

Rapport annuel d'activité

2019

**Centre de national de référence
du Paludisme**

**Année d'exercice
2018**

Préambule

Ce rapport présente les activités du CNR du Paludisme pour l'année 2018, et les principaux faits marquants. Considérant l'organisation du CNR en 2 pôles épidémiologiques, le pôle « zones non endémiques » qui regroupent le laboratoire coordonnateur, et deux laboratoires associés, et le pôle « zones endémiques » avec le laboratoire de l'Institut Pasteur de Cayenne, les données de chaque pôle seront présentées alternativement pour chaque partie du rapport.

Résumé analytique

Pôle métropole

Les données du CNR du paludisme mettent en évidence, **au plan du fonctionnement du réseau en métropole**, l'adhésion de nos correspondants à l'organisation et au fonctionnement du CNR puisqu'en 2018, la transmission des prélèvements est restée à un niveau élevé par les hôpitaux correspondants du réseau.

Sur le plan de l'épidémiologie. Pour l'année 2018, un total de 2 843 cas de paludisme a été déclaré au Centre national de référence (CNR) du Paludisme par les correspondants du réseau métropolitain. Trois sont des cas autochtones (2 aéroportuaires probables et un cryptique). Le nombre total de cas de paludisme d'importation a été estimé à environ 5 550 pour l'ensemble de la France métropolitaine, en augmentation de 6,3% par rapport à 2017. Comme pour les dernières années, les pays à l'origine de la contamination sont toujours majoritairement situés en Afrique subsaharienne ; 2742 (97,9 % des cas). Les cas surviennent principalement chez des sujets d'origine africaine (85,5%), résidant en France ou arrivant d'Afrique, en augmentation de 2,7 % par rapport à 2017 (82,8 %). L'espèce diagnostiquée majoritairement est *P. falciparum* (86,5 %), en légère baisse par rapport à 2017 (88,2 %). Trois accès palustres à *Plasmodium knowlesi* ont été diagnostiqués en 2018 (5 depuis 2010), deux après un voyage en Thaïlande et un après un voyage dans plusieurs pays du sud-est asiatique.

Le nombre et de la proportion des formes graves reste élevé, 353 (13,0 %) en léger retrait par rapport à l'année 2017 (367 ; 14,4 %). Un total de 11 décès a été déclaré, soit une létalité de 0,39% sur l'ensemble des cas et de 3,1 % sur les formes graves, en léger retrait là aussi par rapport à 2017. Le traitement par artésunate intraveineux, recommandé par le Haut Conseil de la santé publique en 2013¹, est le traitement le plus prescrit pour les cas graves (81,2 % des cas) stable par rapport à 2017.

Les 4 principaux pays à l'origine des cas (plus de 60 % des cas à eux quatre) restent la Côte d'Ivoire (n=790, +3,5 %), le Cameroun (n=565, -0,5 %), la Guinée (n=186, -1,1 %) et le Mali (n=170, +19,7 %). Il y a eu, en 2018, 56 cas de paludisme d'importation au retour des Comores contre 12 cas rapportés en 2017. Par ailleurs, 1 accès grave, survenu chez un enfant de 10 ans résidant à Mayotte en voyage en France métropolitaine, est signalé cette année (aucun cas en 2017). L'épidémie qui semblait jugulée dans l'archipel inquiète à nouveau.

L'année 2018 montre un niveau qui reste élevé des cas de paludisme importés en France métropolitaine. Les cas graves et les décès sont stables. Les sujets d'origine africaine sont toujours très majoritaires dans la distribution des cas de paludisme importés. Les cas en provenance des Comores sont en augmentation inquiétante.

Les données sur l'évolution des chimiorésistances aux antipaludiques en 2018 sont sans particularité par rapport aux années antérieures justifiant les recommandations de chimioprophylaxie du

¹ <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=310>

paludisme, en adéquation avec les recommandations internationales. Il n'est pas observé d'augmentation de résistance à l'atovaquone-proguanil et les sensibilités *in vitro* à la luméfántrine, à la pipéraqúine et à la dihydroartémisinine restent élevées. La sensibilité moyenne des isolats à la chloroquine continue de s'élever du fait de la baisse des pressions sélectives sur les parasites en Afrique. Il n'a pas été mis en évidence de mutations associées à la résistance à l'artémisinine dans les isolats de paludisme d'importation analysés. En 2018, une chimioprophylaxie n'est alléguée par le patient que dans 23,7 % des cas. Le non-respect des recommandations de prévention reste à l'origine de la plupart des cas de paludisme d'importation étudiés.

Sur le plan du diagnostic et de la prise en charge du paludisme importé, la PCR, seule ou associée, prend une place de plus en plus importante comme méthode sensible de diagnostic (37%).

L'association arténimol (dihydroartémisinine)-pipéraqúine est devenue la première ligne thérapeutique suivie par l'artémether-luméfántrine pour la prise en charge des accès simples, l'atovaquone-proguanil étant en troisième position, suivant les recommandations nationales de 2017.

La surveillance post-thérapeutique recommandée pour la prise en charge du paludisme à *Plasmodium falciparum* reste incomplète. En 2018, le suivi thérapeutique à J3-J4 pour vérifier l'efficacité du traitement est effectué dans 1255 (44,2%) des cas. Cependant, les contrôles pour la détection des échecs précoces à J7 +/- 2 ou tardifs à J28 +/- 2 sont réalisés dans seulement 754 (26,6%) et 588 (20,7%) des cas respectivement.

Sur le plan de l'efficacité et de la tolérance des traitements du paludisme importé, le nombre d'échecs thérapeutiques aux différentes associations antipaludiques en traitement curatif (arténimol-pipéraqúine, artémether-luméfántrine, atovaquone-proguanil) est en diminution par rapport aux années précédentes mais justifient cependant la recommandation des contrôles post-thérapeutiques tardifs (J28) pour ces médicaments à longue demi-vie d'élimination.

Summary

Data from the *CNR du Paludisme*, the French National Reference Center for imported malaria show the adherence of the members of the metropolitan France network to the organization and operation of the *CNR du Paludisme* since in 2018, the transmission of data and samples has remained at a high level.

In 2018, a total of 2,843 cases of malaria were reported to the *CNR du Paludisme* (the French National Reference Center for Malaria) by correspondents of the metropolitan network. Three were indigenous cases (2 were probable airports malaria and one was classified as cryptic). The number of imported malaria cases has been estimated at 5,550 for Metropolitan France as a whole, up 6.3% from 2017. As in recent years, the contamination was still predominantly located in sub-Saharan Africa 2,742 (97.9% of cases). The cases occur mainly in subjects of African origin (85.5%), residing in France or arriving from Africa, a 2.7 increase compared to 2017 (82.8%). The species diagnosed in the majority was *P. falciparum* (86.5%), slightly lower than in 2017 (88.2%). Three patients were infected with *Plasmodium knowlesi*, two after a trip to Thailand and one after a trip to many countries in Asia (5 *P. knowlesi* imported malaria reported since 2010).

The number and proportion of severe malaria remains high, 353 (12.4%) a 2 point down compared to 2017 (367, 14.4%). A total of 11 deaths was reported, fatality case of 0.39% of all cases and 3.1% of severe malaria, slightly down from 2017. Treatment with intravenous artesunate, recommended by the High Council of Public Health in 2013², is the most prescribed treatment for severe cases (81.2% of cases) stable compared to 2017.

² <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=310>

The 4 main endemic countries visited, which account for more than 60% of cases, are Côte d'Ivoire (n = 790, + 3.5%), Cameroon (n = 565, -0.5%), Guinea (n = 186, -1.1%) and Mali (n = 170, + 19.7%). In 2018, there were 56 cases of imported malaria returning from the Comoros, compared to 12 cases reported in 2017. In addition, 1 severe case, in a 10-year-old child living in Mayotte on a trip to mainland France, was reported this year (none in 2017). The epidemic that seemed to be under control in the archipelago worries again.

The year 2018 showed a high level of malaria imported cases in metropolitan France. Severe cases and deaths were stable. Subjects of African origin were by far the majority in the distribution of cases. Malaria cases from the Comoros were worryingly increasing.

The data on the evolution of antimalarial resistance in 2018 are without particularity compared to the previous year's justifying the recommendations of chemoprophylaxis for malaria, in adequacy with the international recommendations. No increase in resistance to atovaquone-proguanil is observed and *in vitro* sensitivities to lumefantrine, piperazine and dihydroartemisinin remain high. The average susceptibility of isolates to chloroquine continues to rise due to the decline in selective pressures in Africa. There was no evidence of mutations associated with artemisinin resistance in the imported malaria isolates tested. In 2018, chemoprophylaxis is only alleged by the patient in 23.7% of cases. Non-compliance with prevention recommendations remains at the root of most of the imported malaria cases studied.

In terms of the diagnosis and management of imported malaria, the PCR alone or combined with other methods is becoming increasingly important as a sensitive diagnostic method used in 37% of diagnoses.

The dihydroartemisinin-piperazine combination has become the first line of therapy followed by artemether-lumefantrine and atovaquone-proguanil for the management of simple malaria access.

The post-therapeutic surveillance recommended by the 2018 update of the 2007 revision of the 1999 consensus conference for the management of *Plasmodium falciparum* malaria remains incomplete. In 2018, therapeutic follow-up on D3-D4 to verify the effectiveness of treatment is carried out in only 44.3% of cases.

In terms of the efficacy and safety of imported malaria treatments, the few therapeutic failures of dihydroartemisinin-piperazine, artemether-lumefantrine and atovaquone-proguanil, in curative treatment prompt the recommendation of late post-treatment controls (D28) for these drugs with a long elimination half-life.

Pôle Zones endémiques

Pour une vision globale des activités conduites en 2018, se référer au bulletin de rétro-information en annexe 7 de ce rapport. En 2018, l'exhaustivité du CNR paludisme pour les isolats de Guyane s'est maintenue à un niveau élevé, 77,1%. Le nombre de cas observée en 2017 était sensiblement le même qu'en 2018 avec 546 cas recensés par la Cire Guyane. Le niveau de participation des partenaires du CNR à la surveillance reste très satisfaisant et est maintenue à ce niveau grâce à une animation constante du réseau.

Le niveau de sensibilité *in vitro* aux antipaludiques a pu être étudié chez 28 isolats. Les activités de phénotypage en 2018 se sont concentrées sur un rattrapage du retard accumulé en 2017. Faute de temps, aucune évaluation de la sensibilité aux artémisinines et à la pipérazine grâce au test de survie n'a été effectuée. Les résultats ont montrés que le niveau de sensibilité des plasmodies aux antipaludiques actuellement recommandés en Guyane est satisfaisant. En 2018, les activités se sont comme en 2017 concentrées sur la deuxième campagne de dépistage actif PALUSTOP réalisée sur la commune de St Georges de l'Oyapock entre septembre et décembre 2018. L'objectif de cette campagne était de comparer l'impact de la première campagne suivi d'un traitement systématiquement des porteurs, y compris asymptomatiques, sur la transmission du paludisme. Les résultats obtenus lors de la campagne 2017 sont détaillés dans le paragraphe dédié de ce rapport. En plus de cet axe, le projet ELIMALAR inclut un axe visant à mieux comprendre la résistance aux artémisinines et à ses molécules partenaires dans la zone, REAGIR. En lien étroit avec l'OMS, cet

axe nous a permis de confirmer la circulation de parasites résistants aux artémisinines au Guyana et plus particulièrement dans la Région 1 où 8,8% de parasites mutants C580Y au niveau du gène *pfk13* ont pu être observés. Une étude d'efficacité thérapeutique est actuellement en cours sur site pour évaluer leur impact sur l'efficacité de l'artéméther/luméfantrine. *A priori*, l'efficacité ne devrait pas être modifiée car la luméfantrine ne montre aucun signe de défaillance.

En 2018, la pertinence du TDR SD Bioline® Pf/Pv a été évaluée et comparée aux résultats de la microscopie corrigés par PCR en temps réel. Sur 70 isolats analysés, le TDR SD Bioline® Pf/Pv a permis de détecter une infection mixte dans 62,8% des cas. Cependant des défauts de diagnostic ont été signalés par l'Hôpital de Cayenne au sujet du test SD Bioline® Pf/Pan actuellement utilisés et un changement de kit est envisagé 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.

En 2018 l'OMS a renouvelé sa confiance au laboratoire et l'a re-désigné Centre Collaborateur pour une période quatre ans. Ses activités se déploient à l'échelle amazonienne autour du génotypage des marqueurs de résistance et d'efficacité des tests de diagnostic rapide. Les activités de conseils et d'expertises dans ce cadre restent également denses.

For a global view of the activities conducted in 2018, refer to the feedback bulletin in annex 7 of this report.

In 2018, the completeness of Malaria NRC for endemic area regarding isolates from French Guiana remained at a high level, 77.1%. The number of cases observed in 2017 was roughly the same as in 2018 with 546 cases recorded by the Cire Guyane. The level of participation of the CNR partners in the monitoring remains very satisfactory and is maintained at this level thanks to constant animation of the network.

The level of *in vitro* susceptibility to antimalarial drugs has been studied in 28 isolates. Phenotyping activities in 2018 focused on catching up the accumulated delay in 2017. Due to lack of time, no assessment of artemisinin and piperaquine sensitivity using the survival test was conducted. The results showed that the level of susceptibility of malaria parasites to antimalarial drugs currently recommended in French Guiana is satisfactory. In 2018 as in 2017, activities focused on the second PALUSTOP active screening campaign conducted in the municipality of St Georges de l'Oyapock between September and December 2018. The aim of this campaign was to compare the impact of the first campaign followed by systematic treatment of carriers, including asymptomatic, on transmission. The results obtained during the 2017 campaign are detailed in the dedicated section of this report. In addition to this axis, the ELIMALAR project includes an axis aimed at better understanding the resistance to artemisinins and its partner drug on the Guiana Shield, REAGIR. In close collaboration with WHO, this axis allowed us to confirm the circulation of artemisinin-resistant parasites in Guyana and more particularly in Region 1 where 8.8% of *pfk13* C580Y mutant parasites were observed. A therapeutic efficacy study is currently being conducted on site to evaluate the impact of this mutation on the efficacy of artemether/lumefantrine. Normally, efficiency should not be changed as no sign of resistance is observed for lumefantrine.

In 2018, the performances of TDR SD Bioline® Pf/Pv was evaluated and compared to real-time PCR results. Of 70 analyzed samples, SD Bioline® Pf/Pv was able to detect a mixed infection in 62.8% of cases. However, defects in terms of sensibility of the actual RDT SD Bioline® Pf/Pan have been reported by the Cayenne Hospital. A new kit should be implemented in 2019 with a better sensitivity to detect *P. vivax*, nowadays the major specie in French Guiana, 89.38% of cases.

In 2018, WHO re-designated the laboratory as WHO Collaborating Center for a period of four years. Its activities include genotyping of molecular markers for resistance and of genes correlated with rapid diagnostic test efficiency. Consulting and expertise activities in this area also remain dense.

Table des matières

Table des figures.....	9
Table des tableaux.....	10
1. Missions et organisation du CNR.....	11
1.1. Pôle Zones non endémiques	11
1.2. Pôle Zones endémiques	11
2. Activités d'expertise	12
2.1. Évolutions des techniques	13
2.1.1. Pôle Zones non endémiques.....	13
2.1.2. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane	14
2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees	14
2.2.1. Pôle Zones non endémiques.....	14
2.2.2. Pôle Zones Endémiques	14
2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	14
2.4. Collections de matériel biologique	15
2.4.1. Pôle Zones non Endémiques	15
2.4.2. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane	15
2.5. Activités d'expertise	15
2.5.1. Pôle Zones non Endémiques	15
2.5.2. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane	16
2.6. Activités de séquençage	17
2.6.1. Pôle Zones non Endémiques	17
2.6.2. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane	17
3. Activités de surveillance.....	19
3.1. Description du réseau de partenaires	20
3.1.1. Pôle Zones non Endémiques	20
3.1.2. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane	22
3.2. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections.....	25
3.2.1. Pôle Zones non Endémiques	25
3.2.1.1. Estimation du nombre de cas totaux et tendances évolutives	26
Attitude prophylactique.....	33
3.2.1.2. Paludisme de la femme enceinte	34
3.2.1.3. Efficacité thérapeutique	34
3.2.2. Distribution des cas de paludisme aux Antilles et à la Réunion	36
3.2.3. Distribution des cas de paludisme à Mayotte	36

3.2.4.	Paludisme grave en 2018.....	36
3.2.4.1.	Cas graves déclarés dans la base CNR du Paludisme en 2018	36
3.2.5.	Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane	39
3.3.	Surveillance de la résistance de <i>P. falciparum</i> aux antipaludiques	40
3.3.1.	Chimiosensibilité de <i>P. falciparum</i> d'importation.....	40
3.3.1.1.	Chimiosensibilité <i>in vitro</i>	40
3.3.1.2.	Génotypage des isolats	43
3.3.1.2.1.	La mutation 76 du gène <i>pfcr1</i> : résistance à la chloroquine	43
3.3.1.2.2.	La mutation du gène <i>pfcytb</i> : résistance à l'atovaquone.....	43
3.3.1.2.3.	La mutation du gène <i>pfmdr1</i> : résistance à la méfloquine et à la luméfantine	43
3.3.1.2.4.	Les mutations du gène <i>pfdhfr</i> : résistance aux antifoliques	43
3.3.1.2.5.	Polymorphisme du gène K13-propeller	44
3.3.1.2.6.	Evolution des génotypes en 2018.....	44
3.3.2.	Surveillance des résistances de <i>P. falciparum</i> aux antipaludiques en Guyane	44
3.3.3.	Surveillance des résistances de <i>P. falciparum</i> aux antipaludiques à Mayotte.....	45
3.4.	Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	46
3.4.1.	Contribution à la surveillance du paludisme autochtone	46
3.4.2.	Contribution à la surveillance du paludisme d'importation	46
3.4.3.	Contribution à la surveillance du paludisme endémique	46
3.4.4.	Contribution à la surveillance internationale en tant que Centre Collaborateur de l'OMS pour la surveillance des résistances aux antipaludiques qu'est le laboratoire de parasitologie.....	46
3.5.	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	47
3.5.1	ELIMALAR / PALUSTOP	47
3.5.1.	Mise en place d'un laboratoire de chimiosensibilité <i>in vitro</i> à l'Hôpital Principal de Dakar (Sénégal) et évaluation du niveau de résistance aux antipaludiques au Sénégal.....	49
3.5.2.	Surveillance de la résistance aux antipaludiques au Congo et au Gabon.....	49
3.5.3.	Evaluation du paludisme en Mauritanie	50
3.5.4.	Evaluation de kits de tests de diagnostic rapide (TDR) du paludisme.....	50
3.5.5.	Impact du polymorphisme des séquences codantes des protéines HRP2/HRP3 sur les performances des TDR.....	50
3.5.6.	Tendances épidémiologiques de l'incidence du paludisme d'importation en France métropolitaine, 1996-2016.....	51
4.	Alerte	52
4.1.	Pôle Zones non Endémiques	52
4.2.	Phénomènes ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte	52
4.3.	Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane.....	52
5.	Activités de rétro-information, de formation et de conseil	53

5.1.	Conseil et expertise aux professionnels de santé	53
5.1.1.	Pôle Zones non endémiques.....	53
5.1.2.	Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane	53
5.2.	Conseil et expertise aux autorités sanitaires	54
5.2.1.	Pôle Zones non Endémiques	54
5.2.2.	Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane	54
5.3.	Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public...)	55
5.3.1.	Pôle Métropole	55
5.3.2.	Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane	55
6.	Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	57
6.1.1.	Pole Zones non Endémiques	57
6.1.1.1.	Identification et validation de nouveaux marqueurs moléculaires de résistance à la pipéraquline.....	57
6.1.1.2.	Criblage de nouveaux composés potentiellement antipaludiques (<i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>) et développement de nouveaux antipaludiques	57
6.1.1.3.	Evaluation du Ridaquick® Malaria dans le diagnostic du paludisme d'importation. 57	
6.1.1.4.	<i>Plasmodium simium</i> : une nouvelle espèce émergente au Brésil ?.....	58
6.1.1.5.	Evaluation de l'activité <i>in vitro</i> d'extraits de plantes quinéennes sur <i>P. falciparum</i> 59	
6.1.1.6.	Evaluation de l'activité <i>in vitro</i> d'extraits de plantes chiliennes sur <i>P. falciparum</i> 59	
6.1.1.7.	MALAKIT : Autotest et auto-traitement visant à améliorer la situation du paludisme chez les personnes vivant dans des zones éloignées de l'offre de soins.....	60
6.2.	Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	60
6.2.1.	Publications nationales.....	60
6.2.2.	Publications internationales.....	61
6.2.3.	Communications nationales	62
6.2.4.	Communications internationales	63
6.2.4.1.	Orales.....	63
6.2.4.2.	Affichées.....	63
6.2.5.	Conférences sur invitations	64
7.	Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux.....	64
8.	Programme d'activité pour les années suivantes	65
	Références bibliographiques	66

Table des figures

Figure 1. Nombre d'isolats reçus au Pôle Zones endémiques en provenance du plateau des Guyanes, entre 2012 et 2018.....	13
Figure 2 : Recrutement et exhaustivité atteints entre 2006 et 2017 par le Pôle Zones endémiques.	19
Figure 3 : Niveau de sensibilité <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> envers dix molécules testés en 2018 en comparaison avec les données antérieures disponibles.	20
Figure 4 : Distribution des cas de paludisme déclarés par les correspondants du réseau du CNR du Paludisme en France métropolitaine en fonction des trois grands profils épidémiologiques pour l'année 2018.	21
Figure 5. Réseau de partenaires guyanais.....	22
Figure 6. Carte du risque de paludisme en Guyane, mars 2018.....	24
Figure 7. Carte de l'île de Mayotte.	25
Figure 8 : Evolution du paludisme d'importation, cas déclarés, cas estimés et nombre de voyageurs vers les zones impaludées, France métropolitaine 1996 à 2018.	26
Figure 9 : Evolution de taux d'incidence (pour 1000 voyageurs) et de mortalité (pour 100000 voyageurs) du paludisme d'importation en France métropolitaine 1996 à 2017.	27
Figure 10 : Distribution mensuelle des cas de paludisme à <i>P. falciparum</i> déclarés par le réseau des correspondants du CNR du paludisme, France métropolitaine, année 2018, n = 2452.....	28
Figure 11 : Evolution annuelle des proportions de paludisme d'importation des sujets d'origine africaine (en rouge) et caucasienne (en bleu) entre 1996 et 2018.	29
Figure 12 : Répartition des cas de paludisme importés par âge et par sexe en fonction de l'origine africaine ou caucasienne, CNR du paludisme, France métropolitaine, année 2018, n = 2840.	29
Figure 13 : Répartition des espèces par continent n=2799, France métropolitaine 2018. Autres = <i>P. vivax</i> 13 cas (0,4 %) ; <i>P. spp</i> 7 (0,2 %) cas et infections mixtes 60 (2,3 %) cas.....	31
Figure 14 : Répartition des cas en fonction de l'état clinique, CNR du Paludisme, année 2018, n = 2 698.....	37
Figure 15 : Évolution des cas graves de paludisme d'importation en France de 2000 à 2018.....	37
Figure 16 : Taux d'utilisation de l'Artésunate IV vs. Quinine IV en première intention dans le traitement du paludisme grave d'importation en France 2011-2018.....	38
Figure 17 : Évolution de la létalité globale chez les patients avec un accès grave de 2000 à 2018. ...	39
Figure 18. Evolution du nombre de paludisme en Guyane entre 2008 et 2019.....	40
Figure 19 : Répartition croisée des CI ₅₀ de la DHA et de la pipéraquline.	41
Figure 20 Répartition croisée des CI ₅₀ de la DHA et de l'amodiaquine.	42
Figure 21 : Répartition des CI ₅₀ de l'amodiaquine entre les géotypes sauvages et mutés en position 86 du gène Pfmdr1.	42
Figure 22 : Taux de survie observés entre 2013 et 2018 auprès de 135 isolats.	45
Figure 23. Stratégie de lutte contre le paludisme dans une région en fonction du niveau de transmission.	47

Table des tableaux

Tableau 1. Activités d'expertise réalisées en 2018 en lien avec le nombre d'isolats reçus.	16
Tableau 2. Partenaires actifs du Pôle Zones endémiques en Guyane: localisation, fréquence des liaisons avec Cayenne et niveau de participation à la surveillance biologique du paludisme en 2018.	23
Tableau 3 : Cas déclarés et cas estimés de paludisme en France métropolitaine, tendances évolutives 2013 -2018	26
Tableau 4 : Répartition des hommes et des femmes en fonction des tranches d'âge pour la population totale, France métropolitaine, année 2018, n = 2840.....	28
Tableau 5 : régions de contamination des cas déclarés en 2018 comparés à 2017	30
Tableau 6 : Délai d'apparition des symptômes (en jours) en fonction de l'espèce plasmodiale pour l'année 2018, n = 2 164.	32
Tableau 7. Délai diagnostic (en jours) en fonction de l'espèce plasmodiale pour l'année 2018, n = 2282.....	32
Tableau 8. Cas à <i>Plasmodium falciparum</i> seul, caractéristiques de la parasitémie en fonction de l'état clinique, de l'âge et de la zone d'origine en 2018.	32
Tableau 9 : Traitement curatif en première intention des accès palustres de l'enfant de moins de 15 ans, France métropolitaine, année 2018, n=303.	33
Tableau 10 : Traitement curatif en première intention des accès palustres des sujets de plus de 15 ans, France métropolitaine, année 2018, n=2186.	33
Tableau 11 : Molécules utilisées en chimioprophylaxie en fonction de l'observance déclarée pour les cas à <i>Plasmodium falciparum</i> en 2018 (n=408)	34
Tableau 12. Efficacité thérapeutique jugée sur la présence de formes asexuées dans le sang lors des contrôles programmés à J3-J4 ; J7 +/-1 et J28 +/-2 pour la population totale en 2018.....	35
Tableau 13 : seuils de chimiosensibilité et répartition des isolats testés en fonction de leur CI50 aux antipaludiques	41

1. Missions et organisation du CNR

L'organisation du CNR du paludisme en 4 laboratoires, (un laboratoire coordonnateur et 3 laboratoires associés (Annexe 1), répartis en 2 pôles, le pôle « zones non endémiques » et le pôle « zones endémiques » n'est pas différente pour l'année 2018 par rapport à l'année précédente.

1.1. Pôle Zones non endémiques

Les annexes ont été mises à jour concernant les équipes du laboratoire coordonnateur, les locaux du laboratoire associé de l'IRBA et les collections. Par rapport au rapport de 2018, les évolutions intervenues au niveau du CNR Paludisme concernent le personnel du laboratoire coordonnateur qui a été réduit (moins 1 ingénieur de recherche) en raison de la diminution des crédits alloués au fonctionnement.

La démarche d'accréditation suit la norme internationale homologuée NF EN ISO 15189. Cette norme est la preuve de la compétence technique du laboratoire. L'unité de parasitologie du laboratoire de l'hôpital Bichat a été accréditée pour le diagnostic du paludisme, complétant ainsi les examens accrédités dans le laboratoire.

L'unité de parasitologie du laboratoire 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...) dont le diagnostic du paludisme (Goutte épaisse, Frottis sanguin mince, mesure de la parasitémie, biologie moléculaire plus le TDR), attestation d'accréditation N° 8-3253 rév. 9.

L'unité de recherche Parasitologie et entomologie (UPE) 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 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.

1.2. Pôle Zones endémiques

Les annexes ont été mises à jour concernant l'équipe et la taille des collections.

2. Activités d'expertise

Pôle Zones non Endémiques – Eléments clés

On retrouve en 2018, sur la base sécurisée Internet <https://ssl.voozadoo.net/palu> du CNR du Paludisme :

- 2843 fiches déclarées (dont 3 cas de paludisme autochtone) par 86 hôpitaux (dont 5 militaires), 1 Département d'Epidémiologie et de Santé Publique (DESP)

- 2526 isolats associés aux déclarations transmis au CNR du paludisme dont 2070 au laboratoire coordonnateur, 527 au laboratoire associé de la Pitié-Salpêtrière et 456 au laboratoire associé de l'IRBA, par les hôpitaux correspondants du CNR qui participent à l'expertise biologique des isolats des *Plasmodium sp.*

De plus, en 2018, le laboratoire coordonnateur de Bichat a reçu 250 prélèvements sanguins, non associés à une déclaration épidémiologique d'un cas de paludisme dont 7 prélèvements transmis par l'Etablissement Français du Sang dans le contexte de la prévention du paludisme transfusionnel (PCR négatives pour qualifier un donneur à risque). Sur les prélèvements reçus, 931 PCR d'espèce ont été réalisées dont 54 ont permis d'exclure un accès palustre et de confirmer 73 diagnostics portés uniquement sur un résultat de biologie moléculaire positif.

En 2018, l'analyse des échecs thérapeutiques aux ACT avec en corollaire, la recherche de nouveaux marqueurs moléculaires associés a été développée ainsi que la confirmation d'espèce plasmodiale (ou l'exclusion d'un accès palustre) associée au développement des techniques moléculaires dans les laboratoires d'analyse médicale privés ou hospitaliers.

