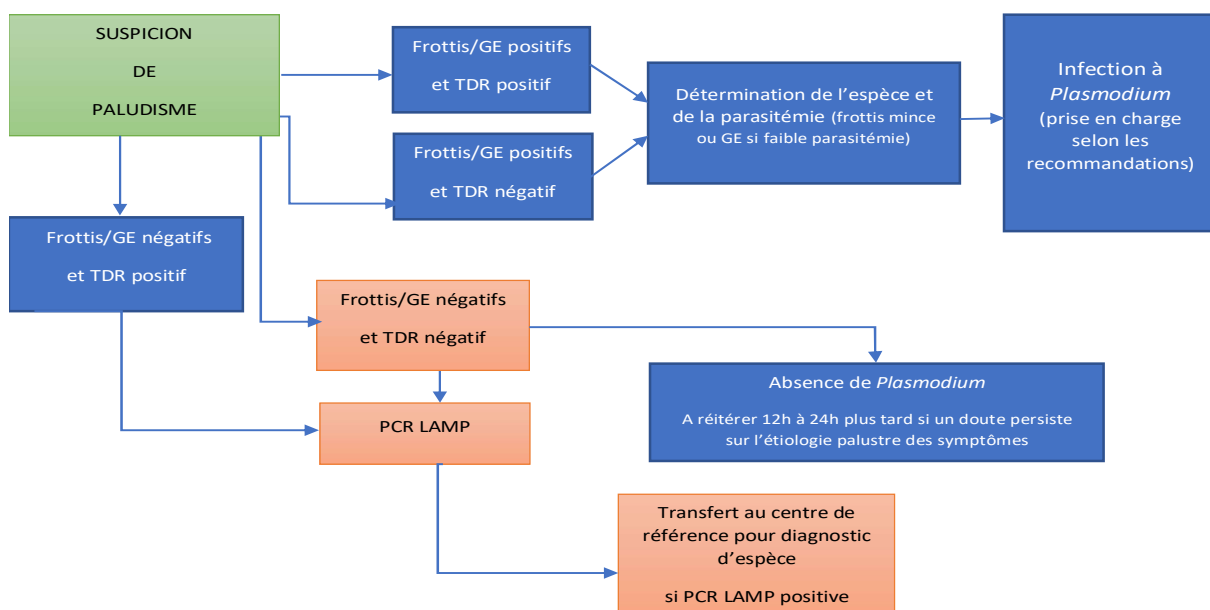
Il s'agit d'une étude observationnelle monocentrique, descriptive et rétrospective incluant les cas de suspicion de paludisme au laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHU de Lille entre janvier 2016 et août 2019.

#### Recueil de données

La PCR Illumigene® MALARIA LAMP était essentiellement réalisée pour toute présomption importante d'accès palustre avec frottis négatif et goutte épaisse négative sur le prélèvement à l'entrée après concertation avec le médecin urgentiste ou infectiologue en charge du patient (**Figure 8**). Les autres situations pour lesquelles la PCR Illumigene® MALARIA LAMP était utilisée sont : discordance entre le frottis/GE et le test immunochromatographique, pour la sécurité transfusionnelle, le don d'organe, pour tout patient symptomatique sans chimioprophylaxie et enfin en cas de fièvre isolée récurrente sans étiologie retrouvée avec notion de voyage même ancien.

Pour chaque cas inclus, les analyses ont été réalisées dans le laboratoire de microbiologie du CHU de Lille. Les tests effectués en plus de la PCR Illumigene® MALARIA LAMP étaient le frottis sanguin/goutte épaisse, un test immunochromatographique PALUTOP +4 (optima®). Lorsque la PCR Illumigene® MALARIA LAMP positive, l'échantillon était adressé au Centre National de Référence pour recherche par PCR en temps réel, permettant ainsi une identification de l'espèce plasmodiale.

**Figure 8 : Logigramme du diagnostic biologique du paludisme utilisé au CHU de Lille (délai de rendu : 2heures)**



## **METHODES**

La technique PCR LAMP malaria Illumigene® utilisée dans notre étude est un test de diagnostic développé par la société Meridian Bioscience. C'est un test moléculaire qui utilise la technologie LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) pour amplifier l'ADN et détecter la présence du *Plasmodium*. L'amplification isotherme médiée par des boucles ou LAMP est une technologie de détection moléculaire qui cible l'ADN et utilise des réactifs pré-mesurés autonomes. La PCR LAMP incube, détecte et rapporte à une seule température, ce qui permet d'obtenir des résultats plus rapides. La technologie Illumigene® est simple d'utilisation et les résultats sont disponibles en moins d'une heure.

L'identification microscopique (par le frottis sanguin et la goutte épaisse) a été utilisée pour le diagnostic de paludisme avec un résultat rendu dans les deux heures suivant le prélèvement sanguin. La coloration au Giemsa est la méthode de coloration classique pour ces techniques. Le kit TDR est PALUTOP +4 (optima®), test immunochromatographique rapide permettant la détection qualitative de l'antigène Pf HRP-2 (histidine rich protein-2) spécifique de *P. falciparum*, pLDH spécifique de *P. vivax* et pLDH communs à toutes les espèces de *Plasmodium* (pan espèces). Le test peut être utilisé pour la détection spécifique de *P. falciparum* et *P. vivax*, pour le diagnostic différentiel de *P. malariae* et *P. ovale*.

Les critères de gravité cliniques et biologiques, les autres parasitoses ou viroses éventuellement associées à l'accès palustre ont été également recherchés. Les résultats biologiques obtenus au CHU de Lille ont été comparés avec ceux du CNR paludisme. Les traitements prescrits en première intention dans ce contexte de PCR LAMP positive ont été analysés rétrospectivement à la lumière du diagnostic d'espèce fait par le CNR.

