

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DE SANTE
DEPARTEMENT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2023

THESE 2023 TOU3 2087

THESE D'EXERCICE

POUR L'OBTENTION DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Spécialité BIOLOGIE MEDICALE

Présentée et soutenue publiquement
par

Suzanne BUREL

Intérêt d'une PCR unique pour l'identification des espèces plasmodiales non-*falciparum* : Etude de 2007 à 2022 au CHU de Toulouse

Le 19 octobre 2023

Directeur de thèse : Dr Xavier IRIART

JURY

Président : Pr Alexis VALENTIN
1er assesseur : Pr Antoine BERRY
2ème assesseur : Dr Camille GARNIER

PERSONNEL ENSEIGNANT
du Département des Sciences Pharmaceutiques
de la Faculté de santé
au 08 mars 2023

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B. (Directrice-adjointe)	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COSTE A.	Parasitologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Doyen-directeur)	Physiologie
Mme DERA EVE C.	Chimie Thérapeutique
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAU MONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATT OUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
Mme WHITE-KONING M.	Mathématiques

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitolo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
Mme KELLER L.	Biochimie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie Analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS C. (*)	Immunologie
Mme ECHINARD-DOUIN V. (*)	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C. (*)	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONFERRAN S	Biochimie
M. PILLOUX L.	Microbiologie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitolo-Universitaires

M. AL SAATI A	Biochimie
Mme BAKLOUTI S.	Pharmacologie
Mme CLARAZ P.	Pharmacie Clinique
Mme CHAGNEAU C.	Microbiologie
Mme DINTILHAC A.	Droit Pharmaceutique
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
Mme RIGOLOT L.	Biologie Cellulaire, Immunologie
Mme STRUMIA M.	Pharmacie Clinique

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Mme HAMZA Eya	Biochimie
Mme MALLI Sophia	Pharmacie Galénique
M. TABTI Redouane	Chimie Thérapeutique

Table des matières

Table des matières	4
Index des Figures	6
Index des Tableaux.....	7
Introduction.....	8
I. Généralités concernant le paludisme.....	8
A. Epidémiologie	8
B. Cycle parasitaire ¹¹	9
II. Diagnostic du paludisme : Revue générale.....	11
A. Diagnostic du paludisme d'importation ¹³	11
B. Diagnostic d'espèce par microscopie	12
C. Utilisation des Tests de Diagnostic Rapide (TDR)	14
D. Diagnostic d'espèce par biologie moléculaire	15
1. Principe général de la PCR (Polymerase Chain Reaction) :	15
2. Application des techniques de PCR au diagnostic moléculaire du paludisme :	18
III. Problématique.....	31
IV. Matériel et méthodes.....	31
A. Sélection des échantillons	31
B. Morphologie : Microscopie et test immunochromatographique (TDR).....	32
C. Biologie moléculaire.....	33
1. Extraction de l'ADN.....	33
2. PCR ciblant <i>Plasmodium falciparum</i>	33
3. PCR « 4 espèces » ciblant les espèces non- <i>falciparum</i>	34
D. Recueil des données.....	37
V. Résultats	37
A. Comparaison PCR et morphologie par espèce.....	37
1. <i>Plasmodium falciparum</i>	38

2.	<i>Plasmodium ovale</i>	39
3.	<i>Plasmodium vivax</i>	41
4.	<i>Plasmodium malariae</i>	42
5.	<i>Plasmodium knowlesi</i>	43
6.	Multiparasitisme.....	43
7.	Echantillons négatifs	45
B.	Comparaison PCR et morphologie par types d'erreurs	46
C.	Répartition des espèces dans le temps	49
VI.	Discussion	50
	Conclusion	52
	Références	53

Index des Figures

Figure 1 : Schéma du cycle parasitaire de <i>Plasmodium</i> (www.cdc.gov)	10
Figure 2 : Représentation des différents stades parasitaires en fonction des espèces de <i>Plasmodium</i>	13
Figure 3 : Schéma d'un cycle de PCR (www.biomnigene.fr).....	16
Figure 4 : Schéma de la PCR nichée (www.abmgood.com).....	16
Figure 5 : Schéma de la PCR multiplex, ici quadriplex (www.abmgood.com)	17
Figure 6 : Résultats de Chew <i>et al.</i> ³⁵	19
Figure 7 : Résultats de Miguel-Oteo <i>et al.</i> ³⁶	20
Figure 8 : Résultats de Xu <i>et al.</i> ³⁰	21
Figure 9 : Exemple de courbes de fusion d'un produit de PCR. ³⁷	22
Figure 10 : Résultats de Lefterova <i>et al.</i> ³⁴	22
Figure 11 : Résultats de Schneider <i>et al.</i> ³⁸	23
Figure 12 : Résultats de Van Bergen <i>et al.</i> ³¹	24
Figure 13 : Exemple de courbe de l'Intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles lors d'une PCR en temps réel (www.biomnigene.fr)	25
Figure 14 : Variation du Ct en fonction de la quantité d'ADN (www.biomnigene.fr)	26
Figure 15 : Schéma représentant la réaction de révélation de produit de PCR dans un micropuits, selon Machouart <i>et al.</i> ⁴⁶	28
Figure 16 : Schémas représentant la méthode de détection utilisée par Saito <i>et al.</i>	29
Figure 17 : Alignements des amorces sur les séquences nucléotidiques du gène codant pour la petite sous-unité 18s du ribosome plasmodial	34
Figure 18 : Courbes de fusion des différentes espèces plasmodiales obtenues avec la PCR 4 espèces.	36
Figure 19 : Graphique de la répartition des espèces plasmodiales non falciparum en fonction des années au CHU de Toulouse, en nombre absolu	49
Figure 20 : Graphique de la répartition des espèces plasmodiales non falciparum en fonction des années au CHU de Toulouse, en pourcentage du nombre de cas	49

Index des Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des principales PCR de diagnostic d'espèce de <i>Plasmodium</i>	30
Tableau 2 : Intervalles de confiance des Tm, longueur et proportion de bases GC des produits de PCR des différentes espèces plasmodiales selon la PCR 4 espèces	37
Tableau 3 : Résultats pour <i>Plasmodium falciparum</i>	39
Tableau 4 : Résultats pour <i>Plasmodium ovale</i>	40
Tableau 5 : Résultats pour <i>Plasmodium vivax</i>	41
Tableau 6 : Résultats pour <i>Plasmodium malariae</i>	42
Tableau 7 : Résultats pour <i>Plasmodium knowlesi</i>	43
Tableau 8 : Résultats pour les multiparasitismes.....	44
Tableau 9 : Résultats pour les échantillons négatifs	46
Tableau 10 : Résultats classés en fonction du type d'erreur	48

Introduction

Le paludisme est une maladie présente au sein de l'humanité depuis la nuit des temps. Elle a été rapportée dans de nombreuses civilisations, y compris les plus anciennes.

Les premières traces écrites évoquant le paludisme remontent à l'antiquité chinoise environ 2700 ans avant Jésus-Christ, où l'empereur Hang Ti évoque la triade de symptômes du paludisme : fièvre – frissons – céphalées.¹ C'est beaucoup plus tard, au cours de l'Antiquité, qu'Hippocrate et Galien décrivent plus précisément les accès palustres, mentionnant notamment leur périodicité.² Cette maladie a été nommée « paludisme » à partir du mot latin *palus*, signifiant marais, au vu de la proximité des marécages et des zones d'endémie. La dénomination « malaria » viendrait quant à elle de l'italien *mal'aria*, signifiant mauvais air.³

Alors que la maladie persiste au fil des siècles, ses symptômes sont de mieux en mieux identifiés et le paludisme est alors distingué des autres fièvres. Cependant, les véritables progrès diagnostiques concernant le paludisme datent de la fin du XIX^{ème} siècle. Un médecin français, Alphonse Laveran, observe des formes parasitaires intra-érythrocytaires chez les malades atteints de paludisme.⁴ Puis différentes espèces seront décrites, ainsi que le cycle parasitaire au sein de l'organisme humain. C'est aussi à cette époque que l'implication de certaines espèces de moustiques en tant que vecteur est décrite, expliquant alors la relation entre les zones marécageuses et les zones d'endémie palustre.⁵

Depuis ces découvertes majeures, les techniques de diagnostic biologique, initialement strictement basées sur la microscopie, n'ont cessé d'évoluer. Même si l'analyse du frottis mince et l'utilisation des tests de diagnostic rapide (TDR) sont des méthodes diagnostiques de choix, l'avènement de la biologie moléculaire a permis d'améliorer la sensibilité et la spécificité du diagnostic du paludisme.⁶

I. Généralités concernant le paludisme

A. Epidémiologie

Le paludisme est une maladie parasitaire causée par des protozoaires hématozoaires du genre *Plasmodium*, transmise par les moustiques femelles du genre *Anopheles*. Cinq espèces principales ont été décrites comme capables d'infecter l'Homme : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*,

Plasmodium vivax, *Plasmodium ovale* (divisé en deux sous-espèces, *Plasmodium ovale curtisi* et *wallikeri*) et *Plasmodium knowlesi*⁷. Cette maladie est endémique des régions tropicales d'Afrique principalement, mais aussi d'Asie, d'Amérique du Sud et d'Amérique centrale. Chaque espèce a une répartition géographique différente. En effet, *P. falciparum* et *P. malariae* sont présents dans la grande majorité des zones impaludées. *P. ovale* est essentiellement confiné au continent africain, tandis que *P. vivax* est plus largement retrouvé en Amérique et en Asie. Enfin, *P. knowlesi* est cantonné à l'Asie du Sud-Est.

Le paludisme est une maladie évitable : sa prévention est un enjeu majeur dans le monde.⁸ Concernant la lutte antivectorielle, l'OMS recommande l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide ainsi que la pulvérisation d'insecticide à effet rémanent au domicile. Une chimiothérapie préventive peut également être proposée aux habitants de zones impaludées. De plus, une chimioprophylaxie peut être prescrite aux voyageurs en fonction de leur pays de destination. Enfin, un vaccin destiné aux enfants vivant dans les zones de transmission modérée à forte du paludisme à *P. falciparum* est recommandé par l'OMS depuis 2021.

Malgré les mesures préventives mises en place dans le monde, le paludisme reste une maladie extrêmement répandue et mortelle. Plus de 240 millions de cas de paludisme sont recensés par an dans le monde, provoquant plus de 600 000 décès.⁸

En France, tandis que le paludisme autochtone est une maladie à déclaration obligatoire auprès de l'Agence Régionale de Santé⁹, le paludisme d'importation est simplement soumis à surveillance. Les correspondants hospitaliers faisant partie du réseau de surveillance déclarent leurs cas au Centre National de Référence (CNR) pour permettre leur étude épidémiologique.

Sur l'année 2019, le CNR du paludisme a estimé à 5540 le nombre de cas de paludisme d'importation en France, ce chiffre est stable par rapport à l'année précédente.¹⁰ 98,8% des cas rapportés provenaient d'Afrique sub-saharienne et la principale espèce impliquée était *Plasmodium falciparum* (87,8%).

B. Cycle parasitaire ¹¹

Le cycle parasitaire du *Plasmodium* est dixène. La phase asexuée a lieu chez l'hôte intermédiaire (Homme) alors que la phase sexuée a lieu chez l'hôte définitif (l'anophèle femelle).

Lors de son repas sanguin, l'anophèle femelle infestée par le paludisme libère des sporozoïtes plasmodiaux dans le sang humain. Suit un cycle exo-érythrocytaire : les sporozoïtes pénètrent dans les

cellules hépatiques et se transforment en schizontes, ces derniers se rompent en libérant des mérozoïtes dans la circulation sanguine. Puis lors du cycle érythrocytaire, les mérozoïtes entrent dans les hématies et deviennent des trophozoïtes. Certains trophozoïtes se transforment en schizontes pour entretenir le cycle érythrocytaire, tandis que d'autres évoluent en gamétocytes mâles ou femelles.

Lors d'un autre repas sanguin, l'anophèle femelle ingère ces gamétocytes et le cycle sporogonique peut ainsi avoir lieu. La fécondation des gamètes engendre des zygotes, qui se différencient en ookinètes. Ces derniers envahissent la paroi intestinale de l'anophèle et deviennent des oocystes. Les oocystes libèrent des sporozoïtes qui vont rejoindre les glandes salivaires de l'anophèle, prêts à être inoculés à l'Homme lors d'un repas sanguin.

Les sporozoïtes des espèces *P. ovale* et *P. vivax* ont la capacité de se transformer en hypnozoïtes après leur entrée dans les hépatocytes¹². Ces formes dormantes peuvent se réactiver après des mois, des semaines voire des années et conduire à des accès dits de reviviscence. Les hypnozoïtes ne sont pas accessibles aux traitements antipaludéens classiques, ils nécessitent un traitement spécifique par Primaquine pour permettre leur éradication¹³.

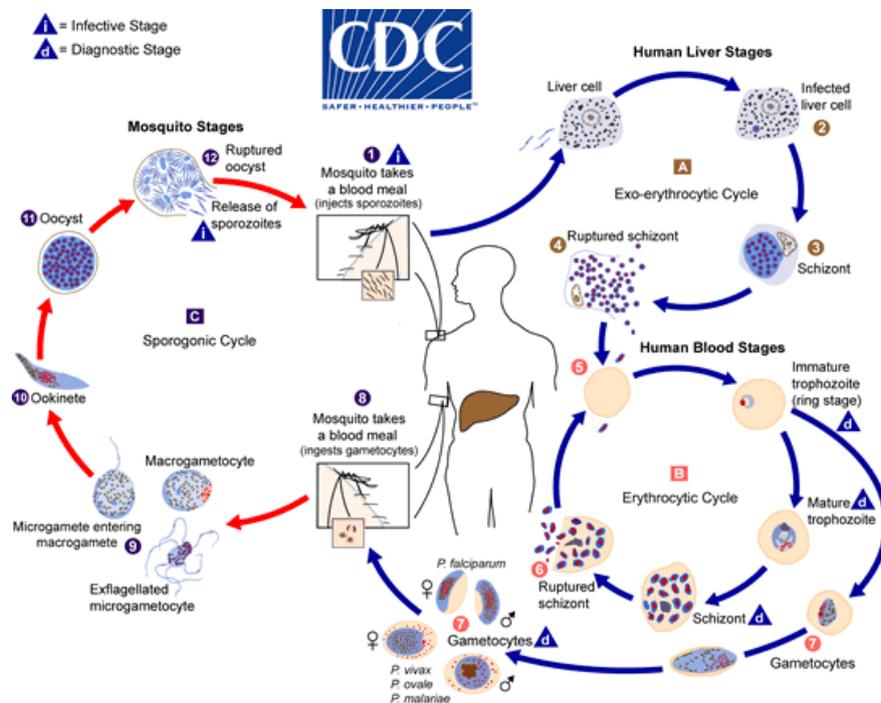


Figure 1 : Schéma du cycle parasite de Plasmodium (www.cdc.gov)

II. Diagnostic du paludisme : Revue générale

A. Diagnostic du paludisme d'importation ¹³

Les recommandations de l'OMS⁸ concernant le diagnostic du paludisme varient entre les zones géographiques et selon l'incidence. En France, le diagnostic de paludisme est évoqué chez toute personne présentant une fièvre et qui a pu être exposée au parasite (retour récent d'une zone d'endémie par exemple).

Il est recommandé d'associer une technique sensible (QBC, goutte épaisse ou technique de biologie moléculaire rapide) à un frottis mince.

En effet, l'intérêt est dans un premier temps de déterminer la présence ou non de *Plasmodium* dans le sang. Cette étape est assurée par une technique de diagnostic avec une sensibilité élevée, comme la goutte épaisse, le QBC ou bien une technique de biologie moléculaire rapide. En cas de test de première intention négatif, le diagnostic de paludisme peut être raisonnablement écarté.

En cas de test de première intention positif, le diagnostic d'accès palustre est confirmé. Le frottis mince (et dans une moindre mesure les tests de diagnostic rapides) permettra de déterminer la ou les espèces en cause ainsi que la parasitémie. Ces informations s'avèrent essentielles pour une prise en charge optimale du patient présentant un accès palustre.

Dès lors que le paludisme est confirmé, le traitement doit être débuté dès que possible. Selon les recommandations de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) ¹³, la prise en charge thérapeutique varie selon plusieurs critères. Prenons l'exemple ici d'un accès palustre chez un adulte (hors femme enceinte).

La prise en charge est guidée dans un premier temps par la présence ou non de signes de gravité.

Les signes de gravité cliniques sont :

- Troubles de la conscience, convulsions
- Choc, défaillance respiratoire
- Syndrome hémorragique

Les signes de gravité biologiques sont :

- Ictère ou bilirubine totale > 50 µmol/L
- Hémoglobine < 7 g/dL
- Créatininémie > 265 µmol/L
- Glycémie < 2,2mmol/L
- Parasitémie > 4 % chez l'adulte
- Hyperlactatémie, acidose métabolique

Un accès grave sera traité par voie intraveineuse, par artésunate en première intention.