Sur les prélèvements transmis, les laboratoires de Bichat et de l'IRBA ont réalisé 1024 génotypages pour l'étude des résistances aux antipaludiques et 430 phénotypages pour l'étude de la sensibilité aux antipaludiques. Le laboratoire de la Pitié a réalisé, sur 527 échantillons de 423 patients (340 avec un accès grave rapporté), le contrôle des parasitémies et la mesure des érythrocytes pîttés pour le dépistage de l'anémie retardée chez 250 patients traités par artésunate intraveineux.

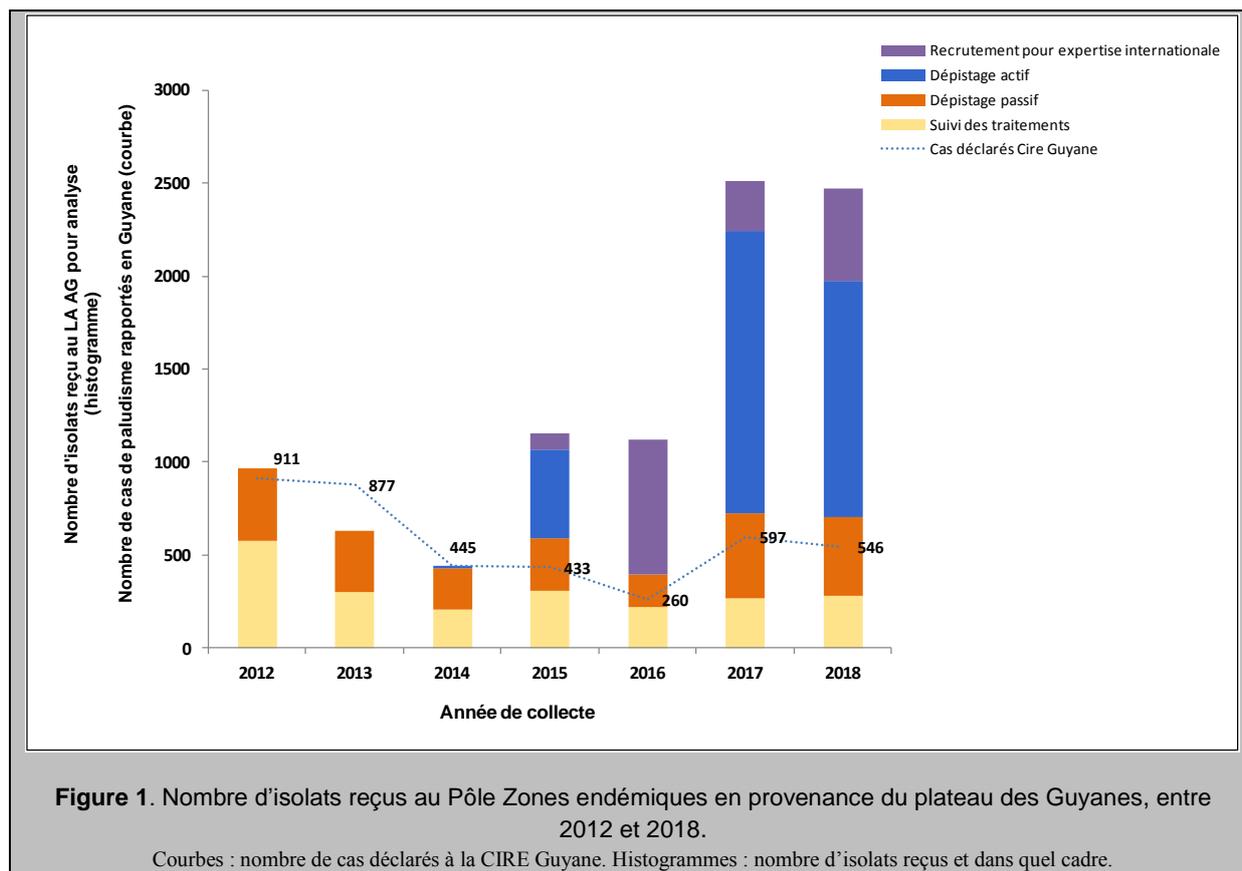
Trois cas de paludisme autochtone ont fait l'objet d'une déclaration obligatoire (DO) en France métropolitaine. Ils ont été explorés en relation avec l'agence de Santé Publique France.

Pôle Zones Endémiques – Eléments clés

Tout comme 2017, l'activité globale 2018 a été très soutenue (**Figure 1**) avec la poursuite de la campagne de dépistage actif menée sur la commune de St Georges de l'Oyapock auprès de 1246 personnes. Côté recherche opérationnel, des analyses ont également été effectuées dans le cadre du projet Malakit visant à former les orpailleurs à l'utilisation de kits d'auto-diagnostic et d'auto-traitement.

En 2018, les activités internationales se sont poursuivies dans l'objectif d'étudier l'impact des mutations *pfk13* sur l'efficacité thérapeutique de l'artéméther-luméfantrine au Guyana.

Pour la surveillance des cas de paludisme à Mayotte, les activités d'expertise sont assurées par le laboratoire de l'IRBA à Marseille.



2.1. Évolutions des techniques

2.1.1. Pôle Zones non endémiques

Le laboratoire coordonnateur de Bichat a validé et mis en place l'évaluation du nombre de copies du gène de la thioredoxine³.

Le laboratoire associé de la Pitié-Salpêtrière, pour repérer plus efficacement et concentrer les globules rouges parasités et les globules rouges pîtés, a :

- mis au point une méthode de concentration des globules rouges parasités et des globules rouges pîtés par l'action de la streptolysine O, permettant leur analyse fonctionnelle par différentes méthodes dont l'électrophysiologie (collaboration avec les équipes de Pierre Buffet Inserm-UPD GR-EX et Stéphane Egée CNRS-UPMC GR-Ex, travail de Master 2 de Ilhame Tantaoui dirigée par Alioune N Dour et Marc Thellier)
- développé une méthode microscopique permettant d'augmenter la résolution des microscopes optiques grâce à la technique de ptychographie de Fourier qui utilise le contrôle de l'éclairage et le post-traitement informatique des images (Travail de Ilhame Tantaoui, Renaud Piarroux et Marc Thellier en collaboration avec Jacques Klossa et la société Tribvn)

Le laboratoire associé de Marseille a mis en place :

- de nouvelles techniques pour identifier et valider de nouveaux marqueurs moléculaires potentiellement impliqués dans la résistance aux antipaludiques (gènes *pfcr1*, *pfmdr5*, *pfmdr6*, exonucléase, RING E3 ubiquitin protein ligase, *pfact*, *pfugt*, *pfcarl*, ...).

³<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29538461>

2.1.2. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

En 2018, le pôle zone endémique a mis en place la technique lui permettant d'évaluer le nombre de copie des gènes de la plasmepsine 2 et 3 par PCR en temps réel en lien avec la résistance à la pipéraquline en Asie du sud (Witkowski et al., 2017⁴),

2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

2.2.1. Pôle Zones non endémiques

Le laboratoire coordonnateur de Bichat a finalisé l'évaluation d'un test de diagnostic rapide, Rida® Quick malaria, distribué par R Biopharm, qui détecte la PfHRP2 et l'aldolase : les résultats de l'étude ont été présentés au congrès de la RICAI en 2018.

En novembre 2017, la laboratoire associé au CNR de Marseille a été chargé par la Direction centrale du service de santé des armées d'évaluer la performance de différents kits de tests de diagnostic rapide (TDR) pour identifier celui ayant la détection la plus sensible pour les 4 principales espèces afin de les mettre en place en Guyane et en opérations extérieures.

2.2.2. Pôle Zones Endémiques

En 2018, le laboratoire associé a été mandaté par l'ARS pour évaluer la plus-value d'utiliser un test de diagnostic rapide dans les centres délocalisés de prévention et de soins (CDPS) permettant de distinguer les infections mixtes *P. falciparum*/*P. vivax* des infections à *P. falciparum*. 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 cas 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 avons dans notre collection. Il n'en a détecté aucun. Les parasitémies étaient compris 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.

2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Aucune technique n'a été transférée vers d'autres laboratoires à partir d'un des laboratoires du CNR Paludisme.

⁴ Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, Chy S, Kim S, Ke S, Kloeung N, Eam R, Khean C, Ken M, Loch K, Bouillon A, Domergue A, Ma L, Bouchier C, Leang R, Huy R, Nuel G, Barale JC, Legrand E, Ringwald P, Fidock DA, Mercereau-Puijalon O, Arie F, Ménard D. A surrogate marker of piperaquine-resistant Plasmodium falciparum malaria: a phenotype-genotype association study. *Lancet Infect Dis* 2017, **17**:174-183

2.4. Collections de matériel biologique

2.4.1. Pôle Zones non Endémiques

Au laboratoire coordonnateur de Bichat, les isolats parasitaires sont cryopréservés si la quantité de prélèvement reçue le permet. L'état précis de la collection en lien avec les activités du CNR figurent en annexe 1. Les plasmas des prélèvements sanguins reçus sont décantés et conservés à -20°C.

En 2018, la séparation des cellules nucléées des erythrocytes avant extraction a été réalisée pour les échantillons dont le volume était suffisant, afin de disposer d'un matériel parasitaire purifié en vue d'analyses en NGS (new generation sequencing). L'ADN parasitaire est systématiquement extrait et conservé à -20°C. Les mêmes procédures de stockage sont appliquées par le laboratoire associé de Marseille.

Au laboratoire associé de la Pitié-Salpêtrière, le sang total et les plasmas des prélèvements sanguins reçus sont conservés à -20°C. L'ADN parasitaire est lui aussi le plus souvent extrait et conservé à -20°C.

2.4.2. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

Les isolats de *P. falciparum* sont systématiquement mis en culture afin de développer une collection de parasites vivants cryopréservés d'intérêt pour l'étude des mécanismes de résistance et l'identification/validation de marqueurs génétiques de résistance. Le taux de réussite de ces adaptations est de plus de 90%. Ce succès intervient parfois jusqu'à 7 jours après le prélèvement des parasites. Le plus tôt étant bien évidemment le mieux. Ainsi en 2018, 43 isolats de *P. falciparum* ont été adaptés à la multiplication *in vitro* (J0, jour de suivi et doublon inclus). L'état précis de la collection en lien avec les activités du CNR figurent en annexe 1.

En 2018, des ADN issus d'isolats collectés au Guyana en 2016 et 2017 ont été partagés dans le cadre de collaboration visant à mieux comprendre l'émergence de la résistance à l'artémisinine en Amérique du Sud (collaboration avec le laboratoire de D. Neafsey de l'Université Harvard à Boston).
Activités d'expertise

2.5. Activités d'expertise

2.5.1. Pôle Zones non Endémiques

En 2018, le Pôle Zones non endémiques a reçu 2526 isolats de patients impaludés transmis par les correspondants hospitaliers. Parmi ces isolats, on a confirmé 2059 infectés par *P. falciparum*, 50 par *P. vivax*, 144 par *P. ovale*, 68 par *P. malariae*, 3 par *P. knowlesi*.

En 2018, 430 tests *in vitro* de chimiosensibilité ont permis d'évaluer la sensibilité des isolats de *P. falciparum* aux antipaludiques : chloroquine, amodiaquine, pipéraquline, méfloquine, quinine, dihydroartémisinine, pyronaridone, doxycycline.

Les études de génotypage ont portées sur 1024 isolats pour lesquels au moins un marqueur moléculaire de résistance a été analysé:

- l'étude du gène *pfcytb*, impliqué dans la résistance à l'atovaquone-proguanil, qui a été réalisée pour 79 isolats de *P. falciparum*,
- l'étude du gène *pfcr*, impliqué dans la résistance à la chloroquine, qui a été réalisée pour 800 isolats de *P. falciparum*,
- l'étude du gène *pfdhfr*, impliqué dans la résistance au proguanil, qui a été réalisée pour 448 isolats de *P. falciparum*,

- l'étude du gène *pfK13*, impliqué dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine, qui a été réalisée pour 962 isolats de *P. falciparum* parmi lesquels un seul isolat (Cambodge) présentait une mutation associée à la résistance aux dérivés de l'artémisinine (C580Y).

Excepté les PCR diagnostiques d'espèce dont les résultats sont communiqués aux prescripteurs dans un délai maximum de sept jours, les autres analyses font l'objet d'analyses groupées au cours de l'année dans l'objectif d'un suivi épidémiologique des tendances. Des analyses par dossier peuvent se faire en cas d'échec thérapeutique mais pas à visée de prise en charge compte-tenu des délais d'obtention des résultats, sauf en cas de sollicitation du clinicien et si les résultats sont disponibles. Les résultats sont accessibles aux correspondants via le serveur sécurisé Voozanoo.

Pour la mesure des hématies pîtées, l'analyse est incluse dans la routine du laboratoire, les tests sont réalisés de 1 à 3 fois par semaine en fonction du nombre d'isolats à tester (N=527 en 2018). Le délai moyen de rendu d'un résultat est de 5 jours. Ces résultats doivent pouvoir être exploités par les cliniciens pour adapter le suivi des patients avec un accès grave traités par artésunate intraveineux (N=250 en 2018).

2.5.2. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

En 2018, le Pôle Zones endémiques a reçu 421 isolats de patients impaludés en provenance de 14 partenaires (Tableau 1). Parmi ces isolats, on en dénombrait 42 infectés par *P. falciparum*, 378 par *P. vivax*, 2 co-infectés par *P. falciparum* et *P. vivax* et un cas à *P. ovale* importé du Bénin. Ont également été reçus, 12 isolats négatifs. Ainsi un très bon niveau d'exhaustivité se maintient à 77,11% (n=421/546).

Au-delà de ces isolats « J0 » reçus dans le cadre du dépistage passif, le laboratoire a également reçu en 2018, 404 prélèvements dans le cadre du suivi de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques conduite en partenariat avec le CHAR et le service de santé des armées.

Sur cette période, le nombre de cas de paludisme déclarés à la suite d'un diagnostic passif de paludisme est sensiblement similaire à celui de 2017 (546 vs 597 en 2017). Onze demandes d'expertise diagnostique par PCR en temps dans le cadre du dépistage passif ont été demandées.

Tableau 1. Activités d'expertise réalisées en 2018 en lien avec le nombre d'isolats reçus.

Activité d'expertise	Provenance	2018	Activités et analyses conduites sur les échantillons
Dépistage passif	Partenaires guyanais	42 <i>Pf</i>	Phénotypage (isotopique, RSA/PSA)
		2 <i>Pf/Pv</i>	Génotypage (<i>pfcytb</i> , <i>pfK13</i> , <i>pfhrp</i>)
	378 <i>Pv</i>	Etudes ponctuelles concurrent à la surveillance	
	9 ND	PCR diagnostique	
Demande d'expertise diagnostique	CNR Paludisme	11 ND	PCR diagnostique pour des dossiers compliqués
	Projet Malakit	22 ND	Analyse discordances diagnostique par PCR
Suivi efficacité thérapeutique		404 <i>Pf</i> et/ou <i>Pv</i>	Variable en fonction des dossiers (génotypage, dosage plasmatique, phénotypage)
Dépistage actif	Palustop 2	1246 ND	Dépistage actif par PCR + étude CAP
Expertise internationale	Guyana	318 <i>Pf</i>	Génotypage <i>pfK13</i> et <i>pfhrp</i>
	Venezuela	36 <i>Pf</i>	

CAP : Connaissances, Attitudes et Pratiques ; ND : Non Déterminé ; PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne (Polymerase Chain Reaction) ; *Pf* : *Plasmodium falciparum* ; *pfcytb* : gène codant le cytochrome *b* en lien avec la résistance à l'atovaquone-proguanil ; *pfhrp* : gènes codant les protéines riches en histidine 2 et 3 en lien avec la détection de *Pf* par certains tests de diagnostic rapide ; *pfK13* : gène codant pour la Kelch protéine en lien avec la résistance aux artémisinines ; *Pv* : *Plasmodium vivax*.

En 2018, 44 tests *in vitro* de chimiosensibilité ont été effectués pour les isolats de 2018 mais une activité importante de l'année a été dédiée au rattrapage du retard accumulé en 2017. Ainsi 35 tests ont été réalisés en plus sur les isolats de 2017 permettant d'en phénotyper 25 de plus. Le pourcentage de succès de la méthode est de 70,5% en prenant la luméfantrine comme référence. Ainsi, la chimiosensibilité à onze molécules de 28 isolats de *P. falciparum* collectés en 2018 dans le cadre du dépistage passif a pu être déterminée. Les études de génotypage ont portées sur :

- l'étude du gène *pfcytb*, impliqué dans la résistance à l'atovaquone-proguanil, qui a été réalisée pour 50 isolats de *P. falciparum* parmi lesquels aucun mutant 268 n'a été observé,
- l'étude du gène *pfk13*, impliqué dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine, qui a été réalisée pour 50 isolats de *P. falciparum* parmi lesquels trois étaient ininterprétables et aucun mutés. Cette analyse a également été étendue à 198 isolats en provenance du Guyana et 67 en provenance du Venezuela.

Excepté la PCR diagnostique multiplex qui est rendu au prescripteur dans les cinq jours, les autres analyses ne font pas l'objet d'un rendu de résultat individuel pour le patient mais sont uniquement analysées de manière groupée pour un suivi des tendances. Des analyses par dossier peuvent se faire en cas d'échec thérapeutique en dehors de la prise en charge du patient. En cas de sollicitation du clinicien dans le cadre de la prise en charge nous disposons en général que des résultats de phénotypage.

2.6. Activités de séquençage

2.6.1. Pôle Zones non Endémiques

Pour la surveillance des résistances aux antipaludiques, les recherches des mutations au sein des gènes *pfdhfr*, *pfcyt b*, *pfmdr1* et *K13* sont réalisées par PCR dans le laboratoire coordonnateur du CNR puis séquençage des produits d'amplification obtenus sur la plateforme de génétique de l'hôpital Bichat (Pr C Boileau). Ces analyses moléculaires ont été limitées en 2018, aux isolats pour lesquelles les données d'efficacité *in vivo* ou les phénotypes *in vitro* de sensibilité aux antipaludiques étaient disponibles afin de limiter les coûts de réalisation, et de privilégier l'obtention de données exploitables.

Le laboratoire associé de Marseille possède sa propre plateforme de séquençage (Sanger, analyse de fragments, nombre de copies de gènes) et a accès à la plateforme de séquençage et à l'expertise bio-informatique de l'IHU Méditerranée Infection (WGS, NGS). Suite à une panne d'un des séquenceurs en 2018 et à du personnel en mission en opération extérieure, nous avons externalisé certains échantillons auprès d'une plateforme commerciale (Biofidal, Lyon). En 2018, aucun génome total n'a été séquencé. En 2018, 530 isolats de *P. falciparum* (385 de France, 41 de Mayotte, 57 non CNR, 47 du Sénégal) ont été séquencés pour les gènes *pfcr1*, *pfdhfr*, *pfmdr1*, *pfk13* pour la recherche de résistance dans le cadre de la surveillance et plus de 600 isolats pour l'identification-validation à des fins de recherche de gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux antipaludiques (*pfcr1* (nouvelles mutations), *pfmdr5*, *pfmdr6*, exonucléase, RING E3 ubiquitin protein ligase, *pfact*, *pfugt*, *pfcar1*).

2.6.2. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

Le Pôle Zones Endémiques utilise de plus en plus le séquençage génome entier pour analyser les isolats et leur 32 mégabases de génome répartis en 14 chromosomes. En lien avec les données de phénotypage qu'il génère pour *P. falciparum*, c'est un outil très puissant pour identifier de nouveaux marqueurs de résistance. Le CNR s'est ainsi équipé en matériel de stockage de séquence et est en cours de mise en place d'outils d'analyse simples des séquences générées et tout particulièrement des fichiers « fastq ». Dans un premier temps, l'expertise bioinformatique est réalisée par notre collaborateur, D. Neafsey travaillant à l'Université d'Harvard. Les séquençages réalisés jusqu'alors ont

été faits par le biais de ce collaborateur et par la plateforme à laquelle il a accès, plateforme du Broad Institute, moyennant finances. Les outils d'analyse utilisés sont des outils « maison » développés par le partenaire du fait de son expertise des génomes plasmodiaux. Une partie des fichiers « fasq » sont disponibles au sein du CNR. L'autre partie est encore chez notre partenaire. Ces fichiers sont pour partie rendus publique pour ceux qui ont servis à étudier le retour de sensibilité à la chloroquine. Pour le reste, ils sont encore privés partagés par le CNR et son partenaire.

Ce séquençage mis en place vise à répondre *in fine* à des questions de recherche en santé publique avec pour philosophie, que les activités de recherche et de santé publique s'éclairent l'une l'autre. Sont ainsi abordé grâce à ces analyses de génome entier :

- La recherche d'un marqueur de résistance à la pipéraquline,
- L'analyse de l'évolution de la diversité génétique de *P. falciparum* en Guyane en fonction des pressions médicamenteuses et de l'intensité de transmission (investigation de l'endémie guyanaise),
- L'analyse du fond génétique « Plateau des Guyanes » actuellement présent pour voir si les marqueurs génétiques en lien avec l'émergence de la résistance aux artémisinines en Asie du Sud Est sont les mêmes dans notre zone
- L'analyse d'isolats mutés en *pfk13* afin de déterminer le nombre de points d'émergence et la dynamique de dispersion de la résistance.

3. Activités de surveillance

Pôle Zones non Endémiques – Eléments clés

Les activités de surveillance concernant la France hors Guyane montrent une augmentation de 4,4% du nombre de cas déclarés par rapport à 2017, à correspondants constants (2843 vs 2721), soit une augmentation du nombre total de cas estimés de + 6,3% (5550 vs 5222).

Le niveau de sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux antipaludiques reste stable et les thérapeutiques recommandées par la mise à jour 2017 de la conférence de consensus de 2009 sont adaptées. Des échecs thérapeutiques tardifs aux ACT sont observés sans être associés à une résistance des parasites à l'artémisinine. L'absence de respect des recommandations prophylactiques reste le facteur de risque principal de développer un accès palustre.

Pôle Zones Endémiques – Eléments clés

L'ensemble des activités de surveillance concernant la Guyane sont résumées dans le bulletin de rétro-information de l'année 2018 figurant en annexe.

Le niveau d'exhaustivité du Pôle Zones Endémiques par rapport au nombre de cas déclarés en Guyane reste très bonne 77,11%.

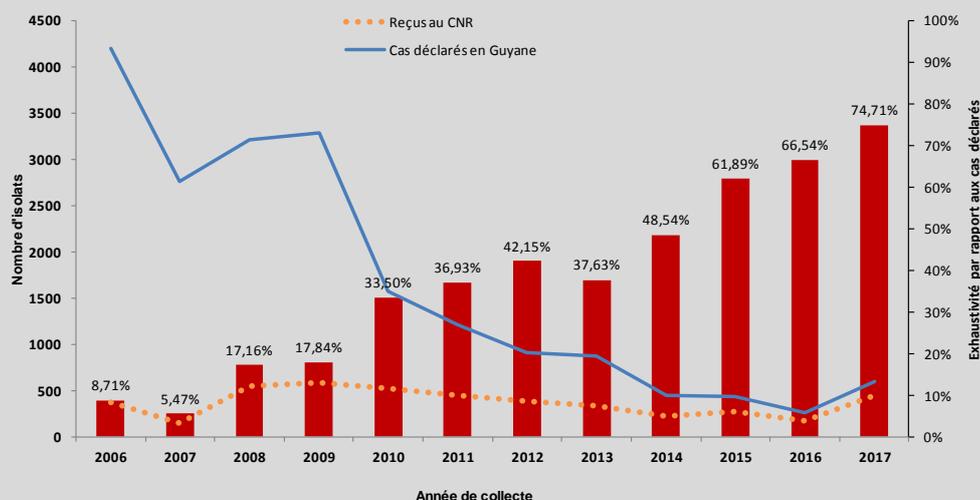


Figure 2 : Recrutement et exhaustivité atteints entre 2006 et 2017 par le Pôle Zones endémiques. Courbe pleine : nombre de cas déclarés à la Cire Guyane ; pointillée : nombre d'isolats reçus. Histogramme : proportion d'isolats collectés en fonction du nombre de cas déclarés à la Cire Guyane.

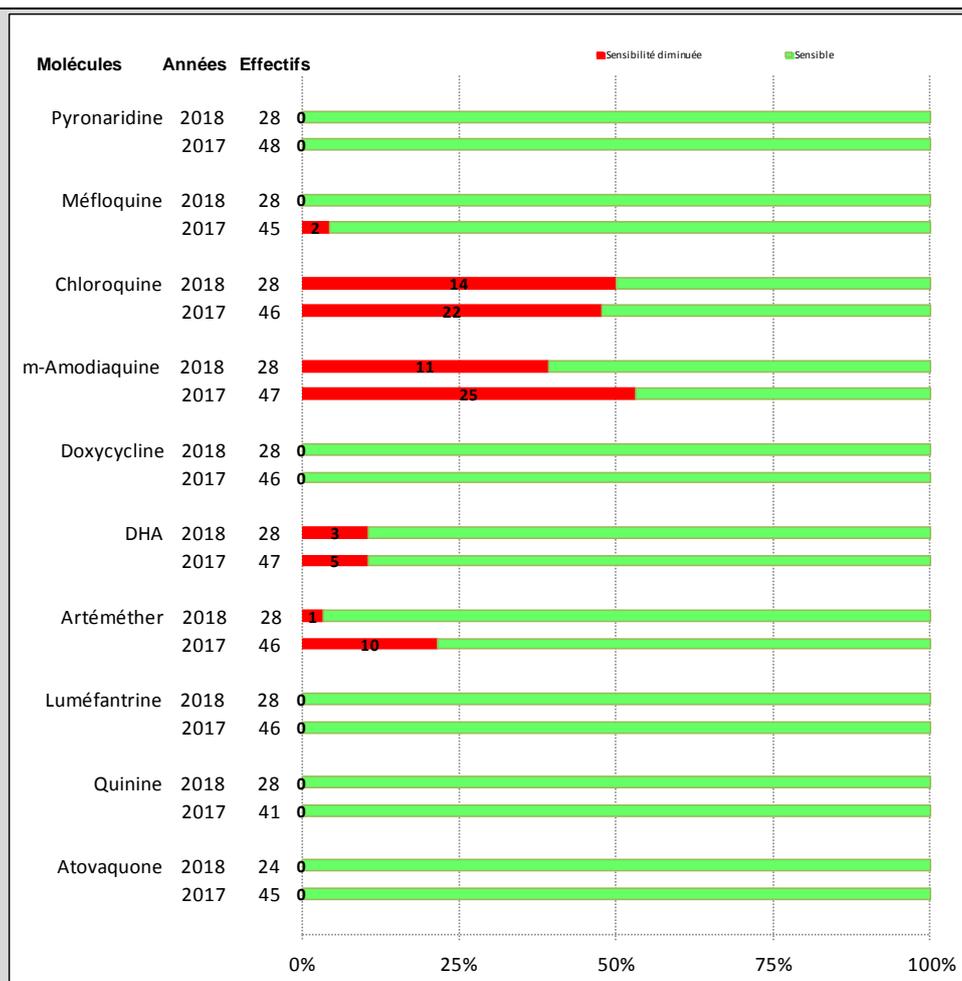


Figure 3 : Niveau de sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* envers dix molécules testées en 2018 en comparaison avec les données antérieures disponibles.

Le niveau de sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux antipaludiques reste stable et les thérapeutiques recommandées par la conférence de consensus de 2002 sont toujours adaptées.

3.1. Description du réseau de partenaires

3.1.1. Pôle Zones non Endémiques

Les correspondants du Pôle Zones non Endémiques (ZNE) sont des correspondants hospitaliers métropolitains ou des départements régions d'outre-mer (DROM) : 86 correspondants réguliers notifient les cas de paludisme sur la base sécurisée Voozanoo : <https://ssl.voozanoo.net/palu/>.

Les correspondants du réseau ont transmis au CNR du Paludisme les isolats qui ont permis la confirmation du diagnostic du paludisme et l'analyse des résistances. Depuis 2018, les cas de paludisme des Antilles françaises, Guadeloupe et Martinique, sont déclarés et les isolats transmis au laboratoire coordonnateur, complétant la surveillance des cas de l'île de la Réunion déjà mis en place.

La représentativité du réseau est stable depuis 2006 entre 52 et 53 % selon les années. Des demandes de participation aux activités du CNR émanent de certaines structures hospitalières ou de laboratoires de biologie médicale privés : la nécessité d'associer les données épidémiologiques aux données biologiques de la déclaration limite cette participation, mais cette obligation est indispensable à l'activité de surveillance du CNR.