Les recommandations françaises 2007 réactualisés en 2017 par la SPILF pour la pratique clinique définissent les critères de gravité du paludisme grave [12]. Le diagnostic de paludisme grave associe au moins un critère défini par l'OMS à un diagnostic positif de paludisme (**Tableau 2**). Les données suivantes sont celles qui ont permis l'évaluation des présentations cliniques des patients observés dans notre travail : les signes de défaillances cardio-vasculaires, neurologiques, respiratoires, ictère clinique. Les données biologiques suivantes sont celles retenues pour l'évaluation de la gravité : l'ictère biologique, la parasitémie, les plaquettes, l'hyperlactatémie, créatininémie, CRP, LDH, glycémie, hémoglobine, l'hématocrite.

L'extraction rétrospective des résultats biologiques est réalisée via le logiciel Molis®. L'exploitation des données cliniques rapportés dans les courriers, ont été extraites à partir du logiciel Sillage® (dossier médical informatisé).

**Tableau 2** : Signes de gravité du paludisme : critères OMS 2000

Défaillance neurologique	Obnubilation, confusion, somnolence, coma (score de Glasgow < 11)
Défaillance respiratoire	Sans ventilation mécanique : PaO <sub>2</sub> < 60 mmHg ou SPO <sub>2</sub> < 90% en air ambiant ou fréquence respiratoire > 32/min - Avec ventilation mécanique ou ventilation non invasive : PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> < 300 mmHg
Défaillance circulatoire	PAS* < 80 mmHg avec signes périphériques Drogues vaso-actives Signes périphériques d'insuffisance circulatoire
Convulsions répétées	Au moins 2/24h
Hémorragie	Définition purement clinique
Ictère	Clinique ou bilirubine totale > 50 μmol/L
Hémoglobinurie microscopique	Rare
Anémie profonde	Hémoglobine < 7 g/dl, hématocrite < 20%
Hypoglycémie	Glycémie < 2,2 mmol/L
Hyperlactatémie	Toute valeur > normale
Hyperparasitémie	> 4%, notamment chez le non immun
Insuffisance rénale	Créatininémie > 265 μmol/L ou urée sanguine > 17 mmol/L et diurèse < 400 ml/24 malgré réhydratation

## 4- RESULTATS

Entre janvier 2016 et décembre 2019, 1254 demandes de recherche de paludisme ont été adressées au laboratoire de microbiologie du CHU de Lille. Un total de 121 demandes étaient positives, soit 105 *Plasmodium falciparum*, 10 *Plasmodium vivax*, 3 *Plasmodium vivax* et 3 *Plasmodium malariae*. Sur les 159 tests réalisés par PCR LAMP, 8 tests étaient positifs. Eu égard au résultat de la PCR Illumigene® MALARIA LAMP, 8 patients ont donc été inclus dans l'étude. D'abord nous décrivons de façon exhaustive deux situations cliniques afin de mettre en lumière l'intérêt de la PCR LAMP dans le diagnostic du paludisme d'importation. La première situation concerne un cas de paludisme à *Plasmodium falciparum* et le second cas un paludisme à *Plasmodium malariae*. Nous détaillerons ensuite l'ensemble des résultats obtenus.

### 4.1- Les situations cliniques détaillées

#### 4.1.1- Première situation clinique : paludisme à *Plasmodium Falciparum* (2018)

Il s'agit d'un homme âgé de 19 ans, migrant, originaire du Mali, en cours d'adoption par un couple français et arrivé en France 18 mois auparavant. A l'entrée aux urgences le patient présente un tableau de douleurs abdominales intenses rapidement progressives au décours d'une course à pied. Les douleurs sont principalement épigastriques avec irradiation dorsale, sans position antalgique. Le bilan biologique retrouvait une discrète cholestase à 2 fois la normale associée à une anémie microcytaire (hémoglobine à 11,5 g/dl) avec un VGM bas à 74 fl, stigmates d'hémolyse (bilirubine non conjuguée augmentée, haptoglobine effondrée, LDH élevés). L'échographie abdominale retrouvait une vésicule biliaire alithiasique, indolore au passage de la sonde, le scanner abdominal injecté ne montrait aucune anomalie en dehors d'une formation hypodense de 5mm du segment V hépatique, non caractérisable sur cet examen. L'IRM rachidienne réalisée afin de ne pas méconnaître une spondylodiscite était normale de même que la radiographie thoracique. L'avis chirurgical sollicité ne retenait pas d'indication chirurgicale et préconisait une fibroscopie oesogastroduodénale qui a retrouvé une gastrite discrète et une œsophagite de grade A. Le quatrième jour de son hospitalisation aux urgences, un syndrome inflammatoire biologique s'installe avec la présence d'une CRP se majorant jusqu'à 250 mg/l, l'anémie se majore avec majoration des stigmates d'hémolyse. Un frottis et goutte épaisse sont réalisés avec comme conclusion : absence d'hématozoaire du paludisme, avec cependant présence d'une faible bande d'antigène plasmodial circulant (*Plasmodium falciparum*) associée à la présence d'ADN de *Plasmodium* à la PCR LAMP. Le prélèvement fut adressé au CNR pour identification de l'espèce plasmodiale. Après la prise en charge aux urgences, le patient est transféré dans l'unité de maladies infectieuses du CHU de Lille où un traitement par Eurartésim® est introduit avec une bonne tolérance clinique. Le frottis et la goutte épaisse à J3 sont revenus négatifs.