Un accès non grave sera traité différemment selon l'espèce identifiée :

- Administration d'une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (ACT) par voie orale en cas de *Plasmodium falciparum*
- Anciennement utilisée dans les accès à *Plasmodium non falciparum*, la chloroquine n'est plus commercialisée depuis 2022. En attendant la rédaction des nouvelles recommandations, il est préconisé de traiter ces accès par atovaquone-proguanil¹⁴ ou ACT¹³

Après vérification de l'absence de contre-indications (dont l'absence de déficit en G6PD), la prévention des accès de reviviscence à *Plasmodium vivax* ou *ovale* se fera par Primaquine.

Ainsi, la détermination précise et rapide de la ou les espèces en cause, ainsi que la parasitémie, sont indispensables à une prise en charge thérapeutique adaptée. Dans l'urgence, il est essentiel de déterminer si la parasitémie est supérieure à 4% (signes de gravité biologiques) et s'il s'agit d'un accès palustre à *Plasmodium falciparum*. Dans un second temps, la confirmation de l'identification de l'espèce par biologie moléculaire est primordiale pour ne pas omettre un biparasitisme ou bien une erreur d'identification par microscopie.

B. Diagnostic d'espèce par microscopie

Comme évoqué précédemment, l'analyse microscopique du frottis mince permet de déterminer l'espèce en cause, les stades parasitaires observés ainsi que la parasitémie (Figure 2). Sa sensibilité est

de l'ordre de 0,002% (100 parasites / μL)¹⁵ pour la détection des parasites. La détermination de l'espèce sur frottis par microscopie est basée sur les caractéristiques morphologiques des formes plasmodiales observées. Selon la qualité de l'étalement et de la coloration, l'exposition ou non du patient à une chimioprophylaxie, l'expérience du lecteur et l'importance de la parasitémie, il est plus ou moins aisé de déterminer l'espèce.¹⁶

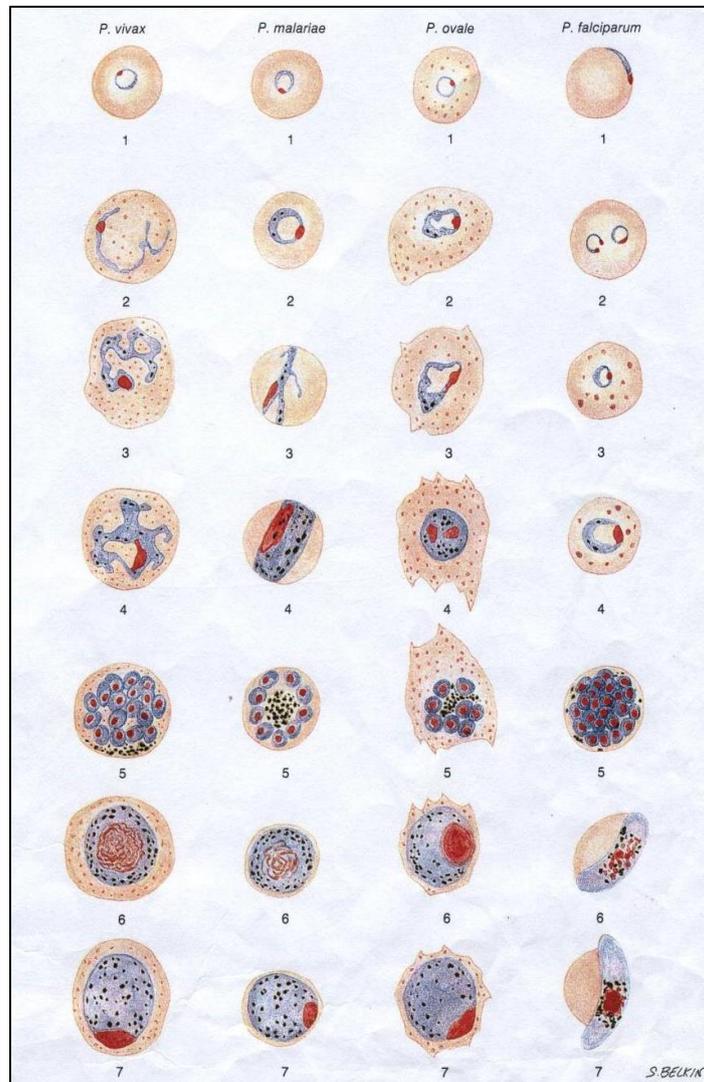


Figure 2 : Représentation des différents stades parasitaires en fonction des espèces de Plasmodium

La plupart des erreurs d'identification d'espèce par microscopie concerne les espèces non *falciparum*. Les raisons de ces erreurs sont multiples. Tout d'abord, la grande majorité des échantillons sont positifs à *P. falciparum* (87,8% des cas de paludisme d'importation en France en 2019¹⁰). Les espèces plasmodiales étant difficilement distinguables en microscopie, leur identification requiert du personnel expérimenté et entraîné. En effet, certaines espèces sont très proches morphologiquement, c'est le

cas d'*ovale* et *vivax* en particulier¹⁷, mais aussi de *knowlesi* et *malariae*.¹⁸ De plus, *P. knowlesi* est très peu représenté dans le paludisme d'importation en France (6 cas rapportés entre 2010 et 2019¹⁰). De plus, la prise d'antipaludiques peut être à l'origine d'altérations de la morphologie des hématozoaires¹⁹ ou de plus faibles niveaux de parasitémie²⁰, rendant l'identification plus complexe. Enfin, les multiparasitismes sont également une des raisons d'erreur d'identification par microscopie²¹.

C. Utilisation des Tests de Diagnostic Rapide (TDR)

En plus de leur capacité à diagnostiquer la présence d'une espèce plasmodiale chez un patient, les TDR sont aussi une aide précieuse dans le cadre de la détermination de l'espèce : en moins de 30 minutes, ces tests basés sur le principe de l'immunochromatographie indiquent la présence ou non de certains antigènes et enzymes spécifiques de différentes espèces de *Plasmodium*. Ces tests permettent de détecter l'enzyme pLDH ou l'aldolase commune aux différentes espèces de *Plasmodium* (bande Pan), l'enzyme pLDH spécifique de *P. vivax* (bande Pv) et l'antigène HRP2 (protéine riche en histidine) spécifique de *P. falciparum*. Les critères de choix d'un TDR recommandés par l'OMS sont une sensibilité supérieure à 75% pour *P. falciparum* et *P. vivax* au seuil de 200 p/μL, un taux de faux positifs inférieur à 10% ainsi qu'un taux de tests invalides inférieur à 5%.¹⁵

Les plus performants affichent une sensibilité supérieure à 90% au seuil de 100 parasites /μL pour *Plasmodium falciparum* et 85% au seuil de 500 parasites /μL pour *Plasmodium vivax* alors que²² les performances pour les autres espèces de *Plasmodium* sont décevantes.¹³ Il a été observé des faux positifs pour la bande Pv, surtout lorsque l'on est en présence de *Plasmodium falciparum* dans le cas d'une forte parasitémie.²²

Concernant HRP2, il s'agit d'une protéine produite exclusivement par l'espèce *P. falciparum*, ce qui en fait un antigène largement utilisé pour la détection de cette dernière. Étant donné les très bonnes sensibilité et spécificité des TDR pour la bande HRP2, une infection à *Plasmodium falciparum* peut être déclarée par la positivité de la bande HRP2 seulement, même en l'absence de certitude sur la morphologie des hématozoaires observés au microscope. Cependant, il est à noter l'existence de souches de *Plasmodium falciparum* délétées pour les gènes HRP2 et/ou HRP3²³. HRP3 est une protéine proche d'HRP2, qui est reconnue par les anticorps spécifiques de cette dernière²⁴. Ainsi, des souches HRP2-/HRP3+ peuvent quand même être détectées par les TDR spécifiques HRP2 du fait de cette réactivité croisée, lorsque la parasitémie est importante. Cependant, les souches HRP2-/HRP3- ne sont plus du tout détectables par les TDR détectant cet antigène.²⁵ Ces souches délétées ont été rapportées

dans de nombreux pays dans le monde, notamment à Djibouti²⁶, au Brésil²⁷ ou en Erythree²⁸. Leur prévalence est telle (respectivement 83,5% ; 82,4% ; 62%) que l'utilisation de ces TDR peut être remise en question dans ces pays, du fait de la sélection potentielle de souches délétées, échappant au diagnostic par ces TDR.

D. Diagnostic d'espèce par biologie moléculaire

Ainsi, en combinant le frottis mince et le TDR, il est possible de déterminer l'espèce plasmodiale en cause. Cependant, dans certaines circonstances, ces techniques restent insuffisantes. La biologie moléculaire est alors l'outil de choix pour la confirmation d'espèce, étant donné sa spécificité et sa sensibilité. L'objectif étant de détecter le plus d'espèces possible et avec une sensibilité maximale.

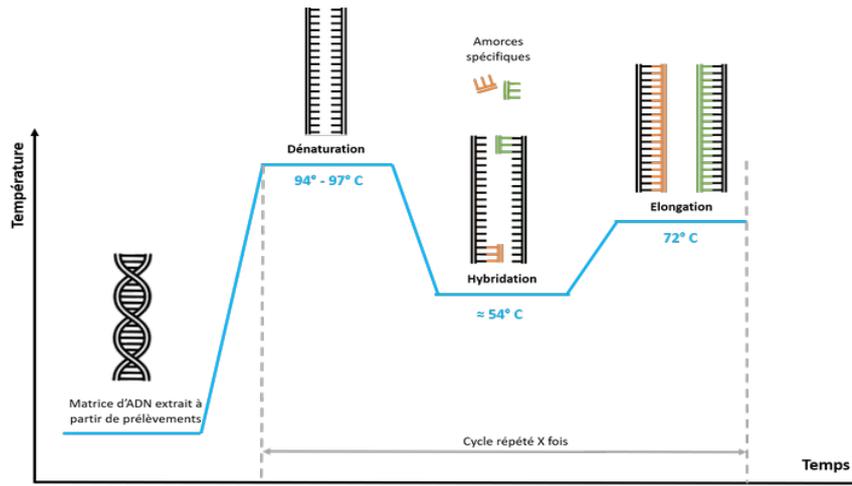
1. Principe général de la PCR (Polymerase Chain Reaction) :

La PCR est une technique permettant d'amplifier une séquence d'acides nucléiques d'intérêt à partir d'une matrice d'ADN extrait d'un prélèvement. Elle nécessite notamment un couple d'amorces, une ADN polymérase, des dNTPs, du MgCl₂ et un tampon.

Chaque couple d'amorces est constitué de 2 amorces spécifiques complémentaires des brins d'ADN de la séquence à amplifier et orientées de façon à permettre la synthèse d'ADN de 5' vers 3'. L'ADN polymérase doit être thermostable car les cycles de PCR font intervenir des hautes températures. L'élaboration d'une PCR nécessite la détermination des facteurs tels que la concentration optimale des amorces, des DNTPs, du MgCl₂, du type de polymérase, des différentes températures du cycle et de la composition de la matrice.

Chaque cycle permet de dupliquer l'ADN cible et est composé de 3 étapes (Figure 3) :

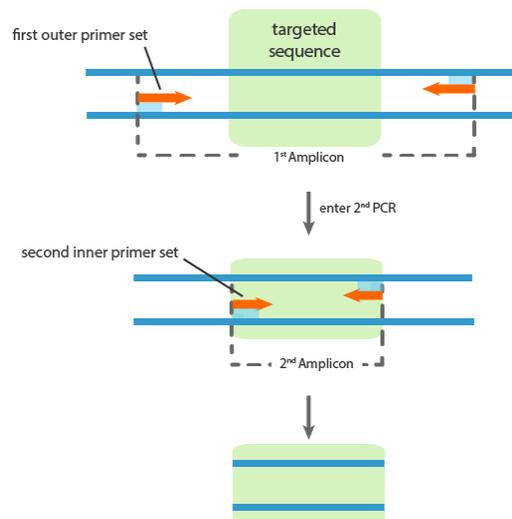
- Dénaturation : la température augmente, l'ADN double brin se dénature.
- Hybridation : la température diminue jusqu'à la température d'hybridation, les amorces spécifiques s'hybrident à leurs séquences d'ADN complémentaires.
- Elongation : l'ADN polymérase synthétise les nouveaux brins complémentaires en ajoutant les dNTPs à la suite des amorces.



A chaque cycle, la quantité d'ADN cible double dans l'échantillon. Ainsi, cette amplification exponentielle permet d'obtenir 2^n amplicons après n cycles. Généralement, le nombre de cycles varie entre 30 et 50.

A partir de ce principe général, plusieurs applications se sont développées. On peut citer pour exemple la PCR nichée (nested-PCR) et semi-nichée (semi-nested) ou le multiplexage.

La PCR nichée consiste en l'enchaînement de deux réactions de PCR classiques avec des couples d'amorces différents, mais encadrant tous deux la même séquence d'ADN d'intérêt. La seconde paire d'amorces cible une séquence comprise dans l'amplicon généré par la première paire d'amorces. Ainsi, la production d'amplicons non spécifiques est peu probable car si le produit obtenu après la première réaction n'est pas spécifique, il ne pourra pas subir la deuxième réaction et ne sera donc pas amplifié. Cette technique permet ainsi d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la réaction.



La PCR semi-nichée est une variante de la PCR nichée qui consiste également en 2 réactions successives. La seule différence est qu'une des deux amorces de la première paire est réutilisée dans la seconde réaction, en association avec une autre amorce.

La PCR multiplex utilise plusieurs paires d'amorces dans une seule réaction de PCR ; le plus souvent autant de paires d'amorces que de fragments cibles. Ainsi, couplé à une technique de détection adaptée, on peut déterminer quelle cible a été amplifiée, voire détecter plusieurs types d'amplicons si plusieurs cibles étaient présentes au début de la réaction.

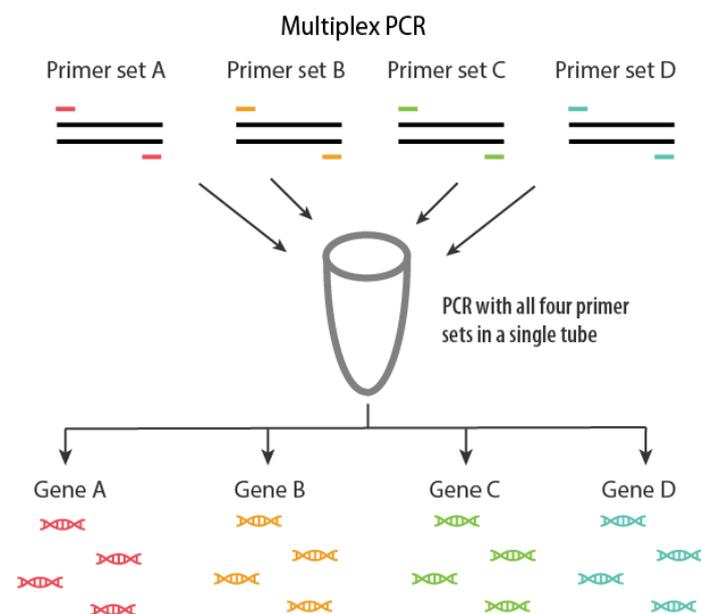


Figure 5 : Schéma de la PCR multiplex, ici quadriplex (www.abmgood.com)

Plus le nombre de cibles est élevé, plus la mise au point de la réaction est complexe. En effet, les différentes conditions de la réaction (composition du mix réactionnel, températures des différentes étapes du cycle d'amplification) doivent être ajustées pour permettre la ou les amplifications avec le meilleur rendement possible.

L'avantage de ce type de PCR est qu'une seule réaction est nécessaire pour détecter plusieurs espèces mais cela peut parfois impliquer une baisse de sensibilité et de spécificité.

2. Application des techniques de PCR au diagnostic moléculaire du paludisme :

Dans le cadre du diagnostic du paludisme, plusieurs types de techniques de biologie moléculaire ont été évalués dans la littérature, combinant différentes méthodes d'amplification ou de détection. Les principales sont décrites ci-dessous et leurs caractéristiques (type d'amplification et de révélation, espèces détectées, gènes cibles, nombre d'amorces et de sondes utilisées) sont récapitulées dans le Tableau 1.

a. Cibles plasmodiales

La plupart des PCR de détection du genre *Plasmodium* ou bien de caractérisation d'espèces, cible le gène de la sous unité 18S de l'ARN ribosomal (18S rRNA). Ce gène présente la particularité d'être assez conservé entre les différentes espèces, ce qui permet d'en détecter le plus grand nombre et est présent en plusieurs copies (5 à 10) dans chaque parasite, ce qui permet d'augmenter la sensibilité²⁹.

D'autres gènes peuvent être la cible de PCR de diagnostic d'espèce :

- Gènes mitochondriaux (Cytochrome b(Cytb)^{30,31}, Cytochrome c oxydase III (cox3)^{31,32}, Cytochrome c oxydase I (cox1)³¹) : un seul gène présent en plusieurs copies, selon la quantité de mitochondries par parasites. Les gènes mitochondriaux ont l'avantage d'être présents en plus grand nombre par rapport au gène 18S rRNA.
- Gènes codant pour d'autres protéines plasmodiales : apical membrane antigen 1 (AMA1) ou plasmepsine³³, dihydrofolate réductase (dhfr)³⁴.
- Séquences nucléotidiques répétées³⁴ (Pfr364 pour *P. falciparum* et Pkr140 pour *P. knowlesi*).

b. Méthode de détection de l'ADN plasmodial amplifié

La détection des produits de PCR peut se faire en point final, c'est-à-dire après un nombre de cycles fixé, ou bien en temps réel, c'est-à-dire tout au long de la réaction.