Avant analyse des données 2018, les données brutes de la base sont validées par l'identification et le traitement des doublons de déclaration, des doublons de transmission d'échantillons et la correction des incohérences. L'analyse des cas de paludisme d'importation en France, comme à l'habitude, décrit le profil épidémiologique global des cas déclarés, mais distingue également les trois grands profils épidémiologiques habituels, en fonction principalement de l'exposition au risque d'impaludation (durée et type d'exposition et attitude prophylactique) (**Figure 4**). Le premier concerne les civils résidents en zone d'endémie palustre, ce groupe inclus deux populations distinctes i/ les sujets autochtones de la zone d'endémie à l'origine supposée de la transmission palustre, qu'ils soient de passage en France métropolitaine pour des raisons touristiques ou professionnelles ou migrants primo arrivants depuis moins de 6 mois ii/ les sujets dit « expatriés » nés en France ou hors d'une zone endémique pour le paludisme et résidents > 6 mois sur les 12 derniers mois dans la zone d'endémie supposée à l'origine de la transmission palustre. Le second profil épidémiologique regroupe les civils voyageurs en zone d'endémie palustre, là encore il convient de distinguer deux catégories de voyageurs i/ les sujets originaires d'une zone endémique pour le paludisme, de retour d'un séjour dans leur pays d'origine pour visiter la famille ou les amis et ii/ les sujets non originaires de la zone supposée à l'origine de la contamination et qui ont effectué un séjour (moins de 6 mois dans les 12 derniers mois) pour des raisons touristiques ou professionnelles. Le troisième profil épidémiologique inclut les militaires de retour d'opération dans une zone de transmission du paludisme. Les caractéristiques épidémiologiques et sociodémographiques de la population totale sont décrites et commentées dans ce rapport.

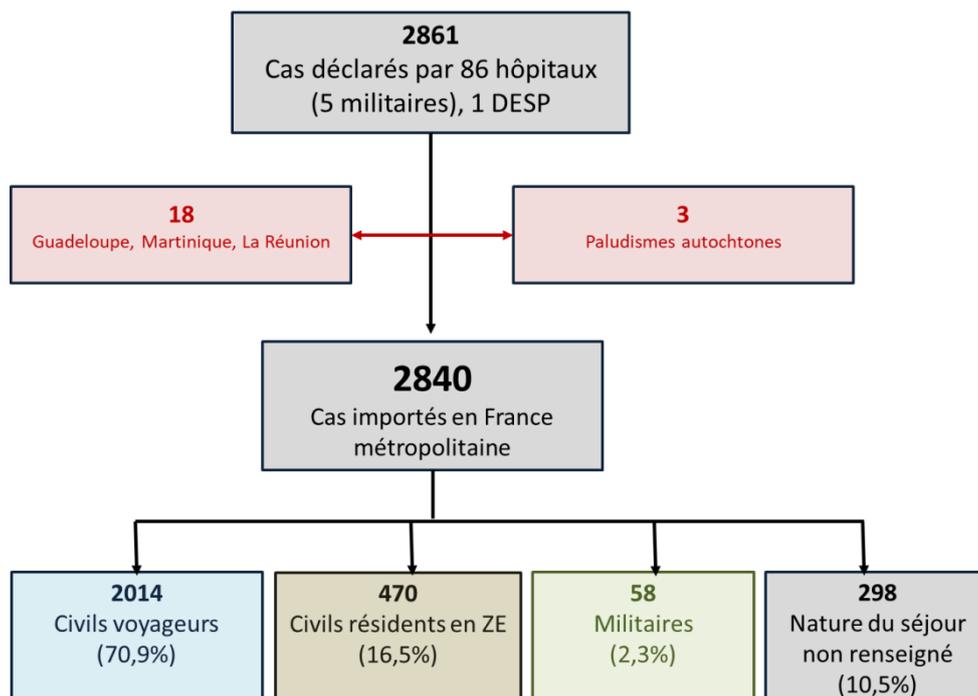


Figure 4 : Distribution des cas de paludisme déclarés par les correspondants du réseau du CNR du Paludisme en France métropolitaine en fonction des trois grands profils épidémiologiques pour l'année 2018.

3.1.2. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

En Guyane

La Guyane, dont la superficie est équivalente à celle du Portugal, est le département le plus vaste de France. Elle est couverte à plus de 80 % par une forêt tropicale associée à un réseau **hydrologique** très dense (**Figure 5**). Ses infrastructures en moyen de communication sont peu développées. Cette situation fait, qu'à l'exception du littoral, un grand nombre de villages situés le long des fleuves ne sont accessibles que par voir fluviale ou aérienne.

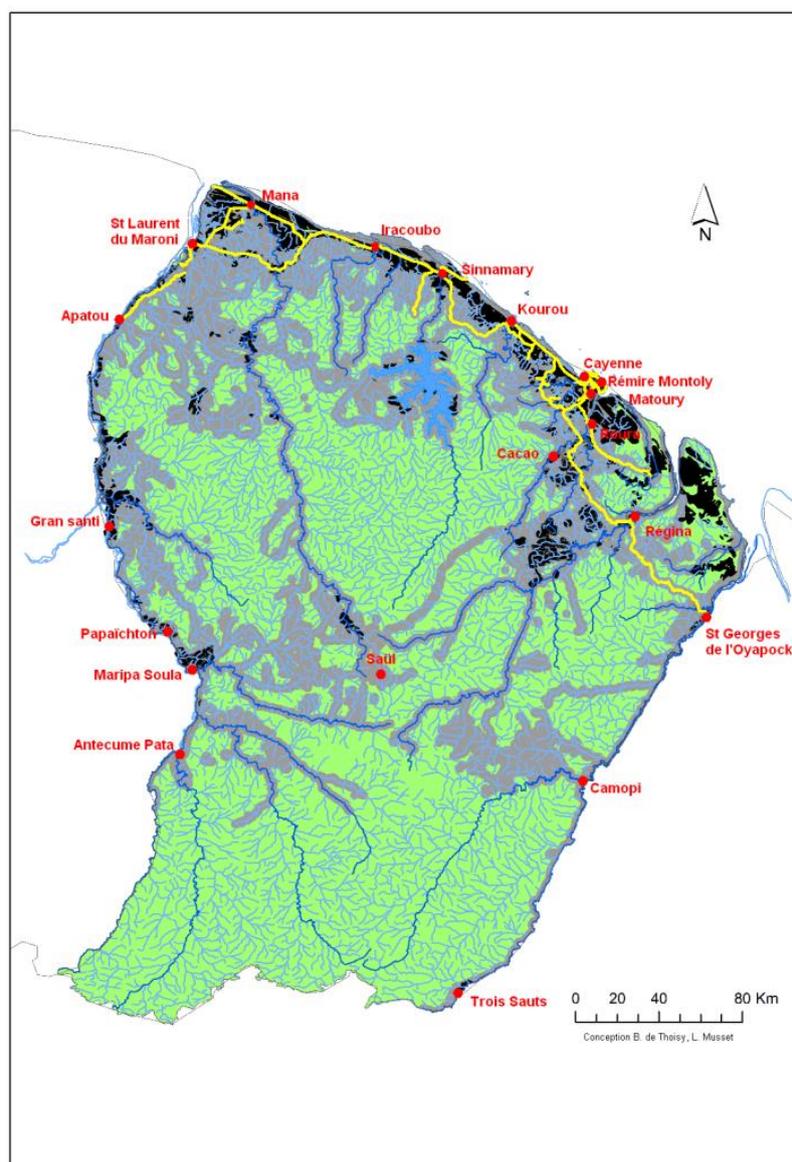


Figure 5. Réseau de partenaires guyanais.
En jaune : réseau routier (national et départemental),
En vert : forêt primaire,
En gris : zones forestières avec impact anthropique,
En noir : absence de forêt (savane ; marécage ; zones urbaine, d'orpaillage étendue, agricole...).

Les zones d'endémie permanente du paludisme sont essentiellement localisées dans ces zones difficiles d'accès (**Figure 6**) et très souvent victimes d'activités d'orpaillage illégal. Quelques foyers de transmission à *P. vivax* sont situés le long du littoral où vivent 87% des 252 338 habitants de la Guyane (source Insee, 2017). L'isolement géographique de certains villages guyanais est tellement

important qu'il n'existe aucune structure de santé rapidement accessible permettant la prise en charge des patients. C'est le cas par exemple du village de Saint-Elie ou encore des villages situés sur le Maroni entre Gran-Santi et Apatou (jusqu'à quatre heures de pirogue de la première structure de soin, **Figure 5**).

Le système de santé en Guyane permet la prise en charge et le diagnostic des patients atteints de paludisme sur l'ensemble du territoire. Il y a trois hôpitaux publics situés à Cayenne, Kourou et St Laurent du Maroni. En plus, l'Hôpital de Cayenne administre 22 CDPS situés pour certains en zone d'endémie palustre. Certains n'ont qu'une infirmière comme personnel. Tous les CDPS ont la possibilité d'établir un diagnostic de paludisme en utilisant les tests de diagnostic rapide. En plus, huit laboratoires de biologie médicale existent : cinq sur l'Île de Cayenne, deux à Kourou et un à St Laurent du Maroni. Ils réalisent le diagnostic par microscopie associé au TDR ou à la PCR.

Toutes ces structures de soin et de diagnostic constituent le réseau de partenaires du Pôle Zones endémiques. Le Tableau 2 liste les partenaires du CNR ayant diagnostiqués plus de 10 cas dans l'année en question. Ils deviennent alors des partenaires dits « actifs » vis à vis desquels nous portons une attention particulière à leur participation et si besoin à leur sensibilisation. L'envoi des échantillons vers le Pôle Zones endémiques repose en effet sur le volontariat du personnel soignant ou des biologistes. Pour animer ce réseau, des missions sont organisées tout au long de l'année tout particulièrement dans les CDPS où la rotation des médecins est importante (en moyenne tous les 6 mois) ce qui rend difficile la pérennisation de la participation à la surveillance. Dans ce cadre, nous participons aussi à la réunion annuelle des CDPS aussi appelé conseil de Pôle qui a lieu en décembre chaque année. Cette participation permet et qui nous permet Sensibilisation, professionnels de santé travaillant en CDPS : AG CDPS 14 dec 2018

Tableau 2. Partenaires actifs du Pôle Zones endémiques en Guyane: localisation, fréquence des liaisons avec Cayenne et niveau de participation à la surveillance biologique du paludisme en 2018.

	Partenaires	Commune	Liaison (fréquences)	Nombre d'accès déclarés (Cire)	Isolats transmis au PZE	
					Nb	%
Maroni	CH	St Laurent du Maroni	Routière (quotidienne)	14	8	57%
	Centre de santé	Maripa Soula	Aérienne (quotidienne)	44	20	45%
	Poste de santé	Antécume Pata	Pirogue + avion (occasionnelle)	17	6	35%
	Poste de santé	Talhuen	Pirogue + avion (occasionnelle)	27	6	22%
Littoral	CH	Cayenne	Routière (quotidienne)	134	142	106%*
	LBM LabAzur	Cayenne Matoury	Routière (sur demande)	15	0	0%
	LBM de Kourou	Kourou	Routière (sur demande)	59	59	100%
	Service de santé des Armées	Cayenne	Routière (sur demande)	18	5	28%
Oyapock	Centre de santé	Régina	Routière (hebdomadaire)	50	43	86%
	Centres de santé	St Georges de l'Oyapock	Routière (bi-hebdomadaire)	135	120	89%
	Centre de santé	Camopi	Pirogue + avion (occasionnelle)	13	10	77%
Total				526	419	80%

CH : Centre Hospitalier, LBM : Laboratoire de Biologie Médicale, Cire : Cellule InterRégionale d'Epidémiologie de Guyane.

*Certains pourcentages sont supérieurs à 100%. Ceux ci concernent essentiellement des patients diagnostiqués deux fois et pour lesquels le lieu de diagnostic (pris en compte une seule fois) a été comptabilisé différemment par la CIRE et par le CNR. Les autres cas concernent les militaires qui sont rarement étiquetés comme service de santé des armées par le CNR mais plutôt systématiquement par le laboratoire qui envoie les prélèvements, le plus souvent le LBM de Kourou et le CH Cayenne.

Carte du risque de paludisme en Guyane – 2018 (évalué sur les données épidémiologiques 2017)

Document destiné aux professionnels de santé : pour toute question n'hésitez pas à vous rapprocher de votre médecin traitant ou d'un spécialiste en médecine des voyages.

Type de zone	Pas de transmission du paludisme au cours de l'année précédente	Risque faible Existence de cas mais pas de transmission dans les bourgs	Risque fort Transmission du paludisme dans la zone
Port de vêtements couvrants	Recommandé	Recommandé	Impératif
Utilisation de produits répulsifs	Recommandée	Recommandée	Impérative
Utilisation de moustiquaires non imprégnées	Recommandée	Sans objet	Sans objet
Utilisation de moustiquaires imprégnées	Recommandée	Impérative	Impérative
Traitement chimio-prophylactique (Touristes et séjours courts)	Sans objet	A voir au cas par cas	Impératif sauf si contre-indication médicale

Sources : Direction de la Démoustication et des Affaires Sanitaires de la Collectivité Territoriale de Guyane - ARS de Guyane – CNR Paludisme, Pôle Zones endémiques - Forces Armées de Guyane
Pôle des Centres Délocalisés de Prévention et de Soins du Centre Hospitalier Andrée Rosemon – Laboratoires de Biologie Médicale de ville et des Centres Hospitaliers – Cellule d'Intervention Régionale Guyane de Santé publique France

Validation : Comité d'experts des maladies à caractère épidémique, le 16 mars 2018

Réalisation : ARS Guyane en collaboration avec l'Institut Pasteur de la Guyane et la CIRE Guyane



Figure 6. Carte du risque de paludisme en Guyane, mars 2018.

Depuis 2018, seuls des prélèvements de sang veineux sur tube EDTA sont collectés. Si leur acheminement à Cayenne est prévu plus d'une semaine après le prélèvement, il sera congelé en attendant son acheminement.

En 2014, conjointement avec la CIRE Guyane et le Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie Mycologie (LHUPM) de l'Hôpital de Cayenne un système de recueil de données commun a été mis en place dans les CDPS. Ce recueil coordonné ne sollicite les partenaires qu'une seule fois. Ainsi chaque organisme reçoit les renseignements dont il a besoin à partir d'une tube et d'une fiche de renseignement unique. Le circuit est le suivant : le CDPS envoie un tube et une feuille au LHUPM qui réalise à son niveau un contrôle du diagnostic précédemment fait par TDR grâce à un frottis mince et une goutte épaisse. Le LHUPM saisit également les données nécessaires à la CIRE pour sa surveillance à visée d'alerte. Le tube et la feuille sont alors transmis au CNR qui réalise les analyses biologiques requises en fonction du dossier en question.

A Mayotte

Pour cette mandature, le Pôle Zones endémiques devait s'attacher à tisser des liens étroits avec les autorités sanitaires locales de façon à proposer son soutien et son expertise techniques si la situation épidémiologie le nécessite (**Figure 7**). Pour l'instant, les activités en lien avec l'île de Mayotte ont été assurées par le Pôle Zones non Endémiques.

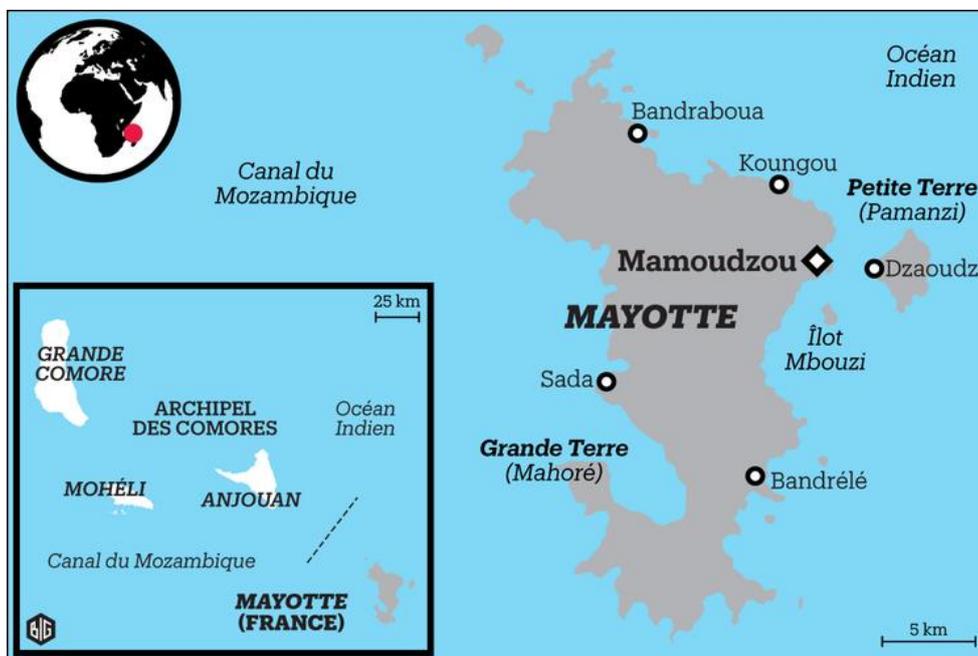


Figure 7. Carte de l'île de Mayotte.

3.2. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

3.2.1. Pôle Zones non Endémiques

En 2018, **2 843** cas de paludisme rapportés en France métropolitaine dont **3 cas autochtones** déclarés par les correspondants du réseau, ont été retenus après élimination des doublons et nettoyage de la base. Les cas déclarés comme autochtones à l'ARS de référence sont après enquête classés en paludisme aéroportuaire pour deux d'entre eux et cryptique pour le dernier. Les 2 840 cas importés en France métropolitaine en 2018 sont déclarés par **86** centres hospitaliers civils (n=2379), **6** centres hospitaliers militaires (n=78) par le Centre d'épidémiologie et de santé publique des Armées (CESPA) (n=17) et par des hôpitaux hors réseau ajoutés par le CNR (n=3). La région Ile de France demeure au 1^{er} rang des déclarations avec 1457 (**51,3%**) cas déclarés.

3.2.1.1. Estimation du nombre de cas totaux et tendances évolutives

On retrouve en 2018, une augmentation de 4,4 % des cas déclarés par rapport à 2017 (2840 Vs 2721). La proportion de cas capturés par le réseau des correspondants du CNR du Paludisme étant mesurée à 51 % par rapport à l'année de référence 2013, le nombre de cas estimés est d'environ 5550 cas pour l'ensemble de la France métropolitaine (+6,3 %) (Tableau 3). La proportion des cas capturés par le réseau en 2018 est de 51 %, en légère baisse par rapport à 2017 (52 %). À déclarants constants, le nombre de cas a augmenté de 7,2 % par rapport à 2017 (Figure 8).

Tableau 3 : Cas déclarés et cas estimés de paludisme en France métropolitaine, tendances évolutives 2013 -2018

	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Nb de cas déclarés	2171	2299	2504	2450	2721	2840
Variation / année antérieure en %	17,0	5,9	8,9	-2,2	11,1	4,4
Hors CESPA	2129	2246	2438	2436	2709	2823
Hors CESPA, variation / année antérieure en %	16,1	5,5	8,5	-0,1	11,2	4,2
Hors CESPA, proportion de cas capturés par le réseau	51,1	51,4	51,4	51,6	52,0	51,0
Hors CESPA à correspondants constants	2025	2197	2403	2362	2541	2723
Hors CESPA à correspondants constants variation / année antérieure	14,3	8,5	9,4	-1,7	7,6	7,2
Nombre total de cas estimés	4208	4420	4810	4735	5220	5550
Nombre total de cas estimés variation / année antérieure	17,5	5,1	8,7	-1,5	10,3	6,3
Cas observés corrigés (enquête exhaustive de 2014 sur les données 2013)	4208					
Cas observés corrigés variation / total cas estimés en %	1,9					

CESPA = Centre d'épidémiologie et de santé publique des Armées

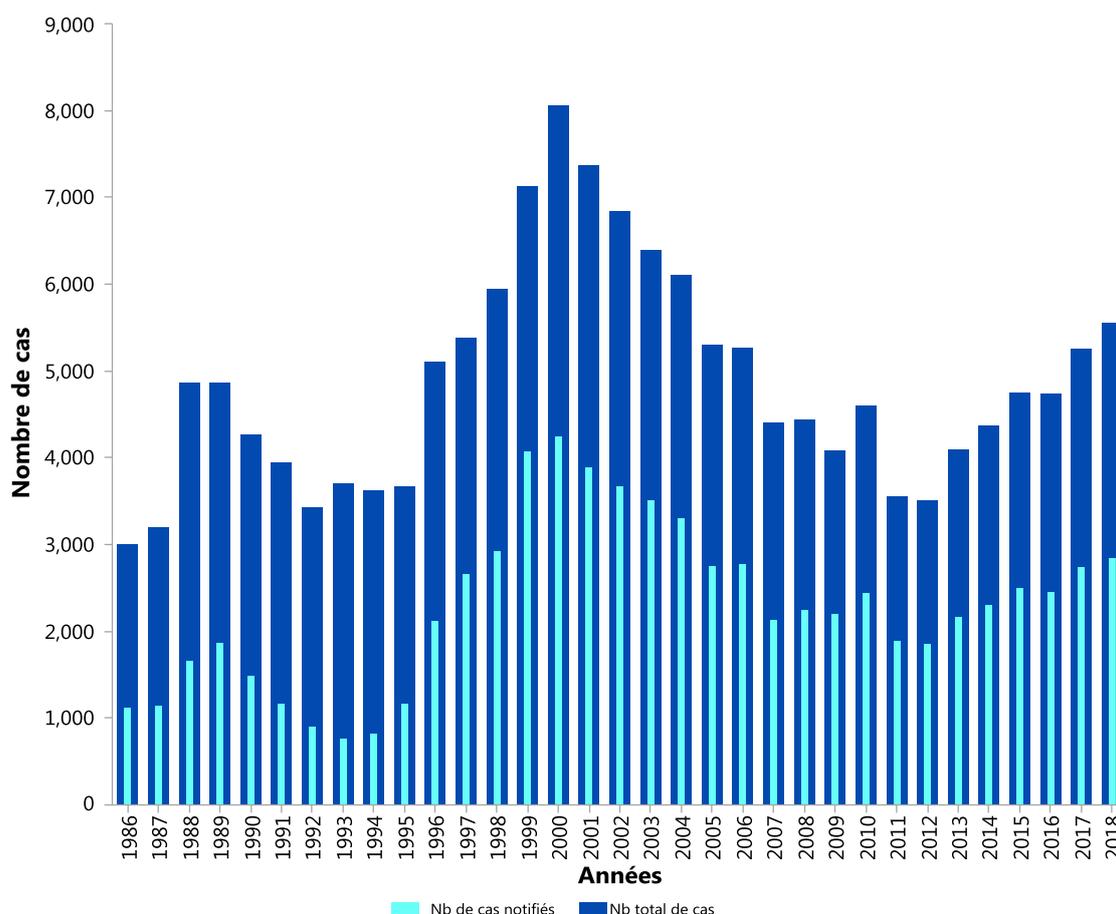


Figure 8 : Evolution du paludisme d'importation, cas déclarés, cas estimés et nombre de voyageurs vers les zones impaludées, France métropolitaine 1996 à 2018.

Cette augmentation du nombre de cas ne s'accompagne pas d'une augmentation de la mortalité qui reste faible (Figure 9).

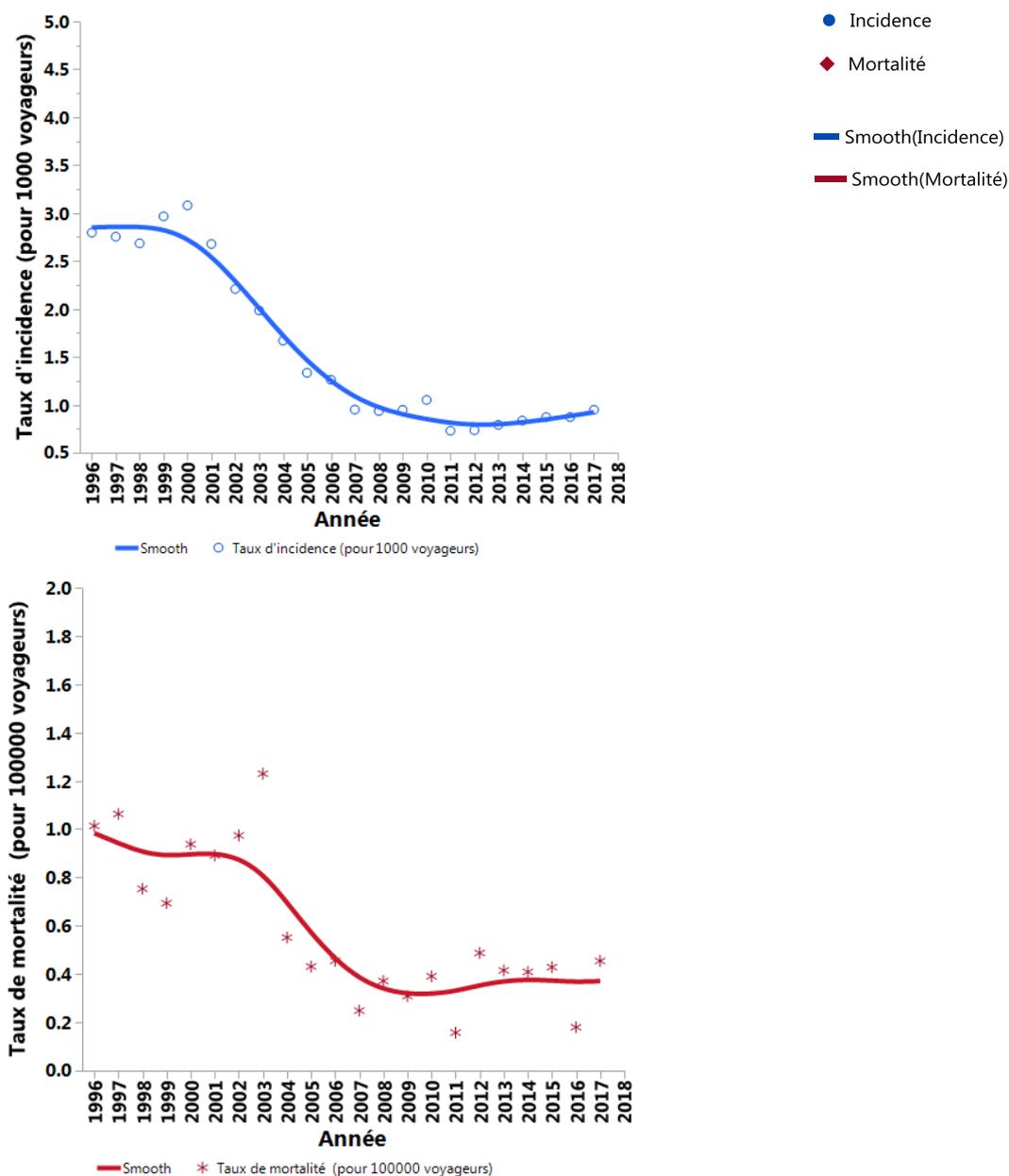


Figure 9 : Evolution de taux d'incidence (pour 1000 voyageurs) et de mortalité (pour 100000 voyageurs) du paludisme d'importation en France métropolitaine 1996 à 2017.

Pour l'année 2018, la région Ile de France est comme à l'habitude la première région pour le nombre de cas déclarés avec toujours plus de 50 % des cas (52 % des cas), loin devant Pays de Loire et Auvergne Rhône-Alpes avec respectivement 8 et 7% des cas déclarés (Tableau en annexe).

Distribution mensuelle des cas

La distribution des cas en fonction du mois de diagnostic est illustrée par la Figure 10 : on note comme à l'habitude pour *P. falciparum* un pic de fréquence des cas entre juillet et octobre et un deuxième plus modéré en janvier. Pour les autres espèces les cas sont bien moins nombreux avec une répartition mieux répartie au cours de l'année. Ils ne sont pas représentés graphiquement. La distribution mensuelle des cas conserve un profil très stable au cours du temps selon les espèces. Pour plus d'informations sur la répartition mensuelle des cas diagnostiqués en France métropolitaine, se reporter à l'article de Kendjo et al, Jama network open 2019.

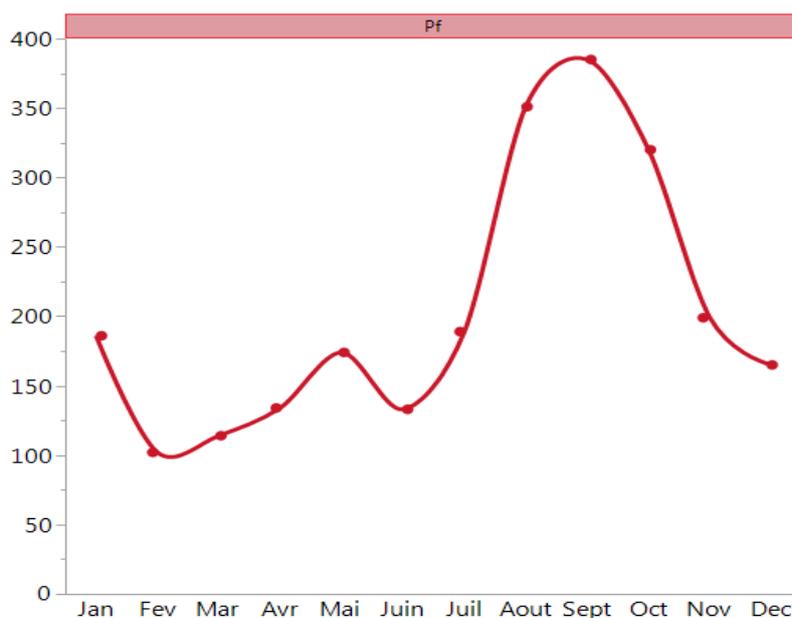


Figure 10 : Distribution mensuelle des cas de paludisme à *P. falciparum* déclarés par le réseau des correspondants du CNR du paludisme, France métropolitaine, année 2018, n = 2452.