Au cours de l'hospitalisation, les sérologies VIH, VHC, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* étaient négatives. La sérologie VHB montrait la présence isolée d'anticorps anti-Hbc positifs. L'examen parasitologique des selles a retrouvé des kystes d'*Entamoeba coli*. Un traitement par Intétrix 2 gélules x 2/j pendant 10 jours a été prescrit.

En outre l'interrogatoire a retrouvé une symptomatologie évoquant de crises vaso-occlusives (crises douloureuses répétées dans l'enfance chez le patient et symptomatologie identique chez un frère, syndrome douloureux abdominal spontanément résolutif sous antalgiques). L'électrophorèse de l'hémoglobine a confirmé le diagnostic de drépanocytose homozygote SS. L'identification de l'espèce plasmodiale rendu par le CNR était en faveur d'un *P. falciparum*. Le contrôle de la parasitémie à J28 était négatif. La sérologie anguillulose était négative mais la sérologie Schistosomose positive (ELISA et Western blot positifs). Les trois examens parasitologiques des selles et urines n'ont pas permis de mettre en évidence la présence d'œufs de *Schistosma sp.* Néanmoins, un traitement par Praziquantel 60 mg/kg, dose unique en deux prises, avec suivi sérologique à 6 mois a été prescrit.

Ce cas 1 correspond à la récurrence d'un accès palustre chez un sujet malien entré en France en novembre 2016 et ayant présenté une crise de paludisme à *P. falciparum* en juillet 2018. Il y a donc par conséquent 20 mois entre le moment de sortie d'une zone d'endémie et l'entrée en zone non endémique. On peut considérer qu'une période d'au moins 20 mois s'est écoulé entre la primo-infection et la récurrence en France.

#### **4.1.2- Deuxième situation clinique : paludisme à *Plasmodium malariae* (2018)**

Il s'agit d'un jeune homme âgé de 19 ans sans antécédent notable ayant séjourné quatre semaines en Côte d'Ivoire pendant le mois de juillet. Les vaccinations étaient à jour notamment le vaccin anti-amarile et les vaccins contre l'hépatite A et B. La prévention anti-vectorielle par moustiquaire a été respectée durant tout le voyage, cependant la chimio-prophylaxie par Malarone fut interrompu devant la mauvaise tolérance digestive.

Au retour de voyage, le patient présente un épisode d'hyperthermie pendant 48h. Après consultation auprès du médecin traitant, le patient repart avec un traitement symptomatique et évolution est rapidement favorable. Quelques jours plus tard, le patient consulte aux urgences pour un nouvelle épisode d'hyperthermie à 39°C associée à des tremblements, des céphalées frontales et pulsatiles associées à une diarrhée aqueuse. Le frottis sanguin et la goutte épaisse sont initialement rendus négatifs. On note l'absence de syndrome inflammatoire biologique. Après un avis avec un infectiologue du CHU de Lille, le patient retourne au domicile avec surveillance clinique et biologique.

Cependant, le lendemain de la sortie des urgences, la recherche de l'ADN du plasmodium sur prélèvement sanguin revient positive, le patient est convoqué aux urgences. En l'absence de signes de gravité clinico-biologiques, un traitement par Euratésim® (4 comprimés par jour en une prise pendant trois jours) est prescrit et un transfert en service de maladies infectieuses pour suite de la prise en charge effectué. L'évolution clinique est marquée par la survenue de céphalées pulsatiles frontales avec une raideur méningée modérée et quelques diarrhées rapidement résolutives. Le patient a également présenté une sensibilité en hypochondre droit sans défense. Sur le plan biologique on a noté un syndrome inflammatoire biologique modéré avec une CRP à 59mg/l, une thrombopénie à 100.000 plaquettes/mm<sup>3</sup>, pas de cytolysé hépatique, pas d'anémie, Fonction rénale normale. La ponction lombaire est normale avec une culture stérile. Les sérologies VHA, VIH, VHB, VHC, VHE, CMV, EBV, syphilis, rickettsiose, dengue sont revenues négatives. L'évolution clinico-biologique a été favorable avec disparition des céphalées, des signes digestifs, régression du syndrome inflammatoire biologique, et les contrôles de la parasitémie à J3 et J7 étaient négatifs. La PCR spécifique d'espèce réalisée par le CNR est revenue positive à *Plasmodium malariae*. Le contrôle de la parasitémie à J28 était négatif.

## 4.2- Epidémiologie et présentation clinique des patients inclus

Dans toutes les situations retenues pour notre travail les patients avaient tous séjournés en Afrique Sub-saharienne dont 6 patients en Afrique de l'Ouest et 2 patients en Afrique centrale. Les pays de provenance sont les suivants : Cameroun, Mali, Côte-d'Ivoire, Ghana et Guinée-Conakry. Les sept patients inclus ont consulté les urgences de l'hôpital Salengro du CHU de Lille. Un patient a bénéficié d'un traitement ambulatoire du paludisme et est retourné à domicile après sa prise en charge aux urgences avec une consultation programmée dans le service des maladies infectieuses à J7. Après leur passage aux urgences trois patients ont été hospitalisés dans le service de pathologies infectieuses, deux patients ont été hospitalisés dans le service de médecine polyvalente post-urgences, un patient a été hospitalisé en réanimation, enfin un patient a été transféré dans le service universitaire des pathologies infectieuses du centre hospitalier de Tourcoing.