(i) Electrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique est la plus fréquemment utilisée pour la détection en point final. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose puis les bandes sont révélées par une molécule se liant à l'ADN double brin : du bromure d'éthidium ou du SYBR® green. Le SYBR® Green est une molécule se liant au petit sillon de l'ADN, il n'émet pas ou peu de fluorescence lorsqu'il est libre dans le milieu réactionnel mais en émet lorsqu'il est lié à de l'ADN double brin.

La séparation des produits de PCR se fait selon la taille des fragments d'ADN uniquement. Cette technique permet d'obtenir un résultat uniquement qualitatif. L'objectif est de vérifier la bonne taille du fragment amplifié par rapport à une valeur théorique ainsi que sa pureté.

A noter que la nécessité de manipulation des produits post PCR implique un risque majeur de contamination de l'environnement par les amplicons présents en très grande quantité en fin de réaction, ce qui en fait une technique de détection nécessitant de grandes précautions techniques. Dans les laboratoires de diagnostic médical, ces méthodes ne sont quasiment plus utilisées, du fait de ce risque.

Si les fragments obtenus ont des poids moléculaires suffisamment distincts, la détermination de l'espèce peut se faire par caractérisation de la taille de l'amplicon.

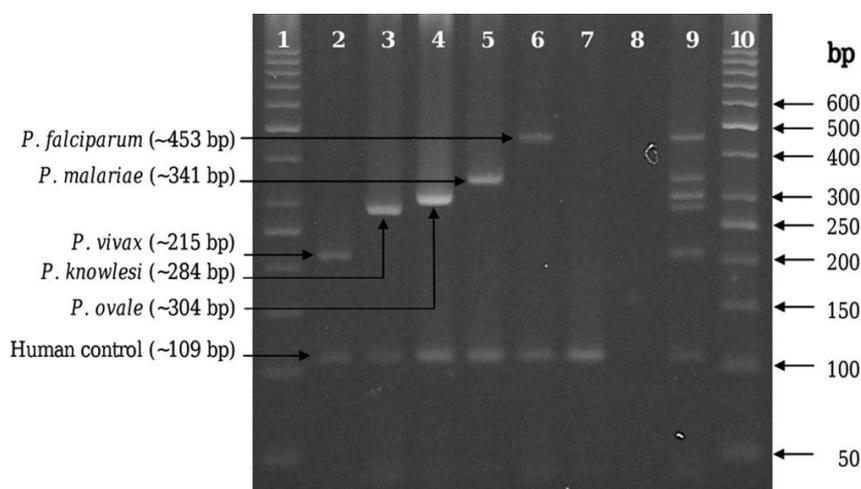


Figure 6 : Résultats de Chew et al.³⁵

C'est la méthode de détection utilisée par Chew et al.³⁵ en 2012 pour détecter les 5 espèces plasmodiales infectant l'homme. Ils utilisent pour chaque espèce une amorce spécifique de l'espèce et une amorce spécifique du genre *Plasmodium*, ciblant le gène 18S rRNA. Grâce à une réaction de PCR classique multiplex, ces amorces amplifient des fragments de taille différentes, de 215 à 453 paires de

bases, ce qui permet de discriminer les 5 espèces après électrophorèse sur gel d'agarose et révélation par bromure d'éthidium.

Miguel-Oteo *et al.*³⁶ ont élaboré une PCR semi-nichée pour détecter également les 5 principales espèces de *Plasmodium*. Les amorces de la première réaction sont pan-*Plasmodium* et ciblent le 18S rRNA, puis lors de la seconde réaction, une de ces amorces est réutilisée, en complément d'une amorce spécifique de l'espèce. Les produits de la réaction sont donc révélés après électrophorèse, et l'espèce est également identifiée par la taille du fragment (de 215 à 457 paires de bases).

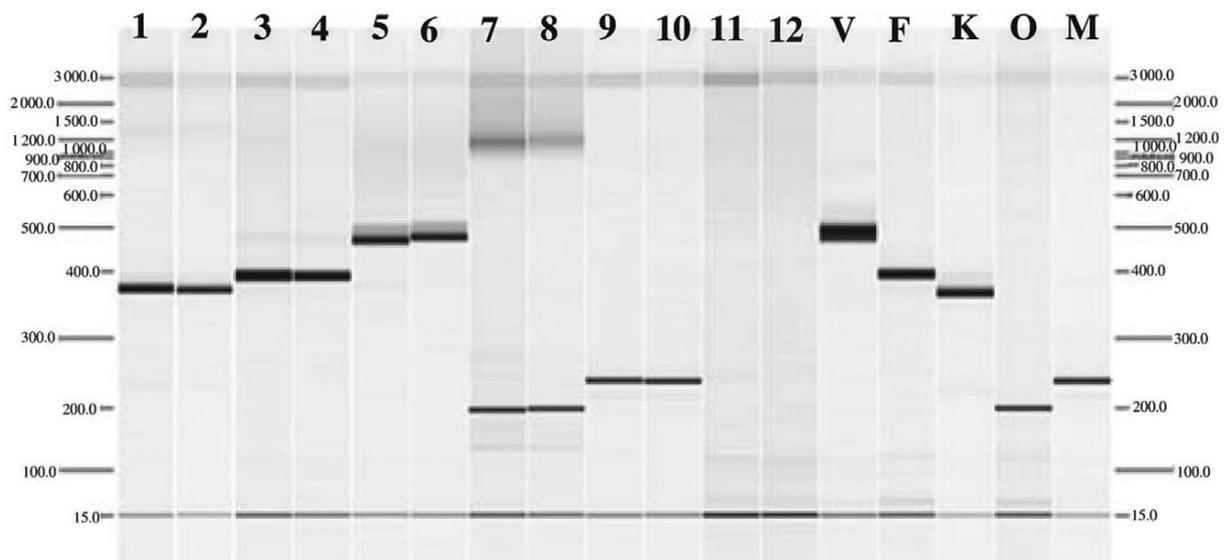


Figure 7 : Résultats de Miguel-Oteo *et al.*³⁶ Profils obtenus après électrophorèse des produits de PCR à partir d'échantillons (puits 1 à 12) et de souches connues (puits V, F, K, O, M)

L'ajout d'une étape de digestion des produits de PCR par des enzymes de restriction permet d'augmenter la spécificité de la détection. Les enzymes de restriction sont des enzymes capables de cliver un fragment d'ADN au niveau d'un site de restriction (séquence nucléotidique palindromique spécifique d'une enzyme donnée). Après digestion des amplicons par ces enzymes, on obtient des fragments d'ADN, qui après une électrophorèse sur gel d'agarose sont révélés comme décrit précédemment. On observe alors sur le gel plusieurs bandes qui constituent un profil spécifique au fragment amplifié, que l'on compare au profil de référence pour s'assurer de la spécificité.

Dans l'étude de Xu *et al.*³⁰, cette technique est utilisée. En effet, la réaction est une PCR simple utilisant une seule paire d'amorces ciblant le gène *cytb* des espèces *falciparum*, *vivax*, *ovale* et *malariae*. Une fois la réaction terminée, le produit de PCR obtenu a une taille de 430 paires de bases quelle que soit l'espèce. Ensuite, les amplicons subissent l'action d'enzymes de restriction (*FspBI* et *AluI*) et les

fragments obtenus sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose. Après révélation, chaque profil obtenu est comparé aux profils connus des différentes espèces pour déterminer cette dernière.

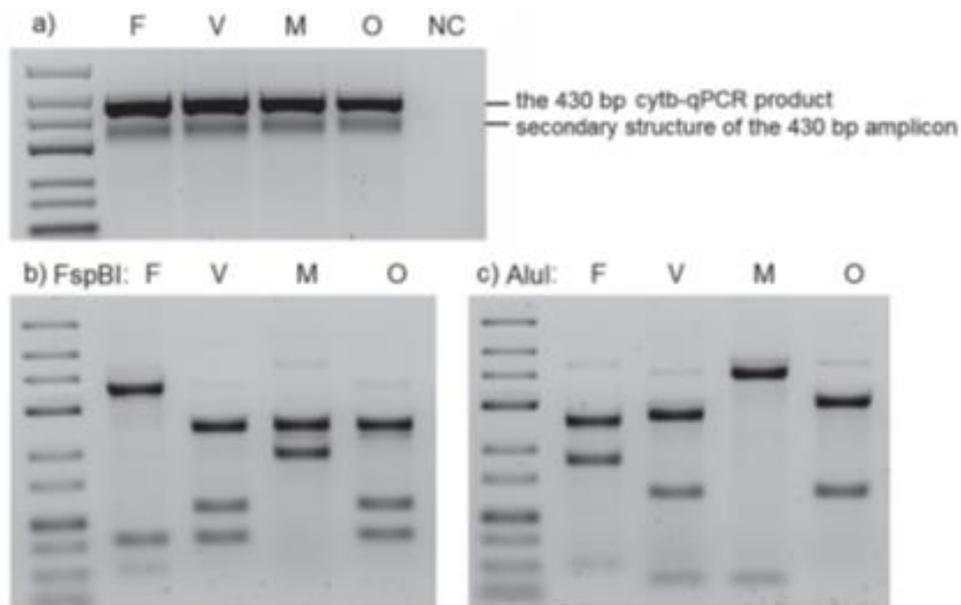


Figure 8 : Résultats de Xu et al.³⁰ a) Produits de PCR bruts, b) et c) Profils après digestion par enzymes de restriction (respectivement FspBI et AluI) pour les différentes espèces de Plasmodium

(ii) Analyse des courbes de fusion

L'analyse de la courbe de fusion consiste à évaluer la température de dénaturation du fragment d'ADN amplifié. Un agent se liant à l'ADN double brin ou une sonde spécifique du produit de PCR couplée à un fluorochrome est ajouté à la réaction de PCR. A la fin de la réaction, la température est augmentée progressivement jusqu'à ce que l'ADN se dénature totalement. Ainsi, une courbe de fluorescence en fonction de la température (A) peut être établie, mais celle-ci est difficilement interprétable. On lui préfère la courbe de la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température (B), qui permet de déterminer la température de fusion (T_m) du produit de PCR, mesurée au niveau du pic. L'allure de la courbe obtenue et le T_m sont comparés à ceux de référence du produit de PCR attendu.

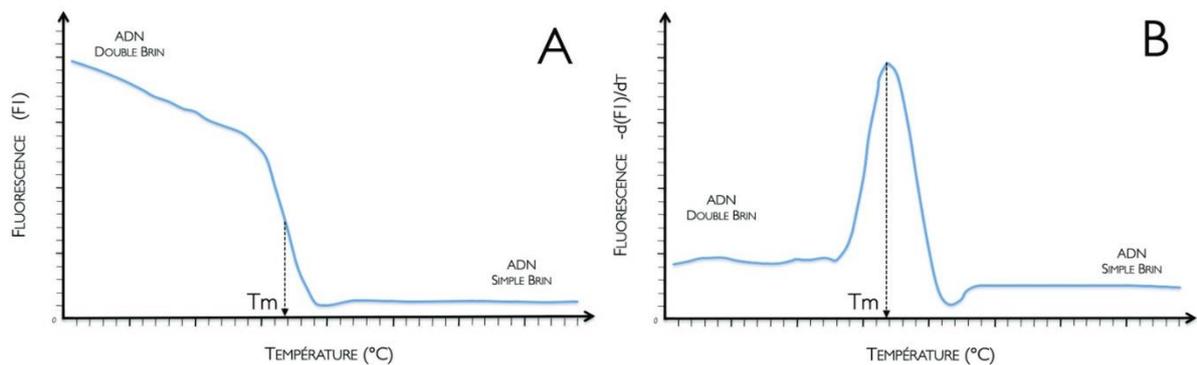


Figure 9 : Exemple de courbes de fusion d'un produit de PCR. Courbe de la fluorescence en fonction de la température (A).
 Courbe de la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température (B) ³⁷

En effet, la température de fusion sera d'autant plus élevée que le fragment d'ADN amplifié est grand et que sa séquence nucléotidique est riche en bases G et C - car ces dernières se lient entre elles grâce à 3 liaisons hydrogène contrairement aux bases A et T qui ne sont liées que par 2. Ainsi, l'obtention d'un deuxième pic sur la courbe de fusion peut être révélateur de produits de PCR non spécifiques par exemple. Dans le cadre d'une PCR multiplex, si les T_m des différentes espèces sont assez distincts, la détermination de l'espèce peut se faire par analyse de la courbe de fusion et comparaison aux T_m de référence des différentes espèces.

Dans l'étude de Lefterova *et al.*³⁴, 5 PCR simplex sont réalisées indépendamment avec des couples d'amorces spécifiques des espèces *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. knowlesi*, en ajoutant du SYBR Green au mix réactionnel. Pour déterminer la spécificité de la réaction, le T_m obtenu à partir des courbes de fusion de l'échantillon est comparé au T_m de référence de l'espèce (courbes de références représentées sur la Figure 10).

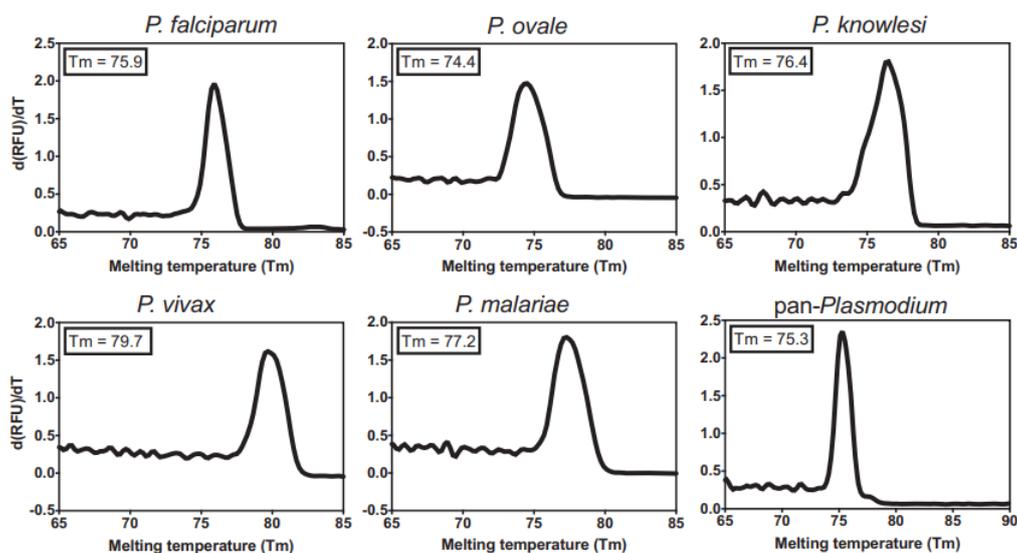


Figure 10 : Résultats de Lefterova *et al.*³⁴ Courbes de fusion des différentes espèces détectées.

Dans l'étude de Schneider *et al.*³⁸, c'est une seule paire d'amorces qui est utilisée : elle permet d'amplifier des fragments d'ADN des 5 espèces infectant l'homme, de taille différente. La région ciblée par ces amorces contient des polymorphismes nucléotidiques (single nucleotide polymorphism SNP). Pour la détection, une seule sonde fluorescente est utilisée, elle est complémentaire de *P. falciparum* et présente 2 mismatch avec la séquence de *P. vivax* et *P. knowlesi*, et 1 mismatch avec les séquences de *P. ovale* et *P. malariae*. Ainsi, les courbes de fusion obtenues sont différentes selon l'espèce, comme illustré dans la figure 11. Malheureusement, cette technique ne permet pas de distinguer les espèces *P. vivax* de *P. knowlesi* du fait de Tm équivalents.

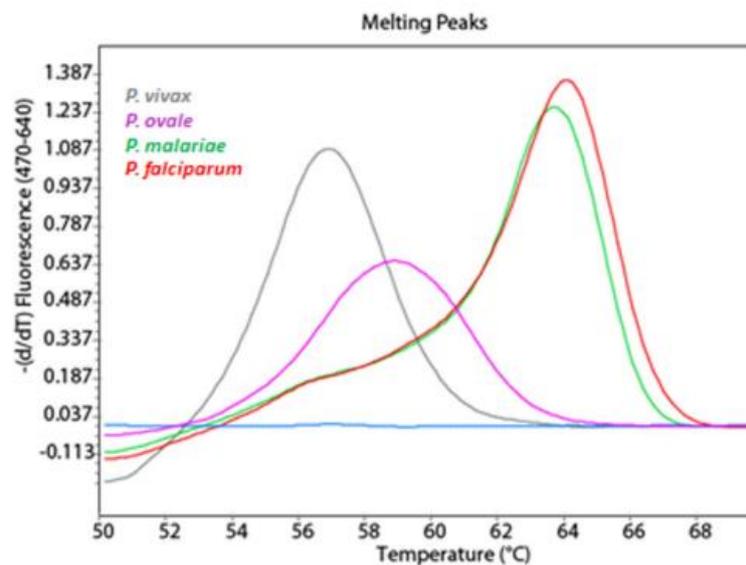


Figure 11 : Résultats de Schneider *et al.*³⁸ Courbes de fusion des différentes espèces de Plasmodium.