Age, sexe et origine des cas déclarés

L'âge et le sexe sont renseignés dans tous les cas (**Tableau 4**). Les patients ont entre 0 mois et 93 ans. L'âge médian est de 36 ans (IQ25-75 =24-49) ; moyenne : 36,7 (ET : 17,4). La proportion des nourrissons dans la population totale est de 0,8 % (23/2840) avec un âge médian de 1 année (IQ25-75 =0-1). La proportion d'enfants (2-14 ans) est de 11,2 % (318/2840) avec un âge médian de 9 ans (IQ25-75 =5-12), celle des adultes de 15-59 ans de 77,9 % (2213/2840) avec un âge médian de 37 ans (IQ25-75 =28-47) et celle des adultes ≥60 ans de 10,1 % (286/2840) avec un âge médian de 65 ans (IQ25-75 =62-69). Les changements sont non significatifs par rapport à 2017.

Le sex-ratio_{H/F} global de l'ensemble de la population d'étude en 2018 est de 1,5 contre 1,6 en 2017, cette différence n'est pas significative. On observe une augmentation significative de la sex-ratio avec les tranches d'âge ($p < 0,001$).

Tableau 4 : Répartition des hommes et des femmes en fonction des tranches d'âge pour la population totale, France métropolitaine, année 2018, n = 2840.

Classe âge	Femme		Homme		Sex-ratio Homme/Femme
	N	%	N	%	
< 2 ans	14	1.2%	9	0.5%	0,6
2-14 ans	145	12.9%	173	10.1%	1,2
15-59 ans	863	76.8%	1349	78.6%	1.6
>=60 ans	101	9.0%	185	10.8%	1.8
Toutes classes d'âge	1123		1716		1.5

L'origine ethnique est renseignée dans 2484 cas (87,5 %). On compte 2124 (85,5 %) Africains, 332 (13,4 %) Caucasiens, 11 (0,4 %) Asiatiques et 17 (0,7 %) avec une autre origine.

La pyramide des âges est déséquilibrée. En dehors du déséquilibre entre les genres déjà souligné, les populations d'âge médian sont surreprésentées (cf Figure en annexe)

L'évolution en proportion des cas chez les sujets africains et caucasiens montre que l'augmentation de la proportion des sujets d'origine africaine dans la population des cas de paludisme importés en France métropolitaine se poursuit encore cette année (Figure 11). Cette tendance est commentée dans l'article de Kendjo et al, Jama network open 2019.

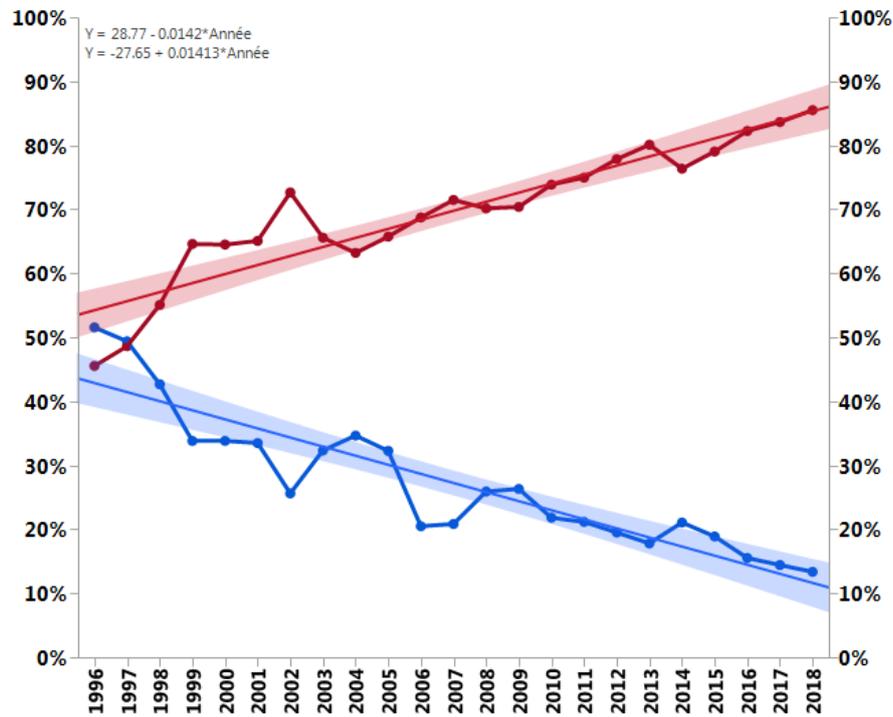


Figure 11 : Evolution annuelle des proportions de paludisme d'importation des sujets d'origine africaine (en rouge) et caucasienne (en bleu) entre 1996 et 2018. Les points rouges désignent la proportion des africains, tandis que les points bleus celles des caucasiens. Une droite de régression est ajustée pour chaque groupe et les équations correspondantes sont données dans la figure.

La comparaison des pyramides des âges des africains versus les caucasiens montre le déséquilibre de répartition des cas entre les hommes et les femmes (Figure 12) et selon les classes d'âges beaucoup plus marqué chez les sujets caucasiens (beaucoup plus masculine et avec très peu d'enfants) que chez les sujets africains.

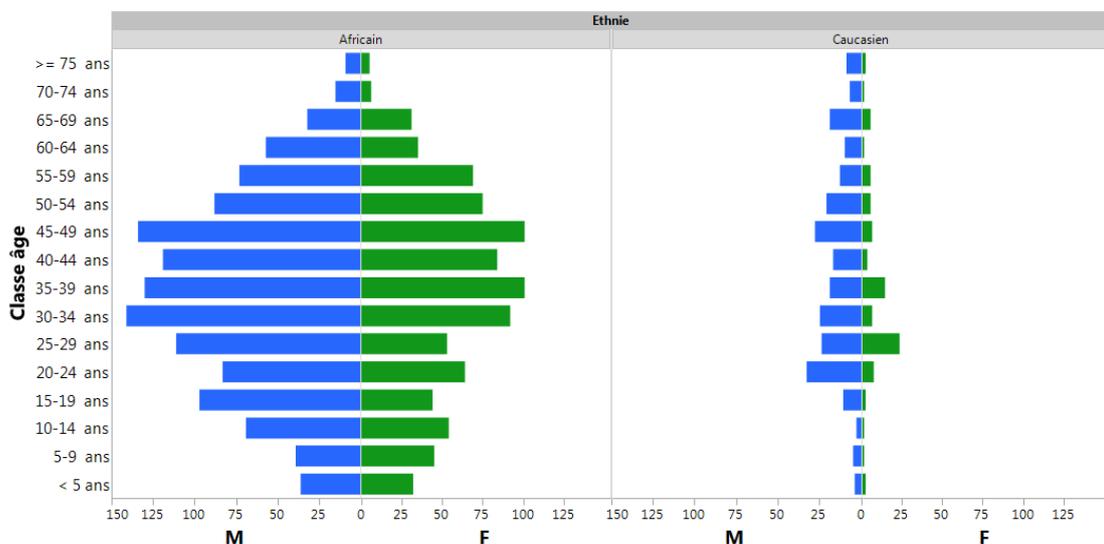


Figure 12 : Répartition des cas de paludisme importés par âge et par sexe en fonction de l'origine africaine ou caucasienne, CNR du paludisme, France métropolitaine, année 2018, n = 2840.

Pays de contamination déclarés

Les cas déclarés sont encore essentiellement contractés en Afrique sub-Saharienne (97,9%) (Tableau 5). Le détail du nombre de cas par pays d'endémie visité et sa variation par rapport à l'année 2017 dont les 15 pays sur les 59 pays à l'origine des cas représentant 93,4 % du total des cas sont présentés en annexe

Les pays les plus souvent en cause comme étant à l'origine de la transmission du paludisme sont toujours, par ordre décroissant, la Côte d'Ivoire, n=790 (28,2 %), le Cameroun, n=565 (20,2 %), la Guinée, n=186 (6,6 %) puis le Mali, n=142 (6,1 %). Ces 4 pays Africains représentent à eux seuls 61 % des cas déclarés. Comme éléments remarquables, on note par rapport à 2017 une augmentation des cas en provenance du Tchad (n=59, +73,5 %) , du Gabon (n=117, +64,8 %), du Congo (n=136, +33,3), du Burkina Faso (n=76, +24,6 %), du Mali (n=170, +19,7 %), de la RDC (n=32, +18,5 %), de la Côte d'Ivoire (n=795, +3,4%) et une baisse des cas en provenance du Nigéria (n=35, -48,5%), du Togo (n=72, -16,3%), de la RCA (n=107, -11,6 %), du Benin (n=75, -5,1 %), de la Guinée (n=186, -1,1) et du Cameroun (n=565, -0,5%).

On notera que les cas de paludisme d'importation chez les militaires n=58 (2,3%) sont en hausse par rapport à 2017 n=42 (1,6%). Les principaux pays ou régions à l'origine des cas pour les militaires sont la Guyane (n=21), la Côte d'Ivoire (n=11), le Burkina-Faso (n=6), la République Centrafricaine (n=4), le Mali (n=3) et le Tchad (n=3). On note cette année une nette augmentation des cas de paludisme d'importation en provenance de la Guyane (seulement 3 cas en 2017).

Il y a eu, en 2018, 56 cas de paludisme d'importation au retour des Comores contre 12 cas rapportés en 2017 (6, 2, 1 et 53 respectivement en 2016, 2015, 2014 et 2013). Les chiffres de l'année 2018 confirment la dégradation amorcée en 2016 et 2017. Un rebond de l'épidémie palustre dans les îles de l'archipel est à craindre, comme semble le corroborer les chiffres du paludisme importés et autochtone à Mayotte en 2018⁵.

Tableau 5 : régions de contamination des cas déclarés en 2018 comparés à 2017

Régions d'endémie visitées	2017	%	2018	%	Variation (2018-2017)
Sub-Saharan Africa	2601	97.9%	2742	97.9%	5.4%
Asia (Ex. Near East)	36	1.4%	20	0.7%	-44.4%
Latin Amer. & Carib	11	0.4%	31	1.1%	181.8%
Oceania	3	0.1%	5	0.2%	66.7%
Near East	1	0.0%	1	0.0%	0.0%
Northern Africa	2	0.1%	1	0.0%	-50.0%
Total	2654	100%	2800	100%	5.4%

Méthodes diagnostiques du paludisme et espèces plasmodiales identifiées

La méthode diagnostique est connue pour 2840 cas. Le frottis sanguin mince est associé à une technique hautement sensible) pour 2290 (81 %) cas associés. La goutte épaisse représente encore la technique majoritairement réalisée par les correspondants (1752 cas ; 76%) mais la PCR (851 ; 37%) seule ou associée est fréquemment mise en œuvre, suivi par le QBC (213 ; 9%). La détection antigénique sur bandelettes (TDR) lorsqu'elle est réalisée, est associée à une autre méthode diagnostique dans la presque totalité des cas n=2187/2194 (99,7 %) suivant les recommandations nationales.

⁵ [file:///C:/Users/mcjth/Downloads/pe_palu_mayotte_101218%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/mcjth/Downloads/pe_palu_mayotte_101218%20(1).pdf)

L'espèce plasmodiale rapportée pour les 2840 cas déclarés en 2018 par les correspondants a pu être vérifiée (microscopie ou PCR) au CNR du paludisme sur les échantillons adressés pour 2276 échantillons soit dans 80,1 % des cas. Ainsi sur l'ensemble des diagnostics rendus par les correspondants, corrigés si besoin par les résultats d'expertise des laboratoires du CNR du Paludisme lorsqu'un échantillon avait été adressé, l'espèce *P. falciparum* seule représente la majorité des infections (Figure 13), elle est identifiée dans 2452 cas (86,3 %), soit une légère diminution par rapport à 2017 (87,5 %). *Plasmodium ovale*, *P. vivax*, *P. malariae*, et les infections mixtes sont retrouvés dans 170 (6,0 %), 63 (2,2 %), 83 (2,9 %) et 62 (2,2 %) des cas respectivement (Figure 13). Trois cas d'accès palustre dus à *Plasmodium knowlesi* ont été diagnostiqués, confirmés par PCR : ils ont été contractés en Thaïlande pour 2 et en Asie du sud est pour le troisième. L'Afrique est le continent à l'origine de l'écrasante majorité des accès palustres importés en France métropolitaine (98 %). Les infections à *P. falciparum* sont majoritairement contractées sur le continent Africain 99,7%. *Plasmodium vivax* est l'espèce prédominante pour les continents asiatique et américain.

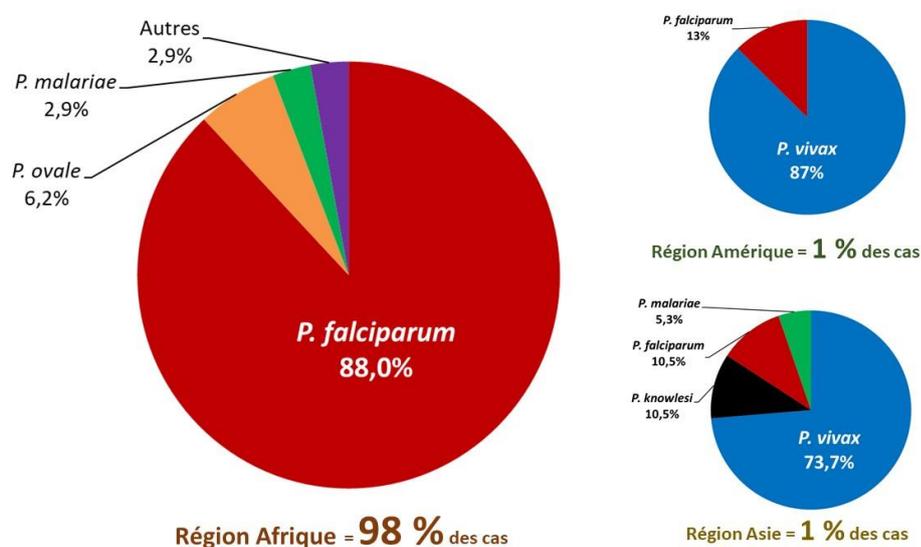


Figure 13 : Répartition des espèces par continent n=2799, France métropolitaine 2018. Autres = *P. vivax* 13 cas (0,4 %) ; *P. spp* 7 (0,2 %) cas et infections mixtes 60 (2,3 %) cas

Présentation clinique à l'entrée et espèces plasmodiales

Les accès déclarés étaient des accès simples avec ou sans vomissements dans 2329 (86,3 %) des cas, toutes espèces confondues. Les accès graves sont presque exclusivement observés avec l'espèce *P. falciparum*, seul ou en association 98,6 % (342/347). Dans 4 cas, l'espèce identifiée n'est pas *P. falciparum* ou une infection mixte avec *P. falciparum* : il s'agit de *P. ovale* dans 2 cas et de *P. vivax* dans 2 cas (voir le chapitre spécifique pour plus de détails sur ces cas).

Délai d'apparition des symptômes, délai de diagnostic, densité parasitaire

Le délai d'apparition des symptômes est calculé comme la date d'apparition des symptômes moins la date de retour de zone d'endémie. Ce délai est détaillé dans le Tableau 6 en fonction des espèces plasmodiales identifiées.

Tableau 6 : Délai d'apparition des symptômes (en jours) en fonction de l'espèce plasmodiale pour l'année 2018, n = 2 164.

Espèces	Délai d'apparition des premiers symptômes			
	N	Médiane	P25	P75
<i>Plasmodium falciparum</i>	1903	5	0	9
<i>Plasmodium vivax</i>	41	24	6	105
<i>Plasmodium malariae</i>	57	27	10	47
<i>Plasmodium ovale</i>	115	41	9	133

Le délai de diagnostic est calculé comme la date du diagnostic moins la date d'apparition des symptômes. Le délai diagnostic est détaillé dans le Tableau 7 en fonction des espèces plasmodiales identifiées.

Tableau 7. Délai diagnostic (en jours) en fonction de l'espèce plasmodiale pour l'année 2018, n = 2282.

Espèces	Délai symptômes/diagnostic (Jours)			
	N	Médiane	P25	P75
<i>Plasmodium falciparum</i>	1998	3	2	5
<i>Plasmodium vivax</i>	47	5	2	7
<i>Plasmodium malariae</i>	61	5	4	11
<i>Plasmodium ovale</i>	123	5	3	7

On notera que pour l'espèce *P. falciparum*, plus de 90 % des cas surviennent dans les 2 mois qui suivent le retour.

Mesure de la charge parasitaire pour l'espèce *P. falciparum*.

Les caractéristiques de la parasitémie, en fonction du type d'accès sont présentées dans le Tableau 8. La parasitémie à *P. falciparum* (seul ou en association) est connue pour 2398 cas. Sa valeur médiane est fonction du type d'accès : 0,9% pour les accès simples sans vomissement versus 6,9% pour les accès graves. Ces valeurs sont en augmentation par rapport à 2017. La différence pour l'âge ≥ 15 ans médiane 0,4% [IQ₂₅₋₇₅ 0,1 %-1,6 %] ou < 15 ans médiane 0.9 % [IQ₂₅₋₇₅ 0,2 %-2,9 %] est significative, les sujets plus jeunes ont des parasitémies plus élevées (test de Wilcoxon $p < 0,001$). La parasitémie n'est pas statistiquement significative en fonction de l'origine ethnique des patients (test de Kruskal-Wallis $p = 0,1$).

Tableau 8. Cas à *Plasmodium falciparum* seul, caractéristiques de la parasitémie en fonction de l'état clinique, de l'âge et de la zone d'origine en 2018.

Type de l'accès clinique	Parasitémie (%)					
	N	Moyenne	ET	Médiane	P25	P75
Accès grave (joindre CR hospitalisation SVP)	327	6.9	7.2	5.0	1.9	9.0
Accès simple AVEC vomissements	463	1.2	1.7	0.6	0.2	1.6
Accès simple sans vomissements	1597	0.9	1.6	0.3	0.1	1.0
Formes Asymptomatiques et découvertes fortuites	11	0.1	0.2	0.0	0.0	0.1
Total	2398	1.7	3.7	0.5	0.1	1.7

Traitement curatif de l'accès

En 2018, le traitement de première intention de l'accès simple est l'association arténimol – pipéraquline (Tableau 9 et Tableau 10) quel que soit l'âge des patients, suivi de l'artémether-luméfántrine ; l'association atovaquone-proguanil arrive en troisième position.

Lorsque l'on tient compte des traitements de deuxième et de troisième intention, l'artésunate intraveineux est utilisé dans le traitement de l'accès grave dans 34 cas sur 39 (87,2 %) chez les moins de 15 ans et dans 248 cas sur 308 (80,5 %) chez les plus de 15 ans

Tableau 9 : Traitement curatif en première intention des accès palustres de l'enfant de moins de 15 ans, France métropolitaine, année 2018, n=303.

Traitement de première intention	Accès grave		Accès simple		Total	
	< 15 ans		< 15 ans			
	N	%	N	%	N	%
Artemether + Lumefantrine	2	5.1%	62	23.5%	64	21.1%
Artésunate IV	31	79.5%	2	0.8%	33	10.9%
Atovaquone + Proguanil	4	10.3%	40	15.2%	44	14.5%
Chloroquine	0	0.0%	18	6.8%	18	5.9%
Arténimol (Dihydroartémisinine) + pipéraquline	1	2.6%	137	51.9%	138	45.5%
Méfloquine	0	0.0%	3	1.1%	3	1.0%
Quinine IV	1	2.6%	1	0.4%	2	0.7%
Total	39	100.0%	263	100.0%	303	100.0%

Tableau 10 : Traitement curatif en première intention des accès palustres des sujets de plus de 15 ans, France métropolitaine, année 2018, n=2186.

Traitement de première intention	Accès grave		Accès simple		Total	
	≥ 15 ans		≥ 15 ans			
	N	%	N	%	N	%
Artemether + Lumefantrine	8	2.7%	351	18.5%	359	16.4%
Artésunate IV	230	78.8%	55	2.9%	285	13.0%
Atovaquone + Proguanil	8	2.7%	343	18.1%	351	16.1%
Autre	0	0.0%	7	0.4%	7	0.3%
Chloroquine	1	0.3%	95	5.0%	96	4.4%
Arténimol (Dihydroartémisinine) + pipéraquline	39	13.4%	948	50.1%	987	45.2%
Méfloquine	0	0.0%	5	0.3%	5	0.2%
Primaquine	0	0.0%	7	0.4%	7	0.3%
Quinine IV	6	2.1%	77	4.1%	83	3.8%
Quinine per os	0	0.0%	6	0.3%	6	0.3%
Total	292	100.0%	1894	100.0%	2186	100.0%

Attitude prophylactique

Elle est très similaire à celle de l'année 2017, et fera l'objet d'un traitement spécifique dans le rapport 2020 pour l'année 2019.

En 2018, l'utilisation d'une protection personnelle antivectorielle est renseignée dans 54 % des cas : plus de 80% des sujets n'utilisent aucune protection antivectorielle.

L'utilisation d'une prophylaxie médicamenteuse est renseignée dans 2395 cas (84,4 %) et un total de 1827 (76,3 %) personnes déclarent ne pas avoir suivi de chimioprophylaxie.

Tableau 11 : Molécules utilisées en chimioprophylaxie en fonction de l'observance déclarée pour les cas à *Plasmodium falciparum* en 2018 (n=408)

Traitement	Observance chimioprophylaxie							
	Arrêt prématuré		Observance irrégulière		Observance régulière		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Atovaquone-Proguanil	48	29,4%	36	37,1%	46	31,1%	130	31,9%
Chloroquine	9	5,5%	7	7,2%	9	6,1%	25	6,1%
Chloroquine-Proguanil	1	0,6%	2	2,1%	5	3,4%	8	2,0%
Doxycycline	79	48,5%	45	46,4%	71	48,0%	195	47,8%
Mefloquine	24	14,7%	7	7,2%	13	8,8%	44	10,8%
Proguanil	2	1,2%	0	0,0%	4	2,7%	6	1,5%
Total	163	100,0%	97	100,0%	148	100,0%	408	100,0%

3.2.1.2. Paludisme de la femme enceinte

Pour l'année 2018, 32 cas de paludisme chez une femme enceinte ont été déclarés par le réseau des correspondants du CNR du Paludisme. La proportion de ces accès reste stable au cours du temps. Parmi les 31 cas dont l'origine est renseignée, 30 (96,8 %) sont d'origine Africaine, une est d'origine Caucasienne. *Plasmodium falciparum* est responsable de l'accès dans 28/32 cas (87,5 %), *P. ovale* dans 3 cas et *P. malariae* dans 1 cas. Les cas sont tous acquis en Afrique sub-Saharienne. Les accès sont déclarés simples dans 27/32 (84,4 %) cas, asymptomatiques dans 3 cas (9,4 %) et graves dans 2 cas (6,3 %). Dans 21/31 (67,7 %) cas, la patiente résidait en France et dans 10 cas (32,3 %) elle résidait en Afrique. La prise d'une chimioprophylaxie est renseignée dans 25/31 cas (80,6 %) et seulement 1 patiente a déclaré une prise médicamenteuse. Le médicament déclaré était de la Maloxine (sulfadoxine-pyriméthamine) dans le cadre d'un programme de traitement intermittent chez une jeune gabonaise vivant au pays. Les traitements curatifs de l'accès sont précisés pour 31/32 (96,8 %) cas. Pour l'espèce *P. ovale*, le traitement de première intention a été la chloroquine, l'atovaquone-proguanil et la quinine par voie intraveineuse dans un cas pour chaque molécule. La patiente infectée par *P. malariae* a bénéficié d'un traitement par l'atovaquone-proguanil. Pour les 27/31 (87,0 %) cas à *P. falciparum* renseignés, les traitements prescrits en première intention sont par ordre de fréquence : la quinine dans 10 cas (32,3 %) dont à 9 reprises par voie intraveineuse, l'atovaquone-proguanil dans 8 cas (25,8 %), l'artemether-luméfantrine dans 6 cas et l'artésunate par voie intraveineuse dans 1 cas. Les deux accès graves ont bénéficié d'un traitement intraveineux par quinine pour l'une et par artésunate pour l'autre.

3.2.1.3. Efficacité thérapeutique

Pour cette analyse, l'échec thérapeutique précoce (ETP) est défini à J3 comme l'association d'une température $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ avec la présence de trophozoïtes ou de schizontes ; l'échec parasitologique tardif (EPT) comme une parasitémie positive entre J7 et J28 sans fièvre et l'échec clinique et parasitologique tardif (ECPT), de même mais avec une fièvre. La RCPA, réponse clinique et parasitologique adéquate est définie comme l'absence de parasitémie et des symptômes à J28.

Quelle que soit la population considérée, le suivi de l'efficacité thérapeutique est peu réalisé, particulièrement au-delà de J7 (tableau 16). Un très faible nombre de prélèvements est positif à J28 dans l'ensemble des cas suivis, mais il n'est pas négligeable et expose à des risques d'accès graves car non diagnostiqués.

La présence de trophozoïtes lors du suivi J3-J4 est observée dans 6% des cas, tous traitements confondus. Le suivi parasitologique pour la détection des échecs thérapeutiques précoces est peu réalisé (26,6% des cas) et seuls 20,7% des cas ont bénéficié d'un suivi tardif (J28 +/-2). Ces suivis ont permis de confirmer 20,3% (577 cas) de succès thérapeutique ; 5 échecs tardifs ont été diagnostiqués (Tableau 12).

Tableau 12. Efficacité thérapeutique jugée sur la présence de formes asexuées dans le sang lors des contrôles programmés à J3-J4 ; J7 +/-1 et J28 +/-2 pour la population totale en 2018.

Contrôle parasitologique J ₃ J ₄	N	%
Non fait	1585	55.8%
Absence de parasites	1025	36.1%
Gamétocytes seuls	59	2.1%
Présence trophozoïtes	171	6.0%
Contrôle parasitologique J₇		
Non fait	2086	73.5%
Absence de parasites	703	24.8%
Gamétocytes seuls	43	1.5%
Présence trophozoïtes	8	0.3%
Contrôle parasitologique J₂₈		
Non fait	2252	79.3%
Absence de parasites	577	20.3%
Gamétocytes seuls	6	0.2%
Présence trophozoïtes	5	0.2%

Suivi de l'efficacité des traitements par atovaquone-proguanil

Au total en 2018, 387 cas de *P. falciparum* ont été traités par l'atovaquone-proguanil en 1^{ère} intention. 148 patients ont été déclarés guéris, dont 48 avaient bénéficié d'un contrôle J28 qui était négatif. **Deux** (0.5%) échecs tardifs ont été identifiés. Pour un des cas, la souche de *P. falciparum* isolée au moment de l'échec thérapeutique n'était pas mutée sur le gène du cytochrome b ; l'autre cas est en cours d'exploration.

Suivi de l'efficacité thérapeutique des traitements par artémether-luméfantrine

Au total en 2018, 436 cas de *P. falciparum* ont été traités par l'artémether-luméfantrine en 1^{ère} intention. 110 patients ont été déclarés guéris, dont 41 avaient bénéficié d'un contrôle J28 qui était négatif. **Deux** échecs tardifs ont été identifiés : les phénotypes *in vitro* n'ont pas mis en évidence de diminution de sensibilité et les marqueurs moléculaires sont sans particularité. Un retard de clairance parasitaire (persistance d'une parasitémie à J3) a été notifié pour 16 patients, sans échec tardif associé.

Suivi de l'efficacité thérapeutique des traitements par l'association arténimol-pipéraquline

Au total en 2018, 1095 cas de *P. falciparum* ont été traités par l'association arténimol (DHA)-pipéraquline en 1^{ère} intention. 408 patients ont été déclarés guéris, dont 180 avaient bénéficié d'un contrôle J28 qui était négatif. **Un** patient a présenté un échec clinique et parasitologique à J28 notifié au CNR. L'isolat de l'échec ne présentait pas de résistance *in vitro*. Les marqueurs moléculaires sont sans particularité.

Les échecs thérapeutiques tardifs expertisés au CNR du paludisme en 2018 ne sont pas en relation avec une diminution de sensibilité ou une résistance moléculaire identifiée des isolats de *P. falciparum* concernés. Une mauvaise observance et/ou une posologie insuffisante sont les explications les plus probables à ce jour de ces échecs.

3.2.2. Distribution des cas de paludisme aux Antilles et à la Réunion

Les cas de paludisme diagnostiqués aux Antilles en 2018 sont tous des cas importés contractés en Afrique sub-saharienne ou en Amérique du Sud.

En Martinique, en 2018, 11 cas de paludisme d'importation ont été diagnostiqués au CHU de Fort de France : 3 contractés en Côte d'Ivoire, 2 au Bénin, 1 au Niger, 1 au Sénégal et 4 au Venezuela. L'espèce *P. falciparum* était retrouvée dans 7 cas, 2 cas étaient dus à *P. ovale* et à *P. vivax* (chez des résidents du Venezuela installés en Martinique). Tous les cas ont été déclarés en 2018, et 9 isolats ont été transmis au laboratoire coordonnateur. Compte-tenu des délais, seules les analyses moléculaires sont réalisables sur ces échantillons.