### 4.2.1- Description épidémiologie de la population étudiée

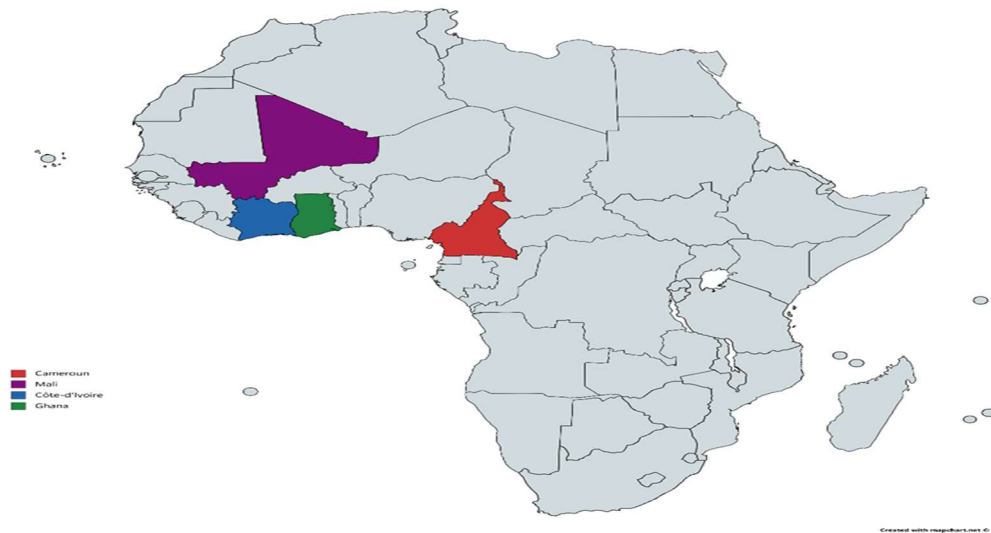
Notre échantillon comprend cinq hommes et trois femmes. L'âge des patients est compris entre 16 ans et 62 ans. Six patients revenaient d'un séjour récent en zone d'endémie et deux patients étaient de nouveaux arrivants en France (**Figure 9**).

Parmi les six patients revenant d'un séjour récent en zone tropicale, deux patients ont confirmé la prise d'une prophylaxie antipalustre. Cependant une non observance de la prophylaxie et une interruption pour cause d'intolérance digestive ont été relevés chez ces deux patients. Les quatre autres patients n'ont pas pris de prophylaxie (**Tableau 3**).

**Tableau 3** : Epidémiologie de la population étudiée

	Cas 1	Cas 2	Cas 3	Cas 4	Cas 5	Cas 6	Cas 7	Cas 8
<b>Sexe</b>	Homme	Femme	Homme	Homme	Homme	Homme	Femme	Femme
<b>Age</b>	19	26	19	16	56	62	35	54
<b>Pays de résidence</b>	France (depuis 18mois)	France	Côte-D'ivoire	France	France	France (depuis 3 mois)	France	France
<b>Pays de provenance</b>	Mali	Ghana	Côte-D'ivoire	Côte-D'ivoire	Cameroun	Côte-D'ivoire	Guinée-Conakry	Cameroun
<b>Prophylaxie</b>	Non	Non	Malarone	Non	Non	Non	Nivaquine	Non
<b>Année du diagnostic</b>	2018	2018	2018	2016	2017	2017	2019	2016

**Figure 9 : Répartition géographique des zones de provenance des sept cas inclus**



**4.2.2- Présentations cliniques initiales dans la population étudiée**

En se référant aux critères de gravités réactualisés en 2007 par la SPILF définissant un paludisme grave, sept patients n’ont pas présenté de signes cliniques de gravité au moment de leur prise en charge et un patient a présenté un neuropaludisme marqué par un épisode de crise tonico-clonique suivi d’un coma motivant une hospitalisation en service de réanimation (**Tableau 4**). La symptomatologie clinique ayant motivé l’entrée aux urgences était : douleurs abdominales (n= 3), fièvre (n=5), céphalée(n=2), diarrhées (n=4), frissons(n=3), arthralgies(n=1), malaise vagale (n=1), courbatures (n=1), convulsions (n=1). La fièvre est le symptôme le plus fréquemment retrouvé, suivie de diarrhées et des douleurs abdominales. Aucun patient n’a présenté d’ictère.

**Tableau 4 : Caractéristiques cliniques de la population étudiée**

	Cas 1	Cas 2	Cas 3	Cas 4	Cas 5	Cas 6	Cas 7	Cas 8
<b>Douleurs abdominales</b>	✓		✓		✓			
<b>Fièvre</b>	✓	✓	✓			✓	✓	
<b>Céphalées</b>			✓				✓	
<b>Frissons</b>			✓	✓				✓
<b>Diarrhées</b>		✓	✓		✓	✓		
<b>Arthralgies</b>							✓	
<b>Courbatures</b>		✓						
<b>Malaise Vagale</b>				✓				
<b>Ictère</b>								
<b>Convulsions et coma</b>								✓

### 4.3- Résultats biologiques

Le CNR a permis d'identifier trois cas d'infection à *P. falciparum*, trois cas à *P. malariae* et un cas de *P. ovale*. Un échantillon de sang n'a pas été envoyé au CNR. Une négativité de la microscopie était retrouvée chez six patients et deux patients présentaient une parasitémie très faible puisqu'estimée à moins de 0.01%.