Dans l'étude de Van Bergen *et al.*³¹, 2 paires d'amorces sont utilisées. La première paire permet d'amplifier un fragment de 116 paires de bases des 11 espèces ou souches de *Plasmodium* (dont *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. knowlesi* et 2 sous espèces de *P. ovale* – *curtisi* et *wallikeri*). La deuxième paire permet d'amplifier un fragment de 212 paires de bases pour les espèces *P. vivax*, *P. knowlesi* et *P. cynomolgi* (espèce répandue en Malaisie, infectant généralement les macaques mais pouvant également infecter l'homme³⁹). 3 sondes ciblant 3 séquences différentes, chacune couplée à un fluorochrome sont ajoutées à la réaction. Les courbes de fusion ensuite obtenues permettent de discriminer les 5 espèces car la combinaison des profils des 3 sondes est différente pour chaque espèce.

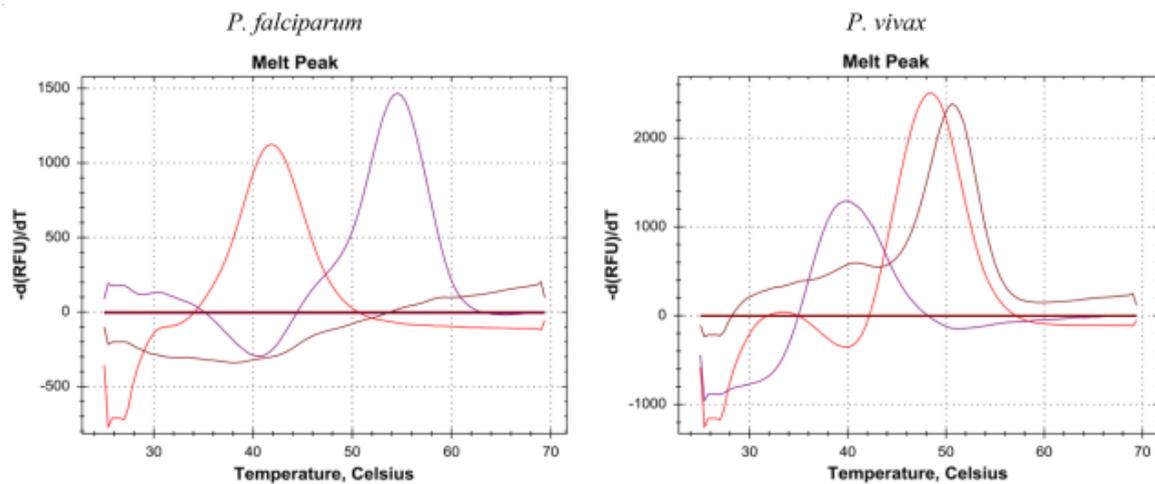


Figure 12 : Résultats de Van Bergen et al.³¹, exemples de courbes de fusion obtenues pour *P. falciparum* et *P. vivax* avec les 3 sondes (courbe rouge pour la sonde marquée au Texas Red, courbe violette pour la sonde marquée au cy5 et courbe marron pour la sonde marquée au Cy5.5).

(iii) Détection en temps réel

De nos jours, la plupart des réactions de PCR sont associée à une détection en temps réel. Cette méthode consiste en l'analyse de la quantité d'ADN répliqué à chaque cycle.

Pour cela, un émetteur fluorescent est ajouté à la réaction de PCR, et permet de suivre la quantité de produit de PCR. Il en existe deux types principaux : les molécules se liant à l'ADN double brin (type SYBR® Green) et les sondes à fluorescence.

Dans le cas du SYBR® Green, la fluorescence augmente significativement lors de l'étape d'élongation puis décroît pendant l'étape de dénaturation. Ce type de molécule offre l'avantage de ne pas être spécifique de la séquence amplifiée donc ne nécessite pas une conception propre à chaque PCR. En revanche, cela implique que la spécificité de la réaction repose entièrement sur la conception des amorces.

Concernant les sondes à fluorescence, il en existe plusieurs types mais le plus fréquent actuellement est la sonde de type Taqman.

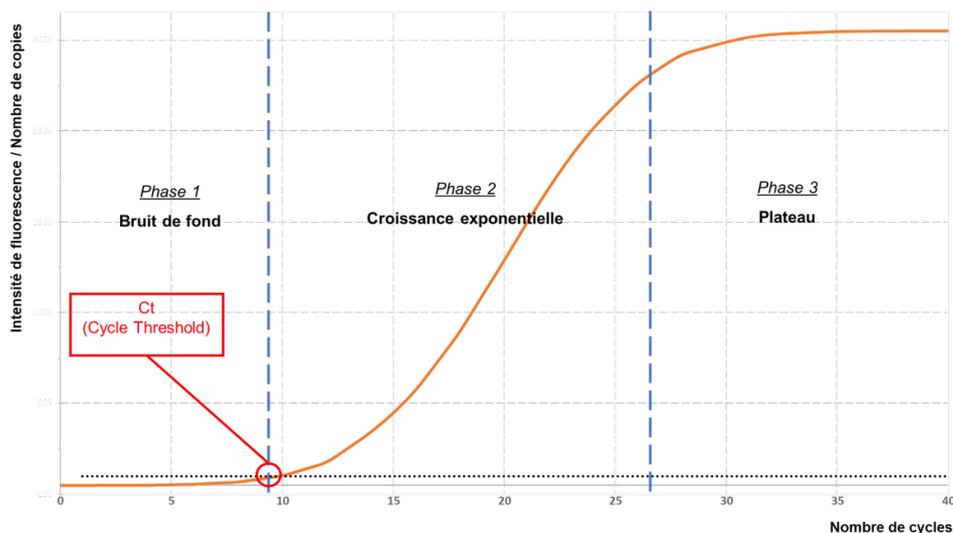
Les sondes Taqman sont des oligonucléotides complémentaires du fragment à amplifier sur lesquelles sont fixés à leur extrémité 5' un fluorochrome émetteur « reporter » et à leur extrémité 3' un fluorochrome suppresseur « quencher ». Dans son état de base, la sonde n'émet pas de fluorescence car, le reporter et le quencher étant proches physiquement, ce dernier absorbe la fluorescence du

reporter. Pendant l'élongation, la sonde s'hybride à sa séquence complémentaire puis subit l'action 5'-3' exonucléasique de la Taq polymérase, libérant dans le milieu réactionnel le quencher et le reporter, séparément. Ainsi, la fluorescence émise par le reporter n'est plus absorbée par le quencher et peut être détectée dans le milieu.

Les avantages de ces sondes sont leur spécificité envers la séquence d'intérêt et la possibilité de créer des PCR multiplex en utilisant des fluorochromes émetteurs différents pour chaque sonde. Cependant, un ajustement de la température d'hybridation sera nécessaire pour permettre l'hybridation des sondes en même temps que celle des amorces ainsi que de la température d'élongation car les sondes doivent rester hybridées lors de cette étape. En comparaison avec les molécules se liant à l'ADN double brin, la conception de ces sondes est donc complexe.

Indépendamment du type d'émetteur choisi pour la réaction, la fluorescence est mesurée à chaque cycle et on obtient en fin de réaction une courbe de la fluorescence en fonction du nombre de cycles. Cette courbe montre 3 phases :

- La phase de bruit de fond au début de la réaction où la fluorescence ne dépasse pas le seuil de détection.
- La phase de croissance exponentielle : la fluorescence dépasse le seuil de détection et augmente de façon exponentielle à l'instar de la quantité d'ADN.
- La phase de plateau : la fluorescence stagne car les éléments nécessaires à la réaction ne sont plus en quantité suffisante pour permettre une amplification.



A.

Figure 13 : Exemple de courbe de l'Intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles lors d'une PCR en temps réel (www.biomnigene.fr)

L'analyse de cette courbe permet de déterminer le Ct (Cycle threshold) : il correspond au nombre de cycles nécessaires pour que l'intensité de fluorescence soit statistiquement supérieure au seuil de détection. Ce Ct est donc inversement proportionnel à la quantité d'ADN présente dans l'échantillon de départ. La PCR en temps réel permet d'obtenir un résultat qualitatif ou quantitatif. En effet, une gamme d'étalonnage peut être élaborée en mesurant les Ct d'échantillons de quantité d'ADN connue.

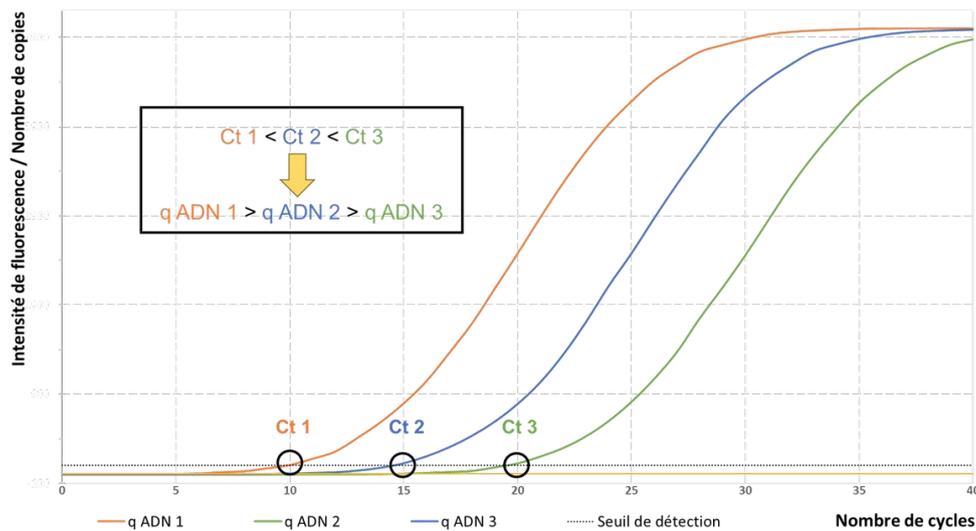


Figure 14 : Variation du Ct en fonction de la quantité d'ADN (www.biomnigene.fr)

Diverses publications rapportent l'utilisation de ces sondes pour discriminer les différentes espèces de paludisme. L'objectif des différents travaux est de détecter et discriminer le plus d'espèces différentes possibles.

Perandin *et al.*⁴⁰ ont mis au point une PCR permettant la détection de *P. falciparum*, *P. ovale* et *P. vivax* par 3 PCR simplex, faisant appel à 3 paires d'amorces et 3 sondes, toutes spécifiques d'espèces.

Shokoples *et al.*⁴¹ ont établi une PCR semi-nichée. La première réaction utilise des amorces pan-plasmodiales, la seconde utilise des couples d'amorces composés d'une amorce pan-plasmodiale et d'une amorce spécifique d'espèce. La détermination d'espèce recourt à 4 sondes spécifiques d'espèce (*P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax* et *P. malariae*).

Plusieurs travaux font appel à une combinaison de 2 PCR duplex en parallèle : une réaction permettant la détection de *P. falciparum* et *P. vivax*, ainsi qu'une autre réaction pour la détection de *P. ovale* et *P. malariae* :

- Dans la publication de Rougemont *et al.*⁴², un seul couple d'amorce commun aux deux réactions est utilisé pour l'amplification. Puis la détermination de l'espèce recourt à 4 sondes spécifiques d'espèce.
- Concernant les travaux de Rosanas-Urgell *et al.*⁴³, 4 paires d'amorces spécifiques des espèces et 4 sondes Taqman elles aussi spécifiques d'espèce sont employées.
- A propos de Cnops *et al.*⁴⁴, chaque couple d'amorce est composé d'une amorce pan-plasmodiale commune à tous les couples associée à une amorce spécifique d'espèce (soit 5 amorces différentes au total). La détermination d'espèce est assurée par 4 sondes spécifiques d'espèce.

Une autre possibilité est l'établissement de PCR multiplex :

- Dormond *et al.*⁴⁵ ont mis en place une PCR permettant de détecter les espèces *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* grâce à 4 paires d'amorces spécifiques d'espèce et 4 sondes également spécifiques d'espèce dans la même réaction.
- La technique est similaire pour Reller *et al.*³³ qui font appel à 5 paires d'amorces spécifiques d'espèces et 5 sondes spécifiques d'espèces, permettant de détecter les 4 espèces précédemment citées ainsi que *P. knowlesi*.

(iv) Autres techniques de détection

D'autres techniques de détection des produits de PCR ont été mises au point, mais leur utilisation reste anecdotique.

Machouart *et al.*⁴⁶ ont utilisé pour la détection des différentes espèces la technique CMPH (Covalink NH microwell plate hybridization). La particularité est de modifier une des deux amorces ciblant le gène de la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal en ajoutant une molécule de biotine à son extrémité 5'. Des micropuits sont coatés avec des sondes spécifiques des espèces *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* ou *P. malariae*. Si l'amplification a bien eu lieu, le produit de PCR se lie à la sonde complémentaire, et

après ajout de streptavidine peroxydase et de substrat chromogénique, un complexe biotine-streptavidine se crée et un produit coloré est formé, comme illustré dans la Figure 15.

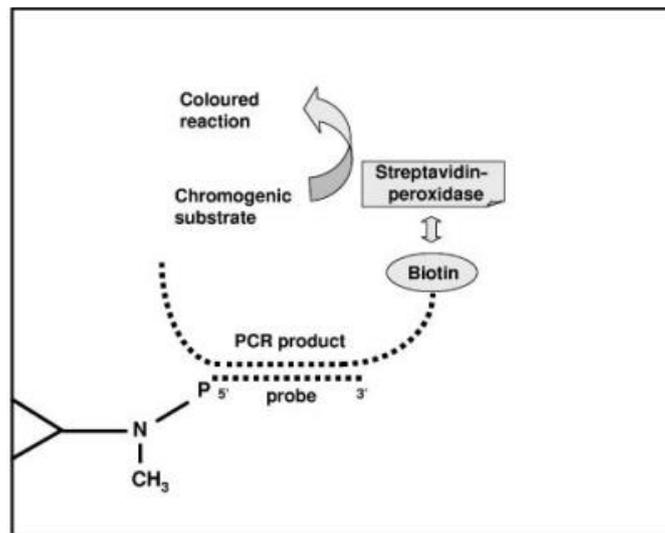


Figure 15 : Schéma représentant la réaction de révélation de produit de PCR dans un micropuits, selon Machouart et al.⁴⁶.

Enfin, une autre technique a été utilisée pour la détection des amplicons dans l'étude de Saito *et al.*³² : l'hybridation de marqueurs simple brins sur bande chromatographique (STH-PAS) basée également sur un complexe biotine-streptavidine. Une PCR nichée multiplex est réalisée avec pour la première réaction une paire d'amorces spécifiques du genre *Plasmodium*, puis pour la seconde réaction avec 5 paires d'amorces spécifiques d'espèce (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*). Chaque paire d'amorce est composée de :

- Une amorce biotinylée en son extrémité 5'
- Une amorce couplée à un marqueur (tag) en 5' également. Les tags sont de petites séquences nucléotidiques, des tags distincts sont accolés aux amorces des différentes espèces.

Ainsi, les produits de PCR porteront à une extrémité une molécule de biotine et à l'autre extrémité un tag, correspondant à l'espèce détectée.

Sur des bandes chromatographiques sont fixés à des positions connues des marqueurs (bandes rouges) ainsi que des cTag, qui sont des séquences nucléotidiques complémentaires de chaque tag (Figure 16B).

Ainsi, pour la révélation, les bandes chromatographiques sont trempées dans un mélange de solution tampon, de billes de latex bleues couvertes de streptavidine et de produits de PCR. Lorsqu'un produit

de PCR a été amplifié, le tag supporté par une extrémité de l'amplicon s'hybride avec le cTag complémentaire et une bande bleue apparaît (Figure 16A).

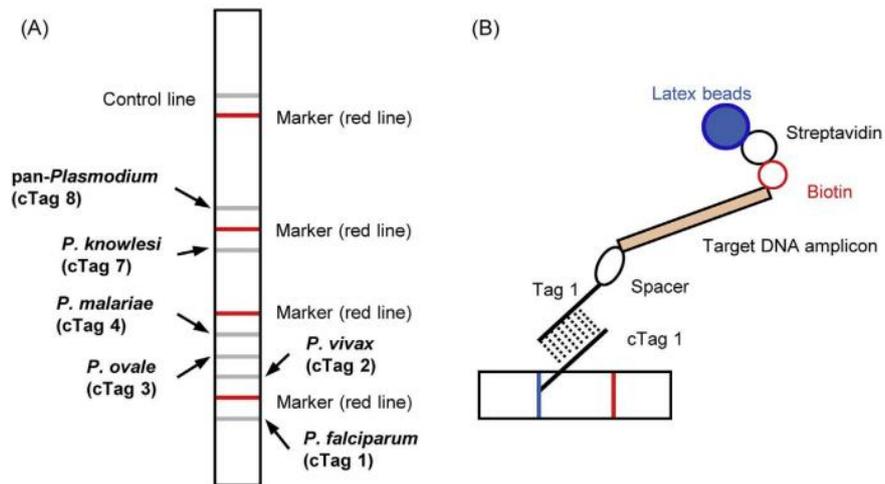


Figure 16 : Schémas représentant la méthode de détection utilisée par Saito et al. (A) Représentation des bandelettes chromatographiques. (B) Représentation de la réaction de révélation au niveau d'une bande.