En Guadeloupe, en 2018, six cas de paludisme ont été diagnostiqués au CHR de Point à Pitre : 2 en provenance de Côte d'Ivoire, 2 en provenance de Guinée, un du Burkina Faso et un du Sénégal. L'espèce *P. falciparum* a été identifiée dans 5 cas ; le dernier était dû à *P. ovale*. La déclaration des cas a été mise en place en 2018 et la transmission des souches au laboratoire coordonnateur sera effective en 2019.

A la Réunion, huit cas de paludisme importés au moins ont été diagnostiqués dont 7 pour lesquels, les isolats ont été transmis au laboratoire coordonnateur.

3.2.3. Distribution des cas de paludisme à Mayotte

En 2018, 51 cas de paludisme ont été déclarés (en augmentation par rapport à 2017 avec 16 cas) : 46 isolats ont été adressés au CNR (90%).

Parmi ces cas, on distingue 47 cas de paludisme d'importation (92%) : 44 cas à *P. falciparum* (94%) en provenance essentiellement de Grande Comore (34 cas, 77%), 1 cas des Comores, 2 de Madagascar, 3 du Burundi, 2 de Tanzanie, 1 du Bénin et 1 du Congo ; 2 cas à *P. ovale* (Rwanda et Tanzanie) et 1 cas à *P. malariae* (Madagascar).

Quatre cas de paludisme autochtone (8%) : 3 de ces isolats possèdent un profil génotypique (7A11, C4M69, C4M79, Pf2689, Pf2802 et TRAP) monoclonal ou biclonal identique à ceux identifiés en Grande Comore, suggérant certainement des cas locaux introduits à partir de Grande Comore. Ces profils avaient été également identifiés en 2017 (paludisme local à Mayotte et Grande Comore).

Le 4^{ème} isolat possède un profil particulier n'ayant jamais été identifié depuis 2014 à Mayotte ou aux Comores.

Les données épidémiologiques de Mayotte sont publiées régulièrement par la Cire Océan Indien. Le dernier en date retraçant l'historique 1970-2016 est disponible à l'adresse suivante <http://invs.santepubliquefrance.fr/fr/Publications-et-outils/Points-epidemiologiques/Tous-les-numeros/Ocean-Indien/2018/Surveillance-du-paludisme-a-Mayotte.-Point-epidemiologique-au-29-janvier-2018>.

3.2.4. Paludisme grave en 2018

3.2.4.1. Cas graves déclarés dans la base CNR du Paludisme en 2018

Le type clinique de l'accès est renseigné dans 2698 cas (95,0 %) dont 347 (12,9 %) sont des accès graves au moment du diagnostic (Figure 14). Ce chiffre est en légère baisse par rapport à 2017 (14,5 %) (Figure 15).

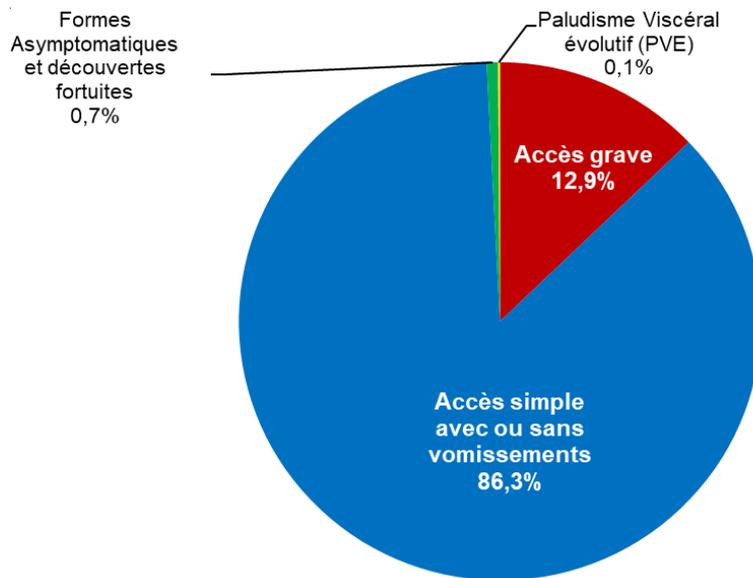


Figure 14 : Répartition des cas en fonction de l'état clinique, CNR du Paludisme, année 2018, n = 2 698

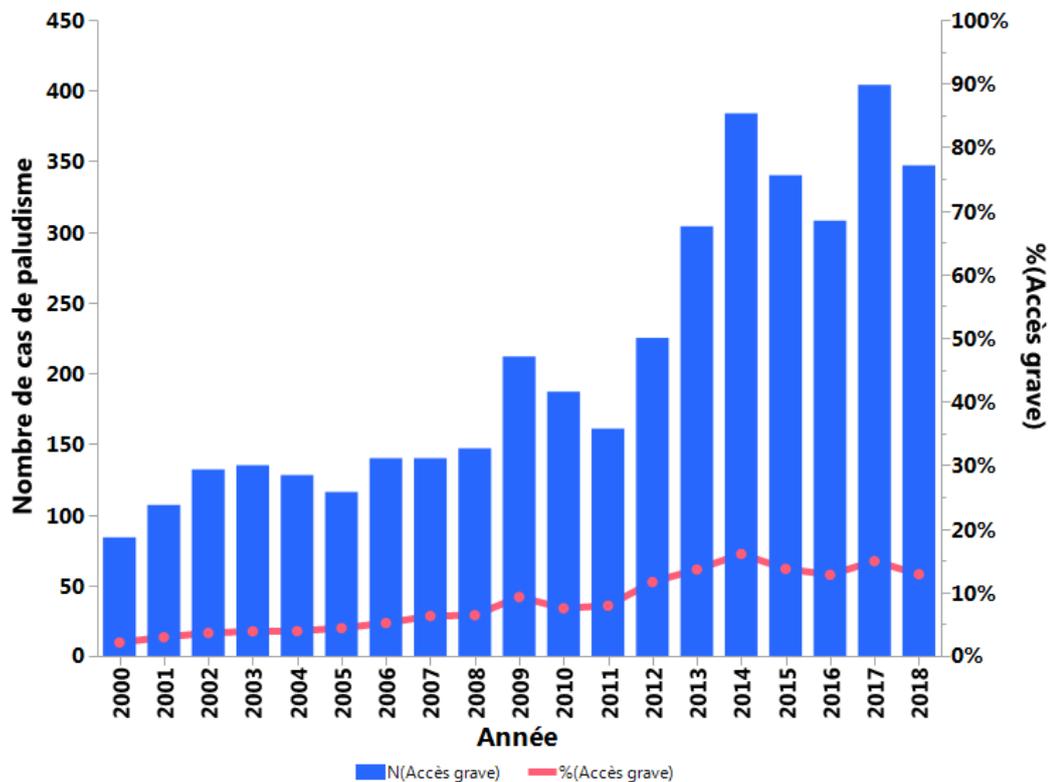


Figure 15 : Évolution des cas graves de paludisme d'importation en France de 2000 à 2018

Les critères de gravités sont renseignés dans 339 cas (97,7 %). Sur un total possible de 16, de 1 à 9 critères de gravités sont rapportés par patient. Pour 150 patients (44,2 %) un seul critère de gravité est rapporté, il s'agit d'une hyperparasitémie isolée dans 89/150 (50,3 %) cas.

Parmi les 347 accès graves, le sex-ratio H/F est de 1,8 ; 308 patients (88,8 %) sont des sujets de plus de 15 ans et 39 des enfants < 15 ans. L'espèce plasmodiale en cause est identifiée pour tous les cas, il s'agit de *P. falciparum* seul dans 343 cas (98,8 %).

On récence 4 accès graves avec une espèce autre que *P. falciparum*, 2 avec *P. ovale* et 2 avec *P. vivax*

Parmi les 308 cas (88,8 %) avec l'origine mentionnée, 236 (76,6 %) des patients étaient originaires d'Afrique, 70 (22,7 %) étaient Caucasiens. Le pays visité, lieu probable de contamination, est spécifié dans 346/347 cas. Il s'agit d'un pays d'Afrique sub-Saharienne dans 343 cas (99,1 %).

Le lieu de prise en charge thérapeutique était renseigné pour 340 patients (97,9 %) et 330 (97,0 %) ont été immédiatement hospitalisés. Les patients traités en ambulatoire avaient de 1 à 4 critères de gravité (parasitémie >4% dans 5 cas). Pour ces patients, le traitement était précisé dans 4 cas et il s'agissait de l'arténimol + pipéraquine dans 2 cas et l'artemether-luméfantrine dans 2 cas.

Les traitements prescrits à ces patients avec un accès grave sont décrits au chapitre « traitement curatif de l'accès ».

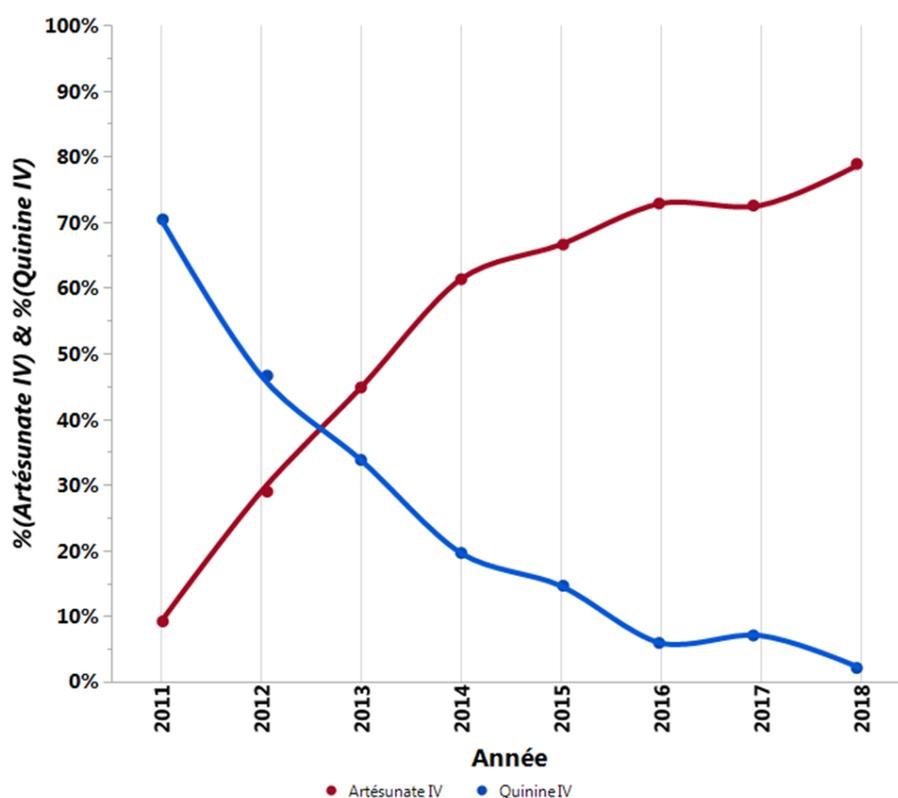


Figure 16 : Taux d'utilisation de l'Artésunate IV vs. Quinine IV en première intention dans le traitement du paludisme grave d'importation en France 2011-2018.

Décès

En 2018, on recense 11 décès chez des patients avec un accès palustre grave. Neuf sont des caucasiens et 2 sont d'origine Africaine. Les âges varient de 4 à 72 ans. La médiane est à 60 ans et 7 ont plus de 55 ans. Un seul a pris une chimioprophylaxie qui n'était pas adaptée à la zone visitée. L'espèce en cause est *P. falciparum* dans tous les cas. L'enfant de 4 ans est un enfant Français, né en France d'une mère Africaine originaire du Nigéria, résidant en France et qui a fait un séjour de 3 semaines au Nigéria sans chimioprophylaxie. Cet enfant a fait un malaise dans l'avion du retour qui a été détourné pour une prise en charge médicale à Alger puis immédiatement rapatrié médical en France. Il décède quelques heures après son admission en réanimation à Paris en dépit de l'instauration d'un traitement par artésunate IV.

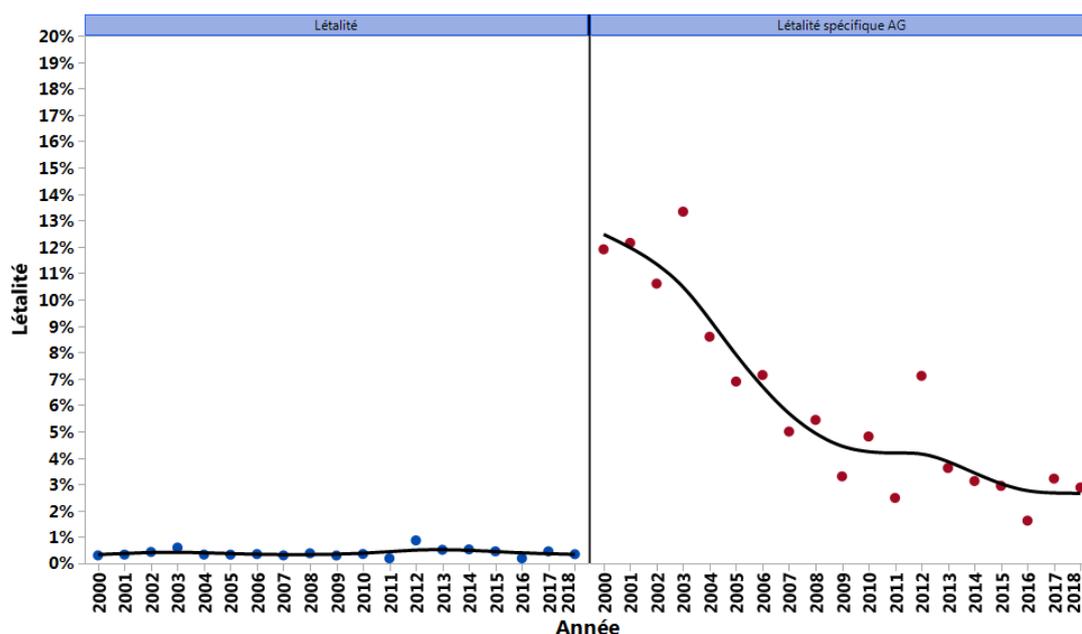


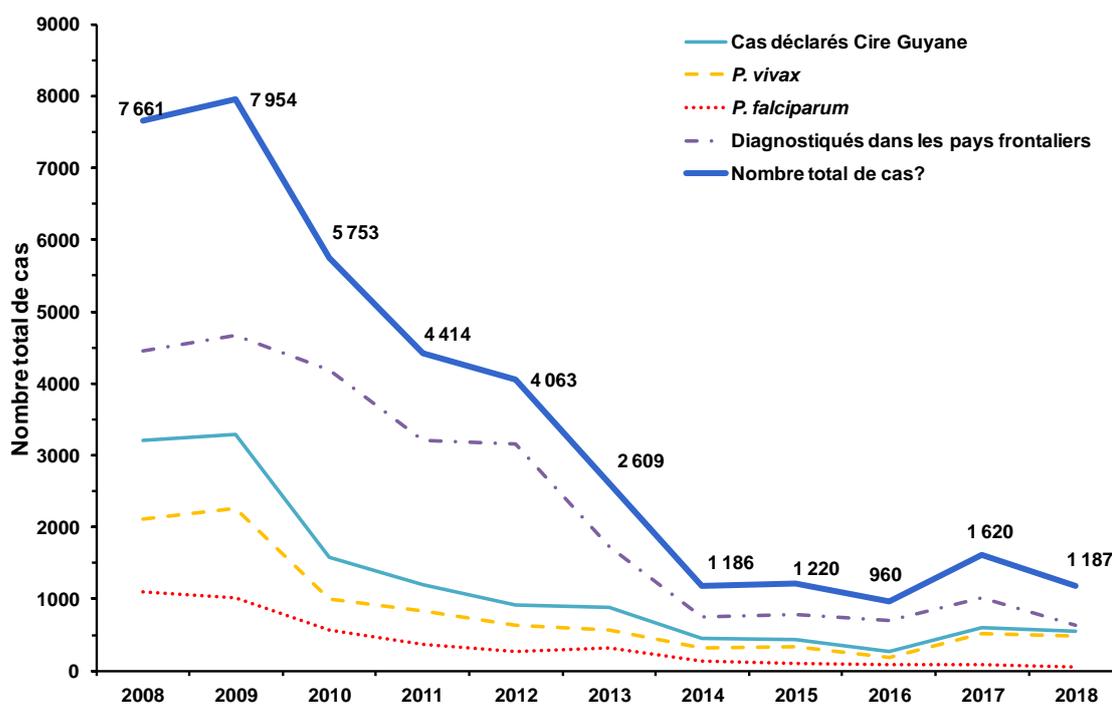
Figure 17 : Évolution de la létalité globale chez les patients avec un accès grave de 2000 à 2018.

Les données d'utilisation, d'efficacité clinique et parasitologique, et de tolérance de l'artésunate intraveineux (ASIV) depuis sa mise à disposition en France (sources CNR du paludisme site Pitié Salpêtrière et données du Centre National de Pharmacovigilance) seront disponibles sur le site de l'ANSM dans quelques semaines

3.2.5. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

En Guyane

En Guyane, les zones de transmission du paludisme sont essentiellement localisées le long des fleuves à proximité des zones d'orpaillage (Maroni, Mana, Approuague et Oyapock, cf Figure 6). L'année 2018 a été marquée par un nombre important de cas recensés dans la commune de Saint Georges de l'Oyapock comme en 2017. Cette transmission est aujourd'hui essentiellement liée à *P. vivax* (89,38%, Figure 18). et est le reflet des forces et des faiblesses du plan de contrôle actuel. Forces car l'ARS coordonne activement ce programme et a récemment déployé une équipe mobile dans cette zone visant à améliorer la couverture par primaquine des patients atteints par *P. vivax*. Faiblesses en parties liée à la géographie guyanaise et aux profils des populations qui y habitent. En effet la transmission est saisonnièrement très active dans des quartiers reculés de St Georges de l'Oyapock tel que Blondin ou Trois Palétuviers. Dans ces quartiers, en cas de fièvre, les patients consultent tardivement pour des raisons financières notamment. Par ailleurs, l'étude Palustop a permis de mettre en évidence certaines lacunes en termes d'attitudes et de pratiques. Le volet éducation à la population doit être largement renforcé. Dans ce cadre, le CNR s'engage aux côtés de l'hôpital de Cayenne à développer des outils de communication adaptés aux publics ciblés. Ces actions sont soutenues financièrement par l'Europe et le Rotary club.



(Source Cire Guyane, Programmes Nationaux de lutte contre le paludisme, Brésil et Suriname).

Figure 18. Evolution du nombre de paludisme en Guyane entre 2008 et 2019.

Remarque : Les diagnostics réalisés dans certains Centre et/ou Poste de Santé ne permettent pas de différencier les infections à *P. vivax* des infections à *P. malariae*. Pour l'analyse des données, aux vues de l'épidémiologie du paludisme en Guyane, les infections notées "autre espèce que *P. falciparum*" ont été analysées comme des infections à *P. vivax*.

La Figure 18 représente le nombre de cas déclarés à la Cire Guyane mais également les cas recensés dans les pays frontaliers et étiquetés comme venant de Guyane. On peut constater que les tendances sont concordantes ce qui conforte le système de surveillance mis en place par la CVAGS en Guyane en remplacement de la déclaration obligatoire et qui se veut exhaustif. La tendance est donc juste et inclut forcément des accès en provenance des zones orpaillées, cas pour certains diagnostiqués à l'étranger.

3.3. Surveillance de la résistance de *P. falciparum* aux antipaludiques

3.3.1. Chimiosensibilité de *P. falciparum* d'importation

3.3.1.1. Chimiosensibilité *in vitro*

En 2018, la chimiosensibilité *in vitro* de 430 isolats à *Plasmodium falciparum* a été déterminée vis-à-vis d'au moins un antipaludique (Chloroquine, Monodéséthylamodiaquine, Quinine, Méfloquine, Luméfantrine, DihydroArtémisinine (DHA), Pyronaridine, Pipéraquline, ou Doxycycline) par incorporation d'hypoxanthine tritiée ou par un test ELISA. Les données portent sur la totalité de ces isolats car très peu ont été soumis à une pression médicamenteuse par auto-traitement ou chimioprophylaxie avant prélèvement.

Le Tableau 13 présente les seuils de résistance appliqués à l'étude de la sensibilité des isolats aux antipaludiques ainsi que le pourcentage d'isolats ayant montré des CI_{50} (concentration inhibant 50% de la croissance parasitaire) supérieures aux seuils.

Tableau 13 : seuils de chimiosensibilité et répartition des isolats testés en fonction de leur CI₅₀ aux antipaludiques

Molécule antipaludique	Nombre d'isolats *	Seuil de résistance	% d'isolats avec une CI ₅₀ > seuil		
			2017	2018	Références
Chloroquine	421	100 nM	14,3%	16,2%	Dedet et al., 1988
Amodiaquine	421	60 nM	7,5%	13,8%	Ringwald et al., 1998
Quinine	402	800 nM	0,2%	0,2%	Basco & Le Bras, 1994
Méfloquine	426	40 nM	39,1%	16,7%	Brasseur et al., 1990
Luméfantine	413	150 nM	-	-	Pradines et al., 1999
DHA	424	12 nM	3%	0,2%	Basco & Le Bras, 1993
Pyronaridine	161	60 nM	3,2%	1,2%	Pascual et al., 2015
Pipéraquline	397	90 nM	0,3%	0,8%	Amato et al., 2017
Doxycycline	430	35 µM	8%	6,5%	Briolant et al., 2009

* nombre d'isolats analysés en 2018

Le pourcentage d'isolats résistants à l'amodiaquine a progressé de 6,3% en 2018. En revanche, ce pourcentage a diminué de 22,4% pour la méfloquine. Le nombre d'échantillons de sensibilité diminuée aux autres molécules reste stable.

Les CTA étant utilisés en première ligne en France pour traiter les cas de paludisme non compliqués, une analyse croisée des CI₅₀ à la DHA *versus* pipéraquline (Figure 19) ou *versus* amodiaquine (Figure 20) a été réalisée : aucun isolat ne présente de diminution de sensibilité aux antipaludiques impliqués dans les CTA. La luméfantine, ne présentant aucune valeur supérieure au seuil fixé, n'a pas été retenue pour cette étude.

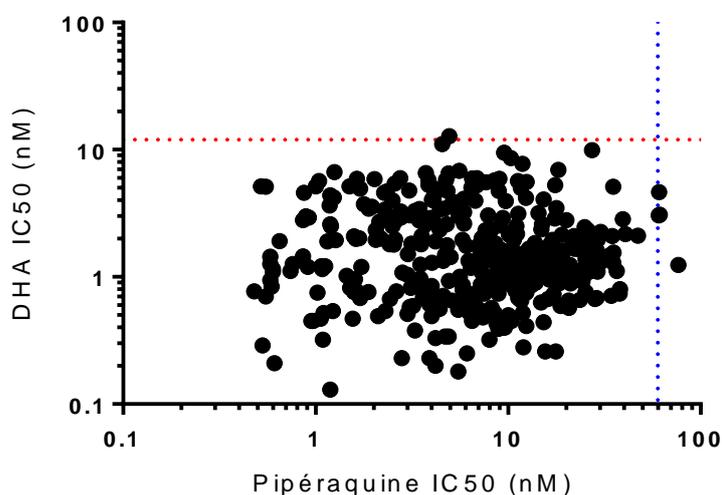


Figure 19 : Répartition croisée des CI₅₀ de la DHA et de la pipéraquline.

Répartition des isolats cliniques en fonction des valeurs de CI₅₀ de la pipéraquline (en abscisse) et des valeurs de CI₅₀ de la DHA (en ordonnées). Le trait en pointillé rouge représente le seuil de résistance à la DHA (12nM) et le trait en pointillé bleu le seuil de résistance à la pipéraquline (90 nM).

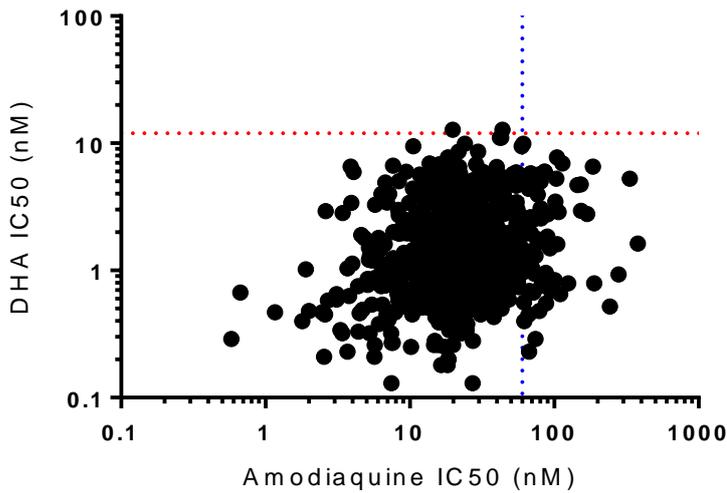


Figure 20 Répartition croisée des CI_{50} de la DHA et de l'amodiaquine.

Répartition des isolats cliniques en fonction des valeurs de CI_{50} de l'amodiaquine (en abscisse) et des valeurs de CI_{50} de la DHA (en ordonnées). Le trait en pointillé rouge représente le seuil de résistance à la DHA (12nM) et le trait en pointillé bleu le seuil de résistance à l'amodiaquine (60 nM).

L'analyse des CI_{50} à l'amodiaquine et des génotypages du codon 86 du gène *Pfmdr1* (Figure 21) montre une association significative entre la diminution de la sensibilité à l'amodiaquine et le génotype N86 du gène *Pfmdr1* alors que les isolats sensibles à l'amodiaquine sont associés au génotype 86Y du même codon.

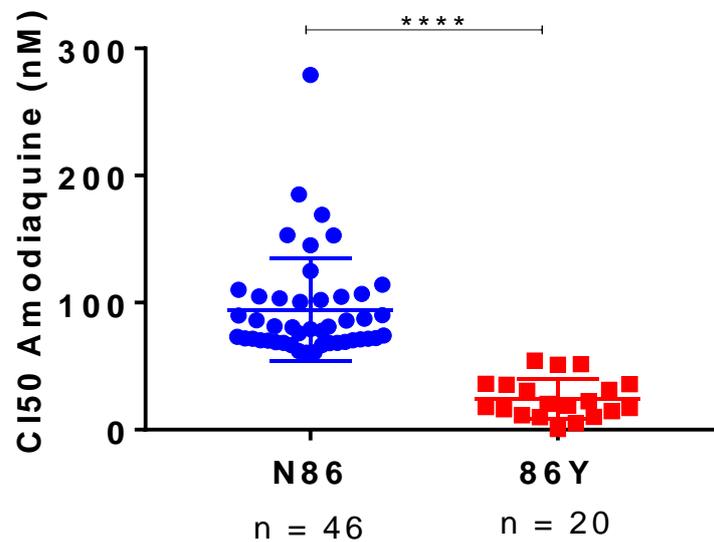


Figure 21 : Répartition des CI_{50} de l'amodiaquine entre les génotypes sauvages et mutés en position 86 du gène *Pfmdr1*.

Répartition des isolats cliniques en fonction des valeurs de CI_{50} de l'amodiaquine (en abscisse) et des valeurs de CI_{50} de la DHA (en ordonnées). Le trait en pointillé rouge représente le seuil de résistance à la DHA (12nM) et le trait en pointillé bleu le seuil de résistance à l'amodiaquine (60 nM).

- **Evolution des phénotypes en 2018**

En 2018, les isolats importés de *P. falciparum* ont montré une sensibilité *in vitro* conservée vis à vis des molécules recommandées comme première ligne de traitement en France comme l'association

artémether-luméfantrine ou l'association artéménone (DHA)-pipéraquline. La proportion de souches résistantes à la chloroquine est stable. Parmi les molécules recommandées en prophylaxie, la proportion des souches dont les sensibilités à la doxycycline et surtout à la méfloquine sont diminuées, doit être surveillée avec attention. L'absence d'échec prophylactique vrai associé à ses souches ne permet pas de corréliser cette observation *in vitro* à une diminution d'efficacité *in vivo*, les seuils de résistance admis n'étant que des seuils épidémiologiques. On observe une augmentation du nombre de souches de sensibilité diminuée à l'amodiaquine, qui n'est pas recommandée en France, mais dont l'usage en Afrique sub-saharienne peut exposer à des échecs thérapeutiques tardifs d'accès traités en zone d'endémie, qui seront révélés en France.

3.3.1.2. Génotypage des isolats

En 2018, les études de génotypage ont portées sur 1024 isolats pour lesquels au moins un marqueur moléculaire de résistance a été analysé.

3.3.1.2.1. La mutation 76 du gène *pfcr1* : résistance à la chloroquine

En 2018, parmi les 800 isolats génotypés pour *pfcr1*, la proportion d'isolats sauvages *pfcr1*76 est de 79,5% (71,6% en 2017, 66,3 en 2016, 64,7% en 2015, 59,9% en 2014, 54,8% en 2013, 52,5% en 2012, 44,4% en 2011, 50,5% en 2010, 43,1% en 2009, 43,2% en 2008). Ces résultats montrent en 2018 une poursuite de la tendance observée les années précédentes avec une diminution de la proportion de souches résistantes à la chloroquine.