L'ensemble des patients ne présentaient pas d'argument biologique en faveur d'un paludisme grave. En effet, aucun patient n'a présenté d'hyperlactatémie, d'acidose métabolique, d'anémie profonde, d'hypoglycémie ou une parasitémie supérieure à 4 % (**Tableau 5**). Une thrombopénie (plaquettes < 150 000 G/L) était présente chez trois patients. La créatininémie était augmentée pour les cas 5 et 6 à 17mg, 14mg/L respectivement (valeur normale comprise entre 6-11 mg/L). La C-réactive Protéine était accrue chez sept patients avec une concentration sérique comprise entre 13 et 250 mg/L (positivité si > 6mg/L). La valeur de CRP la plus élevée, retrouvée 250 mg/L, concernait le patient présentant un paludisme à *P. falciparum*. La glycémie était comprise entre 0,81 et 1,48 g/L dont le taux le plus élevé concernait un patient diabétique. Une anémie modérée était présente chez 4 de nos patients, dont l'hémoglobine la plus basse à 8,2 g/dL, était trouvée chez un patient qui présentait par ailleurs des facteurs pouvant être responsable d'une anémie chronique secondaire (cirrhose et insuffisance rénale chronique).

**Tableau 5** : Caractéristiques biologiques de la population étudiée

	Cas 1	Cas 2	Cas 3	Cas 4	Cas 5	Cas 6	Cas 7	Cas 8
<b>Diagnostic d'espèce</b>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. malariae</i>	Pas d'envoi d'échantillon au CNR	<i>P. ovale</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i>
<b>Parasitémie</b>	Microscopie négative	Inférieure à 0,01%	Microscopie négative	Microscopie négative	Microscopie négative	Inférieure à 0,01%	Microscopie négative	Microscopie négative
<b>Acidose Métabolique</b>	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON
<b>Hyperlactatémie</b>	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON
<b>Plaquettes (/mm<sup>3</sup>)</b>	208000	157000	100000	266000	255000	92000	149000	157000
<b>Créatininémie (mg/L)</b>	9	9	10	8	17	14	8	6
<b>CRP (mg/L)</b>	250	48	59	Inférieur à 5	26	29	13	233
<b>LDH (UI/L)</b>	481		289	407		324		
<b>Glycémie (g/L)</b>	0,86	0,84	0,9	0,98	1	1,48	1,03	3,27
<b>Hémoglobine (g/dL)</b>	10,5	13,2	14,6	13,7	11,9	8,2	11,3	11,7
<b>Diagnostic différentiel du paludisme</b>	Schistosomose (sérologie positive)							



#### 4.4- Comparaison des performances diagnostiques de la PCR LAMP aux méthodes microscopiques et identification d'espèce par la biologie moléculaire réalisée au CNR

Trois patients (cas 2, cas 6, cas 8) ont présenté une discordance entre le résultat du frottis sanguin/goutte épaisse et le TDR. Chez le cas 2, une bande était retrouvée faussement positive pour *Plasmodium vivax*. En effet, l'identification d'espèce rendu par le CNR retrouvant un *Plasmodium malariae*. Concernant le cas 6 la parasitémie est inférieure à 0.01% et le CNR a pu identifier la présence de *Plasmodium falciparum* dans l'échantillon. Les Cinq autres patients étaient négatifs aux tests microscopiques ainsi qu'au TDR, seule la PCR Illumigene MALARIA LAMP était positive. Le résultat du typage plasmodial réalisé par le CNR a permis de retrouver 3 fois un *Plasmodium falciparum*, 3 fois un *Plasmodium malariae* et une fois un *Plasmodium ovale*.

Tableau 6 : Résultats des tests de dépistage du paludisme

	Cas 1	Cas 2	Cas 3	Cas 4	Cas 5	Cas 6	Cas 7	Cas 8
<b>PCR LAMP</b>	positive	positive	positive	positive	positive	positive	positive	positive
<b>Frottis Sanguin</b>	négatif	<i>P. Vivax</i> (parasitémie inférieure à 0,01%) faux positif	négatif	négatif	négatif	<i>P. falciparum</i> (parasitémie inférieure à 0,01%)	négatif	négative
<b>Goutte Epaisse</b>	négative	faux positif au <i>P. vivax</i>	négative	négative	négative	positive	négative	négative
<b>TDR Palutop+4 Ag (HRP2) <i>P. falciparum</i></b>	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	positif
<b>TDR Palutop+4 Ag (LDH) <i>P. vivax</i></b>	négatif	positif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
<b>TDR Palutop+4 Ag (LDH) <i>P. spp</i></b>	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
<b>Résultats du CNR : PCR sp</b>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. malariae</i>	Pas d'envoi d'échantillon au CNR	<i>P. ovale</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i>
<b>Traitement prescrit en première intention</b>	Eurartésim®	Chloroquine	Eurartésim®	Eurartésim®	Eurartésim®	Eurartésim®	Eurartésim®	Artésunate /Eurartésim®

#### 4.5- Description des traitements de première intention prescrits

Cinq patients (cas 1, 3, 4, 5, 7) pour lesquels la microscopie était négative, ont été traités par Eurartésim®. Le cas 8, qui présentait également initialement une microscopie négative, puis positive lors d'un contrôle après 24h, dans un contexte de mal convulsivant sur neuropaludisme, a été traité par Artésunate par voie intraveineuse en réanimation avec un relais per os par Eurartésim®. Le cas 6 pour lequel la positivité en microscopie est établie avec une parasitémie faible (inférieure à 0.01%) a été traité par Eurartésim®. Le cas 2 (faux positif au *Plasmodium vivax* en microscopie) a été traité par Chloroquine.

## 5- DISCUSSION

Les sociétés savantes Européennes ou Américaines recommandent toujours en première intention la combinaison de la microscopie associant le frottis sanguin, la goutte épaisse et le TDR pour le diagnostic du paludisme. En France, le rapport de l'HAS de décembre 2016 relatif aux actes de biologie médicale du diagnostic biologique du paludisme et la synthèse de la SPILF en juin 2017 ont positionné la PCR comme technique pouvant être utilisée en première intention [12]. En revanche, ces sociétés savantes n'ont pas définitivement statué la place de la PCR LAMP dans l'algorithme d'identification biologique du paludisme. En effet, il s'agit d'une technologie relativement récente et la recherche d'ADN de plasmodium n'est utilisée que dans certains CHU en France. Cependant, plusieurs études ont souligné l'intérêt de la PCR LAMP comme test de diagnostic de première intention dans les régions non endémiques. En effet, les difficultés du diagnostic du paludisme soulevées dans ces études sont le manque d'expérience des techniciens et des biologistes en dehors des grands centres hospitaliers et les parasitémies très basses retrouvées chez certains patients [26,27,28]. Cependant, avant l'éventuelle utilisation de cette technique comme test diagnostique principal, des enquêtes prospectives plus importantes sont nécessaires. Une équipe allemande rapporte le cas d'un patient de 53 ans qui a été hospitalisé pour des accès de fièvre, des frissons et des maux de tête causés 9 mois après son retour d'Afrique de l'ouest. Pendant son séjour en Afrique, celui-ci a rapporté la prise d'une chimioprophylaxie antipalustre. La microscopie le frottis sanguin/goutte épaisse, le test de diagnostic rapide sont restés négatifs à trois reprises. Des échantillons de sang EDTA ont été testés en utilisant la technique PCR LAMP et le résultat était positif pour *plasmodium spp*. L'identification d'espèce a pu être affinée comme une infection à *Plasmodium ovale* par la réalisation d'une PCR en temps réel spécifique d'espèce [29]. Le patient a bénéficié d'un traitement par Atovaquone-Proguanil, suivi de Primaquine pour la prophylaxie des rechutes. Ce cas illustre l'utilité de la PCR LAMP pour le dépistage initial du paludisme.

Une étude prospective menée à l'hôpital de Toulouse d'août 2017 à janvier 2018 sur 331 patients revenant essentiellement d'Afrique confirme la sensibilité supérieure de la PCR LAMP (97,3%), par rapport à la microscopie seule, QBC seul et au TDR seul [30]. La sensibilité au diagnostic du paludisme monte à 100% quand cette technique était associée à la microscopie et au TDR, ce qui est supérieur à la stratégie associant la microscopie et le TDR (95,9%). Toutefois, le frottis sanguin reste indispensable pour l'identification des espèces de plasmodium d'une part et d'autre part pour la parasitémie ou la quantification parasitaire. Lorsque le frottis sanguin est ajouté séquentiellement et uniquement sur des échantillons positifs pour LAMP, il n'a pas été observé de diminution de la sensibilité avec la stratégie diagnostique combinant le frottis sanguin et la PCR LAMP. Cette étude montre l'importance de la PCR LAMP en appui des méthodes de référence utilisées actuellement, compte tenu de sa bonne sensibilité et de sa rapidité.

Dans notre étude, le cas 1 correspond à une récurrence d'accès palustre chez un sujet malien. Il s'était écoulé au moins 20 mois entre la primo-infection et la récurrence en France. Dans la littérature, on retrouve une situation semblable au CHU de Bordeaux en 2016. En effet, une patiente enceinte originaire du Cameroun a présenté une récurrence à *P. falciparum* 2 ans après la prise en charge d'un paludisme à *P. falciparum*. L'étude du CHU de Bordeaux conclue au fait que l'infection à *P. falciparum* ne doit pas être exclue chez les patients présentant des symptômes du paludisme, même longtemps après un voyage dans une région où le paludisme est endémique, lorsque les patients subissent une immunosuppression légère, comme cela se produit avec la grossesse [31]. Concernant ce cas, il s'agit d'un patient drépanocytaire, qui pourrait être légèrement immunodéprimé du fait de cette maladie et de ses conséquences sur la rate. Dans cette situation de récurrence tardive d'accès palustre, l'utilisation de la PCR LAMP a permis un diagnostic biologique précoce.

La contribution de la PCR LAMP au diagnostic du paludisme par rapport aux techniques de référence doit être envisagée sans omettre ses limites (son coût important, l'absence de diagnostic d'espèce, l'absence d'appréciation du stade parasitaire et de la parasitémie). Cependant, l'apport déterminant de cette technique réside dans sa rapidité (50 minutes environ), sa bonne sensibilité et surtout sa valeur prédictive négative élevée [32]. Dans les conditions de réalisation de cette méthode diagnostique au CHU de Lille, notre étude l'a comparé aux tests de référence que sont le frottis sanguin, la goutte épaisse et le TDR, aux résultats du typage d'espèce plasmodiale rendu par le CNR, chez les patients PCR LAMP positif. Nous avons également analysé les présentations clinico-biologiques chez ces patients ainsi que les traitements prescrits en première intention dès le diagnostic de paludisme posé par la technique LAMP.

Sur le plan clinique sept patients ont présenté des accès palustres simples, les symptômes physiques retrouvés étaient principalement : la fièvre, les troubles digestifs à type de diarrhées et douleurs abdominales. Un patient (cas 8) a présenté un état de mal convulsivant sur neuro-paludisme avec découverte d'une lésion corticale frontale gauche. La ponction lombaire montrait un liquide clair, sans élément, l'absence de bactérie au direct, une culture stérile, une PCR HSV négative, des antigénuries légionnelle et pneumocoque négatives. L'IRM de contrôle à un mois mettait en évidence une régression de la densité de la prise de contraste de la lésion donc la nature restait difficile à préciser. L'hypothèse principale retenue par le neurologue était une forme très atypique de neuropaludisme, mais une lésion sous-jacente en particulier vasculaire n'était pas exclue.

Sur le plan biologique, aucun élément en faveur d'un paludisme grave n'a été retrouvé chez nos patients. Cependant 2 patients présentaient une thrombopénie, 2 patients présentaient une insuffisance rénale (dont un premier patient avec une insuffisance rénale aigue et le second patient une insuffisance rénale chronique sur néphropathie diabétique déjà connue). Au sens des critères de gravité du paludisme tels que définis par l'OMS, les présentations cliniques et biologiques de nos patients au moment de leur prise en charge n'évoquent pas de paludisme grave pour 7 patients sur 8.

Les espèces plasmodiales identifiées par le CNR sont le *Plasmodium falciparum* (n=3) et le *Plasmodium malariae* (n=3), le *Plasmodium ovale* (n=1). Un patient n'a pas bénéficié d'une identification de l'espèce plasmodiale par le CNR. Les tests microscopiques et le TDR étaient négatifs pour cinq cas. Par contre une discordance entre la microscopie et le TDR a été constatée pour trois patients (cas 2, 6 et 8). Initialement, le cas 2 montrait une positivité de l'antigène pLDH de *P. vivax* au TDR, l'examen microscopique retrouvait de très rare forme parasitaire faisant évoquer la présence d'un *P. vivax* avec une parasitémie inférieure à 0,01%. Néanmoins pour ce cas 2, la présence d'ADN de *P. malariae* a été constatée par la PCR spécifique d'espèce du CNR. Concernant le cas 6, la microscopie a permis de déterminer l'espèce plasmodiale, *P. falciparum* avec une confirmation faite par la PCR spécifique d'espèce au CNR, alors que le TDR était négatif. Le cas 8 était négatif en microscopie mais positif pour l'antigène circulant HRP2 du *P. falciparum*, la PCR spécifique d'espèce du CNR a confirmé la présence d'ADN du *P. falciparum*. La PCR LAMP a confirmé le TDR et a permis une mise en place précoce du traitement suggérant sa sensibilité importante au cours d'une infection précoce.

A l'exclusion de deux situations, l'Eurartésim® était le traitement de première intention chez nos patients, dont l'espèce plasmodiale en cause n'était pas identifiée au début du traitement. En effet pour le cas 2, le résultat de la microscopie était un faux positif pour *Plasmodium vivax* (cas 2) et un traitement par Chloroquine a été introduit. Le patient présentant un neuropaludisme a été traité par Artésunate par voie intraveineuse associé à l'Augmentin. En absence d'identification de l'espèce plasmodiale au moment du dépistage positif par la PCR LAMP, la stratégie thérapeutique était orientée vers le traitement de l'espèce la plus redoutée qui est le *Plasmodium falciparum*. Les résultats rendus par le CNR tendent à conforter cette stratégie thérapeutique étant donné la proportion de *P. falciparum* retrouvée. Nos

résultats montrent que la PCR LAMP a permis la mise en place précoce d'un traitement antiparasitaire par la confirmation d'un paludisme. Toutefois, l'identification *a posteriori* faite par le CNR a permis la mise en place d'un traitement par Primaquine chez 1 patient, ce qui suggère la nécessité de compléter cette PCR LAMP par une PCR spécifique d'espèce.

## 6- CONCLUSION

Notre travail souligne l'intérêt que pourrait avoir la PCR LAMP dans le logigramme du diagnostic biologique du paludisme dans notre centre. En effet l'étude s'est intéressée à huit patients pour lesquels une suspicion clinique d'accès palustre était légitime compte tenu du contexte (séjour en zone endémique récent ou ancien) et de la symptomatologie clinique. La microscopie était souvent négative et il existait pour 3 situations une discordance entre les techniques de référence (microscopie et TDR). Un cas de paludisme compliqué a été diagnostiqué bien que la majorité des patients n'ont pas présenté de signes de gravité cliniques, ni de critères de complications biologiques. Lorsque le test par PCR LAMP était positif, ce diagnostic était à chaque fois confirmé par le CNR. Les espèces plasmodiales retrouvées étaient *Plasmodium falciparum* (n=3), *Plasmodium malariae* (n=3) et *Plasmodium ovale* (n=1). L'évolution sous traitement présomptif (avant le typage de l'espèce par le CNR) était favorable dans toutes les situations. Bien que le coût de ce test puisse être un frein à son utilisation en routine, il s'agit bien d'une technique rapide et très sensible permettant d'écarter ou de confirmer un diagnostic de paludisme, notamment quand la microscopie et/ou le TDR sont négatifs. Cette technique a montré son intérêt en première intention dans notre centre en zone non endémique. Ainsi dès lors qu'un résultat est positif en PCR MALARIA LAMP et malgré la négativité du frottis sanguin et /ou goutte épaisse, un traitement précoce nous semble justifié en ciblant *P. falciparum*. Enfin, nos données montrent qu'une identification est indispensable par une PCR espèce.

## BIBLIOGRAPHIE :

- 1- J.F. Molez (1993). *Plasmodium falciparum* : taxonomie et génétique, aperçu des questions actuelles. Bull. liais. Doc. - OCEAC Vo1.26 N°2 Juin 1993.
- 2- World Malaria Report 2010. <http://www.who.int/malaria/wmr2010/malaria2010.pdf>.
- 3- OMS : Le Rapport sur le paludisme dans le monde 2019
- 4- ANOFEL (2014) (Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie) <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf>.
- 5- Camus D, Slomianny C, Savel J - Biologie de Plasmodium - Encyclopédie Médico Chirurgicale (Éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Maladies Infectieuses, 8-S07-A-10, 1997, 7 p.bn
- 6- Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales - Paludisme In E.Pilly, 20ème édition : Paris; Vivactis Plus Ed; 2006 : pp 534-541.
- 7- ANOFEL (Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie) - Parasitologie et mycologie médicales : Guide des analyses et pratiques diagnostiques (janvier 2018).
- 8- Barber BE, William T, Jikal M, Jilip J. Plasmodium knowlesi malaria in children, 2011, Emerg. Infect. Dis. 17 :814–820.
- 9- F Pages, E Orlandi-Pradines, V Corbel. Vectors of Malaria: Biology, Diversity, Prevention, and Individual Protection : PMID: 17306484 DOI: 10.1016/j.medmal.2006.10.009
- 10- Institut Pasteur, Paludisme - Symptômes, traitement et recherche paludisme. 2013, <http://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/presse/fiches-info/paludisme>.
- 11- Laroche R, Hovette P and al. Neurologie tropicale, Physiopathologie du neuropaludisme, 1993, p 335-337.
- 12- Prise en charge et prévention du paludisme d'importation Mise à jour 2017 des RPC 2007 Groupe recommandations de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF).
- 13- Abdoul Habib Beavogui (2010). Rôle de l'apoptose dans la transmission de Plasmodium falciparum. Agricultural sciences. Université Claude Bernard - Lyon I.
- 14- Th. Daubrey-Potey, H. Die-Kacou, M. Kamagate, M. Vamy, E. Balayssac and J. C. Yavo (2004). Fièvre bilieuse hémoglobinurique au cours du traitement antipaludique à Abidjan : à propos de 41 cas. Bull. Soc. Pathol. Exot., 2004, 97, 5, 325-328. [www.pathexo.fr/documents/articles-bull/T97-5-2449-4p.pdf](http://www.pathexo.fr/documents/articles-bull/T97-5-2449-4p.pdf)
- 15- Professeur Pierre Aubry, Docteur Bernard-Alex Gaüzère (2015). Médecine tropicale : paludisme actualités. <http://medecinetroppicale.free.fr/cours/paludisme.pdf>
- 16- E. Staudt (2009). Un Vaccin contre le Paludisme : obstacles, espoirs et avancées. Thèse de Docteur en Pharmacie, Université Henri Poincaré de Nancy. [http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDPHA\\_T\\_2009\\_STAUDT\\_ELODIE\\_ANNE.pdf](http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDPHA_T_2009_STAUDT_ELODIE_ANNE.pdf)

- 17- OMS (2014). Techniques de base pour le diagnostic microscopique du paludisme, partie I guide du stagiaire, 2ème édition.
- 18- J.J. De Pina, E. Garnotel, P. Hance, S. Vedy, C. Rogier, M. Morillon (2007). Diagnostic du paludisme d'importation en France, *Médecine et maladies infectieuses* 37 (2007) 710-715.
- 19- P. Hance, E. Garnotel, J.J. De Pina, S. Vedy, C. Ragot, M. Chadli, M. Morillon (2005). Tests immunochromatographiques rapides de détection du paludisme, principes et stratégies d'utilisation, *Med. Trop* 2005 ; 65: 389-393.
- 20- Paludisme. Chapitre 110. Dans : Société française de microbiologie, Société française de mycologie médicale, Société française de parasitologie, Bourlet T, Courol R, Hermann JL, et al., ed. Rémic 5.1 - Référentiel en microbiologie médicale. Paris : SFM ; 2015. p. 803.
- 21- G.O.Adeoye, C.Nga : Comparison of Quantitative Buffy Coat technique (QBC) with Giemsa-stained thick film (GTF) for diagnosis of malaria, <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.06.007>.
- 22- Anne-Sophie De Koninck and al: Diagnostic performance of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based illumigene® malaria assay in a non-endemic region *Malar J* (2017) 16:418 DOI 10.1186/s12936-017-2065-8.
- 23- Organisation Mondiale De La Sante, 2011. Directives pour le traitement du paludisme. 2è édition.
- 24- Serge Paul Eholie ; Emmanuel Bissagnene ; Pierre-Marie Girard. Mémento thérapeutique du paludisme en Afrique 2008 première édition.
- 25- OMS, Guidelines for the treatment of malaria, Third edition, 2015.
- 26- Candace Rypien: Detection of Plasmodium Infection by the illumigene Malaria Assay Compared to Reference Microscopy and Real-Time PCR. DOI: 10.1128/JCM.00806-17
- 27- Berit Aydin-Schmid: Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Accurately Detects Malaria DNA from Filter Paper Blood Samples of Low Density Parasitaemias. doi:10.1371/journal.pone.0103905.
- 28- Gitte N. Hartmeyer: Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification in a Resource-Saving Strategy for Primary Malaria Screening in a Non-Endemic Setting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 100(3), 2019, pp. 566–571 doi:10.4269/ajtmh.18-0496.
- 29- Reuken PA and Al: Diagnosis of malaria in a traveler 9 months after returning from West Africa by illumigene® LAMP assay, PMID: 31137943 DOI: 10.1556/030.66.2019.012.
- 30- E. Carpentier and Al: Performance evaluation of different strategies based on microscopy techniques, rapid diagnostic test and molecular loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of imported malaria. doi: 10.1016/j.cmi.2019.05.010. Epub 2019 May 31.
- 31- D. Malvy and Al: Plasmodium falciparum Recrudescence Two Years after Treatment of an Uncomplicated Infection without Return to an Area Where Malaria Is Endemic. DOI: 10.1128/AAC.01892-17.
- 32- A. De Koninck : Diagnostic performance of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based illumigene® malaria assay in a non-endemic region. DOI 10.1186/s12936-017-2065-8.