Auteur, année	Classique/ Temps réel (TR)	Type de PCR	Nb d'amorces	Nb de sondes	Révélation	Espèces détectées	Gènes cibles
Rougemont, 2004	TR	2 Duplex	2	4	Taqman	Pf, Pv, Po, Pm	18S rRNA
Perandin, 2004	TR	3 Simplex	6	3	Taqman	Pf, Po, Pv	18S rRNA
Machouart, 2006	Classique	4 Simplex	2	4	Spectrophotométrie (complexe biotine streptavidine)	Pf, Pv, Po, Pm	18S rRNA
Shokoples, 2009	TR	Semi-nested Multiplex	6	4	Taqman	Pf, Pv, Po, Pm	18S rRNA
Rosanas-urgell, 2010	TR	2 Duplex	8	4	Taqman	Pf, Pv, Po, Pm	18S rRNA
Cnops, 2011	TR	2 Duplex	5	4	Taqman	Pf, Pv, Po, Pm	18S rRNA
Dormond, 2011	TR	Multiplex	8	4	Taqman	Pf, Pv, Po, Pm	18S rRNA
Chew, 2012	Classique	Multiplex	6	0	Electrophorèse sur gel d'agarose	Pf, Pv, Po, Pm, Pk	18S rRNA
Reller, 2013	TR	Multiplex	10	5	Taqman	Pf, Pv, Po, Pm, Pk	18S rRNA, AMA1, plasmepin
Lefterova, 2015	TR	5 Simplex	12	0	SYBRGreen	Pf, Pv, Po, Pm, Pk	18S rRNA, DHFR, repetitive sequences
Xu, 2015	TR	Simplex	2	0	RFLP puis électrophorèse sur gel d'agarose	Pf, Pv, Po, Pm	Cyt b
Miguel-Oteo, 2017	Classique	Semi-Nested Multiplex	7	0	Electrophorèse sur gel d'agarose	Pf, Pv, Po, Pm, Pk	18S rRNA
Saito, 2018	Classique	Nested Multiplex	12	0	STH - PAS	Pf, Pv, Po, Pm, Pk	COX-3
Van bergen, 2021	TR	1 triplex (Pv, Pk, Pc) 1 multiplex	4	3	Courbes de fusion	Pf, Pv, Po, Pm, Pk	COX-3, COX-1, Cyt b
Schneider, 2021	TR	Simplex	2	1	Courbes de fusion	Pf, Pv/Pk, Po, Pm	18S rRNA

Tableau 1 : Caractéristiques des principales PCR de diagnostic d'espèce de Plasmodium

III. Problématique

Alors que la microscopie est la technique de référence dans le diagnostic d'espèce plasmodiale, elle reste néanmoins laborieuse et des erreurs sont possibles, attribuables à des causes évitables (entraînement du lecteur) ou non (importance de la parasitémie, altération des formes par la prise d'antipaludiques...).

L'état des lieux du diagnostic d'espèce plasmodiale par biologie moléculaire présenté précédemment laisse apparaître de nombreuses techniques, différant notamment par le type de PCR, le nombre de réactions nécessaires, le type de révélation, ou bien le panel d'espèces détectées.

Cependant, actuellement, aucune technique de biologie moléculaire décrite dans la littérature ne permet de distinguer les 4 espèces plasmodiales non-*falciparum* (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*) en une unique réaction de PCR. Ainsi, une PCR en temps réel répondant à cette problématique a été développée au CHU de Toulouse au début des années 2000. Cette PCR 4 espèces est associée à une PCR dédiée spécifiquement à la recherche de *Plasmodium falciparum*.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'intérêt de la stratégie d'identification moléculaire des espèces de *Plasmodium* basée sur l'association PCR *falciparum* / PCR unique 4 espèces non-*falciparum*, en comparant les résultats de l'identification morphologique à celui de cette stratégie moléculaire.

IV. Matériel et méthodes

A. Sélection des échantillons

L'étude a été réalisée de manière rétrospective sur l'ensemble des échantillons envoyés dans le service de parasitologie du CHU de Toulouse et ayant bénéficié d'une PCR 4 espèces entre mai 2007 et juillet 2022. Ont été exclus les échantillons envoyés par des laboratoires extérieurs au CHU pour confirmation d'espèce, au vu du manque de données concernant l'analyse morphologique.

Les échantillons de sang ont été prélevés uniquement pour le diagnostic standard sur la base des prescriptions des médecins. Les données cliniques ont été rendues anonymes pour l'analyse. Selon la

loi française de santé publique⁴⁷, les protocoles de ce type ne nécessitent pas l'approbation d'un comité d'éthique et sont exemptés de l'exigence d'un consentement éclairé formel.

Jusqu'en 2018, la stratégie diagnostique du paludisme au CHU de Toulouse consistait en la réalisation d'un Quantitative Buffy Coat (QBC) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), et d'un frottis mince systématiques pour toute demande de recherche de paludisme. Un TDR pouvait être réalisé si nécessaire, en cas de doute ou de négativité du frottis mince. Une PCR genre *Plasmodium sp.*⁴⁸ était effectuée si tous les tests précédents étaient négatifs. En cas de positivité d'une des techniques précédentes, 2 PCR étaient effectuées : une PCR *Plasmodium falciparum*⁴⁸ et la PCR 4 espèces.

Depuis 2019, une amplification par LAMP Alethia assay (ex-Illumigene) (Meridian, Cincinnati, OH, USA) est effectuée pour tout échantillon avec demande de recherche de paludisme. En cas de positivité de la LAMP, un frottis mince et un TDR sont effectués en systématique dans l'urgence. Puis une PCR ciblant *Plasmodium falciparum*⁴⁹ ainsi que la PCR 4 espèces sont réalisées en série.

Entre Mai 2007 et fin 2018, les prélèvements destinés à la recherche de paludisme devaient présenter au moins une technique positive ou douteuse parmi le QBC, frottis mince, TDR ou PCR *Plasmodium sp.*, pour bénéficier d'une PCR 4 espèces. Après 2019, tous les échantillons positifs en technique LAMP bénéficiaient d'une PCR 4 espèces.

B. Morphologie : Microscopie et test immunochromatographique (TDR)

Pour chaque échantillon, un frottis mince coloré au May-Grünwald-Giemsa a été analysé par microscopie optique à l'objectif x100 pour déterminer l'espèce et les stades parasitaires observés. Les frottis minces ont été préparés, colorés et examinés au microscope par des opérateurs certifiés conformément aux recommandations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS)^{50,51}.

La recherche des antigènes plasmodiaux par technique immunochromatographique a été réalisée grâce au kit Palutop+4 Optima (AllDiag, Strasbourg, France) selon les recommandations du fournisseur. Cette technique permet la détection des enzymes LDH pan plasmodiale (bande Pan), et spécifiques de *P. vivax* (bande Pv) ainsi que la protéine HRP2 spécifique de *P. falciparum* (bande Pf). Le TDR permet ainsi uniquement l'identification des espèces *P. vivax* (bande Pv positive) ou *P. falciparum* (bande Pf positive).

L'identification morphologique retenue a ainsi été la combinaison des résultats d'identification des deux techniques (Frottis et TDR). Par exemple, un échantillon avec un frottis positif à *Plasmodium falciparum* et un TDR positif en bande Pv est conclu comme étant un biparasitisme *P. falciparum/vivax* en morphologie.

C. Biologie moléculaire

1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir de 200 µl de sang total à l'aide du kit High-Pure PCR Template (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) conformément aux instructions du fabricant. En résumé, 200 µl de tampon de lyse et 50 µl de protéinase K ont été ajoutés à 200 µl de sang. Après une incubation de dix minutes à 70 °C, 100 µl d'iso-propanol ont été ajoutés et la solution a été centrifugée dans un tube filtre pendant 1 minute à 8000 g. Après avoir ajouté 500µL de tampon d'élimination des inhibiteurs, le tube filtre a ensuite été centrifugé pendant 1 minute à 8000 g puis a été lavé trois fois avec du tampon de lavage. L'ADN a ensuite été élué dans 200 µl de tampon d'éluion par centrifugation pendant 1 minute à 8000 g.

2. PCR ciblant *Plasmodium falciparum*

Entre 2007 et 2018, la PCR ciblant *Plasmodium falciparum* était une PCR quantitative en temps réel ciblant le gène mitochondrial *cox1* issue de Fabre et al.⁴⁸. Les amorces utilisées sont spécifiques de ce gène (5'-GGA ATG TTA TTG CTA ACA C-3' et 5'-AAT GAA GAG CTG TGT ATC -3'). L'automate employé pour l'amplification et la détection est un LightCycler (Roche). L'étape de détection fait appel au SYBR Green, la spécificité du produit de PCR est assurée par la détermination de la température de fusion de ce dernier (Tm).

Depuis 2019, la PCR ciblant *Plasmodium falciparum* utilisée est également une PCR quantitative en temps réel, ciblant le gène codant pour le cytochrome b plasmodial et issue de Farrugia et al.⁴⁹. Le couple d'amorce utilisé est composé d'une amorce spécifique de *P. falciparum* (5'-TAC TAA CTT GTT ATC CTC TAT TCC AGT AGC-3') et d'une amorce pan-plasmodiale 5'-CCT TTA ACA TCA AGA CTT AAT AGA

TTT GGA-3'. La détection est effectuée grâce à une sonde de type Taqman, spécifique du gène *cytb*. Les cycles d'amplification, détection et quantification sont effectués sur un automate LightCycler 480 (Roche).

3. PCR « 4 espèces » ciblant les espèces non-*falciparum*

a. Amplification

Les amorces ciblent le gène de la petite sous-unité 18S du ribosome. Les séquences sont les suivantes :

- PL14ter : 5' CCT TGT GTT AGA CAC ACA TC 3'
- PL16bis : 5' TAA CGA ACG AGA TCT TAA CC 3'

Les alignements des amorces sur les séquences nucléotidiques du gène cible de chaque espèce sont représentés dans la Figure 17.



Figure 17 : Alignements des amorces sur les séquences nucléotidiques du gène codant pour la petite sous-unité 18s du ribosome plasmidial

Le mix réactionnel contient les amorces PL14ter et PL16bis à une concentration de 0,5µM chacune, du MgCl₂ à une concentration de 6,5mM ainsi que 2 µL de mix (FastStart SYBR Green Master, Roche).

Dans chaque puits est déposé 15 µL de mix réactionnel et 5µL d'extrait d'ADN ou 5µL de témoin (positif, négatif ou H₂O).

L'amplification est réalisée sur l'automate Light Cycler 480 (Roche) avec le programme suivant.

La réaction de PCR commence par une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10 minutes. Puis s'enchaînent 38 cycles d'amplification décrits ci-dessous :

- Dénaturation à 95°C pendant 10 secondes.
- Hybridation à 64°C pendant 5 secondes.
- Elongation à 72°C pendant 20 secondes, étape pendant laquelle la fluorescence est détectée à 530 nm.

Chaque échantillon est passé pur et dilué au ¼.

Pour chaque série de PCR, 3 témoins sont déposés :

- Un témoin positif (ADN *Plasmodium ovale* ou *malariae* ou *vivax*)
- Un témoin H₂O qui correspond à un témoin de mix
- Un témoin négatif (ADN humain sans ADN plasmodial)

b. Détection

Après les 38 cycles d'amplification, l'étape de fusion consiste en une augmentation de la température à une vitesse de 0,02 °C/s de 68 à 99°C ainsi qu'une acquisition de la fluorescence en continu tout au long de cette étape. Les données de fluorescence obtenues sont traitées par le logiciel Light Cycler 480, version 1.5.1.62, pour obtenir les courbes de fusion (dérivée première de la fluorescence en fonction de la température).

c. Analyse des courbes de fusion

Des courbes de fusion type ont été élaborées à partir de souches d'espèces connues, elles sont représentées dans la figure 18. L'analyse de ces courbes permet d'établir les T_m correspondant à chaque espèce ainsi que leur intervalle de confiance, ces derniers sont représentés dans le tableau 2. A noter que les intervalles de confiance des T_m, définis comme la moyenne +/- 2 écarts types, des espèces *P. ovale*, *vivax* et *malariae* ne se chevauchent pas. Le profil de *P. knowlesi* est composé de 2 pics à 77 et 80°C au même niveau d'intensité de fluorescence. Concernant *P. falciparum*, un pic autour

de 77°C peut apparaître mais il est inconstant. Cela peut être dû au fait que la séquence ciblée par les amorces pour cette espèce est un ARN ribosomal de type S, qui est présent majoritairement dans les parasites retrouvés chez les moustiques et moins fréquemment chez l'Homme⁵². De plus, cette séquence est variable, expliquant potentiellement les différentes longueurs de fragments obtenus pour *P. falciparum*. Les longueurs des produits de PCR ainsi que leur proportion en bases GC sont également présentées dans le tableau 2.

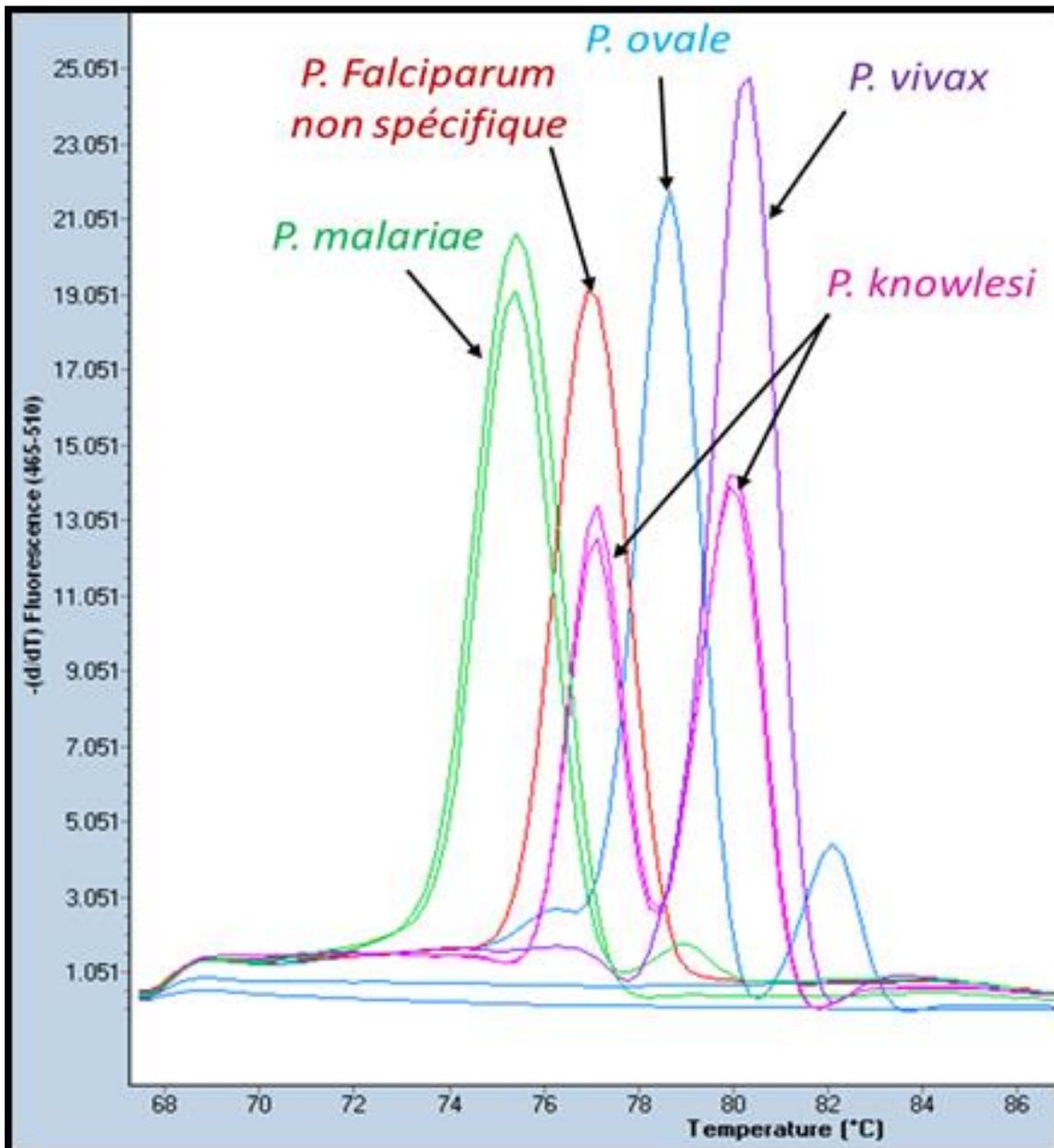


Figure 18 : Courbes de fusion des différentes espèces plasmodiales obtenues avec la PCR 4 espèces.

	Valeur basse Tm (°C)	Valeur haute Tm (°C)	Longueur (pb)	Proportion GC (%)
<i>P. malariae</i>	75	75,49	239	25,9
<i>P. ovale</i>	77,75	79,01	228	32,5
<i>P. vivax</i>	79,72	80,17	225	37,3
<i>P. knowlesi</i>	Double pic 77 + 80		229	31
<i>P. falciparum</i>	Pic inconstant 77		247	27,1
			245	25,7

Tableau 2 : Intervalles de confiance des Tm, longueur et proportion de bases GC des produits de PCR des différentes espèces plasmodiales selon la PCR 4 espèces

D. Recueil des données

Pour chaque échantillon, les données recueillies incluent les résultats du test fait en première intention (QBC ou LAMP selon les années), de l'analyse microscopique du frottis mince, du TDR et de la PCR *Plasmodium* sp. lorsqu'ils sont effectués, ainsi que de la PCR spécifique de *P. falciparum* et de la PCR 4 espèces.

V. Résultats

Au total, 1517 échantillons ont pu être inclus dans cette étude. 180 ont été exclus car provenant de laboratoires extérieurs.

A. Comparaison PCR et morphologie par espèce

Dans cette partie, les différentes combinaisons des données recueillies sont répertoriées pour chaque espèce dans un tableau.

1. *Plasmodium falciparum*

DIAGNOSTIC GENRE			MORPHOLOGIE		PCRS SPECIFIQUES	CONCORDANCE PCR SPECIFIQUES / MORPHOLOGIE	NB	NB (%)
QBC	PSP	LAMP	FROTTIS	TDR				
+	+		f	f	f		232	
+			f	f	f		1	
	+		f	f	f		4	
+			f	f	f		3	
			f	f	f		1	
ill	+		f	f	f		1	
		+	f	f	f		309	
		+	f	p	f		1	
+	+		f		f		392	
	+		f		f	Concordant morphologie/PCR	18	1136 (89,9 %)
+			f		f		9	
-	+		f		f		1	
+	+		f	n	f		34	
+	+		p	f	f		29	
		+	p	f	f		5	
	+		p	f	f		1	
+	+		n	f	f		25	
-	+		n	f	f		30	
	+		n	f	f		1	
		+	n	f	f		39	
+	+		p		f	Morphologie <i>Plasmodium</i> sp., PCR <i>P. falciparum</i>	7	12 (0,9 %)
	+		p		f		2	
		+	p		f		1	
-	+		p	n	f		1	
	+		p	n	f		1	
+	+		n	n	f		2	Morphologie négative, PCR <i>P. falciparum</i>
-	+		n	n	f		15	
		+	n	n	f		3	
-	+		n		f		39	
+	+		n		f		10	
	+		n		f		11	
+			n		f		1	
+	+		f+?	f	f	Morphologie : biparasitisme, PCR <i>P. falciparum</i> seul	3	35 (2,8 %)
	+		f+?		f		2	
+	+		f	f+v	f		7	
	+		f	f+v	f		2	
		+	f	f+v	f		20	

+	+	n	f+v	f	1
---	---	---	-----	---	---

Tableau 3 : Résultats pour *Plasmodium falciparum*

(QBC = Quantitative Buffy Coat, PSP = PCR *Plasmodium sp.*, LAMP = Technique de biologie moléculaire rapide avec amplification isothermique, TDR = Test de diagnostic rapide Palutop+4 Optima, PCR spécifiques = PCR *P. falciparum* et PCR 4 espèces, + = positif, - = négatif, ill = illisible, f = *P. falciparum* détecté, v = *P. vivax* détecté, p = *Plasmodium sp.* détecté, n = négatif, ? = doute sur l'espèce observée)

1264 échantillons étaient positifs en PCR *P. falciparum* seulement, soit 82,7% (Tableau 3). Parmi ces derniers, 1136 (89,9 %) étaient concordants entre la morphologie et la PCR spécifique. 12 (0,9%) étaient identifiés comme *Plasmodium sp.* et 81 (6,4%) étaient négatifs en morphologie. Enfin, 35 échantillons étaient identifiés comme biparasitisme, infirmés par la suite par les PCR spécifiques. Trente d'entre eux étaient dus à une bande Pv faussement positive sur le TDR.

2. *Plasmodium ovale*

Au sujet de *Plasmodium ovale*, 89 échantillons étaient positifs pour cette espèce (Tableau 4). Parmi ces derniers, 60 (67,4 %) étaient concordants entre la morphologie et la PCR 4 espèces. Concernant les échantillons discordants, sept échantillons (7,9 %) ont été identifiés comme *P. vivax* en microscopie et 14 (15,7 %) ont été identifiés comme *Plasmodium sp.*, du fait d'une faible parasitémie. Pour huit échantillons (9,0 %), le MGG et le TDR étaient négatifs.

DIAGNOSTIC GENRE			MORPHOLOGIE		PCRS SPECIFIQUES	CONCORDANCE PCR 4 ESPECES / MORPHOLOGIE	NB	NB (%)
QBC	PSP	LAMP	FROTTIS	TDR				
+			o		o	Concordant morphologie/ PCR	6	60 (67,4 %)
+	+		o		o		3	
	+		o		o		1	
+			o	n	o		4	
+			o	n	o		1	
+	+		o	n	o		14	
	+		o	n	o		1	
		+	o	n	o		23	
		+	o	p	o		4	
+	+		o	p	o		2	
		+	o	f	o		1	
+	+		v		o	Morphologie <i>P. vivax</i> / PCR <i>P. ovale</i>	2	7 (7,9 %)
+			v	n	o		1	
+	+		v	n	o		2	
+			v		o		1	
+			v	n	o		1	
+			p	n	o	Morphologie <i>Plasmodium sp.</i> / PCR <i>P. ovale</i>	1	14 (15,7 %)
+	+		p		o		6	
+	+		p	n	o		3	
-	+		p	n	o		1	
		+	p	n	o		2	
		+	p	p	o	1		
+	+		n		o	Morphologie négative/ PCR <i>P. ovale</i>	2	8 (9,0 %)
-	+		n		o		1	
-	+		n	n	o		2	
+	+		n	n	o		1	
		+	n	n	o		2	

Tableau 4 : Résultats pour *Plasmodium ovale*

(QBC = Quantitative Buffy Coat, PSP = PCR *Plasmodium sp.*, LAMP = Technique de biologie moléculaire rapide avec amplification isothermique, TDR = Test de diagnostic rapide Palutop+4 Optima, PCR spécifiques = PCR *P. falciparum* et PCR 4 espèces, + = positif, - = négatif, o = *P. ovale* détecté, f = *P. falciparum* détecté, v = *P. vivax* détecté, p = *Plasmodium sp.* détecté, n = négatif)

3. *Plasmodium vivax*

DIAGNOSTIC GENRE			MORPHOLOGIE			CONCORDANCE PCR 4 ESPECES / MORPHOLOGIE	NB	NB (%)
QBC	PSP	LAMP	FROTTIS	TDR	PCRS SPECIFIQUES			
+			v	v	v	Concordant morphologie / PCR	6	41 (77,3 %)
+	+		v	v	v		10	
		+	v	v	v		12	
+	+		v		v		4	
+			v		v		7	
			v		v		1	
+			v	v + f	v		1	
			o		v	Morphologie <i>P. ovale</i> / PCR <i>P. vivax</i>	1	2
+	+		o	n	v		1	(3,8 %)
+			p	n	v	Morphologie <i>Plasmodium sp.</i> / PCR <i>P. vivax</i>	1	6 (11,3 %)
+			p		v		2	
+	+		p	p	v		1	
		+	p	n	v		1	
		+	p	n	v		1	
-	+		n		v	Morphologie négative / PCR <i>P. vivax</i>	1	4 (7,5 %)
-	+		n	n	v		1	
+	+		n		v		1	
	+		n		v		1	

Tableau 5 : Résultats pour *Plasmodium vivax*

(QBC = Quantitative Buffy Coat, PSP = PCR *Plasmodium sp.*, LAMP = Technique de biologie moléculaire rapide avec amplification isothermique, TDR = Test de diagnostic rapide Palutop+4 Optima, PCR spécifiques = PCR *P. falciparum* et PCR 4 espèces, + = positif, - = négatif, v = *P. vivax* détecté, o = *P. ovale* détecté, f = *P. falciparum* détecté, p = *Plasmodium sp.* détecté, n = négatif)

Concernant *Plasmodium vivax*, 53 échantillons étaient positifs pour cette espèce (Tableau 5). Parmi ces derniers, 41 (77,3 %) étaient concordants entre la morphologie et la PCR 4 espèces. Concernant les échantillons discordants, deux échantillons (3,8 %) ont été identifiés comme *P. ovale* en microscopie et 6 (11,3 %) ont été identifiés comme *Plasmodium sp.*, du fait d'une faible parasitémie. Pour quatre échantillons (7,5 %), le MGG et le TDR étaient négatifs.

4. *Plasmodium malariae*

DIAGNOSTIC GENRE			MORPHOLOGIE		PCRS SPECIFIQUES	CONCORDANCE PCR 4 ESPECES / MORPHOLOGIE	NB	NB (%)
QBC	PSP	LAMP	FROTTIS	TDR				
+	+		m	p	m	Concordant morphologie / PCR	2	30 (71,4 %)
		+	m	p	m		5	
+			m	n	m		2	
+	+		m	n	m		6	
		+	m	n	m		12	
			m		m		1	
+	+		m		m		2	
		+	p	f	m	Morphologie <i>P. falciparum</i> , PCR <i>P. malariae</i>	1	1 (2,3 %)
		+	p	v	m	Morphologie <i>P. vivax</i> , PCR <i>P. malariae</i>	1	1 (2,3 %)
+	+		p	p	m	Morphologie <i>Plasmodium sp.</i> , PCR <i>P. malariae</i>	1	7 (16,7 %)
+	+		p	n	m		2	
-	+		p	n	m		1	
		+	p	n	m		1	
+	+		p		m		1	
		+	n	p	m	1		
+	+		n	n	m	Morphologie négative, PCR <i>P. malariae</i>	1	3 (7,1 %)
-	+		n		m	2		

Tableau 6 : Résultats pour *Plasmodium malariae*

(QBC = Quantitative Buffy Coat, PSP = PCR *Plasmodium sp.*, LAMP = Technique de biologie moléculaire rapide avec amplification isothermique, TDR = Test de diagnostic rapide Palutop+4 Optima, PCR spécifiques = PCR *P. falciparum* et PCR 4 espèces, + = positif, - = négatif, m = *P. malariae* détecté, v = *P. vivax* détecté, f = *P. falciparum* détecté, p = *Plasmodium sp.* détecté, n = négatif)

Au sujet de *Plasmodium malariae*, 42 échantillons étaient positifs pour cette espèce (Tableau 6). Parmi ces derniers, 30 (71,4 %) étaient concordants entre la morphologie et la PCR 4 espèces. Concernant les échantillons discordants, un échantillon a été identifié comme *Plasmodium sp.* en microscopie du fait d'une parasitémie très faible et *P. falciparum* sur le TDR. Un autre échantillon était positif en bande Pv sur le TDR et rendu *Plasmodium sp.* sur le frottis, un seul trophozoïte avait été observé. Sept échantillons (16,7 %) ont été identifiés comme *Plasmodium sp.*, du fait d'une faible parasitémie. Pour trois échantillons (7,1 %), le MGG et le TDR étaient négatifs.

5. *Plasmodium knowlesi*

Sur la période étudiée, deux cas de *P. knowlesi* ont été recensés (Tableau 7). Des hématozoaires du paludisme ont été observés sur les deux frottis mais l'espèce n'a pas pu être déterminée par la microscopie. Le premier échantillon était positif en PCR *Plasmodium sp.* et en bande Pv sur le TDR, le second n'était positif qu'en technique LAMP.

DIAGNOSTIC GENRE			MORPHOLOGIE		PCRS SPECIFIQUES	CONCORDANCE PCR 4 ESPECES / MORPHOLOGIE	NB
QBC	PSP	LAMP	FROTTIS	TDR			
	+		p	v	k	Morphologie <i>Plasmodium sp.</i>	1
		+	p	n	k	ou <i>P. vivax</i> , PCR <i>P. knowlesi</i>	1

Tableau 7 : Résultats pour *Plasmodium knowlesi*

(QBC = Quantitative Buffy Coat, PSP = PCR *Plasmodium sp.*, LAMP = Technique de biologie moléculaire rapide avec amplification isothermique, TDR = Test de diagnostic rapide Palutop+4 Optima, PCR spécifiques = PCR *P. falciparum* et PCR 4 espèces, + = positif, k = *P. knowlesi* détecté, v = *P. vivax* détecté, f = *P. falciparum* détecté, p = *Plasmodium sp.* détecté, n = négatif)

6. Multiparasitisme

Grâce à la combinaison des PCR spécifiques *P. falciparum* et 4 espèces, 35 multiparasitismes ont pu être détectés. Les résultats sont présentés dans le Tableau 8, incluant les Ct de détection des différentes espèces.

Concernant les biparasitismes, 34 ont été détectés en PCR, 14 *P. falciparum/malariae* et 20 *P. falciparum/ovale*. Parmi eux, cinq ont été correctement identifiés en morphologie : trois *P. falciparum/malariae* et deux *P. falciparum/ovale*. Trois échantillons ont été considérés comme douteux, c'est-à-dire identifiés comme *P. falciparum* au frottis, mais avec un doute sur la présence d'une autre espèce. Cette dernière a pu être détectée grâce à la PCR 4 espèces, il s'agissait de *P. malariae* pour deux échantillons, et *P. ovale* pour le troisième.

DIAGNOSTIC GENRE			MORPHOLOGIE							
QBC	PSP	LAMP	FROTTIS	TDR	PCRS SPECIFIQUES DETECTES EN MORPHOLOGIE ?	Ct Pf	Ct Pm	Ct Po	Ct Pv	NB (%)
		+	f + m	f	f + m	oui	26	20		
+	+		m	f	f + m	oui	>33	>33		3
+	+		m + ?	f	f + m	oui	30	31		
+	+		f + ?	f	f + m	dout.	25	25		2
+	+		f + ?	n	f + m	dout.		>33		
+	+		m	n	f + m	non	34	29		1
+	+		p	f	f + m	non	30	27		
+	+		f	f	f + m	non		33		
+	+		f	f	f + m	non		32		5
		+	f	f	f + m	non		>33		
		+	n	f	f + m	non	>33	>33		
		+	p	n	f + m	non	>33	30		1
		+	n	n	f + m	non	>33	>33		2
-	+		n		f + m	non	>35	>35		
		+	f + m	f	f + m + v	non	21	26	26	1
+			f + o	f	f + o	oui	25	24		2
		+	o	f	f + o	oui	26	23		
			f + ?	f	f + o	dout.	25	28		1
+	+		f		f + o	non	23	>35		
+	+		f		f + o	non		>35		
+	+		f	f	f + o	non		33		
+	+		f	f	f + o	non		>35		
		+	f	f	f + o	non	26	>35		
		+	f	f	f + o	non	14	33		
		+	f	f	f + o	non	19	33		13
		+	f	f	f + o	non	15	>33		
		+	f	f	f + o	non	20	>33		
		+	f	f	f + o	non	19	27		
		+	f	f	f + o	non	15	33		
		+	f	f	f + o	non	25	33		
		+	f	f	f + o	non	21	33		
+	+		o	n	f + o	non	31	29		1
	+		p	f + v	f + o	non	>35	21		2
		+	f	f + v	f + o	non	16	>33		
		+	p	n	f + o	non	31	26		1

Tableau 8 : Résultats pour les multiparasitismes

(QBC = Quantitative Buffy Coat, PSP = PCR *Plasmodium sp.*, LAMP = Technique de biologie moléculaire rapide avec amplification isothermique, TDR = Test de diagnostic rapide Palutop+4 Optima, PCR spécifiques = PCR *P. falciparum* et PCR 4 espèces, + = positif, f = *P. falciparum* détecté, o = *P. ovale* détecté, m = *P. malariae* détecté, v = *P. vivax* détecté, p = *Plasmodium sp.* détecté, n = négatif, ? = doute sur l'espèce observée, dout. = douteux)

Certains échantillons (n = 20) n'étaient positifs que pour une seule espèce en morphologie, 18 pour *P. falciparum*, un pour *P. malariae* et un pour *P. ovale*. Les Ct de l'espèce non identifiée en morphologie étaient élevés (>32) pour 17 de ces 20 échantillons, témoignant d'une faible parasitémie pour ces espèces, pouvant donc expliquer l'absence de détection de l'espèce minoritaire en morphologie

De plus, pour quatre échantillons, la morphologie n'a pas été contributive : deux ont été identifiés comme *Plasmodium sp.*, et deux ont été rendus négatifs. Les Ct des deux espèces étaient très élevés pour ces derniers (>33), pouvant également expliquer la négativité en morphologie.

Enfin, deux échantillons positifs pour *P. falciparum* et *P. ovale* en PCR spécifiques ont initialement été identifiés comme biparasitisme *P. falciparum/P. vivax*. Un faux positif de la bande Pv peut être à l'origine de cette discordance.

Un triparasitisme *P. falciparum/malariae/vivax* a pu être détecté grâce aux PCR spécifiques. Il avait été identifié comme biparasitisme *P. falciparum/malariae* en morphologie.

7. Echantillons négatifs

Certains échantillons (n=32) étaient négatifs en PCR *P. falciparum* et en PCR 4 espèces (Tableau 9).

Parmi ces derniers, 27 (84,4%) étaient positifs seulement en PCR *Plasmodium sp.*, et 2 (6,3%) étaient positifs en technique LAMP seulement. Une PCR *Plasmodium sp.* a été effectuée sur ces deux échantillons, elle était positive pour un échantillon et négative pour l'autre, qui correspondait donc à un faux positif de la technique LAMP. Pour les échantillons positifs uniquement en PCR *Plasmodium sp.*, 22 (81%) présentaient un Ct très élevé pour cette technique, c'est-à-dire supérieur ou égal à 35. Une trop faible charge parasitaire rendait donc impossible la détermination de l'espèce, même par l'association des PCR *P. falciparum* et 4 espèces.

Deux échantillons étaient positifs en PCR *Plasmodium sp.* et en bande Pf, alors que les QBC, frottis et PCR spécifiques étaient négatifs. Enfin, 1 échantillon était positif seulement en bande Pv, alors que les QBC, PCR *Plasmodium sp.*, frottis et PCR spécifiques étaient négatifs. Ce dernier cas est probablement dû à un faux positif de la bande Pv.

DIAGNOSTIC GENRE			MORPHOLOGIE		PCR SPECIFIQUES	NB	NB (%)
QBC	PSP	LAMP	FROTTIS	TDR			
-	+		n	n	n	14	27 (84,4 %)
-	+		n		n	12	
	+		n		n	1	
-	+		n	f	n	2	2
		+	n	n	n	2	2
-	-		n	v	n	1	1

Tableau 9 : Résultats pour les échantillons négatifs

(QBC = Quantitative Buffy Coat, PSP = PCR *Plasmodium sp.*, LAMP = Technique de biologie moléculaire rapide avec amplification isothermique, TDR = Test de diagnostic rapide Palutop+4 Optima, PCR spécifiques = PCR *P. falciparum* et PCR 4 espèces, + = positif, f = *P. falciparum* détecté, v = *P. vivax* détecté, n = négatif)

B. Comparaison PCR et morphologie par types d'erreurs

Dans cette partie, les résultats seront abordés selon le type de concordance ou discordance entre la morphologie et les PCR de diagnostic d'espèce. Ils sont présentés dans le Tableau 10.

Tout d'abord, 74,9 % des échantillons (n = 1136) étaient concordants pour *P. falciparum*, c'est-à-dire positifs en morphologie et PCR pour cette espèce seulement. De plus, 9,2 % des échantillons (n = 140) étaient concordants entre PCR et morphologie pour les espèces non *falciparum*. L'espèce la plus représentée était *P. ovale* avec 60 cas, suivie de *P. vivax* et *P. malariae* avec respectivement 41 et 30 cas.

Enfin, pour les 241 cas restants, soit 15,9 % des échantillons, les PCR de diagnostic d'espèce étaient discordantes avec la morphologie ou le test de première intention (PCR *Plasmodium sp.*, QBC ou LAMP). Les différents cas de figure sont présentés ci-dessous.

Tout d'abord, pour 36 échantillons, la PCR a permis d'infirmer la présence d'une espèce non *falciparum* qui avait été détectée en morphologie, que ce soit par une erreur à l'observation du frottis au microscope (n = 5) ou bien un faux positif de la bande Pv sur le TDR (n = 31). Au sein de ces 31 échantillons, 30 échantillons étaient positifs pour *P. falciparum* en microscopie et pour *P. falciparum* et *P. vivax* sur le TDR. Ces 30 échantillons présentaient une parasitémie très élevée (9,8 % en moyenne), permettant d'expliquer un faux positif de la bande Pv.

De plus, 28 multiparasitismes ont été détectés grâce à la PCR 4 espèces, dont 18 échantillons pour lesquels la morphologie ne retrouvait que *P. falciparum*. La morphologie était douteuse pour trois

échantillons, rendue *Plasmodium sp.* pour deux, et rendue négative pour deux également. Il s'agissait d'un biparasitisme *P. falciparum/ovale* pour 17 échantillons et d'un biparasitisme *P. falciparum/malariae* pour 10 échantillons.

Ensuite, pour 12 échantillons, la PCR 4 espèces a permis de corriger l'espèce identifiée en morphologie. Il s'agissait d'une inversion entre *P. vivax* et *P. ovale* dans la majorité des cas (n = 9), dont 7 cas identifiés comme *P. vivax* en morphologie, corrigés en *P. ovale* par la PCR 4 espèces, et 2 cas inverses. Les trois autres cas sont des faux positifs du TDR : un cas de *P. knowlesi* et un cas de *P. malariae* dont les TDR étaient positifs pour la bande Pv, et un cas de *P. malariae* positif pour la bande Pf.

Parmi les 40 échantillons identifiés comme *Plasmodium sp.* en morphologie, *P. falciparum* a été détecté 12 fois par la PCR spécifique de cette espèce. La PCR 4 espèces quant à elle, a permis d'identifier *P. ovale* pour 14 échantillons, ainsi que *P. malariae*, *P. vivax* et *P. knowlesi* pour sept, six et un échantillon respectivement.

Au sein des 125 échantillons négatifs en morphologie, 81 ont été rendus positifs pour *P. falciparum* grâce à la PCR spécifique. 29 ont été rendus *Plasmodium sp.* du fait de la négativité des PCR *P. falciparum* et 4 espèces. Les données de ces derniers sont détaillées dans la partie V.A.7. Enfin, l'espèce a pu être déterminée grâce à la PCR 4 espèces pour 15 échantillons négatifs en morphologie. Il s'agissait de *P. ovale* pour huit échantillons, *P. vivax* pour quatre et *P. malariae* pour trois.

La PCR 4 espèces a permis d'identifier l'espèce plasmodiale pour 28 échantillons initialement identifiés comme *Plasmodium sp.* en morphologie. Il s'agissait principalement de cas de *P. ovale* (n = 14), suivi par *P. malariae*, *P. vivax* et *P. knowlesi*, représentés respectivement par sept, six et un cas. La moitié (n = 14) présentaient un très faible niveau de parasitémie (<0.01 %).

MORPHOLOGIE	PCR SPECIFIQUES	Nb		INTERPRETATION
f	f	1136 (74,9 %)		Concordant morphologie/PCR pour <i>P. falciparum</i>
o	o	60		
m	m	30		
v	v	41		
f + o	f + o	2	140	Concordant morphologie/PCR pour les espèces non <i>falciparum</i>
f + m	f + m	3	(9,2 %)	
o	f + o	1		
m	f + m	1		
f	n	2		
f + ?	f	5		
f + v	f	30	36	Infirmation d'une espèce non <i>falciparum</i>
v	n	1		
f	f + o	13		Détection multiparasitisme
f	f + m	5		
f + ?	f + m	2		
p	f + m	1		
n	f + m	2	28	
f + m	f + m + v	1		
f + ?	f + o	1		
f + v	f + o	2		
p	f + o	1		
o	v	2		
v	o	7		
v	k	1	12	Modification de l'espèce identifiée
v	m	1		
f	m	1		
p	f	12	12	Morphologie <i>Plasmodium sp.</i> , détection <i>P. falciparum</i>
p	o	14	40	Morphologie rendue <i>Plasmodium sp.</i> , identification d'une espèce non <i>falciparum</i>
p	m	7		
p	v	6		
p	k	1		
n	f	81	81	Morphologie négative, détection <i>P. falciparum</i>
n	o	8	125	Morphologie négative, identification d'une espèce non <i>falciparum</i>
n	v	4		
n	m	3		
n	n	29	29	Echec de l'identification d'espèce en morphologie et PCR

Tableau 10 : Résultats classés en fonction du type d'erreur

(Morphologie = Frottis + TDR, PCR spécifiques = PCR *P. falciparum* et PCR 4 espèces, + = positif, f = *P. falciparum* détecté, o = *P. ovale* détecté, m = *P. malariae* détecté, v = *P. vivax* détecté, k = *P. knowlesi* détecté, p = *Plasmodium sp.* détecté, n = négatif, ? = doute sur l'espèce observée)

C. Répartition des espèces dans le temps

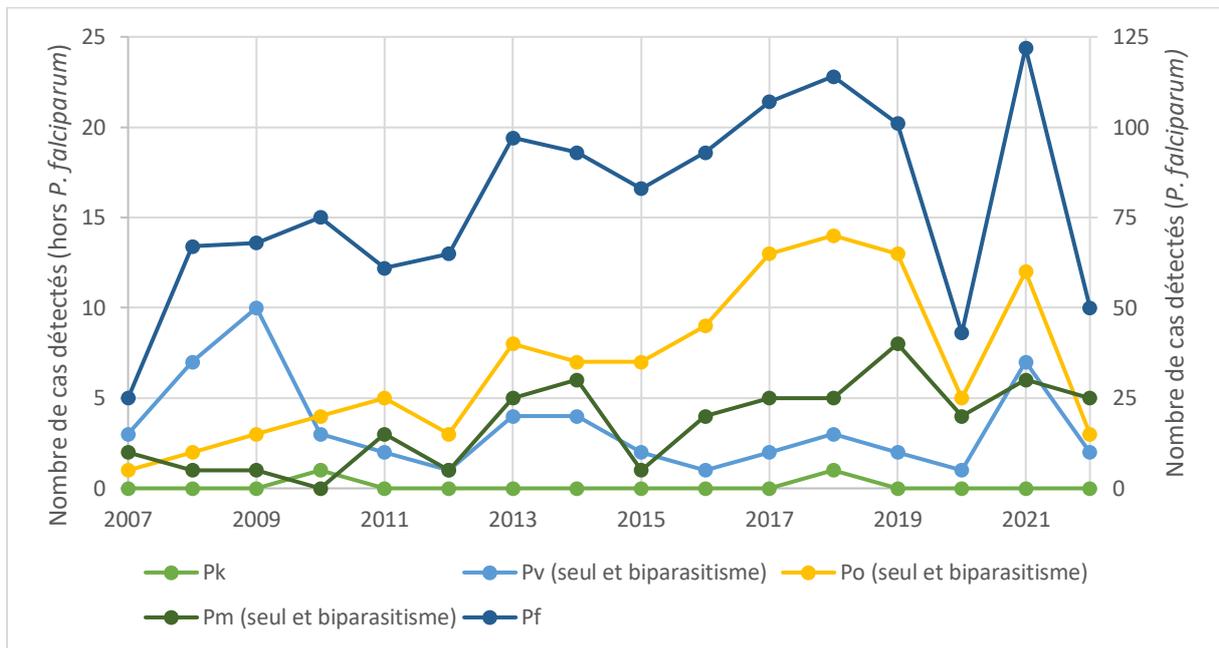


Figure 19 : Graphique de la répartition des espèces plasmodiales non falciparum en fonction des années au CHU de Toulouse, en nombre absolu

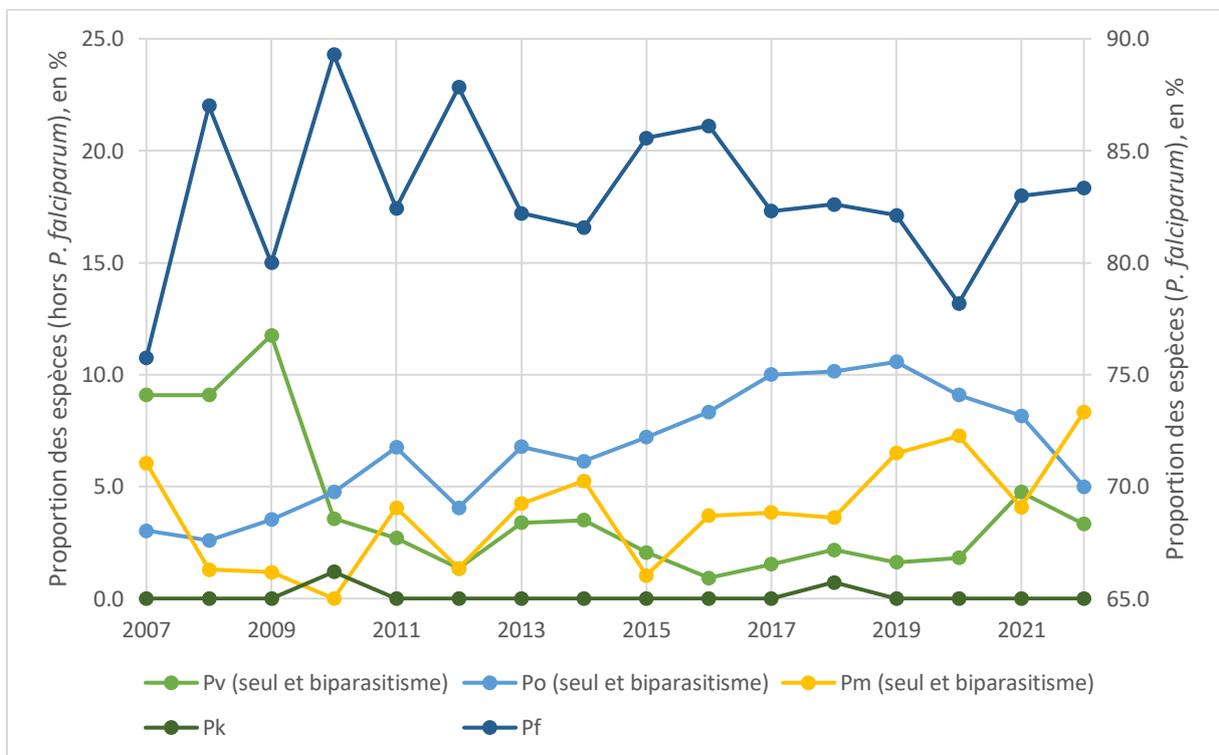


Figure 20 : Graphique de la répartition des espèces plasmodiales non falciparum en fonction des années au CHU de Toulouse, en pourcentage du nombre de cas

Nous avons retrouvé 83,3 % d'échantillons positifs à *P. falciparum*, soit 1264 échantillons. Les espèces *ovale*, *vivax* et *malariae* ont été détectées respectivement dans 5,9 % (n = 89), 3,5 % (n = 53) et 2,8 % (n = 42) des échantillons analysés. Deux cas de *P. knowlesi* ont été détectés, soit 0,1 %. Les données ayant été recueillies entre mai 2007 et juillet 2022, le nombre de cas détectés pour les années 2007 et 2022 n'est pas comparable aux autres années. La répartition des espèces en fonction des années est représentée en nombre absolu dans la Figure 19 ainsi qu'en pourcentage dans la Figure 20.

VI. Discussion

La détermination de l'espèce plasmodiale est un élément primordial dans le diagnostic du paludisme. Cependant, l'analyse morphologique reste complexe et est source d'erreurs, la confirmation par biologie moléculaire est donc essentielle.

D'après l'analyse des données recueillies entre 2007 et 2022, il apparaît que la biologie moléculaire a permis d'apporter un complément à l'analyse morphologique 212 fois, soit dans 14,0 % des cas au total. Cela était dû à la PCR spécifique de *P. falciparum* pour 93 de ces cas et à la PCR 4 espèces pour les 119 autres cas.

Concernant les biparasitismes, la PCR 4 espèces possède une bonne capacité à les détecter puisque seulement 17 % des cas (6 sur 35) détectés par cette PCR avaient été correctement identifiés en microscopie. Dans près de deux tiers des cas de multiparasitisme détectés grâce à la PCR 4 espèces, (n = 19), l'espèce non détectée en morphologie était *P. ovale* (n = 18) ou *P. vivax* (n = 1), amenant à la prescription de primaquine pour prévenir les accès de reviviscence dus à ces espèces. Pour les 10 autres cas, l'espèce non détectée en morphologie était *P. malariae*.

Du fait de l'utilisation systématique du TDR dans la démarche diagnostique du paludisme depuis 2018, les faux positifs de la bande Pv sur le TDR ont tendance à augmenter. En effet, près de 2/3 des faux positifs ont été rapportés entre 2018 et 2022, soit environ le dernier tiers de la période analysée. Sur les 36 cas où la PCR a permis d'infirmer la présence d'une espèce non *falciparum*, 31 étaient dus à des faux positifs de la bande Pv sur le TDR. Ainsi, la PCR 4 espèces permet de palier aux faiblesses techniques que peuvent présenter les TDR.

De plus, la PCR 4 espèces a permis de rattraper des erreurs de diagnostic dues à de faibles parasitémies, ou bien à des erreurs humaines de détermination d'espèce par microscopie 55 fois, soit pour 28,2 % des dossiers conclus à *Plasmodium* non *falciparum*, ce qui correspond à 3,6 % des cas totaux. *P. ovale*

ou *P. vivax* ont été identifiés dans 58 % de ces cas (n = 32), conduisant également à la prescription de primaquine pour prévenir les accès de reviviscence.

Aussi, une des forces de cette PCR est la capacité à détecter *P. knowlesi*, qui est certes très peu représenté dans le paludisme d'importation en France, mais pouvant provoquer des accès graves.⁵³ Il s'agit en effet d'une espèce difficile à diagnostiquer en microscopie et pouvant provoquer des faux positifs en TDR.⁵⁴ De plus, peu de PCR décrites dans la littérature permettent de diagnostiquer les 4 espèces non *falciparum*.

Contrairement aux autres PCR de diagnostic d'espèce présentées dans le Tableau 1, la PCR 4 espèces offre l'avantage de détecter et distinguer les espèces plasmodiales non *falciparum* en une unique réaction. De plus, l'utilisation d'une seule paire d'amorces et de SYBR Green pour la révélation plutôt que de sondes spécifiques permet de limiter les coûts pour le laboratoire. Elle est donc simple à mettre en place et peut être instaurée dans tout laboratoire disposant de matériel de biologie moléculaire.

Ainsi il ressort de ce travail que la PCR 4 espèces a sa place dans la démarche diagnostique du paludisme, puisqu'elle permet en une unique réaction de détecter les espèces non *falciparum* et de palier à des erreurs humaines ou techniques, le tout de manière simple et peu coûteuse.

Compte tenu de ces résultats concernant l'intérêt de la PCR 4 espèces pour le diagnostic d'espèce plasmodiale, il semble approprié de conserver la même démarche diagnostique, c'est-à-dire d'effectuer cette technique sur tous les échantillons positifs en LAMP.

Cependant, une des faiblesses de cette étude est que les résultats obtenus en PCR n'ont pas été comparés à une technique de référence en biologie moléculaire. Il serait intéressant de compléter ce travail en comparant nos données à celles du CNR, auquel tous les échantillons positifs sont envoyés. Concernant les échantillons négatifs en PCR spécifique *P. falciparum* et 4 espèces, ils ne représentent qu'un faible pourcentage des cas, 2,1 % au total. Il serait également intéressant d'étudier les résultats du CNR pour ces échantillons afin de déterminer s'il s'agissait d'une espèce normalement détectée par la PCR 4 espèces ou non.

De plus, étant donné que le pic attribué à *P. falciparum* est inconstant, la technique ne permet pas de détecter les 5 espèces avec assurance, mais seulement les 4 espèces non *falciparum*.

Concernant l'épidémiologie, la tendance au fil des ans semble être une augmentation globale du nombre de cas de paludisme d'importation. On observe une progression du nombre d'infections à *P.*

ovale, notamment après 2012, ainsi qu'une hausse des cas de *P. falciparum* en parallèle. Cependant, les infections attribuées aux autres espèces non *falciparum* semblent rester stables. A noter une baisse significative du nombre de cas de paludisme en 2020, attribuable à la pandémie de COVID-19, qui a grandement limité les déplacements intercontinentaux.

En termes de proportions des différentes espèces, les cas attribués à *P. ovale* semblent croître légèrement, notamment entre 2011 et 2019, tandis que les cas attribués aux autres espèces semblent stagner.

En comparaison avec les données fournies dans le rapport du CNR, il semblerait que la proportion d'infections à *P. falciparum* soit plus faible dans notre étude par rapport au niveau national (82,6 % en 2018 au CHU de Toulouse contre 86,38 % au niveau national).⁵⁵

Conclusion

En conclusion, la comparaison des données morphologiques avec les résultats de la PCR 4 espèces entre 2007 et 2022 ont permis de montrer l'intérêt de cette PCR dans l'identification des espèces plasmodiales non *falciparum*. Du fait de l'utilisation d'une paire d'amorces unique, c'est une technique simple à mettre en place et peu coûteuse, n'ayant pas d'équivalent décrit dans la littérature. Elle a permis de confirmer l'identification par morphologie, voire de rattraper des erreurs d'identification, et ce dans 7,8 % des cas totaux. Pour appuyer ces résultats, la comparaison à une méthode de référence semble judicieuse.

Références

1. Gachot, B. *Paludisme*. (Doin, 2004).
2. Wery, M. *Protozoologie médicale*. (De Boeck Supérieur, 1995).
3. La petite et la grande histoire du paludisme – Académie nationale de médecine | Une institution dans son temps. <https://www.academie-medecine.fr/la-petite-et-la-grande-histoire-du-paludisme/>.
4. Petithory, J. C. [On the discovery of the parasite of malaria by A. Laveran: Bône 1878 - Constantine 1880]. *Hist. Sci. Medicales* **29**, 57–62 (1995).
5. Cox, F. E. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasit. Vectors* **3**, 5 (2010).
6. Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030, édition 2021. (2021).
7. Paludisme. *Institut Pasteur* <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/paludisme> (2015).
8. World malaria report 2022. (2022).
9. Liste des maladies à déclaration obligatoire. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-a-declaration-obligatoire/liste-des-maladies-a-declaration-obligatoire>.
10. Résumé-CNR-paludisme-2019.pdf. <https://cnr-paludisme.fr/activites-dexpertise/rapports-dactivites/>.
11. Paludisme - Maladies infectieuses. *Édition professionnelle du Manuel MSD* <https://www.msmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/protozoaires-extra-intestinaux/paludisme>.
12. Dayananda, K., Achur, R. & Gowda, Dc. Epidemiology, drug resistance, and pathophysiology of *Plasmodium vivax* malaria. *J. Vector Borne Dis.* **55**, 1 (2018).
13. SPILF. Prise en charge et prévention du paludisme d'importation. (2017).
14. Recommandations Paludisme : traitement. VIDAL <https://www.vidal.fr/maladies/recommandations/paludisme-traitement-1845.html>.
15. OMS. Lignes directrices sur le paludisme. (2022).

16. Obare, P. *et al.* Misclassification of Plasmodium infections by conventional microscopy and the impact of remedial training on the proficiency of laboratory technicians in species identification. *Malar. J.* **12**, 113 (2013).
17. Kotepui, M., Masangkay, F. R., Kotepui, K. U. & De Jesus Milanez, G. Misidentification of Plasmodium ovale as Plasmodium vivax malaria by a microscopic method: a meta-analysis of confirmed P. ovale cases. *Sci. Rep.* **10**, 21807 (2020).
18. Mahittikorn, A., Masangkay, F. R., Kotepui, K. U., Milanez, G. D. J. & Kotepui, M. Quantification of the misidentification of Plasmodium knowlesi as Plasmodium malariae by microscopy: an analysis of 1569 P. knowlesi cases. *Malar. J.* **20**, 179 (2021).
19. Haute Autorité de Santé. Évaluation des actes de diagnostic biologique des infections à Plasmodium. (2016).
20. Larréché, S. *et al.* Sensitivity of parasitological tests in imported Plasmodium vivax malaria in adults and impact of chemoprophylaxis and attack type. *J. Travel Med.* **21**, 195–200 (2014).
21. Loomans, L. *et al.* Accuracy of malaria diagnosis by clinical laboratories in Belgium. *Malar. J.* **18**, 104 (2019).
22. van Dijk, D. P. *et al.* Evaluation of the Palutop+4 malaria rapid diagnostic test in a non-endemic setting. *Malar. J.* **8**, 293 (2009).
23. Murillo Solano, C. *et al.* Deletion of Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein 2 (pfhrp2) and Histidine-Rich Protein 3 (pfhrp3) Genes in Colombian Parasites. *PLoS ONE* **10**, e0131576 (2015).
24. Rock, E. P. *et al.* Comparative analysis of the Plasmodium falciparum histidine-rich proteins HRP-I, HRP-II and HRP-III in malaria parasites of diverse origin. *Parasitology* **95 (Pt 2)**, 209–227 (1987).
25. Jejaw Zeleke, A. *et al.* Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 and 3 genes deletion in global settings (2010–2021): a systematic review and meta-analysis. *Malar. J.* **21**, 26 (2022).
26. Iriart, X. *et al.* Misdiagnosis of imported falciparum malaria from African areas due to an increased prevalence of pfhrp2/pfhrp3 gene deletion: the Djibouti case. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 1984–1987 (2020).
27. Góes, L. *et al.* Evaluation of Histidine-Rich Proteins 2 and 3 Gene Deletions in Plasmodium falciparum in Endemic Areas of the Brazilian Amazon. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **18**, 123 (2020).
28. Berhane, A. *et al.* Major Threat to Malaria Control Programs by Plasmodium falciparum Lacking Histidine-Rich Protein 2, Eritrea. *Emerg. Infect. Dis.* **24**, 462–470 (2018).

29. Kamaliddin, C. *et al.* Assessment of diagnostic methods for imported malaria in mainland France. *Médecine Mal. Infect.* **50**, 141–160 (2020).
30. Xu, W. *et al.* SYBR Green Real-Time PCR-RFLP Assay Targeting the Plasmodium Cytochrome B Gene – A Highly Sensitive Molecular Tool for Malaria Parasite Detection and Species Determination. *PLOS ONE* **10**, e0120210 (2015).
31. van Bergen, K. *et al.* Evaluation of a novel real-time PCR assay for the detection, identification and quantification of Plasmodium species causing malaria in humans. *Malar. J.* **20**, 314 (2021).
32. Saito, T. *et al.* Rapid and sensitive multiplex single-tube nested PCR for the identification of five human Plasmodium species. *Parasitol. Int.* **67**, 277–283 (2018).
33. Reller, M. E., Chen, W. H., Dalton, J., Lichay, M. A. & Dumler, J. S. Multiplex 5' Nuclease Quantitative Real-Time PCR for Clinical Diagnosis of Malaria and Species-Level Identification and Epidemiologic Evaluation of Malaria-Causing Parasites, Including Plasmodium knowlesi. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 2931–2938 (2013).
34. Lefterova, M. I., Budvytiene, I., Sandlund, J., Färnert, A. & Banaei, N. Simple Real-Time PCR and Amplicon Sequencing Method for Identification of Plasmodium Species in Human Whole Blood. *J. Clin. Microbiol.* **53**, (2015).
35. Chew, C. H., Lim, Y. A. L., Lee, P. C., Mahmud, R. & Chua, K. H. Hexaplex PCR Detection System for Identification of Five Human Plasmodium Species with an Internal Control. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 4012–4019 (2012).
36. Miguel-Oteo, M. *et al.* Nested multiplex PCR for identification and detection of human Plasmodium species including Plasmodium knowlesi. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **10**, 299–304 (2017).
37. Pugnère, P. Contribution à l'amélioration de la quantification des acides nucléiques par qPCR et RT-qPCR.
38. Schneider, R. *et al.* Validation of a novel FRET real-time PCR assay for simultaneous quantitative detection and discrimination of human Plasmodium parasites. *PLOS ONE* **16**, e0252887 (2021).
39. Kojom Foko, L. P., Kumar, A., Hawadak, J. & Singh, V. Plasmodium cynomolgi in humans: current knowledge and future directions of an emerging zoonotic malaria parasite. *Infection* **51**, 623–640 (2023).

40. Perandin, F. *et al.* Development of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for Routine Clinical Diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1214–1219 (2004).
41. Shokoples, S. E., Ndao, M., Kowalewska-Grochowska, K. & Yanow, S. K. Multiplexed Real-Time PCR Assay for Discrimination of *Plasmodium* Species with Improved Sensitivity for Mixed Infections. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 975–980 (2009).
42. Rougemont, M. *et al.* Detection of Four *Plasmodium* Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5636–5643 (2004).
43. Rosanas-Urgell, A. *et al.* Comparison of diagnostic methods for the detection and quantification of the four sympatric *Plasmodium* species in field samples from Papua New Guinea. *Malar. J.* **9**, 361 (2010).
44. Cnops, L., Jacobs, J. & Esbroeck, M. V. Validation of a four-primer real-time PCR as a diagnostic tool for single and mixed *Plasmodium* infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 1101–1107 (2011).
45. Multiplex real-time PCR for the diagnosis of malaria: correlation with microscopy. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 469–475 (2011).
46. Machouart, M. *et al.* Development of a PCR Assay Followed by Nonradioactive Hybridization Using Oligonucleotides Covalently Bound to CovaLink NH Microwells for Detection of Four *Plasmodium* Species in Blood Samples from Humans. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3279–3284 (2006).
47. Article R1121-1 - Code de la santé publique - Légifrance. https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000043723460.
48. Fabre, R., Berry, A., Morassin, B. & Magnaval, J. F. Comparative assessment of conventional PCR with multiplex real-time PCR using SYBR Green I detection for the molecular diagnosis of imported malaria. *Parasitology* **128**, 15–21 (2004).
49. Farrugia, C. *et al.* Cytochrome b Gene Quantitative PCR for Diagnosing *Plasmodium falciparum* Infection in Travelers[▽]. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2191–2195 (2011).
50. *Basic malaria microscopy*. (WHO, 2010).
51. World Health Organization & UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. *Microscopy for the detection, identification and*

quantification of malaria parasites on stained thick and thin blood films in research settings (version 1.0): procedure: methods manual. (World Health Organization, 2015).

52. McGee, J. P., Armache, J.-P. & Lindner, S. E. Ribosome heterogeneity and specialization of Plasmodium parasites. *PLOS Pathog.* **19**, e1011267 (2023).

53. Chang, C. Y. Afebrile Plasmodium Knowlesi Severe Malaria With A Fatal Outcome. *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad JAMC* **35**, 186–187 (2023).

54. Foster, D. *et al.* Evaluation of three rapid diagnostic tests for the detection of human infections with Plasmodium knowlesi. *Malar. J.* **13**, 60 (2014).

55. Rapport d'activité CNR Paludisme 2019 sur 2018.pdf. <https://cnr-paludisme.fr/activites-dexpertise/rapports-dactivites/>.

TITLE: Interest of a single PCR to identify non-*falciparum* plasmodial species: Study from 2007 to 2022 at Toulouse University Hospital.

ABSTRACT:

During a malaria episode, the determination of the plasmodial species influences therapeutic management. Microscopy and rapid diagnostic tests (RDTs) used as first-line of diagnosis are prone to species misidentification, therefore confirmation by PCR is often necessary. The molecular strategy for plasmodial identification at Toulouse University Hospital combines a *P. falciparum* PCR and a single PCR targeting the 4 non-*falciparum* species (*P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* and *P. knowlesi*). The 4-species PCR, using a unique primer pair and SYBR green to detect and discriminate between the 4 non-*falciparum* species, is simple to setup and inexpensive. The aim of this study was to assess the value of this molecular strategy for the diagnosis of plasmodial species by comparing molecular identification data with morphological identification data (based on blood smear and RDT) on samples received between 2007 and 2022. Of the 1,517 samples studied, species-diagnostic PCRs were used to correct or identify the species in 14% of cases. *P. falciparum* PCR was involved in 6.1% of cases, and 4-species PCR in 7.8% (118 samples). 4-species PCR was able to detect 28 multiparasitisms, to identify the species when morphology was non-contributory (negative or *Plasmodium sp.*) for 43 samples, to modify the species in 12 cases, and to rule out the presence of a non-*falciparum* species 36 times. Overall, 93 cases of *P. falciparum* and 2 of *P. knowlesi* were detected by specific PCRs. In addition, 50 cases of *P. vivax* or *ovale* were detected by 4-species PCR, leading to appropriate primaquine treatment of these patients, and 30 cases of *P. vivax* were invalidated. This molecular strategy allowed to overcome the limitations of morphological diagnosis. These results suggest the interest of simple, low-cost 4-species PCR as part of the molecular strategy to identify plasmodial species.

AUTEUR : Suzanne BUREL

TITRE : Intérêt d'une PCR unique pour l'identification des espèces plasmodiales non-*falciparum* : Etude de 2007 à 2022 au CHU de Toulouse

DIRECTEUR DE THESE : Dr Xavier IRIART

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Hôpital Pierre-Paul Riquet – CHU de Toulouse, le 19 octobre 2023

RESUME en français :

Au cours d'un accès palustre, la détermination de l'espèce plasmodiale conditionne la prise en charge thérapeutique. La microscopie et les tests de diagnostic rapide (TDR) utilisés en première intention peuvent entraîner des erreurs d'identification d'espèce et une confirmation par PCR est souvent nécessaire. La stratégie moléculaire d'identification plasmodiale du CHU de Toulouse consiste en la combinaison d'une PCR spécifique de *P. falciparum* et d'une PCR unique ciblant les 4 espèces non-*falciparum* (*P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. knowlesi*). Cette dernière n'utilisant qu'une seule paire d'amorces et du SYBR green pour détecter et distinguer les 4 espèces non-*falciparum*, elle est simple à mettre en place et peu coûteuse. L'objectif de ce travail était d'étudier l'intérêt de cette stratégie moléculaire de diagnostic d'espèce plasmodiale en comparant les données d'identification moléculaire aux données d'identification morphologique (basée sur le frottis et le TDR) sur les échantillons reçus entre 2007 et 2022. Sur 1517 échantillons étudiés, les PCR de diagnostic d'espèce ont permis de corriger ou d'identifier l'espèce dans 14% des cas. Il s'agissait de la PCR *P. falciparum* dans 6,1% des cas et de la PCR 4 espèces dans 7,8% des cas (soit 118 échantillons). La PCR 4 espèces a ainsi permis de détecter 28 multiparasitismes, déterminer l'espèce alors que la morphologie était non contributive (négative ou rendue *Plasmodium sp.*) pour 43 échantillons, modifier l'espèce dans 12 cas et infirmer la présence d'une espèce non-*falciparum* 36 fois. Au total, 93 accès palustres à *P. falciparum* et 2 à *P. knowlesi* ont pu être rattrapés par les PCR spécifiques. De plus, 50 accès à *P. vivax* ou *ovale* ont pu être détectés par la PCR 4 espèces, permettant un traitement adapté de ces patients par primaquine et 30 accès à *P. vivax* ont pu être infirmés. Cette stratégie moléculaire a ainsi permis de palier aux faiblesses que peut présenter le diagnostic morphologique. Ces résultats suggèrent donc l'intérêt de la PCR 4 espèces, simple et peu coûteuse, au sein de la stratégie moléculaire de diagnostic d'espèce plasmodiale.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Biologie médicale

MOTS-CLES : paludisme, diagnostic d'espèce, PCR unique, *Plasmodium*

KEYWORDS : malaria, species diagnosis, single PCR, *Plasmodium*

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Parasitologie-Mycologie
CHU de Toulouse – Institut Fédératif de Biologie
330 Avenue de Grande-Bretagne
31300 TOULOUSE

Directeur de thèse : Dr Xavier IRIART