La proportion d'isolats sauvages et mutés pour chaque pays est présentée en annexe. Le Bénin (43%), le Congo (56%), le Gabon (39%), la Guinée (64%) et le Sénégal (46%) présentent encore de fortes proportions d'isolats mutés.

3.3.1.2.2. La mutation du gène *pfcytb* : résistance à l'atovaquone

Aucun des 79 isolats génotypés prélevés à J0 n'est muté. Parmi les deux échecs thérapeutiques tardifs à l'atovaquone-proguanil déclarés en 2018, les isolats correspondants (J0 et Jéchec) ne sont pas mutés pour un des cas, et les isolats de l'autre cas sont en cours d'expertise.

3.3.1.2.3. La mutation du gène *pfmdr1* : résistance à la méfloquine et à la luméfantrine

En 2018, parmi les 942 isolats génotypés pour *pfmdr1*, la proportion d'isolats sauvages *pfmdr1* est de 91% pour le codon 84 et de 45% pour le codon 184.

La proportion d'haplotypes N86-184F (sélectionnés dans les cas de résistance à l'association artémether-luméfantrine) est de 48% au total. Cet haplotype est identifié avec des taux supérieurs à 50% au Bénin (65%), au Burkina-Faso (61%), au Cameroun (52%), en Centre Afrique (60%), en Côte d'Ivoire (58%), au Sénégal (53%) et au Togo (54%). La prévalence de cet haplotype est très faible aux Comores (2%).

La proportion d'haplotypes 86Y-Y184 (sélectionnés dans les cas de résistance à l'association dihydroartémisinine-pipéraquline) est de 4%. Cet haplotype est essentiellement identifié aux Comores (26%), au Mali (8%) et au Congo (8%).

Les proportions d'isolats mutés *pfmdr1* N86Y et Y184F pour chaque pays et par année depuis 2014 sont présentées en annexe. Les proportions d'haplotypes N86-184F et 86Y-Y184 sont présentées en annexe pour les pays ayant plus de 20 cas de paludisme.

Aucun n'échantillon n'est muté en 1034 et 1042. 6 isolats (0,65%) sont mutés en position 1246 (D1246Y) dont 4 provenant des Comores (7% de l'ensemble des isolats des Comores), 1 du Mali et un du Rwanda. Cette mutation n'est pas associée à l'haplotype N86-184F.

3.3.1.2.4. Les mutations du gène *pfdhfr* : résistance aux antifoliniques

En 2018, l'étude du gène *pfdhfr*, impliqué dans la résistance au proguanil, a été réalisée pour 448 isolats de *P. falciparum*. La proportion d'isolats triple mutés *pfdhfr* S108N, N51I, C59R est de 86,6% (83,5% en 2017). Les proportions d'isolats avec des triples mutations (S108N, N51L et C59R) sont relativement stables et élevés depuis 2008 (> 80%). Seuls les échantillons en provenance des Comores présentent une proportion de souches inférieure à 50% (37%). La plupart des pays ont un taux supérieur à 90%.

La proportion d'isolats triple mutés *pfdhfr* S108N, N51I, C59R pour chaque pays et par année depuis 2013 est présentée en annexe.

3.3.1.2.5. Polymorphisme du gène K13-propeller

En 2017, le gène K13 impliqué dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine, a été séquencé pour 962 isolats de *P. falciparum* parmi lesquels un seul isolat (Cambodge) présentait une mutation associée à la résistance aux dérivés de l'artémisinine (C580Y). Cet isolat correspondait à un échec thérapeutique tardif après un traitement par arténimol-pipéraquline au Cambodge, confirmant la circulation de souches résistantes à ces deux molécules dans ce pays.

3.3.1.2.6. Evolution des génotypes en 2018

Au cours de ces dernières années, la proportion d'isolats sauvages pour la mutation *pfcr76* a progressé passant de 35,4% en 2006 à 79,5% en 2018. La diminution de la pression médicamenteuse dans les pays d'endémie africains avec l'utilisation des combinaisons thérapeutiques de dérivés d'artémisinine en première ligne de traitement en est l'explication la plus probable. Cependant, de fortes proportions d'isolats mutés restent observées dans un certain nombre de pays comme au Bénin (43%), au Congo (56%), au Gabon (39%), en Guinée (64%) et au Sénégal (46%).

L'haplotype N86-184F sur *pfmdr1* est sélectionné dans les échecs cliniques à l'artéméther-luméfántrine. Cette résistance est renforcée lorsque cet haplotype est associé à une mutation en position 1246. La proportion d'haplotypes N86-184F est supérieure à 50% dans un certain nombre de pays (Bénin, Burkina-Faso, Cameroun, Centre Afrique, Côte d'Ivoire, Sénégal et Togo) mais en l'absence de mutation en position 1246. Ces résultats suggèrent qu'un certain nombre de souches sont résistantes à la luméfántrine mais toujours sensibles à l'artéméther, se traduisant par l'absence de résistance à l'association artéméther-luméfántrine en Afrique. La prévalence de l'haplotype N86-184F est très faible aux Comores (2%).

L'haplotype 86Y-Y184 (sélectionné dans les cas de résistance à l'association dihydroartémisinine-pipéraquline) est identifié aux Comores (26%), au Mali (8%) et au Congo (8%) mais n'est pas associé à la mutation en position 1246.

Ces données montrent qu'il est nécessaire de maintenir une surveillance accrue de la prévalence des différents marqueurs moléculaires de résistance.

86,6% des isolats sont mutés sur *pfdhfr* (S108N, N51I, C59R) impliquant une résistance élevée à la pyriméthamine.

Les mutations du gène K13 impliqués dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine en Asie du Sud-est ne sont pas détectées sur les souches africaines.

3.3.2. Surveillance des résistances de *P. falciparum* aux antipaludiques en Guyane

En 2018, le profil de résistance à onze molécules de *P. falciparum* a été déterminé selon la technique du semi-microtest isotopique. Parmi les 44 prélèvements de *P. falciparum* reçu en 2018 (incluant les deux isolats présentant une infection mixte *falci/vivax*), le LA-ZE a pu évaluer la chimiosensibilité de 28 d'entre eux, les échantillons en doublons ou isolé chez le patient peu de temps après le J0 ne sont pas présentés dans cette analyse de manière à ce pas biaiser les tendances. En 2017, 25 isolats n'avaient pas pu être caractérisés faute de temps. Ils l'ont été en 2018.

Les résultats sont présentés sous forme résumée au niveau de la Figure 3. La répartition des valeurs et les tendances sur l'ensemble des données disponibles sont présentés dans l'annexe de ce document.

Au-delà des tests isotopiques, le laboratoire maîtrise la mise en œuvre de tests de survie permettant d'évaluer la sensibilité aux artémisines. C'est à ce jour l'unique méthode permettant d'évaluer la résistance telle qu'elle est définie actuellement. Ces tests évaluent la capacité des parasites à survivre à une exposition de 6h à 600nM de dihydro-artémisinine. Un isolat est considéré résistant quand son taux de survie est supérieur à 1%. Cette technique très exigeante (début de la manipulation 1h du matin, lavage à 20h et fin à 15h trois jours plus tard) est mise en œuvre de façon intensive depuis 2015. Ceci nous a permis d'obtenir les résultats présentés Figure 22.

Au total plus de 135 isolats ont ainsi pu être caractérisés. Le nombre de tests non interprétables est d'environ 18%. De nombreux isolats ont été testés plusieurs fois de façon à évaluer la reproductibilité de la technique. Nous avons notamment contrôlé tous les isolats faisant l'objet d'un taux de survie supérieur à 1%. Il s'est avéré que les isolats lorsqu'ils étaient testés une deuxième fois étaient rarement confirmés résistants (87%). Deux hypothèses pourraient expliquer cette variabilité : i) un seuil de tolérance trop faible (cf comparaison avec les souches cambodgiennes) ou ii) un phénomène de tolérance existant dans les isolats de Guyane mais de manière transitoire et non stable. Nous poursuivons nos recherches sur ce point afin de tester ces hypothèses.

La zone du plateau des Guyanes est une région à haut risque d'émergence des résistances aux dérivés de l'artémisinine ce qui explique l'investissement du laboratoire dans ses activités de caractérisation et l'étude de la résistance vis-à-vis de ces antipaludiques. Cet investissement s'étend d'ailleurs au-delà des frontières guyanaises.

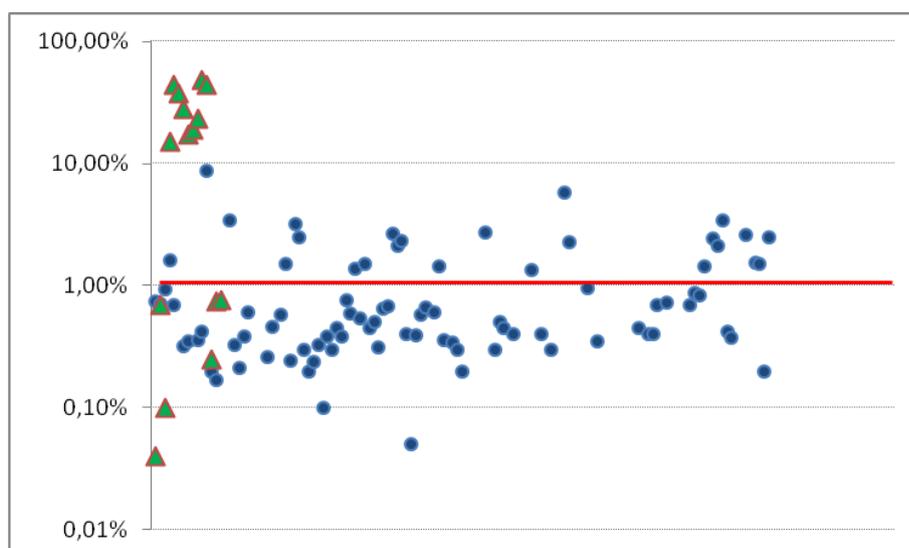


Figure 22 : Taux de survie observés entre 2013 et 2018 auprès de 135 isolats.

La ligne rouge représente le seuil de résistance. Les cercles représentent les valeurs obtenues à partir des isolats de Guyane, les triangles verts celles obtenues à partir de souches de référence sensible (3D7) ou résistantes en provenance du Cambodge.

Génotypage des isolats

En 2018, le LA-ZE a analysé les marqueurs de résistance associés à la résistance à l'atovaquone et aux dérivés de l'artémisinine, à savoir le codon 268 du gène *pfcytb* et la région propeller du gène *pfK13*. Aucune mutation sur le codon 268 du gène *pfcytb* conférant la résistance à l'atovaquone/proguanil (Malarone[®]) n'a été observée chez les 50 isolats étudiés pas plus que dans leur partie propeller du gène *pfK13*.

3.3.3. Surveillance des résistances de *P. falciparum* aux antipaludiques à Mayotte

Les données du paludisme d'importation à Mayotte (42 isolats) ont été analysées avec les données du paludisme d'importation en France. Seules les données de génotypage des isolats du paludisme local introduit ou non (4 échantillons) sont présentées dans ce paragraphe.

En raison de l'éloignement géographique et des contraintes de transport et d'acheminement, seuls les génotypes ont été réalisés.

En 2018, aucun isolat n'est muté sur le codon 76 du gène *pfprt*, suggérant une sensibilité importante à la chloroquine (comme aux Comores avec 100% de souches sauvages).

Aucune mutation sur les codons 86, 184, 1034, 1042 et 1246 du gène *pfmdr1*, avec 100% d'haplotype NYSND, suggérant le maintien d'une excellente efficacité de l'association artéméter-luméfantrine ou dihydroartémisinine-pipéraquline, renforcée par l'absence des mutations sur pfK13 décrites comme impliquées dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine en Asie.

3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

3.4.1. Contribution à la surveillance du paludisme autochtone

Le CNR participe à la surveillance du paludisme transfusionnel par sa participation aux réunions entre l'EFS (Etablissement Français du Sang) – le CNR des risques infectieux transfusionnels – l'ASFP (Agence de Santé Publique France).

3.4.2. Contribution à la surveillance du paludisme d'importation

Le CNR participe au réseau EuroTravNet (European Travel Medicine Network) (Dr P Parola) initié par l'International Society of Travel Medicine, collabore avec le laboratoire national anglais (Pr P Chiodini), le réseau des Instituts Pasteur de surveillance des antipaludiques (Dr. D. Ménard), le réseau WWARN (Dr P. Guérin), les CDC d'Atlanta (Dr Kumar), l'OMS (Dr Pascal Ringwald, Dr Keith Carter). Les données du CNR relative au paludisme en France sont annuellement transmises à l'ECDC (Dr W Van Bortel) et à l'OMS Europe pour enrichir la base CISID (Centralized Information System for Infectious Diseases).

3.4.3. Contribution à la surveillance du paludisme endémique

Les interactions SPF/Pôle Zones Endémiques s'effectuent par l'intermédiaire du bureau en région, la Cire Guyane ou plus rarement directement avec le département des maladies infectieuses. Les membres de la Cire sont en charge du recueil exhaustif des données épidémiologiques concernant les cas de paludisme diagnostiqués en Guyane dans l'ensemble des centres de diagnostic à savoir : CDPS, LBM et hôpitaux. Cette mission de recueil est assurée par une équipe composée de membre de la Cire AG et de l'ARS au sein de la Plateforme de Veille, d'Alerte et de Gestion Sanitaire (PVAGS). Cette plateforme fait suite à la création des agences régionales de santé en 2010. Elle a repris les missions de l'ancienne cellule de veille sanitaire. Elle a pour vocation d'assurer un dispositif de qualité de réception et de traitement des signaux par des équipes pluridisciplinaires intra ou extra institutionnelles, avec un appui permanent et la mobilisation des compétences d'évaluation et d'investigation de SPF. Ses missions reposent spécifiquement sur des activités de surveillance, d'investigations épidémiologiques, d'évaluation de risque et de coordination de la gestion. Ainsi, toutes les observations inhabituelles (résistance, foyer épidémique important...) font l'objet d'un signalement de la part du Pôle Zones Endémiques auprès de la PVAGS et de SPF selon des modalités bien définies (cf § Alerte). Concernant le paludisme en Guyane, la déclaration hebdomadaire à la PVAGS des cas diagnostiqués fait office de déclaration obligatoire. Régulièrement, la Cire Guyane publie une analyse des données épidémiologiques collectées en Guyane sous forme d'un Point Epidémiologique Périodique (PEP) ou, annuellement dans le Bulletin de Veille Sanitaire (BVS)

3.4.4. Contribution à la surveillance internationale en tant que Centre Collaborateur de l'OMS pour la surveillance des résistances aux antipaludiques qu'est le laboratoire de parasitologie

Depuis 2014, le laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane est Centre Collaborateur de l'OMS pour la surveillance des résistances aux antipaludiques. Cette désignation a été renouvelée en 2018 pour quatre ans. A ce titre, le laboratoire intervient dans la surveillance des résistances et de la pertinence des outils diagnostics sur le plateau des Guyanes et en Amazonie en général. Les échanges sont ainsi réguliers avec les Ministères de la santé des pays concernés, le bureau en charge du paludisme de la PAHO basé à Washington DC et le programme global de lutte contre le paludisme de l'OMS basé à Genève.

Par ailleurs, le laboratoire reste membre du réseau RAVREDA regroupant l'ensemble des pays endémique des Amériques. Des réunions sont régulièrement organisées dans ce cadre ou dans des

cadres plus restreint en fonction de l'actualité du paludisme dans la zone. Ainsi en novembre 2018, une réunion a été organisée à Washington DC regroupant l'ensemble des responsables de programmes. Le Pôle Zones Endémiques y a effectué une présentation orale l'état de la résistance dans la zone

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

3.5.1 ELIMALAR / PALUSTOP

Porteur de projet : L. Musset

Collaborations : E. Mosnier, UMIT, Hôpital de Cayenne
Pr F. Djossou, Hôpital de Cayenne
Association de santé communautaire DAAC
E. Roux, Unité Espace-dev, IRD Montpellier
D. Fidock, Columbia University
D. Neafsey, Harvard University
Ministères de la santé du Guyana et du Venezuela...

Financements : FEDER, Rotary international, PAHO/WHO

En Guyane, le paludisme est aujourd'hui essentiellement retrouvé : i) au niveau des zones orpaillées et, ii) dans des foyers de transmission dits « autochtones » situés dans certains quartiers et/ou villages de la commune de Saint Georges de l'Oyapock (village Trois Palétuviers, quartier Espérance, village Blondin) ou le long du Maroni (Talhuen, Twenké).

Le projet ELIMALAR vise à évaluer différentes approches/outils pour améliorer la lutte contre le paludisme en Guyane et tendre le plus rapidement possible à son élimination dans ces quartiers. Il a pour finalité d'**orienter et d'accompagner les décideurs en santé publique lors du passage de la phase de contrôle de la maladie à une phase d'élimination du paludisme en Guyane (Figure 23).**



Figure 23. Stratégie de lutte contre le paludisme dans une région en fonction du niveau de transmission.

De manière schématique, ce changement de phase s'opère une fois que le paludisme est suffisamment contrôlé dans une zone (sur la base du nombre de cas déclarés). Il implique un changement d'approche en ciblant les patients porteurs de parasites dans les poches résiduelles de transmission afin de stopper définitivement le paludisme. Que les approches soient ciblées ou généralistes, elles reposent toutes sur des méthodes diagnostiques performantes et des traitements fiables et efficaces.

Ainsi, ce projet comporte deux axes visant à répondre à deux questions :

1. **REAGIR** ou est-ce les associations d'antipaludiques à base de dérivés de l'artémisinine (ACT) associé à une molécule partenaire (luméfantrine ou pipéraquline) aujourd'hui recommandées dans le monde entier et utilisées en Guyane pour traiter les patients sont toujours efficaces et si oui, pour combien de temps ?
2. **PALUSTOP** ou est-ce que la mise en place d'un dépistage actif ciblé sur toutes les personnes vivant en zone de transmission en Guyane est pertinente, rentable et efficace ?

Axe 1. PALUSTOP : Intérêt des stratégies de dépistage actif et de traitement des porteurs asymptomatiques en zone de transmission autochtone

Ce projet s'intéresse à la prévalence du paludisme en population guyanaise. Ce projet inclura : i) une étude des vecteurs présents sur site en lien avec l'unité d'entomologie médicale et le financement qu'elle a obtenu auprès des fonds européens FEDER, programme de recherche CONTROLE ; ii) un dépistage actif en population humaine auprès de 1 500 habitants des quartiers de Saint Georges de l'Oyapock où l'incidence est la plus élevée. Enfin, les facteurs environnementaux seront analysés à l'aide de cartes d'occupation des sols et des déplacements déclarés par les personnes impaludées.

Distribution hétérogène de *Plasmodium vivax* et de *falciparum* à la frontière entre le Brésil et la Guyane

Porteur de projet : E. Mosnier, UMIT, Hôpital de Cayenne
Collaborations : O. Moriceau, L. Musset, Y. Lazrek-Sandot, CNR Paludisme
Pr F. Djossou, Hôpital de Cayenne
Association de santé communautaire DAAC
E.. Roux, Unité Espace-dev, IRD Montpellier

La Guyane et sa frontière est avec le Brésil étaient considérées comme une zone de transmission du paludisme faible à modérée. Les enquêtes de prévalence par PCR récentes ont montré la présence de porteurs asymptomatiques. En effet, dans la perspective de l'élimination du paludisme, il est recommandé de caractériser ce réservoir infectieux. Une enquête transversale a été menée entre octobre et décembre 2017 auprès des habitants de St Georges de l'Oyapock. La prévalence de *Plasmodium spp.* a été mesurée à l'aide de tests de diagnostic rapides (TDR) et PCR en temps réel. Les maisons ont été géoréférencées. La démographie, les antécédents médicaux enregistrés et analysés par grappes géographiques (SaTScan). Une analyse multivariée des facteurs de risque a également été réalisée. La PCR a montré que 100 des 1 501 participants étaient porteurs de *Plasmodium spp.* 90% de *P. vivax* (Pv) et 10% de *P. falciparum* (Pf). Seulement 13/1549 personnes étaient positives par TDR. La prévalence globale était de 6,66%, avec une variation importante entre les différents quartiers, de 0 à 29,5%. Soixante-quatorze pour cent des infections étaient asymptomatiques. Le risque de portage était significativement élevé dans trois quartiers (Trois Palétuviers: RR = 7,16, p <0,01, Blondin2: RR = 5,15, p = 0,002 et Adimo: RR = 12,43, p = 0,046). Dans l'analyse multivariée, un âge supérieur à 15 ans, vivre dans des quartiers reculés, l'anémie et la thrombopénie étaient indépendamment associés à une probabilité accrue de portage de *Plasmodium spp.* Les porteurs du paludisme vivaient souvent dans des régions éloignées, près de la forêt. Ces résultats mettent en évidence une vulnérabilité particulière de certains territoires au paludisme, tout particulièrement ceux situés le plus loin des centres de soins. Un retard au diagnostic pourrait expliquer un entretien et une poursuite assez importante de la transmission du paludisme.

Attitudes et pratiques vis-à-vis du paludisme, mieux les connaître afin de les améliorer

Porteur de projet : L. Musset,
Collaborations : O. Moriceau
E. Mosnier, Pr F. Djossou, Hôpital de Cayenne
Association de santé communautaire DAAC
Financement : Rotary club International

Au cours de la campagne de dépistage actif PALUSTOP de 2017, une enquête attitudes et pratiques a également été conduite. Les résultats de cette enquête montrent des connaissances sur le paludisme limitées. Dénoncer davantage l'épidémiologie du paludisme en identifiant rapidement l'infection asymptomatique symptomatique peut permettre aux politiques publiques de définir des interventions susceptibles d'accélérer les efforts d'élimination. Rotary

éducation à la population. L'un des objectifs du CNR Paludisme en lien avec l'Hôpital de Cayenne est de développer des moyens de communication innovants, ciblant les connaissances identifiées et adaptées à la culture et à l'âge de la population ciblée. Des tests sont actuellement en cours autour de petites images dessinées et animées à diffuser sur les réseaux sociaux, ou encore des séances de photo-langage ou de théâtre forum. Les moyens les plus pertinents seront ensuite proposés à l'ARS pour diffusion et utilisation plus globale, à l'échelle du plan.

Axe 2. REAGIR : Les ACTs sont-elles encore efficaces en Guyane et si oui, pour combien de temps ?

La deuxième partie de ce projet vise à déterminer si les associations d'antipaludiques à base de dérivés de l'artémisinine (ACT) associés à une molécule partenaire (luméfantrine ou pipéraquline) aujourd'hui recommandées dans le monde entier et utilisée en Guyane pour traiter les patients sont toujours efficaces et si oui, pour combien de temps ?

REAGIR : Etude de la résistance aux artémisinines au Guyana.

Collaborations: Dr Horace Cox - Ministère de la santé publique du Guyana
WHO/GMP - P. Ringwald
D. Fidock - Columbia University
D. Neafsey - Harvard University
Y. Kumar - CDC Atlanta

Cf Annexe 3.

REAGIR : Etude de l'épidémiologie moléculaire de pfk13 sur le plateau des Guyanes.

Collaborations: Ministère de la santé du Venezuela
Ministère de la santé publique du Guyana
M. Lacerda, Fondation de Médecine Tropicale Hector Dourado, Manaus, Brésil

Cf Annexe 3.

3.5.1. Mise en place d'un laboratoire de chimiosensibilité *in vitro* à l'Hôpital Principal de Dakar (Sénégal) et évaluation du niveau de résistance aux antipaludiques au Sénégal

L'état-major des Armées en le Service de Santé des Armées Françaises a financé en 2008 la création et le développement d'un laboratoire d'étude de la chimiosensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux antipaludiques à l'hôpital militaire Sénégalais de Dakar, Sénégal (HPD). Une étude d'évaluation de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux antipaludiques est réalisée chaque année depuis 2009 à Dakar ainsi qu'une évaluation des marqueurs moléculaires de résistance. En 2018, nous avons identifié 42,5% de souches ayant un haplotype CVIET sur *pfcr1* (positions 72-76) associé à la résistance à la chloroquine, 83,3% d'isolats ayant un haplotype IRNI sur *pfdhfr* (position 108, 51, 59, 164) associé à la résistance à la pyriméthamine, 90,9% de souches ayant un haplotype NF sur *pfmdr1* (position 86 et 184) associé à une diminution de sensibilité à la luméfantrine, 0% ayant un haplotype YY sur *pfmdr1* (position 86 et 184) associé à une diminution de sensibilité à la pipéraquline, et 0% de mutation sur le gène *pfK13* associé à la résistance à l'artémisinine et à ses dérivés.

Robert MG, Foguim Tsombeng F, Gendrot M, Diawara S, Madamet M, Kounta MB, et al. Baseline ex vivo and molecular responses of *Plasmodium falciparum* isolates to piperaquine before implementation of dihydroartemisinin-piperaquine in Senegal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63:e02445-18.

3.5.2. Surveillance de la résistance aux antipaludiques au Congo et au Gabon

Une évaluation rétrospective a été réalisée sur des isolats collectés au Gabon entre 2011 et 2014 et sur des isolats collectés au Congo entre 2010 et 2015.

Il n'y a pas de diminution significative des souches résistantes à la chloroquine (CVIET sur *pfcr1*) avec des taux toujours supérieurs à 90% au Gabon. Plus de 89% des isolats sont résistants à la pyriméthamine. Certains isolats présentent des mutations sur le gène *pfK13* (1,7% ; A578S, A494V et V504A) mais qui ne sont associées à la résistance à l'artémisinine.

Entre 2010 et 2015, la proportion d'isolats résistants à la chloroquine a augmenté de 15 à 62% au Congo. En 2015, 43% des isolats sont de sensibilité diminuée à la luméfantine (haplotype N86-184F sur *pfmdr1*). L'haplotype (IRNI sur *pfdhfr*) associé à la résistance à la pyriméthamine est évalué à 87,5% en 2015. Aucune mutation n'est identifiée sur le gène *pfK13* au Congo.

Voumbo-Matoumona DF, Kouana LC, **Madamet M**, Maghendji-Nzondo S, **Pradines B**, Lekana-Douki JB. Prevalence of *Plasmodium falciparum* antimalarial drug resistance genes in Southeastern Gabon from 2011 to 2014. Infect Drug Resist. 2018;11:1329-1338.

Voumbo-Matoumona DF, Akiana J, **Madamet M**, Kouana LC, Lekana-Douki JB, **Pradines B**. High prevalence of *Plasmodium falciparum* antimalarial drug resistance markers in isolates from asymptomatic patients from the Republic of the Congo between 2010 and 2015. J Glob Antimicrob Resist, 2018,14:277-283.

3.5.3. Evaluation du paludisme en Mauritanie

Depuis fin 2010, nous évaluons la prévalence et la morbidité dues au paludisme à *P. falciparum* et à *P. vivax* en Mauritanie associées à une évaluation entomologique des vecteurs et à une évaluation du niveau de résistance aux antipaludiques.

3.5.4. Evaluation de kits de tests de diagnostic rapide (TDR) du paludisme

En novembre 2017, les services d'approvisionnement des armées françaises mettent en dotation un nouveau TDR (SD Malaria Ag Pf/Pan, SD Bionline Alere Abbott) en remplacement du TDR (Core Malaria Pan/Pv/Pf, Core Diagnostics LDT distribué par Biosynex). Dès sa mise à disposition, l'Unité parasitologie et entomologie met en évidence une sensibilité moindre dans la détection de *P. falciparum* et de *P. vivax*. Nous avons été donc chargés par la Direction centrale du service de santé des armées d'évaluer la performance de ces TDR. Dix TDR ont été sélectionnés parmi les plus performants en analysant les dernières recommandations de l'Organisation mondiale de la santé sur les performances de détection des *P. falciparum* et *P. vivax* par les kits TDR [WHO. Malaria rapid diagnosis test performance: results of WHO testing of malaria RDTs: round 7 (2015-2016). Geneva, World Health Organization, 2017] et ayant le label CE et disponibles en France. 165 isolats (79 *P. falciparum*, 37 *P. vivax*, 22 *P. ovale*, 21 *P. malariae* et 6 négatifs) ont été testés en parallèle sur les 10 kits. Le kit Carestart Malaria Pf/Pan (pLDH) Ag (Med G0121) est le plus performant pour la détection des paludismes à *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* alors que celui actuellement en dotation est le plus mauvais des 10 kits.

Rapport d'expertise, Gendrot M, **Mosnier J**, Fonta I, **Benoit N**, **Amalvict R**, **Madamet M**, **Pradines B**. Evaluation de la performance de tests de diagnostic rapide (TDR) dans le cadre du diagnostic de paludisme en Opérations extérieures. 19 mars 2019.

