

UNIVERSITE MOHAMMED V - RABAT  
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT-

ANNEE: 2017

THESE N°: 85

IMPORTANCE DE LA QUANTIFICATION  
DE LA CHARGE PARASITAIRE DANS LES INFECTIONS  
A PLASMODIUM FALCIPARUM  
EVALUATION D'UNE METHODE DE QUANTIFICATION SEMI-AUTOMATIQUE  
PAR RECONNAISSANCE D'IMAGE EN MICROSCOPIE OPTIQUE

THÈSE

*Présentée et soutenue publiquement le : 20 Juillet 2017*

PAR

Mlle. Ilhame TANTAOUI

*Née le 19 Novembre 1991*

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

**MOTS CLES:** Plasmodium falciparum – Accès grave – Physiopathologie – Parasitémie –  
Reconnaissance d'image.

JURY

<b>Mr. M. THELLIER</b> Professeur de Parasitologie	PRESIDENT
<b>Mr. B. E. LMIMOUNI</b> Professeur de Parasitologie et Mycologie	RAPPORTEUR
<b>Mr. M. RABHI</b> Professeur de Médecine Interne	} JUGES
<b>Mr. Y. RAHALI</b> Professeur de Pharmacie Galénique	
<b>Mr. A. BENNANA</b> Professeur de Gestion Pharmaceutique et Informatique	
<b>Mr. M. MEIOUET</b> Professeur de Droit Pharmaceutique	

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا

إنك أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية: 31

بِسْمِ اللَّهِ  
الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



**UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT**  
**FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT**

**DOYENS HONORAIRES :**

1962 – 1969 : Professeur Abdelmalek FARAJ  
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH  
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK  
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI  
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI  
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI  
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI



**ADMINISTRATION :**

**Doyen** : Professeur Mohamed ADNAOUI  
**Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et étudiantes**  
Professeur Mohammed AHALLAT  
**Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération**  
Professeur Taoufiq DAKKA  
**Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie**  
Professeur Jamal TAOUFIK  
**Secrétaire Général** : Mr. Mohamed KARRA

**1- ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS**

**ET  
PHARMACIENS**

**PROFESSEURS :**

**Décembre 1984**

Pr. MAAOUNI Abdelaziz  
Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi  
Pr. SETTAF Abdellatif

Médecine Interne – **Clinique Royale**  
Anesthésie -Réanimation  
pathologie Chirurgicale

**Novembre et Décembre 1985**

Pr. BENSAID Younes

Pathologie Chirurgicale

**Janvier, Février et Décembre 1987**

Pr. CHAHED OUZZANI Houria  
Pr. LACHKAR Hassan  
Pr. YAHYAOUI Mohamed

Gastro-Entérologie  
Médecine Interne  
Neurologie

**Décembre 1988**

Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib  
Pr. DAFIRI Rachida

Chirurgie Pédiatrique  
Radiologie

### Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed  
Pr. CHAD Bouziane  
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Médecine Interne –Doyen de la FMPR  
Pathologie Chirurgicale  
Neurologie

### Janvier et Novembre 1990

Pr. CHKOFF Rachid  
Pr. HACHIM Mohammed\*  
Pr. KHARBACH Aïcha  
Pr. MANSOURI Fatima  
Pr. TAZI Saoud Anas

Pathologie Chirurgicale  
Médecine-Interne  
Gynécologie -Obstétrique  
Anatomie-Pathologique  
Anesthésie Réanimation

### Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AL HAMANY Zaïtounia  
Pr. AZZOUZI Abderrahim  
Pr. BAYAHIA Rabéa  
Pr. BELKOUCHI Abdelkader  
Pr. BENCHEKROUN Belabbes Abdellatif  
Pr. BENSOU DA Yahia  
Pr. BERRAHO Amina  
Pr. BEZZAD Rachid  
Pr. CHABRAOUI Layachi  
Pr. CHERRAH Yahia  
Pr. CHOKAIRI Omar  
Pr. KHATTAB Mohamed  
Pr. SOULAYMANI Rachida  
Pr. TAOUFIK Jamal

Anatomie-Pathologique  
Anesthésie Réanimation –Doyen de la FMPO  
Néphrologie  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Pharmacie galénique  
Ophtalmologie  
Gynécologie Obstétrique  
Biochimie et Chimie  
Pharmacologie  
Histologie Embryologie  
Pédiatrie  
Pharmacologie – Dir. du Centre National PV  
Chimie thérapeutique V.D à la pharmacie+Dir du CEDOC

### Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed  
Pr. BENSOU DA Adil  
Pr. BOUJIDA Mohamed Najib  
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza  
Pr. CHRAIBI Chafiq  
Pr. DEHAYNI Mohamed\*  
Pr. EL OUAHABI Abdessamad  
Pr. FELLAT Rokaya  
Pr. GHAFIR Driss\*  
Pr. JIDDANE Mohamed  
Pr. TAGHY Ahmed  
Pr. ZOUHDI Mimoun

Chirurgie Générale V.D Aff. Acad. et Estud  
Anesthésie Réanimation  
Radiologie  
Gastro-Entérologie  
Gynécologie Obstétrique  
Gynécologie Obstétrique  
Neurochirurgie  
Cardiologie  
Médecine Interne  
Anatomie  
Chirurgie Générale  
Microbiologie

### Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Nouredine  
Pr. BEN RAIS Nozha  
Pr. CAOUI Malika  
Pr. CHRAIBI Abdelmjid  
Pr. EL AMRANI Sabah

Radiothérapie  
Biophysique  
Biophysique  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques Doyen de la FMPA  
Gynécologie Obstétrique



Pr. EL BARDOUNI Ahmed  
Pr. EL HASSANI My Rachid  
Pr. ERROUGANI Abdelkader  
Pr. ESSAKALI Malika  
Pr. ETTAYEBI Fouad  
Pr. HADRI Larbi\*  
Pr. HASSAM Badredine  
Pr. IFRINE Lahssan  
Pr. JELTHI Ahmed  
Pr. MAHFOUD Mustapha  
Pr. RHRAB Brahim  
Pr. SENOUCI Karima

### **Mars 1994**

Pr. ABBAR Mohamed\*  
Pr. ABDELHAK M'barek  
Pr. BELAIDI Halima  
Pr. BENTAHILA Abdelali  
Pr. BENYAHIA Mohammed Ali  
Pr. BERRADA Mohamed Saleh  
Pr. CHAMI Ilham  
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae  
Pr. JALIL Abdelouahed  
Pr. LAKHDAR Amina  
Pr. MOUANE Nezha

### **Mars 1995**

Pr. ABOUQUAL Redouane  
Pr. AMRAOUI Mohamed  
Pr. BAIDADA Abdelaziz  
Pr. BARGACH Samir  
Pr. CHAARI Jilali\*  
Pr. DIMOU M'barek\*  
Pr. DRISSI KAMILI Med Nordine\*  
Pr. EL MESNAOUI Abbes  
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila  
Pr. HDA Abdelhamid\*  
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed  
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia  
Pr. SEFIANI Abdelaziz  
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

### **Décembre 1996**

Pr. AMIL Touriya\*  
Pr. BELKACEM Rachid  
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim  
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan  
Pr. GAOUZI Ahmed  
Pr. MAHFOUDI M'barek\*  
Pr. OUADGHIRI Mohamed  
Pr. OUZEDDOUN Naima  
Pr. ZBIR EL Mehdi\*

Traumato-Orthopédie  
Radiologie  
Chirurgie Générale- **Directeur CHIS**  
Immunologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Médecine Interne  
Dermatologie  
Chirurgie Générale  
Anatomie Pathologique  
Traumatologie – Orthopédie  
Gynécologie –Obstétrique  
Dermatologie

Urologie  
Chirurgie – Pédiatrique  
Neurologie  
Pédiatrie  
Gynécologie – Obstétrique  
Traumatologie – Orthopédie  
Radiologie  
Ophtalmologie  
Chirurgie Générale  
Gynécologie Obstétrique  
Pédiatrie

Réanimation Médicale  
Chirurgie Générale  
Gynécologie Obstétrique  
Gynécologie Obstétrique  
Médecine Interne  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Générale  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Cardiologie - **Directeur HMI Med V**  
Urologie  
Ophtalmologie  
Génétique  
Réanimation Médicale

Radiologie  
Chirurgie Pédiatrie  
Ophtalmologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Radiologie  
Traumatologie-Orthopédie  
Néphrologie  
Cardiologie



### Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan  
Pr. BEN SLIMANE Lounis  
Pr. BIROUK Nazha  
Pr. ERREIMI Naima  
Pr. FELLAT Nadia  
Pr. HAIMEUR Charki\*  
Pr. KADDOURI Nouredine  
Pr. KOUTANI Abdellatif  
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid  
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ  
Pr. TAOUFIQ Jallal  
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique  
Urologie  
Neurologie  
Pédiatrie  
Cardiologie  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Pédiatrique  
Urologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Psychiatrie  
Gynécologie Obstétrique

### Novembre 1998

Pr. AFIFI RAJAA  
Pr. BENOMAR ALI  
Pr. BOUGTAB Abdesslam  
Pr. ER RIHANI Hassan  
Pr. BENKIRANE Majid\*  
Pr. KHATOURI ALI\*

Gastro-Entérologie  
Neurologie – *Doyen de la FMP Abulcassis*  
Chirurgie Générale  
Oncologie Médicale  
Hématologie  
Cardiologie

### Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed\*  
Pr. AIT OUMAR Hassan  
Pr. BENJELLOUN Dakhama Badr.Sououd  
Pr. BOURKADI Jamal-Eddine  
Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer  
Pr. ECHARRAB El Mahjoub  
Pr. EL FTOUH Mustapha  
Pr. EL MOSTARCHID Brahim\*  
Pr. ISMAILI Hassane\*  
Pr. MAHMOUDI Abdelkrim\*  
Pr. TACHINANTE Rajae  
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumophtisiologie  
Pédiatrie  
Pédiatrie  
Pneumo-phtisiologie  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Pneumo-phtisiologie  
Neurochirurgie  
Traumatologie Orthopédie- *Dir. Hop. Av. Marr.*  
Anesthésie-Réanimation *Inspecteur du SSM*  
Anesthésie-Réanimation  
Médecine Interne



### Novembre 2000

Pr. AIDI Saadia  
Pr. AJANA Fatima Zohra  
Pr. BENAMR Said  
Pr. CHERTI Mohammed  
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma  
Pr. EL HASSANI Amine  
Pr. EL KHADER Khalid  
Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah\*  
Pr. GHARBI Mohamed El Hassan  
Pr. MAHASSINI Najat  
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae  
Pr. ROUIMI Abdelhadi\*

Neurologie  
Gastro-Entérologie  
Chirurgie Générale  
Cardiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Pédiatrie *Directeur Hop. Chekikh Zaied*  
Urologie  
Rhumatologie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Anatomie Pathologique  
Pédiatrie  
Neurologie

## Décembre 2000

Pr. ZOHAIR ABDELAH\*

ORL

## Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham\*  
Pr. BENABDELJLIL Maria  
Pr. BENAMAR Loubna  
Pr. BENAMOR Jouda  
Pr. BENELBARHDADI Imane  
Pr. BENNANI Rajae  
Pr. BENOACHANE Thami  
Pr. BEZZA Ahmed\*  
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi  
Pr. BOUMDIN El Hassane\*  
Pr. CHAT Latifa  
Pr. DAALI Mustapha\*  
Pr. DRISSI Sidi Mourad\*  
Pr. EL HIJRI Ahmed  
Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid  
Pr. EL MADHI Tarik  
Pr. EL OUNANI Mohamed  
Pr. ETTAIR Said  
Pr. GAZZAZ Miloudi\*  
Pr. HRORA Abdelmalek  
Pr. KABBAJ Saad  
Pr. KABIRI EL Hassane\*  
Pr. LAMRANI Moulay Omar  
Pr. LEKEHAL Brahim  
Pr. MAHASSIN Fattouma\*  
Pr. MEDARHRI Jalil  
Pr. MIKDAME Mohammed\*  
Pr. MOHSINE Raouf  
Pr. NOUINI Yassine  
Pr. SABBABH Farid  
Pr. SEFIANI Yasser  
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Anesthésie-Réanimation  
Neurologie  
Néphrologie  
Pneumo-phtisiologie  
Gastro-Entérologie  
Cardiologie  
Pédiatrie  
Rhumatologie  
Anatomie  
Radiologie  
Radiologie  
Chirurgie Générale  
Radiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Neuro-Chirurgie  
Chirurgie-Pédiatrique  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie **Directeur. Hop.d'Enfants**  
Neuro-Chirurgie  
Chirurgie Générale  
Anesthésie-Réanimation  
Chirurgie Thoracique  
Traumatologie Orthopédie  
Chirurgie Vasculaire Périphérique  
Médecine Interne  
Chirurgie Générale  
Hématologie Clinique  
Chirurgie Générale  
Urologie **Directeur Hôpital Ibn Sina**  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Vasculaire Périphérique  
Pédiatrie



## Décembre 2002

Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane\*  
Pr. AMEUR Ahmed \*  
Pr. AMRI Rachida  
Pr. AOURARH Aziz\*  
Pr. BAMOU Youssef \*  
Pr. BELMEJDOUB Ghizlene\*  
Pr. BENZEKRI Laila  
Pr. BENZZOUBEIR Nadia  
Pr. BERNOUSSI Zakiya  
Pr. BICHRA Mohamed Zakariya\*  
Pr. CHOHO Abdelkrim \*

Anatomie Pathologique  
Urologie  
Cardiologie  
Gastro-Entérologie  
Biochimie-Chimie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Dermatologie  
Gastro-Entérologie  
Anatomie Pathologique  
Psychiatrie  
Chirurgie Générale

Pr. CHKIRATE Bouchra  
Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair  
Pr. EL HAOURI Mohamed \*  
Pr. FILALI ADIB Abdelhai  
Pr. HAJJI Zakia  
Pr. IKEN Ali  
Pr. JAAFAR Abdeloihab\*  
Pr. KRIOUILE Yamina  
Pr. LAGHMARI Mina  
Pr. MABROUK Hfid\*  
Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss\*  
Pr. OUJILAL Abdelilah  
Pr. RACHID Khalid \*  
Pr. RAISS Mohamed  
Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha\*  
Pr. RHOU Hakima  
Pr. SIAH Samir \*  
Pr. THIMOU Amal  
Pr. ZENTAR Aziz\*

### **Janvier 2004**

Pr. ABDELLAH El Hassan  
Pr. AMRANI Mariam  
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas  
Pr. BENKIRANE Ahmed\*  
Pr. BOUGHALEM Mohamed\*  
Pr. BOULAADAS Malik  
Pr. BOURAZZA Ahmed\*  
Pr. CHAGAR Belkacem\*  
Pr. CHERRADI Nadia  
Pr. EL FENNI Jamal\*  
Pr. EL HANCHI ZAKI  
Pr. EL KHORASSANI Mohamed  
Pr. EL YOUNASSI Badreddine\*  
Pr. HACHI Hafid  
Pr. JABOUIRIK Fatima  
Pr. KHARMAZ Mohamed  
Pr. MOUGHIL Said  
Pr. OUBAAZ Abdelbarre\*  
Pr. TARIB Abdelilah\*  
Pr. TIJAMI Fouad  
Pr. ZARZUR Jamila

### **Janvier 2005**

Pr. ABBASSI Abdellah  
Pr. AL KANDRY Sif Eddine\*  
Pr. ALLALI Fadoua  
Pr. AMAZOUZI Abdellah  
Pr. AZIZ Noureddine\*  
Pr. BAHIRI Rachid

Pédiatrie  
Chirurgie Pédiatrique  
Dermatologie  
Gynécologie Obstétrique  
Ophtalmologie  
Urologie  
Traumatologie Orthopédie  
Pédiatrie  
Ophtalmologie  
Traumatologie Orthopédie  
Gynécologie Obstétrique  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Traumatologie Orthopédie  
Chirurgie Générale  
Pneumophtisiologie  
Néphrologie  
Anesthésie Réanimation  
Pédiatrie  
Chirurgie Générale

Ophtalmologie  
Anatomie Pathologique  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Gastro-Entérologie  
Anesthésie Réanimation  
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale  
Neurologie  
Traumatologie Orthopédie  
Anatomie Pathologique  
Radiologie  
Gynécologie Obstétrique  
Pédiatrie  
Cardiologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Traumatologie Orthopédie  
Chirurgie Cardio-Vasculaire  
Ophtalmologie  
Pharmacie Clinique  
Chirurgie Générale  
Cardiologie

Chirurgie Réparatrice et Plastique  
Chirurgie Générale  
Rhumatologie  
Ophtalmologie  
Radiologie  
Rhumatologie



Pr. BARKAT Amina  
Pr. BENYASS Aatif  
Pr. BERNOUSSI Abdelghani  
Pr. DOUDOUH Abderrahim\*  
Pr. EL HAMZAOUI Sakina\*  
Pr. HAJJI Leila  
Pr. HESSISSEN Leila  
Pr. JIDAL Mohamed\*  
Pr. LAAROUSSI Mohamed  
Pr. LYAGOUBI Mohammed  
Pr. NIAMANE Radouane\*  
Pr. RAGALA Abdelhak  
Pr. SBIHI Souad  
Pr. ZERAIDI Najia

Pédiatrie  
Cardiologie  
Ophtalmologie  
Biophysique  
Microbiologie  
Cardiologie (mise en disponibilité)  
Pédiatrie  
Radiologie  
Chirurgie Cardio-vasculaire  
Parasitologie  
Rhumatologie  
Gynécologie Obstétrique  
Histo-Embryologie Cytogénétique  
Gynécologie Obstétrique

### Décembre 2005

Pr. CHANI Mohamed

Anesthésie Réanimation

### Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen\*  
Pr. AKJOUJ Said\*  
Pr. BELMEKKI Abdelkader\*  
Pr. BENCHEIKH Razika  
Pr. BIYI Abdelhamid\*  
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine  
Pr. BOULAHYA Abdellatif\*  
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas  
Pr. DOGHMI Nawal  
Pr. FELLAT Ibtissam  
Pr. FAROUDY Mamoun  
Pr. HARMOUCHE Hicham  
Pr. HANAFI Sidi Mohamed\*  
Pr. IDRIS LAHLOU Amine\*  
Pr. JROUNDI Laila  
Pr. KARMOUNI Tariq  
Pr. KILI Amina  
Pr. KISRA Hassan  
Pr. KISRA Mounir  
Pr. LAATIRIS Abdelkader\*  
Pr. LMIMOUNI Badreddine\*  
Pr. MANSOURI Hamid\*  
Pr. OUANASS Abderrazzak  
Pr. SAFI Soumaya\*  
Pr. SEKKAT Fatima Zahra  
Pr. SOUALHI Mouna  
Pr. TELLAL Saida\*  
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Rhumatologie  
Radiologie  
Hématologie  
O.R.L  
Biophysique  
Chirurgie - Pédiatrique  
Chirurgie Cardio – Vasculaire  
Gynécologie Obstétrique  
Cardiologie  
Cardiologie  
Anesthésie Réanimation  
Médecine Interne  
Anesthésie Réanimation  
Microbiologie  
Radiologie  
Urologie  
Pédiatrie  
Psychiatrie  
Chirurgie – Pédiatrique  
Pharmacie Galénique  
Parasitologie  
Radiothérapie  
Psychiatrie  
Endocrinologie  
Psychiatrie  
Pneumo – Phtisiologie  
Biochimie  
Pneumo – Phtisiologie

### Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid  
Pr. ACHACHI Leila

Réanimation médicale  
Pneumo phtisiologie



Pr. ACHOUR Abdessamad\*  
 Pr. AIT HOUSSA Mahdi\*  
 Pr. AMHAJJI Larbi\*  
 Pr. AOUI Sarra  
 Pr. BAITE Abdelouahed\*  
 Pr. BALOUCH Lhousaine\*  
 Pr. BENZIANE Hamid\*  
 Pr. BOUTIMZINE Nourdine  
 Pr. CHARKAOUI Naoual\*  
 Pr. EHIRCHIOU Abdelkader\*  
 Pr. ELABSI Mohamed  
 Pr. EL MOUSSAOUI Rachid  
 Pr. EL OMARI Fatima  
 Pr. GHARIB Noureddine  
 Pr. HADADI Khalid\*  
 Pr. ICHOU Mohamed\*  
 Pr. ISMAILI Nadia  
 Pr. KEBDANI Tayeb  
 Pr. LALAOUI SALIM Jaafar\*  
 Pr. LOUZI Lhousain\*  
 Pr. MADANI Naoufel  
 Pr. MAHI Mohamed\*  
 Pr. MARC Karima  
 Pr. MASRAR Azlarab  
 Pr. MRABET Mustapha\*  
 Pr. MRANI Saad\*  
 Pr. OUZZIF Ez zohra\*  
 Pr. RABHI Monsef\*  
 Pr. RADOUANE Bouchaib\*  
 Pr. SEFFAR Myriame  
 Pr. SEKHSOKH Yessine\*  
 Pr. SIFAT Hassan\*  
 Pr. TABERKANET Mustafa\*  
 Pr. TACHFOUTI Samira  
 Pr. TAJDINE Mohammed Tariq\*  
 Pr. TANANE Mansour\*  
 Pr. TLIGUI Houssain  
 Pr. TOUATI Zakia

### **Décembre 2007**

Pr. DOUHAL ABDERRAHMAN

### **Décembre 2008**

Pr ZOUBIR Mohamed\*  
 Pr TAHIRI My El Hassan\*

Chirurgie générale  
 Chirurgie cardio vasculaire  
 Traumatologie orthopédie  
 Parasitologie  
 Anesthésie réanimation **Directeur ERSM**  
 Biochimie-chimie  
 Pharmacie clinique  
 Ophtalmologie  
 Pharmacie galénique  
 Chirurgie générale  
 Chirurgie générale  
 Anesthésie réanimation  
 Psychiatrie  
 Chirurgie plastique et réparatrice  
 Radiothérapie  
 Oncologie médicale  
 Dermatologie  
 Radiothérapie  
 Anesthésie réanimation  
 Microbiologie  
 Réanimation médicale  
 Radiologie  
 Pneumo phtisiologie  
 Hématologique  
 Médecine préventive santé publique et hygiène  
 Virologie  
 Biochimie-chimie  
 Médecine interne  
 Radiologie  
 Microbiologie  
 Microbiologie  
 Radiothérapie  
 Chirurgie vasculaire périphérique  
 Ophtalmologie  
 Chirurgie générale  
 Traumatologie orthopédie  
 Parasitologie  
 Cardiologie



Ophtalmologie

Anesthésie Réanimation  
 Chirurgie Générale

## **Mars 2009**

Pr. ABOUZAHIR Ali\*  
Pr. AGDR Aomar\*  
Pr. AIT ALI Abdelmounaim\*  
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia  
Pr. AKHADDAR Ali\*  
Pr. ALLALI Nazik  
Pr. AMINE Bouchra  
Pr. ARKHA Yassir  
Pr. BELYAMANI Lahcen\*  
Pr. BJIJOU Younes  
Pr. BOUHSAIN Sanae\*  
Pr. BOUI Mohammed\*  
Pr. BOUNAIM Ahmed\*  
Pr. BOUSSOUGA Mostapha\*  
Pr. CHAKOUR Mohammed \*  
Pr. CHTATA Hassan Toufik\*  
Pr. DOGHMI Kamal\*  
Pr. EL MALKI Hadj Omar  
Pr. EL OUENNASS Mostapha\*  
Pr. ENNIBI Khalid\*  
Pr. FATHI Khalid  
Pr. HASSIKOU Hasna \*  
Pr. KABBAJ Nawal  
Pr. KABIRI Meryem  
Pr. KARBOUBI Lamya  
Pr. L'KASSIMI Hachemi\*  
Pr. LAMSAOURI Jamal\*  
Pr. MARMADE Lahcen  
Pr. MESKINI Toufik  
Pr. MESSAOUDI Nezha \*  
Pr. MSSROURI Rahal  
Pr. NASSAR Ittimade  
Pr. OUKERRAJ Latifa  
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani \*

## **PROFESSEURS AGREGES :**

### **Octobre 2010**

Pr. ALILOU Mustapha  
Pr. AMEZIANE Taoufiq\*  
Pr. BELAGUID Abdelaziz  
Pr. BOUAITY Brahim\*  
Pr. CHADLI Mariama\*  
Pr. CHEMSI Mohamed\*  
Pr. DAMI Abdellah\*  
Pr. DARBI Abdellatif\*  
Pr. DENDANE Mohammed Anouar  
Pr. EL HAFIDI Naima  
Pr. EL KHARRAS Abdennasser\*

Médecine interne  
Pédiatrie  
Chirurgie Générale  
Neurologie  
Neuro-chirurgie  
Radiologie  
Rhumatologie  
Neuro-chirurgie  
Anesthésie Réanimation  
Anatomie  
Biochimie-chimie  
Dermatologie  
Chirurgie Générale  
Traumatologie orthopédique  
Hématologie biologique  
Chirurgie vasculaire périphérique  
Hématologie clinique  
Chirurgie Générale  
Microbiologie  
Médecine interne  
Gynécologie obstétrique  
Rhumatologie  
Gastro-entérologie  
Pédiatrie  
Pédiatrie  
Microbiologie ***Directeur Hôpital My Ismail***  
Chimie Thérapeutique  
Chirurgie Cardio-vasculaire  
Pédiatrie  
Hématologie biologique  
Chirurgie Générale  
Radiologie  
Cardiologie  
Pneumo-phtisiologie



Anesthésie réanimation  
Médecine interne  
Physiologie  
ORL  
Microbiologie  
Médecine aéronautique  
Biochimie chimie  
Radiologie  
Chirurgie pédiatrique  
Pédiatrie  
Radiologie

Pr. EL MAZOUZ Samir  
Pr. EL SAYEGH Hachem  
Pr. ERRABIH Ikram  
Pr. LAMALMI Najat  
Pr. MOSADIK Ahlam  
Pr. MOUJAHID Mountassir\*  
Pr. NAZIH Mouna\*  
Pr. ZOUAIDIA Fouad

Chirurgie plastique et réparatrice  
Urologie  
Gastro entérologie  
Anatomie pathologique  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie générale  
Hématologie  
Anatomie pathologique

### Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed  
Pr. ABOUELALAA Khalil\*  
Pr. BELAIZI Mohamed\*  
Pr. BENCHEBBA Driss\*  
Pr. DRISSI Mohamed\*  
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna  
Pr. EL KHATTABI Abdessadek\*  
Pr. EL OUAZZANI Hanane\*  
Pr. ER-RAJI Mounir  
Pr. JAHID Ahmed  
Pr. MEHSSANI Jamal\*  
Pr. RAISSOUNI Maha\*

Chirurgie Pédiatrique  
Anesthésie Réanimation  
Psychiatrie  
Traumatologie Orthopédique  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Générale  
Médecine Interne  
Pneumophtisiologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Anatomie pathologique  
Psychiatrie  
Cardiologie

### Février 2013

Pr. AHID Samir  
Pr. AIT EL CADI Mina  
Pr. AMRANI HANCHI Laila  
Pr. AMOUR Mourad  
Pr. AWAB Almahdi  
Pr. BELAYACHI Jihane  
Pr. BELKHADIR Zakaria Houssain  
Pr. BENCHEKROUN Laila  
Pr. BENKIRANE Souad  
Pr. BENNANA Ahmed\*  
0.  
Pr. BENSghir Mustapha\*  
Pr. BENYAHIA Mohammed\*  
Pr. BOUATIA Mustapha  
Pr. BOUABID Ahmed Salim\*  
Pr. BOUTARBOUCH Mahjouba  
Pr. CHAIB Ali\*  
Pr. DENDANE Tarek  
Pr. DINI Nouzha\*  
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Mohamed Ali  
Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Najwa  
Pr. ELFATEMI Nizare  
Pr. EL GUERROUJ Hasnae  
Pr. EL HARTI Jaouad

Pharmacologie – Chimie  
Toxicologie  
Gastro-Entérologie  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Réanimation Médicale  
Anesthésie Réanimation  
Biochimie-Chimie  
Hématologie  
Informatique Pharmaceutique

Anesthésie Réanimation  
Néphrologie  
Chimie Analytique  
Traumatologie Orthopédie  
Anatomie  
Cardiologie  
Réanimation Médicale  
Pédiatrie  
Anesthésie Réanimation  
Radiologie  
Neuro-Chirurgie  
Médecine Nucléaire  
Chimie Thérapeutique



Pr. EL JOUDI Rachid\*  
Pr. EL KABABRI Maria  
Pr. EL KHANNOUSSI Basma  
Pr. EL KHLOUFI Samir  
Pr. EL KORAICHI Alae  
Pr. EN-NOUALI Hassane\*  
Pr. ERRGUIG Laila  
Pr. FIKRI Meryim  
Pr. GHFIR Imade  
Pr. IMANE Zineb  
Pr. IRAQI Hind  
Pr. KABBAJ Hakima  
Pr. KADIRI Mohamed\*  
Pr. LATIB Rachida  
Pr. MAAMAR Mouna Fatima Zahra  
Pr. MEDDAH Bouchra  
Pr. MELHAOUI Adyl  
Pr. MRABTI Hind  
Pr. NEJJARI Rachid  
Pr. OUBEJJA Houda  
Pr. OUKABLI Mohamed\*  
Pr. RAHALI Younes  
Pr. RATBI Ilham  
Pr. RAHMANI Mounia  
Pr. REDA Karim\*  
Pr. REGRAGUI Wafa  
Pr. RKAIN Hanan  
Pr. ROSTOM Samira  
Pr. ROUAS Lamiaa  
Pr. ROUIBAA Fedoua\*  
Pr. SALIHOUN Mouna  
Pr. SAYAH Rochde  
Pr. SEDDIK Hassan\*  
Pr. ZERHOUNI Hicham  
Pr. ZINE Ali\*

Toxicologie  
Pédiatrie  
Anatomie Pathologie  
Anatomie  
Anesthésie Réanimation  
Radiologie  
Physiologie  
Radiologie  
Médecine Nucléaire  
Pédiatrie  
Endocrinologie et maladies métaboliques  
Microbiologie  
Psychiatrie  
Radiologie  
Médecine Interne  
Pharmacologie  
Neuro-chirurgie  
Oncologie Médicale  
Pharmacognosie  
Chirurgie Pédiatrique  
Anatomie Pathologique  
Pharmacie Galénique  
Génétique  
Neurologie  
Ophtalmologie  
Neurologie  
Physiologie  
Rhumatologie  
Anatomie Pathologique  
Gastro-Entérologie  
Gastro-Entérologie  
Chirurgie Cardio-Vasculaire  
Gastro-Entérologie  
Chirurgie Pédiatrique  
Traumatologie Orthopédie

### **Avril 2013**

Pr. EL KHATIB Mohamed Karim\*  
Pr. GHOUNDALE Omar\*  
Pr. ZYANI Mohammad\*

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale  
Urologie  
Médecine Interne

**\*Enseignants Militaires**



## MARS 2014

ACHIR ABDELLAH  
BENCHAKROUN MOHAMMED  
BOUCHIKH MOHAMMED  
EL KABBAJ DRISS  
EL MACHTANI IDRISSE SAMIRA  
HARDIZI HOUYAM  
HASSANI AMALE  
HERRAK LAILA  
JANANE ABDELLA TIF  
JEAIDI ANASS  
KOUACH JAOUAD  
LEMNOUER ABDELHAY  
MAKRAM SANAA  
OULAHYANE RACHID  
RHISSASSI MOHAMED JMFAR  
SABRY MOHAMED  
SEKKACH YOUSSEF  
TAZL MOUKBA. :LA.KLA.

Chirurgie Thoracique  
Traumatologie- Orthopédie  
Chirurgie Thoracique  
Néphrologie  
Biochimie-Chimie  
Histologie- Embryologie-Cytogénétique  
Pédiatrie  
Pneumologie  
Urologie  
Hématologie Biologique  
Génécologie-Obstétrique  
Microbiologie  
Pharmacologie  
Chirurgie Pédiatrique  
CCV  
Cardiologie  
Médecine Interne  
Génécologie-Obstétrique

**\*Enseignants Militaires**

## DECEMBRE 2014

ABILKACEM RACHID'  
AIT BOUGHIMA FADILA  
BEKKALI HICHAM  
BENAZZOU SALMA  
BOUABDELLAH MOUNYA  
BOUCHRIK MOURAD  
DERRAJI SOUFIANE  
DOBLALI TAOUFIK  
EL AYOUBI EL IDRISSE ALI  
EL GHADBANE ABDEDAIM HATIM  
EL MARJANY MOHAMMED  
FEJJAL NAWFAL  
JAHIDI MOHAMED  
LAKHAL ZOUHAIR  
OUDGHIRI NEZHA  
Rami Mohamed  
SABIR MARIA  
SBAI IDRISSE KARIM

Pédiatrie  
Médecine Légale  
Anesthésie-Réanimation  
Chirurgie Maxillo-Faciale  
Biochimie-Chimie  
Parasitologie  
Pharmacie Clinique  
Microbiologie  
Anatomie  
Anesthésie-Réanimation  
Radiothérapie  
Chirurgie Réparatrice et Plastique  
O.R.L  
Cardiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Chirurgie Pédiatrique  
Psychiatrie  
Médecine préventive, santé publique et Hyg.

**\*Enseignants Militaires**



## AOUT 2015

Meziane meryem  
Tahri latifa

Dermatologie  
Rhumatologie

## JANVIER 2016

BENKABBOU AMINE  
EL ASRI FOUAD  
ERRAMI NOUREDDINE  
NITASSI SOPHIA

Chirurgie Générale  
Ophtalmologie  
O.R.L  
O.R.L

## **2- ENSEIGNANTS – CHERCHEURS SCIENTIFIQUES**

### PROFESSEURS / PRs. HABILITES

Pr. ABOUDRAR Saadia	Physiologie
Pr. ALAMI OUHABI Naima	Biochimie – chimie
Pr. ALAOUI KATIM	Pharmacologie
Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma	Histologie-Embryologie
Pr. ANSAR M'hammed	Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. BOURJOUANE Mohamed	Microbiologie
Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia	Biochimie – chimie
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie
Pr. DRAOUI Mustapha	Chimie Analytique
Pr. EL GUESSABI Lahcen	Pharmacognosie
Pr. ETTAIB Abdelkader	Zootchnie
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
Pr. HAMZAOUI Laila	Biophysique
Pr. HMAMOUCHE Mohamed	Chimie Organique
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Biologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. REDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie
Pr. ZELLOU Amina	Chimie Organique

*Mise à jour le 14/12/2016 par le  
Service des Ressources Humaines*



# *DEDICACES*



*A mes très chers parents, à qui je ne pourrais jamais exprimer toute la reconnaissance qui m'habite, tant pour leurs sacrifices, leur amour que leur générosité.*

*A mes sœurs Naoual et Safaa, dont l'amour n'a cessé de me baigner depuis l'enfance.*

*A mon ami Oussama, dont l'amitié et l'affection me sont si chers.*

*A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.*

# *REMERCIEMENTS*





*A notre Maître et Président de jury*

*Monsieur le Professeur M. THELLIER*

*Professeur de parasitologie*

*Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de  
présider notre jury de thèse.*

*Nous vous exprimons notre grande admiration pour vos hautes qualités morales,  
humaines et professionnelles.*

*Nous vous prions de trouver, dans ce modeste travail, l'expression de notre  
sincère reconnaissance et notre respectueuse admiration.*

*A notre Maître et rapporteur de thèse*

*Monsieur le Professeur B. E. LMIMOUNI*

*Professeur agrégé parasitologie*

*Vous m'aviez fait l'honneur de me confier ce travail, qui n'aurait pu se faire  
sans vos précieuses directives et vos judicieux conseils.*

*Je tiens à vous exprimer ici toute ma gratitude pour votre grande disponibilité et  
votre immense gentillesse.*

*Veillez accepter, l'assurance de ma profonde estime et ma vive reconnaissance.*

*A notre Maître et juge de thèse*

*Monsieur le Professeur M. RAHBI*

*Professeur MEDECINE INTERNE*

*Nous vous remercions vivement pour l'honneur que vous nous faites en acceptant  
de siéger parmi le jury de notre thèse.*

*Veillez accepter l'assurance de notre profond respect et notre sincère  
reconnaissance.*

*A notre Maître et juge de thèse*

*Monsieur le Professeur Y. RAHHALI*

*Professeur de pharmacie galénique*

*Nous sommes sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de participer au jury de notre thèse et très touchés par la gentillesse avec laquelle vous nous avez toujours accueillis.*

*Puisse ce travail être pour nous, l'occasion de vous exprimer notre profond respect et notre gratitude la plus sincère.*

*A notre Maître et juge de thèse*

*Monsieur le Professeur M. MEIOUET*

*Professeur de droit pharmaceutique*

*Nous avons le privilège et l'honneur de vous avoir parmi les membres de notre  
jury.*

*Veillez accepter nos remerciements et notre admiration pour vos qualités  
d'enseignant et votre compétence.*

*LISTE  
DES ILLUSTRATIONS*

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

Ac	: Anticorps
ADCI	: Antibody-dependent cellular inhibition
ADN	: Acide désoxyribonucléique
Ag	: Antigène
ATP	: Adénosine triphosphate
CSP	: Protéine circumsporozoïte (circumsporozoite protein)
DDT	: Dichlorodiphényltrichloroéthane
EBA	: Erythrocyte binding antigen
FasL	: Fas ligand
GR	: Globule rouge
GRP	: Globule rouge parasité
ICAM-1	: Intercellular adhesion molecule 1
IFN	: Interféron
IFN $\gamma$	: Interféron gamma
Ig	: Immunoglobuline
IL	: Interleukine
KO	: Knock
NK	: Natural killer
NO	: Nitric oxide
P. berghei ANKA	: Plasmodium berghei ANKA

<i>P. falciparum</i>	: <i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P. knowlesi</i>	: <i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P. malariae</i>	: <i>Plasmodium malariae</i>
<i>P. ovale</i>	: <i>Plasmodium ovale</i>
<i>P. vivax</i>	: <i>Plasmodium vivax</i>
PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
PECAM	: Platelet/Endothelial cell adhesion molecule
PfEMP1	: <i>Plasmodium falciparum</i> Erythrocyte Membrane Protein 1
TDR	: Test de detection rapide
TNF $\alpha$	: Tumor necrosis factor alpha
TRAP	: Thrombospondin-related anonymous protein
VCAM-1	: Vascular cell adhesion molecule 1

## GLOSSAIRE

**Analyse** : « ensemble d'opérations destinées à déterminer la valeur ou les caractéristiques d'une propriété ; en microbiologie, une analyse correspond à la totalité des essais, des observations ou des mesurages effectués. » *Norme 15189*.

**Analyte** : « Constituant d'un échantillon avec une propriété mesurable. Exemple : dans l'expression « mesure de la parasitémie dans le sang », le terme « sang » est l'analyte et le terme « parasitémie » la propriété. ».

**Calibrage** : « Positionnement matériel de chaque repère (éventuellement de certains repères principaux seulement) d'un instrument de mesure en fonction de la valeur correspondante du mesurande. » *LAB GTA 06* – en pratique souvent non accessible à l'utilisateur.

**Calibrateur** : voir Matériau de référence

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

**CNR** : voir Centres nationaux de référence

**Co-infection** : présence simultanée dans le sang, à l'examen microscopique ou en PCR de  $\geq 2$  espèces plasmodiales différentes.

**Comparaison de méthode** (avec la méthode de référence ou une autre méthode). La comparaison de méthodes consiste à évaluer les résultats obtenus avec une méthode par rapport à ceux d'une autre méthode. Si cette dernière est une méthode de référence, des conclusions sur la justesse peuvent être formulées. Sinon cette évaluation est destinée à mettre en évidence des différences qui peuvent nuire à l'interprétation des résultats (guide SFBC – Chapitre Phase analytique). Etude de concordance (analyse des discordances) pour les méthodes qualitatives (SH FORM 44).

**Comparaison interlaboratoires (CIL)** : comprend l'organisation, l'exécution et l'évaluation de mesurages ou d'essais sur la même entité ou sur des entités similaires par deux laboratoires ou plus selon des conditions prédéterminées (norme 17025).

**Contrôle externe de la qualité (CEQ)** : voir évaluation externe de la qualité.

**Contrôle interne de qualité externalisé** : CIQ réalisé par plusieurs laboratoires sur un même lot d'échantillons de contrôles confrontés entre eux par l'établissement périodique des moyennes (généralement mensuel) permettant d'estimer la justesse (biais). Il répond à l'obligation de comparaisons interlaboratoires, mais le SH REF 02 – révision 01 précise que le CIQ externalisé n'est pas considéré comme une évaluation externe de la qualité (EEQ). Il peut constituer une approche de la justesse.

**Contrôle interne de qualité (CIQ)**, appelé couramment à tort CQI : réalisé au sein du laboratoire à l'aide d'échantillons de contrôles lors de la mesure

d'échantillons biologiques de patients pour vérifier la maîtrise du processus analytique. L'interprétation se fera en fonction de limites de tolérance déterminées selon un protocole pré-établi.

**Echanges d'échantillons entre laboratoires** : En l'absence d'organisateur de comparaisons interlaboratoires pour un examen donné, le laboratoire pourra mettre en place des comparaisons par des échanges avec d'autres laboratoires.

**Echantillon primaire** : « spécimen ; une ou plusieurs parties prélevées sur un système.

**Echantillon secondaire** : échantillon préparé par aliquotage de l'échantillon primaire (pour répartition aux différents secteurs du laboratoire, pour examen différé ou pour biothèque).

**Echantillon** : « Une ou plusieurs parties prélevées sur un système en vue de fournir des informations sur ce système, souvent pour servir de base à la décision concernant ce système ou sa production. EXEMPLE : Un volume de sérum prélevé sur un volume de sérum plus important. » *Norme 15189*

**Etalon** : voir Matériau d'étalonnage

**Etalonnage = calibration** Définition du LAB GTA 06 : Ensemble des opérations établissant, dans des conditions spécifiées, la relation entre les valeurs de la grandeur indiquées par un appareil de mesure ou un système de mesure ou les valeurs représentées par une mesure matérialisée ou par un matériau de référence, et les valeurs correspondantes de la grandeur réalisées

par des étalons. Opération qui, dans des conditions spécifiées, établit en une première étape une relation entre les valeurs et les incertitudes de mesures associées qui sont fournies par des étalons et les indications de mesure correspondantes avec les incertitudes associées, puis utilise en une seconde étape cette information pour établir une relation permettant d'obtenir un résultat de mesure à partir d'une indication de mesure. La seule première étape dans la définition est souvent perçue comme étant l'étalonnage. *Il s'agit d'une opération technique à priori. Il permet de déterminer les valeurs des écarts d'indication d'un instrument de mesure par rapport aux valeurs étalons. Il permet également par l'application de corrections systématiques, de réduire l'incertitude associée aux mesures. L'étalonnage entraîne un ensemble de résultats chiffrés.*

**Evaluation externe de la qualité (EEQ)** = procédure d'évaluation des performances d'un laboratoire par le biais d'une comparaison interlaboratoires réalisée par un organisateur respectant substantiellement les exigences de l'ISO 43-1 (norme 15189 - § 5.6.4) et la réglementation en vigueur à l'aide d'échantillons inconnus. Elle permet une approche de l'exactitude. Contrôle national de qualité (CNQ) = EEQ de l'ANSM (anciennement AFSSAPS) : obligatoire. Contrôles externes de la qualité (CEQ) autres que CNQ. En pratique : les EEQ « vraies » sont des EEQ ponctuelles en aveugle, c'est à dire sans connaître la valeur de l'échantillon de contrôle à analyser.

**Exactitude** : « Etroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et une valeur vraie d'un mesurande. NOTE 1 : L'exactitude de mesure n'est pas une

grandeur et ne s'exprime pas numériquement. En pratique, l'exactitude est déterminée à partir de la justesse et de la fidélité. Elle est approchée par les EEQ « vraies ».

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

**Fidélité intermédiaire** : voir Reproductibilité

**Fidélité** : « Etroitesse de l'accord entre les indications ou les valeurs mesurées, obtenues par des mesurages répétés du même objet ou d'objets similaires dans des conditions spécifiées. NOTE 1 : La fidélité est en général exprimée numériquement par des caractéristiques telles que l'écart-type, la variance ou le coefficient de variation dans les conditions spécifiées. NOTE 2 : Les conditions spécifiées peuvent être, par exemple, des conditions de répétabilité, des conditions de fidélité intermédiaire ou des conditions de reproductibilité. » *SH GTA 04 rev00*. En pratique : la fidélité inclut la répétabilité (intra-série) et la reproductibilité (inter-série). Elle traduit la distribution des erreurs aléatoires et n'a aucune relation avec la valeur vraie ou spécifiée. Ne pas confondre avec la fidélité intermédiaire, qui est un synonyme de reproductibilité.

**Grandeur** : « Attribut d'un phénomène, d'un corps ou d'une substance qui est susceptible d'être distingué qualitativement et déterminé quantitativement. » *Norme 15189*.

**Incertitudes / Facteurs de variation** : Il existe plusieurs définitions et plusieurs modes d'expression et de calcul (voir SH GTA 14 pour plus de précisions). Incertitude de mesure : « paramètre, associé au résultat d'un mesurage, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement être attribuées au mesurande. » Norme 15189. Autre définition : « estimation de la dispersion des résultats, qui tient compte de l'erreur systématique et aléatoire ; +/- une valeur attribuée à un résultat. Ex : résultat indiqué : +/-0.5°C. » GM LABM. En pratique : Préconisation de la SFBC : déterminer l'incertitude de mesure à partir des résultats de CIQ et des données de l'étalon fournisseur (si incertitude fournie). Préconisation du COFRAC : déterminer l'incertitude de mesure à partir des résultats de CIQ et d'EEQ.

**Intervalle de mesure** = défini par la limite inférieure de linéarité (profil de fidélité) et la limite supérieure de linéarité (voir Limites de linéarité). « Ensemble des valeurs de grandeurs d'une même nature qu'un instrument de mesure ou un système de mesure donné peut mesurer avec une incertitude instrumentale spécifiée, dans des conditions déterminées.

**Intervalle de référence** = « Intervalle correspondant aux 95% de la distribution des valeurs de référence.

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

**Justesse** : « Étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence. La justesse de mesure n'est pas une grandeur et ne peut donc pas s'exprimer numériquement. La justesse de mesure varie en sens inverse de l'erreur systématique mais n'est pas liée à l'erreur aléatoire. En pratique, la justesse fournit une indication sur les erreurs systématiques. Elle est approchée grâce aux CIQ et exprimé en biais (% par rapport à la valeur cible) ou en z-score. (\*) valeur de référence = valeur cible, moyenne des pairs, moyenne des laboratoires de référence, moyenne des méthodes de référence....

**Les Centres nationaux de référence (CNR)** : Les Centres nationaux de référence (CNR) sont des laboratoires localisés au sein d'établissements publics ou privés de santé, d'enseignement ou de recherche. Ils sont nommés pour 5 ans par le ministre chargé de la Santé sur proposition de Santé publique France. Pour l'exercice de ses missions de surveillance des maladies infectieuses, Santé publique France s'appuie sur un réseau de 38 CNR et 5 CNR – Laboratoires experts (article L 1413-3 du code de la santé publique).

Pour assurer certaines de ses missions, un CNR peut s'appuyer sur un ou plusieurs laboratoires dits «laboratoires associés». Dans ce cas, le responsable du CNR est chargé de la coordination de l'ensemble des activités des laboratoires associés et rend à Santé Publique France un rapport annuel faisant la synthèse des activités réalisées par les différents laboratoires.

**Limite de détection :** « Le terme limite de détection est utilisé pour décrire la plus petite valeur de mesurande dont une procédure d'analyse peut indiquer la présence avec un niveau de confiance spécifié. Elle a également été appelée « concentration détectable minimale ». Il convient de ne pas confondre la limite inférieure d'un intervalle de mesure avec la limite de détection. En pratique, Valable pour les méthodes quantitatives. Considérer le seuil de positivité dans le cas des méthodes qualitative. Plus petite quantité examinée dans un échantillon pouvant être détectée mais non quantifiée comme une valeur exacte (guide SFBC – chapitre Phase analytique) La limite de détection peut être calculée selon la formule suivante =  $3 \times s_b$  ( $s_b$  = écart type).

**Limite de quantification :** « Valeur la plus faible du mesurande dans un échantillon pouvant être mesurée avec une incertitude de mesure spécifiée, dans des conditions de mesure déterminées. » *SH GTA 04 rev00*. A différencier de la limite de détection. La limite de quantification peut être calculée selon la formule suivante =  $10 \times s_b$

**Limites de linéarité :** elles définissent l'intervalle de mesure (exprimé en concentration) à l'intérieur duquel les mesures peuvent être effectuées avec fidélité et justesse (guide SFBC – chapitre Phase analytique). **Linéarité :**

« Aptitude à fournir des valeurs mesurées qui sont directement proportionnelles à la valeur du mesurande dans l'échantillon. En pratique, Limites de validité de la relation linéaire existant entre les concentrations observées et les concentrations théoriques des dilutions d'un spécimen.

**Matériau d'étalonnage = étalon** = matériau de référence au plan national, européen ou international.

**Matériau de référence** = calibrateur en pratique « Matériau ou substance dont une (ou plusieurs) valeur(s) de la (des) propriété(s) est (sont) suffisamment homogène(s) et bien définie(s) pour permettre de l'utiliser pour l'étalonnage d'un appareil, l'évaluation d'une méthode de mesurage ou l'attribution de valeurs aux matériaux. » SH GTA 04 rev00 : Matériau suffisamment homogène et stable en ce qui concerne des propriétés spécifiées, qui a été préparé pour être adapté à son utilisation prévue pour un mesurage ou pour l'examen de propriétés qualitatives.

**Matrice** : Milieu faisant l'objet de l'examen/analyse (sérum, plasma, sang total, urine, LCR, tissu... SH GTA 04 rev01).

**Mesurage** : Ensemble d'opérations ayant pour but de déterminer une valeur d'une grandeur. *Norme 15189* = terme métrologique pour analyse en LBM. Ne s'applique qu'aux propriétés quantitatives (*SH rev01*).

**Mesurande** : Grandeur que l'on veut mesurer. NOTE 1 : La spécification d'un mesurande en biologie médicale exige la connaissance de la nature de la

grandeur (par exemple la concentration massique), une description de la matrice dont la grandeur est une propriété (par exemple le plasma sanguin) et les entités chimiques en jeu (par exemple l'analyte). NOTE 2 : Le mesurande peut être une activité biologique.

**Mesure** : « Processus consistant à obtenir expérimentalement une ou plusieurs valeurs que l'on peut raisonnablement attribuer à une grandeur. » *SH GTA 04*.

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

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

**Paludisme autochtone** : cas de paludisme confirmé acquis en France métropolitaine.

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

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

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

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

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

**Période d'évaluation** : période d'essai du matériel qui se conclut ou non par l'autorisation de mise en service.

**Prélèvement** = acte de prélever (cf définitions de la norme 15189).

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

**Répétabilité** : « Fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de répétabilité - Différence entre les résultats du dosage répété de la même analyse effectuée dans les mêmes conditions » *GM LABM* Synonymes : répétabilité intra-série.

**Reproductibilité interlaboratoire** : terme non retenu, mais cité pour information car rencontré dans certains documents d'EEQ ; en pratique cela

correspond aux comparaisons interlaboratoires (CIL) et aux évaluations externes de la qualité (EEQ).

**Reproductibilité** : Fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de reproductibilité - Différence entre les résultats du dosage répété de la même analyse effectuée dans des conditions différentes. *GM LABM*. Synonymes : répétabilité inter-série, fidélité intermédiaire (terme utilisé dans le SH FORM 43), variabilité

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

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

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

**Robustesse** : « Par "robustesse" d'une technique d'analyse, on entend une mesure de sa capacité à ne pas être affectée par des variations faibles mais délibérées des paramètres de la méthode, et qui fournit une indication sur sa fiabilité dans les conditions normales d'utilisation. » *SH GTA 04 rev00*.

**Sensibilité analytique** : pour information car ce n'est pas un paramètre de la validation de méthode, mais ce terme apparaît dans certaines notices. « Quotient de la variation d'une indication de mesure par la variation correspondante de la valeur de la grandeur mesurée. La sensibilité d'une procédure de mesure peut dépendre de la valeur de la grandeur mesurée. La sensibilité analytique d'un système de mesure est la pente de la courbe d'étalonnage. Il convient de ne pas utiliser la sensibilité analytique au sens de limite de détection ou de limite de quantification et de ne pas la confondre avec la sensibilité diagnostique. Aux fins de l'application des spécifications techniques communes (STC), on entend par "sensibilité analytique" la limite de détection, soit la plus petite quantité de marqueur cible pouvant être détectée avec précision même si cette acceptation est erronée. » *SH GTA 04 rev00*. **En pratique** = absence de faux négatifs pour une méthode qualitative ; pente de la droite d'étalonnage pour une méthode quantitative.

**Sensibilité diagnostique** : « La probabilité qu'un dispositif donne un résultat positif en présence du marqueur cible. » associé à une maladie particulière ou à un état particulier ; *SH GTA 04 rev00* – pour les méthodes qualitatives. En pratique : valeur prédictive positive.

**Seuil de positivité** : plus petite quantité à examiner dans un échantillon pouvant être détectée dans les conditions expérimentales décrites (guide SFBC – chapitre Phase analytique). En pratique : concerne les méthodes qualitatives. Considérer la limite de détection pour les méthodes quantitative.

**Spécificité diagnostique** : « aptitude d'une procédure d'analyse de DIV (diagnostic *in vitro*) à reconnaître l'absence d'un marqueur cible associé à une maladie particulière ou à un état particulier. » *SH GTA 04 rev00*. En pratique = absence de faux positifs pour une méthode qualitative.

**Spécificité analytique** : « Capacité d'un système de mesure, utilisant une procédure de mesure spécifiée, à produire des résultats de mesure, pour un ou plusieurs mesurandes, qui ne dépendent ni les uns des autres ni de toute autre grandeur dans le système soumis au mesurage. EXEMPLE : Capacité d'un système de mesure à mesurer la concentration en créatinine dans le plasma sanguin par une procédure au picrate alcalin sans interférence des concentrations de glucose, d'urates, de cétone ou de protéines. NOTE 1 Le manque de spécificité analytique est appelé interférence analytique. NOTE 2 Le manque de spécificité analytique dans les procédures de mesure immunochimiques peut être dû à la réactivité croisée. » *SH GTA 04 rev00*. Une méthode est dite spécifique lorsqu'elle permet de garantir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser et de mesurer quantitativement un paramètre physicochimique ou un groupement fonctionnel d'une ou de plusieurs substances dans l'échantillon (guide SFBC – Chapitre Phase analytique).

**Système de mesure** : ensemble technique comprenant analyseur, réactif et protocole d'adaptation (guide SFBC – Chapitre Phase analytique).

**Théranostique, Théranostic (ou théragnostique)** : néologisme qui dérive de la contraction des termes « thérapeutique » et « diagnostic » ; c'est l'utilisation

d'un test diagnostique, identifiant un marqueur, pour orienter la thérapeutique du patient en fonction de son statut pour le marqueur (statut positif ou négatif pour un marqueur binaire).

**Validité analytique** : aptitude d'un test diagnostique à réaliser la mesure d'intérêt avec exactitude et fiabilité. Cette validité inclut la sensibilité et la spécificité analytiques, la reproductibilité, la robustesse et la satisfaction des contrôles de qualité.

**Validité clinique** : aptitude d'un test diagnostique à prédire avec précision et fiabilité le phénotype clinique d'intérêt (exemple : survie globale ou survie sans progression des patients recevant un traitement donné). Elle inclut la sensibilité et la spécificité cliniques, ainsi que les valeurs prédictives positive et négative du test.

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Carte de l'origine probable de Plasmodium falciparum.....	6
Figure 2.Principales étapes de l'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte (d'après Tonkin 2011 ; Mitchell 2004 et Aikawa 1978).....	16
Figure 3.Cycle vital de Plasmodium falciparum.....	17
Figure 4. Physiopathologie de l'accès simple, profil de la fièvre.....	19
Figure 5. Facteurs de risque de décès du paludisme grave en réanimation en France d'après une étude de cohorte de 400 cas graves chez des adultes .....	22
Figure 6. Evolution de la charge parasitaire en fonction du stade de développement (Extrait de Borrmann, S. 2011). .....	23
Figure 7. Production des mérozoïtes par cycle érythrocytaire (Modifié de Planches de l'OMS, Marc Thellier) .....	24
Figure 8. Age des hématies et compatibilité avec les infections par les différents plasmodiums humains (Schéma Marc Thellier) .....	25
Figure 9. Structure schématique et organisation de l'unité fonctionnelle filtrante splénique (Extrait de Buffet et coll. Blood 2011) .....	26
Figure 10. Mécanismes du contrôle immunitaire lors d'une infection palustre (extrait de Deroost, K. FEMS Microbiology Reviews 2015).....	31
Figure 11. Les globules rouges parasités, ultrastructure et schémas des knobs, le rôle de la protéine de membrane érythrocytaire 1 de Plasmodium falciparum, PfEMP1 .....	34
Figure 12. Structure et ultrastructure du capillaire. L'interface globule rouge, cellule endothéliale .....	35

Figure 13.Représentation de la vitesse du sang en fonction de la surface totale des différents types de vaisseaux.....	36
Figure 14. Conséquence mécanique de la cytoadhérence : la séquestration des globules rouges parasités dans les capillaires, aboutit à un ralentissement du flux sanguin dans les tissus avec une hypoxie cellulaire (Modifié d'après Dondorp, A.M. 2004) .....	37
Figure 15. La réaction inflammatoire locale de type « allergique » avec production de médiateurs et cytokines pro-inflammatoires (Mecheri, S. 2012) .....	39
Figure 16.Apoptose et nécrose, représentation schématique (d'après Service d'anatomopathologie, Faculté Broussais, Hôtel Dieu, Paris) .....	41
Figure 17.Exemple de la formation et de la structure des microparticules. Dans le cas du paludisme, elles sont d'origine érythrocytaire, plaquettaire ou endothéliale vasculaire.....	41
. Figure 18. Rétinopathie palustre (Mishra, S.K. 2009) .....	42
Figure 19. Représentation schématique des cycles de glycolyse aérobie et anaérobie. Bilan pour une molécule de glucose.....	43
Figure 20 .Résumé schématique des conséquences de la cytoadhérence des GRP aux cellules endothéliales dans les capillaires .....	44
Figure 21. Représentation schématique du déroulement du cycle de schizogonie érythrocytaire de <i>P. falciparum</i> dans le temps en lien avec la dynamique des phénomènes de cytoadhérence et leurs conséquences cliniques (Marc Thellier).....	45
Figure 22. . Logigramme du diagnostic biologique du paludisme (MAJ 2017 des RPC 2007) .....	61

Figure 23. Concentration-détection en une étape d'un biomarqueur du paludisme (Pereira, D.Y. et Coll. 2015) .....	63
Figure 24. Diagnostic transdermique du paludisme (Lukianova-Hleb, E.Y. 2015) .....	65
Figure 25. Principe du diagnostic transdermique du paludisme (Lukianova-Hleb, E.Y. 2014) .....	66
. Figure 26. Effet du laser pulsé sur les globules rouges parasités (Lukianova-Hleb, E.Y. 2014) .....	67
Figure 27. Organigramme du laboratoire associé Hôpital Pitié-Salpêtrière.....	79
Figure 28. CNR du Paludisme Hôpital Pitié-Salpêtrière, Pavillon Laveran 1er étage, plan des locaux .....	80
Figure 29. CNR du Paludisme Hôpital Pitié-Salpêtrière, schéma des liens fonctionnels avec les partenaires pour la recherche et le développement des techniques.....	83
Figure 30. Photographie d'un champ microscopique au grossissement x1000 d'un frottis sanguin mince d'un sang parasité par Plasmodium falciparum.....	88
Figure 31. Photographie d'un champ microscopique au grossissement x1000 d'un frottis sanguin mince d'un sang parasité par Plasmodium falciparum avec une cellule de Miller .....	89
Figure 32. Méthode de comptage des globules rouges sur une cellule de Miller.....	90
Figure 33. Dispositif xRapid composé d'un microscope à lampe LED et d'un iPhone 6S avec sa coque et le cylindre qui permet la fixation sur l'oculaire du microscope .....	91

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Epidémiologie du paludisme en 2000-2015 les points clés .....	13
Tableau 2. Physiopathologie du paludisme à Plasmodium falciparum, les points clés....	46
Tableau 3. Critères de gravité du paludisme à Plasmodium falciparum (OMS, 2000) .....	49
Tableau 4. Critères du paludisme grave d'importation à Plasmodium falciparum de l'adulte : définition en France métropolitaine selon les RPC 2007, mise à jour en 2017.....	50
Tableau 5. Le diagnostic biologique du paludisme, les points clés .....	69
Tableau 6. Organisation schématique et activités au sein du CNR du Paludisme .....	76

# *Sommaire*

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	1
<b>II. ACCES PALUSTRE A PLASMODIUM FALCIPARUM, EPIDEMIOLOGIE, PHYSIOPATHOLOGIE, DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE</b> .....	7
II.1. PLASMODIUM FALCIPARUM, EPIDEMIOLOGIE, CYCLE PARASITAIRE .....	8
II.1.1. EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION A PLASMODIUM FALCIPARUM.....	8
II.1.2. PLASMODIUM FALCIPARUM, LE CYCLE PARASITAIRE, LES ETAPES CLES .....	13
II.2. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A PLASMODIUM FALCIPARUM.....	18
II.2.1. LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ACCES SIMPLE.....	18
II.2.2. LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ACCES GRAVE .....	21
II.3. LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE D'UNE INFECTION PALUSTRE.....	51
II.3.1. QUELLES INDICATIONS DU DIAGNOSTIC.....	51
II.3.2. LA TECHNIQUE DE REFERENCE.....	53
II.3.3. LES TECHNIQUES ALTERNATIVES .....	57
II.3.4. LES TECHNIQUES POUR L'AVENIR.....	63
II.4. IMPORTANCE DE LA MESURE DE LA CHARGE PARASITAIRE .....	69
II.4.1. LA CHARGE PARASITAIRE ET SON EVOLUTION .....	69
II.4.2. LA MESURE DE LA CHARGE PARASITAIRE .....	70
<b>III. COMPARAISON DE METHODES</b> .....	71

III.1. MATERIEL ET METHODE.....	73
III.1.1. LIEUX DE L'ETUDE .....	73
III.1.1.1. Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de la Pitié-Salpêtrière, CNR du Paludisme, laboratoire associé .....	73
III.1.1.2. La société xRapid .....	84
III.1.2. SOUS PROCESSUS 3 = MESURE DE LA PARASITEMIE SUR LE FSM ..	85
III.1.2.1. Matériaux de référence .....	85
III.1.2.2. Répétabilité.....	94
III.1.2.3. Fidélité intermédiaire .....	94
III.1.2.4. Justesse.....	95
III.1.2.5. Exactitude .....	97
III.1.2.6. Incertitude de mesure.....	97
III.1.2.7. Etendue de mesure.....	99
III.1.2.8. Comparaison de méthodes .....	99
III.1.2.9. Interférences et spécificité analytique .....	100
III.2. RESULTATS.....	101
1.4.1. REPETABILITE .....	101
1.4.2. FIDELITE INTERMEDIAIRE, JUSTESSE, EXACTITUDE, INCERTITUDE	102
1.4.3. ETENDUE DE MESURE.....	107
1.4.4. COMPARAISON DE METHODES .....	107
1.4.5. INTERFERENCES ET SPECIFICITE ANALYTIQUE.....	108

III.3. ANALYSE DES RESULTATS, DISCUSSION .....	108
<b>IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>112</b>
<b>V. RESUME</b>	
<b>VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	

# *I. Introduction*

Le paludisme, ou malaria, est une parasitose due à des protozoaires hématozoaires du genre *Plasmodium*, transmise par des moustiques femelles du genre *Anopheles*. Il s'agit de la première endémie parasitaire mondiale. On estime que près d'un tiers de la population mondiale vit en zone d'endémie (1). Six espèces de *Plasmodium* infectent régulièrement l'homme dont une, *Plasmodium falciparum* est responsable de la majorité des accès graves et des décès. Selon un rapport conjoint de l'OMS et de l'UNICEF publié fin 2015, confirmé par le rapport annuel de l'OMS sur le paludisme de 2016, les taux d'incidence et celui de mortalité attribuable au paludisme ont chuté respectivement de 37 et de 60 pour cent depuis 2000 (1). En pratique, cela représente plus de 6 millions de vies, en majorité d'enfants, sauvées. L'objectif du millénaire, cible 6C, pour le développement « D'ici à 2015, avoir maîtrisé le paludisme et d'autres grandes maladies, et commencé à inverser la tendance actuelle » a été atteint. « La lutte mondiale contre le paludisme constitue l'une des plus grandes réussites en santé publique des quinze dernières années. C'est le signe que nos stratégies se révèlent efficaces et que nous pouvons vaincre cette ancienne maladie mortelle qui prend encore chaque année des milliers de vies, et principalement la vie d'enfants », déclare le Dr Margaret Chan, la directrice générale de l'OMS. Ces propos très optimistes et très volontaristes sont également un plaidoyer pour obtenir davantage de financement pour lutter contre ce fléau qui tue encore des milliers de personnes dans le monde essentiellement dans les pays tropicaux les plus pauvres. En effet, l'OMS estime à 429 000 [235 000-639 000] le nombre de décès, dans le monde pour l'année 2015 (1). Les décès sont recensés à 92% en Afrique sub-saharienne et l'espèce *P. falciparum* est

responsable dans 99% des cas. Une question fondamentale agite le monde de la paludologie depuis des décennies, pourquoi cette espèce et quels sont les mécanismes physiopathologiques impliqués pour expliquer cette situation ? Un certain nombre de voiles ont été levés ces dernières années, en particulier concernant l'origine de l'apparition de *P. falciparum* chez l'Homme. Il est maintenant en effet démontré, grâce à l'analyse d'ADN de parasites extraits de selles de grands singes, que l'isolat de *P. falciparum* qui s'est implanté chez l'homme est un parasite du gorille (2). Le transfert a eu lieu il y a environ 350 000 ans (3). Ceci correspond à l'émergence d'*Homo sapiens* dont les fossiles les plus anciens, retrouvés sur le continent Africain sur le site de Jebel Irhoud (Maroc), sont datés d'il y a  $315 \pm 34$  millier d'années (4). Les raisons et les mécanismes de ce transfert ne sont pas connus, mais il est certain que cela a pu être réalisé en un temps très court si l'on se réfère à la récente expansion de *Plasmodium knowlesi*, un parasite des singes macaques qui s'est implanté très récemment chez l'homme du fait d'un bouleversement de l'écologie locale. La forêt primaire d'iles de Malaisie a été rasée et remplacée par des plantations d'arbres à palme avec disparition des singes macaques remplacés dans le cycle du parasite par une population humaine de travailleurs pauvres en provenance des îles voisines. Les analyses moléculaires toujours, mettent en évidence que les populations de *P. falciparum* se sont ensuite développées chez *Homo sapiens* sur le continent Africain avant d'accompagner des groupes d'hommes lors de leur sortie du continent il y a 50.000 à 100.000 ans (Pleistocène) (5). On constate également un accroissement soudain de la population de parasites il y a environ 10.000 ans que l'on peut mettre en lien avec la sédentarisation et le développement de l'agriculture et de l'élevage (5). C'est de cette période que date

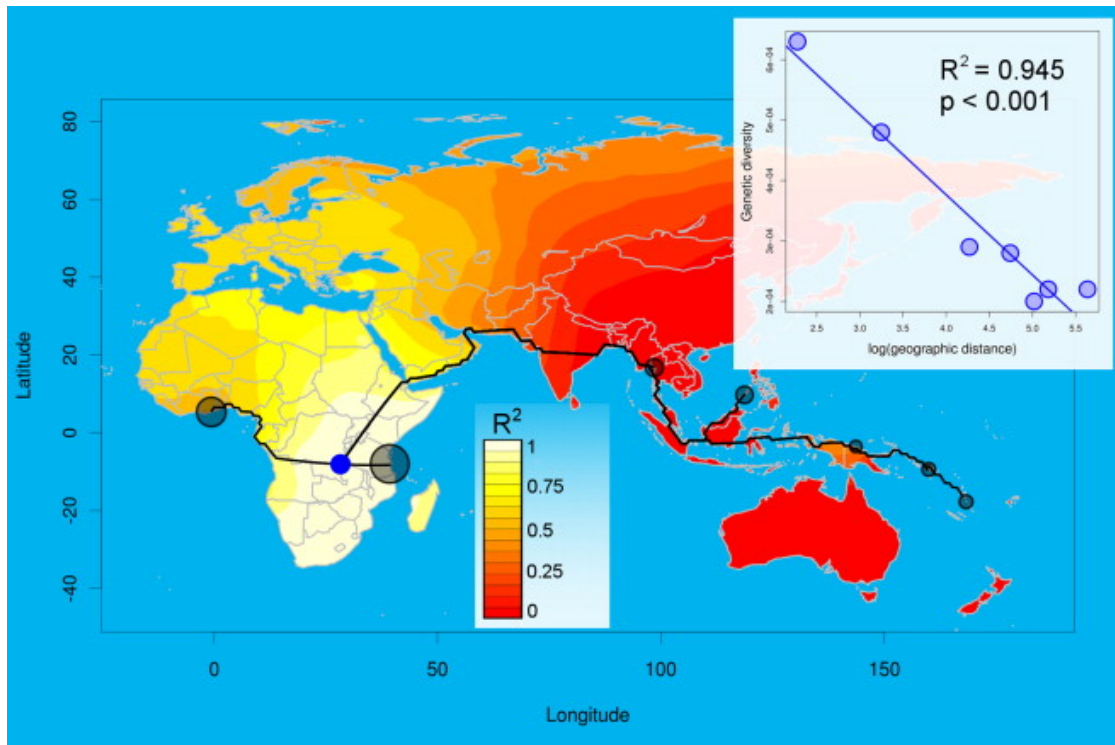
l'implantation et l'expansion de *P. falciparum* sur le continent européen et asiatique. Il a également été démontré que la diversité génétique de *P. falciparum* était la plus large sur le continent africain et qu'elle se réduisait à mesure que l'on s'éloignait de cette source originelle Figure X (6). Du plus ancien que l'on puisse remonter avec les dosages d'ADN, *P. falciparum* a toujours été délétère pour l'Homme. Les analyses moléculaires récentes identifient sans équivoque des infections palustres à *P. falciparum* dans plusieurs momies égyptiennes anciennes de plus de 4000 ans et quelques cas isolés dans l'Europe romaine et la Renaissance (7, 8). Le jeune Pharaon Toutankhamon est probablement décédé d'un accès palustre avec cette espèce il y a environ 3 300 ans (9). Les preuves littéraires de l'infection par le paludisme remontent à la première période grecque, il y a environ 2.450 ans, lorsque Hippocrate a décrit la fièvre ondulée typique très évocatrice de cette infection. Bien que le nombre de cas soit faible, il est admis que les taux globaux d'infection aient été élevés et que cette maladie infectieuse ait pu avoir un impact significatif sur les populations historiques. Plus récemment l'histoire moderne rend compte du poids de cette maladie dans les populations humaines. En zone de forte endémicité, le poids de la létalité est essentiellement supporté par les enfants de moins de 5 ans. La prémunition protégeant efficacement des accès graves et de la létalité les sujets plus âgés. A l'inverse, de nombreuses épidémies mortelles dans toutes les classes d'âge sont publiées dans la littérature médicale des années 1950 à nos jours, avec des dizaines de milliers de victimes à chaque fois, en zone de paludisme instable (10). Les raisons de la gravité particulière des accès à *P. falciparum* sont longtemps demeurées mystérieuses. Parmi les signes cliniques fréquemment rencontrés, les signes neurologiques ont orienté les recherches

étiologiques vers une pathologie principalement cérébrale avec pensait-on une forte composante inflammatoire (refs). De nombreux mécanismes ont ensuite été évoqués : l'obstruction des capillaires du cerveau, l'hypoglycémie, l'acidose lactique l'œdème cérébral et pulmonaire que l'on retrouve dans de nombreux ouvrages scientifiques ou dans des textes de vulgarisation scientifiques largement diffusés (Gentilini) (wikipédia)<sup>1</sup>. L'élément déterminant est en fait la capacité des hématies parasitées par *P. falciparum* de cytoadhérer à la surface des cellules endothéliales vasculaires (11). C'est en effet cette particularité qui lui a permis de s'implanter chez l'homme en échappant à la destruction dans la rate du fait de rigidité acquise des GR parasités par cette espèce, à peu près à la moitié de leur développement intra-erythrocytaire. Nous avons donc choisi de développer dans une première partie la physiopathologie de l'accès palustre grave ainsi que l'aspect diagnostic et la mesure de la parasitémie avant de réaliser dans une seconde partie une étude comparative de 3 méthodes de mesure de la parasitémie, dont une semi automatisée.

---

1

[https://fr.wikipedia.org/wiki/Paludisme#Acc.C3.A8s\\_palustres\\_graves\\_.C3.A0\\_Plasmodium\\_falci parum](https://fr.wikipedia.org/wiki/Paludisme#Acc.C3.A8s_palustres_graves_.C3.A0_Plasmodium_falci parum)



*Figure 1. Carte de l'origine probable de Plasmodium falciparum*

Les cercles gris représentent les emplacements géographiques des populations analysées, la surface des cercles étant proportionnelle à la diversité génétique à l'intérieur de la population ( $\theta\pi$ ). La couleur de fond représente la force de la corrélation entre la distance géographique des différents isolats analysés et la diversité génétique, avec des nuances représentant des origines plus probables. L'origine la plus probable est indiquée par un point bleu. Sont également représenté les itinéraires de colonisation à partir de cette origine pour toutes les populations analysées.

L'insertion représente la corrélation entre la distance géographique et la diversité génétique pour l'origine la plus probable.

*II. Accès palustre a  
plasmodium falciparum,  
épidémiologie, physiopathologie,  
diagnostic biologique*

## **II.1. *Plasmodium falciparum*, épidémiologie, cycle parasitaire**

### **II.1.1. Epidémiologie de l'infection à *Plasmodium falciparum***

L'épidémiologie du paludisme dans le monde a beaucoup évolué dans les quinze dernières années, qu'il s'agisse du paludisme sévissant en zone tropicale ou du paludisme importé dans les zones non endémiques. Comme annoncé par la directrice de l'OMS, les progrès sont réels puisqu'un nombre croissant de pays sont sur le point d'éliminer le paludisme. En 2016, on considère 91 pays et territoires avec une transmission active du paludisme contre 105 en 2000 (1). Les diminutions les plus rapides ont été observées dans le Caucase et en Asie centrale, où aucun cas n'a été signalé en 2014, de même qu'en Asie de l'Est. Cependant, si l'objectif du millénaire a été atteint sans trop de difficultés, ceux de l'Assemblée mondiale de la Santé, réduire de 75% la charge du paludisme à l'horizon 2015, et du partenariat Roll Back Malaria, réduire pratiquement à zéro le nombre de décès dus au paludisme à l'horizon 2015, n'ont pas été atteints. En effet en 2015, 3,2 milliards d'individus sont soumis au risque palustre et l'OMS estime à 212 [148-334] millions le nombre de cas de paludisme dont plus de 90% dus à l'espèce *P. falciparum* et environ 8 % dus à *Plasmodium vivax* et quoique parfaitement évitable et traitable, à 429 000 [235 000-639 000] le nombre de décès (1). Les décès sont recensés à 92% en Afrique sub-saharienne et l'espèce *P. falciparum* est responsable dans 99% des cas. Les pays les plus pauvres sont les plus désavantagés. La République Démocratique du Congo et le Nigéria comptent à eux deux pour 40% des décès ! Ainsi, pour réaliser à terme l'objectif ambitieux qui consiste à éradiquer le paludisme. L'éradication du

paludisme se définit comme la réduction permanente à zéro de l'incidence mondiale de l'infection palustre causée par une espèce particulière de parasite. Dans cet objectif, l'OMS vient de relancer un nouveau plan de 15 ans, la « Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030 » qui a été adoptée par l'Assemblée mondiale de la Santé en mai 2015<sup>2</sup>. Les principaux objectifs sont de diminuer de 90 % le nombre de cas et la létalité à échéance 2030 par rapport à 2015 et d'éliminer le paludisme dans 35 nouveaux pays sans qu'il ressurgisse là où il a été éliminé (12). Pour l'OMS, un pays ou un territoire acquiert le statut de pays exempt de paludisme en quatre phases programmatiques distinctes : la maîtrise, la phase de pré-élimination, l'élimination, et la prévention de la réintroduction de la maladie. Dans les phases de maîtrise et pré élimination l'objectif principal de la lutte antipaludique est de réduire le nombre de cas et de décès en rendant les méthodes de prévention, les tests de diagnostic et le traitement accessibles à l'ensemble de la population à risque. Lors de la phase de pré-élimination, le paludisme n'est plus considéré comme un problème de santé publique important et les programmes se concentrent sur la réduction de la transmission du paludisme dans quelques régions données. Les interventions consistent à déceler tous les cas de paludisme, à prévenir la transmission ultérieure, à maîtriser les foyers de paludisme et à prendre en charge les cas importés. L'élimination est caractérisée par l'interruption de la transmission locale d'un parasite du paludisme spécifié dans une zone géographique définie. Ces dernières années, 6 pays ont été certifiés par l'OMS comme ayant éliminé le paludisme : les Émirats arabes unis (2007), le Maroc (2010), le Turkménistan (2010), l'Arménie (2011), les Maldives (2015) et le Sri Lanka

---

<sup>2</sup> [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA68/A68\\_R2-fr.pdf?ua=1](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_R2-fr.pdf?ua=1)

(2016). Des mesures continues sont nécessaires afin d'empêcher la réintroduction de la transmission. La rapidité des progrès dépend ; de la solidité du système national de santé, du niveau d'investissement consenti pour la lutte contre le paludisme, d'autres éléments incluant des facteurs biologiques et environnementaux, et les réalités sociales, démographiques, politiques et économiques de chaque pays. L'OMS estime qu'il manque encore plusieurs milliards de dollars annuels pour réaliser ces objectifs. Depuis 2006, le renouveau le plus spectaculaire a été la mise en place mondiale de combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (ACT), afin d'accélérer l'efficacité clinique et de contrer la sélection de résistance du parasite aux drogues les plus employées (chloroquine, sulfadoxine-pyriméthamine). Cependant, ces données doivent être nuancées. Le nombre de cas de paludisme recensés par l'OMS est estimé à partir des déclarations annuelles officielles de chaque pays. Or, les estimations de l'incidence fournies par les organismes correspondants du réseau de surveillance de l'OMS (qui recueillent 10-14 % des cas estimés de se produire à l'échelle mondiale) ne sont pas suffisamment documentées pour établir des tendances dans les principaux pays d'Afrique sub-saharienne (13). Plus préoccupant, l'OMS sous-estimerait de manière importante le nombre de cas de paludisme et les décès. En effet, des épidémiologistes modélisateurs et cartographistes cherchaient à corriger ces données en regroupant des résultats d'études contrôlées, des données climatiques et démographiques : ils aboutissaient à des évaluations moins favorables que celles de l'OMS. En février 2012, une étude de grande envergure de ce type paraît dans le Lancet et soulève l'étonnement : Murray et ses collaborateurs estiment qu'il y aurait eu en 2010 presque deux fois plus de morts attribuables au paludisme que ne l'estime

l’OMS : 1,24 million et non 655 000 ! Ceci concerne davantage les sujets de plus de 5 ans (14). Dans nombre de pays touchés, essentiellement en Afrique, les troubles sociaux, les conflits et les catastrophes humanitaires sont des obstacles majeurs à la réalisation des objectifs fixés. La lutte contre les insectes vecteurs est en perte de vitesse, en Afrique subsaharienne, 278 millions de personnes sur une population totale à risque de 840 millions vivent dans un foyer sans moustiquaire (13). De plus, les anophèles, insectes vecteurs de la maladie et les parasites du paludisme développent des résistances contre les molécules utilisées contre eux. Encore plus inquiétant, certains *Anopheles gambiae* se s’adaptent progressivement au milieu urbain pollué et semblent augmenter la prévalence, classiquement faible, du paludisme, dans les grandes villes d’Afrique. Cette capacité d’adaptation sélective existe indépendamment de l’acquisition des résistances aux insecticides utilisés pour imprégner les moustiquaires. Sans réelle surprise, la résistance aux dérivés de l’artémisinine a été acquise à l’Ouest du Cambodge par des isolats de *P. falciparum*, à faible diversité et haute capacité mutante qui ont subi successivement la sélection de tous les antipaludiques depuis 1945. Elle a ensuite diffusé en Asie du Sud-Est (10)(13, 15). Le paludisme à *P. vivax* a été réintroduit en Grèce entre 1999 et 2012 (16). Une espèce de paludisme d’origine simienne, *Plasmodium knowlesi*, est à l’origine d’une épidémie en voie d’extension chez l’Homme en Asie (17, 18). Elle est responsable d’accès graves et de décès. Par ailleurs, si le paludisme n’est plus endémique dans de nombreux pays industrialisés, il continue de poser des défis en matière de diagnostic et de prise en charge. La maladie est essentiellement importée par des voyageurs ou des migrants en provenance de zones endémiques. La France métropolitaine est le pays d’Europe de l’ouest

qui recense le plus grand nombre de cas de paludisme d'importation. Pour la période 2000-2015, un total de 43 875 cas de paludisme a été déclaré au Centre national de référence (CNR) du Paludisme par les correspondants du réseau métropolitain. Le nombre de cas de paludisme d'importation a été estimé à environ 82 000 cas pour la période. Les pays de contamination sont majoritairement situés en Afrique subsaharienne (95 %), stables sur la période. Ils surviennent principalement chez des sujets d'origine africaine (70 %), résidant en France ou arrivant d'Afrique, en augmentation marquée entre 2000 (63 %) et 2015 (79 %) et ils sont dus en majorité à l'espèce *P. falciparum* (85 %), en augmentation entre 2000 (83 %) et 2015 (87 %). Pour les autres espèces, *Plasmodium ovale* vient en seconde position (7 %), stable sur la période, puis *P. vivax* (5 %), en diminution entre 2000 (5 %) et 2015 (2%) puis *Plasmodium malariae* en légère augmentation entre 2000 (2,4 %) et 2015 (3,1). Les principaux pays de contamination, sont situés en Afrique subsaharienne, par ordre décroissant la Côte d'Ivoire, le Cameroun, le Mali et le Sénégal. Le nombre et la proportion des formes graves 2733 (6,4 %) sont en augmentation sur la période, passant de 84 cas (2,1 %) en 2000 à 295 cas (12,4 %) en 2015. Un total de 172 décès est déclaré, soit une létalité de 0,4 % sur l'ensemble des cas, stable sur la période. Le traitement par artésunate intraveineux, mis à disposition en France depuis 2011 grâce à une ATU nominative, est recommandé par le Haut Conseil de la Santé Publique en remplacement de la quinine intraveineuse en 2013<sup>3</sup> (19). Il est maintenant le traitement le plus prescrit pour la prise en charge des accès graves, dans plus de 75 % des cas. Si le taux d'incidence des cas de paludisme importés en France métropolitaine a diminué de 70 % sur la période alors que celui de la

---

<sup>3</sup> <http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=310>

létalité a chuté de près de 60 %, en valeur absolue, les cas de paludisme d'importation sont cependant en progression de plus de 30 % entre 2011 et 2015. Le nombre des voyageurs vers les zones d'endémie palustres qui augmente régulièrement sur la période, passant de 2,6 millions en 2000 à 5,4 millions en 2015 et une moins bonne adhésion aux recommandations de prévention sont des causes avancées pour expliquer ce phénomène.

**Tableau 1. Epidémiologie du paludisme en 2000-2015 les points clés**

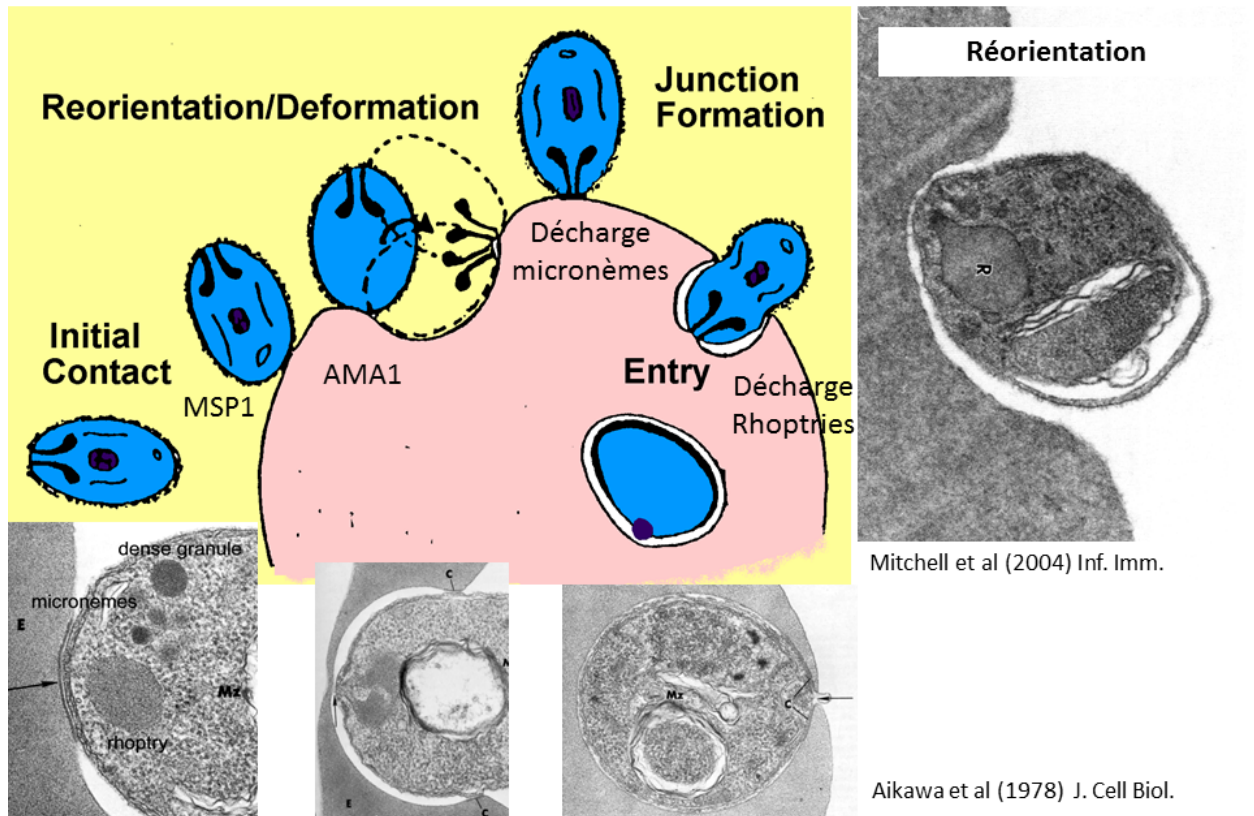
3,2 milliards de personnes exposées au niveau mondial en 2015,
Transmission dans 91 pays ou territoires en 2015 contre 214 en 2000,
212 millions de cas et 429 000 décès au niveau mondial,
En 2000-2015 : diminution de 41% de l'incidence mondiale et de 62% des décès,
Les décès sont recensés à 92% en Afrique sub-saharienne et l'espèce <i>P. falciparum</i> est responsable dans 99% des cas
Probablement plus de cas et de décès qu'estimé par l'OMS
Emergence d'anophèles résistants à plusieurs classes insecticides,
Emergence de parasites résistants aux associations à base d'artémisinine,

### **II.1.2. *Plasmodium falciparum*, le cycle parasitaire, les étapes clés**

Après un repas sanguin infectant et l'ingestion par l'anophèle de gamétocytes matures mâles et femelles, a lieu en quelques minutes, dans l'estomac du moustique, la fusion des gamètes avec production d'un œuf mobile, l'ookinète. La reproduction du parasite à lieu chez l'anophèle femelle, qui est donc l'hôte définitif de ce cycle à 2 hôtes (Figure 3). Cet œuf traverse activement la paroi de l'estomac du moustique pour s'implanter sur la face externe dans la cavité cœlomique. Se produisent alors une première division

méiotique suivie de divisions mitotiques. Les sporozoïtes issus de cette reproduction migrent vers les glandes salivaires du moustique et sont injectés à l'homme, quelques dizaines, lors du repas sanguin de l'anophèle. Suivent chez l'Homme, hôte intermédiaire, deux cycles de reproduction asexués (mitotiques) sur le mode d'une schizogonie. Amplification du matériel nucléaire puis division binaire asynchrone sans division cytoplasmique jusqu'à l'arrêt des mitoses. Un premier cycle schizogonique a lieu dans les hépatocytes qui sont envahis par les sporozoïtes. Il est totalement asymptomatique et il dure 7 jours in vitro pour *P. falciparum*. Arrivés à maturité, les schizontes hépatiques libèrent par paquets, dans le flux sanguin, les mérozoïtes qui vont envahir les érythrocytes. Toutes ces étapes sont spécifiques et font intervenir des mécanismes particuliers sélectionnés tout au long de la co-évolution entre les populations du parasite et de ses 2 hôtes. Par exemple le phénomène d'invasion cellulaire propre aux *Apicomplexa* est mis en œuvre à 2 étapes cruciales de l'infection chez l'Homme. Par le sporozoïte lors de la pénétration des cellules hépatiques et par le mérozoïte lors de l'invasion du globule rouge. Cette étape est très spécifique et elle fait intervenir des mécanismes complexes de reconnaissance et d'intégration du parasite dans la cellule hôte (Figure 2). Par exemple, lors de l'invasion du GR par le mérozoïte, on peut schématiquement distinguer six étapes 1/ le premier contact au cours duquel le mérozoïte roule et s'accroche au GR cible qu'il reconnaît grâce à des protéines de surface les « merozoïte surface proteins 1 » MSP-1 2/ il s'oriente avec son pôle apical en contact avec la membrane de la cellule hôte grâce à l'action des protéines AMA-1 3/ survient alors la jonction avec la cellule hôte avec décharge des micronèmes et expression de protéines d'adhésion 4/ puis la décharge des rhoptries et la formation de la vacuole

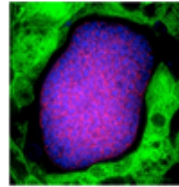
parasitaire par réarrangement des protéines de la membrane de l'hôte et formation du complexe de « jonction mobile » (RON2/AMA-1) 5/ entrée du parasite dans le GR, médiée par le complexe actine-myosine "glidosome" et enfin 6/ fermeture de la membrane de la vacuole du parasite et de la membrane de l'érythrocyte. L'ensemble du processus prend environ 20 secondes (20). Après que le mérozoïte ait infecté le globule rouge, il prend le nom de trophozoïte. Le trophozoïte pour sa croissance ingère l'hémoglobine dans une vacuole digestive et libère lors de la digestion les molécules d'hème. Le fer étant toxique pour lui, il agrège ces molécules ferriques en les entourant de protéines néo synthétisées pour former un pigment brun insoluble, l'hémozoïne. Le nombre et la taille de ces pigments d'hémozoïne dépendent du stade de développement du parasite dans le GR. Plus le parasite est âgé, plus il est volumineux, plus il y a de grains d'hémozoïne et moins le cytoplasme du GR est coloré.



*Figure 2. Principales étapes de l'invasion de l'érythrocyte par le mérozoïte (d'après Tonkin 2011 ; Mitchell 2004 et Aikawa 1978)*

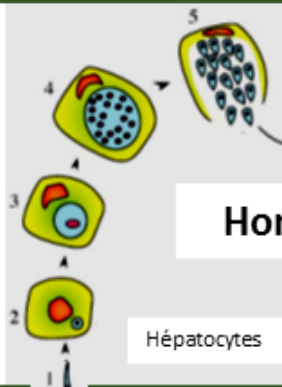
## Phase hépatique

- 1 Sporozoïte
- 2,3 Trophozoïte
- 4 Schizonte jeune
- 5 Schizonte mature



40 000 mérozoïtes par schizonte

Durée 7-12j

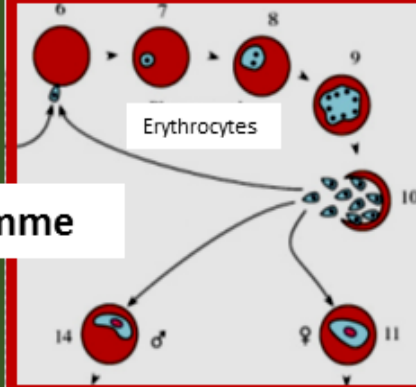


Hépatocytes

Homme

## Phase sanguine

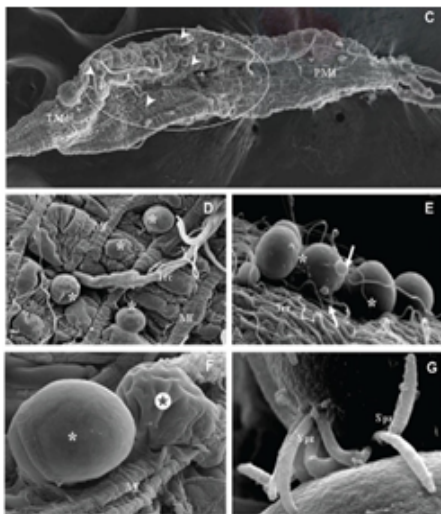
- 6 Mérozoïte
- 7 Trophozoïte
- 8 Schizonte jeune
- 10 Schizonte mature
- 11 Gamétoocyte femelle
- 14 Gamétoocyte mâle



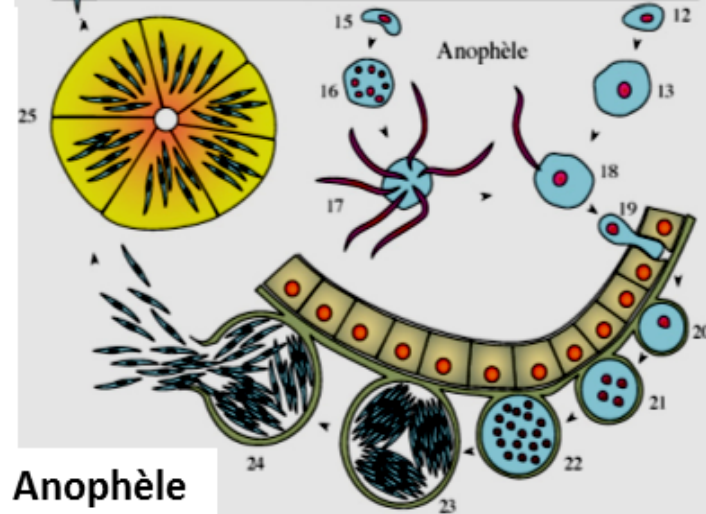
Erythrocytes

16-32 mérozoïtes par schizonte

Durée 48h



C-F Maturation des Oocystes  
G Libération des sporozoïtes



- 12,13 Gamètes femelles
- 15,16 Gamètes mâles
- 18 Fusion des gamètes
- 19 Ookinète
- 20-24 Oocyste
- 23 Sporoblastes
- 24,25 Sporozoïtes

Durée 13j à 25°C

Durée 30j à 20°C

Anophèle

Figure 3. Cycle vital de *Plasmodium falciparum*

## **II.2. Physiopathologie de l'infection à *Plasmodium falciparum***

### **II.2.1. La physiopathologie de l'accès simple**

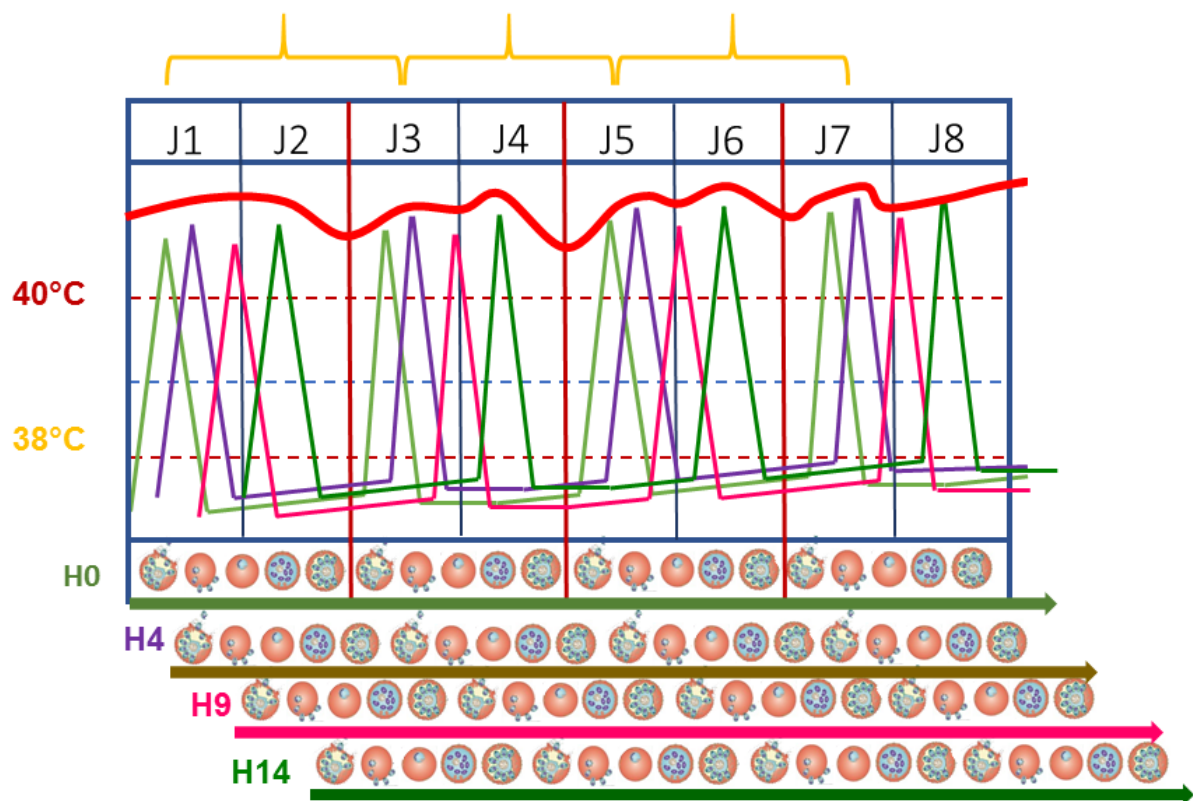
La clinique de l'accès palustre est décrite dans de nombreux ouvrages de référence. Après une période d'incubation silencieuse correspondant à la phase hépatique, variable en fonction des espèces mais jamais inférieure à une semaine (7 à 12 jours pour *Plasmodium falciparum*), débute la phase d'invasion caractérisée par l'apparition d'une fièvre le plus souvent continue ou irrégulière, plus rarement rythmée. Elle est fréquemment, associée à des céphalées, des arthralgies des myalgies, mais également des troubles digestifs « embarras gastrique fébrile ». L'examen clinique est le plus souvent normal à ce stade, en particulier pas d'hépatomégalie ni de splénomégalie. L'évolution spontanée est souvent marquée par l'augmentation de volume de ces deux organes les jours suivants.

La présentation clinique d'un accès palustre simple ne présente donc aucune spécificité permettant d'orienter le diagnostic. Le risque pour le clinicien étant de passer à côté du diagnostic si la notion de voyage ou séjour en zone de transmission n'a pas été recueillie au moment de l'anamnèse. L'évolution sans traitement peut rapidement aboutir à un accès grave voir au décès du patient. Ainsi « *toute fièvre, toute symptomatologie, chez un patient de retour de zone d'endémie palustre est un paludisme jusqu'à preuve du contraire.* » (21)Gentillini 6<sup>e</sup> édition ou Anofel).

L'étude des mécanismes de la physiopathologie de l'accès palustre nous apprend que la fièvre est déclenchée lors de l'éclatement des schizontes matures relargant les mérozoïtes dans sang circulant, par la libération de

molécules pro-inflammatoires produites par le parasite. Il s'agit principalement de l'hémozoïne et du glycosylphosphatidylinositol.

La durée d'un cycle érythrocytaire de *P. falciparum* étant de 48H, le profil de fièvre attendue est celui d'une fièvre rythmée (fièvre tierce). Ce profil ne correspond pas aux profils principalement observés lors de la primo invasion (Cf supra fièvre continue ou irrégulière). La libération des molécules pro-inflammatoires est donc réalisée de manière continue ou irrégulière. De fait, les mérozoïtes de première génération sont expulsés du foie de manière décalée (le développement des schizontes hépatiques n'est pas synchrone). Ainsi le profil de la fièvre observé est la résultante de ce phénomène (Figure 4).



*Figure 4. Physiopathologie de l'accès simple, profil de la fièvre.*

La consommation de l'hémoglobine par le parasite associée ou non à des phénomènes d'hémolyse globulaire, est en partie responsable de la survenue d'une anémie d'apparition progressive, avec un impact clinique plus marqué chez les jeunes enfants et les femmes enceintes. On observe généralement une thrombopénie secondaire à des phénomènes de margination et de séquestration dont les mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés.

La rate joue un rôle dans le contrôle de l'infection palustre, à la fois mécanique et immunologique. Elle va séquestrer et détruire les hématies parasitées les moins déformables (phénomène mécanique), et détruire les hématies marquées par des anticorps spécifiques (phénomène immunologique). Elle participe donc activement au contrôle de la maladie mais elle peut aussi aggraver l'anémie. Pour *P. falciparum*, elle retient dans une faible proportion les hématies contenant des parasites jeunes (trophozoïtes) et très efficacement les hématies contenant des parasites âgés (schizontes).

Pris en charge suffisamment tôt et correctement traité, l'accès simple évolue vers la guérison. À l'inverse, en cas de prise en charge retardée, ou de traitement inadapté, l'état clinique du patient peut se dégrader de manière souvent brutale, et évoluer vers le décès. Si toutes les espèces peuvent être responsables d'accès graves, voire de décès, c'est l'espèce *P. falciparum* qui est responsable de la grande majorité des évolutions défavorables.

## II.2.2. La physiopathologie de l'accès grave

De nombreuses théories ont été avancées pour expliquer ce phénomène : des mécanismes inflammatoires et immunologiques, l'apoptose, des microhémorragies, le choc et l'acidose, l'hypoglycémie, l'atteinte neurologique... Cependant aucune d'entre elles ne rend compte de l'ensemble des manifestations observées et la genèse de l'accès grave demeure encore très confuse. Les ouvrages de références ne sont pas d'un grand secours et la confusion est entretenue par une grande encyclopédie en ligne<sup>4</sup>

Pour cette infection, au cours de l'évolution de l'accès grave, les éléments presque constamment présents sont des signes neurologiques (d'une simple confusion au coma profond), et au plan biologique, une acidose lactique secondaire à une glycolyse anaérobie (élévation du ratio lactate/pyruvate). Récemment a été mis en évidence une diminution de perfusion dans la microcirculation tissulaire. Correctement traité, la guérison se fait généralement sans séquelles.

Deux éléments majeurs rendent compte de cette évolution : l'importance de la charge parasitaire et un phénomène propre à *P. falciparum*, la cytoadhérence.

### La charge parasitaire

Plus elle est élevée, plus le risque de paludisme grave et de décès sont élevés. Le lien entre la charge parasitaire et la gravité de l'accès est depuis longtemps établie en zone d'endémie et hors zone d'endémie (21-23). Pour les décès, dans une étude de cohorte de 400 patients de réanimation avec un accès

---

<sup>4</sup>

[https://fr.wikipedia.org/wiki/Paludisme#Acc.C3.A8s\\_palustres\\_graves\\_.C3.A0\\_Plasmodium\\_falci\\_parum](https://fr.wikipedia.org/wiki/Paludisme#Acc.C3.A8s_palustres_graves_.C3.A0_Plasmodium_falci_parum)

palustre grave, Fabrice Brunneel et collaborateurs identifient 3 facteurs de risque indépendants prédictifs pour la mortalité à l'admission des patients : l'âge, avec un odd ratio (OR)x 1,72 par 10 ans d'âge supplémentaire ; le score de Glasgow, avec un OR x1,32 par diminution de 1 point ; et l'élévation de la parasitémie avec un OR x1,41 par augmentation de 5% de parasitémie (Figure 5) (24).

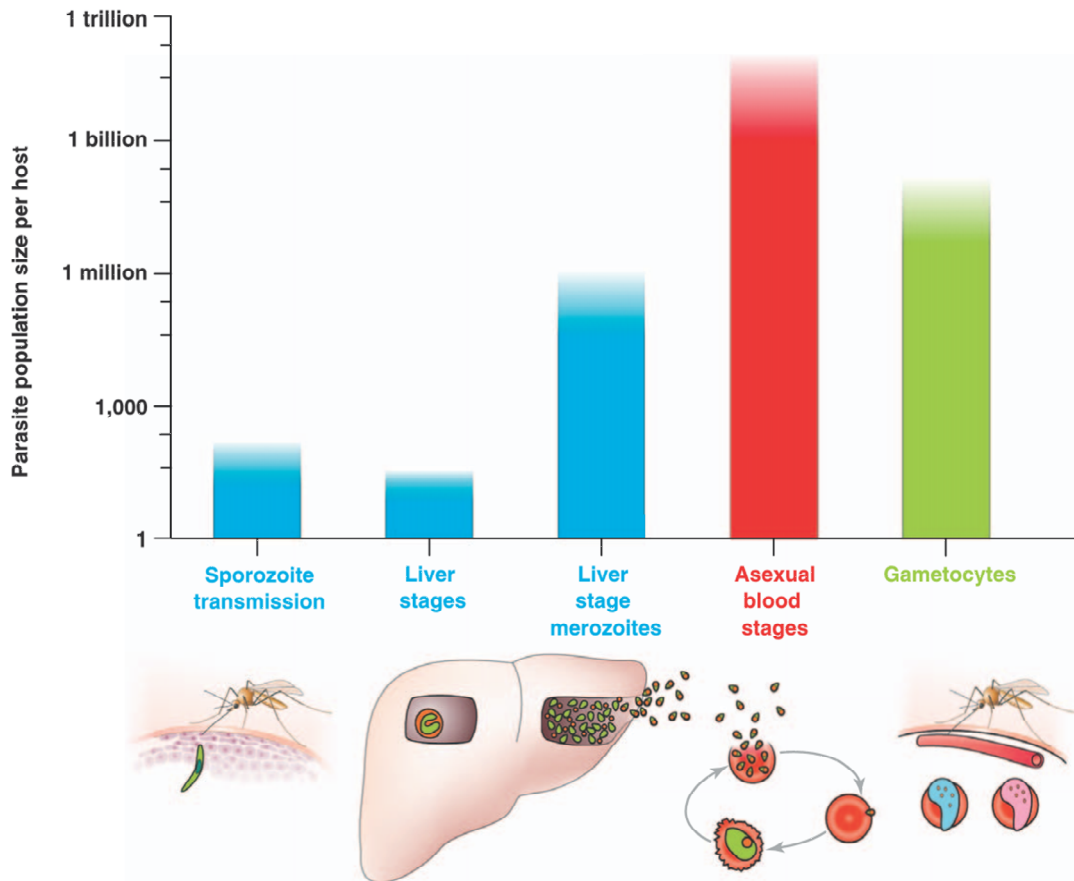
**Table 6.** Independent predictors of death at intensive care unit admission in the 400 patients.

	N	OR (95%CI)	P value
Age (per 10-year increment)	400	1.72 [1.28–2.32]	0.0004
Glasgow Coma Scale score (per 1-point increment)	400	1.32 [1.20–1.45]	<0.0001
Parasitemia (per 5% increment)	400	1.41 [1.22–1.62]	<0.0001

R<sup>2</sup> of the model: 0.90.  
OR, odds ratio; 95%CI, 95% confidence interval.

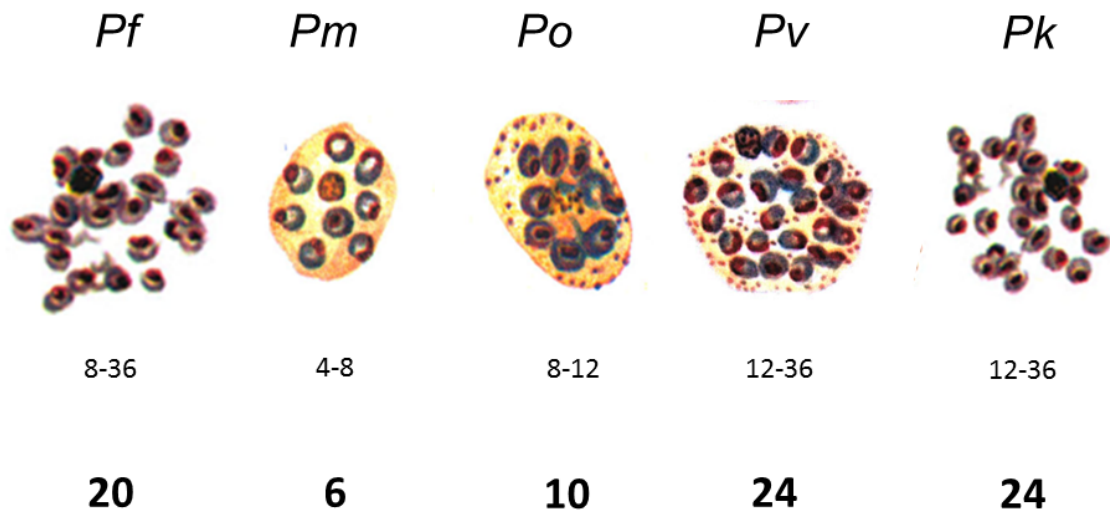
*Figure 5. Facteurs de risque de décès du paludisme grave en réanimation en France d'après une étude de cohorte de 400 cas graves chez des adultes (Fabrice Brunneel et Coll. PLoS one 2010)*

Au cours du cycle vital de *P. falciparum* la charge parasitaire est très faible lors de la phase d'invasion correspondant à la schizogonie hépatique, moins d'une centaine de sporozoïtes injectés. Elle va ensuite augmenter d'une manière exponentielle lors schizogonie érythrocytaire pendant la phase d'état (Figure 6).



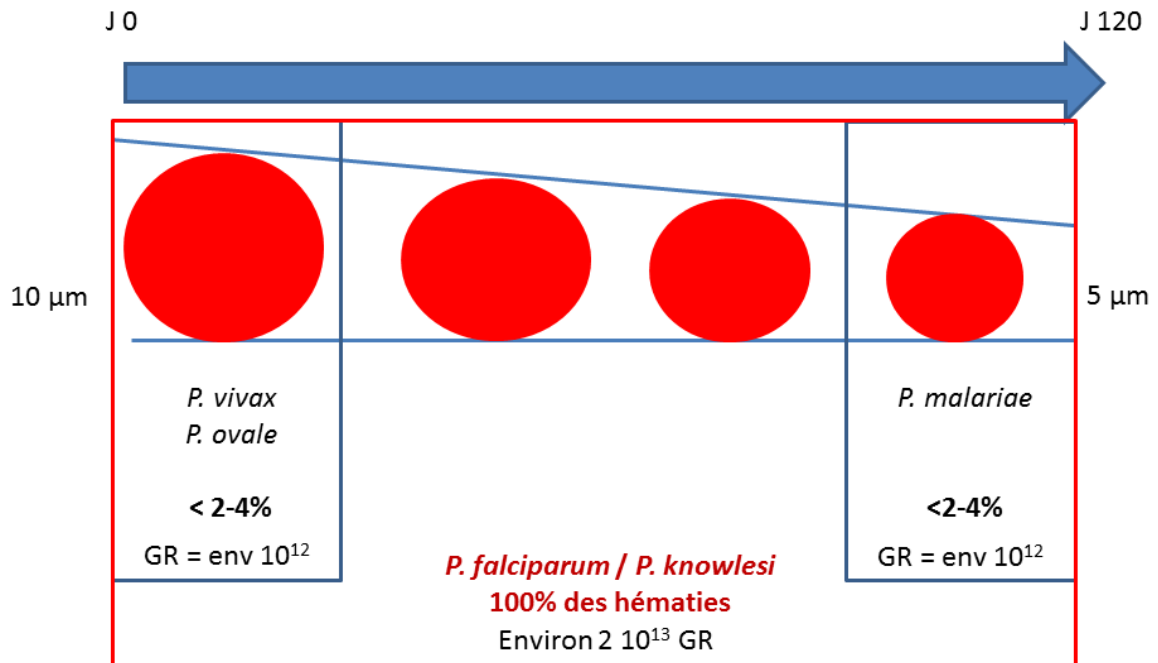
*Figure 6. Evolution de la charge parasitaire en fonction du stade de développement  
(Extrait de Borrmann, S. 2011).*

Pour l'espèce *P. falciparum*, chaque mérozoïte entrant dans une hématie, produit en moyenne 20 mérozoïtes au bout de 48 heures (Figure 7).



*Figure 7. Production des mérozoïtes par cycle érythrocytaire (Modifié de Planches de l'OMS, Marc Thellier)*

Contrairement à d'autres espèces (*P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*), l'ensemble des hématies sont compatibles pour l'infection à *P. falciparum* environ  $2 \cdot 10^{13}$  (Figure 8).



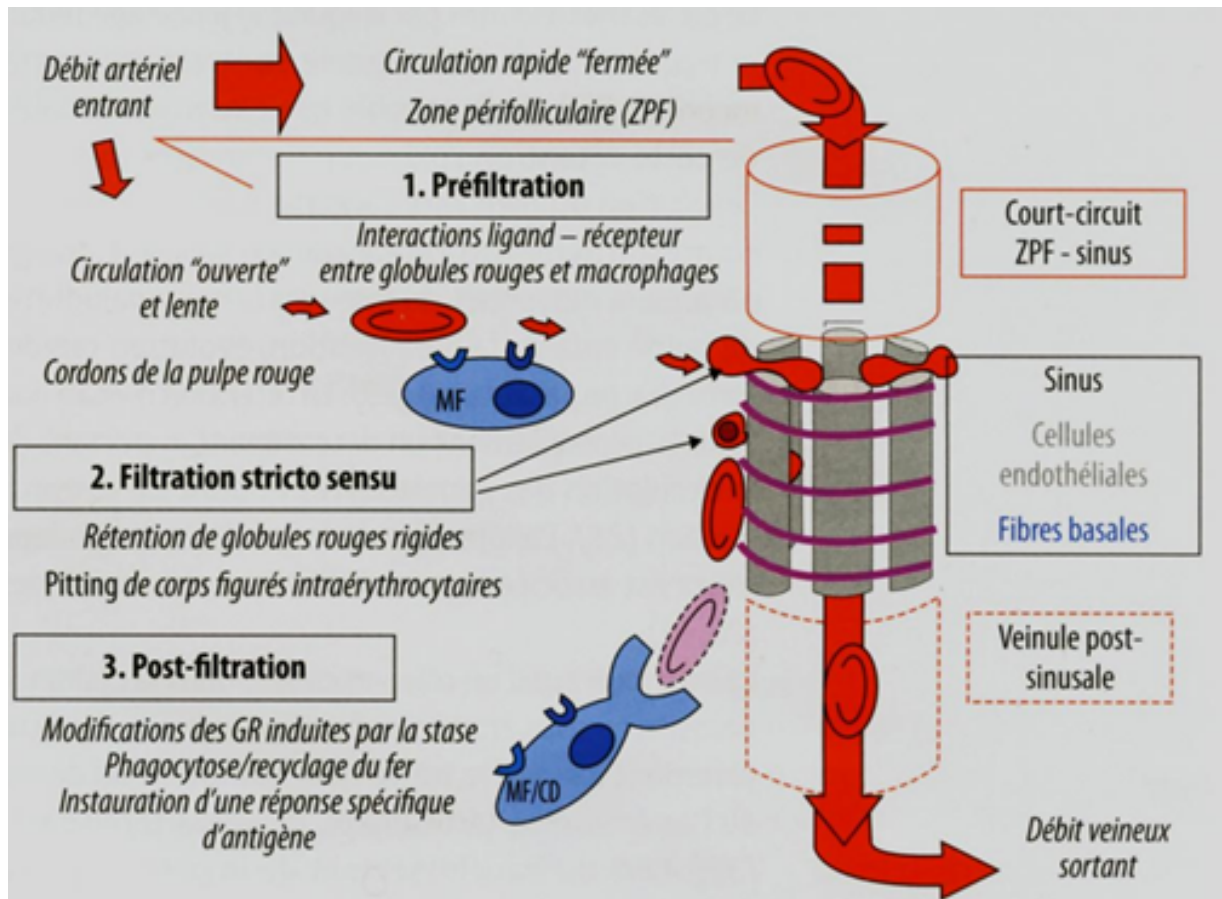
**Figure 8. Age des hématies et compatibilité avec les infections par les différents plasmodiums humains (Schéma Marc Thellier)**

Un certain nombre de mécanismes de contrôle de l'hôte interviennent pour limiter l'expansion parasitaire. Les principaux sont un filtre mécanique des hématies parasitées dans la rate, la réaction immunitaire innée et acquise.

D'autres facteurs d'hôte jouent un rôle parfois crucial, il s'agit des facteurs d'ordre génétiques comme le groupe sanguin ou le HLA. Ils ne seront pas développés dans cette thèse.

## Le filtre mécanique de la rate

Il est décrit dans l'article de Buffet et collaborateurs dans la revue *Blood* en 2011 (25) (Figure 9).



*Figure 9. Structure schématique et organisation de l'unité fonctionnelle filtrante splénique (Extrait de Buffet et coll. Blood 2011)*

Brièvement, le sang artériel entrant dans la rate est dirigé dans deux types de circulations. Une circulation rapide « fermée » dans la zone périfolliculaire, environ 90% du volume. Elle correspond à la circulation classique de la vascularisation des organes (artère vers veine via le réseau capillaire). Une

circulation lente « ouverte », dans la pulpe rouge (cordons de Billroth), dans des espaces dépourvus d'endothélium, qui correspond à la zone de filtration. Ceci est une particularité splénique, la circulation y est 20 fois plus lente que dans la circulation rapide, ce qui permet aux globules rouges d'interagir avec les macrophages qui constituent environ la moitié du volume des cordons et les lymphocytes : c'est l'étape de préfiltration. Les érythrocytes (7  $\mu\text{m}$ ) doivent ensuite franchir la paroi sinusale, en passant à travers des fentes inter-endothéliales ( $< 1\mu\text{m}$ ) pour atteindre la circulation générale. Cette étape met en exercice les propriétés mécaniques de déformabilité des globules rouges, c'est la filtration *stricto sensu*. Les globules rouges retenus lors de la première et deuxième étape, bloqués en amont ou dans les fentes inter-endothéliales, sont détruits au cours de l'étape dite de post-filtration, probablement par phagocytose. Ceci permet à la fois d'éviter la saturation splénique, et d'instaurer une réponse spécifique d'antigène (immunité acquise par présentation d'antigène) tout en recyclant le fer. Certains globules rouges parasités par *P. falciparum*, moins déformables ou présentant des structures antigéniques ciblées par le système immunitaire (PfEMP1) sont retenus et détruits lors de ce processus.

### **La réaction immunitaire, innée, l'inflammation**

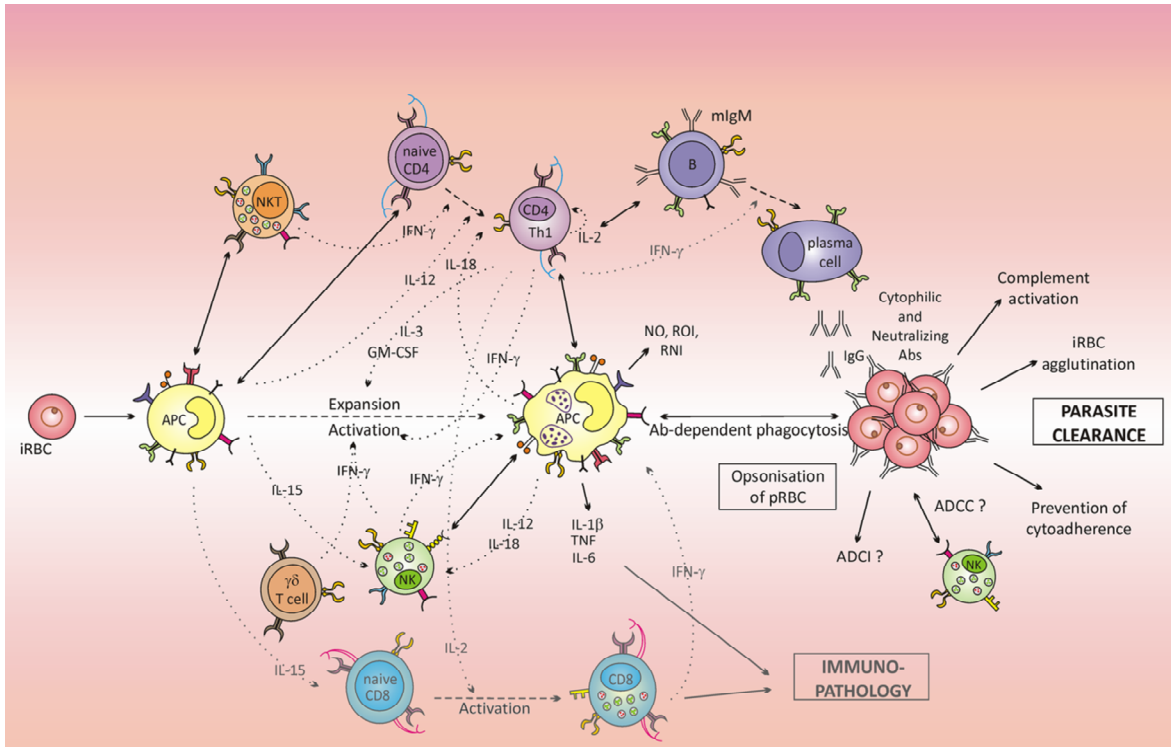
Lors d'une primo infection, des mécanismes immunitaires jouent un rôle dans le contrôle de la charge parasitaire. En effet, l'immunité innée est déclenchée dès les premières heures de l'infection, impliquant les monocytes, les neutrophiles et les cellules NK. L'activation endothéliale induit la production de cytokines, qui activent les neutrophiles, recrutent les monocytes qui se différencient en macrophages. L'immunité adaptative intervient dans les 10

jours qui suivent l'infection. La rate joue un rôle central dans la mise en place de ces mécanismes (26) (27). La défense immunitaire innée, si elle n'est pas capable de stopper l'infection, permet de limiter l'augmentation de la charge parasitaire à la phase aiguë. L'immunité adaptative est activée secondairement lorsque les cellules présentatrices d'antigènes délivrent des antigènes palustres aux lymphocytes T naïfs. Les cellules T une fois activées participent à la production d'anticorps spécifiques par les cellules B. D'autres lymphocytes libèrent des cytokines. La réponse globale est en général suffisante pour contrôler et stopper l'infection. Cependant, dans certains cas une réponse immunitaire trop violente peut être responsables de lésions tissulaires. A l'inverse, la réponse immunitaire peut être contrebalancée par un phénomène d'évasion parasitaire (28).

Le principal élément de la réponse immunitaire innée correspond à un mécanisme d'élimination directe du parasite (mérozoïtes), des globules rouges parasités (GRP), du pigment malarique par phagocytose. Les cellules immunes impliquées sont des monocytes, des macrophages, des polynucléaires neutrophiles et des cellules dendritiques. La phagocytose survient principalement dans la rate et le foie. Les monocytes sont produits massivement et recrutés à partir de la moelle osseuse. Ils augmentent ainsi le nombre de macrophages et de cellules dendritiques. Chez les enfants infectés par *P. falciparum* le niveau d'expression de certaines populations de macrophages (CD16/FcγRIIIA par exemple) est corrélé avec la production de TNF et l'erythrophagocytose (29). De plus le système de complément est activé. Il produit des particules solubles qui agissent comme des opsonines qui favorisent la phagocytose.

Les phagocytes, monocytes/macrophages et les cellules dendritiques utilisent des récepteurs spécialisés, par exemple CD36, qui détectent les protéines parasitaires à la surface des mérozoïtes et des GRP. Lors de la phagocytose, une activation transcriptionnelle des cytokines associées à l'inflammation est générée lors d'un « burst » oxydatif pour tuer les parasites. A la suite de la sécrétion de certaines interleukines, IL-12, IL-15 et IL-18, d'autres cellules du système immunitaire inné, les cellules NK, les cellules T  $\gamma\delta$  et les cellules T NK sont activées et commencent à sécréter des quantités élevées de cytokines, y compris l'IFN- $\gamma$  nécessaire pour mobiliser et activer encore davantage de cellules et améliorer les processus phagocytaires. En outre, les cellules présentatrices d'antigènes digèrent et présentent des antigènes parasitaires dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II qui peuvent activer les réponses adaptées aux lymphocytes T et B. L'interféron gamma, produit par des cellules NK, des cellules T  $\gamma\delta$ , T  $\alpha\beta$  et des cellules T-NK, semble jouer un rôle majeur à cette étape de l'infection. Il stimule en particulier la différenciation Th1 et la production d'anticorps spécifiques (Acs) par les cellules B pour générer une forte réponse antiparasitaire. L'opsonisation Acs avec le dépôt du complément accélère la reconnaissance des GRP par les phagocytes, tandis que d'autres Acs entravent l'invasion et la séquestration des GRP sur les cellules endothéliales vasculaires ou provoquent une dégénérescence des parasites intra-érythrocytaires. Les parasites sont finalement éliminés du sang, à moins que les mécanismes d'échappement soient mis en place de façon efficace par le parasite. Un mécanisme majeur pour le parasite est sa capacité à produire de la variation antigénique en modifiant la composition de ses protéines de surface.

Certaines cytokines IL-1 $\beta$ , TNF et IL-6, principalement produites par des cellules phagocytaires, provoquent de la fièvre. Lorsqu'elles ne sont pas contrôlées par des mécanismes anti-inflammatoires efficaces, elles peuvent causer des dommages collatéraux aux tissus. Il est ainsi admis que la production de médiateurs et cytokines pro-inflammatoires et la régulation à la hausse des molécules d'adhésion des cellules endothéliales jouent un rôle important dans la pathogenèse du paludisme (30). Les cellules T-CD8 dirigées spécifiquement contre le parasite sont également activées pendant l'infection par présentation croisée d'antigènes parasitaires dans le contexte du CMH de classe I, pouvant ainsi provoquer une pathologie auto-immune. Des phénomènes d'inhibition cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCI des anglo-saxons) ou de cytotoxicité cellulaire Ac dépendante (ADCC des anglo-saxons) sont alors mis en évidence (Figure 10).



**Figure 10. Mécanismes du contrôle immunitaire lors d'une infection palustre (extrait de Deroost, K. FEMS Microbiology Reviews 2015)**

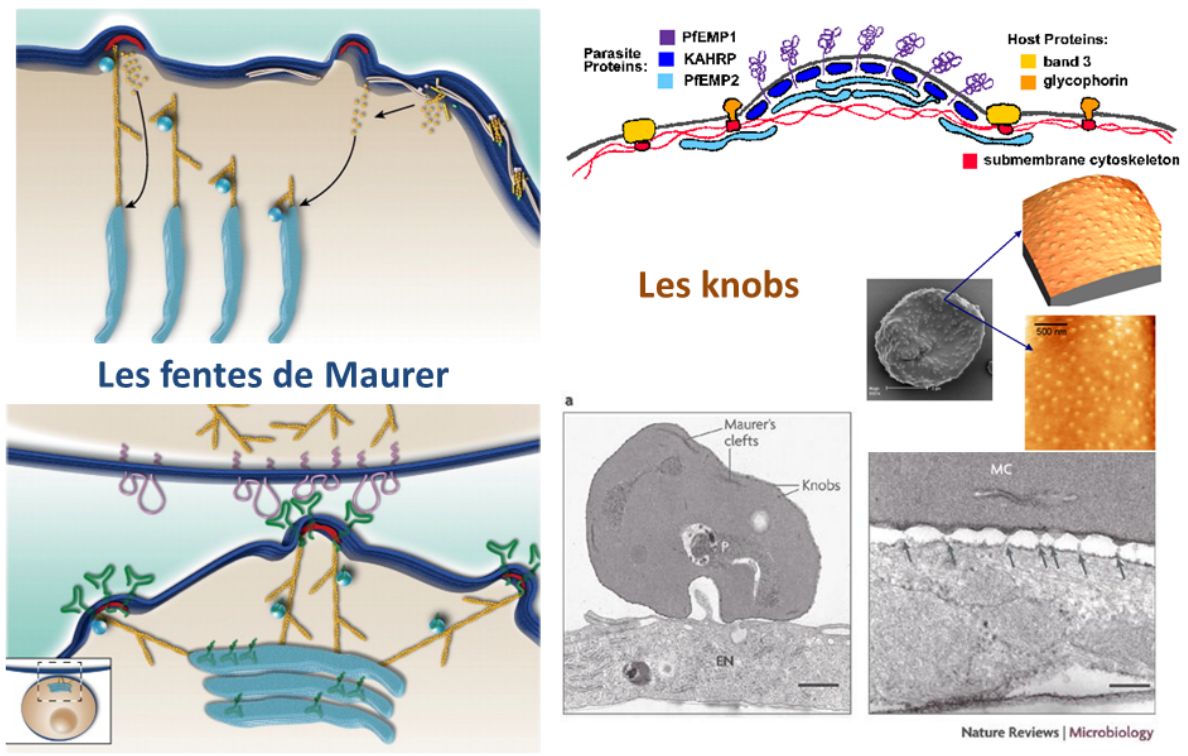
L'évolution clinique d'un accès palustre dépend au final de l'équilibre entre la croissance du parasite et les mécanismes de contrôle innés. Une réponse insuffisante de l'hôte ou des mécanismes d'échappement du parasite peuvent conduire à une augmentation très rapide de la charge parasitaire. Cela provoque des perturbations métaboliques, une pathologie sévère et même la mort. En revanche, lorsqu'une réaction immunitaire exagérée est induite, cela

entraîne une inflammation non contrôlée responsable de troubles métaboliques puis de dégâts tissulaires pouvant de la même manière aboutir à une pathologie sévère et à la mort, même si la charge parasitaire est faible. Comme souvent en infectiologie, l'évolution d'une infection aigue est la résultante d'une balance entre la virulence de l'agent pathogène et l'importance de la réponse immunitaire.

### **Le mécanisme d'échappement du parasite impliqué dans la gravité : la cytoadhérence**

L'examen en microscopie optique du sang des sujets infectés par *P. falciparum*, ne permet d'observer qu'un seul stade parasitaire de la schizogonie : le trophozoïte. Les stades plus âgés, vieux trophozoïtes, schizontes sont, sauf exception, absents du flux circulatoire. En effet, les hématies parasitées par les stades trophozoïtes âgés et schizontes de *P. falciparum* ont, contrairement aux autres espèces, la capacité de se fixer aux cellules endothéliales des capillaires (cerveau, avec risque de coma par neuropaludisme, mais aussi reins, foie, poumons...). Cette séquestration est due à des phénomènes d'adhérence cellulaire (cytoadhérence) entre les hématies parasitées et les cellules endothéliales vasculaires. Elle est sous la dépendance d'interactions entre des ligands moléculaires plasmodiaux présents à la surface des hématies parasitées et des contre-ligands spécifiques des cellules endothéliales. Le ligand principal de *P. falciparum* est la protéine 1 érythrocytaire (PfEMP1) codé par une famille de gènes var répartis dans l'ensemble du génome du parasite (31-33). PfEMP1 est ancré à la protéine ankyrine du cytosquelette de l'érythrocyte par sa liaison à la protéine KHARP, stabilisée par PfEMP3 (34). Cela peut être visualisé en microscopie

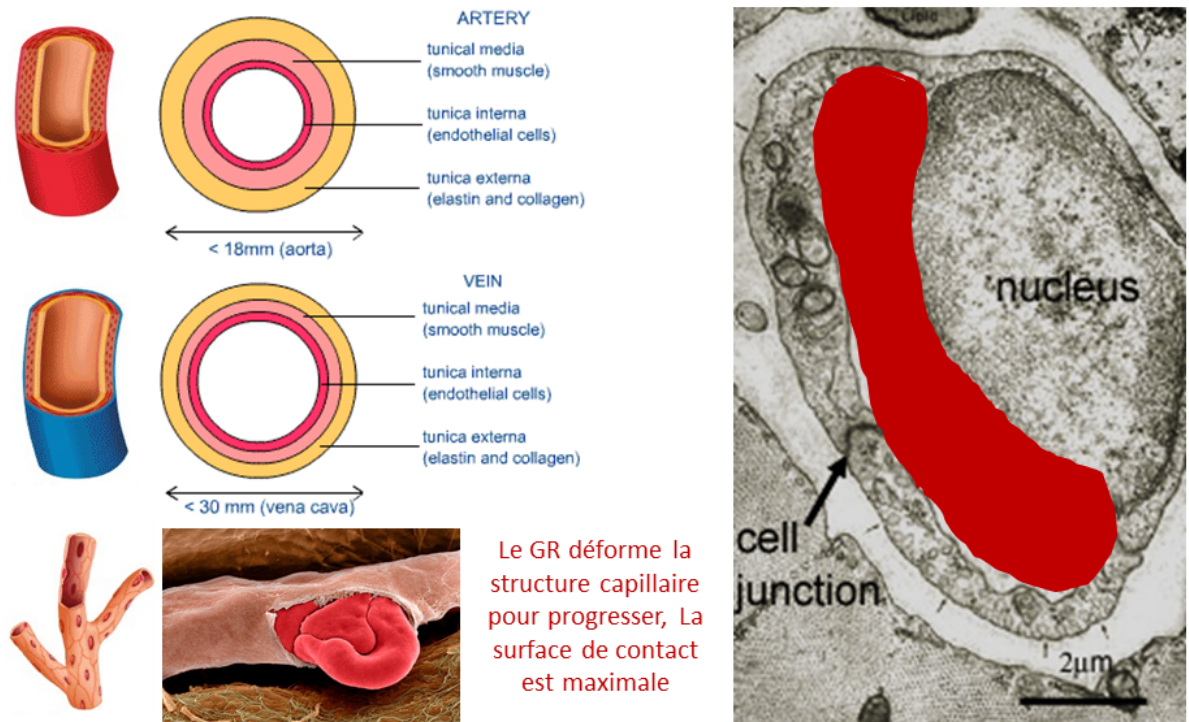
électronique comme des "boutons" (knobs en anglais) qui forment les points de fixation avec des contre-ligands présents sur les cellules endothéliales vasculaires (Figure 12). Les principaux contre-ligands présents à la surface des cellules endothéliales vasculaires sont le CD36 et ICAM-1. Le CD36 est présent sur toutes les cellules endothéliales vasculaires. Il reconnaît de nombreux ligands dont le collagène, les acides gras à longues chaînes, certaines lipoprotéines, des microparticules, les drépanocytes, PfEMP1. La molécule ICAM-1 fait partie de la superfamille des immunoglobulines. Il reconnaît le LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) sur les lymphocytes et permet leur extravasation. L'expression de ICAM-1 serait up-régulée par le TNF $\alpha$ . Il a été montré que certains variants génétiques favorisent la cytoadhérence et la gravité de l'accès palustre tel ICAM-1<sup>kilifi</sup> au Kenya (35) (36). C'est ce phénomène qui a permis à cette espèce d'échapper à la filtration mécanique dans la rate. Il est le résultat de l'exportation à la surface du GRP de structures parasitaires protéiques transportées dans l'équivalent parasite du réticulum endoplasmique : les fentes de Maurer.



**Figure 11. Les globules rouges parasités, ultrastructure et schémas des knobs, le rôle de la protéine de membrane érythrocytaire 1 de *Plasmodium falciparum*, PfEMP1**

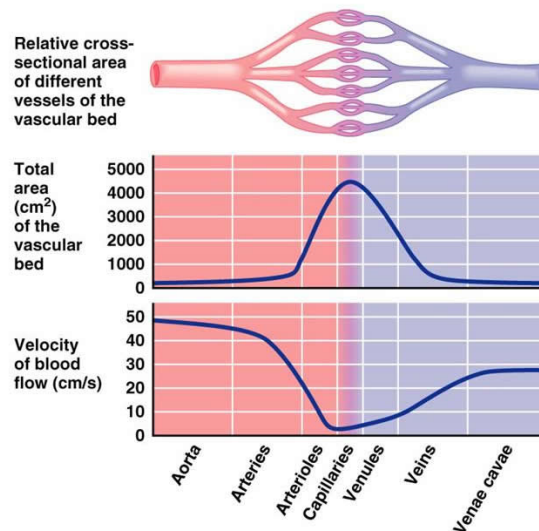
### **Les vaisseaux sanguins, la circulation**

Les vaisseaux sanguins jouent un rôle central dans la genèse de l'accès palustre grave. Lors du cycle de schizogonie érythrocytaire, les GRP vont à environ la moitié du cycle, après 24 heures, exprimer la protéine PfEMP1 qui va se lier à un contre ligand présent à la surface de la cellule endothéliale vasculaire. La vitesse du sang dans les gros vaisseaux empêche les GRP de se fixer sur les cellules endothéliales de la paroi (Figure 12). Il y a trop de forces de cisaillement. C'est dans les capillaires, là où le contact individuel des GR avec la surface des cellules endothéliales est maximal, avec un temps de contact prolongé (faible vitesse du sang, pas de forces de cisaillement) que va se produire la cytoadhérence (Figure 13).



**Figure 12. Structure et ultrastructure du capillaire. L'interface globule rouge, cellule endothéliale**

Les GRP se fixent, dans tous les tissus, sur les cellules endothéliales des vaisseaux avec la moins grande vélocité, les capillaires. Le réseau capillaire a pour vocation principal les échanges gazeux avec les cellules. La conséquence immédiate de cette action est la survenue d'un blocage mécanique du capillaire. Ce blocage n'est pas complet, les GR parviennent à circuler dans le tissu, mais de manière très ralentie (Figure). Il en résulte une hypoxie, parfois sévère, avec un ralentissement des fonctions cellulaires, mais pas d'anoxie ni de nécrose cellulaire.



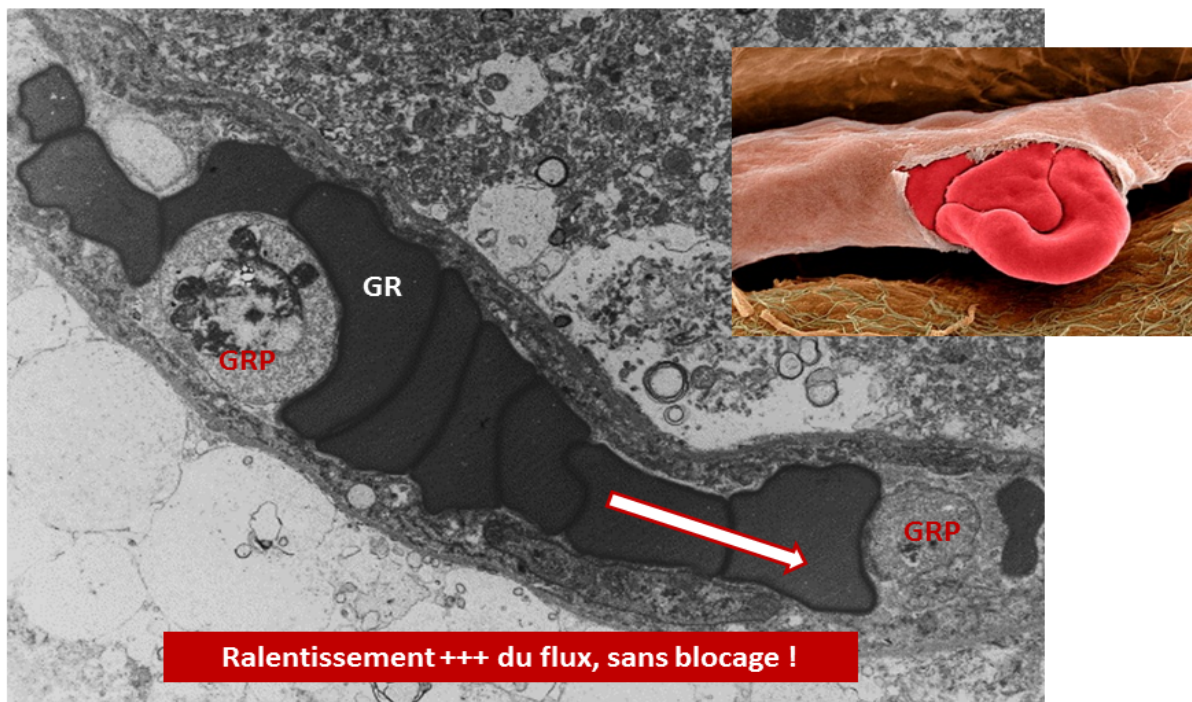
*Figure 13. Représentation de la vitesse du sang en fonction de la surface totale des différents types de vaisseaux*

## **Le déroulement des évènements : la cytoadhérence et ses conséquences**

### **Le blocage mécanique**

La physiopathologie du paludisme grave à *P. falciparum* est complexe, mais les preuves augmentent, son aspect central est l'obstruction mécanique des capillaires sanguins. Les études d'autopsie, mais aussi les observations *in vivo* de la microcirculation, montrent une obstruction d'intensité variable des capillaires dans le paludisme grave. La principale cause de cela est la cytoadhérence à l'endothélium vasculaire des GRP contenant les formes matures du parasite, entraînant la séquestration et l'obstruction des petits vaisseaux. En outre, les globules rouges parasités deviennent rigides, compromettant leur écoulement dans les capillaires dont la lumière a été réduite par des GRP séquestrés. Les forces d'adhésion entre les GRP (auto-agglutination), entre les GRP et les GR non infectés (rosetting) et entre les

GR non infectés pourraient ralentir encore davantage une microcirculation déjà faible. Une découverte plus récente est que les érythrocytes non infectés deviennent également rigides dans le paludisme sévère. La réduction de la déformation générale des globules rouges a une forte valeur prédictive pour la létalité. La rigidité peut être causée par un dommage oxydatif à la membrane des globules rouges par le pigment du paludisme libéré au moment de la rupture des schizontes. La première conséquence des phénomènes de cytoadhérence entre les GR parasités par des stades asexués « matures », vieux trophozoïtes, schizontes, et les cellules endothéliales de certains capillaires est donc une conséquence mécanique : le ralentissement du flux sanguin dans les territoires capillaires concernés (Figure 16)(11).



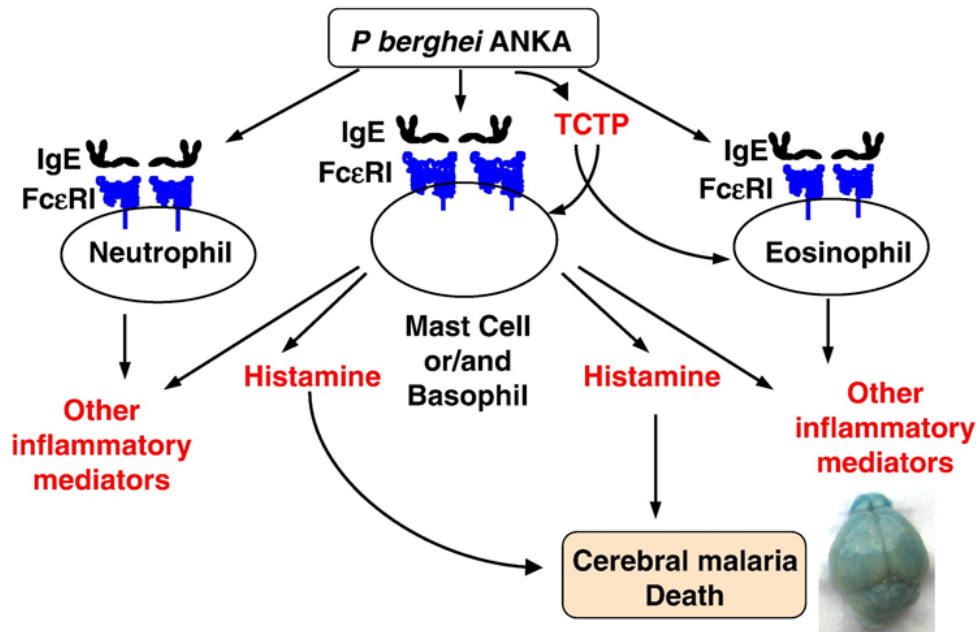
**Figure 14. Conséquence mécanique de la cytoadhérence : la séquestration des globules rouges parasités dans les capillaires, aboutit à un ralentissement du flux sanguin dans les tissus avec une hypoxie cellulaire (Modifié d'après Dondorp, A.M. 2004)**

Un travail de Nicolas J White et son équipe portant sur la séquestration dans les micro-vaisseaux du cerveau de 50 patients thaïlandais et vietnamiens décédés de paludisme sévère (*Plasmodium falciparum*, n=49, *P. vivax*, n=1) montre que : les parasites ont été séquestrés dans 46 cas pour *P. falciparum* et qu'il n'y a pas eu de séquestration pour *P. vivax* ; Le rapport médian de la parasitémie cérébrale et du sang périphérique était de 40, confirmant le tropisme cérébral du parasite. Par ailleurs, dans le même cerveau, différents vaisseaux avaient des populations de parasites différentes, ce qui indique que les caractéristiques d'adhésion de l'endothélium vasculaire cérébral changent de manière asynchrone pendant le paludisme et que la recirculation significative des érythrocytes parasités après la séquestration est peu probable. Le ratio médian (gamme) des schizontes aux trophozoïtes (0,15 à 1; 0,0 à 11,7) était significativement inférieur à celui prévu dans le cycle de vie du parasite (P <0,001). Le traitement antipaludique arrête le développement aux stades trophozoïtes qui restent séquestrés dans le cerveau, mais ne provoque pas le décrochage des hématies parasitées. Il y avait beaucoup plus de parasites de la forme anneau (âge <26 heures) qu'attendu dans les micro vaisseaux cérébraux (médiane : 19% ; 0 -90%) en fonction du mélange libre de ces cellules dans la circulation systémique (parasitémie médiane : 1,8%; 0-36,2%). Tous les stades de développement de *P. falciparum* sont donc séquestrés dans le cerveau dans le paludisme sévère (37)

### **La réaction inflammatoire**

Il est clairement démontré que le glycosylphosphatidylinositol de *P. falciparum* ainsi que l'hémozoïne produite et relarguée par le parasite au moment de l'éclatement des schizontes matures ont tous les 2 une forte action

pro-inflammatoire. Ainsi, localement, sur les lieux même de la séquestration des GRP, se produit une réaction inflammatoire immédiate, de type « allergique » avec participation des mastocytes et des cellules basophiles.



*Figure 15. La réaction inflammatoire locale de type « allergique » avec production de médiateurs et cytokines pro-inflammatoires (Mecheri, S. 2012)*

La production de médiateurs et de cytokines stimule l'expression à la surface des cellules endothéliales des molécules d'adhésion (30) Dans l'étude de Silamut et collaborateurs, l'expression par les cellules endothéliales cérébrales des récepteurs de cytoadhérence ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine et sulfate de chondroïtine mais également HLA classe II a été augmentée (37). Cette réaction est dans le cas général contrôlée par le système immunitaire et proportionnelle à la quantité des substances relarguées, donc de la parasitémie.

## L'apoptose

Après la libération des mérozoïtes par le GRP séquestré au stade schizonte mature, les cellules endothéliales restent « tapissées » par des structures antigéniques de *P. falciparum* qui restent fixées avec les débris de membranes du GRP comme PfEMP1, KHARP, PfEMP2 ... (Figure 19). Leur présence est repérée par les lymphocytes et provoque une surexpression des cytokines inflammatoires qui déclenche le processus d'apoptose pour détruire la cellule en la fragmentant, avec formation de microparticules (38-40). Le système immunitaire va pouvoir ainsi accéder aux structures antigéniques étrangères éventuellement présentes. Certains résultats ont également suggéré que le glycosylphosphatidylinositol (GPI) de *P. falciparum* était responsable de l'apoptose des cardiomyocytes (41). Il est montré également que l'hémozoïne peut provoquer l'apoptose de précurseurs de la lignée rouge dans la moelle osseuse, participant ainsi à la genèse de l'anémie palustre (42). L'apoptose est un phénomène naturel et habituellement utile qui fait partie de la défense innée contre les infections. Ce processus élimine de nombreux parasites avec les cellules apoptotiques. Il devient délétère lorsque la parasitémie est élevée. La conséquence redoutée est la genèse de microhémorragies non contrôlées par les mécanismes de réparation, si elles sont trop nombreuses et si l'organisme est défaillant (Figure 20) (43). Ainsi, les résultats de l'apoptose cellulaire sont ambivalents, favorables initialement puis défavorables pendant la progression du paludisme si la charge parasitaire augmente trop rapidement.

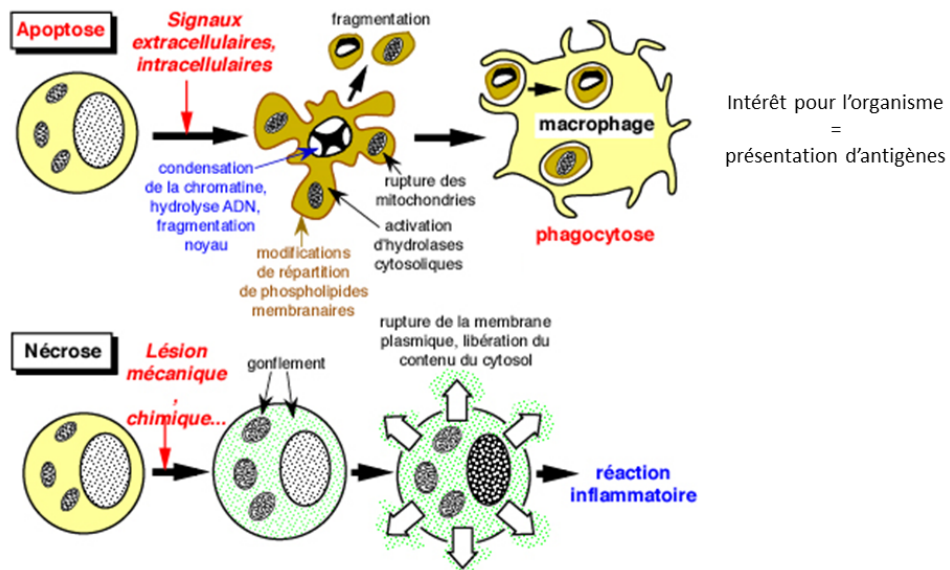


Figure 16. Apoptose et nécrose, représentation schématique (d'après Service d'anatomopathologie, Faculté Broussais, Hôtel Dieu, Paris)

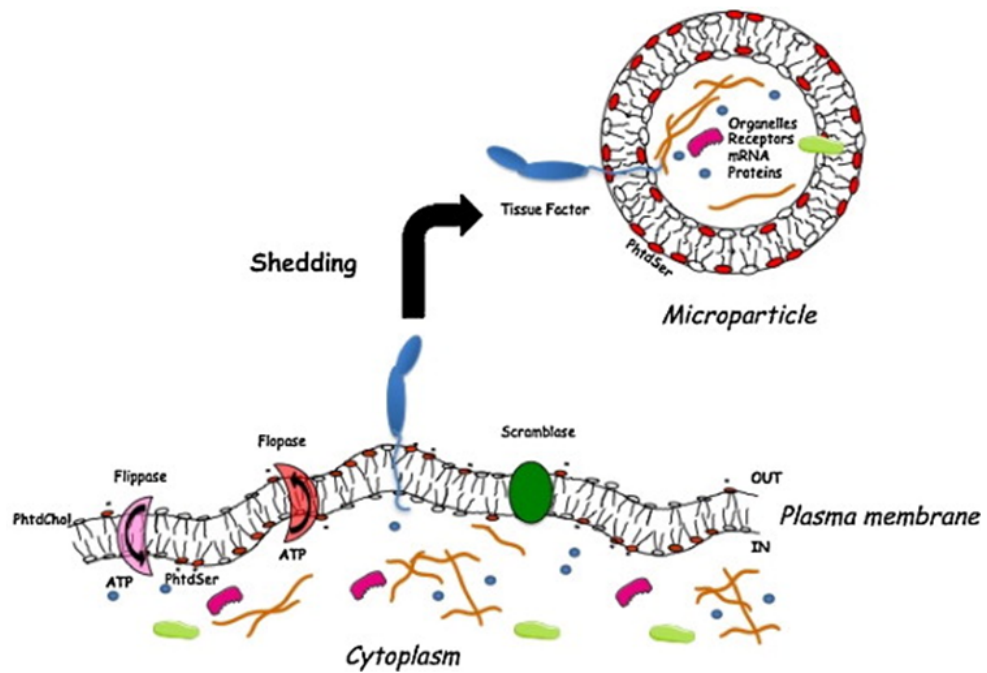
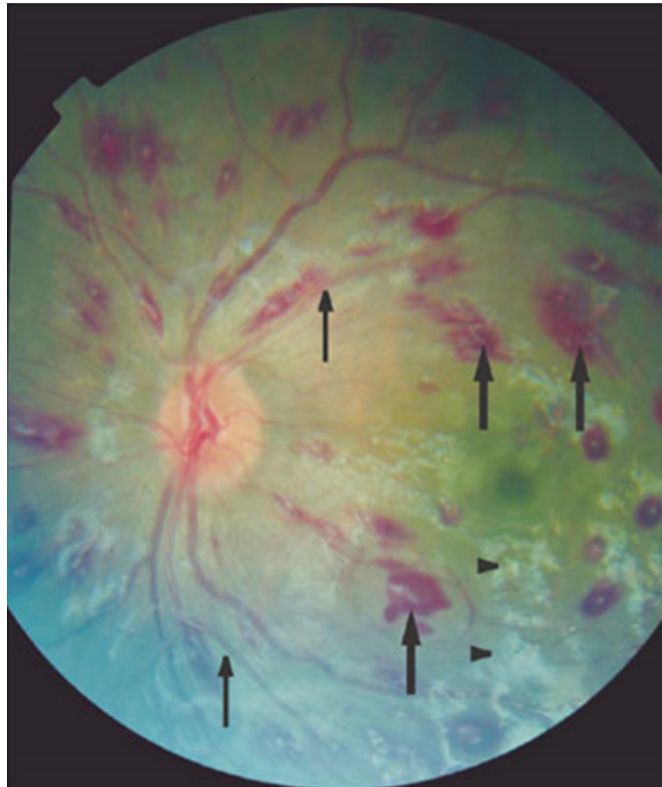


Figure 17. Exemple de la formation et de la structure des microparticules. Dans le cas du paludisme, elles sont d'origine érythrocytaire, plaquettaire ou endothéliale vasculaire



*Figure 18. Rétinopathie palustre (Mishra, S.K. 2009)*

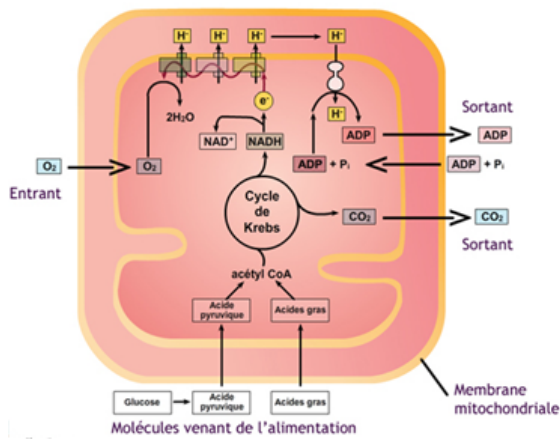
Au niveau cellulaire, les conséquences de la séquestration des GRP au niveau des capillaires de tous les tissus, et en particulier du cerveau avec une surexpression des contre ligands de PfEMP1, est une hypoxie. Cette hypoxie provoque un switch du métabolisme cellulaire vers un système de production d'énergie anaérobie. La glycolyse anaérobie est beaucoup moins efficace que la glycolyse aérobie du cycle de Krebs (ou de Szent-Györgyi et Krebs, ou encore cycle de l'acide citrique) <sup>5</sup>. Elle produit 18 fois moins de molécules d'ATP avec la production d'acide lactique dans le cycle lactate-pyruvate (Figure)

---

<sup>5</sup> <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Metabo/ck1.htm>

## Glycolyse aérobie

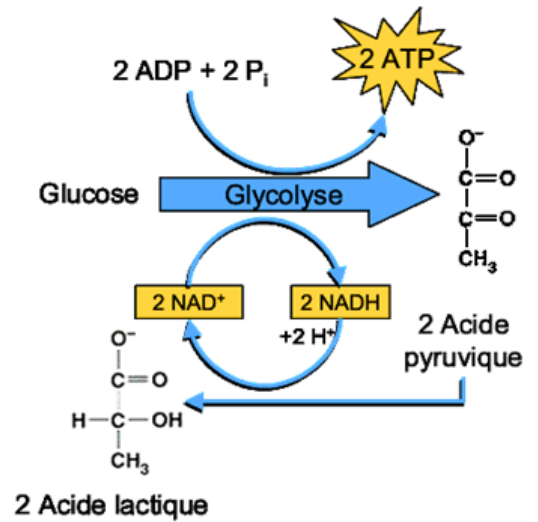
### Cycle de Szent-Györgyi et Krebs



+ chaîne respiratoire

**Bilan pour 1 glucose = 36 ATP**

## Fermentation lactique

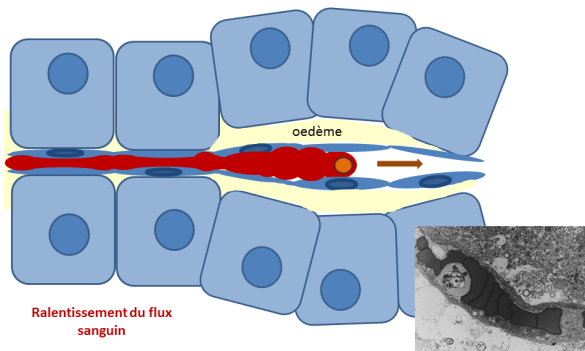


**Bilan pour 1 glucose = 2 ATP**

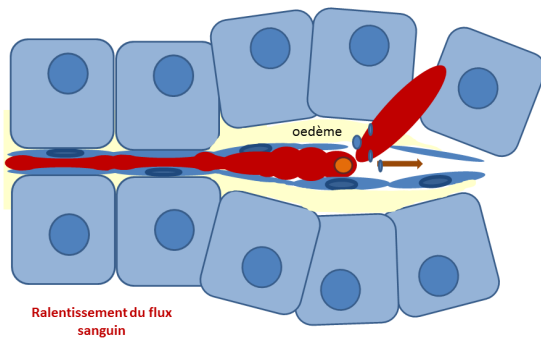
Figure 19. Représentation schématique des cycles de glycolyse aérobie et anaérobie.

Bilan pour une molécule de glucose.

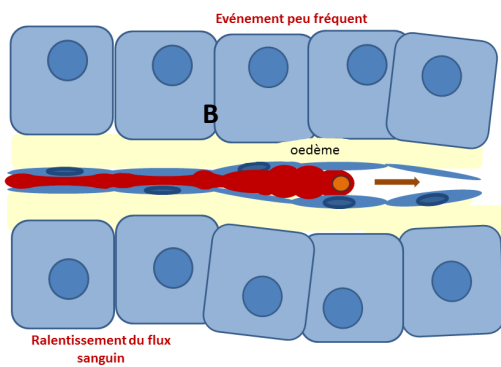
**A** Capillaire et GR parasité  
Phénomène mécanique élément déterminant



Capillaire et GR parasité  
Apparition de phénomènes d'apoptose



**C** Capillaire et GR parasité  
Phénomène inflammatoire élément déterminant

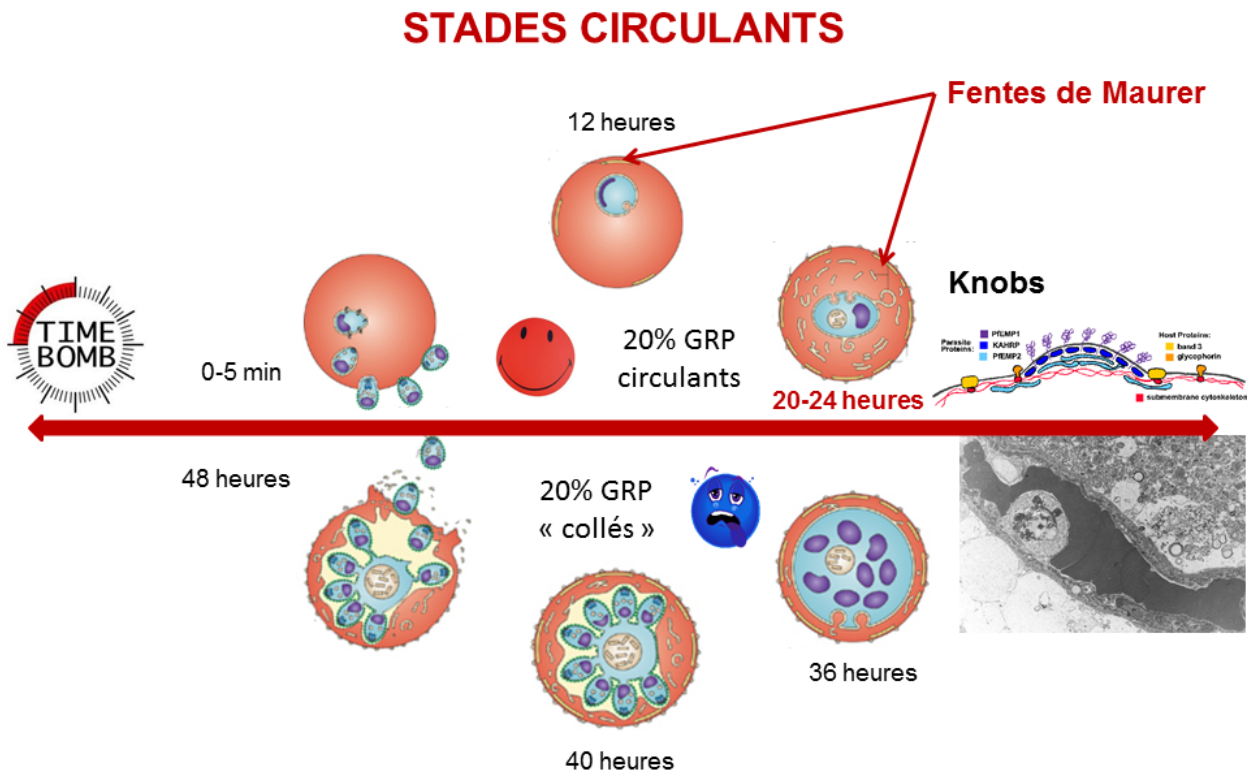


**En A** : cas général, le blocage mécanique est l'élément prépondérant pour la genèse des signes cliniques de gravité. Plus la charge parasitaire est élevée plus les cellules souffrent plus le retentissement pour l'organisme est important : signes de gravité du paludisme dont signes neurologiques. L'inflammation est présente mais elle reste contrôlée.

**En B** : Apoptose non contrôlée, microhémorragies, lorsque l'apoptose des cellules endothéliales vasculaires est intense (forte parasitémie en général).

**En C** : cas rare, l'inflammation de type allergique n'est pas contrôlée. Elle devient l'élément prépondérant dans la genèse des signes cliniques de gravité. La charge parasitaire peut être basse.

**Figure 20 .Résumé schématique des conséquences de la cytoadhérence des GRP aux cellules endothéliales dans les capillaires**



## STADES SEQUESTRES

*Figure 21. Représentation schématique du déroulement du cycle de schizogonie érythrocytaire de *P. falciparum* dans le temps en lien avec la dynamique des phénomènes de cytoadhérence et leurs conséquences cliniques (Marc Thellier)*

**Tableau 2. Physiopathologie du paludisme à *Plasmodium falciparum*, les points clés**

***Primum movens* : la CYTOADHERENCE**

Entre les GR parasité par les stades asexués « matures » (trophozoïtes âgés, schizontes) et les cellules endothéliales vasculaires

Responsable de :

- 1/ un ralentissement du flux sanguin dans les capillaires (**phénomène mécanique**)
- 2/ une réaction inflammatoire tissulaire « cytokines » (**phénomène inflammatoire**).

Apparition des signes de gravités (cf p55)

Le phénomène mécanique est prédominant sauf dans de rares exceptions (charges parasitaires faibles avec accès grave chez certains individus particulièrement réactifs à la présence des antigènes parasitaires).

Si l'évolution de l'accès n'est pas maîtrisée par le traitement ou une réponse immune adaptée, l'évolution est défavorable avec apparition de phénomènes d'**apoptoses**. On observe alors des micros hémorragies tissulaires.

**Paludisme grave et parasitémie**

La définition princeps de paludisme grave à *P. falciparum* est celle de l'OMS publiée en 2000 [ref]. Le paludisme grave est défini par la présence d'une parasitémie avec des formes asexuées de *P. falciparum* et au moins un critère clinique ou biologique de gravité. Ces critères sont décrits dans deux tableaux qui précisent chez l'adulte et l'enfant, la fréquence et la valeur pronostique de chaque critère (sur une échelle semi-quantitative de +/- à +++). Chez l'adulte, deux critères ont été légèrement modifiés par l'OMS en 2010 dans les recommandations concernant le traitement du paludisme :

- L'hyperparasitémie est maintenant définie comme une parasitémie > 2 % dans les zones d'endémie où la transmission est d'intensité faible et > 5% dans les zones d'endémie où la transmission est stable et d'intensité élevée ;
- L'ictère est maintenant considéré comme un critère de gravité si, à l'ictère clinique, s'associe une atteinte d'un autre organe vital.

Cette définition appelle quelques commentaires : elle date de plus de 10 ans, elle est fondée sur des études réalisées en zone d'endémie palustre, en Afrique et en Asie principalement et elle a souvent été légèrement « modifiée » ou « adaptée » au gré des études et des recommandations nationales (21, 44). Par ailleurs, elle ne définit le paludisme grave qu'en présence de *P. falciparum*, alors que des accès graves sont régulièrement décrits avec *P. knowlesi* et *P. vivax*, beaucoup plus rarement avec *P. ovale* et *P. malariae*.

En 2007, les recommandations pour la pratique clinique (RPC) françaises concernant la prise en charge du paludisme d'importation à *P. falciparum* précisent la définition française du paludisme grave d'importation à *P. falciparum* sur le modèle de l'OMS : positivité du frottis/goutte épaisse à *P. falciparum* avec présence de formes asexuées et au moins un des critères cliniques ou biologiques de gravité détaillés dans le Tableau 2. Le seuil de décision pour la parasitémie est fixé à 4 % . Cette définition appelle plusieurs remarques : elle a été élaborée par un groupe d'experts, à partir des données de la littérature, notamment des grandes études récentes réalisées en zone d'endémie mais surtout des données concernant le paludisme grave d'importation ; ainsi, par rapport à la définition princeps de l'OMS 2000 et tout en gardant l'esprit de celle-ci, cette définition est modifiée sur plusieurs

points , qui la rendent mieux appropriée à la prise en charge du paludisme grave d'importation dans un contexte de soins français/européen et plus largement des pays « industrialisés ». En 2012, l'OMS précise à nouveau les critères de gravité du paludisme et le seuil de décision pour la définition de l'accès grave sur ce critère est fixé à 10 %<sup>6,7</sup> (45)

D'autres études locales, en zone d'endémie le plus souvent, mais également hors zones d'endémie donnent des chiffres allant de moins de 1 % à 10% pour classer un patient en accès grave. Ce seuil permet d'orienter la prise en charge initiale : hospitalisation obligatoire avec surveillance étroite et continue (monitorage) et traitement par voie intraveineuse lorsque le seuil est dépassé versus traitement per os en l'absence de vomissements non contrôlés et retour au domicile possible.

---

<sup>6</sup> <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/severe-malaria-tmih-2014/en/>

<sup>7</sup> <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241548526/fr/>

**Tableau 3. Critères de gravité du paludisme à *Plasmodium falciparum* (OMS, 2000)**

Troubles de la conscience	Score de Glasgow modifié = 10 chez l'adulte et l'enfant de plus de 5 ans Score de Blantyre = 2 chez le petit enfant
Convulsions répétées	2 par 24 heures (malgré la correction de l'hyperthermie)
Prostration	Extrême faiblesse Ou, chez l'enfant : impossibilité de tenir assis pour un enfant en âge de le faire, ou de boire pour un enfant trop jeune pour tenir assis
Détresse respiratoire	Critère clinique : polypnée
Ictère	Clinique ou biologique (bilirubine > 50 µmol/l)
Hémoglobinurie macroscopique	Urines rouges foncées ou noires Hémoglobinurie ou myoglobinurie à la bandelette Absence d'hématurie microscopique
Collapsus circulatoire	PA systolique < 80 mm Hg chez l'adulte PA systolique < 50 mm Hg chez l'enfant
Œdème pulmonaire	Critère radiologique
Saignement anormal	Critère clinique
Anémie grave	Adulte : hémoglobine < 7 g/dl ou hématokrite < 20 % Enfant : hémoglobine < 5 g/dl ou hématokrite < 15 %
Hypoglycémie	Glycémie < 2,2 mmol/l
Acidose métabolique	pH < 7,35 ou bicarbonates < 15 mmol/l
Hyperlactatémie	Lactates plasmatiques > 5 mmol/l
Hyperparasitémie	> 4 % chez un sujet non immun
Insuffisance rénale	Créatininémie > 265 µmol/l après réhydratation ou diurèse < 400 ml/24 heures chez l'adulte (< 12 ml/kg/24 heures chez l'enfant)

En France, tout paludisme à *P. falciparum*, mais aussi plus rarement à l'une des 4 autres espèces plasmodiales, comportant au moins un des critères du tableau 3 (notamment ceux gradés ++ et +++ au plan pronostique) doit être rapidement évalué avec le réanimateur ; mais sans retarder le début du traitement. Isolément, une parasitémie supérieure à 4%, particulièrement chez l'adulte non immun, est considérée comme suffisamment critique pour justifier une prise en charge de type forme grave<sup>8</sup> (MAJ 2017).

<sup>8</sup> <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/2017-palu-texte-final.pdf>

**Tableau 4. Critères du paludisme grave d'importation à *Plasmodium falciparum* de l'adulte : définition en France métropolitaine selon les RPC 2007, mise à jour en 2017**

Pronostic	Critères cliniques et/ou biologiques	Fréquence
+++	<b>Défaillance neurologique incluant :</b> - obnubilation, confusion, somnolence, prostration - coma avec score de Glasgow < 11 - convulsion(s)	+++
+++	<b>Défaillance respiratoire incluant :</b> - si VM ou VNI : PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> < 300 mmHg - si non ventilé PaO <sub>2</sub> < 60 mmHg et/ou SpO <sub>2</sub> < 92% en air ambiant et/ou FR > 30/min - signes radiologiques : images interstitielles et/ou alvéolaires	+
+++	<b>Défaillance cardio-circulatoire incluant :</b> - PAS < 80 mmHg et/ou présence de signes périphériques d'insuffisance circulatoire - nécessité de drogues vasopressives* et lactate > 2 mmol/l	++
++	<b>Hémorragie :</b> définition clinique	+
+	<b>Ictère :</b> clinique ou bilirubine totale > 50 µmol/l	+++
+	<b>Anémie profonde :</b> hémoglobine < 7 g/dl, hématocrite < 20%	+
+	<b>Hypoglycémie :</b> glycémie < 2,2 mmol/l	+
+++	<b>Acidose :</b> bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/l, ou acidémie avec pH < 7,35 (surveillance rapprochée dès que bicarbonates < 18 mmol/l)	++
+++	<b>Hyperlactatémie :</b> > 2 mmol/l ( <i>a fortiori</i> si > 5 mmol/l)	++
++	<b>Hyperparasitémie :</b> > 4% (voir texte long)	+++
++	<b>Insuffisance rénale :</b> créatininémie > 265 µmol/l ou urée > 20 mmol/l	+++

VM : ventilation mécanique ; VNI : ventilation non invasive ; FR : fréquence respiratoire ; PAS : pression artérielle systolique

# Si *Plasmodium vivax* : mêmes critères sans parasitémie > 4% (car rarement > 2%), anémie ictère fréquents, quelques cas de SDRA, rareté de l'atteinte neurologique et de l'acidose.

§ Si *Plasmodium knowlesi* : mêmes critères mais hyperparasitémie dès que > 2%, atteintes hépatique et rénale fréquentes, atteinte neurologique très rare.

\*noradrénaline ou adrénaline

## **II.3. Le diagnostic biologique d'une infection palustre**

### **II.3.1. Quelles indications du diagnostic**

Avant toute chose, il convient de bien distinguer le ou les objectifs de mise en œuvre d'une technique de diagnostic du paludisme. L'objectif le plus commun et le plus évident est le diagnostic d'urgence du paludisme. Il sera notre fil conducteur pour la suite de notre exposé. Cependant d'autres situations sont possibles. On retiendra en particulier le diagnostic d'une splénomégalie palustre hyper immune (SPH) qui rend compte d'une infection chronique à bas bruit avec une hyper réaction du système immunitaire. Dans cette situation le diagnostic doit faire intervenir la sérologie avec le dosage pondéral des immunoglobulines, les IgM sont très augmentées, et la PCR (46). Dans le cadre du dépistage d'une infection palustre en transfusion sanguine, dans la pratique française, c'est la sérologie palustre (une technique ELISA) qui permet d'apprécier le risque et qui sert d'outil décisionnel (ref). Dans le cadre de la lutte contre la transmission du paludisme, il convient pour les années à venir de réduire le plus possible le réservoir du parasite. Ce réservoir est constitué des sujets impaludés, symptomatique donc aisément repérables ou asymptomatiques, très nombreux en zone d'hyperendémie, plus difficilement repérables (réf). Si des traitements de masse sont envisagés par les autorités sanitaires nationales et internationales (47), cela pose de nombreuses questions, à la fois éthiques mais également de faisabilité et de mise en application (ref). Une action plus facile à mettre en œuvre consiste à repérer les sujets infectés asymptomatiques en utilisant des tests de dépistages hyper-sensibles. Ces techniques doivent être facilement utilisables sur le terrain. Des TDR ultra sensibles sont ainsi développés (refs). Enfin les

équipes de recherche qui travaillent sur le sujet utilisent fréquemment des souches de *P. falciparum* qu'elles cultivent pour les exploiter dans des tests *in-vitro* ou *in vivo* dans des modèles murins ou même humain (production de vaccins par exemple (refs)). Dans ce cas il faut privilégier les techniques qui permettent un comptage automatique comme la cytométrie en flux ou les techniques de lecture microscopiques si possible automatisées, pour distinguer finement les stades de développement du parasite (Cf mon expérience personnelle et refs).

Concernant le diagnostic de paludisme en urgence, il s'agit d'une urgence vitale absolue. Un accès simple peut s'aggraver en seulement quelques heures. L'examen ne doit donc pas être différé si ce diagnostic est évoqué. La récente mise à jour (juin 2017) des recommandations 2007 pour la pratique clinique pour la prise en charge et la prévention du paludisme d'importation<sup>9</sup> des sociétés savantes françaises stipule : « La confirmation d'une suspicion de paludisme d'importation repose sur la mise en évidence directe et/ou indirecte du parasite sur un prélèvement sanguin qui doit être fait dès que possible, sans attendre un frisson ou un pic thermique. Le prélèvement doit être accompagné des renseignements épidémiologiques et cliniques indispensables : pays endémique de séjour, date de retour, traitement antipaludique prophylactique ou curatif antérieur ». Ce diagnostic biologique doit répondre obligatoirement à 4 questions dans un délai de 2 heures suivant le prélèvement 1/ Y-a-t-il un *Plasmodium* dans le sang ? 2/ si oui, quelle espèce est en cause ? 3/ Quel(s) stade(s) parasite(s) (stades asexués, stades sexués) 4/ si présence de stades asexués, quelle est la charge parasitaire ? Obligatoire pour *P. falciparum* et

---

<sup>9</sup> <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/2017-palu-texte-final.pdf>

*Plasmodium knowlesi*. L'identification de l'espèce *P. falciparum* et le niveau mesuré de la parasitémie (en pourcentage d'hématies parasitées par des stades asexués) ont un impact direct sur la prise en charge du patient. Le délai de 2 heures est un objectif fixé par la conférence de consensus de 1999<sup>10</sup> révisée en 2007<sup>11</sup>, mis à jour en 2017 et confirmé par les recommandations de l'OMS [36] du fait de l'aggravation souvent très brutale de l'infection palustre (cf Illustration logigramme 2017) (références).

### **II.3.2. La technique de référence**

Il s'agit en fait de deux techniques microscopiques combinées. Elles figurent à la nomenclature officielle des actes de biologie médicale : le frottis sanguin mince et la goutte épaisse<sup>12</sup>. La lecture au microscope du frottis sanguin mince (FSM) est une technique très pratiquée en laboratoire de biologie médical. Elle consiste à étaler une goutte de sang anti coagulé sur une lame en une couche mince uni cellulaire et à le colorer après fixation par le May-Grünwald Giemsa (MGG) ou des colorations alternatives plus rapides (Giemsa rapide, éosine-bleu de méthylène...) (48, 49) (21) et <sup>13</sup>. Elle permet d'observer de manière individuelle, au microscope à immersion grossissement x1000, les éléments sanguins non altérés. Les performances, en termes de sensibilité et de spécificité, dépendent directement du respect strict des conditions de séchage, de fixation et de coloration pour éviter les artéfacts. Cette technique présente de nombreux avantages : son temps de réalisation est court (<30 minutes), elle permet d'identifier la ou les espèces de *Plasmodium*

---

<sup>10</sup> [http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/\\_documents/consensus/palu99.pdf](http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/_documents/consensus/palu99.pdf)

<sup>11</sup> [http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/\\_documents/consensus/2007-paludisme-long.pdf](http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/_documents/consensus/2007-paludisme-long.pdf)

<sup>12</sup> [http://www.codage.ext.cnamts.fr/codif/nabm/index\\_presentation.php?p\\_site=AMELI](http://www.codage.ext.cnamts.fr/codif/nabm/index_presentation.php?p_site=AMELI)

<sup>13</sup> [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/en/)

et de réaliser le comptage du pourcentage d'hématies parasitées. Cependant les résultats sont peu précis et microscopistes dépendants. Le temps de lecture est long, environ 30 minutes pour 1 lame, puisqu'on ne peut parler de négativité qu'après étude d'un minimum de 50 000 hématies correspondant à environ 200 champs au grossissement  $\times 1\,000$ . Le seuil de détection de la technique est de l'ordre de 100-200 parasites par  $\mu\text{l}$ . La technique de goutte épaisse (GE) décrite par Ronald Ross il y a plus d'un siècle est une technique permettant d'augmenter d'un facteur 20 à 30 le volume de sang par unité de surface observée et donc d'améliorer la sensibilité. Comme les hématies sont lysées, la parasitémie est alors estimée par le nombre de parasites comptés pour 200, 500 ou 1000 leucocytes observés, selon les habitudes. La connaissance du nombre d'éléments nucléés sur un hémogramme simultané permet d'en déduire la numération des parasites par microlitre. La goutte épaisse est rendue négative après observation de 100 champs microscopiques selon les normes OMS. Son principal intérêt est le gain avéré en termes de seuil de détection, 5 à 20 parasites par microlitre (refs). Elle était classiquement longue à obtenir du fait de l'étape de séchage à l'air mais des méthodes de séchage rapide permettent d'accélérer cette étape (étuve, lampe, microonde, séchoir) et toute la préparation peut être réalisée en dix à 30 minutes (ref MT). Son inconvénient majeur réside dans le fait qu'elle est très observateur-dépendant, puisque seuls une minorité de biologistes la pratique régulièrement. En 2004, parmi 3 341 laboratoires ayant répondu au questionnaire du CNR du paludisme, les deux tiers (67 %) n'ont diagnostiqué aucun cas de paludisme, alors que 28% ont identifié entre un et cinq cas et seulement 5% plus de cinq cas dans l'année [37]. Cette situation n'avait bien entendu pas changé lors de nouveaux questionnaires réalisés en 2008 et 2014

(non référencés). C'est cet inconvénient qui motive depuis plusieurs décennies la recherche d'une technique alternative pour remplacer la goutte épaisse. Ceci va être rendu encore plus impératif avec l'obligation en France (2016) de l'accréditation, selon la norme ISO 15189, des laboratoires de biologie médicale<sup>14,15</sup>. Le législateur impose un contrôle de qualité externe pour chaque analyse et, dans le cas de l'examen direct pour la recherche de paludisme, le texte de la révision de la conférence de consensus précise « L'examen d'un frottis sanguin et d'une goutte épaisse doit être pratiqué par des biologistes ayant suivi une formation spécifique, complète et continue » (ref rev CC). Les biologistes et les laboratoires auront d'énormes difficultés à satisfaire ces exigences. Au plan international, l'OMS recommande : “*A prompt parasite-based diagnosis by microscopy or malaria rapid diagnostic test (RDT) in all patients suspected of malaria before antimalarial treatment is administered*” en français “la mise en œuvre rapide d'une technique de diagnostic par microscopie ou test de diagnostic rapide du paludisme (TDR) pour tous les patients suspects de paludisme avant l'administration d'un antipaludique” en autorisant de facto l'utilisation d'un TDR seul<sup>16</sup>. Cependant quelques précisions importantes sont fournies indiquant l'importance de la microscopie qui seule répond à l'ensemble des exigences pour ce diagnostic avec des performances suffisantes et en précisant également qu'il s'agit de la technique de référence à laquelle doivent se confronter les nouvelles techniques “*Light microscopy entails visualization of the malaria parasites in*

---

14

[http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=B8280888BF8F4744E15C8D9A1EE046A9.tpdjo06v\\_1&dateTexte=?cidTexte=JORFTEXT000021683301&categorieLien=cid](http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=B8280888BF8F4744E15C8D9A1EE046A9.tpdjo06v_1&dateTexte=?cidTexte=JORFTEXT000021683301&categorieLien=cid)

15 <http://www.cofrac.fr/documentation/SH-GTA-01>

16 <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241502092/en/index.html>

a thick or thin smear of the patient's blood. Malaria microscopy allows the identification of different malaria-causing parasites (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* and *P. ovale*), **various parasite stages, including gametocytes, and the quantification of parasite density to monitor response to treatment.** Microscopy is the method of choice for the investigation of malaria treatment failures. Giemsa is the classical stain used for malaria microscopy, and diagnosis requires examination of both thin and thick films from the same patient. Light microscopy is the diagnostic standard against which other diagnostic methods have traditionally been measured”<sup>17, 18</sup>. On ajoutera que ces recommandations ciblent spécifiquement les pays situés en zone d'endémie pour la maladie. Hors zone d'endémie, les principales recommandations internationales britanniques, suisses, canadiennes ou américaines recommandent également la réalisation des techniques microscopiques en y associant la possibilité de réaliser un test de diagnostic rapide si la GE n'est pas disponible immédiatement (50)<sup>19, 20, 21</sup>. Très récemment, la France, dans les mises à jour 2017 des RCP de 2007, assouplit un peu sa position en acceptant le fait de pouvoir différer ou remplacer la technique de GE par une PCR un QBC ou un TDR dans certaines conditions : “Le diagnostic du paludisme d'importation devrait associer une technique sensible (goutte épaisse, QBC ou technique de biologie moléculaire à réponse rapide) à un frottis mince (évaluation de la parasitémie et identification des espèces) afin de rendre un diagnostic dans les deux heures. En pratique,

---

<sup>17</sup> <http://www.who.int/malaria/areas/diagnosis/microscopy/en/index.html>

<sup>18</sup> [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127\\_eng.pdf?ua=1&ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127_eng.pdf?ua=1&ua=1)

<sup>19</sup> [http://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(16\)00047-5/pdf](http://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(16)00047-5/pdf)

<sup>20</sup> <https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/clinicalguidance.pdf>

<sup>21</sup> [http://publications.gc.ca/collections/collection\\_2014/aspc-phac/HP40-102-2014-eng.pdf](http://publications.gc.ca/collections/collection_2014/aspc-phac/HP40-102-2014-eng.pdf)

l'association d'un frottis mince et d'un TDR (test de diagnostic rapide) est une alternative quand cet algorithme ne peut être mis en œuvre. Le TDR doit impérativement détecter l'antigène HRP2 pour le diagnostic spécifique du paludisme à *P. falciparum*. L'association frottis mince et TDR n'a cependant pas une sensibilité optimale et en cas de premier résultat négatif ou douteux, il est nécessaire de réitérer le diagnostic 12h à 24h plus tard. Un contrôle par PCR peut également être réalisé dans une structure de référence (paucifinfection, identification d'espèce ou recherche d'association d'espèces)".

### **II.3.3. Les techniques alternatives**

**Le QBC (*quantitative buffy coat*) malaria<sup>®</sup>** Le QBC est une technique très rapide et spécifique, avec un seuil de détection de l'ordre de dix parasites par microlitre. Très performante dans les mains de lecteurs entraînés, elle ne permet cependant pas le calcul de la parasitémie, ni le diagnostic d'espèce. Le coût de l'équipement et des réactifs est élevé (51-53).

**Les Tests de Détection Rapide d'antigènes plasmodiaux sur bandelette immunoréactive.** Depuis ueCf OMS avec de multiples tests de détection rapide (TDR) par immunochromatographie. Ces méthodes sont destinées à la recherche dans le lysat de sang de protéines spécifiques des hématozoaires. Trois types d'antigènes sont ciblés et associés de manière diverses dans les tests commercialisés i/ l'antigène *Histidine Rich Protein 2* (HRP-2) qui est une glycoprotéine spécifique de *P. falciparum*, exportée par le parasite dans le cytoplasme du globule rouge et libérée dans le plasma au moment de la rupture des schizontes ii/ les iso enzymes de la lactico déhydrogénase de *Plasmodium* : pLDHPf spécifique de *P. falciparum*, pLDHPv spécifique de *P. vivax* et pLDHpan pan-malarique produites par tous les stades érythrocytaires,

asexués et sexués et iii/ l'aldolase de *Plasmodium*, pan malarique également [41]. Pour le diagnostic de *P. falciparum* chez les voyageurs provenant des zones d'endémie, les résultats d'une méta-analyse montrent que la spécificité est excellente (>98%) pour tous les antigènes alors que la sensibilité est excellente pour *P. falciparum*, 95-98% (Se HRP2 > Se pLDH<sub>Pf</sub>) moins bonne pour *P. vivax* et surtout *P. ovale* et *P. malariae* [41,42]. Dans les avantages on retiendra la rapidité et la facilité de mise en œuvre, le diagnostic d'espèce possible pour *P. falciparum* et *P. vivax*, la bonne sensibilité, supérieure à 95% en comparaison de la GE à partir de 100 parasites par microlitre [43]. Un inconvénient majeur est existence de faux négatifs : faibles parasitémies, phénomène de prozone ou mutation/délétion du gène codant l'antigène HRP-2, diversité génétique de l'antigène HRP-2 [42,48], des faux positifs existent également en particulier chez les patients positifs pour le facteur rhumatoïde [46,47].

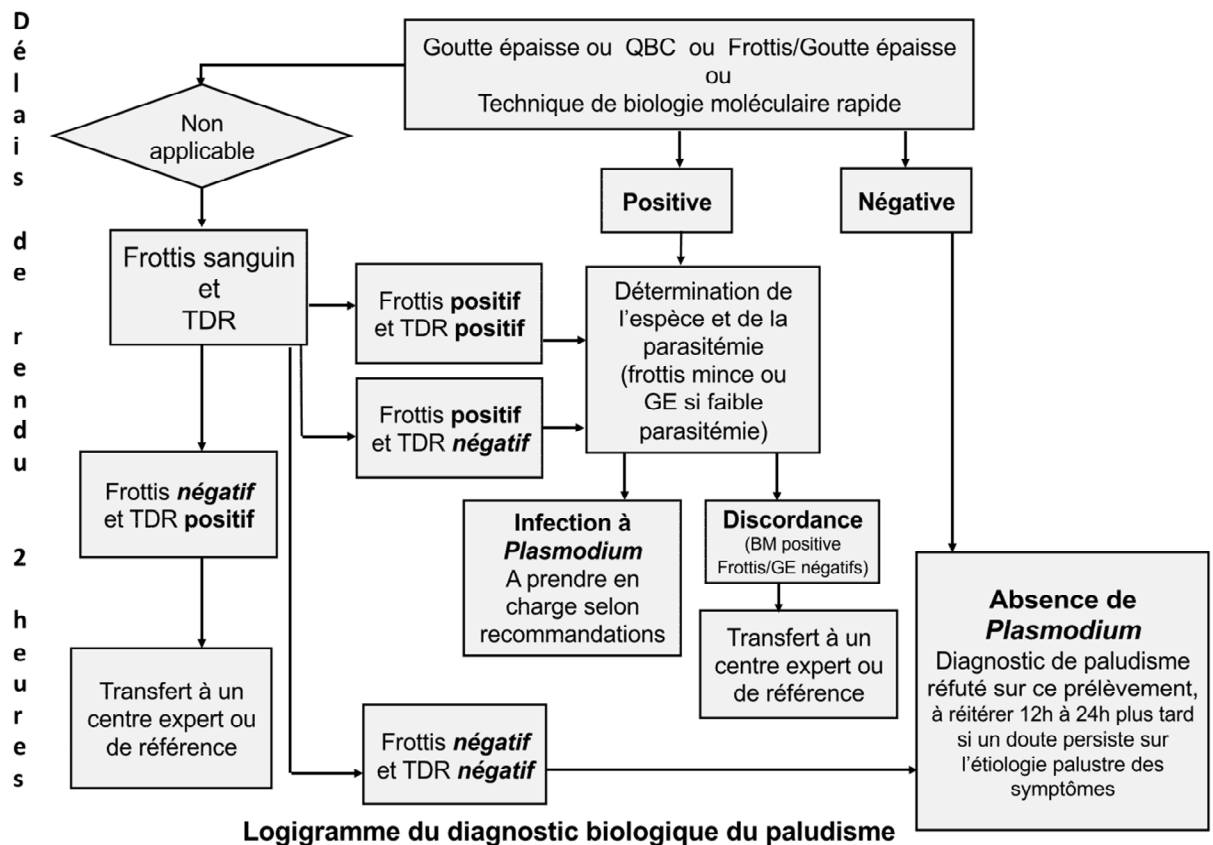
Des études publiées à la fin des années 1990, utilisant des **analyseurs automatiques de numération formule sanguine**, ont mis en évidence des anomalies dans la distribution de certains globules blancs et dans l'histogramme des réticulocytes de patients souffrant de paludisme (54)(55)(56) Les monocytes normaux peuvent être différenciés des monocytes ayant ingéré et digéré des globules rouges infectés grâce à la propriété de l'hémozoïne, produit de dégradation de cette digestion, de dépolariiser la lumière laser utilisée par les automates d'hématologie pour identifier les éosinophiles (Mendelow 1999, Hanscheid 2000). Le matériel nucléaire intraérythrocytaire des parasites peut être coloré par une sonde fluorescente, le propidium iodide, utilisée habituellement pour la numération automatique

des réticulocytes avec l'automate de numération Cell-Dyn® 4000 (Abbot Diagnostics, Santa Clara, Ca). Depuis cette description initiale, d'autres automates utilisant des méthodes similaires obtiennent les mêmes résultats. Cependant si la détection de *P. vivax* ou de *P. ovale* donne de bons résultats (Sensibilité 93-97%), les performances de ces automates sont décevantes pour *P. falciparum* (Se < 60%) du fait de la présence isolée dans le sang circulant des stades jeunes du parasite avec peu ou pas de pigments et une masse nucléaire très faible non détectés par ces méthodes (Wever 2002, Fawzi 2003, Lee 2012, Dubreuil, P. 2014).

**Les techniques de biologie moléculaires (PCR)**, elles sont proposées depuis une vingtaine d'années pour le diagnostic du paludisme [53,54]. Les méthodes les plus récentes utilisent une technique d'amplification dite en temps réel qui permet d'obtenir un résultat en quelques heures [55-58]. Ces méthodes sont très sensibles et spécifiques et peuvent détecter des parasitemies très faibles, de l'ordre d'un parasite par microlitre, voire moins [56,58,59]. La PCR est plus sensible que l'examen microscopique et les tests rapides de recherche d'antigènes plasmodiaux elle permet de gagner 1 à 3 Log10 par rapport à la goutte épaisse ou au QBC Malaria Test. De nombreux systèmes de PCR revendiquent un seuil de sensibilité de 1 à 0,005 parasite/ $\mu$ L pour la détection de *P. falciparum*. Pour les 4 autres espèces plasmodiales, la PCR apparaît aussi plus sensible que les techniques microscopiques [57,59,60]. Elle a donc la meilleure valeur prédictive négative [59]. Elle est capable de différencier *P. falciparum* et les autres espèces d'hématozoaires, et est devenue la méthode de référence pour la confirmation des infections mixtes. Elle permet une quantification de l'ADN plasmodial (parasitémie) et

des techniques spécifiques permettent d'utiliser cette méthode pour la recherche de marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques [61]. Cependant, elle ne permet pas de différencier les stades parasitaires (important si gamétocytes seuls, il faut chercher une autre étiologie aux signes cliniques). Comme pour les TDR, la PCR n'est pas utile pour le suivi thérapeutique car le délai de clairance de l'ADN est long. Elle peut rester positive jusqu'à plus de 30 jours après un traitement bien conduit (gamétocytes, parasites morts dans des hématies circulantes). Elle nécessite un matériel spécifique et des procédures de mise en œuvre non accessible à tous les laboratoires (circuit d'analyse sécurisé) et elle était difficilement accessible en garde, la nuit ou les jours fériés. Ainsi, l'apport essentiel de la PCR pour le diagnostic de paludisme en urgence tient à sa valeur prédictive négative élevée, venant de son excellente détectabilité : un résultat négatif permet ainsi d'écarter un accès palustre évolutif au moment du prélèvement.

Ainsi, Compte tenu de leurs inconvénients respectifs, aucune de ces techniques n'a pu se substituer à la GE en complément du FSM dans le diagnostic de routine du paludisme (Cf **Tableau 1**). Cependant, cette technique est mal acceptée par les biologistes non parasitologue car rarement réalisée dans la plupart des cas et donc mal maîtrisée. Aucun contrôle de qualité externe ne peut être proposé pour l'ensemble des laboratoires (trop de contraintes techniques pour la réalisation des contrôles). Cette technique ne devrait pas passer le cap de l'accréditation pour l'ensemble des laboratoires et on pourrait se diriger pour cette technique vers une habilitation individuelle des biologistes. En attendant la mise à jour des recommandations de prise en charge du paludisme préconisent l'attitude résumée dans la figure 22 .



*Figure 22. . Logigramme du diagnostic biologique du paludisme (MAJ 2017 des RPC 2007)*

Au vu de la situation actuelle du diagnostic biologique du paludisme, il y a un besoin pressant pour les laboratoires de biologie médicale de pouvoir disposer d'une technique automatisable qui puisse être évaluée dans un EEQ en remplacement de la GE pour le diagnostic de paludisme.

De plus, le contrôle de l'épidémie palustre avec un objectif ambitieux d'éradication de la maladie dans les zones d'endémie a un cruel besoin de nouveaux outils capables de dépister de manière fiable et pour des volumes de diagnostic importants (enquêtes épidémiologiques, contrôle de l'efficacité des programmes nationaux de lutte contre le paludisme) la présence de

*Plasmodium* dans le sang des sujets testés jusqu'à un niveau sub-microscopique (seuil de détection de l'ordre de 1 à 5 parasites par microlitre).

En effet, il est maintenant clairement établi que :

1/ le diagnostic microscopique réalisé dans de nombreux endroits en zone d'endémie est fréquemment erroné (faux positifs et faux négatifs), aboutissant à un traitement non justifié qui augmente le risque de sélection de mutants résistant si une infection survient alors que le médicament est encore présent à des doses inadaptées.

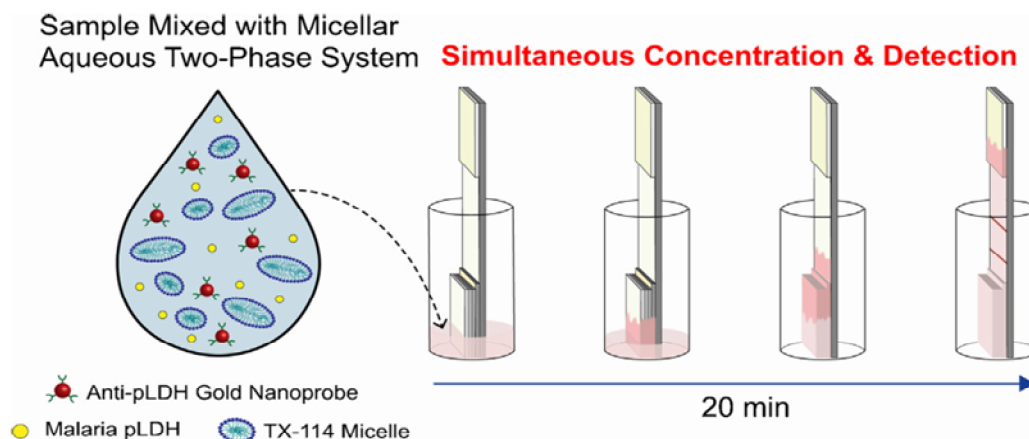
2/ qu'il existe des porteurs asymptomatiques de paludisme (quel que soit l'espèce) avec souvent des parasitemies faibles qui sont un réservoir de la maladie qu'il convient de contrôler pour réellement prétendre à éradiquer la maladie.

Les traitements préventifs intermittents des enfants ou des femmes enceintes qui ont démontrés leur intérêt en termes de morbi-mortalité sont contestés par certains au regard du risque majoré de développement de résistance aux médicaments. Les drogues utilisées, données de manière systématiques plusieurs fois au cours de la grossesse ou de l'année pour les jeunes enfants provoquent de manière obligatoire et fréquente des situations de monothérapie à des doses infra-thérapeutiques. Ce risque pourrait être réduit si un contrôle fiable et rapide du portage parasitaire pouvait être réalisé de manière systématique (1x par mois par exemple) pour autoriser ou non l'administration d'un traitement.

### II.3.4. Les techniques pour l'avenir

De nouvelles techniques d'amplification génique isothermiques en boucle, LAMP, avec une sensibilité de l'ordre de celle de la goutte épaisse, peuvent désormais être accessibles en routine de laboratoire avec des procédures de réalisation simplifiées (Han, E.T. 2013 ; Aydin-Schmidt, B. 2014 ; Polley, S.D. 2010). Il s'agit en particulier de techniques commerciales, robustes et aisément implantables dans tout type de laboratoire de biologie médicale (Lucchi, N.W. 2016). Cependant cette technique ne semble pas suffisamment sensible pour détecter efficacement les sujets porteurs asymptomatiques en zone d'endémie (Aydin-Schmidt, B. 2016).

L'amplification du signal est également d'actualité pour les TDR. Le principe étant de concentrer l'antigène cible présent dans l'échantillon avant ou concomitamment à la détection sur bandelette immunoréactive. Ce type de test pourrait être utilisé en zone endémique pour dépister les sujets asymptomatiques (Pereira, D.Y. 2015).



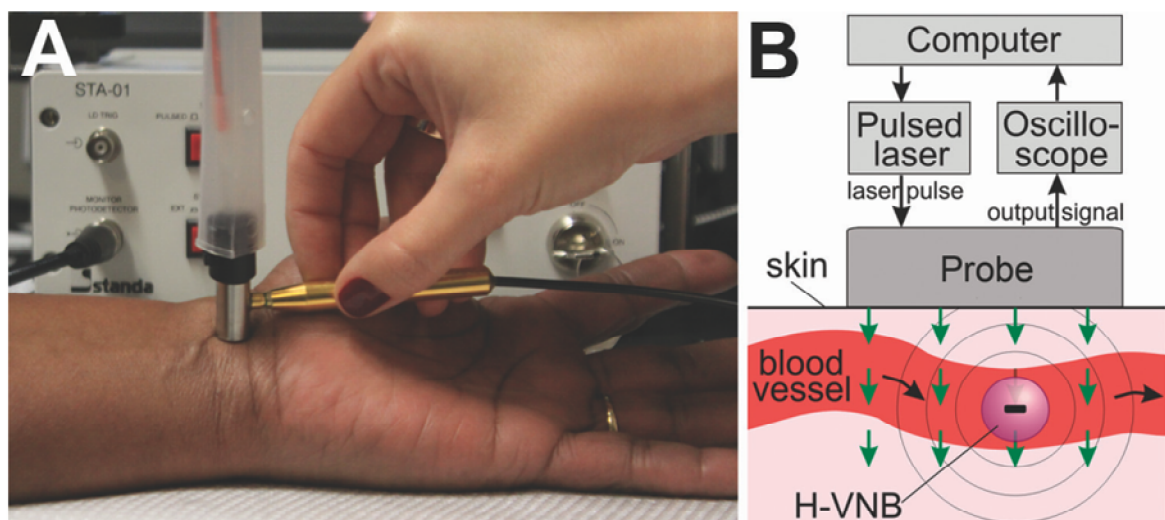
*Figure 23. Concentration-détection en une étape d'un biomarqueur du paludisme (Pereira, D.Y. et Coll. 2015)*

Dans les laboratoires de recherche, des techniques utilisant des propriétés particulières des GR infectés par *P. falciparum* : diminution de la déformabilité ou encore propriétés diélectrophorétiques ou magnétophorétiques sont actuellement en développement (Kasetsirikul, S. 2016 ; Krüger, T. 2014 ; Wu, T. 2013). Cependant c'est une approche totalement nouvelle est récemment publiée qui attire 'attention. La méthode est en effet à la fois un test diagnostique et un traitement curatif. On parle alors de technique « Théranostique » « Théranostic » ou « Théragnostic ». Il s'agit d'un néologisme qui dérive de la contraction des termes « thérapeutique » et « diagnostic » ; c'est l'utilisation d'un test diagnostique, identifiant un marqueur, pour orienter la thérapeutique ou directement traiter le patient en fonction de son statut pour le marqueur (statut positif ou négatif pour un marqueur binaire) (Picard, F.J. 2002 ; Xie, J. 2010)<sup>22</sup>. Les auteurs rapportent une technique de détection transdermique rapide non invasive de l'infection par le paludisme, sans prélèvement de sang ou utilisation de réactifs. Son seuil de détection est de l'ordre de 10 à 20 parasites par microlitres (celui de la goutte épaisse) (Lukianova-Hleb, E.Y. 2013 ; Lukianova-Hleb, E.Y. 2014 ; Lukianova-Hleb, E.Y. 2015). La méthode utilise des impulsions laser inoffensives pour générer et détecter à travers la peau d'un sujet atteint de paludisme de minuscules bulles « nano-bulles » de vapeur produites spécifiquement dans les globules rouges parasités. Le laser étant capable d'exciter l'hémozoïne qui va chauffer jusqu'à vaporiser les liquides biologiques au contact, détruisant ainsi le GR parasité sans altérer les cellules voisines. