

Rapport annuel d'activité	2018
Centre de national de référence du Paludisme	ANNEXES

ANNEXES DU RAPPORT D'ACTIVITE DU CNR DU PALUDISME

Table des matières

ANNEXES DU RAPPORT D'ACTIVITE DU CNR DU PALUDISME.....	2
Table des matières	2
TABLE DES TABLEAUX.....	4
TABLE DES FIGURES	4
1. Annexe 1 : Missions et organisation du CNR.....	6
1.1 Missions du CNR Paludisme et des trois laboratoires associés	6
1.1.1 Rappel du cahier des charges	6
1.1.2 Laboratoire coordonateur de l'hôpital Bichat	8
1.1.3 Laboratoire associé de Pitié-Salpêtrière.....	9
1.1.4 Laboratoire associé IRBA.....	9
1.1.5 Le laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane	10
1.2 Organisation du CNR et de ses laboratoires associés.....	10
1.2.1 Ressources humaines	11
1.2.2 Laboratoire coordonnateur de parasitologie de l'Hôpital Bichat	11
1.2.3 Laboratoire associé de parasitologie-mycologie de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière	13
1.2.4 Laboratoire associé IRBA.....	15
1.2.5 Pôle Zones endémiques : Laboratoire associé de l'Institut Pasteur de la Guyane.....	16
1.3 Locaux et équipements.....	18
1.3.1 Laboratoire coordonateur de l'hôpital Bichat	18
1.3.2 Laboratoire associé de l'hôpital Pitié - Salpêtrière	18
1.3.3 Laboratoire associé IRBA.....	19
1.3.4 Pôle Zones endémiques : Laboratoire associé de l'Institut Pasteur de la Guyane.....	20
1.4 Collections de matériel biologique.....	22
1.4.1 Conditions de stockage	23
1.4.2 Conditions de mise à disposition de ces collections	23
1.5 Démarche qualité du laboratoire	24
1.5.1 Le laboratoire coordonnateur de l'hôpital Bichat	24
1.5.2 Laboratoire associé de la Pitié Salpêtrière	24
1.5.3 Laboratoire associé IRBA.....	24
1.5.4 Pôle Zones endémiques : laboratoire associé de l'Institut Pasteur de la Guyane	25
1.5.5 Démarche qualité interne au CNR Paludisme	25
1.5.5.1 Clones de références	25
1.5.5.2 Lots de plaques d'antipaludiques	25
1.5.6 Ethique, protection des données et management de la base.....	25
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	30
2.1 Liste des techniques de référence	30

2.1.1	Techniques mises en œuvre dans les laboratoires du CNR.....	30
2.1.2	Techniques spécifiques du pôle Zones non Endémiques	33
2.1.3	Techniques spécifiques du Pôle Zones endémiques	34
2.1.4	Tableau récapitulatif des techniques maîtrisées au sein du CNR Paludisme	37
2.1.5	Marqueurs épidémiologiques disponibles	38
2.2	Liste des techniques recommandées par le CNR	38
3.	Annexe 3 : Autres informations	39
4.	Annexe 4 : Liste des Centres Hospitalo-Universitaires et des centres hospitaliers régionaux correspondants du CNR du Paludisme - Pôle métropole en 2018.....	40
5.	Annexe 5 : Méthodes d'analyse	42
6.	Annexe 6 : Données complémentaires du CNR du paludisme	45
6.1	Surveillance du paludisme d'importation	45
6.2	Surveillance des résistances de <i>P. falciparum</i> dans le paludisme d'importation.....	53
6.2.1	Chimiosensibilité <i>in vitro</i>	53
6.2.1.1	Antipaludiques conventionnels	53
6.2.1.2	Les dérivés d'artémisinine	55
6.2.1.3	Les molécules associées aux ACTs	55
6.2.2	Génotypages des isolats de <i>P.falciparum</i>	58
7.	Annexe 7 : Bulletin de rétroinformation, pôle Antilles-Guyane.....	65
8.	Annexe 8 : Présentation détaillée des valeurs de chimiosensibilités, Guyane 2012-2018	70

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Récapitulatif des missions du CNR Paludisme exercées par chacun des laboratoires.	7
Tableau 2 : Organisation schématique et activités au sein du CNR du Paludisme	11
Tableau 3. Nombre d'unités composant les collections disponibles dans chaque pôle.	22
Tableau 4. Recommandations thérapeutiques en Guyane, au Suriname et au Brésil en 2017.	31
Tableau 5. Techniques de laboratoire disponibles sur les différents sites du CNR Paludisme.	37
Tableau 6. Marqueurs disponibles sur les différents sites du CNR Paludisme.	38
Tableau 7 : Liste des Centres Hospitalo-Universitaires et des centres hospitaliers régionaux correspondants du CNR du Paludisme - Pôle métropole en 2018.	40
Tableau 8 : Répartition des cas pour les 15 pays de contamination les plus fréquemment cités en 2017 et 2018, n=2614	45
Tableau 9 : Variation relative du nombre de cas de paludisme d'importation entre 2018 et 2017 selon les pays endémie visités, France. Les pays sont classés par ordre décroissant.	46
Tableau 10. Cas à <i>Plasmodium falciparum</i> seul, caractéristiques de la parasitémie en fonction du type de l'accès clinique et de l'âge, CNR du Paludisme, France métropolitaine, 2018, n=2398.	49
Tableau 11 : Proportion d'isolats mutés <i>pfprt</i> K76T par pays et par année	59
Tableau 12 : Proportion d'isolats triple mutés <i>pfphr</i> S108N, N51I, C59R par pays et par année.....	60
Tableau 13 : Proportion d'haplotypes <i>pfmdr1</i> N86Y-Y184F par pays en 2018	62
Tableau 14 : Proportion d'isolats mutés <i>pfmdr1</i> N86Y par pays et par année	63
Tableau 15 : Proportion d'isolats triple mutés <i>pfmdr1</i> Y184F par pays en 2018	64

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Organigramme du CNR Paludisme.....	6
Figure 2. Organigramme du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Bichat en 2018.	12
Figure 3. Organigramme du laboratoire associé Hôpital Pitié-Salpêtrière.	14
Figure 4. Organigramme du laboratoire associé IRBA.....	16
Figure 5. Organigramme du laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane.	18
Figure 6 : CNR du Paludisme Hôpital Pitié-Salpêtrière, Pavillon Laveran 1er étage, plan des locaux.....	18
Figure 7 : Plan du laboratoire NSB2/3 de l'Unité Parasitologie et entomologie	20
Figure 8. Plan du deuxième étage mis à disposition du Pôle ZE.....	22
Figure 9. Plan du rez-de-chaussée du bâtiment dont une partie est mis à disposition du Pôle ZE.....	22
Figure 10 : stratégie de contrôle des données saisies et de traitement des doublons	44
Figure 11 : Répartition par âge et par sexe des cas de paludisme déclarés par le réseau des correspondants du CNR du paludisme, France métropolitaine, année 2018, n = 2840.	45
Figure 12 : Distribution cas de Paludisme d'importation par espèces, France métropolitaine, 2018, n = 2840	48
Figure 13 : Délai entre la date de retour et le diagnostic de l'accès palustre pour l'espèce <i>Plasmodium falciparum</i>	48
Figure 14 : Conduite chimioprophylactique, CNR du paludisme, France métropolitaine, année 2018, n = 2396.	49
Figure 15 : Nombre de cas de paludisme chez les enfants de moins de 15 ans, 2006-2018	50
Figure 16 : Evolution des traitements pour les accès simples à <i>P. falciparum</i> chez les patients de 15 ans et plus, CNR du paludisme, France métropolitaine, années 2006-2018	51
Figure 17 : Evolution des traitements pour les accès simples à <i>P. falciparum</i> chez les patients de moins de 15 ans, CNR du paludisme, France métropolitaine, années 2006-2018	51

Figure 18 : Evolution des traitements pour les accès graves à <i>P. falciparum</i> chez les patients de 15 ans et plus, CNR du paludisme, France métropolitaine, années 2006-2018	52
Figure 19 : Evolution des traitements pour les accès graves à <i>P. falciparum</i> chez les patients de moins de 15 ans, CNR du paludisme, France métropolitaine, années 2006-2018	52
Figure 20 : Evolution des chimiosensibilités à la chloroquine de 2016 à 2018	53
Figure 21 Evolution des chimiosensibilités à la quinine entre 2016 et 2018.....	53
Figure 22 Evolution des chimiosensibilités à la doxycycline en 2016 et 2018	54
Figure 23 Evolution des chimiosensibilités à la dihydroartémisinine entre 2016 et 2018	55
Figure 24 Evolution des chimiosensibilités à la Mono déséthyl-amodiaquine entre 2016 et 2018.....	55
Figure 25 Evolution des chimiosensibilités à la luméfantrine entre 2016 et 2018	56
Figure 26 Evolution des chimiosensibilités à la pipéraquline entre 2016 et 2018	56
Figure 27 Evolution des chimiosensibilités à la méfloquine entre 2016 et 2018.....	57
Figure 28 Evolution des chimiosensibilités à la pyronaridine entre 2016 et 2018	57
Figure 29 : proportion de souches mutées sur <i>pfcr</i> (K76T) en 2018 pour les pays ayant au moins un effectif de 20 échantillons	58
Figure 30 : proportion de souches ayant un haplotype IRNI(position 108-51-59-164) sur <i>pfdhfr</i> en 2018 pour les pays ayant au moins un effectif de 20 échantillons	60
Figure 31 : proportion de souches avec un haplotype (position 86-184) sur <i>pfmdr1</i> en 2018 pour les pays ayant au moins un effectif de 20 échantillons.....	61
Figure 32. Evolution des chimiosensibilités de <i>P. falciparum</i> à la chloroquine.....	71
Figure 33. Evolution des chimiosensibilités de <i>P. falciparum</i> à la monoséthylamodiaquine	72
Figure 34. Evolution des chimiosensibilités de <i>P. falciparum</i> à l'atovaquone.....	73
Figure 35. Evolution des chimiosensibilités de <i>P. falciparum</i> à la quinine	74
Figure 36. Evolution des chimiosensibilités de <i>P. falciparum</i> à la doxycycline.....	75
Figure 37. Evolution des chimiosensibilités entre 2012 et 2018 :	76
Figure 38. Evolution des chimiosensibilités de <i>P. falciparum</i> à la luméfantrine.....	77
Figure 39. Evolution des chimiosensibilités de <i>P. falciparum</i> à la méfloquine	78
Figure 40. Evolution des chimiosensibilités de <i>P. falciparum</i> à la pyronaridine.....	79

1. Annexe 1 : Missions et organisation du CNR

1.1 Missions du CNR Paludisme et des trois laboratoires associés

Le CNR du paludisme est organisé en 4 laboratoires, un laboratoire coordonnateur et 3 laboratoires associés (Figure 1), répartis en 2 pôles, le pôle « zones non endémiques » et le pôle « zones endémiques ».

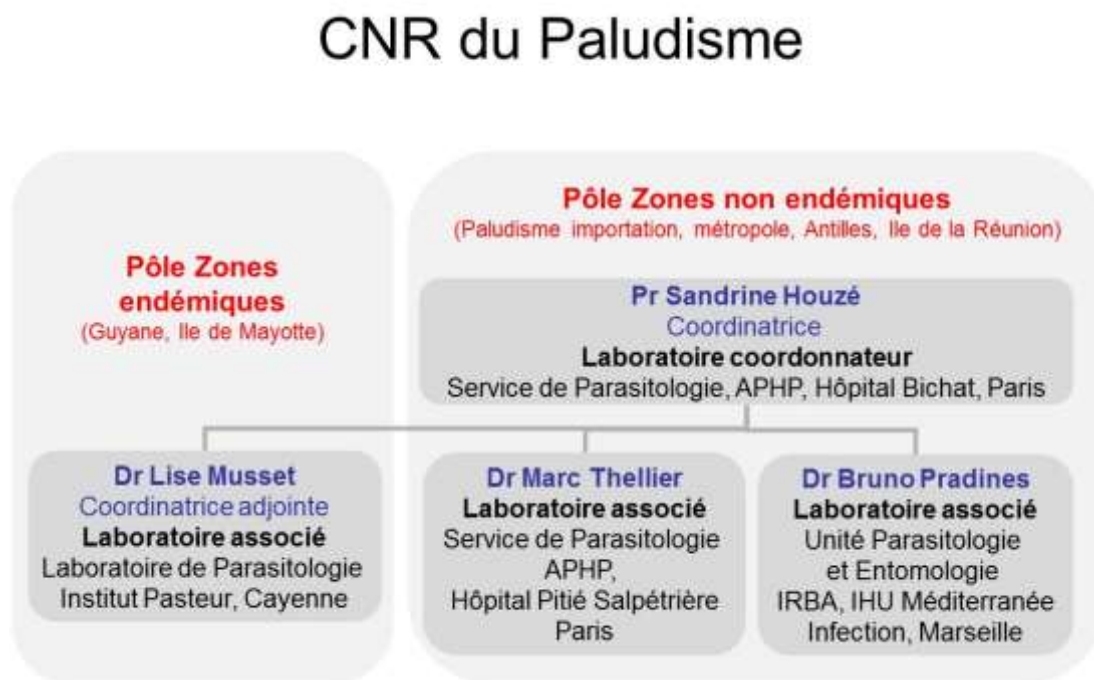


Figure 1 : Organigramme du CNR Paludisme

1.1.1 Rappel du cahier des charges

Les laboratoires constituant le CNR Paludisme répondent aux missions inscrites dans le cahier des charges défini par ANSP, à savoir :

1. Expertise

- en participant au développement et en évaluant les techniques de diagnostic ;
- en expertisant les souches, leur résistance aux antipaludéens et en contribuant à l'évaluation des mécanismes de résistance ;
- en contribuant à des études de recherche appliquée visant à documenter le risque de paludisme chez les voyageurs et en zone d'endémie, les facteurs de risque influant la morbidité et la mortalité, l'évaluation des mesures de prévention ;
- en mettant en place les moyens d'un diagnostic différentiel paludisme / babésiose

2. Conseil

- en apportant son soutien technique aux autorités au plan national et local (notamment dans le cadre des programmes internationaux de lutte contre le paludisme dans la région des Amériques) ;
- en suivant l'évolution des zones de résistance en liaison avec les réseaux d'experts internationaux notamment pour adapter les recommandations aux voyageurs.

3. Contribution à la surveillance, en lien avec l'agence nationale de santé publique

- en assurant la surveillance du paludisme d'importation et autochtone, par la mise en place d'un réseau de laboratoires ou de services cliniques afin de suivre les tendances évolutives du paludisme d'importation et autochtone en France métropolitaine et hors métropole (notamment en Guyane) et d'identifier les groupes à risque. La représentativité de ce réseau est à évaluer en collaboration avec l'agence nationale de santé publique;
- en contribuant à l'investigation des signalements de cas de paludisme sur le territoire, en particulier par une expertise diagnostique et le typage des souches ;
- en fournissant chaque année une analyse de l'épidémiologie du paludisme d'importation et autochtone apportant une information actualisée, notamment pour la mise à jour annuelle des recommandations aux voyageurs ;
- en assurant la surveillance des chimiorésistances aux antipaludiques, notamment en s'appuyant sur des réseaux représentatifs en Guyane et, dans la mesure du possible, les pays frontaliers (Brésil et Surinam) afin de définir les zones de résistance pour adapter les schémas prophylactiques et thérapeutiques ;
- en développant des collaborations avec les réseaux de parasitologie et de surveillance du paludisme à l'échelle nationale, européenne et internationale.

4. Contribution à l'alerte

- en signalant à l'agence nationale de santé publique tout événement inhabituel concernant le paludisme d'importation et autochtone : nouvelle zone d'endémie ; augmentation inhabituelle de cas, modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles), apparition de cas groupés, cas autochtone en France métropolitaine, apparition de nouveaux phénotypes de résistance (notamment en Guyane), extension d'une zone de résistance, etc.

Les activités du CNR Paludisme mises en place afin de répondre à ses missions sont résumées dans le Tableau 1 et sont détaillées pour chaque pôle dans les paragraphes suivants.

Tableau 1. Récapitulatif des missions du CNR Paludisme exercées par chacun des laboratoires.

	Zones non-endémiques			Zones endémiques
	Hôpital Bichat	Hôpital PSL	IRBA	IPG
Animation du réseau des correspondants	✓	✓	✓	✓
Gestion de la base de données zones non endémiques		✓		
Gestion de la base de données Guyane				✓
Etude épidémiologique des cas de paludisme		✓		✓
Caractérisation de foyers épidémiques				✓
Expertise diagnostique des échantillons transmis	✓	✓ (graves)	✓ (PACA)	✓
Diagnostic différentiel babesia/paludisme	✓			
Phénotypage des parasites vis-à-vis des antipaludiques	✓		✓ (PACA)	✓
Etude <i>ex vivo</i> et <i>in vitro</i> de la sensibilité aux dérivés de l'artémisinine et leur molécules partenaires : tests RSA et PSA	✓			✓
Suivi du niveau d'efficacité thérapeutique	✓			✓
Etude des marqueurs moléculaires de résistance	✓			✓
Identification de nouveaux marqueurs de résistance	✓		✓	✓
Modification génétique de parasites				✓
Adaptation des parasites à la multiplication <i>in vitro</i>			✓	✓
Etablissement d'une collection incluant la	✓	✓	✓	✓

		(graves)	(PACA)
cryoconservation des isolats			
Dosages plasmatiques des antipaludiques à visée prophylactique			✓
Dosages plasmatiques des antipaludiques à visée thérapeutique			✓
Surveillance Réunion et Antilles	✓		
Surveillance Mayotte			✓
Surveillance des résistances en zone d'endémie			✓
Evaluation entomologique			✓
Conseil et alerte auprès des autorités sanitaires	✓	✓	✓
Surveillance de la mise à disposition de l'artésunate intra-veineux (ATU nominative)*		✓	

* Surveillance effectuée en Guyane par l'équipe de l'Unité d'entomologie médicale de l'Institut Pasteur de la Guyane financée par l'ARS Guyane

¥ Rédaction du protocole d'utilisation thérapeutique, conseils cliniques et biologiques, recueil et signalement des effets indésirables dont l'anémie hémolytique post artésunate (cf publications), réalisation d'analyses spécialisées, mise au point d'outils spécifiques (mesure de la pittémie), rédaction d'un rapport annuel de surveillance spécifique pour l'ANSM

1.1.2 Laboratoire coordonnateur de l'hôpital Bichat

Le laboratoire coordonnateur de l'hôpital Bichat AP-HP assure :

- la validation épidémiologique et d'expertise diagnostique des isolats transmis par les correspondants de France métropolitaine (à l'exception de la région PACA), de l'île de la Réunion, et des Antilles, Guadeloupe et Martinique. Les diagnostics de paludisme sont réalisés par les laboratoires des correspondants pour assurer la prise en charge thérapeutique sans délais des patients. Notre mission de CNR est d'expertiser les prélèvements transmis pour confirmer les diagnostics d'espèce difficile : cette étape est réalisée dès réception des prélèvements (les parasites s'altèrent après prélèvement dès 24h). Sur les prélèvements reçus « frais », la confirmation diagnostique est portée par observation microscopique des frottis sanguins et des gouttes épaisses colorés : ceci est très consommateur de temps et repose sur du personnel habilité après une formation longue d'environ 6 mois. Sur les prélèvements altérés ou reçus sur papier buvard, en cas de difficultés diagnostiques microscopiques, pour la confirmation des espèces non *falciparum*, et pour le diagnostic des associations d'espèces, des PCR diagnostiques sont réalisées. Cette expertise diagnostique est également disponible pour les laboratoires de biologie médicale non correspondants du CNR au titre des missions d'expertise des CNR,
- le diagnostic parasitologique différentiel de la babésiose : cette activité sera proposée à l'ensemble des laboratoires de biologie médicale du territoire national en 2018,
- le phénotypage des isolats de *P. falciparum* dont la viabilité et la charge parasitaire le justifient : la décision est prise après observation microscopique du frottis sanguin. Si les conditions sont remplies, la mise en culture des parasites est faite immédiatement. Ce phénotypage a pour but d'établir la sensibilité des parasites aux différents antipaludiques testés par la détermination des CI_{50} (concentration inhibitrice 50%), avec mise en œuvre de radionucléides. Le service de Bichat possède les installations agréées par l'Autorité de Sureté Nucléaire pour cette activité,
- l'étude des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques des isolats reçus. Les marqueurs étudiés sont fonction du traitement prescrit au patient afin d'évaluer le risque d'échec thérapeutique éventuel, ou choisis afin d'apporter des éléments descriptifs de la prévalence des marqueurs d'intérêt dans la population plasmodiale étudiée : ces données permettent de compléter les cartes établies par les réseaux WWARN (WorldWide Antimalarial Resistance Network) ou OMS (Organisation Mondiale de la Santé) de prévalence en fonction de la région d'endémie considérée,
- la cryoconservation des isolats de la métropole (à l'exception de la région PACA).

1.1.3 Laboratoire associé de Pitié-Salpêtrière

Le laboratoire associé AP-HP, Pitié-Salpêtrière assure précisément pour la France métropolitaine :

- ✓ Pour la partie épidémiologie, surveillance et alerte :
 - Le suivi et la gestion du réseau des correspondants du CNR Paludisme (attribution des mots de passes, gestion des connexions, diffusion des messages et alerte, mise à jour de la documentation, maintenance...)
 - Le développement du logiciel de déclaration en ligne Voozanoo (changement de version)
 - La sécurité du site de déclaration en ligne et des données, en lien avec la société Epiconcept,
 - La gestion des données (contrôles de saisies, recherche d'informations manquantes, correction des erreurs ...),
 - L'analyse statistique des données épidémiologiques et l'identification des tendances évolutives annuelles
 - L'organisation de la réunion nationale annuelle,
 - L'animation du site Internet
 - La participation à l'identification et à l'investigation des signalements des cas de paludisme inhabituels, en particulier les cas autochtones de France métropolitaine
- ✓ Pour la partie clinique et biologique du paludisme grave
 - La coordination et le suivi de la mise à disposition de l'artésunate IV en ATU pour le traitement des accès palustres graves sur l'ensemble du territoire national (mission déléguée par l'ANSM).
 - L'investigation des cas de paludisme dont la présentation clinique répond aux critères de gravité, physiopathologie, réponse aux traitements, effets indésirables
 - Les conseils aux praticiens pour la prise en charge thérapeutique initiale de l'accès grave, pour le diagnostic ou pour la surveillance des effets indésirables du médicament
 - La mesure de la parasitémie et de la « pitémie » par une technique de cytométrie en flux pour évaluer le risque de survenue d'une anémie hémolytique post artésunate,

Une particularité de l'action de ce CNR est qu'il participe pleinement à la prise en charge médicale des patients avec la réalisation d'analyses spécifiques : vérification d'espèces (expertise microscopique, PCR), marqueurs moléculaires de résistance, mesure de la sensibilité *in-vitro* des isolats. En particulier, depuis mai 2011, pour les accès graves traités par artésunate intraveineux (nouveau médicament qui remplace la quinine intraveineuse dans cette indication) dans le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation ou ATU, la surveillance de l'efficacité et des effets indésirables du médicament ont été confiés par l'ANSM au Pr Pierre Buffet et au groupe de la Pitié-Salpêtrière (Service de Parasitologie-Mycologie, Dr M. Thellier, Dr F. Gay ; Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Dr S. Jauréguiberry et l'unité de Pharmacovigilance Dr B. Lebrun-Vignes).

1.1.4 Laboratoire associé IRBA

Le laboratoire associé IRBA, situé à Marseille assure :

- l'expertise diagnostique des cas de *P. falciparum* de la région PACA, et des correspondants de Bordeaux, Lyon, Toulouse et Montpellier. La région PACA est la deuxième région de France pour le nombre de cas observés. La transmission de ses isolats au laboratoire de l'IRBA de Marseille permettra un transport dans un délai < 48h donc la prise en charge par l'IRBA d'échantillons de qualité qu'un transport sur Paris aurait altérés. Les isolats de Bordeaux et de Montpellier se justifient par des projets en cours, PHRC, et des conventions passées avec ces correspondants.
- le développement et l'évaluation de nouvelles techniques de diagnostic (TDR, biologie moléculaire).
- le phénotypage des cas de *P. falciparum* de la région PACA, et des correspondants de Bordeaux, Toulouse et Montpellier.

- la cryoconservation des isolats de la région PACA, Bordeaux, Toulouse et Montpellier.
- les dosages plasmatiques d'antipaludiques utilisés à visée prophylactique dans le cadre des missions du CNR de surveillance de l'efficacité prophylactique des traitements recommandés en France, sur l'ensemble des prélèvements transmis au CNR (dont ceux reçus au laboratoire coordonnateur) et les dosages plasmatiques d'antipaludiques utilisés à visée thérapeutique dans le cadre des missions du CNR de surveillance de l'efficacité thérapeutique des traitements recommandés en France. Ces dosages seront centralisés sur la plateforme de l'Unité de Toxicologie analytique de l'IRBA
- l'identification, le développement et la validation de nouveaux marqueurs moléculaires de résistance avant leur mise en œuvre en routine.
- la surveillance du paludisme en zone d'endémie en relation avec les missions de terrain coordonnées par les autorités militaires.
- l'évaluation entomologique des suspicions de paludisme autochtones.

1.1.5 Le laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane

Le laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane devait assurer l'ensemble des missions du CNR dans les territoires endémiques pour le paludisme, la Guyane et l'île de Mayotte :

- expertise diagnostique des isolats transmis par les partenaires locaux
- évaluation des nouvelles méthodes de diagnostic (TDR paludisme, TDR G6PD)
- phénotypage des isolats de *P. falciparum* à l'aide de la méthode isotopique et test de survie
- constitution d'une collection de parasites, plasma et ADN avec adaptation systématique des isolats de *P. falciparum* à la culture continue
- étude des marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques des isolats reçus
- suivi de l'efficacité thérapeutique en lien avec l'Unité des Maladies Infectieuses et Tropicales de l'Hôpital de Cayenne
- conseil et alerte auprès des autorités sanitaires
- contribution à la surveillance épidémiologique du paludisme autochtone en lien avec les Cire locales (échanges d'informations, sensibilisation des partenaires conjointe).

1.2 Organisation du CNR et de ses laboratoires associés

Pour répondre au mieux à ses missions sur l'ensemble des territoires français, le CNR du paludisme s'est réorganisé avec un laboratoire coordonnateur et trois laboratoires associés (Tableau 2). Pour plus de visibilité et d'efficacité dans leur organisation, les laboratoires du CNR se sont regroupés en un pôle « **zones non endémiques** » chargé du paludisme d'importation en France métropolitaine, aux Antilles et sur l'île de Réunion et un pôle « **zones endémiques** » s'intéressant plus particulièrement aux territoires présentant une transmission autochtone du paludisme, la Guyane et l'île de Mayotte

Le pôle **zones non endémiques** est composé de :

1. Le laboratoire coordonnateur sera le Service de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Bichat, HUPNVS - AP-HP, UPD, IRD/UPD-UMR 216 MERIT, à Paris avec pour responsable, le Pr Sandrine Houzé, coordonnateur du CNR Paludisme, pharmacien, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier (PU-PH),

2. Le laboratoire associé de Parasitologie-Mycologie du CHU Pitié-Salpêtrière (PSL), AP-HP, UPMC, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique - iPLESP, UMR_S 1136 INSERM/UPMC - dont le responsable est le Dr Marc Thellier, médecin, Maître de Conférences Universités-Praticien Hospitalier (MCU-PH),

3. Le laboratoire associé de l'Unité Parasitologie et entomologie de l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées, à Marseille (UMR 7278, Institut Hospitalo-Universitaire en infectiologie),

avec pour responsable, le Dr Bruno Pradines, pharmacien en chef, responsable de ce laboratoire.

Le pôle **zones endémiques** est composé de :

4. Le laboratoire associé de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane, Centre collaborateur OMS pour la surveillance des résistances aux antipaludiques, à Cayenne, avec pour responsable, le Dr Lise Musset, coordonnatrice adjointe du CNR, pharmacienne, responsable de ce laboratoire.

Tableau 2 : Organisation schématique et activités au sein du CNR du Paludisme

CNR du Paludisme Coordination Sandrine Houzé Coordination adjointe Lise Musset			
Pôle Zones non endémiques			Pôle Zones endémiques
Laboratoire coordonnateur Hôpital Bichat Paris Sandrine Houzé Coordonnatrice Responsable	Laboratoire associé Hôpital Pitié Salpêtrière Paris Marc Thellier Responsable	Laboratoire associé IRBA Marseille Bruno Pradines Responsable	Laboratoire associé IPG Cayenne Lise Musset Coordonnatrice adjointe Responsable
BIOLOGIE - Expertise diagnostique (Paludisme, Babesia) - 80% Phénotypage - 80% Génomypage - Cryoconservation CONSEILS - Participation aux groupes d'experts nationaux	CLINIQUE & BIOLOGIE - Accès graves EPIDEMIOLOGIE - Surveillance France métropolitaine CONSEILS - Participation aux groupes d'experts nationaux	BIOLOGIE - Expertise diagnostique - 20% Phénotypage (PACA) - Nouveaux marqueurs de résistance - Dosage plasmatiques - Cryoconservation EPIDEMIOLOGIE - Surveillance des pays en zone tropicale d'intérêt 'militaire' EXPERTISE ENTOMOLOGIQUE	BIOLOGIE (Guyane) - Expertise diagnostique - Caractérisation du risque par dépistage actif - Phénotypage (PACA) - Nouveaux marqueurs de résistance - Cryoconservation - Expertise d'isolats étrangers EPIDEMIOLOGIE (Guyane) - Analyse tendancielle annuelle CONSEILS - Participation aux groupes d'experts locaux et internationaux

AP-HP : Assistance Publique Hôpitaux de Paris ; IRBA : Institut de Recherche Biomédicale des Armées ; IPG : Institut Pasteur de la Guyane.

1.2.1 Ressources humaines

Le coordonnateur du CNR Paludisme est Sandrine Houzé, PU-PH et chef du service de Parasitologie-Mycologie, elle est responsable du laboratoire coordonnateur qui est installé à l'hôpital Bichat, qui appartient au groupe hospitalier HUPNVS de l'AP-HP.

La coordination adjointe est assurée par Lise Musset, responsable du Pôle « zones endémique » et du laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane, responsable également du centre collaborateur OMS pour la surveillance des résistances aux antipaludiques.

1.2.2 Laboratoire coordonnateur de parasitologie de l'Hôpital Bichat

- **Sandrine Houzé**, biologiste-parasitologue PU-PH (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP) - Université Paris Descartes (UPD)), coordonnateur du CNR Paludisme, membre du comité coordination et du comité de pilotage du CNR Paludisme, animation du réseau de correspondants du Pôle zones non endémiques, contrôle du diagnostic des isolats transmis, évaluation des dispositifs médicaux et des méthodes diagnostiques, responsable des études génomiques (étude des résistances, diagnostic d'espèce par biologie moléculaire), responsable des biothèques, coordination

des protocoles au laboratoire, personne compétente en radioprotection, responsable assurance qualité du laboratoire, analyse et rédaction du rapport, (25% de son activité hospitalière, financement APHP-MIGAC),

- **Sandrine Cojean**, parasitologue scientifique MCU (Paris Sud), membre du comité de pilotage du CNR Paludisme, responsable de l'étude *in vitro* des résistances de *P. falciparum* et de l'analyse des données des isolats transmis au CNR Paludisme, responsable de l'adaptation en culture des isolats (30% de son activité, financement SPF),

- Trois **ingénieurs de recherche**, contractuels (Véronique Sarrasin, Liliane Cicéron, Justine Bailly) assurant l'encadrement de la technicienne sur le contrôle diagnostique des isolats reçus, la réalisation des tests génomiques, l'étude *in vitro* des résistances, la mise en culture des isolats, la cryoconservation des isolats, la réalisation des tests génomiques, et la mise en place des nouveaux marqueurs de résistance ou de génotypage selon les procédures validées par les laboratoires associés de l'IRBA ou de l'IPG (100% de leur activité, financement MIGAC/SPF)

- Un **technicien contractuel**, Rizwana Zaffaroullah, assurant le contrôle diagnostique des isolats reçus, l'étude *in vitro* des résistances, la mise en culture des isolats, la cryoconservation des isolats, (100% de son activité, financement MIGAC/SPF),

- Un **étudiant en master 2** (ANSP), assurant au cours de son stage de Master 2, un travail de développement en relation avec les missions du CNR Paludisme (financement SPF)

- **Monique Lemoine**, (AP-HP), agent de gestion, gestion des correspondants, gestion du budget du CNR et du laboratoire coordonnateur, (100% de son activité, financement APHP-MIGAC),

- **Jérôme Clain**, parasitologue scientifique MCU (UPD), membre du comité de pilotage du CNR Paludisme, responsable de la surveillance de l'efficacité thérapeutique et de l'analyse des données des isolats transmis au CNR Paludisme, (collaboration non rémunérée par le CNR, UPD),

- **Nicolas Argy**, biologiste- parasitologue AHU (APHP-UPD), membre du comité de pilotage du CNR Paludisme, participation à l'expertise diagnostique et à l'analyse des données des isolats transmis au CNR Paludisme, (collaboration non rémunérée par le CNR, APHP),

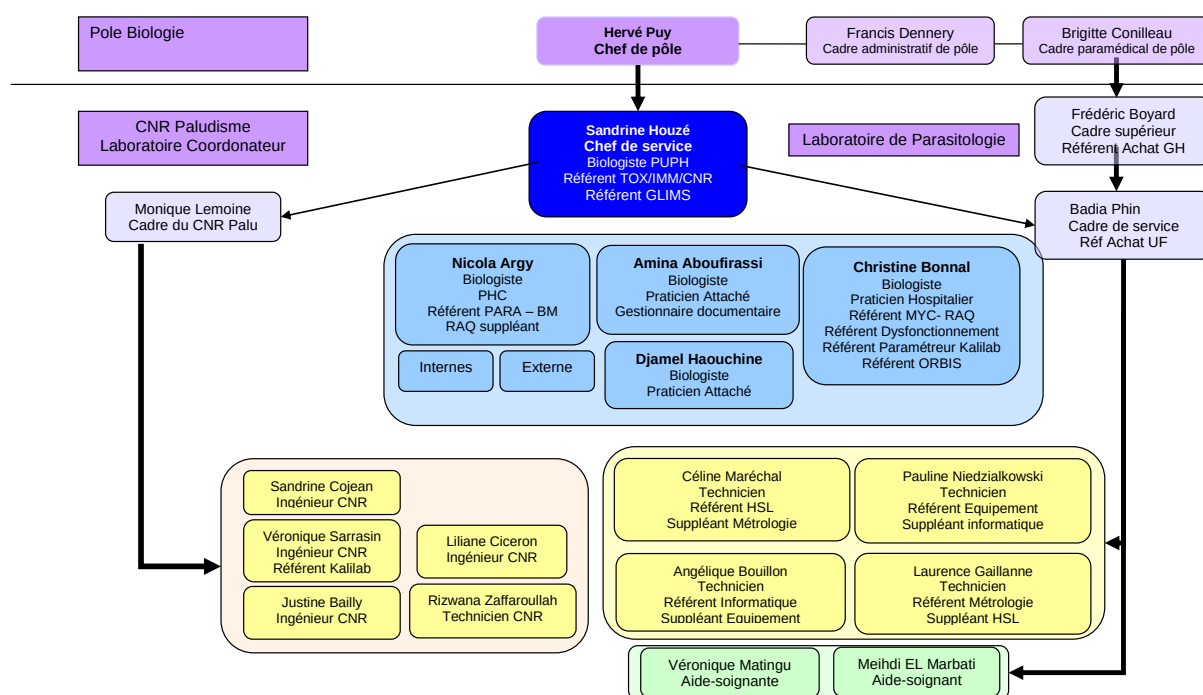


Figure 2. Organigramme du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Bichat en 2018.

1.2.3 Laboratoire associé de parasitologie-mycologie de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière

- **Dr Marc Thellier**, médecin-parasitologue MCU-PH (UPMC, AP-HP, UMRS 1136 iPLESP), responsable du laboratoire associé PSL ; membre du comité de coordination et du comité de pilotage du CNR Paludisme, surveillance épidémiologique des cas de paludisme ; conseils thérapeutiques, expertise des cas pour la clinique : cas graves, paludisme et grossesse, paludisme autochtone ; conseils et expertise pour la biologie : diagnostics difficiles (expertise microscopique, biologie moléculaire) ; traitement des données, analyse des données, rédaction du rapport ; développement et animation du site Internet ; organisation de la réunion nationale métropolitaine ; animation du réseau de correspondants du pôle métropole : circuit des échantillons, rétro-information des correspondants, visites sur sites ; expertise pour les groupes de travail, pour les sociétés savantes ; protocoles thérapeutiques ; surveillance, en lien avec l'ANSM de la mise à disposition de l'artésunate intraveineux dans le cadre d'une ATU de cohorte ; membre de droit du Comité des Maladies liées aux Voyages et des maladies d'Importation (CMVI), validation des résultats biologiques.
- **Dr Oussama Mouri**, médecin Praticien attaché AP-HP, gestion du circuit des échantillons, expertise microscopique, biologie moléculaire, réalisation des techniques de pitting, suivi de résistance aux dérivés de l'artémisinine, activité de recherche transversale sur le diagnostic du paludisme, développement et animation du site Internet, validation des résultats biologiques.
- **Dr Frédérick Gay**, médecin-parasitologue MCU-PH (UPMC, AP-HP, UMRS 1136 IPL-esp), traitement et analyse des données, rédaction du rapport, analyses épidémiologiques spécialisées, conseils thérapeutiques, expertise des cas pour la clinique : cas graves, paludisme et grossesse, paludisme autochtone, conseils et expertise, pour la biologie : diagnostic difficile, expertise pour les groupes de travail, les sociétés savantes, protocoles thérapeutiques, activité de recherche transversale sur la physiopathologie de l'accès grave, développement et animation du site Internet, validation des résultats biologiques.
- **Dr Stéphane Jauréguiberry**, médecin-infectiologue, PH (AP-HP, Inserm UPMC, UMRS 1136 iPLESP), membre du comité de pilotage du CNR Paludisme, conseils thérapeutiques, expertise des cas pour la clinique : cas graves, paludisme et grossesse, paludisme autochtone, expertise pour les groupes de travail, les sociétés savantes, protocoles thérapeutiques (artésunate IV dans les accès graves), activité de recherche transversale sur la physiopathologie, Surveillance, en lien avec l'ANSM, de la mise à disposition de l'artésunate iv dans le cadre d'une ATU de cohorte
- **Dr Cécile Nabet**, AHU, (AP-HP, UPMC, UMRS 1136 iPLESP), conseils thérapeutiques, expertise des cas pour la clinique : cas graves, paludisme et grossesse, paludisme autochtone ; conseils et expertise pour la biologie : diagnostics difficiles (expertise microscopique, biologie moléculaire, spectrométrie de masse)
- **Pr Renaud Piarroux**, PU-PH (AP-HP, UPMC, UMRS 1136 iPLESP), chef du service de Parasitologie- Mycologie (octobre 2017) ; membre du comité de pilotage du CNR Paludisme, analyse des données, rédaction du rapport, conseils thérapeutiques, expertise des cas pour la clinique : cas graves, paludisme et grossesse, paludisme autochtone, conseils et expertise pour la biologie : diagnostic difficile, expertise pour les groupes de travail, les sociétés savantes, protocoles thérapeutiques, validation des résultats biologiques.
- **Éric Kendjo**, biostatisticien-gestionnaire de données (AP-HP contractuel), membre du comité de pilotage du CNR Paludisme, surveillance épidémiologique des cas de paludisme, administration de la base de données, participation à l'animation du réseau de correspondants du Pôle métropole, administration des correspondants du groupe EPID (correspondants qui déclarent les cas sans adresser de manière systématique d'échantillons pour la biologie), participation au développement du site de déclaration en ligne, administration du site Internet, développement et animation du site Internet, organisation de la réunion nationale métropolitaine, analyse des données, rédaction du rapport.
- **Christophe Parizot**, ingénieur hospitalier en biologie (AP-HP titulaire), coordinateur des activités de cytométrie en flux pour le pôle de biologie médicale et pathologie du site PSL, conseils et

expert en cytométrie, développement technique, standardisation, validation de méthodes, veille technologique, formation et encadrement technique des utilisateurs du cytomètre.

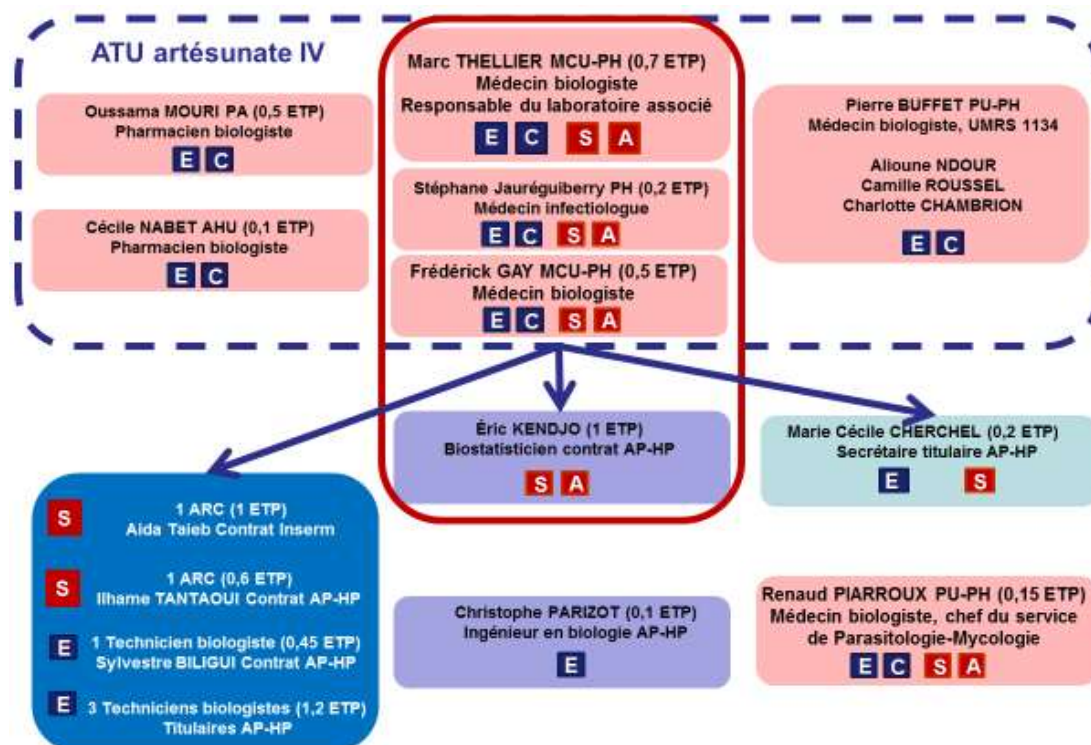
- **Aida Taieb**, attaché de recherche clinique (plein-temps), recueil des données épidémiologiques et cliniques, nettoyage de la base, saisie de données, rétro-information des correspondants, participation au suivi et au recueil des données des patients avec un accès grave, en particulier les patients traités par l'artésunate intraveineux dans le cadre d'une autorisation temporaire d'utilisation.

- **Ilhame Tantaoui** attaché de recherche clinique (mi-temps), recueil des données épidémiologiques et cliniques, nettoyage de la base, saisie de données, rétro-information des correspondants, participation au suivi et au recueil des données des patients avec un accès grave.

- **4 Techniciens** (1,5 ETP), (3 APHP titulaires, 1 contractuel, **Sylvestre Biligui**) pour l'enregistrement des demandes, la réalisation des techniques de pitting, l'expertise des lames (identification d'espèces, parasitémie), la saisie des résultats, le développement technique et les validations de méthodes.

- **Pr Pierre Buffet**, et son équipe de recherche médecin-parasitologue-infectiologue PU-PH (AP-HP, UMRS 1134, GR-EX), membre du comité de pilotage du CNR Paludisme, analyse des données, rédaction du rapport, conseils thérapeutiques, expertise des cas pour la clinique : cas graves, paludisme et grossesse, paludisme autochtone, conseils et expertise pour la biologie : diagnostic difficile, expertise pour les groupes de travail, les sociétés savantes, protocoles thérapeutiques (surveillance de l'artésunate IV en ATU dans les accès graves), activité de recherche transversale sur la physiopathologie de l'accès grave (séquestration des globules rouges, filtre splénique), tests de sensibilité de *P. falciparum* aux artémisinine, test théranostique anémie post-artésunate, surveillance, en lien avec l'ANSM de la mise à disposition de l'artésunate intraveineux dans le cadre d'une ATU de cohorte.

- **Mme Marie Cécile Cherchel**, Secrétaire (APHP, titulaire), appel des correspondants, logistique, organisation de la réunion nationale, courriers.



E = expertise, C = conseil scientifique, S = surveillance épidémiologique, A = alerte

Figure 3. Organigramme du laboratoire associé Hôpital Pitié-Salpêtrière.

1.2.4 Laboratoire associé IRBA

- **Bruno Pradines**, (Unité Parasitologie et entomologie, Département des Maladies Infectieuses, IRBA), pharmacien-chef de l'Unité Parasitologie et entomologie de l'IRBA et chef de l'Equipe « Paludisme et vecteurs » de l'Unité VITROME (vecteurs et infectiologie tropicale et méditerranéenne), Aix-Marseille Univ, IRD, SSA, AP-HM, Institut hospitalo-universitaire Méditerranée Infection, directeur adjoint de VITROME, responsable du laboratoire associé IRBA, membre du comité de coordination du CNR Paludisme, participation à l'analyse et à la rédaction du rapport, responsable de l'évaluation des méthodes de diagnostic, du phénotypage, de l'adaptation à la culture et de la cryoconservation des isolats, de la surveillance de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques et de la surveillance de la résistance dans les pays d'intérêt 'militaire' (30% de son activité),
- **Nicolas Taudon**, (Unité Toxicologie analytique, Département des Services, IRBA), pharmacien et chef de l'unité de toxicologie, membre du comité de pilotage du CNR Paludisme, responsable des dosages des antipaludiques, (10% de son activité),
- **Marylin Torrentino-Madamet** (Unité Parasitologie et entomologie, Département des Maladies Infectieuses, IRBA), ingénieure, responsable des études génomiques (étude des résistances, diagnostic d'espèce par biologie moléculaire), responsable des biothèques, assurant la gestion consommables et mise en place de la qualité ainsi que le suivi administratif des dossiers (60% de son activité),
- **Mylène Penot** (Unité Toxicologie analytique, Département des Services, IRBA), ingénieure assurant la mise en œuvre des dosages et le développement de nouvelles méthodes (30% de son activité),
- **Rémy Amalvict** (Unité Parasitologie et entomologie, Département des Maladies Infectieuses, IRBA), technicien, assurant la mise en œuvre des tests *in vitro* (entretien et culture des clones de référence et des isolats, révélation des tests, analyse des données, gestion consommables et mise en place qualité, validation des lots de plaques), le diagnostic par biologie moléculaire et la préparation des lots de plaques ainsi que le suivi administratif des dossiers (60% de son activité),
- **Nicolas Benoit** (Unité Parasitologie et entomologie, Département des Maladies Infectieuses, IRBA), technicien, assurant la mise en œuvre des tests *in vitro* et des techniques de biologie moléculaire dans la cadre de la recherche de nouveaux marqueurs de résistance, le diagnostic par biologie moléculaire, et la préparation des lots de plaques ainsi que le suivi administratif des dossiers (50% de son activité),
- **Joel Mosnier** (Unité Parasitologie et entomologie, Département des Maladies Infectieuses, IRBA), technicien, assurant la mise en œuvre des tests *in vitro* et la préparation des lots de plaques ainsi que le suivi administratif des dossiers (60% de son activité),
- **Catherine Pinaud** (Unité Toxicologie analytique, Département des Services, IRBA), technicienne, assurant la mise en œuvre des dosages (30% de son activité),
- **Sébastien Briolant**, (Unité Parasitologie et entomologie, Département des Maladies Infectieuses, IRBA), médecin en chef, adjoint au chef d'unité de parasitologie et d'entomologie, responsable des activités d'entomologie, pourra intervenir en cas d'évaluation entomologique de cas de paludisme autochtone,
- **Lionel Almeras**, (Unité Parasitologie et entomologie, Département des Maladies Infectieuses, IRBA), scientifique, responsable des activités d'identification par technique MaldiToff des vecteurs en entomologie, pourra intervenir en cas d'évaluation entomologique de cas de paludisme autochtone,
- **Albin Fontaine**, (Unité Parasitologie et entomologie, Département des Maladies Infectieuses, IRBA), scientifique, responsable des activités de recherche en entomologie, pourra intervenir en cas d'évaluation entomologique de cas de paludisme autochtone,
- **Christophe Nguyen**, (Unité Parasitologie et entomologie, Département des Maladies Infectieuses, IRBA), technicien, pourra intervenir en cas d'évaluation entomologique de cas de paludisme autochtone.

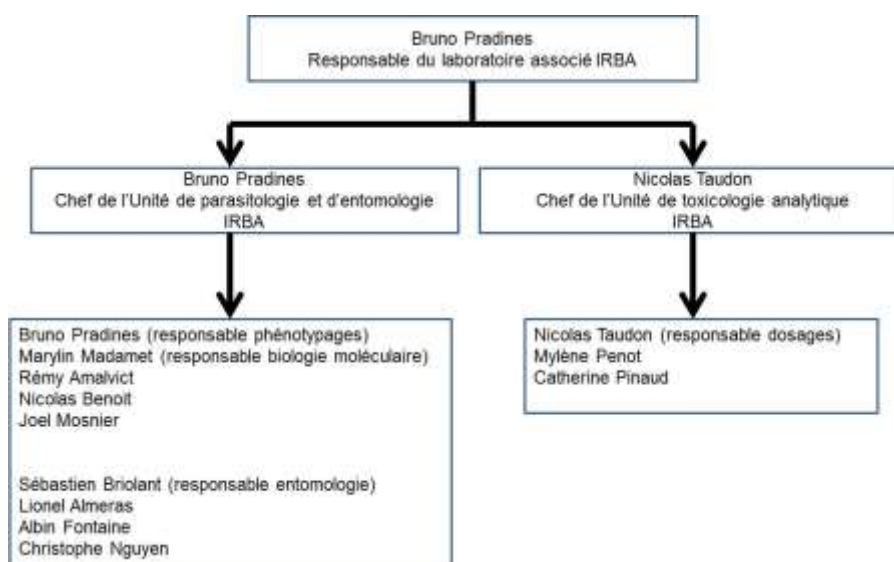


Figure 4. Organigramme du laboratoire associé IRBA.

1.2.5 Pôle Zones endémiques : Laboratoire associé de l'Institut Pasteur de la Guyane

Le laboratoire de parasitologie qui héberge le Pôle Zones endémiques est composé de six personnes dont cinq assurent quotidiennement le fonctionnement de ce pôle. La part financière complémentaire nécessaire au financement de ces personnes et de celle des autres unités impliquées est assumée par l'Institut Pasteur de la Guyane. Sont impliqués :

- **Lise Musset**, pharmacien, paludologue, chargé de recherche, coordinatrice adjointe du CNR Paludisme, responsable du Pôle Zones endémiques du CNR Paludisme, membre du comité de coordination et du comité de pilotage, responsable du suivi du paludisme dans les zones endémiques.

Pour le Pôle ZE : relation avec les correspondants (missions de sensibilisation, organisation de la rétro-information); participation au groupe de travail associant les autorités locales et les différents acteurs impliqués dans le contrôle du paludisme en Guyane ; évaluation des techniques diagnostiques en lien avec les correspondants locaux ; expertise des résistances (étude *in vitro* des résistances, étude *in vivo* de l'efficacité thérapeutique) ; adaptation d'isolats à la culture cellulaire ; constitution de biothèque ; analyse et rédaction du rapport d'activité annuel ; expertise internationale auprès des autorités du plateau des Guyane (50% de son activité).

- **Yassamine Lazrek-Sandot**, ingénieur de recherche, adjointe du CNR Paludisme pour la mandature 2017-2021, et correspondant qualité du laboratoire de parasitologie. Dans le cadre du CNR Paludisme, relation avec les correspondants (missions de sensibilisation) ; participation aux réunions avec les autorités locales ; participation aux études génomiques (étude des résistances, diagnostic d'espèce par biologie moléculaire), analyse et rédaction du rapport d'activité annuel ; suivi de la démarche d'accréditation du laboratoire ; développement de nouvelles techniques d'analyses (75% de son activité).

- **Béatrice Volney**, technicienne d'analyse assurant le contrôle diagnostique des échantillons réceptionnés, la mise en œuvre des tests *in vitro* ainsi que leur analyse, la culture des clones de référence et des isolats, les contrôles qualités des différentes techniques de culture cellulaire utilisées au laboratoire ; correspondante métrologie et équipement du laboratoire de parasitologie ; rédaction et mise à jour de document qualité (75% de son activité),

- **Simon Roques**, technicienne d'analyse assurant le contrôle diagnostique des échantillons réceptionnés, la mise en œuvre des tests *in vitro* ainsi que leur analyse, la culture des clones de référence et des isolats, les contrôles qualités des différentes techniques de culture cellulaire utilisées au laboratoire; ensemble des études phénotypiques en remplacement de Béatrice Volney, les contrôles qualité des différentes techniques de biologie moléculaire utilisées au laboratoire, et appuyer

le correspondant qualité du laboratoire pour la mise en place et le fonctionnement du système de management de la qualité ; correspondante vie de labo en charge notamment des collections du laboratoire (75% de son activité).

- Une **secrétaire** assurant la réception des échantillons, le rendu des résultats aux correspondants, la gestion des stocks, la traçabilité d'un certains nombre d'opérations selon les exigences de la norme NF ISO EN 15189 (60% de son activité),

Bien que non budgétées, des personnes ressources seront parties prenantes du fonctionnement du Pôle ZE :

- **Olivier Moriceau**, infirmier coordinateur du programme Palustop financé par les fonds européen à 100% mais qui participe indirectement à la surveillance du paludisme en Guyane et à la compréhension de la transmission du paludisme dans l'Est Guyanais. Il est en charge de l'organisation des missions de terrains et de la coordination des médiateurs en santé communautaire.
- les **épidémiologistes de la Cire Guyane, bureau de SPF en région** (Luisiane Carvalho, Audrey Andrieu) pour une analyse annuelle conjointe des tendances de l'endémie et de ses caractéristiques épidémiologiques en Guyane,
- **Félix Djossou**, médecin infectiologue du CHC pour permettre une analyse fine des dossiers des patients en échec thérapeutique identifiés dans le cadre du suivi de l'efficacité thérapeutique *in vivo* mis en place à l'UMIT et aussi le classement des cas graves en fonction des critères de l'OMS.
- **Christelle Prince**, infirmière financée par l'ARS et en charge du suivi des cas graves sur le département en lien avec les trois hôpitaux.
- **L'unité informatique** pour la gestion et la maintenance de la base de données propre au Pôle ZE permettant de référencer les échantillons reçus, les informations et les résultats d'analyses qui les accompagnent ainsi que tout l'équipement informatique détenu au laboratoire
- **L'unité HSQE** qui coordonne la démarche d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 de l'Institut et fait appliquer les normes d'hygiène et de sécurité des laboratoires au sein de l'IPG.

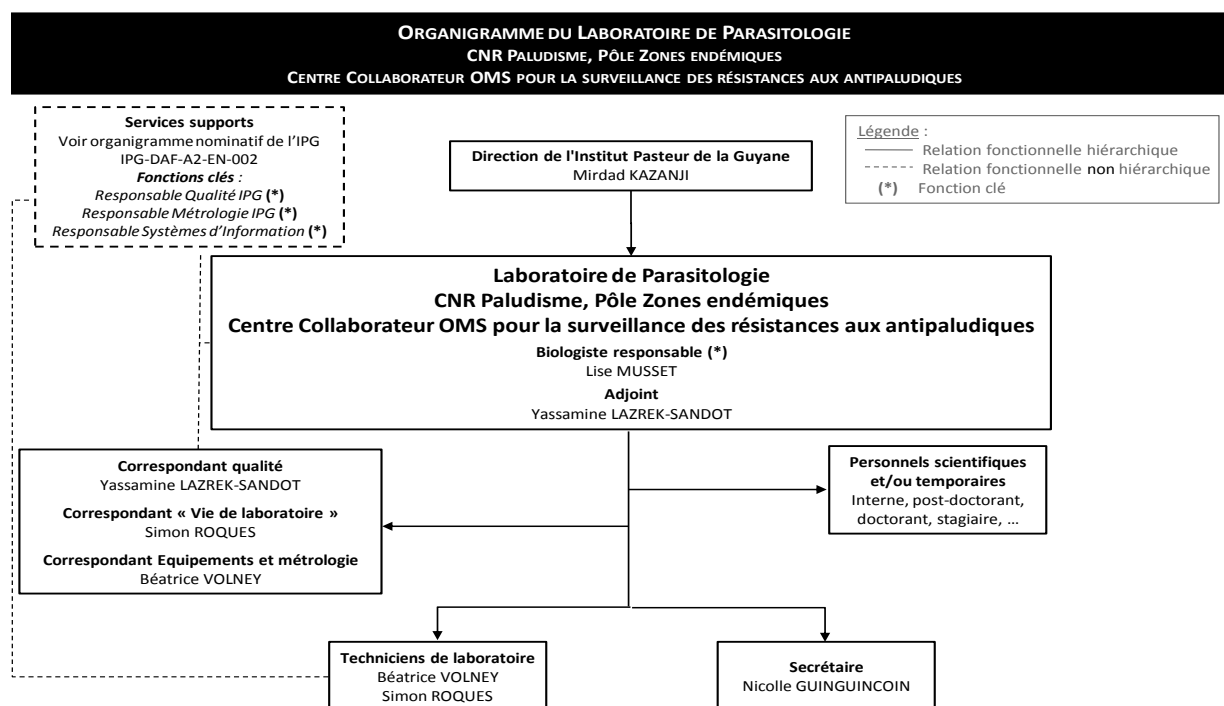


Figure 5. Organigramme du laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane.

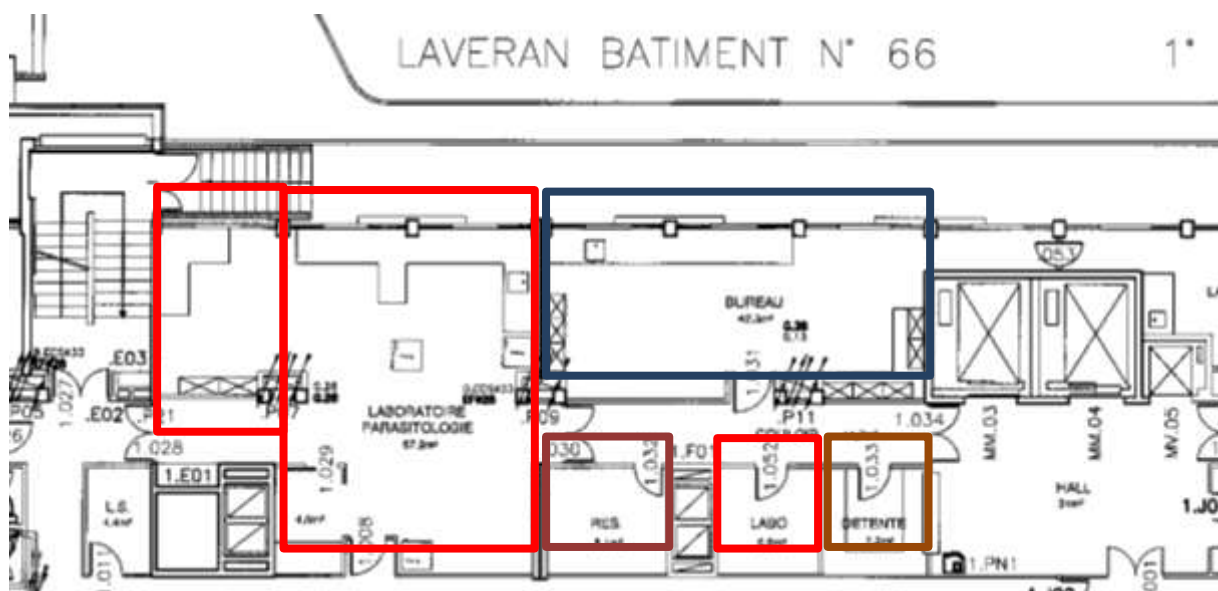
1.3 Locaux et équipements

1.3.1 Laboratoire coordonateur de l'hôpital Bichat

Par convention signée en 2009 avec l'hôpital Bichat, HUPNVS, AP-HP, l'Institut de Médecine et d'Epidémiologie Appliquée (IMEA) met à disposition du CNR Paludisme un laboratoire d'une superficie de 300 m² répartie en six pièces. Une pièce est dédiée à la culture des isolats (trois postes de travail, deux Postes de Sécurité Microbiologique (PSM), un incubateur à atmosphère régulée en dioxygène (O₂) et dioxyde de carbone (CO₂), trois microscopes, équipement ELISA et fluorimètre. Une pièce est dédiée à la culture des isolats en milieu radioactif (un poste de travail, un PSM, un incubateur avec chambre à O₂ et CO₂ contrôlés, un ensemble collecteur de cellules et compteur à scintillation). Une pièce est dédiée à la préparation des milieux avec une hotte de préparation à flux laminaire et un diluteur pour la préparation des plaques pré-dosées en antipaludiques pour l'étude des chimiosensibilités. En biologie moléculaire, deux pièces sont dédiées à la préparation et à l'obtention des amplicons (deux postes de travail, thermocycleurs, automate d'extraction d'ADN, PCR temps réel (ViiA® 7, Thermo Fischer Scientific) et une pièce est dédiée à l'analyse des amplicons de biologie moléculaire (accès réservé, deux postes de travail). L'ensemble comprend des chambres et armoires de conservation à +4°C, -20°C, -80°C et -196°C et trois bureaux sont dédiés à l'épidémiologie (archivage, moyens informatiques, visioconférence, Internet, fax et téléphone).

1.3.2 Laboratoire associé de l'hôpital Pitié - Salpêtrière

L'Hôpital Pitié-Salpêtrière met à disposition du CNR du Paludisme site PSL environ 135 m² de surfaces de locaux au premier étage du Pavillon Laveran. Ces surfaces sont réparties en 40 m² de surface bureaux, 80 m² de surface de laboratoire, 8 m² de surface de stockage/réserve et 7 m² de surface de détente. La partie bureau inclue un espace d'archives.



ordinateurs portables, acquis en 2014, 2015 et 2016 ; des disques durs de sauvegardes mobiles et fixes de grande capacité (> 1 To), les logiciels de dernière génération, pour les analyses statistiques et la cartographie (STATA, SAS, Stat Transfert, Jump, Arctique Suite « cartes et données » ...), des imprimantes (2-3 ans), une connexion haut débit, les logiciels courants actualisés (2010 à 2015) pour la bureautique. Téléphone, Fax et visioconférence (une salle de 30m² accessible sur simple demande).

Equipement pour les analyses biologiques, trois postes de travail, un PSM, un incubateur CO₂, un automate ELISA, quatre microscopes (dont un trois têtes avec capture d'images acquis en 2015) et un cytomètre de flux Accuri 6 (mesure du pitting). L'ensemble est équipé de chambres et armoires de conservation +4 °C, -20 °C et -80°C (au sous-sol du bâtiment équipé d'une sonde de surveillance pour générer des alertes en temps réel). Un conteneur de grande dimension est spécialement dédié pour la cryoconservation des isolats en azote liquide (local spécifique au 5ème étage du même bâtiment).

Sont également disponibles dans les structures de support (équipes de recherche en lien direct avec le CNR) les différentes plateformes de l'unité Immunité et Infection - INSERM/UPMC UMRS 945 :

- ✓ Plateforme de cytométrie supervisée par le Pr B. Autran mise à disposition par le département d'Immunologie de la Pitié-Salpêtrière/Charles Foix d'un cytomètre analyseur BD FACS Canto™ II (BD Biosciences) équipé de trois lasers (488nm-633nm-405nm) permettant l'analyse simultanée de 8 fluorescences. Il est équipé d'un passeur d'échantillons de tubes permettant l'automatisation du passage des échantillons. Doté d'un système puissant de traitement des données (FACSDiva™ 6.0 BD Biosciences) qui simplifie et réduit le temps des expériences et qui, combiné à la grande sensibilité de l'optique, permet la détection des événements rares. Combiné à un choix optimisé des fluorochromes des anticorps monoclonaux et aux marqueurs d'ADN, ce cytomètre est parfaitement dédié à la détection des hématies « pitées ».
- ✓ Plateforme de Protéomique incluant différentes techniques de spectrométrie de masse supervisée par le Pr D. Mazier
- ✓ Un insectarium pour notamment la production de gamétocytes dans le but d'initier, développer et maintenir des colonies de moustiques de l'espèce *Anopheles stephensi* (Cf la partie recherche) supervisé par le Pr D. Mazier,
- ✓ Une animalerie exempte d'agents pathogènes spécifiés : souris humanisées.

Du matériel spécialisé pour l'étude du globule rouge parasité ou non dans les locaux de l'équipe du Pr Pierre Buffet au laboratoire d'excellence GR-EX :

- ✓ Un microscope à contraste de phase et contraste interférentiel « Nomarski »,
- ✓ Un cytomètre en flux de type Accuri 6 ,
- ✓ Une technique de filtration sur microplaques des globules rouges à travers des couches de microsphères.

1.3.3 Laboratoire associé IRBA

A partir du 1^{er} octobre 2017, l'Unité Parasitologie et entomologie a déménagé au sein de l'Institut Hospitalo-Universitaire en infectiologie de Marseille et dispose d'un laboratoire de type NSB2 de 170 m² comprenant deux pièces destinées à la culture parasitaire avec trois postes de travail (3 PSM, 2 incubateurs à atmosphère régulée en oxygène (O₂) et dioxyde de carbone (CO₂), une pièce de préparation des lots de plaques (1 PSM, automate de distribution), une pièce destinée à la sérologie (lecteur ELISA, Multiplexage), une pièce destinée à la mise en œuvre des techniques de biologie moléculaire (PSM, appareil PCR, PCR temps réel, séquenceur d'ADN) et d'une animalerie ; l'Unité Parasitologie et entomologie possède des moyens de conservation à basse température (congélateurs -20°, congélateurs -80°C, congélateurs -152°C) ; des collections d'échantillons biologiques et de réactifs ; des moyens informatiques. Toutes les enceintes soumises à une température (congélateur -80°C et -20°C, réfrigérateur à 4°C, incubateur à 37°C) sont contrôlées par une centrale informatisée.

L'Unité Parasitologie et entomologie aura aussi accès à des plateformes communes : plateforme de séquençage (10 séquenceurs haut débit), plateforme de protéomique (MaldiToff), plateforme de microscopie (2 microscopes électroniques), insectarium, laverie.

Laboratoire NSB2/3 Parasitologie SSA (170 m²)

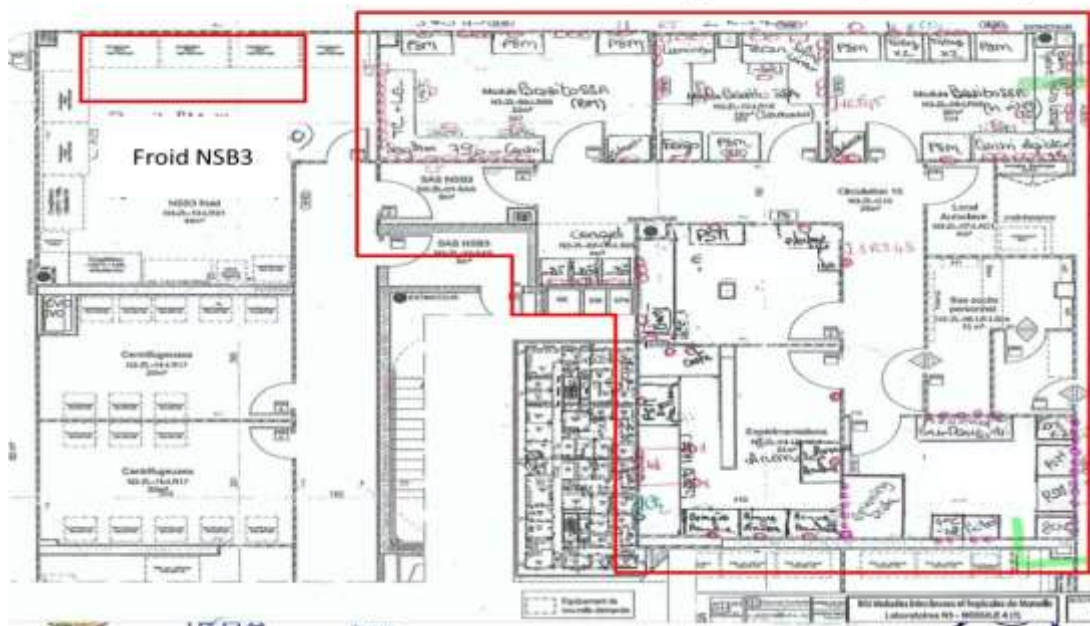


Figure 7 : Plan du laboratoire NSB2/3 de l'Unité Parasitologie et entomologie

L'Unité Toxicologie analytique à Brétigny est constituée d'environ 300 m² de laboratoire situé au niveau du 2^{ème} étage du bâtiment abritant les laboratoires dits "standards" de l'IRBA. Les pièces constitutives sont réparties de la façon suivante: une pièce de stockage : petits consommables et produits chimiques poudre ; une pièce de réception : sectorisation pour la réception et l'enregistrement des prélèvements biologiques et des produits chimiques ; une laverie : système de production d'eau de niveau II alimentant un laveur ; une salle de pesée : contenant 3 balances de précision couvrant un intervalle de pesée allant du mg au kilo ; 4 salles de préparation et prétraitement d'échantillons : organisées selon les matériels contenus, ces salles permettent de sectoriser la préparation des échantillons avant analyse (l'une d'elle contient un système de production d'eau ultra pure ainsi qu'une armoire ventilée permettant le stockage de produits chimiques volatils) ; 4 salles d'analyse chromatographique : sectorisation selon le type de matériel ; 1 salle de retraitement des données : abrite un serveur en lien avec certains systèmes d'analyse. L'ensemble des pièces dédiées à la réception, préparation et analyse des échantillons ainsi que les moyens froids critiques et la salle de pesée font l'objet d'un suivi de température centralisé. Pour cette dernière pièce, un suivi de l'hygrométrie est également assuré. Une sauvegarde journalière ainsi qu'un archivage mensuel sont assurés.

1.3.4 Pôle Zones endémiques : Laboratoire associé de l'Institut Pasteur de la Guyane

Depuis la rénovation des locaux ayant eu lieu en 2013, l'Institut Pasteur de la Guyane met à la disposition du Pôle ZE les moyens suivants :

- Un étage entièrement dédié aux activités relatives au paludisme (184m²) divisé en neuf secteurs (cf Figure 8):
 - un LSB2/extraction (23m²), servant à la culture cellulaire des plasmodies, aux examens microscopiques du sang et à l'extraction d'ADN. Ce secteur est équipé de deux postes de sécurité microbiologique de niveau 2 (PSM2), d'un réfrigérateur, d'un congélateur (-20°C), de deux bains marie, de deux centrifugeuses, d'un microscope, d'une hotte aspirante pour produits chimiques, et

d'un incubateur à atmosphère régulée en gaz carbonique et oxygène pour permettre une croissance optimale des parasites en culture et surtout l'adaptation *in vitro* des isolats de *Plasmodium falciparum*,

- une pièce de préparation (6m²) des mélanges réactionnels pour les PCR équipée d'un congélateur (-20°C),
- une pièce polyvalente (amplification/préparation), permettant la distribution des ADN dans les mélanges réactionnels, la préparation des milieux de culture, le dosage des acides nucléiques.... Elle est équipée de deux congélateurs (-20°C), un spectrophotomètre (Nanodrop[®]), deux balances dont une de précision, une centrifugeuse, trois thermocycleurs, deux agitateurs magnétiques, un pH-mètre,
- une pièce post amplification (14m²), utilisée pour la visualisation sous ultra-violet des bandes d'ADN présentent sur les gels d'agarose, équipée d'un transilluminateur à ultra-violet, de deux générateurs, d'un séquenceur (Applied[®] 3130XL),
 - trois bureaux d'une superficie de 52m² au total,
 - des sanitaires,
 - un espace archives (7m²).
- Deux pièces situées au rez-de-chaussée (RDC) du bâtiment dédiées au stockage (8m²) des radioéléments ou à la manipulation (LSB2 radioactivité, 13m², Figure 9). Cette dernière est équipée d'un PSM2, d'un incubateur à atmosphère régulée en gaz carbonique et oxygène pour permettre une incubation optimale des tests de phénotypage, un compteur à scintillation, un collecteur de cellule, un réfrigérateur et un congélateur (-20°C). Ces deux pièces sont partagées avec le laboratoire d'immunologie des leishmanioses.

De plus, le Pôle ZE dispose d'un accès aux différents espaces partagés par les différentes unités (Figure 9). Ces espaces situés au RDC de notre bâtiment inclus :

- un plateau technique commun (43m²) doté entre autres, d'un analyseur génétique permettant le séquençage de fragments d'ADN ainsi que l'analyse de marqueurs microsatellites, de trois appareils de PCR en temps réel, d'un lecteur fluorimètre/luminomètre, d'un système automatisé d'extraction d'ADN,
- une chambre froide (4m²) où sont stockés les containers d'azote permettant de conserver les parasites adaptés à la multiplication *in vitro*,
- une salle commune des congélateurs -80°C (24m²) où est entreposé notre congélateur -80°C,
- une centrale de gaz (6m²) permettant d'acheminer le gaz aux incubateurs à partir de bouteilles stockée à l'extérieur.

En termes d'équipement informatique, le laboratoire de parasitologie met à disposition du Pôle ZE six ordinateurs de bureau et quatre ordinateurs faisant fonctionner un équipement chacun.

Le Pôle ZE dispose également d'une base de données permettant de gérer les différents échantillons qu'il reçoit. Cette base est construite autour du patient de façon à regrouper les prélèvements issus d'une même personne afin de pouvoir détecter rapidement les suspicions d'échecs thérapeutiques ou de reviviscence concernant *P. vivax*. Elle permet également de regrouper toutes les données clinico-épidémiologiques et les notions d'antécédents de paludisme disponibles pour un patient. Côté laboratoire, cette base gère l'ensemble des analyses à réaliser, émet des listes de travail et permet de suivre les délais de rendu de résultat.



Figure 8. Plan du deuxième étage mis à disposition du Pôle ZE.

1 carreau = 0,1m

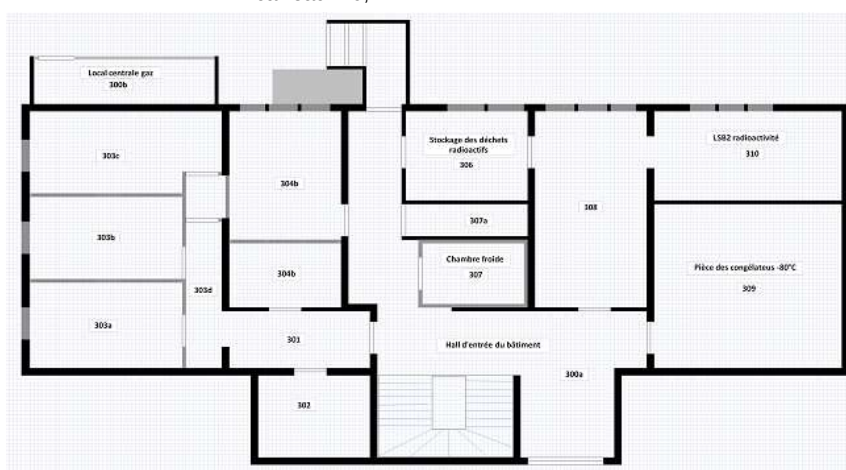


Figure 9. Plan du rez-de-chaussée du bâtiment dont une partie est mis à disposition du Pôle ZE.

1 carreau = 0,1m

1.4 Collections de matériel biologique

Le tableau ci-dessous reprend l'ensemble des collections disponibles dans chaque laboratoire.

Tableau 3. Nombre d'unités composant les collections disponibles dans chaque pôle.

	Pôle ZNE			Pôle ZE
	Bichat	Pitié Salpêtrière	IRBA	
Clones de référence en nombre, conservés en azote liquide	20		30	20
Isolats de patients en nombre conservés, en azote liquide	7000 (1979)		>2000 (1989)	91 (2003)
Isolats de patients adaptés à la multiplication <i>in vitro</i>			>500 (1996)	766 (2003)
Plasma des échantillons en nombre	5000 (2000, -20°C)	6000 (2006)	>10 000 (1994, -80°C)	>10 000 (1998, -80°C)
Extraits d'ADN de d'isolats de patients : nombre disponibles	14 500 (1996, -80°C)	2000 (2006)	>8000 (1994, -80°C)	>10 000 (1998, -20°C)
Lames de diagnostic en nombre conservées à température ambiante	16 000 (1984)	6000 (2006)	> 5000 (1989)	>10 000 (1997)

Entre parenthèses figure l'année de mise en place de la collection suivie de sa température de conservation ; ADN : Acide désoxy-ribonucléique.

1.4.1 Conditions de stockage

Les conditions de stockage des collections peuvent différer en fonction des labos. Elles sont reprises dans le tableau récapitulatif (Tableau 3).

A l'hôpital Bichat, les enceintes sont surveillées par une sonde de température dont les valeurs sont enregistrées en continu et expertisées par le logiciel Sirius de la société JRI. En cas de température mesurée en dehors des bornes définies pour chaque enceinte, une alarme prévient les utilisateurs.

A l'IRBA, toutes les enceintes à température dirigée (congélateur -80°C, -20°C et -152°C) sont contrôlées par une centrale informatisée (bureau des techniciens et poste de garde).

A l'IPG, la collection en azote liquide est consolidée par la répartition des cryotubes entre plusieurs containers d'azote pour limiter les pertes cas de problèmes. Toutes les enceintes à température dirigée, containers d'azote compris, sont équipées d'un système de suivi et l'alerte en temps réel des températures.

1.4.2 Conditions de mise à disposition de ces collections

L'accès aux souches, aux prélèvements biologiques et données associées collectés dans le cadre de l'activité des CNR est conditionné par la mise en place de documents contractuels spécifiques. Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées, la mise en place *a minima* d'un accord de transfert de matériel biologique (Material Transfer Agreement - MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties. Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou pas à une contrepartie financière.

Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. L'unité de recherche reconnue CNR, de par la valorisation de son savoir-faire et de son expertise sur le matériel biologique concerné, reste détenteur des prélèvements biologiques et données associées ou propriétaire des droits existants sur les souches et données associées y afférant.

Différents points essentiels sont appréhendés dans ces accords : i) le partenaire s'engage à n'utiliser les souches, les prélèvements biologiques et données associées que dans le cadre d'un programme de recherche défini spécifiquement, ii) les résultats issus du programme de recherche devront systématiquement être communiqués par le partenaire au CNR ; le CNR sera également associé ou remercié dans les publications et/ou aux communications, iii) le tiers partenaire s'engage à ne pas transférer les souches, les prélèvements biologiques et les données associées à des tiers et à retourner ou détruire le matériel biologique à la fin du programme de recherche.

En termes de valorisation, les structures porteuses s'assurent dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique et veillent à ce que la valorisation du savoir-faire et de l'expertise du CNR ayant conservé, traité, trié et analysé le matériel biologique soit garantis au titre de l'accord.

Lorsque le matériel biologique et les données associées sont mis à disposition dans le cadre d'une collaboration scientifique par laquelle les partenaires s'associent de manière plus conséquente à la réalisation du programme de recherche, la valorisation des travaux menés conjointement devra tenir compte des apports respectifs de chacun des partenaires. Les accords excluent toute garantie relative (i) à la nature appropriée des souches, des prélèvements biologiques et données associées pour une utilisation spécifique et (ii) à la qualité non-infectieuse du matériel biologique. L'interdiction de l'utilisation du matériel biologique sur l'homme et sur les animaux, le cas échéant, est également stipulée dans l'accord. Enfin, le CNR n'assume aucune responsabilité quant à l'utilisation du matériel biologique par le partenaire.

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Chacun des laboratoires est engagé individuellement ou collectivement dans une démarche qualité.

1.5.1 Le laboratoire coordonnateur de l'hôpital Bichat

L'accréditation pour le paludisme de la plateforme de Bichat du CNR Paludisme a été réalisée en 2017 (dépôt de la demande d'extension) – 2018 (visite des auditeurs) selon la norme ISO 15189 au sein du laboratoire des hôpitaux universitaires de Paris Val de Seine accrédité depuis janvier 2015. Respect des bonnes pratiques de laboratoire : toutes les procédures sont rédigées et actualisées semestriellement. Les échantillons transportés par un prestataire contractuel bénéficient d'un enregistrement des températures qui est imprimé à leur arrivée. Pour le contrôle de chaque lot de plaques, les clones *Pf* 3D7 et *Pf* W2, sont utilisés pour valider le lot avec traçabilité des valeurs obtenues. Afin de normaliser les résultats présentés, les valeurs de CI₅₀ sont également exprimées en ratio 3D7 et W2. Les procédures de contrôle de sécurité des collections sont la mise en place de sondes thermiques à + 4°C et -20°C avec enregistrement des températures et alarme, l'enregistrement des températures à -80°C, le relevé quotidien des paramètres d'incubateur de culture (température, humidité, mélange gazeux) et la traçabilité des anomalies. Les collections sont déclarées aux CRB AH-HP.

1.5.2 Laboratoire associé de la Pitié Salpêtrière

Accréditation selon norme ISO 15189 dans le cadre de l'accréditation du Pôle de biologie du CHU Pitié-Salpêtrière. Fériel Touafek, responsable assurance qualité dans le service, sera également en charge de cet aspect pour la plateforme Pitié Salpêtrière. Respect des bonnes pratiques de laboratoire : toutes les procédures sont révisées à partir du GBEA du service lorsque c'est pertinent ou rédaction de fiches techniques et de procédures spécifiques lorsqu'il y a lieu. Elles sont actualisées en temps réel à mesure des modifications apportées. Le laboratoire de Parasitologie de l'hôpital Pitié-Salpêtrière a été confirmée dans son accréditation le 01 avril 2018 jusqu'au 31 mars 2023 pour les méthodes reconnues, adaptées ou développées (portée B) pour la recherche et l'identification de parasites en microscopie optique et par biologie moléculaire (pcr, hybridation, séquençage...), attestation d'accréditation N° 8-3253 rév. 9.

1.5.3 Laboratoire associé IRBA

L'unité de recherche Parasitologie et entomologie de l'IRBA, laboratoire associé au centre national de référence du paludisme entre dans un processus de certification ISO 9001. L'IRBA, centre de recherche situé à Brétigny sur Orge a eu la certification ISO 9001 en début d'année 2019 et c'est maintenant aux différentes unités de l'IRBA situées hors de Brétigny d'obtenir la certification Iso 9001. Bien que l'UPE ne fasse pas de diagnostic en première intention et ne rende pas de résultats à des patients, une de ses missions est l'aide et l'expertise diagnostic des cas de paludisme des correspondants de la région PACA, de Lyon, de Valence, de Montpellier, de Toulouse et de Bordeaux. A ce titre, l'UPE mets en place une procédure d'accréditation NF EN ISO 15189 pour accréditer le diagnostic du paludisme pour les méthodes de recherche et d'identification des parasites par microscopie et par biologie moléculaire. Bruno Pradines est autorisé à exercer la biologie médicale dans son domaine d'expertise au titre du CNR paludisme de par son expérience depuis 1996 après examen par Commission nationale de Biologie médicale.

1.5.4 Pôle Zones endémiques : laboratoire associé de l'Institut Pasteur de la Guyane

Les quatre Laboratoires de Référence et d'Expertise hébergés à l'Institut Pasteur de la Guyane (IPG) sont accrédités selon la norme ISO 15189 auprès du Comité Français d'Accréditation (COFRAC, Accréditation n° 8-3373, portée disponible sur COFRAC.fr).

1.5.5 Démarche qualité interne au CNR Paludisme

1.5.5.1 Clones de références

Les clones de références de *P. falciparum* (Pf 3D7 et Pf W2) utilisés pour valider les lots de plaques d'antipaludiques sont depuis 2010 contrôlés systématiquement deux fois par an en biologie moléculaire (clonalité et identification) par un laboratoire extérieur appartenant au réseau WWARN (cf. §4.3.3. de la partie H de ce document).

Des clones ou souches anonymisés seront expédiés par le laboratoire IRBA à l'Hôpital Bichat réalisant également le phénotypage pour être techniqués. Les résultats de chimiosensibilité obtenus sont ainsi comparés entre-eux : ceci constitue un contrôle extérieur inter-laboratoires.

1.5.5.2 Lots de plaques d'antipaludiques

Pour réaliser les tests de chimiosensibilité *in vitro*, les laboratoires métropolitains du CNR travaillent avec les mêmes lots d'antipaludiques distribués désormais par le réseau WWARN. Les lots de plaques sont contrôlés par au moins un clone de référence (3D7). Le nombre de plaques contrôlées dépend du nombre de plaques dans le lot selon le respect de la norme ISO de production de matières premières. Les lots non validés sont détruits.

De plus, les isolats seront désormais caractérisés par leur valeur de concentration inhibitrice 50% (CI_{50}) pour chaque antipaludique considéré mais aussi par le ratio de cette CI_{50} pour l'antipaludique considéré sur la valeur moyenne de la CI_{50} pour ce même antipaludique obtenue avec le clone Pf 3D7 lors de la validation du lot utilisé. Ceci permet de normaliser les résultats obtenus et de les comparer d'un lot à l'autre au niveau d'un même laboratoire mais aussi entre laboratoires.

1.5.6 Ethique, protection des données et management de la base

Les données épidémiologiques, biologiques, cliniques et thérapeutiques des cas de paludisme identifiés en zone non endémiques sont déclarées au CNR Paludisme. Les cas des zones endémiques sont déclarés de manière exhaustive aux Cire concernées et les données globales en lien avec les échantillons biologiques reçus en provenance des zones d'endémie sont stockées dans la base spécifique du laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane

Les différents composants du système d'Information du CNR Paludisme sont détaillés ci-dessous.

Base Voozanoo Zones non endémiques

Les cas déclarés au CNR Paludisme sont gérés par un système de gestion de base de données sécurisé en ligne développé par la société EpiConcept : le logiciel Voozanoo. Ce logiciel est accessible sur Internet avec un identifiant et un mot de passe valide sur le site d'EpiConcept (<https://ssl.voozanoo.net/palu>). Il permet le recueil, le traitement et l'échange en temps réel de données en provenance des centres collecteurs des cas de paludisme.

Les différents composants du système d'Information du CNR Paludisme sont détaillés ci-dessous.

Voozanoo

Le système de déclaration en ligne pour la notification des cas de paludisme du CNR du Paludisme a été déclaré à la «Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés» (CNIL) sous le numéro 1223103. Ce système de déclaration en ligne, basé sur le logiciel spécialisé « Voozanoo » (ie. une boîte à outils basée sur des technologies open source), a été développé en collaboration avec la société EpiConcept qui est également en charge de l'hébergement de la base de données du CNR du Paludisme. Il permet de créer et de publier via Internet, des « questionnaires » du plus simple (cf. enquêtes de satisfaction en ligne), au plus complexe (cf. fiche de saisie en ligne). La licence Voozanoo est sous GNU/GPL (General Public License). EpiConcept est une société privée spécialisée dans l'épidémiologie et le développement des technologies de l'information des systèmes de santé publique. Depuis le 11 mai 2012, EpiConcept est un " fournisseur d'hébergement de données de santé personnelles " avec une certification nationale ¹. La certification a été reconduite en mai 2015. Epiconcept est agréée par l'ASIP pour la plateforme Voozanoo. Les exigences techniques en matière de sécurité, l'analyse des risques et la mise en place d'une PSSI (Politique de Sécurité des Systèmes d'Information) nécessaires à l'obtention de cet agrément sont très proches de celles répondant à la norme ISO 27001.

Epiconcept est membre de l'association française des hébergeurs de données de santé à caractère personnel : AFHADS Pour ce faire, l'entreprise a mis en place une politique de sécurité des données qui remplit les exigences légales et éthiques liés à l'hébergement des données médicales personnelles. Le cadre juridique associé à l'approbation de l'hébergement de données de santé personnelles est régi par l'article L. 1111-8 du code de la santé publique dans le cadre de la Loi n ° 2002-303 du 4 Mars 2002 dite loi "Kouchner".

Exploitation des données de la base

Les données saisies sont facilement exportables sous plusieurs formats (données agrégées ou de fichiers à plat anonymisés du type Feuilles Excel, fichier texte, pdf..). La sécurisation des transferts est assurée par le serveur Web (via le protocole https). Le niveau de sécurisation des transferts dépend de la nature des données (individuelles ou agrégées). Les technologies utilisées dans Voozanoo (en particulier l'exploitation native de fichiers Xml) permettent une mise en place naturelle d'interfaces pour un transfert automatique et sécurisé de données standardisées. (Ce type d'architecture est identique à celle mise en place pour les échanges avec l'eCDC pour alimenter la base TESSy. cf. machine to machine interface to TESSy).

(www.ecdc.europa.eu/.../0907_TER_TESSy_Web_Service_Technical_Documentation_1.pdf)

- ✓ Export-Import de et vers d'autres logiciels
- ✓ Suivi en réel du déroulement de l'enquête
- ✓ Edition de résultats en cours d'enquête

Analyse des données

Le logiciel permet une description sommaire des données saisies,

- ✓ Traitement automatisé des données
- ✓ Analyse des fréquences, tables croisées, moyennes..
- ✓ Présentation en tableaux ou graphiques
- ✓ Création de rapport d'analyse standard
- ✓ Option de mise en ligne automatisée des résultats
- ✓ Rétro information en direct avec analyses comparatives

Ces données sont bien sûr destinées à être exportées pour être analysées avec des logiciels statistiques puissants (Stata, SAS, SPSS...) pour des statistiques plus élaborées.

¹ <http://esante.gouv.fr/services/referentiels/securite/hebergeurs-agrees>

Un partage des données est envisageable avec des structures internationales comme l'OMS et WWARN. Un accord de partage des données (DSA) a été signé entre le CNR et le programme WWARN hébergé à l'Université d'Oxford (UK) en 2010. Les termes de cet accord pourraient servir de modèle pour d'autres partages respectant la confidentialité, les prérogatives des systèmes sanitaires nationaux et la propriété de la recherche et de ses applications. Des contacts sont en cours entre EpiConcept et WWARN-Université d'Oxford pour un format international de base de données sur la surveillance des résistances dans le paludisme.

Mesures de protection des systèmes Voozano

Les exigences techniques en matière de sécurité, l'analyse des risques et la mise en place d'une PSSI (Politique de Sécurité des Systèmes d'Information) nécessaires à l'obtention de cet agrément sont très proches de celles répondant à la norme ISO 27001. L'organisme de certification d'État concerné était l'Agence des Systèmes d'Informations Partagées de Santé, acronyme ASIP-Santé².

Organisation de la sécurité³

EpiConcept a notamment adopté les mesures suivantes :

- ✓ création d'un comité de pilotage sécurité,
- ✓ diagnostic du niveau de sécurité (plateforme de développement, développement et hébergement),
- ✓ mise en œuvre d'un plan d'actions pour couvrir les risques (formalisation des pratiques, processus de gestion de la sécurité, plan de formation des salariés...),
- ✓ accompagnement par des experts de la sécurité de l'information (parmi lesquels la société HSC).

Architecture de la plateforme d'hébergement

Tous les développements informatiques d'EpiConcept sont effectués à partir de la plateforme Voozano. Parmi les mesures permettant d'assurer sa sécurité :

- ✓ utilisation systématique de la cryptographie,
- ✓ segmentation du réseau par l'utilisation de sous-réseaux distincts,
- ✓ choix de systèmes d'exploitation réputés pour leur robustesse et optimisés par des experts,
- ✓ veille technologique et intégration immédiate des mises à jour de sécurité proposées par les éditeurs des formats ouverts,
- ✓ formation des développeurs à la programmation sécurisée.

La sauvegarde et restauration.

- ✓ Le centre d'hébergement dispose d'onduleurs garantissant la continuité en alimentation électrique des serveurs, en cas de défaillance électrique.
- ✓ Les sites sont gardés et surveillés 24 heures sur 24.
- ✓ Les différentes parties des sites sont isolées par des portes hautes sécurités et toutes les fenêtres sont équipées d'un système anti-intrusion.
- ✓ L'accès aux salles via un digicode n'est permis qu'aux personnes accréditées.
- ✓ Les mesures assurant la sauvegarde du système informatique sont des disques durs avec une fréquence des sauvegardes quotidienne
- ✓ tous les lieux de sauvegarde bénéficient d'une protection supplémentaire qui est le système anti-incendie

La protection contre les intrusions extérieures utilisant le canal des réseaux informatiques est assurée un pare-feu (firewall) : KASPERSKY.

² <http://esante.gouv.fr/asip-sante>

³ contact-pssi@epiconcept.fr

Afin d'**assurer la confidentialité des données lors du développement de l'application informatique**, celle-ci s'effectue dans un environnement informatique distinct de celui de la production (sur des ordinateurs différents, dans des salles machine différentes).

Les mesures destinées à assurer **la confidentialité des données lors des opérations de maintenance des équipements informatiques** sont enregistrées dans une main-courante.

Les supports de stockage destinés à la destruction sont passés au pilon.

Les interventions de maintenance des logiciels dans l'environnement de production sont enregistrées dans une main-courante. Une clause de confidentialité est signée avec le prestataire informatique.

Le contrôle d'accès, authentification/identification des personnes habilitées à accéder à l'application se fait par un mot de passe caractérisé par une séquence alphanumérique aléatoire de huit caractères générée par le système mélangeant numérique et alphanumérique. Nativement l'authentification est individuelle (personne physique) et elle s'effectue par le biais de la saisie d'un identifiant et d'un mot de passe associé. En fonction des infrastructures, elle peut être renforcée par l'utilisation d'un LDAP (Système d'annuaire centralisé). Une interface d'administration permet à l'administrateur de gérer l'ensemble des utilisateurs (révocation, changement de mot de passe, création...). Lors d'une connexion, des informations concernant la précédente connexion s'affichent sur le terminal (par ex. date, heure et identifiant de l'utilisateur). Les accès à l'application font l'objet d'une journalisation (données de connexion) caractérisée par l'enregistrement du login/ identifiant de l'utilisateur et date/heure de connexion, la référence des données du fichier auxquelles il a été accédé et le type d'accès journalisés, pour : Consultation / Création / Mise à jour.

Chaque variable peut être tracée pour suivre les modifications effectuées. On conserve ainsi la date de modification, l'identifiant de l'utilisateur à l'origine de la modification, la valeur avant et après modification.

Confidentialité/authentification. L'application met en œuvre des **procédés** de chiffrement du transport des données : SSL Longueur de la clé : 256/128 bits. La sécurisation des flux est fondamentale afin d'éviter toute éventualité d'interception de paquets de données.

La politique de sécurité/confidentialité est formalisée dans des documents et la sensibilisation des utilisateurs à la politique de sécurité passe par des règles déontologiques. Formation en interne, réunions internes de sensibilisation...

Monsieur Éric Kendjo biostatisticien à l'Hôpital Pitié-Salpêtrière assure l'administration de la base de données et avec un assistant de recherche clinique et ses responsables le Pr Sandrine Houzé, le Dr Marc Thellier, le Dr Bruno Pradines et le Dr Lise Musset, le traitement et l'analyse des données.

Une particularité de l'action de ce CNR est qu'il participe pleinement à la prise en charge médicale des patients avec la réalisation d'analyses. Les données saisies dans la base Voozanoo ne sont donc pas anonymes.

Base de données du pôle Zones non endémiques du CNR Paludisme

La base de données du CNRPalu met en réseau la saisie des fiches de déclaration avec une double finalité. Cette saisie est sécurisée et se fait via Internet par les centres partenaires qui reçoivent en retour une rétro information en ligne concernant les données collectées. La rétro-information comporte deux parties : une première partie constituée par une série de tableaux de bord standards et une seconde qui permet à chaque correspondant de récupérer ses données au format CSV à des fins d'analyses locales. La base comporte un système d'alerte destiné aux responsables du CNRPalu avec des tableaux de bord spécifiques pour la surveillance et le suivi global des cas de paludisme d'importation en France.

Le recueil de données : Il s'intéresse au patient atteint du paludisme diagnostiqué en France métropolitaine et DOM. Une interface Web facilite la saisie des données de cas et des échantillons biologiques. Le module de saisie est basé sur Voozanoo, donc possède en mode natif les fonctionnalités suivantes :

- ✓ Gestion des groupes et des niveaux d'utilisateurs,

- ✓ Saisie multi-utilisateur,
- ✓ Accès protégé et protection par mot de passe,
- ✓ Gestion des formulaires d'identification,
- ✓ Accès administrateur pour la gestion des comptes et des droits utilisateurs,
- ✓ Sécurisation possible en utilisant la restriction d'accès par adresse IP

En résumé, l'accès à la base de données se fait par identification et mot de passe et suit une certaine hiérarchisation. Les correspondants n'ont accès qu'aux informations concernant leur centre. Le responsable de chaque laboratoire associé peut avoir accès aux données de ses correspondants. Le CNRPalu est dépositaire de toutes les données par l'intermédiaire d'un administrateur unique.

Création d'enquête : elle est d'une grande souplesse et permet la mise en place des contrôles à la saisie.

- ✓ Identification des variables : libellés de la question, intitulée, nom de la variable,
- ✓ Types de variable : Texte, numérique, date,...
- ✓ Variable rattachée à un thésaurus paramétrable
- ✓ Gestion du caractère obligatoire ou non de la saisie
- ✓ Bornes pour les dates et les numériques
- ✓ Gestion de sauts de question

Collecte-saisie : les données saisies sont anonymisées avec :

- ✓ Saisie en ligne du questionnaire
- ✓ Modification d'un questionnaire saisi
- ✓ Saisie sécurisée par un accès restreint pour un laboratoire à ses seules données
- ✓ Traçabilité de la saisie (historisation des transactions)

Design. Il est spécifique avec logos et charte graphique, couleurs, polices, présentation personnalisée du masque de saisie

L'hébergement du site web de saisie des données se trouve sur les serveurs d'EpiConcept.

L'administration. L'administrateur s'occupe de la gestion au quotidien de la base de données (état de la saisie, gestion des comptes utilisateur, création des enquêtes spécifiques, relation avec les correspondants...). Il gère les droits des utilisateurs / Restriction des accès. Une interface dédiée permet l'association d'actions et de droits à des groupes d'utilisateurs (personnel administratif, technicien, biologiste, administrateurs...).

La maintenance. Elle est assurée conjointement par EpiConcept et l'administrateur.

La traçabilité. Journalisation des accès, traçabilité de toutes les actions sur la base de données du type (QUI/QUOI/QUAND), traçabilité des modifications effectuées sur le logiciel et les ressources (versionning)

Base de données du pôle Zones endémiques du CNR Paludisme

- En Guyane, le laboratoire de parasitologie de l'IPG dispose également d'une base de données permettant de gérer les différents échantillons qu'il reçoit et les informations clinico-épidémiologiques associés. Cette base est construite autour du patient de façon à regrouper les prélèvements issus d'une même personne afin de pouvoir détecter rapidement les suspicions d'échecs thérapeutiques ou de reviviscence concernant *P. vivax*. Elle permet également de regrouper toutes les données clinico-épidémiologiques et les notions d'antécédents de paludisme disponibles pour un patient. Côté laboratoire, cette base gère l'ensemble des analyses à réaliser, émet des listes de travail et permet de suivre les délais de rendu de résultat. Elle est hébergée sur le serveur propre de l'IPG.
- Cependant, cette base n'est pas suffisamment aboutie en termes d'analyse des données et requêtes. Nous déploierons dans les années qui viennent la même structure base de données que les CNR pasteuriens métropolitains. La structure exact de cette future base n'est pas encore définie.

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

2.1.1 Techniques mises en œuvre dans les laboratoires du CNR

Méthodes diagnostiques

Le diagnostic d'espèce et la densité parasitaire sont confirmés au microscope sur frottis mince et goutte épaisse. Les divergences ou difficultés diagnostiques font l'objet d'une étude antigénique (tests immunochromatographiques de diagnostic rapide) ou génomique par PCR (*PCR temps réel*, *PfssurRNA*, *pLDH*). Tous les échantillons avec moins de 100 parasites par microlitre font l'objet d'une PCR d'espèce en temps réel avec des réactifs commerciaux ou des réactifs maisons (ainsi que tous les échantillons pour lesquels une espèce différente de *P. falciparum* est identifiée microscopiquement).

Dosages des antipaludiques

Le dosage des antipaludiques est effectué sur les plasmas des isolats de *P. falciparum* associés à un échec thérapeutique ou prophylactique déclaré. A l'IRBA, les dosages sont effectués par chromatographie LHP. Les molécules étudiées sont la chloroquine (CQ) et son métabolite actif déséthyl (CQM), le proguanil (PG) (peu actif) et son métabolite actif le CY, la méfloquine (MQ) et son métabolite carboxy (cMQ), l'atovaquone (AV), la quinine (QN), l'amodiaquine et son métabolite actif déséthyl (DQ), la luméfantrine (LUM), et la doxycycline (DOX).

Pour l'AV et la MQ, un dosage est effectué sur le plasma de J3 ou J7, si le patient s'est présenté au contrôle et s'il présente un échec thérapeutique précoce (J3-J7) ou tardif entre J7 et J28.

Test de chimiosensibilité *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

Le principe du test isotopique est de mettre en contact les stades sanguins de *P. falciparum* avec des concentrations croissantes d'antipaludique (Le Bras *et al.*, 1983⁴). Après 42 heures de culture, le niveau d'incorporation de l'hypoxanthine tritiée, précurseur de l'ADN, permet d'évaluer l'inhibition de la croissance parasitaire par l'antipaludique testé. On peut alors tracer une courbe effet/dose et déterminer la concentration nécessaire pour réduire de 50% la croissance parasitaire (concentration inhibitrice 50% : CI_{50}). La courbe et la CI_{50} sont calculées par l'intermédiaire d'un logiciel, ICestimator, développé par J. Le Bras (<http://www.antimalarial-icestimator.net>, Kaddouri H *et al.*, 2006⁵).

La chimiosensibilité de *P. falciparum* (antipaludogramme) à la chloroquine, la mono-déséthylamodiaquine, la quinine, la luméfantrine, la dihydroartémisinine, la méfloquine, la pipéraquline, la doxycycline est mesurée. Si justifié, la sensibilité peut être mesurée à l'atovaquone, la pyronaridine, à l'halofantrine, l'artésunate, l'artémether, au cycloguanil ou à la pyriméthamine. Les tests sont réalisés si les prélèvements sont reçus non altérés moins de 48h après le prélèvement, et si la parasitémie est supérieure ou égale à 0,1 % (5000 formes asexuées par μ L de sang).

Le laboratoire coordonnateur de Bichat révèle la croissance parasitaire par incorporation d'hypoxanthine tritiée. Bien que technique de référence, la principale limitation de cette méthode est qu'elle utilise un radionucléide (tritium) dont la demi-vie est de 12,3 ans et génère donc des déchets

⁴ Le Bras J, Deloron P: *In vitro* study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: evaluation of a new semi-micro test. *Am J Trop Med Hyg* 1983, **32**:447-451.

⁵ Kaddouri H, Nakache S, Houze S, Mentre F, Le Bras J: Assessment of the drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from africa by using a *Plasmodium* lactate dehydrogenase immunodetection assay and an inhibitory maximum effect model for precise measurement of the 50-percent inhibitory concentration. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**:3343-3349.

radioactifs (solides et liquides). Les installations font l'objet d'un contrôle annuel par l'APAVE (Association des Propriétaires d'Appareils à Vapeur et Electriques), et le laboratoire évacue annuellement ses déchets via l'ANDRA. Depuis 2010, en lien avec l'APAVE (Association des Propriétaires d'Appareils à Vapeur et Electriques), l'IPG évacue également annuellement ses déchets vers un centre de l'ANDRA situé en métropole.

Depuis 2013, l'IRBA révèle les tests de chimiosensibilité de *P. falciparum* après 72 heures de culture, par la mesure de la quantité d'antigène présente dans le milieu (pLDH ou pHRP₂) à l'aide d'un test ELISA.

Les tests *in vitro* sont réalisés sur les échantillons de *P. falciparum* arrivés au LA-ZE avant ou après adaptation à la multiplication *in vitro* en fonction de la parasitémie. Plusieurs molécules sont testées : la chloroquine, la quinine, la doxycycline, l'artémether, l'atovaquone, la luméfantrine, la méfloquine, la dihydro-artémisinine, la pipéraquline, la pyronaridine et la monodéséthyl-amodiaquine. Ces molécules ont été choisies en fonction :

- des recommandations thérapeutiques et prophylactiques de la conférence de consensus sur la prise en charge du paludisme en Guyane de 2002 (Tableau 4);
- de l'intérêt thérapeutique de molécule en développement ;
- des recommandations thérapeutiques et prophylactiques des pays frontaliers (Tableau 4).

Tableau 4. Recommandations thérapeutiques en Guyane, au Suriname et au Brésil en 2017.

			Guyane	Suriname	Brésil
<i>P. falciparum</i>	Accès simple	1	AR/LU	AR/LU/PQ	AR/LU ou AS/ MQ
		2	AV/PG	AS/MQ/PQ	QU/DX
	Accès grave		AS IV puis AR/LU	AS IV puis AR/LU	QU + AS
<i>P. vivax</i>			CQ	CQ	CQ
<i>P. malariae</i>			PQ (15mg/j - 15 jours)	+ PQ (15mg/j - 15 jours)	+ PQ (30mg/j - 7 jours)

AR : artémether ; AS : artésunate ; AV : atovaquone ; CQ : chloroquine ; DX : doxycycline ; IV : intra veineux ; LU : luméfantrine ; MQ : méfloquine ; PG : proguanil ; PQ : primaquine ; QU : quinine.

Préambule à l'interprétation des tests *in vitro* présentés dans le document principal

Définition des isolats résistants : Nous tenons à rappeler que pour la majorité des molécules testées, il s'agit d'être très prudent dans l'interprétation des tests puisque, excepté pour l'atovaquone et la chloroquine, les seuils *in vitro* utilisés pour catégoriser les sensibilités des isolats n'ont pas été corrélés avec : i) des données d'efficacité thérapeutique *in vivo* (absence d'échec thérapeutique ou absence d'étude de suivi clinique) ou, ii) avec un marqueur moléculaire de résistance validé. L'absence de ce type de données impose une détermination des seuils selon des méthodes statistiques. De ce fait, nous avons choisi de ne pas utiliser le mot résistance mais plutôt "de sensibilité diminuée", pour les isolats présentant une sensibilité au dessus du seuil pour les molécules en question. Nous n'utiliserons le terme résistant que pour la chloroquine et l'atovaquone qui sont les deux seules molécules pour lesquelles une corrélation a pu être démontrée.

Les seuils de diminution de sensibilité consensus au sein du CNR sont:

- 800nM pour la quinine (Basco & Le Bras, 1994),
- 35 µM pour la doxycycline (Briolant *et al.*, 2009),
- 12nM pour l'artémether (Basco & Le Bras, 1993),
- 150nM pour la luméfantrine (Pradines *et al.*, 1999),
- 12nM pour la dihydro-artémisinine (Basco & Le Bras, 1993),
- >90nM pour la pipéraquline (Amato *et al.*, 2017),
- 60nM pour la pyronaridine (Pascual *et al.*, 2015),
- 30nM pour la méfloquine pour les données en provenance de Guyane, 40nM à Paris (Brasseur *et al.*, 1990),
- 60nM pour la monodéséthyl-amodiaquine (Ringwald *et al.*, 1998).

La différence de seuil pour la méfloquine est liée à la méthode, extemporanée en Guyane, plaques pré-dosées en métropole. La méfloquine étant une molécule fragile, cela pourrait expliquer pourquoi les valeurs observées sont généralement plus hautes en métropole qu'en Guyane lorsque l'on analyse les résultats issus des souches de références.

Influence de l'adaptation des isolats à la culture cellulaire : Entre 2010 et 2013, les valeurs de chimiosensibilité déterminées après mise en culture des parasites réalisées en Guyane avaient été analysées séparément. Aucune différence significative n'avait été observée. Ainsi, depuis 2014, nous ne distinguons plus les valeurs obtenues avant et après adaptation. Pour un isolat, la valeur considérée est : la valeur déterminée à J0 ou, la valeur de Jx lorsqu'il n'y avait pas de donnée à J0.

Influence de l'atmosphère d'incubation : Début 2013, nous avons modifié nos conditions de culture et incubé nos tests à 5% CO₂, 10% d'O₂ alors que jusque là, ces derniers étaient incubés en jarre à bougie soit 2,7% de CO₂ et 17,5% d'O₂. En effet, nous avons fait l'acquisition d'un deuxième incubateur à atmosphère contrôlée dédié à la manipulation des radioéléments et qui présente l'avantage de mieux maîtriser les conditions d'incubation que des jarres à bougie où l'atmosphère pouvait varier plus largement en fonction de l'étanchéité de la jarre et des bougies utilisées. L'atmosphère d'incubation a eu une forte influence sur les valeurs de CI₅₀ de la famille des amino-4-quinoléines à savoir, chloroquine, monodéséthyl-amodiaquine, méfloquine et quinine dans une moindre mesure.

Présentation des données obtenus en 2018 par le Pôle zones endémiques

Cf Annexe 8.

Phénotypage vis à vis des dérivés de l'artémisinine à l'aide du Ring Survival Assay (RSA) et du Piperaquine Survival Assay (PSA)

Le phénotypage des parasites reçus au laboratoire coordonnateur inclus deux tests de survie dit test RSA (ring survival assay) et test PSA (piperaquine survival assay) qui sont mis en œuvre pour étudier la sensibilité des parasites aux dérivés de l'artémisinine et à la pipéraquline (Witkowski *et al.*, 2013⁶, Duru *et al.*, 2015⁷). Les tests RSA et PSA *ex vivo* sont effectués sur des isolats de parasites fraîchement collectés chez des patients infectés par *P. falciparum* (monoinfection). Pour les tests RSA, les parasites sont exposés à 700nM de DHA pendant 6 heures (exposition s'approchant de celle des patients traités) et leur survie est évaluée 72 heures plus tard comme décrit dans la publication princeps à ce sujet. Pour le test PSA, les parasites sont exposés à 200nM de pipéraquline pendant 48h (exposition s'approchant de celle des patients traités) est évaluée 24 heures plus tard.

Le résultat des RSA et PSA est exprimé en pourcentage de parasites survivant par rapport à la cupule contrôle ne contenant que du solvant ou milieu de culture respectivement. Les isolats présentant un taux de survie supérieur à 1% sont dits résistants pour le RSA et 10% pour le PSA.

Méthodes de biologie moléculaire

Extraction d'ADN

A partir de sang veineux prélevé sur tube EDTA utilisant des colonnes de silice (Qiagen®).

Analyse des marqueurs moléculaires de résistance

La recherche de mutations ponctuelles par séquençage

L'identification par séquençage des mutations ponctuelles se situant sur les gènes codant sont réalisées :

⁶ Witkowski, Amaratunga et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: *in vitro* and *ex vivo* drug-response studies. Lancet Infect Dis. 11 Sep 2013.

⁷ Duru, V., N. Khim, R. Leang, S. Kim, A. Domergue, N. Kloeung, S. Ke, S. Chy, R. Eam, C. Khean, K. Loch, M. Ken, D. Lek, J. Beghain, F. Arieu, P. J. Guerin, R. Huy, O. Mercereau-Puijalon, B. Witkowski, and D. Menard. 2015. *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperaquine failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites presenting high survival rates in novel piperaquine *in vitro* assays: retrospective and prospective investigations. BMC medicine 13:305.

- le cytochrome *b* (*pfcytb*) : le codon 268 (Y268S ou Y268C) étant lié à la résistance à l'atovaquone/proguanil ou Malarone® (Musset *et al.*, 2006⁸),
- le gène K13 (*pfK13*) : les mutations dans le site actif de cette protéines sont recherchées selon la méthode développée par Arie *et al.*, 2014⁹ en lien avec la résistance aux dérivés de l'artémisinine,
- la dihydrofolate reductase et la dihydroptéroate synthase (*pfdhfr*, *pfdhps*) impliquées dans la résistance aux antifoliques et antifoliniques,
- le transporteur vacuolaire impliqué dans la résistance à la chloroquine (*pfcr1*) dont les mutations sont impliquées dans la résistance à la chloroquine et à certains antipaludiques s'accumulant dans la vacuole digestive, les lysosomotropes,

La détection des amplifications géniques par PCR en temps réel

- Gène *pfmdr1* : l'augmentation du nombre de copies du gène *pfmdr1* est associée à la résistance à la méfloquine (Price *et al.*, 2004¹⁰),
- Gène *plasmepsine 2* : l'augmentation du nombre de copies du gène *plasmepsine 2* pourrait être associée à la résistance de *P. falciparum* à la pipéraquline.

Etude du polymorphisme génétique des plasmodies

Pour les patients présentant deux accès palustres à *P. falciparum* dans un intervalle de temps court (<4-5 semaines), ces techniques permettent de distinguer les échecs thérapeutiques des nouvelles infections. Ces techniques permettent également d'étudier le dynamisme et de la diversité de la population parasitaire circulant dans une zone donnée.

- Etude de marqueurs microsatellites de *P. falciparum*

Chacun des marqueurs est amplifié au cours d'une PCR utilisant une amorce fluorescente. Trois fluorochromes différents sont utilisés (Musset *et al.*, 2007¹¹). La distinction des deux marqueurs marqués par le même fluorochrome s'effectue en comparant les tailles observées. Cette technique est au point et utilisée pour valider nos souches de référence et être sûr qu'elles n'ont pas été victimes d'un mélange accidentel entre plusieurs souches ou encore d'une dérive génétique au cours de la culture.

2.1.2 Techniques spécifiques du pôle Zones non Endémiques

Etude du pitting

La mesure, par une technique d'immunofluorescence spécifique en cytométrie en flux, des hématies « pitées » ou épépinées par la rate, cad débarrassées des restes du parasite tué par les médicaments à action sur les stades les plus jeunes du parasite (rôle de contrôle des globules rouges et de filtre mécanique) permet le suivi de cette population particulière de globules rouges qui ont été infectés « once infected » des anglo-saxons. Cette mesure est investiguée pour son utilité potentielle comme marqueur de l'anémie différée observée chez environ 25% des patients traités par l'artésunate iv.

⁸ Musset L, Bouchaud O, Matheron S, Massias L, Le Bras J: **Clinical atovaquone-proguanil resistance of *Plasmodium falciparum* associated with cytochrome *b* codon 268 mutations.** *Microbes Infect* 2006, **8**:2599-2604.

⁹ Arie *et al.* (2014) A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 505(7481):50-55.

¹⁰ Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, Patel R, Laing K, Looareesuwan S, White NJ, et al: **Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number.** *Lancet* 2004, **364**:438-447.

¹¹ Musset L, Le Bras J, Clain J: **Parallel evolution of adaptive mutations in *Plasmodium falciparum* mitochondrial DNA during atovaquone-proguanil treatment.** *Mol Biol Evol* 2007, **24**:1582-1585.

Sérodiagnostic Ac Antinucléaires sur cellules Hep2

Une nouvelle méthode originale pour le diagnostic des paludismes chroniques à l'aide d'un test répandu et habituellement prescrit pour le diagnostic de certaines maladies auto-immunes, la recherche d'auto anticorps sur cellules Hep2. Une avancée qui permet d'améliorer ce diagnostic souvent délicat et généralement non évoqué chez des patients explorés pour des maladies chroniques pouvant évoquer une infection autoimmunes (thrombopénie chroniques, maladie inflammatoire chronique) et donc de proposer une meilleure prise en charge thérapeutique aux patients. Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication la revue PLOS ONE.

2.1.3 Techniques spécifiques du Pôle Zones endémiques

Méthodes diagnostiques

- Diagnostic différentiel d'espèce par PCR nichée (Snounou *et al.*, 1993¹²).

Lorsqu'un prélèvement arrive au laboratoire, un frottis et une goutte épaisse sont systématiquement réalisés. En cas de difficulté diagnostic, un test TDR et un diagnostic différentiel d'espèce par PCR sont réalisés. Le diagnostic différentiel d'espèce est également utilisé pour tous les échantillons : i) pour lequel le LA-ZE a reçu une demande d'expertise de confirmation d'espèce d'un laboratoire de diagnostic, comme par exemple une recherche de *P. falciparum* chez un patient hospitalisé pour un *P. vivax*, ou ii) en cas de discordance entre le diagnostic du laboratoire et l'examen microscopique du frottis effectué au LA-ZE.

Méthodes de culture cellulaire

Multiplication *in vitro* continue de *P. falciparum*

En plus de la multiplication *in vitro* des souches de référence pour la réalisation des contrôles de qualité des lots de solution mères d'antipaludiques maîtrisée depuis longtemps au laboratoire, le laboratoire adapte à la multiplication *in vitro* les isolats de *P. falciparum* depuis mi 2009. Cette adaptation permet de consolider la collection d'isolats cryoconservés ou encore de déterminer des chimiosensibilités pour des isolats qui ne présentaient pas les critères requis à la réception : volume de sang insuffisant ou parasitémie trop faible. Sur toute la période d'adaptation, nous avons rencontré des problèmes de culture pendant plusieurs semaines qui étaient liés à la qualité du sérum qui était utilisé. En dehors de ces périodes, le pourcentage de succès d'adaptation est de proche de 95%.

Méthodes de biologie moléculaire

Mise au point d'une PCR diagnostique d'espèce en temps réel

Cette PCR diagnostique a remplacé la méthode de PCR nichée historiquement utilisée appelée couramment la méthode Snounou. Cette PCR en temps réel multiplex s'effectue en trois PCR pour diagnostiquer quatre espèces : *Plasmodium falciparum*, *vivax*, *ovale* et *malariae*. Un témoin d'extraction est inclus à savoir l'amplification du gène codant la mégaglobuline (MG) humaine. Ainsi une manipulation recherche *P. falciparum* et *P. vivax*, une deuxième *P. ovale* et *P. malariae* et la troisième la mégaglobuline. Les sensibilités ont été déterminées alors que les PCR étaient faites en deux manipulations, Pf/Pv/MG et Pm/Po. Elles sont à 1 parasite par microlitre pour les trois espèces sauf *P. falciparum* dont la sensibilité est uniquement comprise entre 1 et 2,5P/μl. Depuis l'amplification de la MG a été isolée pour augmenter la sensibilité. Ceci c'est vérifier sur plusieurs prélèvements de

¹² Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN: **High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction.** *Mol Biochem Parasitol* 1993, **61**:315-320.

patients sans que l'on est eu le temps pour l'instant de déterminer la sensibilité exacte. Cette technique entre dans le champ d'accréditation de la norme NF EN ISO 15189 version 2012 protégée B des activités de biologie médicale de l'Institut Pasteur de la Guyane.

Modification génétique dirigée des parasites encore appelée : transfection

La transfection parasitaire a été développée au laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane. Elle est effectuée chez des parasites de Guyanes récemment adaptés à la multiplication *in vitro* ce qui la rend unique chez des isolats sud-américains. L'objectif de ce développement est de caractériser la résistance aux artémisinines et à leurs dérivés. Cette technique consiste modifier les parasites à l'aide de nucléases à doigt de zinc (Zinc Finger Nucleases) qui permettent de découper l'ADN à un endroit bien précis.¹³ On introduit ainsi une portion du gène *pfK13* modifiée qui porte la mutation étudiée. Les parasites génétiquement modifiés ainsi obtenus sont clonés puis exposés aux antipaludiques par l'intermédiaire des tests de survie *in vitro* pour mesurer l'impact de la mutation introduite sur leur sensibilité aux dérivés de l'artémisinine.

Identification des délétions des gènes *pfhrp2*/*pfhrp3*

Les tests de diagnostic rapide (TDR) sont devenus un outil indispensable pour le diagnostic de paludisme dans les zones endémiques. Les plus communément utilisés pour détecter *P. falciparum* sont des TDR basés sur la détection de l'antigène Pf-HRP2. Depuis les années 2010, des délétions au niveau du gène codant pour la protéine Pf-HRP2 et Pf-HRP3 chez *P. falciparum* ont été mise en évidence dans certains pays situés à l'ouest de l'Amérique du Sud. Ces délétions entraînent un TDR négatif pour *P. P. falciparum*. Actuellement, ces délétions ont été décrites dans plus de 10 pays du monde (Pérou, Suriname, Brésil, Chine, Inde, République démocratique du Congo...). Ainsi, l'OMS recommande une surveillance attentive des parasites délétés. Pour ce faire, nous avons mis en place au laboratoire un algorithme d'analyse utilisant des PCR nichées spécifiques des régions du gène *pfhrp2* et *pfhrp3* ainsi que leurs gènes adjacents afin d'être capables de suivre la prévalence de ces parasites dans les différents pays de la région amazonienne. La qualité et la quantité de l'ADN au sein de cet algorithme est évalué grâce à une PCR en temps réel spécifique de *P. falciparum*.

Analyse des marqueurs moléculaires de résistance

La recherche de mutations ponctuelles par séquençage

Le LA-ZE maîtrise l'identification par séquençage des mutations ponctuelles se situant sur les gènes codant:

- le cytochrome *b* (*pfcytb*): le codon 268 (Y268S ou Y268C) étant lié à la résistance à l'atovaquone/proguanil ou Malarone® (Musset *et al.*, 2006¹⁴),
- le gène K13 (*pfK13*): les mutations dans le site actif de cette protéine sont recherchées selon la méthode développée par Arieu *et al.*, 2014¹⁵ en lien avec la résistance aux dérivés de l'artémisinine,
- la dihydrofolate reductase et la dihydroptéroate synthase (*pfdhfr*, *pfdhps*) impliquées dans la résistance aux antifoliques et antifoliniques,
- le transporteur vacuolaire impliqué dans la résistance à la chloroquine (*pfCRT*) dont les mutations sont impliquées dans la résistance à la chloroquine et à certains antipaludiques s'accumulant dans la vacuole digestive, les lysosomotropes,

¹³ Straimer, J., N. F. Gnading, B. Witkowski, C. Amaratunga, V. Duru, A. P. Ramadani, M. Dacheux, N. Khim, L. Zhang, S. Lam, P. D. Gregory, F. D. Urnov, O. Mercereau-Puijalon, F. Benoit-Vical, R. M. Fairhurst, D. Menard, and D. A. Fidock. 2015. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science* 347:428-431.

¹⁴ Musset L, Bouchaud O, Matheron S, Massias L, Le Bras J: Clinical atovaquone-proguanil resistance of *Plasmodium falciparum* associated with cytochrome *b* codon 268 mutations. *Microbes Infect* 2006, **8**:2599-2604.

¹⁵ Arieu F, *et al.* (2014) A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 505(7481):50-55.

- le gène *pvmdr1* potentiellement impliqué dans la résistance de *P. vivax* à la chloroquine et tout particulièrement les positions 976 et 1076.

La détection des amplifications géniques par PCR en temps réel

- Gène *pfmdr1* : l'augmentation du nombre de copies du gène *pfmdr1* est associée à la résistance à la méfloquine (Price *et al.*, 2004¹⁶),
- Gène *pvmdr1* : l'augmentation du nombre de copies du gène *pvmdr1* pourrait être associée à la résistance de *P. vivax* à la chloroquine.

Etude du polymorphisme génétique des plasmodies

Pour les patients présentant deux accès palustres à *P. falciparum* dans un intervalle de temps court (<4-5 semaines), ces techniques permettent de distinguer les échecs thérapeutiques des nouvelles infections. Ces techniques permettent également d'étudier le dynamisme et de la diversité de la population parasitaire circulant dans une zone donnée.

- Etude de marqueurs microsatellites de *P. falciparum*

Chacun des marqueurs est amplifié au cours d'une PCR utilisant une amorce fluorescente. Trois fluorochromes différents sont utilisés (Musset *et al.*, 2007¹⁷). La distinction des deux marqueurs marqués par le même fluorochrome s'effectue en comparant les tailles observées. Cette technique est au point et utilisée pour valider nos souches de référence et être sûr qu'elles n'ont pas été victimes d'un mélange accidentel entre plusieurs souches ou encore d'une dérive génétique au cours de la culture.

- Etude des marqueurs microsatellites de *P. vivax*

Cette méthode de PCR nichée permettant d'amplifier sept marqueurs microsatellites de *P. vivax* par PCR nichée a été mise au point en 2011 mais n'a pas encore été publiée. Le protocole est disponible sur demande.

- Gènes codant des antigènes de surface du mérozoïte, *pfmsp1* et *pfmsp2*

Cette méthode de PCR nichée utilise des amorces spécifiques des familles alléliques recherchées (Robert *et al.*, 1996¹⁸, Ntoumi *et al.*, 1995¹⁹). La distinction des différentes familles se fait sur gel d'agarose en comparant les tailles observées.

¹⁶ Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, McGready R, Ashley E, Phaipun L, Patel R, Laing K, Looareesuwan S, White NJ, et al: **Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number.** *Lancet* 2004, **364**:438-447.

¹⁷ Musset L, Le Bras J, Clain J: **Parallel evolution of adaptive mutations in *Plasmodium falciparum* mitochondrial DNA during atovaquone-proguanil treatment.** *Mol Biol Evol* 2007, **24**:1582-1585.

¹⁸ Robert F, Ntoumi F, Angel G, Candito D, Rogier C, Fandeur T, Sarthou JL, Mercereau-Puijalon O: **Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996, **90**:704-711.

¹⁹ Ntoumi F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape JF, Mercereau-Puijalon O: **Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections.** *Am J Trop Med Hyg* 1995, **52**:81-88.

2.1.4 Tableau récapitulatif des techniques maîtrisées au sein du CNR Paludisme

Le tableau ci-dessous reprend l'ensemble des marqueurs épidémiologiques disponibles dans chaque des labos.

Tableau 5. Techniques de laboratoire disponibles sur les différents sites du CNR Paludisme.

	Bichat	Pôle Métropole Pitié Salpêtrière	IRBA	Pôle ZE
Méthodes diagnostiques				
Microscopie, frottis (coloration rapide), goutte épaisse (Giemsa)	✓	✓	✓	✓
Détermination de la densité gamétocytaire	✓	✓	✓	
Tests de diagnostic rapide	✓	✓	✓	✓
PCR (réaction de polymérisation en chaîne) classique	✓	✓	✓	✓
PCR en temps réel	✓	✓	✓	✓
Pitting/épépinage (filtration sur microbilles)		✓		
Immunofluorescence « Resa » mesure des « once-infected »		✓		
Sérodiagnostic Ac Antinucléaires sur cellules Hep2		✓		
Méthodes de culture cellulaire				
Phénotypage de <i>P. falciparum</i> par les méthodes isotopiques et immunoenzymatiques vis-à-vis de la grande majorité des antipaludiques	✓		✓	✓
Phénotypage de <i>P. falciparum</i> par la méthode RSA (Ring Survival Assay)	✓			✓
Phénotypage de <i>P. falciparum</i> par la méthode PSA (Piperaquine Survival Assay)	✓			✓
Adaptation d'isolats de <i>P. falciparum</i> à la culture cellulaire	✓		✓	✓
Antipaludogramme de <i>P. vivax</i> à la chloroquine	En cours		En cours	
Méthode de biologie moléculaire				
Marqueurs moléculaires de résistance <i>P. falciparum</i>	✓		✓	✓
Marqueurs moléculaires de résistance <i>P. vivax</i>	En cours		✓	✓
Analyse des délétions des gènes <i>pfhrp</i>				✓
Modification génétique des parasites				✓
Empreintes génétiques de <i>P. falciparum</i>	✓		✓	✓
Empreintes génétiques de <i>P. vivax</i>	✓		✓	✓
Mesure de la clairance parasitaire par PCR	✓			
Sérologie				
Anticorps anti-stades sexués			✓	
Dosage pharmacologique des antipaludiques	✓		✓	

2.1.5 Marqueurs épidémiologiques disponibles

Le tableau ci-dessous reprend les principaux marqueurs épidémiologiques et biologiques disponibles au sein du CNR paludisme :

Tableau 6. Marqueurs disponibles sur les différents sites du CNR Paludisme.

	Pôle Métropole	Pôle ZE
Marqueurs épidémiologiques des patients impaludés		
Age	✓	✓*
Genre	✓	✓*
Ethnicité	✓	
Zone d'endémie visitée	✓	✓
Nature du séjour	✓	✓
Prophylaxie personnelle antipalustre	✓	✓
Signes cliniques	✓	✓
Signes biologiques	✓	
Prise en charge thérapeutique	✓	✓
Evolution clinique	✓	
	Pôle Métropole	Pôle ZE
Marqueurs biologiques des plasmodies		
Espèce plasmodiale et charge parasitaire	✓	✓
Phénotype <i>in vitro</i> de sensibilité de <i>P. falciparum</i>	✓	✓
Phénotype <i>in vivo</i> d'efficacité thérapeutique	✓	✓
Génotype des marqueurs de résistance de <i>P. falciparum</i>	✓	✓
Marqueurs d'échec prophylactique (dosages plasmatiques)	✓	
Marqueurs d'échec thérapeutique (dosages plasmatiques)	✓	

* Données disponibles et collectées par les Cire en zone d'endémie

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Les membres du CNR se tiennent à la disposition de tous les partenaires ou acteurs de santé afin de discuter de l'intérêt ou non de mettre en œuvre une technique plutôt qu'une autre. Les protocoles utilisés au sein de nos laboratoires sont disponibles sur simple demande. Si la méthode est complexe, une formation au sein d'une des équipes du CNR est envisageable et sera planifiée avec le demandeur.

3. Annexe 3 : Autres informations

4. Annexe 4 : Liste des Centres Hospitalo-Universitaires et des centres hospitaliers régionaux correspondants du CNR du Paludisme - Pôle métropole en 2018

Tableau 7 : Liste des Centres Hospitalo-Universitaires et des centres hospitaliers régionaux correspondants du CNR du Paludisme - Pôle métropole en 2018.

Centres Hospitalo-Universitaires et des centres hospitaliers régionaux	AP-HP	EPID	IRBA	Total + CNR*
Amiens	1	0	0	1
Angers	1	0	0	1
Aulnay-Sous-Bois	1	0	0	1
Beaujon	1	0	0	1
Besançon	1	0	0	1
Bicêtre	1	0	0	1
Bobigny-Avicenne	1	0	0	1
Bondy-Jean-Verdier	1	0	0	1
Boulogne	1	0	0	1
Brest	1	0	0	1
Chambéry	1	0	0	1
Clermont-Ferrand	1	0	0	1
Colombes-Louis Mourier	1	0	0	1
Creil	1	0	0	1
Créteil-Henri Mondor	1	0	0	1
Dijon	1	0	0	1
Fréjus St Raphael	1	0	0	1
Grenoble	1	0	0	1
HIA Brest-Clermont-Tonnerre	1	0	0	1
La Rochelle	1	0	0	1
Lariboisière	1	0	0	1
Le Havre	1	0	0	1
Le Mans	1	0	0	1
Lille	1	0	0	1
Limoges	1	0	0	1
Meaux	1	0	0	1
Mulhouse	1	0	0	1
Nancy	1	0	0	1
Nantes	1	0	0	1
Niort	1	0	0	1
Orléans	1	0	0	1
Paris-Bichat	1	0	0	1
Paris-Cochin	1	0	0	1
Paris-HEGP	1	0	0	1
Paris-HIA Begin	1	0	0	1
Paris-Necker	1	0	0	1
Paris-Pitié-Salpêtrière	1	0	0	1
Paris-Robert Debré	1	0	0	1
Paris-Saint-Antoine	1	0	0	1
Paris-Tenon	1	0	0	1
Paris-Trousseau	1	0	0	1

Poitiers	1	0	0	1
Reims	1	0	0	1
Rennes	1	0	0	1
Saint-Denis	1	0	0	1
Strasbourg	1	0	0	1
Tourcoing	1	0	0	1
Tours	1	0	0	1
Troyes	1	0	0	1
Versailles	1	0	0	1
Villeneuve St Georges	1	0	0	1
Aix en Provence	0	0	1	1
Bordeaux	0	0	1	1
Marseille-HIA Laveran	0	0	1	1
Marseille-Nord	0	0	1	1
Marseille-Timone	0	0	1	1
Montpellier	0	0	1	1
Nice	0	0	1	1
Nîmes	0	0	1	1
Toulon Naval	0	0	1	1
Toulouse-Rangueil	0	0	1	1
Arles	0	1	0	1
Auxerre	0	1	0	1
Blois	0	1	0	1
Bourges	0	1	0	1
Caen	0	1	0	1
Cahors	0	1	0	1
Clamart	0	1	0	1
Corbeil Essonne	0	1	0	1
Dole	0	1	0	1
Dourdan	0	1	0	1
Fontainebleau	0	1	0	1
Hospices Civils de Lyon	0	1	0	1
La Roche-sur-Yon	0	1	0	1
Laval	0	1	0	1
Longjumeau	0	1	0	1
Marseille-DESP-Sud	0	1	0	1
Paris/St Joseph	0	1	0	1
Paris-Institut Pasteur	0	1	0	1
Paris-Saint Louis	0	1	0	1
Rouen	0	1	0	1
Saint-Brieuc	0	1	0	1
Saint-Etienne	0	1	0	1
Valenciennes	0	1	0	1
Vannes	0	1	0	1
CNR	0	0	0	0
Total	51	24	10	85

*Cas envoyé au CNR et saisi par le CNR

5. Annexe 5 : Méthodes d'analyse

Sources de données

Les 85 correspondants volontaires du CNRPalu assurent la saisie en temps réel les données d'interrogatoire, cliniques et biologiques de chaque cas se fait, sauf exception, en remplissant une fiche électronique (<https://ssl.voozanoo.net/palu/>). Les exceptions concernent certains correspondants avec moins de 5 cas par an et les militaires pris en charge dans les unités ou hôpitaux du Service de Santé des Armées, (autres que les 3 Hôpitaux d'Instruction des Armées membre du réseau), qui ont une fiche de déclaration spécifique. Chaque dossier est complété par les résultats d'analyses spécialisées (PCR diagnostiques, antipaludogrammes, marqueurs moléculaires, dosages de médicaments) réalisées par les laboratoires du CNR sur les isolats transmis (cf rapport).

Définitions

Les définitions suivantes sont utilisées dans ce rapport pour les cas de paludisme confirmés détectés par le réseau de correspondant du CNR du paludisme en France métropolitaine

Afrique Australe : Afrique du Sud, Angola, Botswana, Comores, Lesotho, Madagascar, Malawi, Maurice, Mozambique, Namibie, Swaziland, Zambie, Zimbabwe, Territoires non autonomes, sous souveraineté de la France, dans l'océan Indien, La Réunion (département d'outre-mer), Mayotte (collectivité départementale d'outre-mer), Les Îles éparses de l'océan Indien (inhabitées, administrées depuis La Réunion) Sous souveraineté du Royaume-Uni, dans l'océan Atlantique Territoire d'outre-mer de Sainte-Hélène, Ascension et Tristan da Cunha.

Afrique Centrale : Cameroun, République centrafricaine, République du Congo, République démocratique du Congo, Gabon, Guinée équatoriale, Sao Tomé-et-Principe, Tchad.

Afrique de l'Est : Burundi, Djibouti, Érythrée, Éthiopie, Kenya, Ouganda, Rwanda, Seychelles, Somalie, Tanzanie.

Afrique de l'Ouest : Bénin, Burkina Faso, Cap-Vert, Côte d'Ivoire, Gambie, Ghana, Guinée, Guinée-Bissau, Liberia, Mali, Niger, Nigeria, Sénégal, Sierra Leone, Togo.

Afrique du Nord : Algérie, Égypte, Libye, Maroc, Mauritanie, Soudan, Tunisie

Amérique Latine-Caraïbes (Amérique du sud, Amérique centrale et îles des Caraïbes) : Indicatif de réserve (Amérique), Mexique, Brésil, Chili, Colombie, Venezuela, Guatemala, Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa-Rica, Panama, Haïti, Bolivie, Guyane, Equateur, Guyane-Française, Paraguay, Uruguay, Antilles-Néerlandaises, Bahamas, République-Dominicaine.

Asie Centrale : Afghanistan, Turkménistan, Ouzbékistan, Tadjikistan, Kirghizistan, Kazakhstan.

Asie de l'Est : Chine, Taiwan.

Asie du Sud : Inde, Bhoutan, Népal, Pakistan, Bangladesh, Lanka.

Asie du Sud-est & Pacifique : Brunei, Cambodge, Indonésie, Laos, Malaisie, Myanmar, Philippines, Singapour, Timor-Oriental, Vietnam, Thaïlande, Papouasie-Nouvelle-Guinée, Vanuatu, Wallis-et-Futuna, Polynésie-Française, Nouméa.

Cas de paludisme confirmé : infection à *Plasmodium* spp, symptomatique ou non, survenant sur le territoire métropolitain et confirmé au laboratoire (examen microscopique ou PCR).

Civil résident à l'étranger ou dans les DOM-TOM en zone d'endémie palustre : personne REZEP, à l'exclusion du personnel militaire (Civ_REZEP)

Civil résidant hors de France métropolitaine et hors zone d'endémie palustre : personne RHZEP, à l'exclusion du personnel militaire (Civ_RHZEP)

Civil résidant en France métropolitaine : RFM, à l'exclusion du personnel militaire (Civ_RFM)

Co-infection : présence simultanée dans le sang, à l'examen microscopique ou en PCR de ≥ 2 espèces plasmodiales différentes

Date de diagnostic : date de la confirmation d'un cas de paludisme par un examen microscopique ou une PCR (cf cas de paludisme confirmé)

Date des symptômes : date de survenue des premiers symptômes de l'accès en cours

Délai d'apparition des symptômes : date des symptômes – date retour (par définition « 0 » si le début des symptômes survient avant le retour)

Délai de recours aux soins = date de la première consultation médicale - date symptômes

Délai diagnostic = date de diagnostic - date des symptômes

Doublon « biologique » de saisie : dossier biologique saisi à plusieurs reprises par un/des biologistes d'un même centre BCB, IMTSSA ou PSL

Doublon d'extraction : doublon générés par le logiciel (bug) suite à des manipulations par les utilisateurs (corrigés dans la nouvelle version du logiciel voozanoo)

Doublons « épidémiologique » de saisie : dossier épidémiologique saisi à plusieurs reprises par un/des correspondants i/ d'un même hôpital = doublon intra hôpital (même correspondant ou ≥ 2 correspondants du même hôpital ou ii/ inter hôpitaux (correspondants différents, avec transfert ou consultation spontanée d'un patient dans un autre hôpital du réseau de correspondants du CNR du paludisme.

Échantillons multiples : échantillons biologiques successifs pour un même patient (impératif de noter la date de prélèvement le jour et le numéro d'échantillon)

Examen microscopique positif : présence de formes asexuées et/ou sexuées du genre *Plasmodium* objectivées par un examen microscopique au Frottis Sanguin Mince, à la Goutte Epaisse ou au Quantitative Buffy Coat (QBC) dans le sang (ou plus rarement une autre ponction ou biopsie : moelle, placenta...)

J0 pour « jour 0 » : correspond au jour de la prise en charge thérapeutique de l'accès palustre confirmé biologiquement. On considère cette confirmation biologique valide si i/ le diagnostic est réalisé dans un laboratoire du réseau de correspondants ii/ après confirmation écrite = transmission du résultat si le laboratoire ne fait pas partie du réseau (une lame du diagnostic peut être demandé selon les cas = laboratoire considéré comme peu expérimenté et aucun stigmat biologique d'une infection récente au moment de la prise en charge du patient dans un hôpital du réseau par exemple)

Militaire résident à l'étranger ou dans les DOM-TOM en zone d'endémie palustre : personne REZEP et personnel militaire, inclue le personnel de la gendarmerie- (PM_REZEP)

Militaire résident à l'étranger ou dans les DOM-TOM hors zone d'endémie palustre : personne RHZEP et personnel militaire inclue le personnel de la gendarmerie- (PM_RHZEP)

Militaire résident en France métropolitaine : résident en France métropolitaine et personnel militaire -inclus le personnel de la gendarmerie- (PM_RFM)

Moyen-Orient : Iran, Indicatif de réserve (Moyen Orient), Syrie, Irak, Arabie-Saoudite, Yémen, Oman, Emirats-Arabo-Unis, Bahreïn, Qatar

NA/REV : sujet qui est reparti en zone d'endémie et qui présente une infection survenant après le J30 de la mise en route d'un traitement curatif efficace de l'accès initial, à la même espèce que la première, pour les espèces *P. ovale* et *P. vivax*.

Nouvel accès (NA): deux situations distinctes i/ sujet qui n'est pas reparti en zone d'endémie et qui présente une infection survenant après le J30 de la mise en route d'un traitement curatif efficace et à une espèce différente de l'accès initial ii/ sujet qui est reparti en zone d'endémie et qui présente une infection survenant après le J30 de la mise en route d'un traitement curatif efficace à *P. falciparum* ou *P. knowlesi* d'un premier accès

Paludisme autochtone induit : cas de paludisme confirmé transmis sur le territoire métropolitain par l'intermédiaire d'un moyen artificiel (transfusion sanguine, aiguilles, greffe,...)

Paludisme autochtone introduit : cas de paludisme confirmé transmis sur le territoire métropolitain par un anophèle vecteur introduit (avion, bateau, bagages...)

Paludisme autochtone : cas de paludisme confirmé acquis en France métropolitaine

Paludisme cryptique : cas de paludisme confirmé pour lequel les investigations épidémiologiques ne permettent pas d'identifier un mode plausible d'acquisition

Paludisme du résident : paludisme importé en France métropolitaine, acquis par un sujet résident en zone d'endémie palustre

Paludisme du voyageur : paludisme importé en France métropolitaine, acquis par un sujet résident hors zone d'endémie palustre

Paludisme importé : cas de paludisme confirmé acquis hors de France métropolitaine dans une zone d'endémie palustre

PCR positive : amplification d'une portion de gène spécifique d'une espèce du genre *Plasmodium* dans le sang (ou plus rarement une autre ponction ou biopsie : moelle, placenta...)

Rechute : infection à la même espèce que la première, persistante ou survenant entre le J3 et le J30 de la mise en route d'un traitement curatif

Résident en France métropolitaine : personne vivant > 6 mois consécutifs de l'année en France métropolitaine, quelle que soit sa situation légale ou professionnelle (RFM).

Résident en zone d'endémie palustre : personne vivant > 6 mois consécutifs de l'année à l'étranger ou dans les DOM-TOM dans un pays situé **en** zone d'endémie palustre, quelle que soit sa situation légale ou professionnelle (REZEP). (cf tableau BEH)

Résident hors zone d'endémie palustre : personne vivant > 6 mois consécutifs de l'année à l'étranger ou dans les DOM-TOM dans un pays situé **hors** zone d'endémie palustre, quelle que soit sa situation légale ou professionnelle (RHZEP). (cf tableau BEH)

Reviviscence (REV) : infection survenant plus de 30 jours après la mise en route d'un traitement curatif efficace d'un accès initial, due à la même espèce que la première, pour les espèces *P. ovale*, *P. vivax*, chez un sujet qui n'est pas reparti en zone d'endémie

Voyageur en zone d'endémie : sujet RFM ou RHZEP et ayant effectué un séjour de moins de 6 mois en zone d'endémie pour le paludisme

Période couverte

Du premier janvier au 31 décembre 2012 inclus

Diagnostic de laboratoire par les correspondants : le diagnostic de base est réalisé par un frottis sanguin mince et une goutte épaisse ou un QBC. La PCR est réalisée dans certaines structures spécialisées

Validation des données de la base :

Après application des définitions décrites, le contrôle de saisie, la cohérence des données et les tests de vraisemblance ont été réalisés sur la base de données.

Après identification des différents types de doublons dans la base, le dédoublonnage, la correction des données et l'archivage ont permis l'obtention d'un fichier unique de travail pour l'ensemble des analyses nécessaires à la production du rapport (figure 1).

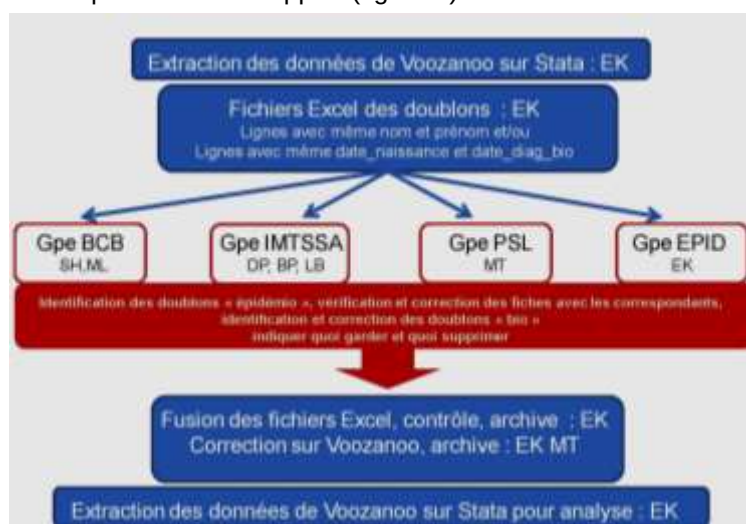


Figure 10 : stratégie de contrôle des données saisies et de traitement des doublons

6. Annexe 6 : Données complémentaires du CNR du paludisme

6.1 Surveillance du paludisme d'importation

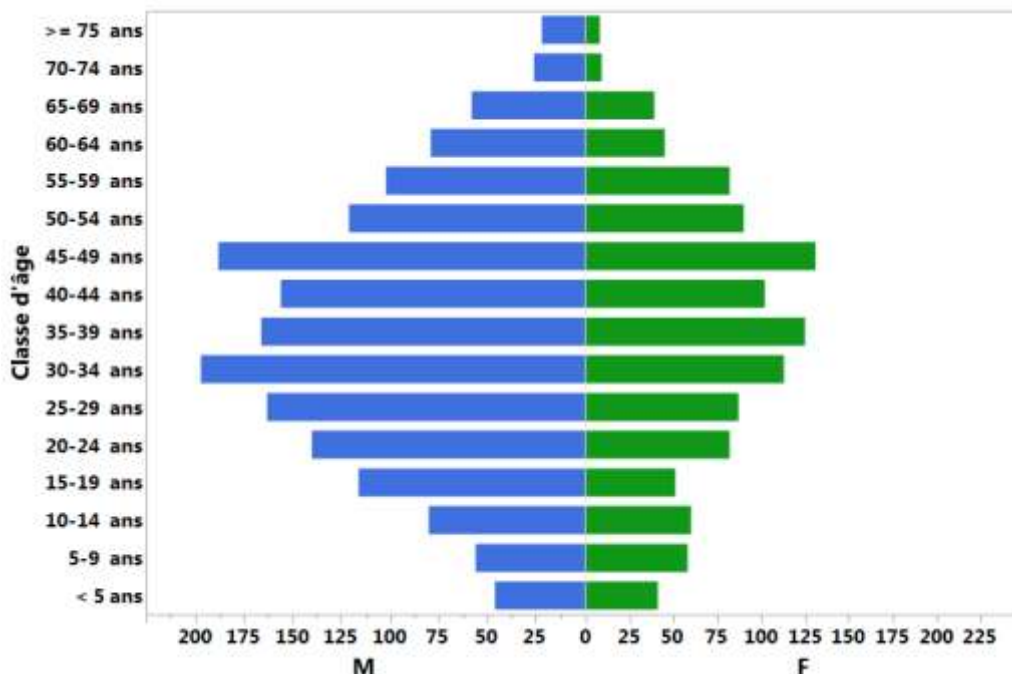


Figure 11 : Répartition par âge et par sexe des cas de paludisme déclarés par le réseau des correspondants du CNR du paludisme, France métropolitaine, année 2018, n = 2840.

Tableau 8 : Répartition des cas pour les 15 pays de contamination les plus fréquemment cités en 2017 et 2018, n=2614

Pays d'endémie visités	2017	%	2018	%	Variation (2018-2017)
Côte d'Ivoire	763	28.7%	790	28.2%	3.5%
Cameroun	568	21.4%	565	20.2%	-0.5%
Guinée	188	7.1%	186	6.6%	-1.1%
Mali	142	5.3%	170	6.1%	19.7%
Congo	102	3.8%	136	4.9%	33.3%
Gabon	71	2.7%	117	4.2%	64.8%
Centrafrique	121	4.6%	107	3.8%	-11.6%
Senegal	93	3.5%	100	3.6%	7.5%
Burkina Faso	61	2.3%	76	2.7%	24.6%
Benin	79	3.0%	75	2.7%	-5.1%
Togo	86	3.2%	72	2.6%	-16.3%
Tchad	34	1.3%	59	2.1%	73.5%
Iles des Comores	12	0.5%	56	2.0%	366.7%
Nigéria	68	2.6%	35	1.3%	-48.5%
RDC	27	1,0%	32	1,1%	18,5%
Total	2453	92,3%	2614	93,4%	6,6%

Tableau 9 : Variation relative du nombre de cas de paludisme d'importation entre 2018 et 2017 selon les pays endémie visités, France. Les pays sont classés par ordre décroissant.

Pays d'endémie visités	2017	%	2018	%	Variation (2018-2017)
Côte d'Ivoire	763	28.7%	790	28.2%	3.5%
Cameroun	568	21.4%	565	20.2%	-0.5%
Guinee	188	7.1%	186	6.6%	-1.1%
Mali	142	5.3%	170	6.1%	19.7%
Congo	102	3.8%	136	4.9%	33.3%
Gabon	71	2.7%	117	4.2%	64.8%
Centrafrique	121	4.6%	107	3.8%	-11.6%
Senegal	93	3.5%	100	3.6%	7.5%
Burkina Faso	61	2.3%	76	2.7%	24.6%
Benin	79	3.0%	75	2.7%	-5.1%
Togo	86	3.2%	72	2.6%	-16.3%
Tchad	34	1.3%	59	2.1%	73.5%
Comores	12	0.5%	56	2.0%	366.7%
Afrique, sans autre indication	38	1.4%	38	1.4%	0.0%
Nigeria	68	2.6%	35	1.3%	-48.5%
RDC	27	1.0%	32	1.1%	18.5%
Guyane Francaise	7	0.3%	24	0.9%	242.9%
Niger	26	1.0%	18	0.6%	-30.8%
Ghana	22	0.8%	15	0.5%	-31.8%
Sierra Leone	9	0.3%	15	0.5%	66.7%
Angola	17	0.6%	12	0.4%	-29.4%
Madagascar	9	0.3%	8	0.3%	-11.1%
Djibouti	3	0.1%	6	0.2%	100.0%
Cote D'Ivoire	6	0.2%	5	0.2%	-16.7%
Liberia	1	0.0%	5	0.2%	400.0%
Mozambique	7	0.3%	5	0.2%	-28.6%
Pakistan	11	0.4%	5	0.2%	-54.5%
Afghanistan	17	0.6%	4	0.1%	-76.5%
Afrique du Sud	1	0.0%	4	0.1%	300.0%
Guinee Equatoriale	10	0.4%	4	0.1%	-60.0%
Guinee-Bissau	2	0.1%	4	0.1%	100.0%
Soudan	6	0.2%	4	0.1%	-33.3%
Burundi	3	0.1%	3	0.1%	0.0%
Erythree	0	0.0%	3	0.1%	
Inde	2	0.1%	3	0.1%	50.0%
Papouasie-Nouvelle-Guinee	2	0.1%	3	0.1%	50.0%
Thailande	2	0.1%	3	0.1%	50.0%
Kenya	6	0.2%	2	0.1%	-66.7%
Malawi	2	0.1%	2	0.1%	0.0%
Rwanda	7	0.3%	2	0.1%	-71.4%
Salomon, Iles	1	0.0%	2	0.1%	100.0%
Somalie	0	0.0%	2	0.1%	

Zambie	1	0.0%	2	0.1%	100.0%
Arabie Saoudite	1	0.0%	1	0.0%	0.0%
Bresil	0	0.0%	1	0.0%	
Cambodge	0	0.0%	1	0.0%	
Cap-Vert	0	0.0%	1	0.0%	
Colombie	1	0.0%	1	0.0%	0.0%
Coree-Sud	1	0.0%	1	0.0%	0.0%
Costa Rica	1	0.0%	1	0.0%	0.0%
Ethiopie	1	0.0%	1	0.0%	0.0%
Gambie	2	0.1%	1	0.0%	-50.0%
Guyana	0	0.0%	1	0.0%	
Haiti	0	0.0%	1	0.0%	
Laos RDP	0	0.0%	1	0.0%	
Maroc	3	0.1%	1	0.0%	-66.7%
Mauritanie	2	0.1%	1	0.0%	-50.0%
Mayotte	0	0.0%	1	0.0%	
Nicaragua	0	0.0%	1	0.0%	
Ouganda	1	0.0%	1	0.0%	0.0%
Perou	2	0.1%	1	0.0%	-50.0%
Philippines	0	0.0%	1	0.0%	
Sri Lanka	1	0.0%	1	0.0%	0.0%
Tanzanie	4	0.2%	1	0.0%	-75.0%
Bangladesh	1	0.0%	0	0.0%	-100.0%
Europe et autres Pays non endémiques-SAI	1	0.0%	0	0.0%	-100.0%
Hong-Kong	1	0.0%	0	0.0%	-100.0%
Iran	1	0.0%	0	0.0%	-100.0%
Total	2657	100.0%	2800	100.0%	5.4%

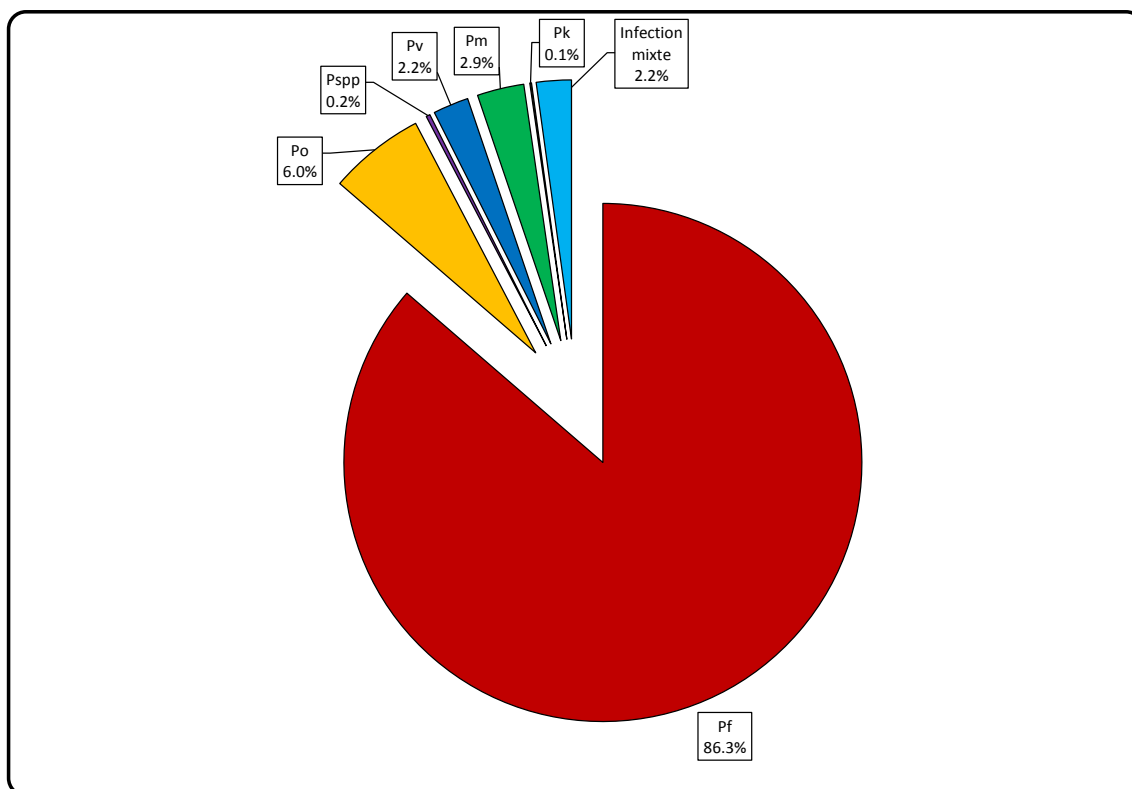


Figure 12 : Distribution cas de Paludisme d'importation par espèces, France métropolitaine, 2018, n = 2840

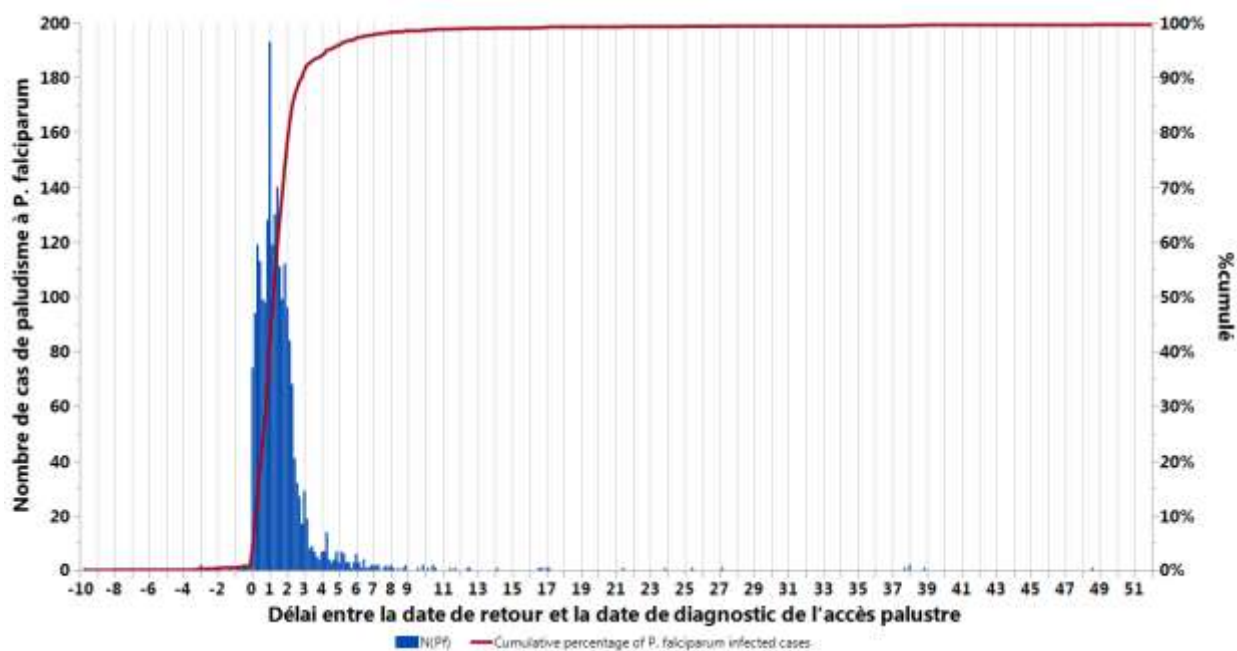
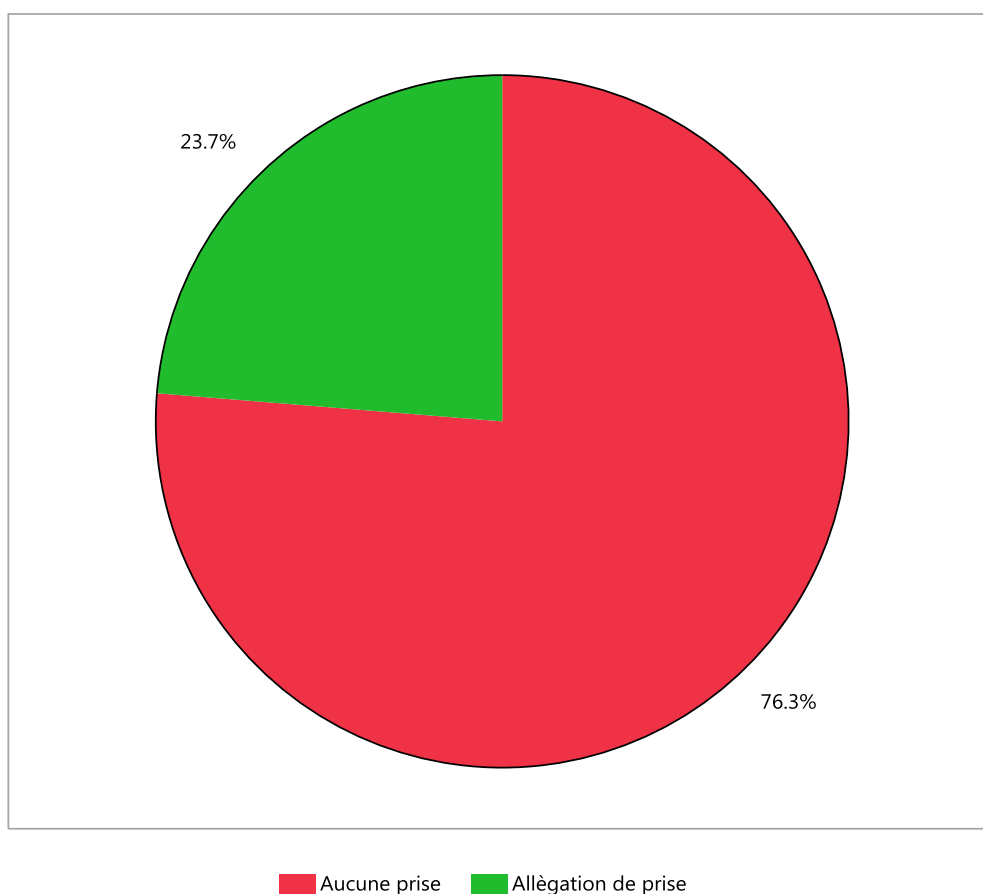


Figure 13 : Délai entre la date de retour et le diagnostic de l'accès palustre pour l'espèce *Plasmodium falciparum*

Tableau 10. Cas à *Plasmodium falciparum* seul, caractéristiques de la parasitémie en fonction du type de l'accès clinique et de l'âge, CNR du Paludisme, France métropolitaine, 2018, n=2398.

Classe d'âge	Type de l'accès clinique	Frottis mince (%)					
		N	Moyenne	ET	Médiane	P25	P75
< 15 ans	Accès grave (joindre CR hospitalisation SVP)	37	7.3	6.6	5.2	2.3	11.6
	Accès simple AVEC vomissements	88	2.0	2.6	1.0	0.2	2.8
	Accès simple sans vomissements	159	1.3	2.0	0.5	0.1	1.8
	Formes Asymptomatiques et découvertes fortuites	2	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1
	Sous Total	286	2.3	3.7	0.9	0.2	2.9
>= 15 ans	Accès grave (joindre CR hospitalisation SVP)	290	6.9	7.3	5.0	1.9	8.2
	Accès simple AVEC vomissements	375	1.0	1.3	0.6	0.2	1.5
	Accès simple sans vomissements	1438	0.8	1.5	0.3	0.1	1.0
	Formes Asymptomatiques et découvertes fortuites	9	0.1	0.2	0.0	0.0	0.1
	Sous Total	2112	1.7	3.7	0.4	0.1	1.6

**Figure 14 :** Conduite chimio prophylactique, CNR du paludisme, France métropolitaine, année 2018, n = 2396.

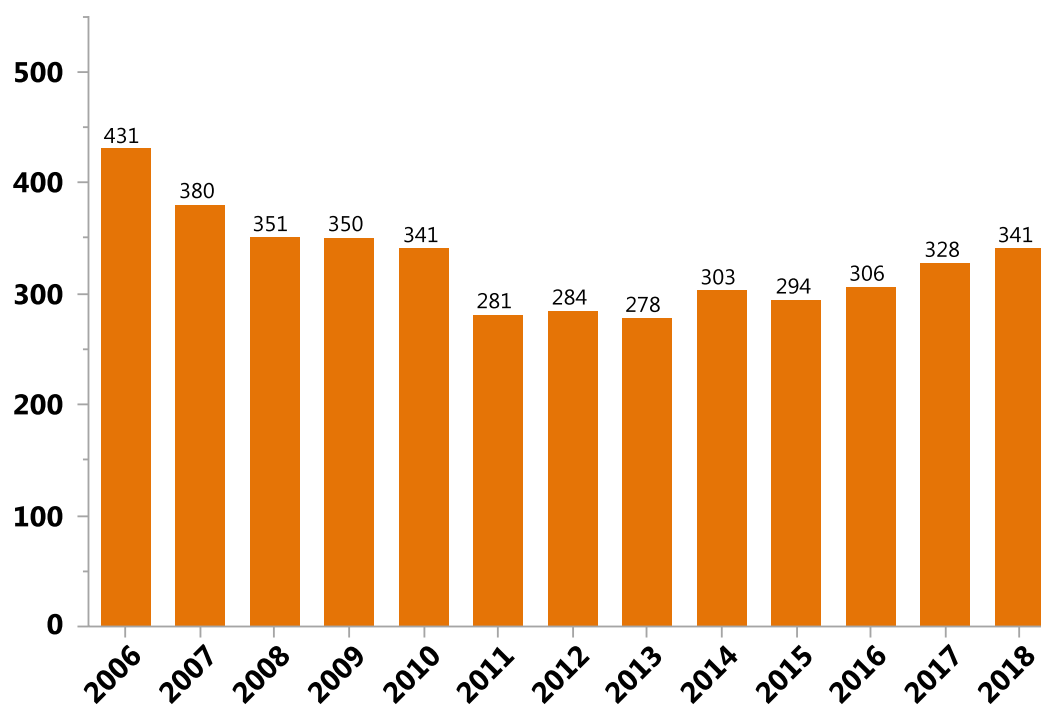


Figure 15 : Nombre de cas de paludisme chez les enfants de moins de 15 ans, 2006-2018

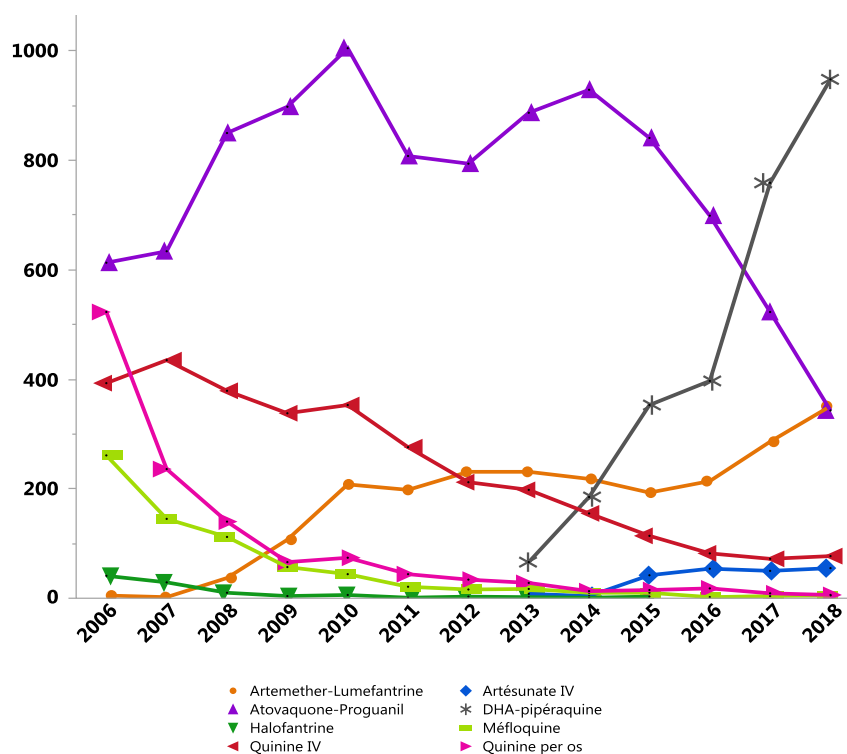


Figure 16 : Evolution des traitements pour les accès simples à *P. falciparum* chez les patients de 15 ans et plus, CNR du paludisme, France métropolitaine, années 2006-2018

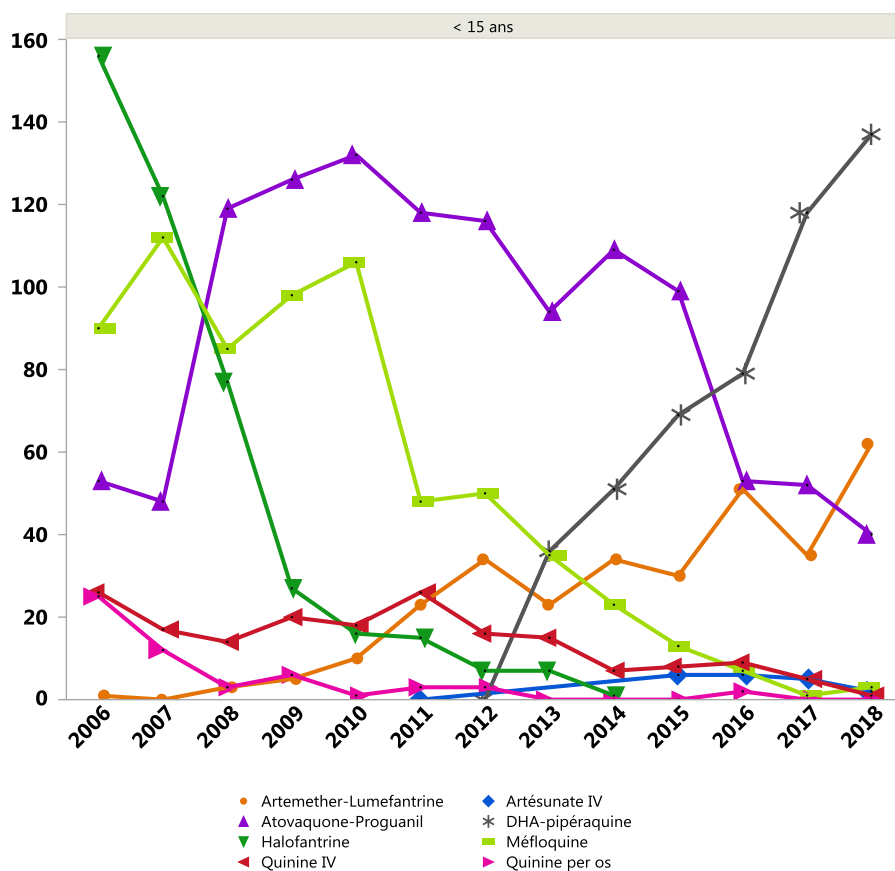


Figure 17 : Evolution des traitements pour les accès simples à *P. falciparum* chez les patients de moins de 15 ans, CNR du paludisme, France métropolitaine, années 2006-2018

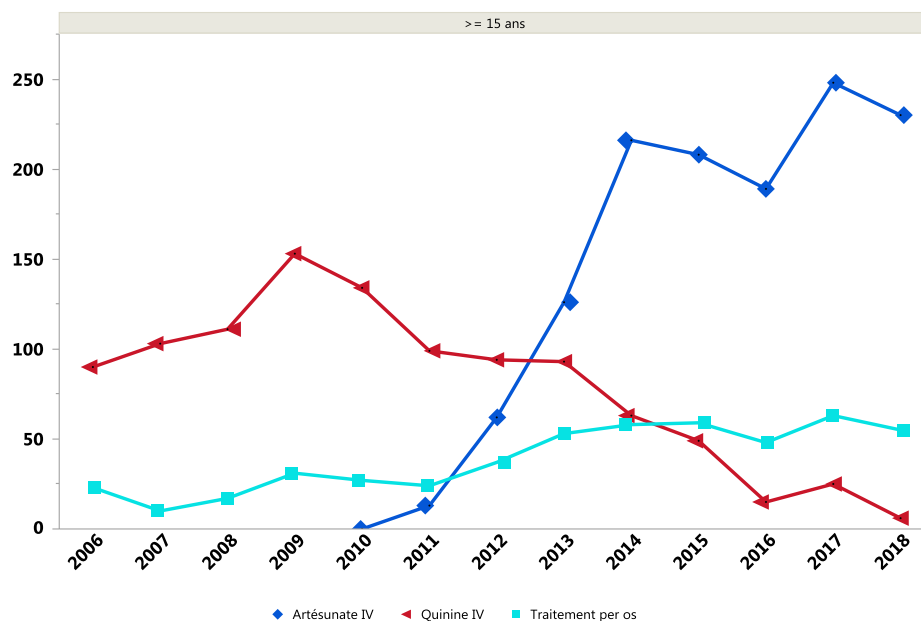


Figure 18 : Evolution des traitements pour les accès graves à *P. falciparum* chez les patients de 15 ans et plus, CNR du paludisme, France métropolitaine, années 2006-2018

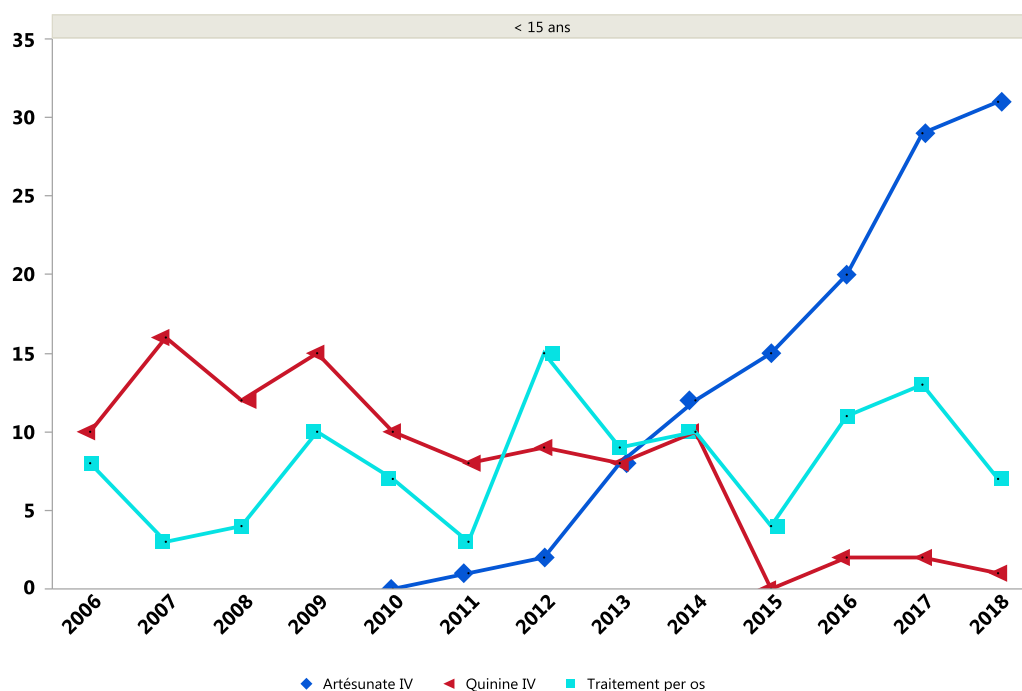


Figure 19 : Evolution des traitements pour les accès graves à *P. falciparum* chez les patients de moins de 15 ans, CNR du paludisme, France métropolitaine, années 2006-2018

6.2 Surveillance des résistances de *P. falciparum* dans le paludisme d'importation

6.2.1 Chimiosensibilité *in vitro*

6.2.1.1 Antipaludiques conventionnels

Chloroquine

Quatre cent vingt et un isolats ont pu être analysés en 2018 pour la chloroquine. 16,2% ont montré des valeurs supérieures au seuil de résistance à la chloroquine *in vitro*. L'isolat sensible est donc majoritaire. (Figure 20). Les isolats résistants provenaient majoritairement de Côte d'Ivoire (37,5%).

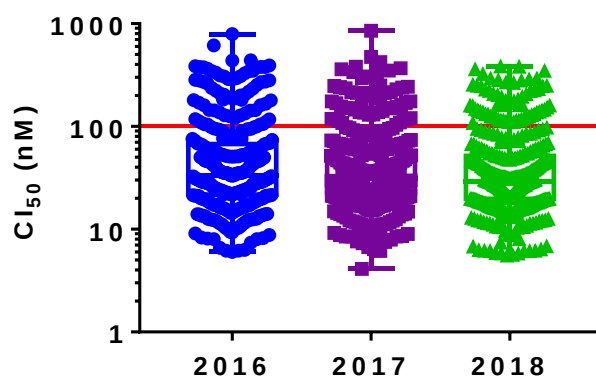


Figure 20 : Evolution des chimiosensibilités à la chloroquine de 2016 à 2018

2016 n : 361, 2017 n°393. ; 2018 n° 421

La ligne rouge représente le seuil de résistance à 100 nM (Dedet et al., 1988).

Quinine

Nous avons disposé de 402 résultats de CI_{50} , seul 1 isolat a présenté une $CI_{50} > 800$ nM en 2018 (Figure 21) provenant du Gabon.

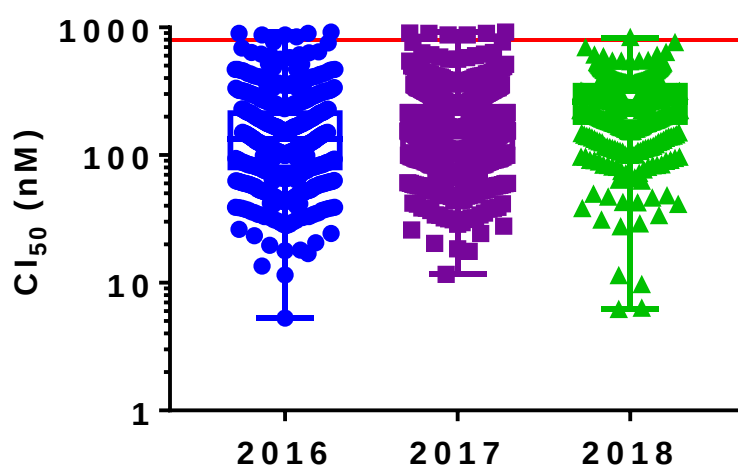


Figure 21 Evolution des chimiosensibilités à la quinine entre 2016 et 2018

2016 n : 358, 2017 n° :484 ; 2018 n° :402

La ligne rouge représente le seuil de résistance à 800 nM (Basco and Le Bras, 1994).

Doxycycline

Les 430 isolats ont montré une CI_{50} comprise entre 0,23 et 51,9 μM en 2018. Vingt-six échantillons (6,5%) présentent une CI_{50} supérieure au seuil de résistance (35 μM) principalement en provenance de Côte d'Ivoire (Figure 22).

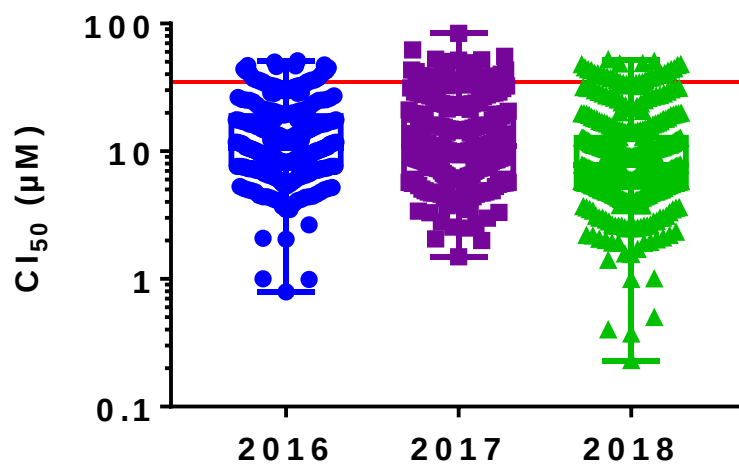


Figure 22 Evolution des chimiosensibilités à la doxycycline en 2016 et 2018

2016 n : 313, 2017 n° : 310 ; 2018 n° : 430

La ligne rouge représente le seuil de résistance à 35 μM (Briolant et al., 2009).

6.2.1.2 Les dérivés d'artémisinine

La dihydroartémisinine

Sur les quatre cent vingt-quatre isolats analysés en présence de DHA, seul un isolat a présenté une $CI_{50} > 12$ nM (0,2%), l'isolat provenait de Côte d'Ivoire (Figure 23).

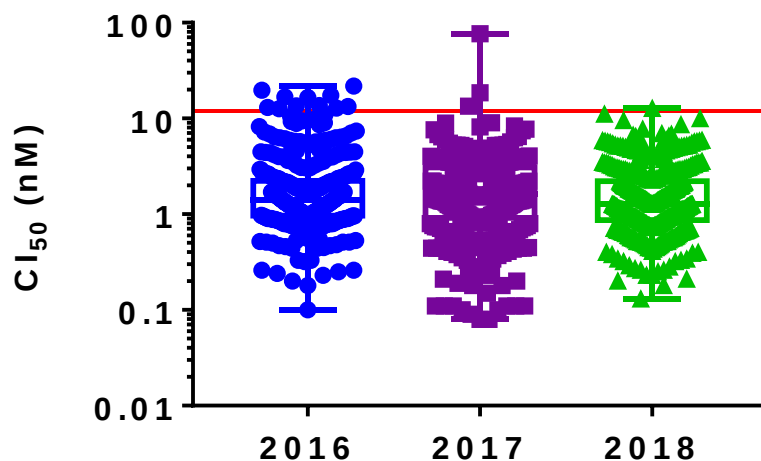


Figure 23 Evolution des chimiosensibilités à la dihydroartémisinine entre 2016 et 2018

2016 n : 356, 2017 n° : 464 ; 2018 n° : 424

La ligne rouge représente le seuil de résistance à 12 nM (Basco & Le Bras, 1993).

6.2.1.3 Les molécules associées aux ACTs

Mono déséthyl-amodiaquine

Cinquante-huit isolats sur les 421 ont présenté une $CI_{50} > 60$ nM (Figure 24) essentiellement originaires de Côte d'Ivoire (24%).

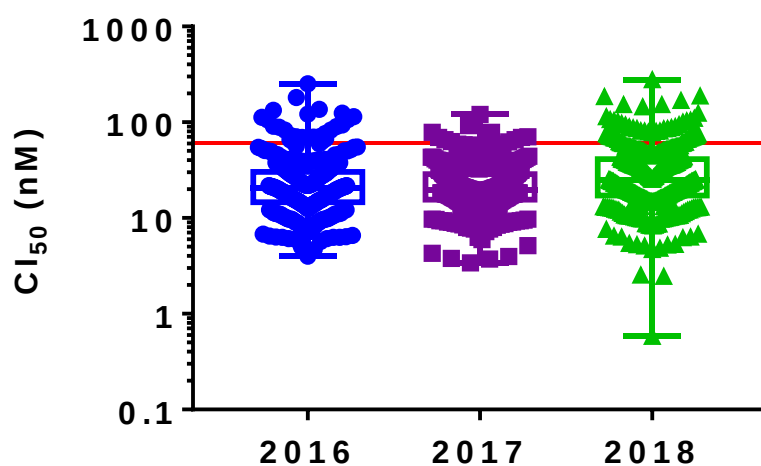


Figure 24 Evolution des chimiosensibilités à la Mono déséthyl-amodiaquine entre 2016 et 2018

2016 n : 361, 2017 n° : 491 ; 2018 n° : 421

La ligne rouge représente le seuil de résistance de 60 nM (Ringwald et al., 1998).

Luméfantrine

Quatre cent treize isolats ont pu être analysés. Aucun isolat n'a présenté une CI_{50} supérieure au seuil de résistance fixé à 150 nM (Figure 25).

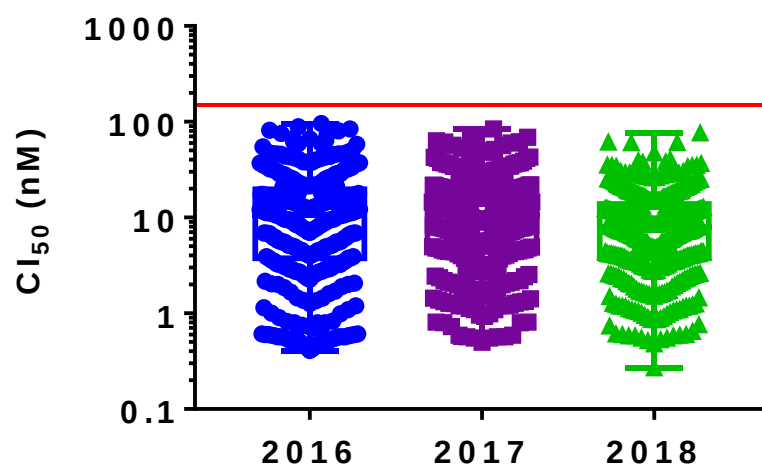


Figure 25 Evolution des chimiosensibilités à la luméfantrine entre 2016 et 2018

2016 n : 356, 2017 n° :478 ; 2018 n° : 413

La ligne rouge représente le seuil de résistance à 150 nM (Pradines et al., 1999).

Pipéraquine

Le seuil de résistance à la pipéraquine ayant été révisé, 3 isolats sur les 397 analysés ont montré une $CI_{50} > 90$ nM provenant du Cameroun (2) et de Côte d'Ivoire (1) (Figure 26).

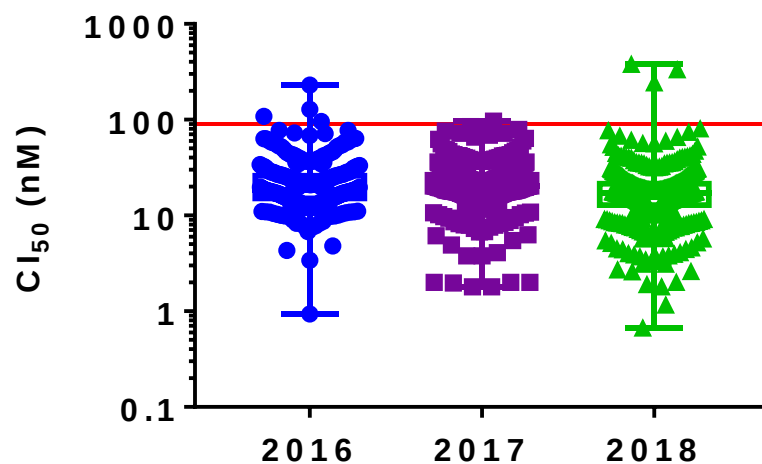


Figure 26 Evolution des chimiosensibilités à la pipéraquine entre 2016 et 2018

2016 n : 351, 2017 n° :483 ; 2018 n° : 397

La ligne rouge représente le seuil de résistance à 90 nM (Amato et al., 2017).

Méfloquine

Quatre cent vingt-six échantillons ont été analysés. Soixante et onze échantillons ont montré une $CI_{50} > 40$ nM (Figure 27). Ces isolats présentant des diminutions de sensibilité à la méfloquine provenaient principalement du Cameroun (25%) et de Côte d'Ivoire (11%).

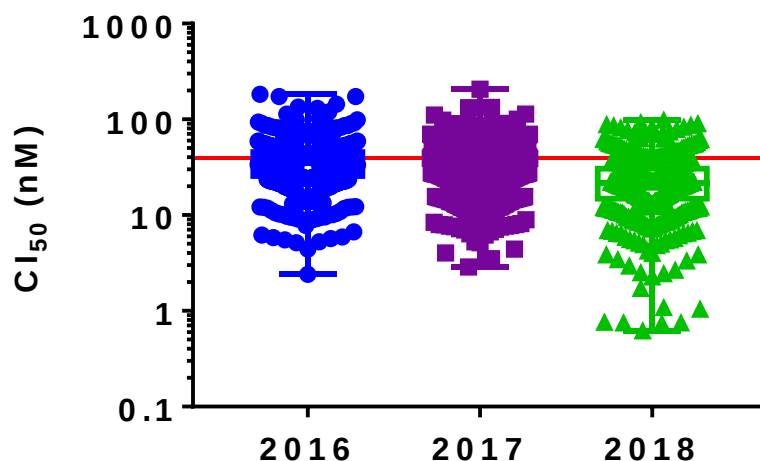


Figure 27 Evolution des chimiosensibilités à la méfloquine entre 2016 et 2018

2016 n : 361, 2017 n°:475 ; 2018 n° : 426

La ligne rouge représente le seuil de résistance à 40 nM (Brasseur et al., 1990).

Pyronaridine

Cent soixante et un échantillons ont pu être analysés (Figure 28). Deux isolats ont montré une $CI_{50} > 60$ nM un en provenance de Côte d'Ivoire et le second du Togo.

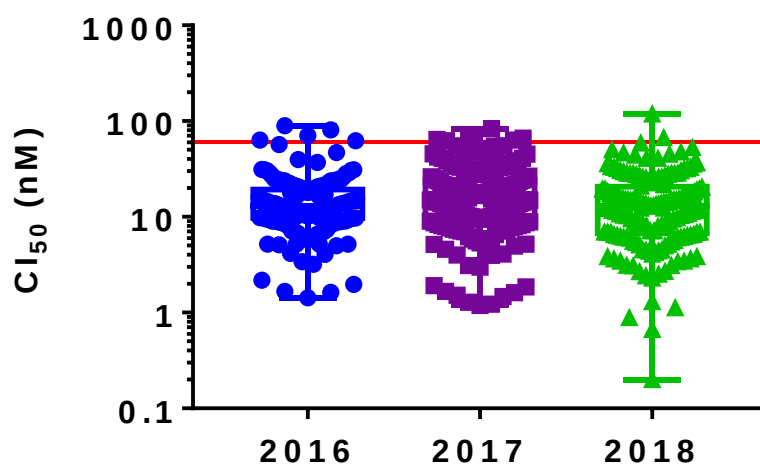


Figure 28 Evolution des chimiosensibilités à la pyronaridine entre 2016 et 2018

2016 n : 154, 2017 n° :257 ; 2018 n° : 161

La ligne rouge représente le seuil de résistance à 60 nM (Pascual et al, 2015).

6.2.2 Génomotypages des isolats de *P.falciparum*

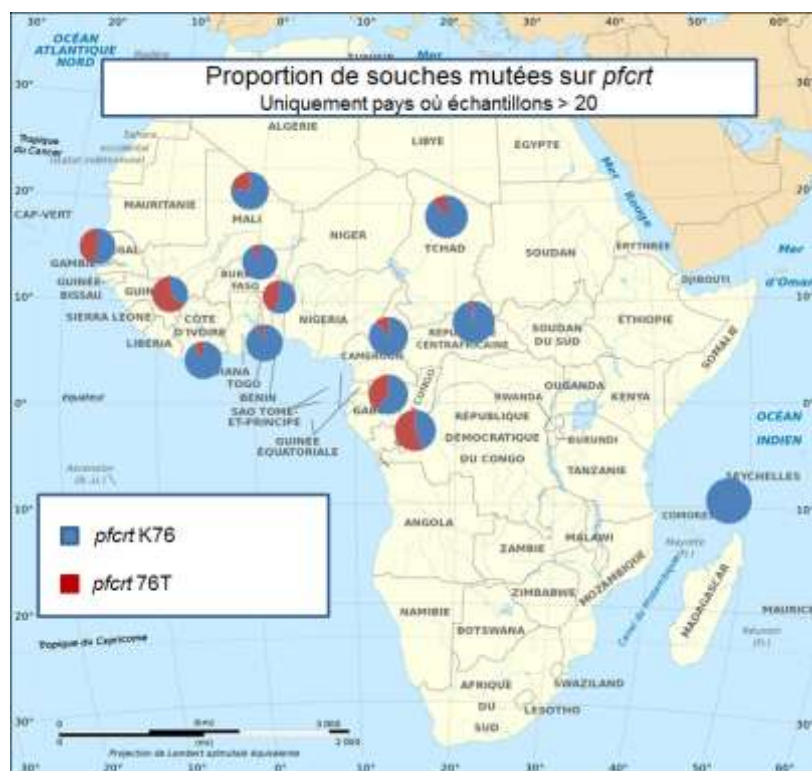


Figure 29 : proportion de souches mutées sur *pfprt* (K76T) en 2018 pour les pays ayant au moins un effectif de 20 échantillons

Tableau 11 : Proportion d'isolats mutés *pfcr* K76T par pays et par année

Pays	2014		2015		2016		2017		2018	
	Nb	% mutés	Nb	% mutés	Nb	% mutés	Nb	% mutés	Nb	% mutés
Afrique										
Angola	9	44.5	10	50	6	50	6	50	4	25
Bénin	19	52.6	38	61	13	69.2	24	79,2	21	43
Burkina Faso	48	12.5	59	3	14	14.3	20	15,0	29	7
Burundi							2	100	3	100
Cameroun	217	46.1	299	35	132	26.5	204	18,1	151	11
RCA	54	11.1	61	7	33	9.1	39	2.6	36	3
Comores					6	33.3	7	14,3	57	0
Congo	44	75	65	68	63	63.5	24	54.2	50	56
Congo RDC	20	75	16	56	10	70	4	50	3	33
Côte d'Ivoire	297	29.3	388	23	120	18.3	284	17,6	200	8
Djibouti							2	50	1	0
Gabon	40	62.5	30	77	28	50	30	40	38	39
Gambie									1	100
Ghana	9	22.2	14	17	2	50	7	0	6	17
Guinée	51	62.7	46	65	26	69.2	70	71,4	47	64
Guinée Equat	3	33.4	9	13	1	100	4	50	3	67
Guinée Bissau									2	100
Libéria									1	100
Madagascar	3	0	13	10	3	66	3	33.3	4	0
Maroc							1	0	1	0
Mali	130	50	179	54	19	33	54	35,2	30	23
Mozambique			2	0	1	0	4	0	2	0
Niger	4	50.0	6	66	4	0	11	27,3	5	0
Nigeria	16	75	16	66	14	21.4	24	45,8	8	25
Sénégal	38	47.4	90	38	8	37.5	24	62,5	26	46
Sierra Leone	4	50	3	100			4	25	8	50
Soudan	2	0	4	100			1	0	1	100
Tanzanie			2	0			4	0	2	0
Tchad	20	30	34	24	1	100	14	21,4	18	11
Togo	45	37.8	16	10	20	25	19	14,0	20	5
Amériques										
Nicaragua									1	100
Autre										
Arabie									1	100
Sri Lanka									1	0
Cambodge									1	100

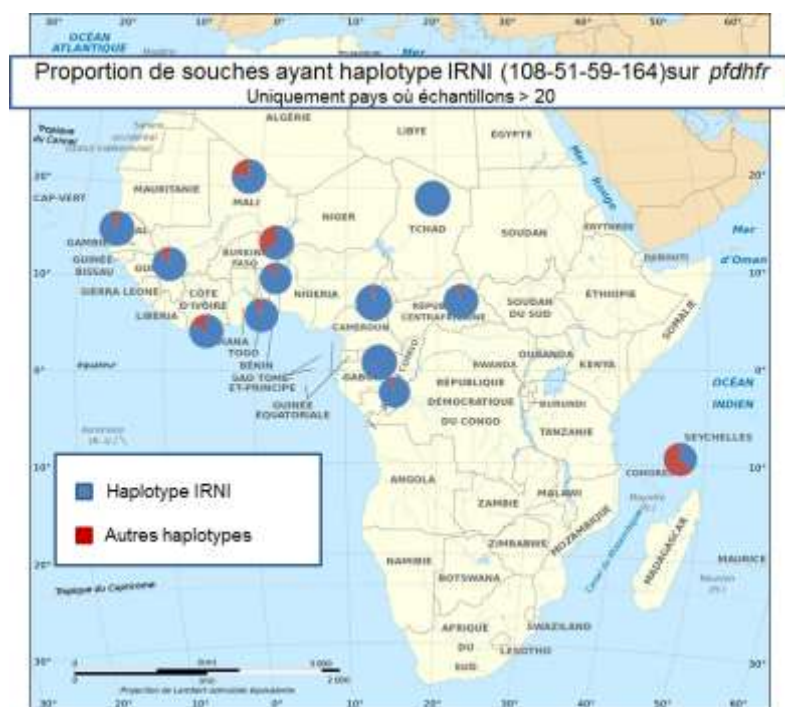


Figure 30 : proportion de souches ayant un haplotype IRNI(position 108-51-59-164) sur *pfdhfr* en 2018 pour les pays ayant au moins un effectif de 20 échantillons

Tableau 12 : Proportion d'isolats triple mutés *pfdhfr* S108N, N51I, C59R par pays et par année

Pays	2013		2015		2016		2017		2018	
	Nb	% mutés <i>pfdhfr</i> S108N, N51I, C59R	Nb	% mutés <i>pfdhfr</i> S108N, N51I, C59R	Nb	% mutés <i>pfdhfr</i> S108N, N51I, C59R	Nb	% mutés <i>pfdhfr</i> S108N, N51I, C59R	Nb	% mutés <i>pfdhfr</i> S108N, N51I, C59R
Afrique										
Angola			10	100	5	100	2	50	2	50
Bénin	2	100	38	93	6	83.3	12	91,7	12	92
Burkina Faso	9	56.6	59	57	18	77.8	8	62,5	20	65
Burundi							2	100	1	100
Cameroun	39	97.4	299	96	12	66.7	133	94,7	84	98
Cap Vert									1	100
RCA	4	100	61	91	37	89.2	27	81,5	25	96
Comores					2	50	7	28,6	21	37
Congo	11	72.7	65	94	42	95.2	19	89,5	24	96
Côte d'Ivoire	62	71	388	70	109	73.3	155	70,3	106	83
Djibouti							1	0	1	100
Gabon	3	100	30	100	29	82.8	21	76,2	30	100
Gambie									1	0
Guinée	16	87.5	46	91	38	84.2	33	97,0	33	91
Guinée Equat									2	100

Guinée Bissau									2	50
Madagascar	12	33.3	13	66	2	50	2	100	4	50
Mali	22	63.6	179	77	17	81.0	14	85,7	5	80
Maroc							1	100	1	100
Mozambique			2	100	1	100	5	100	1	100
Niger			6	100	6	83.3	8	75	4	100
Nigeria	1	100	16	83	11	100	10	83,3	6	100
Sénégal	13	76.9	90	82	18	77.8	13	76,9	14	93
Sierra Leone			3	100	1	100	3	100	3	100
Soudan			4	0	1	100	1	100	1	100
Tchad	2	100	34	93	3	66.7	10	90	13	100
Togo	3	100	16	70	17	88.2	13	69,2	14	93
Autre										
Arabie Saoudite							1	100	1	100
Cambodge									1	100

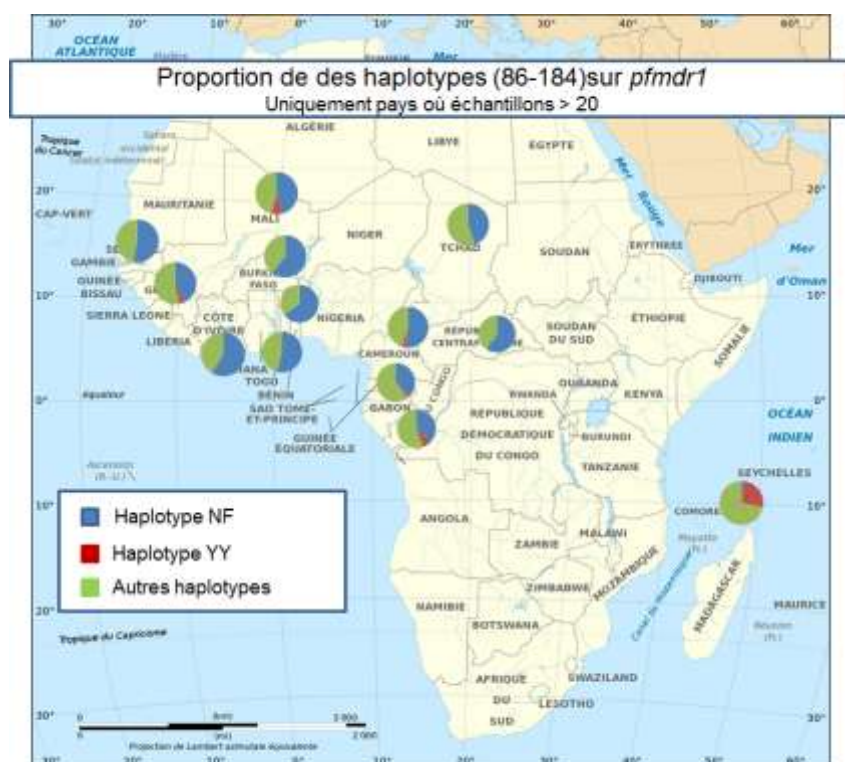


Figure 31 : proportion de souches avec un haplotype (position 86-184) sur *pfmdr1* en 2018 pour les pays ayant au moins un effectif de 20 échantillons

Tableau 13 : Proportion d'haplotypes *pfmdr1* N86Y-Y184F par pays en 2018

Pays	Nb	% Haplotypes NF	% Haplotypes YY
Afrique			
Angola	4	50	0
Bénin	20	65	0
Burkina Faso	33	61	0
Burundi	1	0	0
Cameroun	197	52	3
Cap Vert	1	100	0
RCA	40	60	0
Comores	57	2	26
Congo	60	37	8
Congo RDC	5	20	0
Côte d'Ivoire	239	58	1
Djibouti	1	100	0
Gabon	40	38	2
Ghana	6	67	0
Guinée	53	43	4
Guinée Equat	2	0	0
Guinée Bissau	1	0	0
Libéria	1	0	0
Madagascar	4	25	25
Mali	35	46	8
Maroc	1	0	0
Mozambique	2	25	0
Niger	3	0	0
Nigeria	8	75	0
Rwanda	1	0	0
Sénégal	30	53	0
Sierra Leone	8	50	0
Soudan	1	100	0
Tanzanie	1	0	0
Tchad	20	45	0
Togo	24	54	0
Amériques			
Nicaragua	1	100	0
Autre			
Arabie Saoudite	1	0	0

Tableau 14 : Proportion d'isolats mutés *pfmdr1* N86Y par pays et par année

Pays	2014		2015		2016		2017		2018	
	Nb	% mutés N86Y	Nb	% mutés N86Y	Nb	% mutés N86Y	Nb	% mutés N86Y	Nb	% mutés N86Y
Afrique										
Angola	12	0	10	0	10	0	6	0	4	0
Bénin	17	17.6	38	17	16	12.5	24	4,2	20	0
Burkina Faso	41	12.2	59	3	30	66.7	19	0	33	0
Burundi							2	0	3	0
Cameroun	126	23	299	29	173	13.9	168	11,3	201	6
RCA	42	2.4	61	6	40	0	32	3,1	40	2
Comores					7	57.1	10	0	57	49
Congo	16	37.5	65	27	71	15.5	28	14.3	63	11
Congo RDC	6	0	16	33	17	11.8	3	0	5	0
Côte d'Ivoire	282	8.2	388	6	178	9.6	219	4,6	242	4
Djibouti							2	0	1	0
Gabon	24	16.7	30	25	30	30	33	3,0	41	12
Ghana	7	0	14	0	6	0	5	0	6	0
Guinée	37	8.1	46	8	42	11.9	59	10,2	54	9
Guinée Equat	3	0	9	17	2	50	2	0	2	50
Guinée Bissau									2	0
Libéria									1	100
Madagascar	1	0	13	33	4	25	3	33,3	4	25
Mali	119	13.4	179	10	49	14.3	46	10,9	36	17
Maroc							1	0	1	0
Mozambique			0	0	1	0	4	0	2	0
Niger	3	0	6	33	9	22.2	8	12,5	3	33
Nigeria	16	18.8	16	0	16	18.9	22	0	8	0
Rwanda			4	0	1	0	1	0	1	0
Sénégal	36	5.6	90	8	27	7.4	19	10,5	30	3
Sierra Leone	2	0	3	0	1	0	6	16,7	9	11
Tchad	18	11.1	34	7	9	22.2	12	8,3	20	10
Togo	39	8	16	11	30	13.3	25	4,0	24	0
Amériques										
Nicaragua									1	0
Asie										
Cambodge									1	0
Autre										
Arabie Saoudite							1	0	1	0

Tableau 15 : Proportion d'isolats triple mutés *pfmdr1* Y184F par pays en 2018

Pays	2018	
	Nb	% mutés Y184F
Afrique		
Angola	4	50
Bénin	20	55
Burkina Faso	33	61
Burundi	2	50
Cameroun	196	59
Cap Vert	1	100
RCA	40	63
Comores	57	26
Congo	60	40
Congo RDC	5	20
Côte d'Ivoire	237	62
Djibouti	1	100
Gabon	40	50
Ghana	6	67
Guinée	52	52
Guinée Equat	2	50
Guinée Bissau	2	50
Libéria	1	100
Madagascar	4	25
Mali	35	51
Maroc	1	100
Mozambique	2	50
Niger	3	33
Nigeria	8	75
Rwanda	1	0
Sénégal	30	67
Sierra Leone	8	63
Soudan	1	100
Tanzanie	1	100
Tchad	20	55
Togo	24	54
Amériques		
Nicaragua	1	100
Autre		
Arabie Saoudite	1	0

7. Annexe 7 : Bulletin de rétroinformation, pôle Antilles-Guyane

Rétro-information CNR Paludisme, Zones Endémiques Région Guyane - Année 2018

Implication des différents partenaires guyanais

Niveau de participation à la surveillance des plasmodies en 2018.

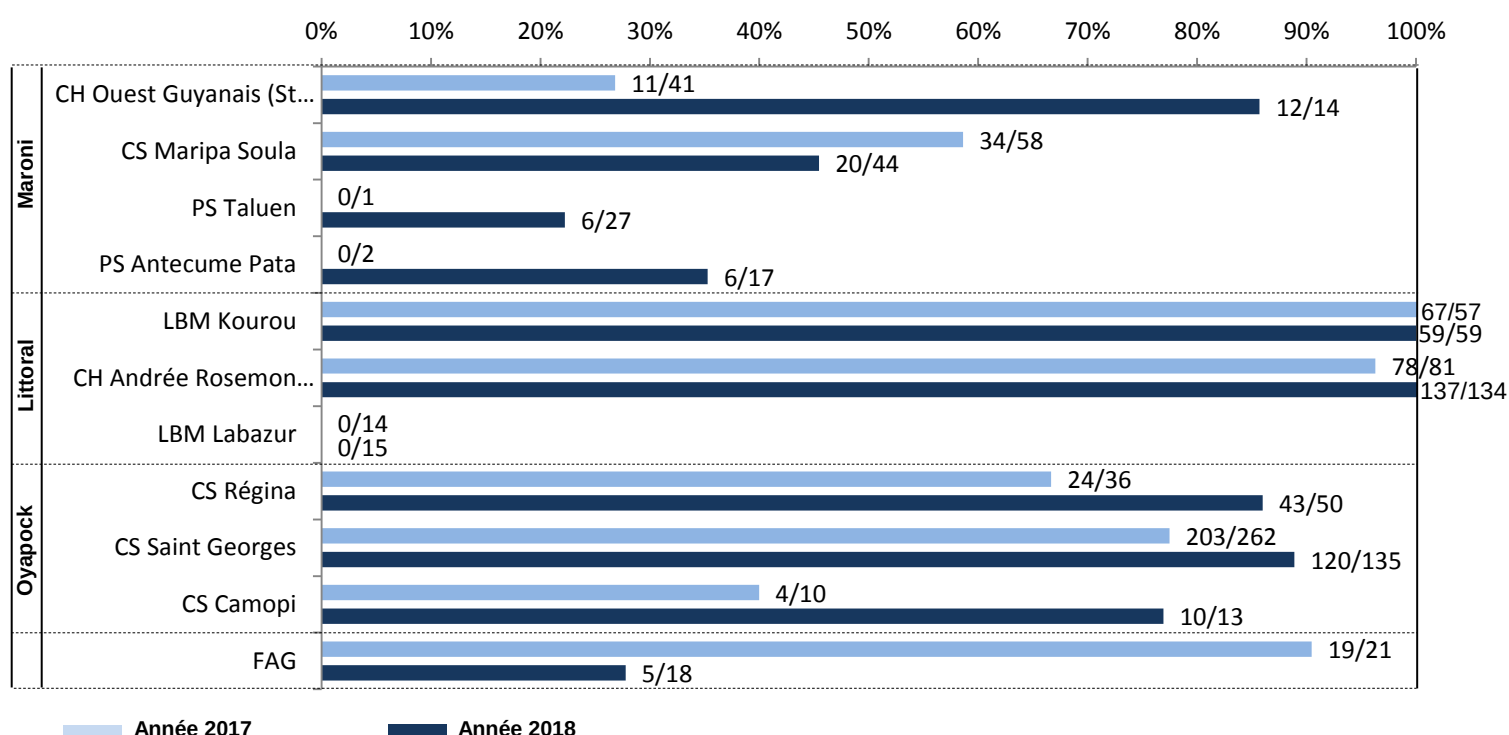


Figure 1. Pourcentage d'isolats reçus au Centre National de Référence du Paludisme, Pôle Zones Endémiques en fonction du nombre de cas déclarés à la Cire Guyane.

CH : Centre Hospitalier, LBM : Laboratoire de Biologie Médicale, CS : Centre de Santé, PS : Poste de Santé. Seuls sont représentés les centres pour lesquels au moins 10 cas de paludisme (toutes espèces confondues) ont été déclarés au cours de l'année 2018 à la Cire Guyane.

Conclusions

Avec 546 cas, le niveau de transmission observé en 2018 a été sensiblement le même qu'en 2017. L'année 2017 avait été une année de transmission particulièrement intense avec 597 cas déclarés à la Cire Guyane mais en faite un doublement par rapport aux chiffres de 2016 (+129%). En 2018, le niveau d'exhaustivité des isolats reçus au CNR continu d'augmenter légèrement pour atteindre 77,1% des cas contre 74,7% en 2017. Ainsi, 421 isolats ont été reçus.

Les Centres Délocalisés de Prévention et de Soins (CDPS) sont des acteurs majeurs de la surveillance car ils se situent en zone d'endémie. En 2014, une procédure conjointe incluant le recueil de données pour la Cire a été déployée dans l'ensemble des CDPS. En juin 2018, une fiche de renseignements unique pour tous les CDPS a été déployée. Cette coordination des acteurs pour simplifier votre quotidien **impose cependant d'être exhaustif dans le recueil des prélèvements et les informations pour leur transmission au LHUPM du CHAR comme première étape du circuit.**

Un certain nombre de cas de paludisme sont également diagnostiqués dans les LBM de ville. N'hésitez pas à nous contacter si vous souhaitez connaître la marche à suivre pour participer à cette démarche de santé publique qui permet de veiller à ce que l'on utilise les méthodes et les traitements les plus adaptés à notre territoire.

L'OMS renouvelle sa confiance au laboratoire

2014-2017 a été la première mandature du laboratoire en tant que Centre Collaborateur OMS pour la surveillance des résistances aux antipaludiques. Cette première mandature a été performante avec le déploiement d'activités à l'échelle du plateau des Guyanes. En 2018, l'OMS nous a renouvelé sa confiance pour quatre années supplémentaires.

Le programme de travail porte sur la caractérisation du gène *pfk13* en lien avec la résistance aux artémisinines mais cette fois plus largement, à l'échelle amazonienne. La recherche de délétions des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* est aussi une activité. En effet, la délétion de ces gènes peut entraîner de faux diagnostics si l'on utilise des tests de diagnostic rapide *Pf/Pan*. Ils étiquetteront alors à tort, des cas de *P. falciparum* délétés, *P. vivax*.

Etude de la sensibilité de *P. falciparum*

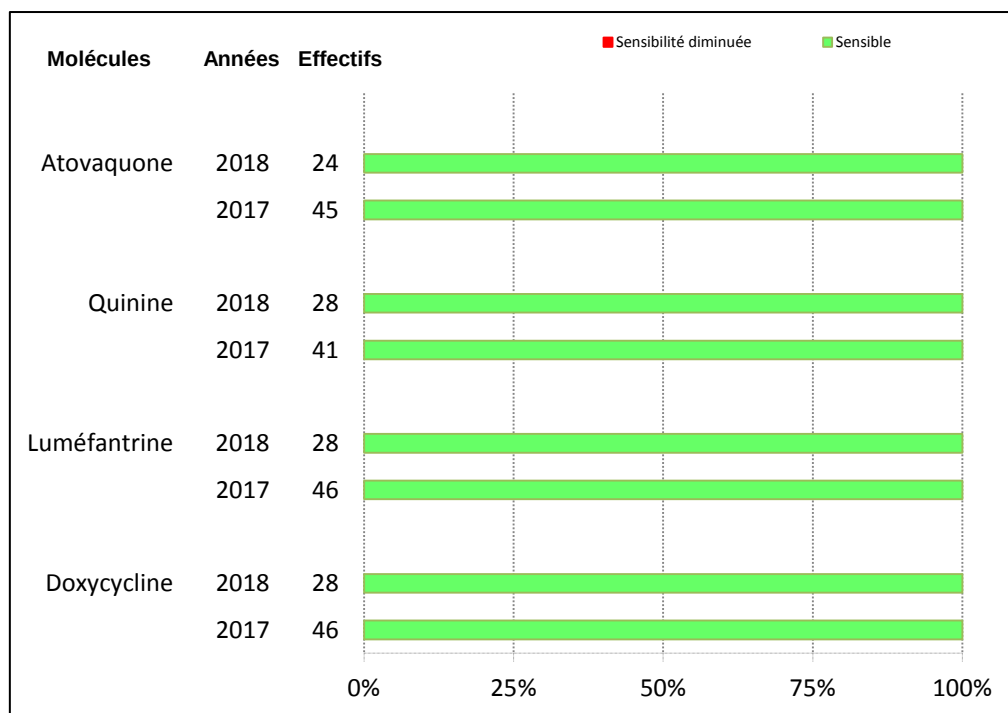


Figure 2. Pourcentage d'isolats de sensibilité diminuée observés à l'aide du test *in vitro* classique.

Le nombre d'isolats testés est variable d'une molécule à l'autre et dépend de l'interprétabilité du résultat. Les isolats sont classés en deux catégories en fonction de leur sensibilité. Il n'est possible que de parler d'isolat de sensibilité diminuée car le seuil d'interprétation a été fixé par des approches statistiques et non une corrélation avec les observations obtenues lors d'un suivi de l'efficacité thérapeutique *in vivo*.

En 2018, les tests *in vitro* ont été effectués sur 11 molécules. Seules les molécules les plus informatives et utilisées en thérapeutique sont présentées ici. L'accent est par contre mis depuis trois ans sur les nouvelles méthodes telles que le test de survie pour étudier la sensibilité aux artémisinines et à la pipéraquline.

Sensibilité à la quinine, l'atovaquone et la doxycycline

Aucun isolat de sensibilité diminuée n'a été observé en 2018.

En lien avec la résistance à l'atovaquone (en association avec le proguanil dans la Malarone®), 50 isolats ont été analysés au niveau du gène *pfcyt*b. Aucune mutation n'a été observée.

Sensibilité aux artémisinines et à ses molécules partenaires

Artéméthér/luméfamtrine en association dans le Riamet®, ou dihydroartémisinine/pipéraquline au sein de l'Eurartésim® les associations à base de dérivés de l'artémisinine sont partout. Du fait de l'utilisation croissante et parfois « anarchique » de ces associations, la pression médicamenteuse est de plus en plus importante, notamment sur les sites d'orpaillage. Ainsi la vigilance est accrue vis-à-vis de ces molécules.

Concernant les dérivés de l'artémisinine.

A l'heure actuelle, les tests dits « classiques » ne sont pas les méthodes de référence pour évaluer la sensibilité aux artémisinines. Les tests de survie sont mis en place au CNR depuis 2015 mais en 2018 aucun test de ce type n'a été effectué faute de temps dédié. Les tests précédemment réalisés ne montrent aucun signe de sélection de résistance pas plus que l'analyse du gène *pfk13* de 50 isolats.

Concernant les molécules partenaires, la luméfamtrine et la pipéraquline.

Pas d'émergence de résistance observée avec la luméfamtrine, en revanche, les premiers résultats obtenus concernant la pipéraquline montrent un signal de sélection. Ces résultats sont en cours de consolidation.

CONCLUSION

Le niveau de sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux antipaludiques reste stable et les thérapeutiques recommandées au sein du plan de lutte contre le paludisme sont toujours adaptées.

Etudes ponctuelles et recherche en santé publique

ELIMALAR : un projet au service de tous dans l'objectif de mieux lutter contre le paludisme

2018 a vu la poursuite du projet ELIMALAR financé par les fonds européens régionaux FEDER, l'ARS Guyane, le ROTARY international, l'IPG et le CHAR en lien avec l'OMS. *ELIMALAR pour l'élimination du paludisme en Guyane : évaluation des approches et des outils les plus pertinents*. Le projet est porté par le laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane en lien étroit avec la coordination l'Hôpital de Cayenne qui coordonne l'axe 1.

Quelques informations sur les activités initiées dans les deux axes que comporte le projet :

Axe 1. PALUSTOP : La mise en place d'un dépistage actif ciblé de toutes les personnes vivant dans une poche de transmission en Guyane est-elle pertinente, rentable et efficace ? Les 1566 personnes résidant et travaillant sur la commune de St Georges de l'Oyapock dépistées en 2017 ont fait l'objet d'une recherche active en 2018. 1232 ont pu faire l'objet d'une nouvelle PCR. Seuls 36 d'entre eux étaient porteurs de parasites contre 100 en 2017. Difficile de dire à ce stade si la stratégie de dépistage plus traitement de 2017 est responsable de cette baisse.

En 2017, les personnes avaient également fait l'objet d'une enquête sur leurs connaissances, attitudes et pratiques vis-à-vis du paludisme. L'analyse de ses résultats est en cours afin de connaître leur niveau de connaissances et de mieux comprendre leurs comportements vis-à-vis de cette pathologie. Ils sont aussi actuellement utilisés pour définir des populations cibles et tester des approches innovantes d'éducation à la santé par une approche de santé communautaire. Cette étude et ces tests ne sont possibles que grâce au soutien et au professionnalisme des médiateurs en santé issus des communautés de l'association DAAC (Développement, Accompagnement, Animation, Coopération).

Axe 2. REAGIR : Résistance/Emergence aux Artémisinines et ses partenaires sur le plateau des Guyanes, les Identifier pour mieux les faire Reculer. Les associations d'antipaludiques à base d'un dérivé de l'artémisinine sont-elles toujours efficaces et si oui, pour combien de temps ?

Cet axe du projet se déploie dans la continuité des travaux de surveillance des résistances menées au sein de notre laboratoire. Une jeune chercheuse guyanaise, Luana Mathieu termine son Doctorat de Sciences au sein du laboratoire sur la résistance aux artémisinines sur le plateau des Guyanes. Les résultats de l'analyse d'isolats en provenance de Guyane, du Guyana, de l'Etat d'Amazonas au Brésil et du Venezuela montrent un signal d'émergence de parasites mutants au Guyana. Ce signal est en cours d'analyse. L'étude approfondie de la résistance aux molécules partenaires devrait s'accélérer en 2019 avec l'arrivée d'un post-doctorant dédié à cette thématique.

Evaluation d'un kit de diagnostic rapide capable d'identifier les infections mixtes Pf/Pv

Les TDR SD Bioline® Pf/Pv et SD Bioline® Pf/Pan ont ainsi été comparés aux résultats de la microscopie corrigés par PCR en temps réel. Sur les 91 infections mixtes détectées par microscopie, 70 ont été confirmées par PCR, les autres étaient des monoinfections. Sur ces 70 isolats, le TDR SD Bioline® Pf/Pv a permis de détecter une infection mixte dans 62,8% des cas. Les non détectés l'étaient essentiellement du fait de la faible parasitémie de l'espèce minoritaire. Déployer ce type de test voudrait dire renoncer à l'identification des cas à *P. malariae* qui deviennent aujourd'hui extrêmement rares en Guyane. Nous avons par ailleurs testé la capacité des tests SD Bioline® Pf/Pan actuellement utilisés à détecter cette espèce à partir de neuf isolats que nous avions dans notre collection. Il n'en a détecté aucun. Les parasitémies étaient comprises entre 0,01 et 0,05%. En changeant de test nous ne perdons donc rien par rapport à l'actuel. Cependant des défauts de diagnostic ont été signalés par l'Hôpital de Cayenne au sujet du test SD Bioline® Pf/Pan, y compris lors de la réalisation de leur contrôles externes de qualité. Il est donc envisagé de changer de marque de TDR courant 2019 au profit d'une marque plus fiable et ayant une meilleure sensibilité pour détecter *P. vivax*, espèce aujourd'hui largement majoritaire en Guyane, 89,38% des cas.

COMME TOUJOURS, MERCI DE VOTRE PARTICIPATION !!!

La transmission du paludisme se maintient en Guyane et dans le même temps, rarement autant de projets et d'actions ont été conduites sur ce territoire autour de cette pathologie, sur le terrain comme au laboratoire. Tout ce travail et les avancées qui vont avec ne sont possibles qu'avec l'implication de tous et la mise à profit de la complémentarité de tous les acteurs du territoire au bénéfice de la population habitant la Guyane.

Si tu veux aller vite, marche seul mais si tu veux aller loin, marchons ensemble.

Proverbe africain

Nous comptons toujours autant sur nos partenaires guyanais afin de poursuivre ensemble ce qui a été mis en place depuis plusieurs années Enfin et comme toujours, **les échantillons que vous nous transmettez sont précieux** et leur analyse requiert un minimum de renseignements relatifs au patient, à ses déplacements et son histoire vis-à-vis du paludisme et des antipaludiques. Par conséquent, nous vous rappelons toute l'importance de prendre quelques minutes pour compléter, de la façon la plus exhaustive possible, la fiche de renseignements devant accompagner tous les échantillons (cf p.4).

Contact

Centre National de Référence du Paludisme, Pôle zones endémiques - Laboratoire de parasitologie
Centre collaborateur de l'OMS pour la surveillance des résistances aux antipaludiques
Institut Pasteur de la Guyane - 23, av Pasteur - BP 6010 - 97306 Cayenne cedex

Interlocuteurs :	Responsable	Lise Musset	05 94 29 68 40	lmusset@pasteur-cayenne.fr
	Adjoint	Yassamine Lazrek-Sandot	05 94 29 26 12	ylazrek@pasteur-cayenne.fr
Fax : 05 94 31 80 83	Secrétariat	Nicolle Guinguincoin	05 94 29 58 21	nguinguincoin@pasteur-cayenne.fr

Partenaires du réseau de surveillance du paludisme en Guyane

- Centre Hospitalier de Cayenne (CHC), Centre Hospitalier de l'Ouest Guyanais
- Postes et Centres Délocalisés de Prévention et de Soins,
- Laboratoires de Biologie Médicale de Kourou, Biosoleil, Labazur et Institut Pasteur de la Guyane
- Service de Santé des Forces Armées de Guyane.

 Surveillance du paludisme et/ou confirmation de diagnostic Données clinico-épidémiologiques <i>Fiche à joindre obligatoirement au tube EDTA prélevé</i>		Identifiant _____ - _____ Ne pas remplir
Demande	Nom : Centre demandeur : <i>Nom de jeune fille :</i> Prescripteur : Prénom : Téléphone : Date de naissance : ____ / ____ / ____ Signature : Sexe : ☐ M ☐ F	
	Tube EDTA ou ACD à conserver au réfrigérateur avant envoi, et acheminer en conditions réfrigérées (stockage possible plusieurs jours). Prélevé le : ____ / ____ / ____ à ____ h ____ par	
	TDR ☐ Non fait ☐ Fait <i>Données brutes :</i> ☐ Bande contrôle ☐ Bande P ☐ Bande Pf <i>Interprétation :</i> ☐ Négatif ☐ <i>P. falciparum</i> ou infection mixte ☐ <i>Plasmodium</i> sp Examen microscopique ☐ Neg ☐ <i>P. falciparum</i> ☐ <i>P. vivax</i> ☐ <i>P. malariae</i> ☐ <i>P. ovale</i> Para : % ☐ Confirmation diagnostique suite à un TDR positif (pour les CDPS et les prélèvements acheminés en 48h) ☐ Demande de PCR diagnostique (fortes suspicions cliniques malgré TDR/FM/GE négatifs, etc...) ☐ Isolat envoyé pour la surveillance	
	Non opposition En vertu du Code de la Santé Publique et de la Loi « Informatique et liberté », le patient doit être informé de l'utilisation possible des échantillons biologiques collectés et des données associées à des fins de recherche, en vue d'améliorer les connaissances générales sur le paludisme. Toute recherche en matière de génétique humaine est exclue de cette démarche. Suite à cette information, le patient (ou le titulaire de l'autorité parentale, ou le tuteur) ☐ s'oppose à l'utilisation secondaire de ses échantillons et données associées pour des fins de recherche.	
Données clinico-épidémiologiques	Origines possibles de contamination : ☐ Résident en Guyane ☐ De passage en Guyane Lieu de résidence : Pays de provenance : Activités professionnelles nécessitant une présence sur site d'orpaillage : ☐ Oui ☐ Non Déplacement dans les quatre dernières semaines précédant l'accès : ☐ Oui ☐ Non Si oui, lieu de passage 1 : Durée: Date de retour : ____ / ____ / ____ Si oui, lieu de passage 2 : Durée: Date de retour : ____ / ____ / ____	
	Antécédents de paludisme : ☐ Non ☐ Oui Date du dernier accès : ____ / ____ / ____ Traitement dernier accès : Lieu : Espèce : ☐ Pf ☐ Pv ☐ Pm ☐ Po	
	Examen clinique : Date début symptômes : ____ / ____ / ____ Femme enceinte : ☐ Oui ☐ Non ☐ NSP Hospitalisation : ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas (NSP) Forme clinique : ☐ Accès simple ☐ Accès compliqué (pernicieux)	
	Thérapeutique Prophylaxie utilisée : ☐ Aucune ☐ Ne sait pas Prophylaxie bien suivie : ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas Date de la dernière prise : ____ / ____ / ____ Traitement avant prélèvement : ☐ Aucun ☐ Ne sait pas Traitement bien suivi : ☐ Oui ☐ Non ☐ Ne sait pas Date de la dernière prise : ____ / ____ / ____ Traitement après prélèvement : ☐ Aucun ☐ Ne sait pas	
Remarques diverses : Fiches vierges envoyées sur demande : 05 94 29 58 21, cnrpaludisme@pasteur-cayenne.fr		
LHUPM	Examen microscopique : ☐ Neg ☐ Pf ☐ Pv ☐ Pm ☐ Po Para : % Ne pas remplir TDR ☐ Bande contrôle ☐ Bande Pan ☐ Bande Pf Saisie Hexalis ☐ Oui ☐ Non	

8. Annexe 8 : Présentation détaillée des valeurs de chimiosensibilités, Guyane 2012-2018

En plus du tableau récapitulatif des tendances en termes de résistance ou de diminution de sensibilité par rapport à l'année précédente présenté dans le document principal, nous présentons ici le détail des tendances depuis 1997 pour certaines molécules.

Fiche signalétique a été construite pour chaque molécule. Elle reprend les dates clés concernant la molécule vis-à-vis des recommandations thérapeutiques et prophylactiques pour l'utilisation des antipaludiques extraites de la 3^{ème} conférence de consensus sur la prise en charge des cas de paludisme en Guyane. Pour les recommandations concernant le Brésil et le Suriname, les publications de l'Organisation Panaméricaine de la Santé et les connaissances des pratiques dans cette région ont été utilisés (WHO, 2009).

Elle présente également le détail des valeurs sous forme de boîtes de Tukey qui représente la distribution des valeurs. En effet, le simple classement en isolat sensible ou résistant ou sous forme de moyenne géométrique est trop sensible aux valeurs extrêmes, notamment dans le cas des molécules pour lesquelles le ratio CI_{50} résistant/ CI_{50} sensible peut aller jusqu'à 1000 (ex : atovaquone). Ces boîtes sont construites de la manière suivante :

- Les boîtes à moustache représentent la distribution des CI_{50} des isolats,
 - La boîte est délimitée par la valeur du 1^{er} quartile (Q_1) de la distribution pour le trait inférieur et celle du 3^{ème} quartile (Q_3) pour le trait supérieur. La boîte contient donc 50% des valeurs. La médiane est représentée par un trait à l'intérieur de la boîte qui délimite l'espace interquartile,
 - La longueur des moustaches est définie par deux valeurs :
 - La frontière basse qui est la valeur minimum dans les données qui est supérieure à : $Q_1 - 1,5 \times (Q_3 - Q_1)$,
 - La frontière haute qui est la valeur maximum dans les données qui est inférieure à : $Q_3 + 1,5 \times (Q_3 - Q_1)$,
 - Les valeurs situées au-delà des moustaches sont individualisées à l'aide d'un point. Elles représentent des valeurs normalement considérées comme aberrantes. Dans notre cas, elles pourraient correspondre à des isolats résistants ou de sensibilité diminuée.
- Le logiciel GraphPad Prims 8[®] a été utilisé pour générer ces graphiques.

CHLOROQUINE

Dates et points clés en Guyane	1995	Utilisation limitée aux traitements des accès palustres à <i>P. vivax</i> et <i>P. malariae</i> (idem au Brésil et au Suriname en association avec la primaquine),
	2002	Recommandation en prophylaxie en association avec le proguanil chez les enfants < 8 ans.
Médiane [min ; max]	65,71 [16,16 ; 765,55]	
Proportion de résistants	38,2%	
Seuil de résistance	100nM (Dedet et al., 1988)	

La proportion d'isolats résistants reste stable à 47,8% (Figure 32). L'augmentation des valeurs observées en 2013 tient à la modification de l'atmosphère d'incubation, passée de 19% d'oxygène à environ 10%. Depuis 1999 on observe une tendance nette au retour de la sensibilité. Cette sensibilité est associée à des isolats présentant la particularité de posséder un génotype *pfcr* résistant avec la présence notamment de la mutation K76T mais également la mutation réversible de la résistance par acquisition d'une nouvelle mutation est une première mondiale qui a été publiée par le laboratoire en 2015.²⁰ L'hypothèse étant que ce retour de la sensibilité est peut être dû à un avantage sélectif de cette mutation vis-à-vis d'autres molécules car il n'y a plus de pression médicamenteuse de cette molécule sur *P. falciparum* depuis 1995.

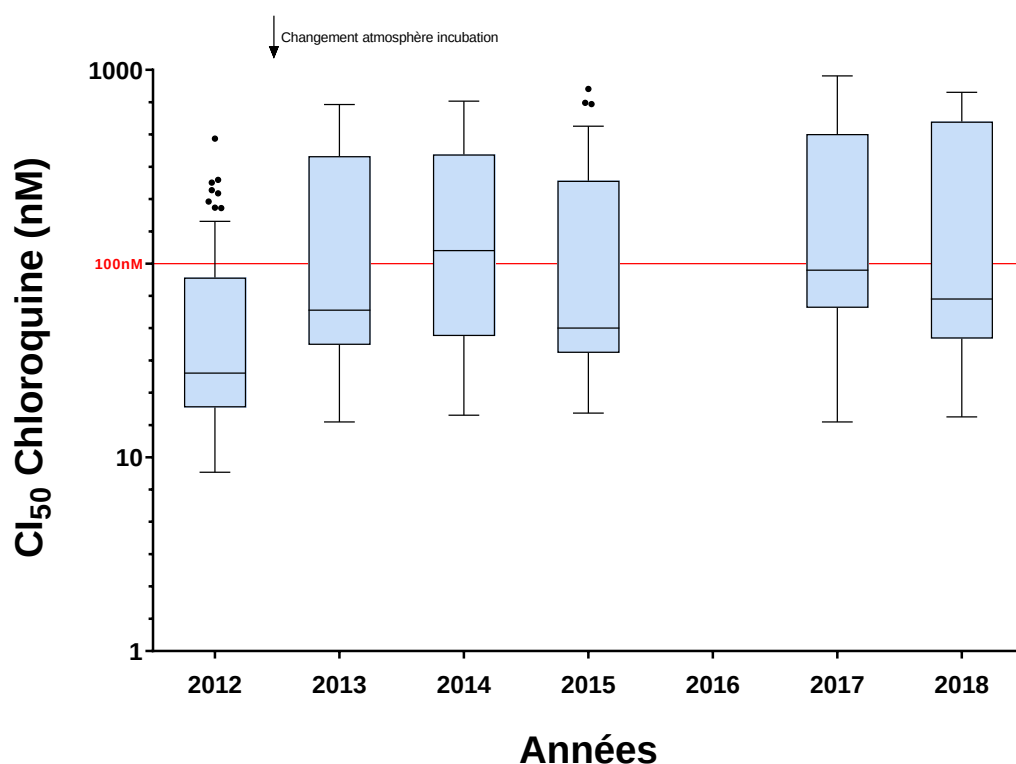


Figure 32. **Evolution des chimiosensibilités de *P. falciparum* à la chloroquine en Guyane entre 2012 et 2018.**

La ligne rouge représente le seuil de résistance.

²⁰ Pelleau S, Moss EL, Dhingra SK, Volney B, Casteras J, et al. (2015) Adaptive evolution of malaria parasites in French Guiana: Reversal of chloroquine resistance by acquisition of a mutation in *pfcr*. Proc Natl Acad Sci U S A.

Monodéséthyl-AMODIAQUINE

Dates et points clés	Utilisation dans de nombreux pays en association avec l'artésunate pour les traitements des accès palustres à <i>P. falciparum</i> . Pas d'utilisation en France en général.
Médiane [min ; max]	41,76 [10,49 ; 377,56]
Proportion d'isolats de sens. diminuée	39,29%
Seuil de diminution de sensibilité	80 nM (Ringwald et al., 1998)

Si l'on compare les sensibilités à celles de la chloroquine, une forte corrélation est observée, signe d'une résistance croisée.

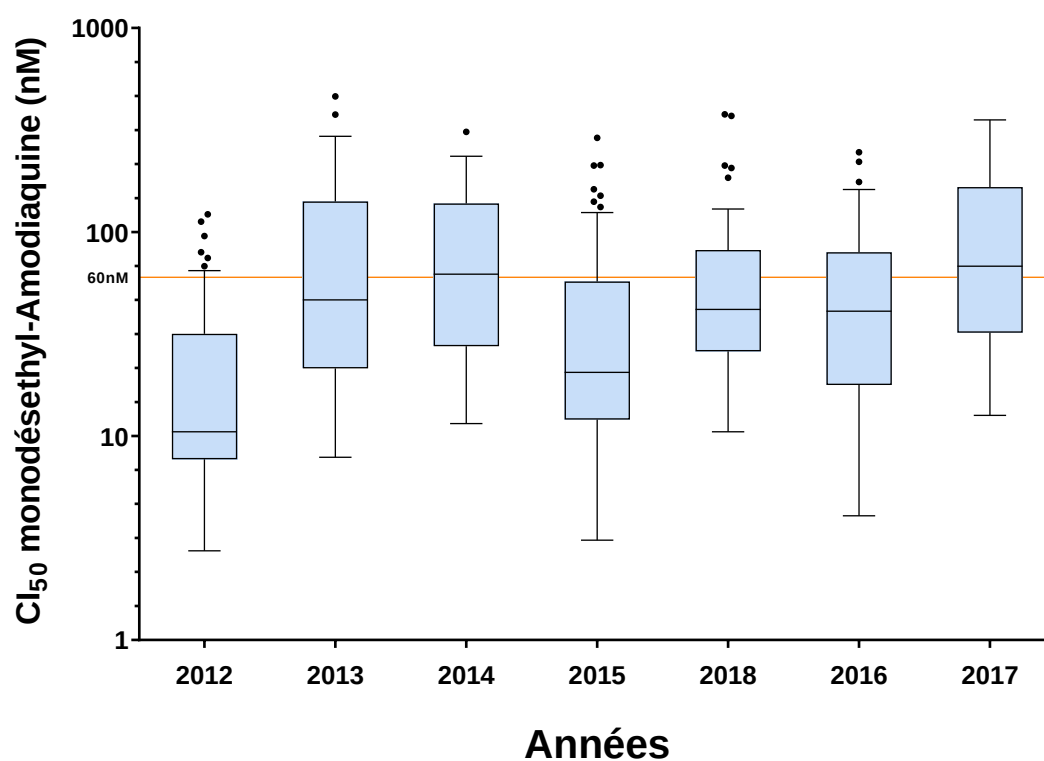


Figure 33. Evolution des chimiosensibilités de *P. falciparum* à la monoséthylamodiaquine en Guyane entre 2012 et 2018.

La ligne orange représente le seuil de diminution de sensibilité.

ATOVAQUONE

Dates et points clés en Guyane	1995	2 ^{ème} ligne thérapeutique des accès simples ou de la femme enceinte à <i>P. falciparum</i> en association avec le proguanil (Malarone [®]),
	2002	Recommandée en prophylaxie chez les plus de 40kg et la femme enceinte en association avec le proguanil (Malarone [®]).
Médiane [min ; max]	2,46 [0,08 ; 9,68]	
Proportion de résistants	0%	
Seuil de résistance	400nM (Savini et al., 2008)	

Aucun isolat résistant n'a été identifié en 2018 (Figure 34), pas plus grâce au génotypage du *pfcytb* de 50 isolats. Cette molécule en association avec la proguanil reste donc efficace en Guyane.

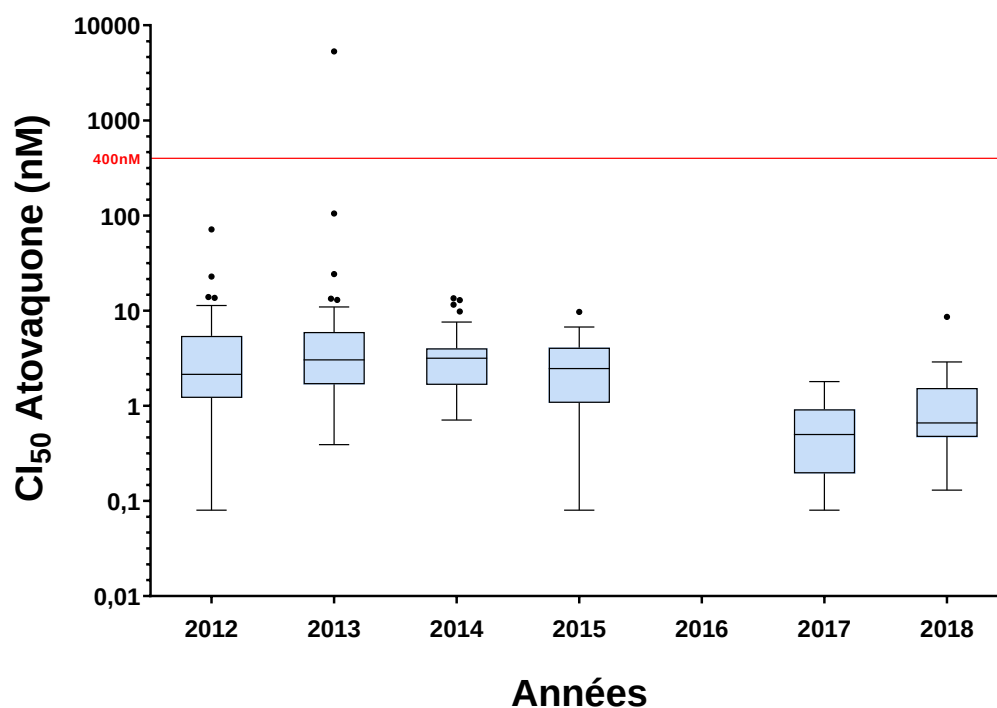


Figure 34. Evolution des chimiosensibilités de *P. falciparum* à l'atovaquone en Guyane entre 2012 et 2018.

La ligne rouge représente le seuil de résistance.

QUININE

Dates et points clés en Guyane	1995	2 ^{ème} ligne thérapeutique des accès graves à <i>P. falciparum</i> ou de la femme enceinte en association avec une cycline (1 ^{ère} ligne au Brésil), et 3 ^{ème} ligne des accès simples,
Médiane [min ; max]		181,77 [32,14 ; 399,89]
Proportion d'isolats de sens. diminuée		0,00%
Seuil de diminution de sensibilité		800nM (Basco and Le Bras, 1994)

Aucun isolat de sensibilité diminuée à la quinine n'a été observé cette année pas plus qu'en 2017 (Figure 35). Aucune tendance n'est observable ces dernières années.

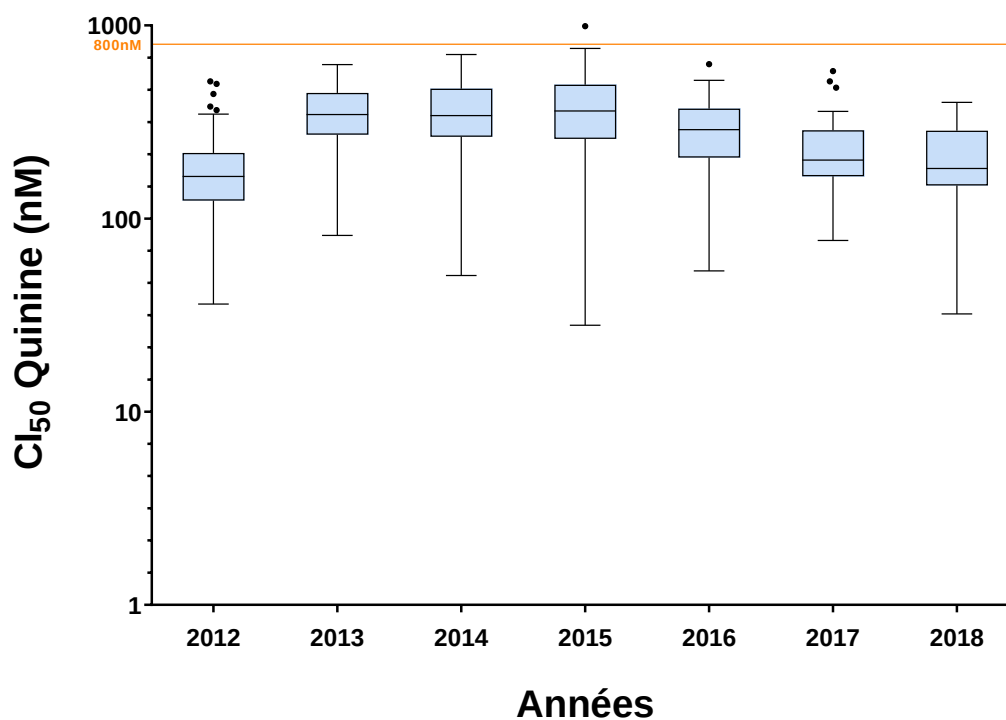


Figure 35. **Evolution des chimiosensibilités de *P. falciparum* à la quinine en Guyane entre 2012 et 2018.**

La ligne orange représente le seuil de diminution de sensibilité.

DOXYCYCLINE

Dates et points clés en Guyane	1995	2 ^{ème} ligne thérapeutique des accès graves à <i>P. falciparum</i> ou de la femme enceinte en association avec la quinine (1 ^{ère} ligne au Brésil), et 3 ^{ème} ligne des accès simples,
	1995	Recommandée en prophylaxie chez les plus de 15kg non gravides,
	2003	Utilisation systématique en prophylaxie chez les militaires français se rendant en Guyane.
Médiane [min ; max]	14,14 [6,39 ; 28,06]	
Proportion d'isolats de sens. diminuée	0,00%	
Seuil de diminution de sensibilité	Seuil de diminution de sensibilité : 35µM (Briolant et al., 2009)	

Aucun isolat de sensibilité diminuée à la quinine n'a été observé cette année pas plus qu'en 2017 (Figure 36).

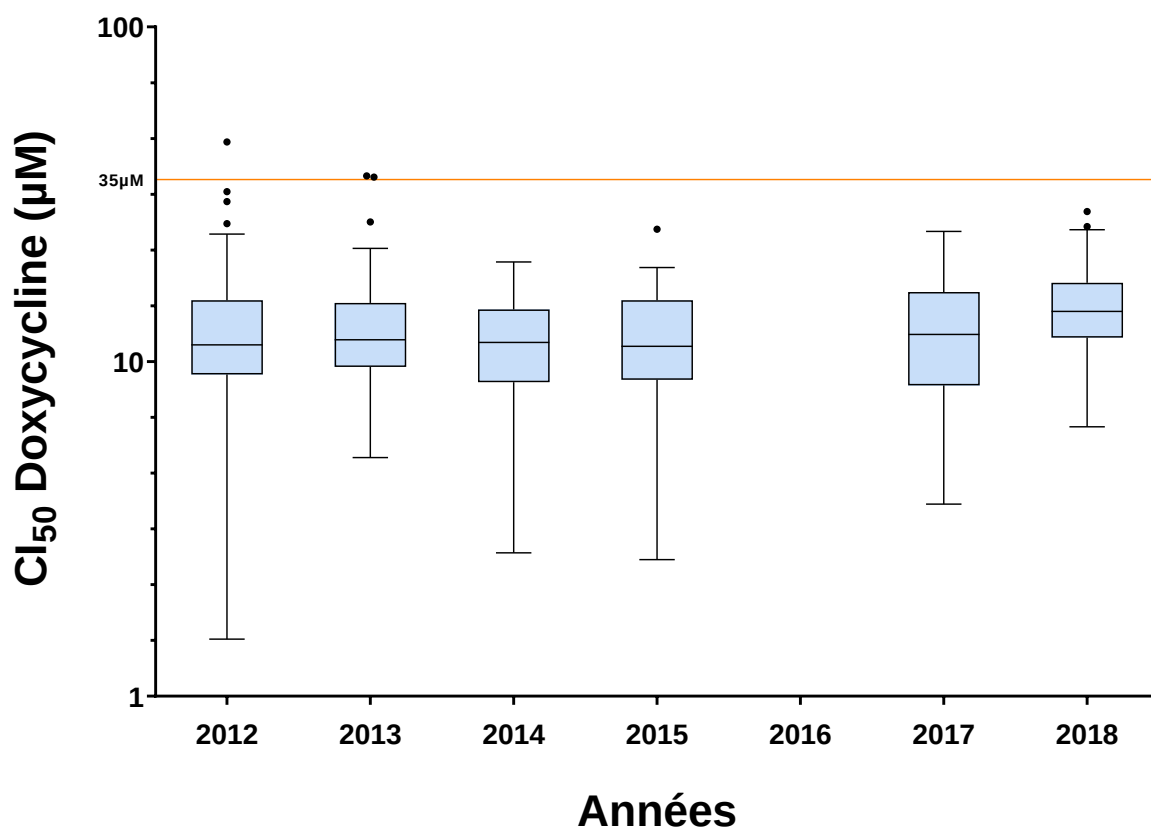


Figure 36. Evolution des chimiosensibilités de *P. falciparum* à la doxycycline en Guyane entre 2012 et 2018.

La ligne orange représente le seuil de diminution de sensibilité.

Sensibilité aux artémisinines

Alors qu'en Asie du Sud Est le test *in vitro* isotopique classiques ne permet pas d'identifier les parasites de sensibilité diminuée aux artémisinines, nous avons fait le choix de présenter tout de même les résultats que nous avons obtenu afin de voir si une tendance se dégage au-delà des seuils d'interprétation.

DIHYDROARTEMISININE		
Dates et points clés en Guyane	Site orpillage	Métabolite actif de l'artémisinine entrant dans la composition de l'Artecom®, une spécialité régulièrement retrouvée sur les sites d'orpillage clandestin en Guyane. Cette association regroupe trois molécules, dihydroartémisinine, pipéraqune, triméthoprime.
	2011	La spécialité Eurartésim®, association de dihydroartémisinine et de pipéraqune, est mise sur le marché en France. En Guyane, elle est utilisée par les militaires pour traiter leurs accès à <i>P. falciparum</i> .
Médiane [min ; max]		2,99 [0,60 ; 7,31]
Proportion d'isolats de sens. diminuée		0%
Seuil de diminution de sensibilité		12nM (Basco & Le Bras, 1993)
ARTEMETHER		
Dates et points clés	2007	1 ^{ère} ligne thérapeutique des accès simples à <i>P. falciparum</i> en association avec la luméfantrine sous la spécialité Riamet®, (idem au Brésil depuis 2008 = Coartem® ; et au Suriname depuis 2003).
Médiane [min ; max]		8,02 [1,30 ; 26,10]
Proportion d'isolats de sens. diminuée		32,35%
Seuil de diminution de sensibilité		12nM (Pradines et al., 1999)

Sans qu'elle ne soit très marquée, une tendance à l'augmentation est significative ($p < 0.001$). Elle est plus visiblement concernant la dihydro-artémisinine. Aucun test de survie n'a été effectué en 2018 faute de temps. Nous ne pouvons donc pas rapprocher les résultats des deux types de tests.

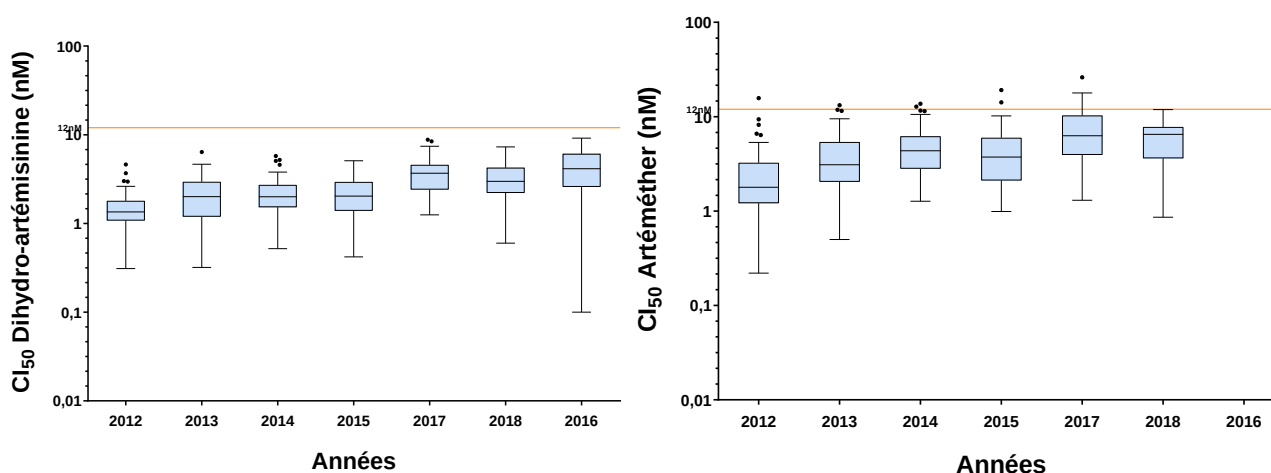


Figure 37. Evolution des chimiosensibilités entre 2012 et 2018 :
dihydroartémisinine (gauche), artémether (droite).

La ligne orange représente le seuil de diminution de sensibilité.

LUMEFANTRINE

Dates et points clés	2007	1 ^{ère} ligne thérapeutique des accès simples à <i>P. falciparum</i> en association avec l'artéméter (Riamet®), idem au Brésil (Coartem®) depuis 2008 et au Suriname depuis 2003.
Médiane [min ; max]	36,61 [3,62 ; 105,34]	
Proportion d'isolats de sens. diminuée	0,00%	
Seuil de diminution de sensibilité	150nM (Pradines et al., 1999)	

Aucune sensibilité diminuée n'a été identifiée en 2018 (Figure 38).

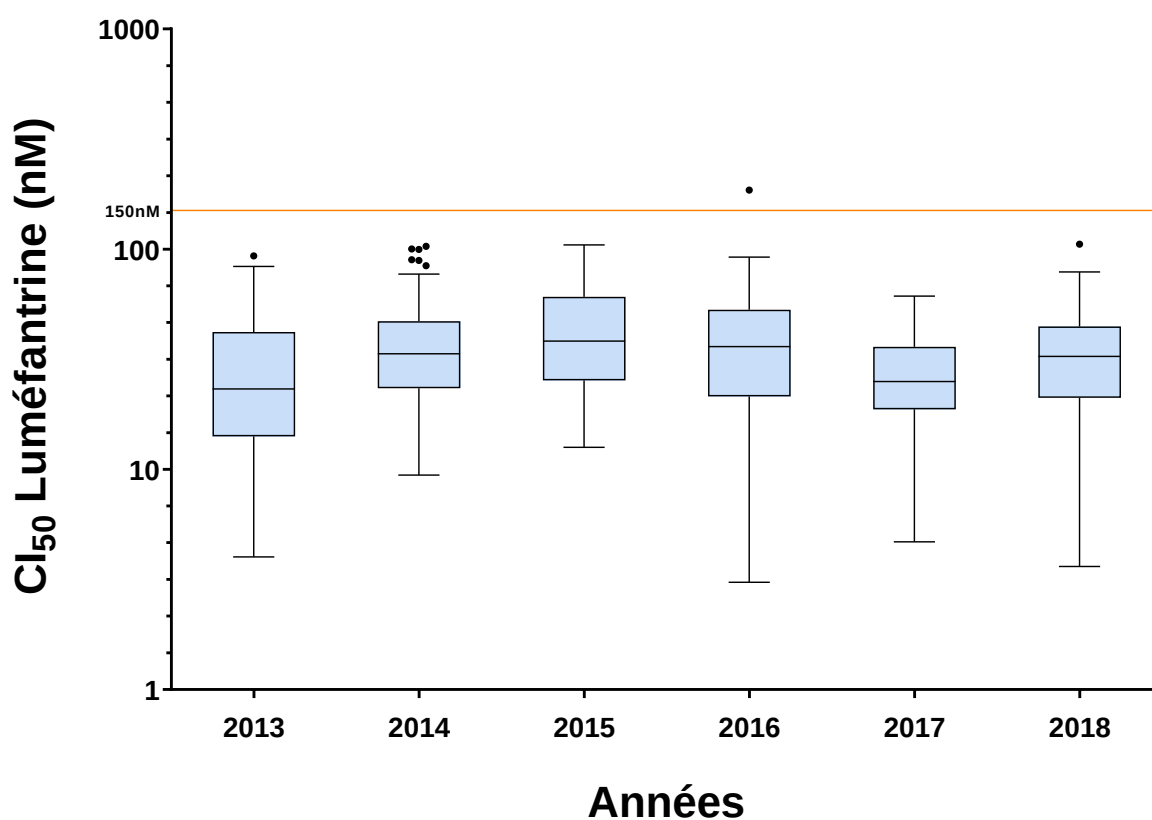


Figure 38. Evolution des chimiosensibilités de *P. falciparum* à la luméfantrine en Guyane entre 2012 et 2018.

La ligne orange représente le seuil de diminution de sensibilité.

MEFLOQUINE

Dates et points clés	2002	Arrêt de la recommandation pour le traitement des accès simples à <i>P. falciparum</i> .
	2002	Arrêt de la recommandation en prophylaxie.
	Brésil, Suriname	2 ^{ème} ligne thérapeutique des accès simples à <i>P. falciparum</i> en association avec l'artésunate.
Médiane [min ; max]	7,53 [1,53 ; 40,15]	
Proportion d'isolats de sens. diminuée	0,00%	
Seuil de diminution de sensibilité	30 nM (Brasseur et al., 1990)	

Aucun isolat de sensibilité diminuée n'a été observé en 2018. Le nombre de copie du gène *pfmdr1* en lien avec la résistance n'est plus étudié mais la majorité (97,5%, n=162) des isolats étaient monocopie en 2010 dernière année de l'étude de ce gène.

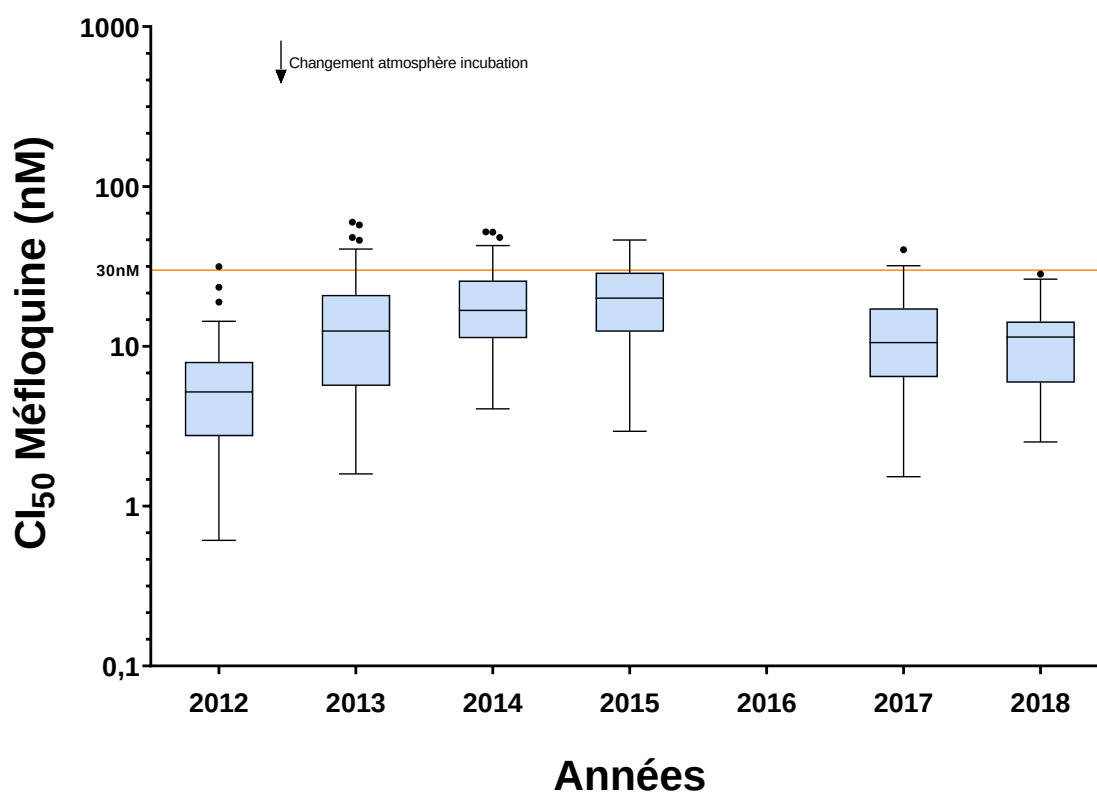


Figure 39. Evolution des chimiosensibilités de *P. falciparum* à la méfloquine en Guyane entre 2012 et 2018.

La ligne orange représente le seuil de diminution de sensibilité.

PYRONARIDINE

Dates et points clés	2013	Avis favorable de l'agence européenne du médicament en association avec l'artésunate (Pyramax®), pour les traitements des accès palustres à <i>P. falciparum</i> en Asie du sud est.
Médiane [min ; max]	9,75 [1,59 ; 31,42]	
Proportion d'isolats de sens. diminuée	0,00%	
Seuil de diminution de sensibilité	60nM (Pascual et al., 2015)	

Les valeurs ont une tendance à la hausse sans qu'elles ne franchissent pour autant le seuil de diminution de sensibilité. Cette molécule n'étant pas utilisée dans la zone, aucune pression ne s'exerce sur les parasites. Cela ne peut pas expliquer cette évolution des valeurs.

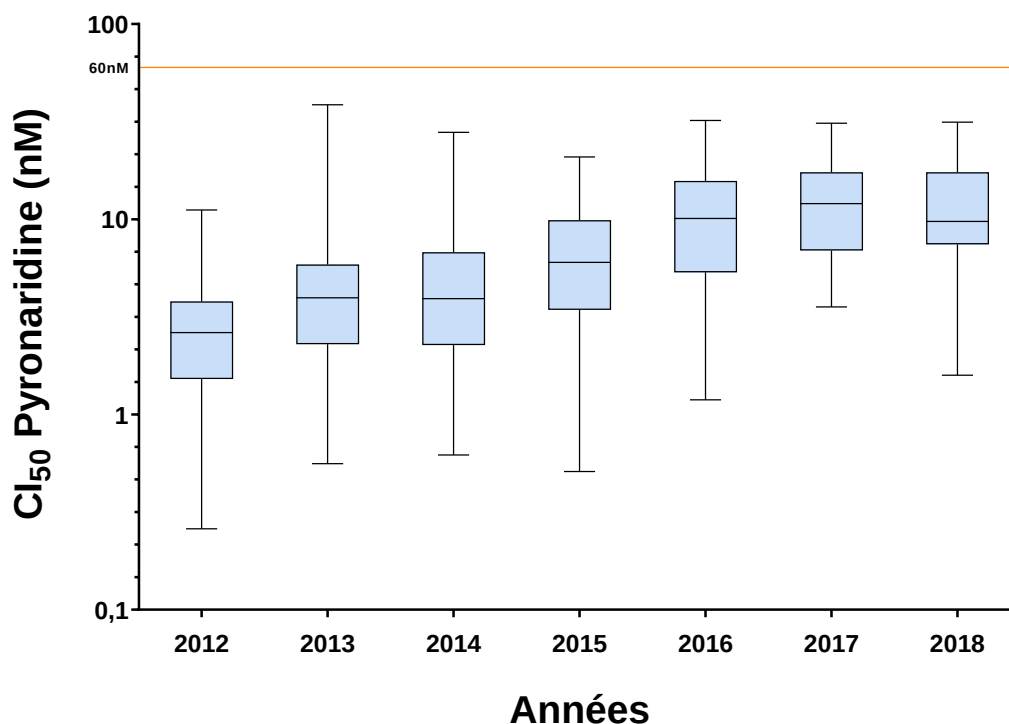


Figure 40. **Evolution des chimiosensibilités de *P. falciparum* à la pyronaridine en Guyane entre 2012 et 2018.**

La ligne orange représente le seuil de diminution de sensibilité.