3.5.5. Impact du polymorphisme des séquences codantes des protéines HRP2/HRP3 sur les performances des TDR

Des souches sud-américaines et africaines non sécrétrices d'HRP2 ont été décrites dans la littérature en zone d'endémie et quelques isolats ont également été rapportés dans le contexte de paludisme d'importation. L'étude du polymorphisme des séquences codantes pour les protéines parasitaires HRP-2/HRP-3 des isolats de *Plasmodium falciparum* associés à des tests de diagnostics rapides faussement négatifs dans le contexte du paludisme d'importation a été initiée au laboratoire coordinateur du CNR du paludisme. Les prélèvements répondant à ces critères, reçus entre 2014 et 2018 ont été inclus : l'acquisition des données et leur analyse est en cours.

3.5.6. Tendances épidémiologiques de l'incidence du paludisme d'importation en France métropolitaine, 1996-2016

En dépit des recommandations, adaptées chaque année, pour prévenir le paludisme chez les voyageurs qui se rendent dans des zones d'endémie, la France reste le pays industrialisé signalant le plus grand nombre de cas de paludisme importés. Une meilleure compréhension du contexte épidémiologique et de son évolution au cours des deux dernières décennies doit permettre de faire évoluer la stratégie de prévention. L'objectif de cette étude est ainsi d'étudier les tendances épidémiologiques des cas importés de paludisme en France métropolitaine dans la période de 1996 à 2016 pour expliquer la persistance d'une forte incidence de paludisme importé malgré les mesures préventives nationales.

Les tendances évolutives, en association avec l'âge, le sexe, l'ethnie, le but du voyage, l'espèce du paludisme, la gravité de la maladie, le taux de mortalité et les pays d'endémie visités ont été analysées chez 43 333 cas de paludisme chez des voyageurs civils vivant en métropole.

Parmi les cas inclus dans l'étude, 24949 étaient des hommes (62,4 %) et 8 549 étaient âgés de moins de 18 ans (19,9 %). Au total, 28658 cas de paludisme (71,5 %) concernaient des sujets d'origine Africaine et 1 618 cas (26,5 %) des sujets caucasiens. De 1996 à 2016, le nombre de cas de paludisme confirmés a culminé à 3 400 cas en 2000, puis à 1 824 cas en 2005 et s'est ensuite stabilisé à environ 1 720 cas de paludisme importé par des voyageurs résidants en France chaque année. Un total de 37 065 cas (85,5%) était dû à *Plasmodium falciparum*. La proportion de cas de paludisme chez les Africains est passée de 53,5 % en 1996 à 83,4 % en 2016, et la motivation la plus fréquente pour voyager était la visite d'amis et de parents (25 329 [77,1 %]; $P < 0,001$). La médiane de l'âge des patients a augmenté de 8 ans au cours de la période d'étude ($P < 0,001$). Cependant, malgré une augmentation de la proportion de cas graves, qui est passée de 131 cas (8,9 %) en 1996 à 279 (16,7 %) en 2016 ($P < 0,001$), la mortalité est restée stable, à environ 0,4 % au cours de la période.

Étant donné que l'augmentation de l'âge est associée à une augmentation de la gravité et de la mortalité du paludisme, il convient de renforcer les mesures visant à prévenir et détecter rapidement le paludisme importé chez tous les voyageurs. En outre, l'augmentation substantielle de la proportion de VFR africains entre 1996 et 2016, souligne l'importance pour les autorités publiques de mettre en œuvre des solutions efficaces et pour les voyageurs et les médecins de famille de redoubler d'efforts pour inciter ce groupe à utiliser des moyens préventifs contre le paludisme, tels que la protection personnelle antivectorielle et l'utilisation d'une chimioprophylaxie adaptée. Pour remédier à ces problèmes, il conviendrait de mener de nouvelles enquêtes afin de clarifier l'attitude des voyageurs à l'égard des mesures de prophylaxie contre le paludisme, d'identifier avec précision les obstacles à leur utilisation et de trouver de meilleurs moyens de surmonter ces obstacles.

Epidemiologic Trends in Malaria Incidence Among Travelers Returning to Metropolitan France, 1996-2016. **Eric Kendjo; Sandrine Houzé, Oussama Mouri, Aida Taieb, Frédérick Gay, Stéphane Jauréguiberry, Ilhame Tantaoui, Papa A. Ndour, Pierre Buffet, Martine Piarroux, Marc Thellier, Renaud Piarroux**, for the French Imported Malaria Study Group
JAMA Netw Open. 2019;2(4):e191691. doi:10.1001/jamanetworkopen.2019.1691

4. Alerte

4.1. Pôle Zones non Endémiques

Au CNR Pôle métropole, lorsqu'un membre du laboratoire décèle une déclaration de cas anormal ou un dossier d'intérêt (échec thérapeutique, interférence diagnostique,...), il le signale au responsable du laboratoire qui évalue l'information et la suite à donner. Si cet élément peut avoir des conséquences de santé publique, les autorités sanitaires sont informées.

Le CNR est en relation avec le Département des Maladies Infectieuses de l'InVS.

4.2. Phénomènes ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte

En métropole

Trois cas suspects de paludisme autochtones ont été signalés à l'ARS et notifiés au CNR par ses correspondants et pour lesquels des échantillons sanguins ont été transmis pour expertise.

Cas n°1 : Un cas de paludisme autochtone à *P. falciparum*, confirmé par le CNR, a été diagnostiqué en région parisienne chez une personne originaire de Cote d'Ivoire, sans voyage récent en zone d'endémie. L'hypothèse d'un paludisme introduit à partir d'un bagage de retour de zone d'endémie, contenant probablement au moins un Anophèle infecté a été retenue. Il n'y a pas eu d'autres cas signalés au cours des semaines encadrant le diagnostic, laissant augurer d'un phénomène isolé. La patiente a été traitée avec succès.

Cas N°2 : Un cas de paludisme autochtone à *P. falciparum*, confirmé par le CNR, a été diagnostiqué en région PACA chez un patient originaire du Portugal, résident en France, sans antécédent de paludisme, avec, pour dernier séjour en ZE, un séjour au Cap-Vert à l'été 2013 à Praia dans l'île de Santiago. La famille habite au voisinage de l'aéroport international. Le prélèvement transmis au CNR a permis de confirmer le diagnostic. Il n'y a pas eu d'autres cas signalés au cours des semaines encadrant le diagnostic, laissant augurer d'un phénomène isolé en rapport probablement avec le transport d'un Anophèle infecté. Le patient a été traité avec succès.

Cas n°3 : Un cas de paludisme autochtone chez une patiente de 78 ans, prise en charge en novembre 2018 pour un neuropaludisme à *P. falciparum* (confirmé par le CNR Paludisme avec une parasitémie de 2,2%). Il s'agit d'une personne caucasienne, résidant en région parisienne, sans voyage rapporté en zone d'endémie. Les hypothèses d'une transmission nosocomiale suite à une intervention chirurgicale (sans transfusion sanguine) ou d'un paludisme introduit ont été émises mais l'enquête épidémiologique n'a pas permis de confirmer l'une ou l'autre.

Des cas suspects peuvent également être l'occasion d'échanges entre le CNR, l'ARS et l'InVS : des voyages non signalés sont fréquemment l'élément épidémiologique qui permet d'écartier un cas autochtone.

4.3. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

Phénomènes anormaux en Guyane

La procédure de signalement propre au Pôle Zones Endémiques est détaillée dans l'annexe 1 du présent rapport. L'année 2018 n'a pas été marquée par des phénomènes particuliers et/ou anormaux.

La caractérisation de l'épidémie ayant eu lieu à St Georges de l'Oyapock fin 2017 se poursuit avec une analyse de la diversité génétique des isolats à *P. vivax* pour mieux comprendre la dynamique de transmission. Ces résultats seront présentés et disponibles fin 2019.

5. Activités de rétro-information, de formation et de conseil

5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé

5.1.1. Pôle Zones non endémiques

Participation de S Houzé à l'enseignement en parasitologie du 1^{er} et 2^{ème} cycles des études pharmaceutiques, Paris Descartes, à l'enseignement des formations de Master 1 santé Paris 5, Master 2 microbiologie Paris Sud ; Master 2 Pharmacologie clinique et préclinique, Paris Descartes, DIU Médecine du voyage et santé des voyageurs.

Participation de M Thellier à l'enseignement en parasitologie du 1^{er} et 2^{ème} cycles des études médicales de Sorbonne Université UPMC, à l'enseignement des formations de Master 1 santé et Master 2 Parcours Microbiologie de Sorbonne Université, au DIU Médecine des voyages - santé des voyageurs des Universités Paris VI et Paris VII, au DU de médecine tropicale et humanitaire de l'Université de Rennes, à la Capacité inter Universitaire de Médecine Tropicale des Universités Paris V, VI et VII.

Participation de S. Houzé et de M. Thellier, au DES de biologie médicale, module parasitologie, université Paris Diderot et Paris Descartes ;

Participation de S Houzé au "Blood Safety Malaria Meeting Greece" sur la prévention du paludisme transfusionnel, à Athènes en mai 2018.

Participation de J. Clain à l'enseignement en parasitologie du 1^{er} et 2^{ème} cycles des études pharmaceutiques, Paris Descartes, à l'enseignement des formations de Master 1 Santé Paris 5 et Paris Diderot, Master 2 UPMC .

Participation de B Pradines aux cours de Master 2^{ème} année – Maladies transmissibles – Pathologies tropicales, module : Emergence et ré-émergence des maladies infectieuses, entomologie médicale – Faculté de Médecine de Marseille - Aix-Marseille II, *Génétique de Plasmodium et résistance aux antipaludiques*.

Participation de B Pradines, R Amalvict, N Benoit et J Mosnier à la formation « Actualité du paludisme dans les armées », EVDG & CESPA, « Tests de diagnostic rapide et résistance » au profit des militaires partant outre-mer.

Participation de B Pradines au MOOC « le paludisme », en charge du cours « la résistance aux antipaludiques », Université de la Méditerranée, Marseille.

Participation de S. Houzé, M. Thellier, Bruno Pradines, Lise Musset, et les membres du COPIL du CNR à la journée nationale du CNR du Paludisme (70 participants)

Guides élaborés

Les détails de la collaboration entre le LA-ZE et ses partenaires sont formalisés au sein de modalités pratiques de la surveillance du paludisme en Guyane. Ces modalités sont propres à chaque partenaire actif participant à la surveillance du paludisme en Guyane. Elles sont définies et approuvées par l'ensemble des partenaires, au cours des réunions de sensibilisation et d'échange. Leurs révisions périodiques sont rappelées par le système documentaire du laboratoire mis en place dans le cadre de la démarche d'accréditation selon la norme ISO 15189.

5.1.2. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

Les appels téléphoniques sont réceptionnés par les responsables du Pôle Zones Endémiques entre 8h et 18h du lundi au vendredi. Le volume de cette activité est en moyenne d'un appel par mois. Une adresse

mail propre au CNR a également été créée. Le volume de cette activité est en moyenne de cinq mails par mois.

Au cours de ses actions de sensibilisation, le Pôle Zones Endémiques en profite pour échanger avec les professionnels sur les différentes méthodes de diagnostic, les différentes actions à mettre en place dans le cadre du contrôle et de l'élimination du paludisme en Guyane et surtout l'actualité en termes de résistances aux antipaludiques.

Les détails de la collaboration entre le Pôle Zones Endémiques et ses partenaires sont formalisés au sein de modalités pratiques de la surveillance du paludisme en Guyane. Ces modalités sont propres à chaque partenaire actif participant à la surveillance du paludisme en Guyane. Elles sont définies et approuvées par l'ensemble des partenaires, au cours des réunions de sensibilisation et d'échange. Leurs révisions périodiques sont rappelées par le système documentaire du laboratoire.

Conformément aux nouvelles exigences de la biologie médicale, seuls les résultats de diagnostic de paludisme par PCR en temps réel sont rendus nominativement aux partenaires.

Une **rétro-information** est également organisée pour les partenaires du Pôle Zones Endémiques sous forme de bulletin qui a pour objectif de présenter :

- (i) le niveau de participation de chaque partenaire afin d'améliorer la représentativité des échantillons reçus ;
- (ii) le niveau de chimiorésistance du paludisme ;
- (iii) les actions et projets menés par le Pôle Zones Endémiques.

La périodicité de ce bulletin est annuelle. Le dernier bulletin paru est celui concernant l'année 2018 (cf. Annexe 7). Il est très largement diffusé par voie électronique à l'ensemble de nos partenaires (CDPS, Organisation Panaméricaine de la Santé, Cire-AG, ARS, InVS, DGS, SPF, médecins de ville...).

5.2. Conseil et expertise aux autorités sanitaires

5.2.1. Pôle Zones non Endémiques

Le laboratoire associé au CNR Paludisme de Marseille a émis des recommandations en 2018 pour le choix d'un test de diagnostic rapide pour une utilisation à Mayotte à la demande de l'ARS Océan Indien et pour une utilisation par les personnels du CNRS lors de missions à la demande du médecin-conseil du CNRS.

Le CNR Paludisme a de plus participé en 2018,

- aux réunions téléphoniques impliquant les ARS, la DGS, SPF sur les mesures à mettre en place suite aux signalements de deux cas de paludisme autochtone
- aux réunions impliquant l'EFS, le CNR des risques infectieux transfusionnels, SPF sur les mesures à mettre en place pour la prévention du paludisme transfusionnel
- à l'élaboration des avis du Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) relatifs aux recommandations pour les voyageurs
- à la révision de l'avis du HCSP sur le traitement radical par primaquine des accès palustres à *P. vivax* et *P. ovale*
- à la révision de la fiche d'information EFICATT sur le paludisme en collaboration avec l'INRS.

5.2.2. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

Le CNR Paludisme, Pôle Zones Endémiques participe à toutes les réunions organisées par les autorités de santé guyanaises en tant que conseiller et expert des questions de paludisme. Ce temps de conseils et d'expertise est une activité majeure du Pôle Zones Endémiques. Il y dédie un temps personnel considérable, environ 20% d'ETP au minimum. Ainsi en 2018 ont eu lieu des réunions d'échanges autour

- de la refonte de la carte de risque de paludisme en Guyane,

- du suivi du plan paludisme,
- des projets de recherche opérationnels conduits par le laboratoire, notamment ELIMALAR,
- du projet de recherche opérationnel MALAKIT conduit par le CIC-EC de l'Hôpital de Cayenne.

En 2018 le laboratoire a ainsi effectué une présentation intitulée « CNR Paludisme/CC OMS : activités de recherche au service de la santé publique guyanaise. » lors du comité de suivi du plan paludisme. Il n'a pas été sollicité par les acteurs de lutte contre l'endémie mahoraise.

En termes d'expertise nationale, la responsable du laboratoire a participé à l'élaboration des nouvelles recommandations en terme d'utilisation de la primaquine à visée anti-hyponozoitaire. Assez globalement, on peut regretter la difficulté à faire entendre et comprendre la réalité de la prise en charge en zone d'endémie. En effet, nous sommes dans un contexte humain, géographique et sanitaire bien différent d'une prise en charge parisienne du paludisme d'importation. Cette difficulté s'est fait ressentir malgré les recommandations internationales et la participation de plusieurs experts guyanais à ce groupe. Plus largement, l'ARS prône pour un droit à la différenciation pour les questions de paludisme mais pour les questions de santé en générale en Guyane compte tenu d'un contexte distinct de la métropole.

Au niveau international, le laboratoire de l'Institut Pasteur de la Guyane est un partenaire majeur de l'Organisation Mondiale de la Santé en Amazonie et surtout sur le plateau des Guyanes en tant que Centre Collaborateur de l'OMS. Le point focal de ce centre est Lise Musset. Après un premier axe de coopération aux antipaludiques pour la période 2014-2017, ses activités se sont étendues pour la période 2018-2021 à la pertinence des méthodes diagnostiques dans la zone. Dans ce cadre, un certains nombres d'isolats étrangers sont analysés et le laboratoire participe aux côtés de l'OMS/PAHO à un certains nombre de réunions régionales ou du programme global à Genève. Ces activités permettent un rayonnement des activités nationales financées par Santé Publique France et inversement, une extension de la surveillance effectuée via le CNR aux pays limitrophes avec soutien financier de la PAHO/OMS.

5.3. Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public...)

5.3.1. Pôle Métropole

Le CNR Paludisme, Pôle zones non endémiques n'a pas participé à des actions grand public en 2018.

5.3.2. Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

Oralité, supports média, communautés et médiateurs : Par ailleurs, le projet de recherche opérationnel ELIMALAR décrit précédemment inclut un large volet d'éducation à la santé des populations vivant en zone d'endémie. Ce volet s'appuie sur les résultats de l'enquête connaissances et pratiques ayant eu lieu au cours de l'étude PALUSTOP 1 qui avait pour objectif de recueillir des données chiffrées de manière à identifier les leviers possibles pour améliorer les messages de lutte contre le paludisme. Ce volet est également financé par le Rotary Club international. Ainsi en 2018, nous avons participé à la formation des médiateurs en santé communautaire de la DAAC, association travaillant à St Georges de l'Oyapock auprès des communautés. Cette formation visait expliquer les messages de prévention et à répondre aux questions formulées par les médiateurs eux-mêmes ou la population. Des méthodes de sensibilisation innovantes et adaptées aux modes de vie et à la culture des personnes cibles sont en cours d'évaluation et de test dans ce cadre.

Radio, grand public : En 2018, le Pôle Zones Endémiques a participé à une émission radio autour des messages de santé publique pour mieux lutter contre le paludisme : « se faire dépister tôt » pour limiter la transmission et éviter les formes graves, « prendre complètement son traitement » primaquine incluse quand on est atteint de *P. vivax* et « se protéger des piqûres d'*Anopheles* ».

Médias, grand public : en septembre 2018 nous avons convié la presse au lancement du projet Elimalar. Ceci a permis de faire parler du paludisme et à expliquer ce qui est fait pour tenter de mieux le contrôler. Des reportages télé (Guyane première), radio (Guyane première, Radio Peyi) et presse écrite (Guyaweb, France Guyane) ont ainsi été diffusés associés à leurs diffusions internet respectives. Une chaîne youtube a également été créée de manière à diffuser les spots d'informations destinés à la population en vue de l'étude Palustop

6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR

6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N

6.1.1. Pole Zones non Endémiques

6.1.1.1. Identification et validation de nouveaux marqueurs moléculaires de résistance à la pipéraquline

L'amplification du gène de la plasmepsin II (*pfpm2*), qui est impliquée dans la résistance de souches cambodgiennes à la pipéraquline, ne semble pas être associée ni à la résistance *in vitro* de souches africaines à la pipéraquline, ni à des échecs cliniques à l'association dihydroartémisinine-pipéraquline. Nous avons évalué un certain nombre de gènes pouvant être potentiellement impliqués dans la résistance à la pipéraquline (nouvelles mutations sur *pfcr1*, *pfmdr5*, *pfmdr6*, exonucléase, RING E3 ubiquitin protein ligase, *pfact*, *pfugt*, *pfcar1*). Ces différents gènes ne semblent pas être impliqués dans une quelconque résistance à la pipéraquline. Depuis 6 mois, nous avons mis en culture une souche sensible à la pipéraquline sous pression discontinue de pipéraquline. Sa sensibilité a été diminuée d'un facteur 3. Nous allons continuer cette pression pendant plusieurs mois jusqu'à obtenir une souche très résistante qui sera comparée à la souche sensible par des méthodes de génomique, transcriptomique, protéomique et de métabolomique.

Robert MG, Foguim Tsombeng F, Gendrot M, Diawara S, **Madamet M**, Kounta MB, et al. Baseline ex vivo and molecular responses of *Plasmodium falciparum* isolates to piperavaquine before implementation of dihydroartemisinin-piperavaquine in Senegal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63:e02445-18.

Robert MG, Foguim Tsombeng F, Gendrot M, **Mosnier J**, **Amalvict R**, **Benoit N**, **Torrentino-Madamet M**, **Pradines B**. Absence of a high level of duplication of the Plasmepsin II gene in Africa. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62:e00374-18.

Malvy D, **Torrentino-Madamet M**, L'ollivier C, Receveur MC, Jeddi F, Delhaes L, **Piarroux R**, Millet P, **Pradines B**. *Plasmodium falciparum* recrudescence two years after treatment of an uncomplicated infection without return to an area where malaria is endemic. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62:e01892-17.

Gendrot M, Foguim FT, Robert MG, **Amalvict R**, **Mosnier J**, **Benoit N**, **Madamet M**, **Pradines B**. The D113N mutation in the RING E3 ubiquitin protein ligase gene is not associated with ex vivo susceptibility to common anti-malarial drugs in African *Plasmodium falciparum* isolates. *Malar J*. 2018;17:108.

6.1.1.2. Criblage de nouveaux composés potentiellement antipaludiques (*in vitro* et *in vivo*) et développement de nouveaux antipaludiques

Evaluation *in vitro* de composés naturels (79 échantillons évalués en 2018) et du bleu de méthylène (Proveblue). Le bleu de méthylène, et plus particulièrement Proveblue, un produit de synthèse exempt de métaux et de produits toxiques, est actif *in vitro* sur des isolats de *P. falciparum* et *in vivo* sur des souches murines de *Plasmodium*. D'autre part, des études ont montré que le bleu de méthylène pouvait augmenter l'activité *in vitro* des dérivés de l'artémisinine. Proveblue protège du neuropaludisme dans un modèle murin de neuropaludisme. En 2018, nous avons analysé la sensibilité de plus de 500 isolats de *P. falciparum* à Proveblue afin de définir la distribution bayésienne des réponses *in vitro* (concentration inhibitrice 50%) et d'identifier des souches de sensibilité diminuée. Nous avons évalué l'association de marqueurs de résistance standards (*pfcr1*, *pfmdr1*, *pfk13*, *pfpm2*) et de gènes pouvant être potentiellement impliqués dans la résistance aux antipaludiques (*pfmdr5*, *pfmdr6*, exonucléase, RING E3 ubiquitin protein ligase, *pfact*, *pfugt*, *pfcar1*), sans en montrer une quelconque implication. Une souche sensible au bleu de méthylène est en culture sous pression discontinue afin d'obtenir une souche résistante.

6.1.1.3. Evaluation du Ridaquick® Malaria dans le diagnostic du paludisme d'importation.

Le paludisme est la seule urgence parasitaire. Le diagnostic peut reposer sur l'observation microscopique des formes asexuées du parasite associée à la détection par immunochromatographie des antigènes

plasmodiaux par les tests de diagnostic rapide (TDR). Cependant, leur spécificité relative pour *P. falciparum* et leur mauvaise sensibilité pour les autres espèces complexifient l'interprétation du résultat par rapport à la microscopie. Le développement de TDR plus performants est un défi pour les industriels des réactifs. Récemment, la société R-Biopharm a commercialisé le test Ridaquick® Malaria qui détecte l'HRP2 (Histidin Rich Protein 2), spécifique de *P. falciparum* et la pLDH (Plasmodial Lactico Deshydrogenase), commune aux différentes espèces de plasmodium pathogènes pour l'homme. Nous avons évalué ce dispositif prospectivement dans le diagnostic du paludisme par rapport au TDR SD Malaria Ag Pf/Pan (Bioline) et à la microscopie.

Matériel et méthodes : les prélèvements sanguins de patients suspects de paludisme au retour de zone d'endémie ont été inclus. Sur chaque prélèvement, un frottis/GE était réalisé en parallèle avec un TDR SD Malaria Ag Pf/Pan (Bioline) et un TDR Ridaquick® Malaria. Ces TDR détectent l'HRP2 et la pLDH. L'identification des espèces autres que *P. falciparum* était confirmée par PCR.

Résultats : parmi les 160 prélèvements inclus, 53 étaient considérés comme négatifs et 107 positifs dont 64 à *P. falciparum*, 30 à *P. ovale*, 7 à *P. vivax*, et 6 à *P. malariae*. Une spécificité de 100% a été retrouvée pour les 2 TDR testés qui ont de plus montré une sensibilité de 100% pour la détection de *P. falciparum* (HRP2). La sensibilité globale du Ridaquick® Malaria pour la détection de la pLDH était de 80,4% (86/107) contre 55,1% (59/107) pour le SD Malaria Ag Pf/Pan ($p < 0.001$). Plus spécifiquement, pour les espèces non *falciparum*, la sensibilité du Ridaquick® Malaria était de 81,4% (35/43) alors que celle du SD Malaria Ag Pf/Pan était de 37,2% (16/43) ($p < 0.001$).

En conclusion, le TDR Ridaquick® Malaria présente une très bonne spécificité. Sa sensibilité est excellente pour la détection des accès palustres à *P. falciparum* associée à une très grande sensibilité pour la détection des accès aux espèces non *falciparum*, et très supérieure au test SD Malaria Ag Pf/Pan. Ces performances sont favorables à l'utilisation de ce test dans le paludisme d'importation.

D. Haouchine, C Bonnal, V Sarrasin, N Argy, S Houzé : Evaluation du Ridaquick® Malaria dans le diagnostic du paludisme d'importation. RICAI 2018, Paris. Communication affichée

6.1.1.4. Plasmodium simium : une nouvelle espèce émergente au Brésil ?

L'incidence du paludisme au Brésil est limitée. Les cas de paludisme sont principalement recensés en région amazonienne, au nord du Brésil où *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* sont principalement retrouvés. Une épidémie récente de cas autochtones de paludisme survenue dans la forêt atlantique de la région de Rio de Janeiro a été explorée : les cas étaient dus à *Plasmodium simium*, paludisme du singe, très proche de *Plasmodium vivax*.

Nous rapportons le cas d'un paludisme survenu chez un touriste français ayant séjourné 15 jours au Brésil, dans la région de Rio de Janeiro sans chimioprophylaxie antipaludique et avec le respect épisodique de mesures de prévention antivectorielle. Il a consulté trois semaines après son retour pour une fièvre tierce évoluant depuis 7 jours. Un diagnostic de paludisme a été posé par PCR diagnostique rapide (LAMP) mais le frottis sanguin et la goutte épaisse étaient négatifs ainsi que les tests de diagnostic rapide (PfHRP2, Aldolase). L'évolution a été favorable sous Artémisinol-Pipéraquline.

Sur le prélèvement sanguin du diagnostic transmis au CNR du Paludisme, la PCR diagnostique (Fast Track, Launch Diagnostics) ayant pour cible l'ARN18S rapportait une réaction positive pour *P. vivax*. Compte-tenu de l'histoire clinique et de sa présentation, une PCR spécifique suivie d'un séquençage d'une fraction du génome mitochondrial a permis d'identifier spécifiquement l'espèce *Plasmodium simium* et d'exclure une infection par *Plasmodium vivax*.

Une analyse de la bibliographie de ces cas a complété cette observation qui présente les éléments caractéristiques de ces accès : une fièvre tierce et une parasitémie faible voir négative. Quand la charge parasitaire le permet, le diagnostic microscopique identifie les formes comme *P. vivax*. Les quelques différences entre les génomes de *P. vivax* et de *P. simium* permettent un diagnostic moléculaire différentiel en sélectionnant les cibles.

Ce premier cas chez un touriste souligne l'émergence possible de cette espèce simienne chez l'homme et rappelle qu'en cas de fièvre au retour d'un séjour au Brésil, le diagnostic de paludisme doit être systématiquement évoqué.

V Hubert, PH Consigny, E Dannaoui, MM Roux, S Houzé. *Plasmodium simium* : une nouvelle espèce émergente au Brésil ? SFP, Mai 2018, Nice. Communication orale

6.1.1.5. Evaluation de l'activité *in vitro* d'extraits de plantes guinéennes sur *P. falciparum*

Le paludisme est la première endémie parasitaire mondiale, causée par un protozoaire appartenant au genre *Plasmodium*, transmis par la piqûre d'un moustique femelle, l'Anophèles, qui l'injecte lors de ses repas sanguins chez l'Homme. Il existe cinq espèces de Plasmodium mais d'emblée il faut différencier *P. falciparum* des autres espèces car c'est celui qui est le plus largement répandu à travers le monde, qui développe des résistances aux antipaludiques et qui est responsable des formes cliniques potentiellement mortelles.

De nombreux traitements ont été mis sur le marché mais certains présentent des effets indésirables. Surtout, le parasite développe des résistances à ces antipaludiques, d'où la nécessité de rechercher et de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'activité *in vitro* d'extraits de trois plantes (*Desmodium velutinum*, *Rourea minor* et *Terminalia albida*) largement utilisées en médecine traditionnelle guinéenne, sur des souches de référence de *P. falciparum* chloroquino-sensible et chloroquino-résistante (3d7 et W2) par mesure de l'inhibition de croissance des parasites en fonction d'un gradient de concentrations de 0 à 95 µg/ml. Ces extraits ont été obtenus par macération avec trois solvants de polarités différentes (dichlorométhane, acétate d'éthyle et méthanol). La croissance parasitaire est évaluée par incorporation d'hypoxanthine tritiée. Les concentrations inhibitrices 50% (CI50) des différents extraits sont calculées avec le logiciel Ice estimator qui réalise une courbe effet-dose à partir des coups par minute (CPM) en fonction des concentrations.

Sur les dix-huit extraits étudiés, six semblent présenter une efficacité moyenne avec des CI50 comprises entre [36,13 ± 1,42] µg/ml et [80,25 ± 12,25] µg/ml. Sur ces six extraits présentant une efficacité moyenne, quatre sont les extraits méthanoliques de *Terminalia albida* et deux sont extraits de *Rourea minor*.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'unité UMR PHARMADEV "pharmacochimie et biologie pour le développement" UMR152 IRD/UPS-Toulouse 3, avec les chercheurs Aissata Camara (doctorante cotutelle UPS-Univ Guinée), Pr Mamadou Balde (CRVPM), Mohamed Haddad et Agnès Aubouy (IRD Pharmadev). Les plantes venaient de Guinée, du CRVPM-Dubrêka, centre de recherche et de valorisation des plantes médicinales de Dubrêka.

6.1.1.6. Evaluation de l'activité *in vitro* d'extraits de plantes chiliennes sur *P. falciparum*

De précédentes enquêtes ethnobotaniques dans la partie nord andine du Chili, où coexistaient différents groupes ethniques, avec la prééminence des traditions aymara et atacama, ont révélé une utilisation domestique extensive de la flore locale. Dans ces communautés, les utilisations médicinales traditionnelles sont principalement liées au traitement des troubles respiratoires, gastro-intestinaux et urinaires, de la douleur et de l'inflammation, qui est étroitement lié aux observations épidémiologiques.

Ces symptômes pouvant être liés à des maladies infectieuses, une évaluation bioguidée de l'activité antibactérienne et antifongique a été réalisée sur dix-huit espèces sélectionnées appartenant à la communauté Taira, à Ollague.

Le criblage a été réalisé en utilisant un large panel de germes pathogènes impliqués dans les principales maladies infectieuses acquises dans la communauté, représentées par les bactéries Gram positives et Gram négatives d'intérêt clinique et par des champignons pathogènes humains, en utilisant une approche bioguidée.

Les souches à Gram positif présentant un intérêt clinique étaient très sensibles aux extraits d'*Aloysia deserticola* (Verbenaceae) et de *Krameria iappacea* (Krameriaceae). L'approche bioguidée nous a

conduit à identifier le néolignan isolé de *K. lappacea conocarpan* (1) et les triterpénoïdes d'*A. Deserticola* (acide oléanolique (6) et acide ursolique (10)), en tant que principaux composés bioactifs.

Ortiz S, Leccsö-Bornet M, Bonnal C, Houze S, Michel S, Grougnet R, Boutefnouchet S. Bioguided identification of triterpenoids and neolignans as bioactive compounds from anti-infectious medicinal plants of the Taira Atacama's community (Calama, Chile). *J Ethnopharmacol.* 2019 Mar 1;231:217-229. doi: 10.1016/j.jep.2018.10.029. Epub 2018 Nov 6.

6.1.1.7. MALAKIT : Autotest et auto-traitement visant à améliorer la situation du paludisme chez les personnes vivant dans des zones éloignées de l'offre de soins

Porteur de projet : M. Douine – CIC-EC Hôpital de Cayenne

*Collaboration : L. Musset – Laboratoire de parasitologie – Institut Pasteur de la Guyane
S. Vreden – Fondation pour la recherche médicale – Suriname
M. Suarez – FIOCRUZ – Brésil*

Financements : Europe INTERREG – ARS Guyane – Hôpital de Cayenne.- Ministères de la santé du Brésil et du Suriname.

Plusieurs études ont ces dernières années objectivé la problématique du paludisme en zones orpaillées, tout particulièrement celles situées en zones reculées à plusieurs heures, voire jours, de l'offre de soin. L'objectif de ce projet est de distribuer des kits d'autodiagnostic et d'auto-traitement aux personnes vivant dans ces zones reculées et de les former à la réalisation de ces tests et la prise du traitement en cas de positivité uniquement. La finalité de ce projet est double : i) limiter les traitements présomptifs et la prise aléatoire et non contrôlée d'antipaludiques en formant les personnes à la prise d'un traitement complet et bien suivi uniquement lorsque la présence de parasites est réelle afin de limiter l'apparition de résistances et, ii) si la distribution atteint une couverture suffisante, diminuer le niveau de transmission du paludisme dans ces zones.

Deux études d'évaluation appelées ORPAL, encadreront cette phase de distribution afin de voir si elle a permis de changer les connaissances, attitudes et pratiques de ces individus et de limiter la transmission du paludisme dans ces zones. Le laboratoire de parasitologie aura la charge des analyses des prélèvements issus de ses campagnes de dépistage actif.

La distribution des kits a commencée côté Maroni et Oyapock. A ce jour, plus de 2000 kits ont été distribués avec succès. Les premiers retours des orpailleurs et d'utilisation sont en cours d'analyse. L'étude d'évaluation ORPAL aura lieu entre octobre et janvier 2020 et la distribution se poursuivra jusqu'en juin 2020.

Dans ce cadre, le laboratoire de parasitologie a eu à analyser des échantillons collectés sur papier buvard en lien avec une discordance diagnostique observée entre le TDR SD Bionline® Pf/pan utilisé en routine et le TDR Carestart® Pan disponible au sein du kit.

6.2. Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

6.2.1. Publications nationales

Velut G, Dia A, Briolant S, Javelle E, Pommier de Santi V, Berger F, Savini H, Simon F, Michel R, Pradines B. Le paludisme : toujours d'actualité dans les armées françaises. *Med Armées*, 2018, 46:13-26.

Kamaliddin C, Joste V, Argy N, Houzé S. [Fluindione and falciparum malaria treated by atovaquone-proguanil]. *Thérapie.* 2018 Oct;73(5):445-447. doi: 10.1016/j.therap.2018.03.002. Epub 2018 Apr 3.

6.2.2. Publications internationales

Kendjo E, Houze S, Mouri O, Taieb A, Gay F, Jauréguiberry S, Tantaoui I, Ndour PA, Buffet P, Piarroux M, Theulier M, Piarroux R; French Imported Malaria Study Group. Epidemic Trends in Malaria Incidence Among Travelers Returning to Metropolitan France, 1996-2016. *JAMA Netw Open*. 2019 Apr 5;2(4):e191691.

Leblanc C, Vasse C, Minodier P, Mornand P, Naudin J, Quinet B, Siriez JY, Sorge F, de Suremain N, Theulier M, Kendjo E, Faye A, Imbert P. Management and prevention of imported malaria in children. 2019 update of the French guidelines. *Med Mal Infect*. 2019 Mar 15. pii: S0399-077X(18)30596-1.

Wojnarski M, Mouri O, Chambrion C, Roussel C, Chartrel N, Smith B, Smith P, Theulier M, Buffet P, Ndour PA. *Plasmodium falciparum* clearance is pitting-dependent with artemisinin-based drugs but pitting-independent with atovaquone-proguanil or mefloquine Short title: Drug-specific pitting in malaria. *J Infect Dis*. 2019 Mar 16. pii: jiz115.

Elket N, Kendjo E, Theulier M, Assoumou L, Potard V, Taieb A, Tantaoui I, Caumes E, Piarroux R, Roussel C, Buffet P, Costagliola D, Jauréguiberry S; French Artesunate Working Group. Propensity score analysis of artesunate versus quinine for severe imported *Plasmodium falciparum* malaria in France. *Clin Infect Dis*. 2019 Mar 15. pii: ciz206.

Duez J, Carucci M, Garcia-Barbazan I, Corral M, Perez O, Presa JL, Henry B, Roussel C, Ndour PA, Rosa NB, Sanz L, Gamo FJ, Buffet P. High-throughput microfiltration to assess red blood cell deformability and screen for malaria transmission-blocking drugs. *Nat Protoc*. 2018 Jun;13(6):1362-1376.

Ortiz S, Lecsö-Bornet M, Bonnal C, Houze S, Michel S, Grougnet R, Boutefnouchet S. Bioguided identification of triterpenoids and neolignans as bioactive compounds from anti-infectious medicinal plants of the Taira Atacama's community (Calama, Chile). *J Ethnopharmacol*. 2019 Mar 1;231:217-229. doi: 10.1016/j.jep.2018.10.029.

Pagès F, Houze S, Kurtkowiak B, Balleydier E, Chieze F, Filleul L. Status of imported malaria on Réunion Island in 2016. *Malar J*. 2018 May 24;17(1):210. doi: 10.1186/s12936-018-2345-y.

Joste V, Kamaliddin C, Kendjo E, Hubert V, Argy N, Houze S. Distinction of *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* using quantitative Polymerase Chain Reaction with High Resolution Melting revelation. *Sci Rep*. 2018 Jan 10;8(1):300. doi: 10.1038/s41598-017-18026-1.

Robert MG, Foguim Tsombeng F, Gendrot M, Diawara S, Madamet M, Kounta MB, et al. Baseline ex vivo and molecular responses of *Plasmodium falciparum* isolates to piperazine before implementation of dihydroartemisinin-piperazine in Senegal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63:e02445-18.

Robert MG, Foguim Tsombeng F, Gendrot M, Mosnier J, Amalvict R, Benoit N, Torrentino-Madamet M, Pradines B. Absence of a high level of duplication of the Plasmeprin II gene in Africa. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62:e00374-18.

Malvy D, Torrentino-Madamet M, L'ollivier C, Receveur MC, Jeddi F, Delhaes L, Piarroux R, Millet P, Pradines B. *Plasmodium falciparum* recrudescence two years after treatment of an uncomplicated infection without return to an area where malaria is endemic. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62:e01892-17.

Voumbo-Matoumona DF, Kouna LC, Madamet M, Maghendji-Nzondo S, Pradines B, Lekana-Douki JB. Prevalence of *Plasmodium falciparum* antimalarial drug resistance genes in Southeastern Gabon from 2011 to 2014. *Infect Drug Resist*. 2018;11:1329-1338.

Gendrot M, Foguim FT, Robert MG, Amalvict R, Mosnier J, Benoit N, Madamet M, Pradines B. The D113N mutation in the RING E3 ubiquitin protein ligase gene is not associated with ex vivo susceptibility to common anti-malarial drugs in African *Plasmodium falciparum* isolates. *Malar J*. 2018;17:108.

Gaillard T, Boxberger M, Madamet M, Pradines B. Has doxycycline, in combination with anti-malarial drugs, a role to play in intermittent preventive treatment of *Plasmodium falciparum* malaria infection in pregnant women in Africa ? *Malar J*, 2018, 17:469.

Gendrot M, Fawaz R, Dormoi J, Madamet M, Pradines B. Genetic diversity and deletion of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and 3: a threat to diagnosis of *P. falciparum* malaria. *Clin Microbiol Infect*, 2018, 2018 Sep 27. pii: S1198-743X(18)30631-1..

Almeras L, Basco LK, Sokhna C, Ranque S, Parola P, Devaux C, Brouqui P, Drancourt M, Pradines B. Malaria, tuberculosis and HIV: what's new? Contribution of the Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection in updated data. *New Microbes New Infect*, 2018,26: S23-S30.

Pradines B, Rogier C. Contribution of the French army health service in support of expertise and research in infectiology in Africa. *New Microbes New Infect*, 2018,26: S78-S82.

Gautret P, Pradines B, Memish ZA, Sokhna C, Parola P. Mobile populations across the Mediterranean Sea and beyond: travel medicine, mass gathering medicine and homeless health. *New Microbes New Infect*, 2018,26: S96-S99.

Voumbo-Matoumona DF, Akiana J, Madamet M, Kouna LC, Lekana-Douki JB, Pradines B. High prevalence of *Plasmodium falciparum* antimalarial drug resistance markers in isolates from asymptomatic patients from the Republic of the Congo between 2010 and 2015. *J Glob Antimicrob Resist*, 2018,14:277-283.

Douine M, Sanna A, Galindo M, Musset L, Pommier de Santi V, Marchesini P, Magalhaes ED, Suarez-Mutis M, Hiwat H, Nacher M, Vreden S, Garancher L. Malakit: an innovative pilot project to self-diagnose and self-treat malaria among illegal gold miners in the Guiana Shield. *Malar J*, 2018. 17:158.

Douine M, Lazrek Y, Blanchet D, Pelleau S, Chanlin R, Corlin F, Hureau L, Volney B, Hiwat H, Vreden S, Djossou F, Demar M, Nacher M, Musset L. Predictors of antimalarial self-medication in illegal gold miners in French Guiana: a pathway towards artemisinin resistance. *J Antimicrob Chemother*, 2018. 73: 231-239.

6.2.3. Communications nationales

Voumbo-Matoumona DF, Akiana J, Madamet M, Kouna LC, Lekana-Douki JB, Pradines B. Résistance de *Plasmodium falciparum* aux antipaludiques vis-à-vis d'isolats de patients asymptomatiques au Congo entre 2010 et 2015. XXIV^{es} Actualités du Pharo 2018, Marseille, France, 3-5 octobre 2018.

Mosnier E, Cropet C, Moriceau O, Lazrek Y, Michaud C, Gaillet M, Mathieu L, Demar M, Odonne G, Douine M, Pelleau S, Djossou F, Roux E, Musset L. 2018. Répartition spatiale et facteurs de risque de portage de paludisme à la frontière entre la Guyane et le Brésil. *Journée annuelle du CNR Paludisme*, 19 décembre, Paris (France). Communication orale.

Berthelot L, Lazrek Y, Volney B, Musset L. 2018. Prévalence des délétions des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* chez *Plasmodium falciparum* sur le plateau des Guyanes. *2ème journée des travaux scientifiques des jeunes médecins de Guyane*, 7 Décembre, Cayenne (Guyane). Communication orale.

Mosnier E, Bidaud B, Sanna A, Moriceau O, Dusfour I, Lazrek Y, Gaillet M, Travers P, Gauduchon S, Michaud C, de Laval F, Ardillon V, Musset L, Brousse P, Roux E. 2018. Foyer épidémique de paludisme autochtone à *P. vivax* en Guyane à la frontière avec le Brésil, 2017. XXIV^{ème} Actualités du Pharo, 3-5 Octobre, Marseille (France). Communication orale.

Musset L. 2018. Plasmodia on the Guiana Shield : a particular adaptation process driven by strong selective forces from the host. *Journées annuelles du labex CEBA*, 1^{er} octobre, Cayenne (Guyane). Conférence orale invitée.

Moriceau O, Musset L., Barbosa R, Lazrek Y, Michaud C, Abboud P, Walter G, Cebe M, Djossou F, Mosnier E. 2018. Nouvelles stratégies de dépistage de terrain du paludisme : importance et rôle de l'infirmier coordinateur sur le projet PALUSTOP. 19^{ème} *Journées Nationales d'Infectiologie*, 13-15 Juin, Rennes (France). Prix JNI meilleur présentation infirmier. Communication orale.

Douine M, Sanna A, Galindo M, Musset L., Pommier de Santi V, Marchesini P, Magalhaes ED, Suarez-Mutis M, Hiwat H, Nacher M, Vreden S, Garancher L. 2018. Projet Malakit (paludisme et orpaillage) : un exemple d'adaptation à la prise en charge de populations vulnérables. *Rencontre de santé publique Antilles-Guyane*, 17-19 avril, Cayenne (Guyane). Communication orale.

Mosnier E, Bidaud S, Musset L., Moriceau O, Gaillet M, Gauduchon S, Travers P, Brousse P, Lazrek Y, Sanna E. 2018. Foyer épidémique de paludisme autochtone à *P. vivax* en Guyane à la frontière avec le Brésil, 2017. Poster MV-ZOO-MIG-05. 19^{ème} *Journées Nationales d'Infectiologie*, 13-15 Juin, Rennes (France). Communication affichée.

6.2.4. Communications internationales

6.2.4.1. Orales

Musset L., Heugas C, Naldjinan R, Blanchet D, Houzé P, Abboud P, Volney B, Lazrek Y, Epelboin L, Pelleau S, Ringwald P, Legrand E, Demar M, Djossou F. 2018. Emergence of *P. vivax* resistance to chloroquine in French Guiana. *Combating resistance! Microbes and vectors*, November 15-16th, Paris (France).

Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, Lucchi NW, Ade MP, Grant Q, Udhayakumar V, Alexandre JSF, Ringwald P, Neafsey DE, Fidock DA, Musset L. 2018. *In vitro* artemisinin resistance and the *pfk13* C580Y mutation in Guyana: a confirmed link and emergence. Abst n°71. 67th *Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, October 25th to November 1st, New Orleans (USA).

6.2.4.2. Affichées

Mosnier E, Roux E, Cropet C, Lazrek Y, Gaillet M, Mathieu L, Nacher M, de Laval F, Pelleau S, Douine M, Abboud P, Bidaud B, Djossou F, Musset L. 2018. Heterogeneous distribution of *Plasmodium vivax* and *falciparum* carriage on the border area between Brazil and French Guiana. Abst n°1034. 67th *Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, October 25th to November 1st, New Orleans (USA).

Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, Lucchi NW, Ade MP, Grant Q, Udhayakumar V, Alexandre JSF, Ringwald P, Neafsey DE, Fidock DA, Musset L. 2018. *In vitro* artemisinin resistance and the *pfk13* C580Y mutation in Guyana: a confirmed link and emergence. *Combating resistance! Microbes and vectors*, November 15-16th, Paris (France).

Manca MF, Jollivet A, Kezza C, Carles G, Misslin-Tritsch C, Barrelet A, Clouzeau J, Miller J, Boukhari R, Boex P, Musset L., Carod JF. 2018. Endemic Malaria in West French Guiana: A 7 Years Retrospective Study. Poster n°6786. *American Society for Microbiology General Meeting & ICAAC, ASM Microbe*, 7-11th June, Atlanta (USA).

6.2.5. Conférences sur invitations

Pradines B. Résistance aux combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (ACT) en Afrique. Journée Dakaroise de l'IHU Méditerranée Infection sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes (11^{ème} journée), Dakar, Sénégal, 13 novembre 2018.

Pradines B. Evolution des résistances aux antipaludiques. Les Jeudis de l'IHU « Paludisme en Afrique : où en est-on ? Marseille, France, 11 octobre 2018

Pradines B. La recherche sur le paludisme dans le Service de santé des armées. Journées navalaises, Bordeaux, France, 24 mars 2018.

Musset L. Situation of global resistance to antimalarials in the region. *Malaria project managers' meeting*, 14-16th November, Washington DC (USA).

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

En Guyane, zone d'endémie du paludisme, des échanges ont lieu régulièrement entre le Pôle Zones Endémiques et le service de démoustication de la collectivité territoriale de Guyane (partage d'information, d'expérience etc...) ainsi que le secteur santé et environnement de l'ARS Guyane qui est en charge de la communication, de la distribution de moustiquaires et de l'éducation à la santé (ex : organisation conjointe de journée de sensibilisation au paludisme chez les scolaires etc...).

8. Programme d'activité pour les années suivantes

Pour les années à venir, le CNR du Paludisme va poursuivre ses activités de surveillance du paludisme d'importation en France métropolitaine, et dans les DOM indemnes de paludisme (Antilles françaises et La Réunion) et du paludisme autochtone en Guyane et à Mayotte, en collaboration avec SPF, les CIRE régionales et les ARS.

Plus particulièrement, le Pôle zones non endémiques du CNR du Paludisme souhaite développer :

- les travaux sur la résistance aux antipaludiques et plus particulièrement vis-à-vis de la pipéraquline et de la doxycycline qui seront poursuivis de même que l'identification et le développement de nouveaux marqueurs moléculaires de résistance. Pour cela, le CNR souhaite recentrer son activité sur l'expertise et l'exploitation des isolats associés à des dossiers cliniques et épidémiologiques bien documentés, éléments indispensables pour valider de nouveaux marqueurs potentiels de résistance.
- l'analyse systématique des génotypes de toutes les souches reçues sera réalisée dans le cadre de projets éventuels de cartographie d'un marqueur donné dont l'évolution est préoccupante (gène K13 par exemple et programme KARMA)
- le séquençage « whole génome » d'isolats d'intérêt clinique spécifique (résistance aux ACT)
- d'un point de vue des outils diagnostiques, la surveillance des isolats délétés au niveau des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* sera poursuivie et réalisée en temps réel
- la différenciation des espèces *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*,
- des travaux pour mieux caractériser les accès à *P. ovale*

La surveillance de la résistance *in vitro* aux antipaludiques en collaboration avec des équipes de terrain francophones sera maintenue (Sénégal, Mauritanie, Gabon, Congo) ou initiée (Comores, Bénin).

Le LA-ZE poursuivra ses activités de surveillance et de sensibilisation des partenaires afin de maintenir son niveau d'exhaustivité. Il continuera également de fonctionner selon les exigences de la norme 15189 pour la PCR diagnostique d'espèce déployée au sein du laboratoire afin de maintenir l'accréditation en cours (Accréditation n° 8-3373, portée disponible sur COFRAC.fr). Le travail de caractérisation du niveau de sensibilité de *P. falciparum* aux dérivés de l'artémisinine à l'aide du taux de survie (test RSA) et test PSA pour la sensibilité à la pipéraquline sera poursuivi.

Par ailleurs, un temps certains sera consacré à la poursuite des deux importants projets de recherche opérationnelle que sont ELIMALAR et MALAKIT. Analyse et valorisation des données PALUSTOP et développement d'axe sur la résistance aux molécules partenaires dans le cadre de REAGIR. 2019 sera également l'année de l'élaboration d'un nouveau plan de lutte contre le paludisme en Guyane coordonné par l'ARS. Le CNR y passe en général un temps certains d'expertise.

Enfin, les activités de centre collaborateur OMS du laboratoire continueront à être déployées dans le cadre des termes de référence fixées avec l'OMS autour du suivi des mutations *pfK13* dans la région et du suivi des parasites délétés au niveau des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3*. En plus en 2019 une étude d'efficacité thérapeutique de l'artéméther/luméfántrine au Guyana sera conduite à laquelle participera le CNR/CC OMS.

Références bibliographiques

- Baker, J., J. McCarthy, M. Gatton, D. E. Kyle, V. Belizario, J. Luchavez, D. Bell & Q. Cheng, (2005) Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. *J Infect Dis* **192**: 870-877.
- Basco, L. K. & J. Le Bras, (1992) *In vitro* activity of pyronaridine against African strains of *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol* **86**: 447-454.
- Basco, L. K. & J. Le Bras, (1993) *In vitro* activity of artemisinin derivatives against African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* **49**: 301-307.
- Basco, L. K. & J. Le Bras, (1994) *In vitro* susceptibility of Cambodian isolates of *Plasmodium falciparum* to halofantrine, pyronaridine and artemisinin derivatives. *Ann Trop Med Parasitol* **88**: 137-144.
- Basco, L. K. & P. Ringwald, (2003) *In vitro* activities of piperazine and other 4-aminoquinolines against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Cameroon. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1391-1394.
- Brasseur, P., J. Kouamou, R. S. Moyou & P. Druilhe, (1990) Emergence of mefloquine-resistant malaria in Africa without drug pressure. *Lancet* **336**: 59.
- Briolant, S., M. Baragatti, P. Parola, F. Simon, A. Tall, C. Sokhna, P. Hovette, M. M. Mamfoumbi, J. L. Koeck, J. Delmont, A. Spiegel, J. Castello, J. P. Gardair, J. F. Trape, M. Kombila, P. Minodier, T. Fusai, C. Rogier & B. Pradines, (2009) Multinomial *in vitro* distribution model suitable for the distribution of *Plasmodium falciparum* chemosusceptibility to doxycycline. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 688-695.
- Briolant S, Wurtz N, Zettor A, Rogier C, Pradines B, (2010). Susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates to doxycycline is associated with *pftetQ* sequence polymorphisms and *pftetQ* and *pfmdt* copy numbers. *J Infect Dis*. **201**: 153-159.
- Cojean, S., V. Hubert, J. Le Bras, R. Durand, (2006) Resistance to dihydroartemisinin. *Emerg Infect Dis* **12**:1798-1799.
- Dedet, J. P., P. Germanetto, G. Cordoliani, O. Bonnevie & J. Le Bras, (1988) [*In vitro* activity of various antimalarials (chloroquine, amodiaquine, quinine and mefloquine) against 32 isolates of *Plasmodium falciparum* in French Guiana]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **81**: 88-93.
- 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. Arie, P. J. Guerin, R. Huy, O. Mercereau-Puijalon, B. Witkowski, and D. Menard. 2015. *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperazine failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites presenting high survival rates in novel piperazine *in vitro* assays: retrospective and prospective investigations. *BMC medicine* **13**:305.
- Duru V, Witkowski B, Ménard D. Plasmodium falciparum Resistance to Artemisinin Derivatives and Piperazine: A Major Challenge for Malaria Elimination in Cambodia. *Am J Trop Med Hyg*. 2016 Dec 7; 95(6): 1228–1238.
- Jambou, R., E. Legrand, M. Niang, N. Khim, P. Lim, B. Volney, M. T. Ekala, C. Bouchier, P. Esterre, T. Fandeur & O. Mercereau-Puijalon, (2005) Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to *in-vitro* artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* **366**: 1960-1963.
- Kaddouri, H., S. Nakache, S. Houzé, F. Mentré & J. Le Bras, (2006) Drug Susceptibility of *Plasmodium falciparum* Clinical Isolates from Africa using Plasmodium Lactate Dehydrogenase Immunodetection Assay and inhibitory Emax model for precise IC50 measurement. *Antimicrob Agents Chemother*. **50**: 3343-3349.
- Kaddouri, H., S. Nakache, S. Houzé, F. Mentré & J. Le Bras, (2006) 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* **50**: 3343-3349.
- Le Bras, J., P. Deloron, J. F. Hartmann, P. Coulanges, H. V. Dourado & B. Larouze, (1984) Application of an *in vitro* semi-microtest to the study of drug sensitivity of 66 *Plasmodium falciparum* isolates from 15 countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **78**: 485-488.
- Legrand, E., M. Demar, B. Volney, M. T. Ekala, M. Quinternet, C. Bouchier, T. Fandeur, C. Rogier, B. Carne, O. M. Puijalon & P. Esterre, (2007) First case of emergence of atovaquone resistance in *Plasmodium falciparum* during second-line atovaquone-proguanil treatment in South America. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 2280-2281.
- Legrand E., J. Yrines, M.T. Ekala, J. Péneau, B. Volney, F. Berger, C. Bouchier, S. Bertani, L. Musset, J.B. Meynard & O. Mercereau-Puijalon, (2012) Discordant temporal evolution of *Pfcr* and *Pfmdr1* genotypes and *Plasmodium*

falciparum in vitro drug susceptibility to 4-aminoquinolines after drug policy change in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother.*; **56** :1382-1389.

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

Musset, L., B. Pradines, D. Parzy, R. Durand, P. Bigot & J. Le Bras, (2006b) Apparent absence of atovaquone/proguanil resistance in 477 *Plasmodium falciparum* isolates from untreated French travellers. *Publi perso* **1 57**: 110-115.

Noedl, H., J. Bronnert, K. Yingyuen, B. Attlmayr, H. Kollaritsch & M. Fukuda, (2005) Simple histidine-rich protein 2 double-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for use in malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3575-3577.

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

Pradines, B., A. Tall, T. Fusai, A. Spiegel, R. Hienne, C. Rogier, J. F. Trape, J. Le Bras & D. Parzy, (1999) In vitro activities of benflumetol against 158 Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum* in comparison with those of standard antimalarial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 418-420.

Price, R. N., A. C. Uhlemann, A. Brockman, R. McGready, E. Ashley, L. Phaipun, R. Patel, K. Laing, S. Looareesuwan, N. J. White, F. Nosten & S. Krishna, (2004) Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet* **364**: 438-447.

Ringwald, P., J. Bickii & L. K. Basco, (1998) Amodiaquine as the first-line treatment of malaria in Yaounde, Cameroon: presumptive evidence from activity in vitro and cross-resistance patterns. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**: 212-213.

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

Savini, H., H. Bogreau, L. Bertaux, H. Bouchiba, P. Kraemer, D. Parzy, E. Garnotel, C. Rogier, F. Simon & B. Pradines, (2008) First case of emergence of atovaquone-proguanil resistance in *Plasmodium falciparum* during treatment in a traveler in Comoros. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 2283-2284.

Snounou, G., S. Viriyakosol, X. P. Zhu, W. Jarra, L. Pinheiro, V. E. do Rosario, S. Thaithong & K. N. Brown, (1993) High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* **61**: 315-320.

Veron, V., S. Simon, B. Carne, (2009) Multiplex real-time PCR detection of *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* in human blood samples. *Exp Parasitol* **121**: 346-351.

WHO, (2003) Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria. In: W. a. H. Organization (ed). Geneva: World and Health Organization, pp.

WHO, (2009) World malaria report. In: W. a. H. Organization (ed). Geneva: World and Health Organization, pp.

Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, Lim P, Mao S, Sopha C, Sam B, Anderson JM, Duong S, Chuor CM, Taylor WR, Suon S, Mercereau-Puijalon O, Fairhurst RM, Ménard D 2013. 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*, **13**, 1043-1049.

Witkowski B, Duru V, Khim N, Ross LS, Saintpierre B, Beghain J, Chy S, Kim S, Ke S, Kloeung N, Eam R, Khean C, Ken M, Loch K, Bouillon A, Domergue A, Ma L, Bouchier C, Leang R, Huy R, Nuel G, Barale JC, Legrand E, Ringwald P, Fidock DA, Mercereau-Puijalon O, Ariey F, Ménard D. A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype-genotype association study. *Lancet Infect Dis*. 2017 Feb;**17**(2):174-183.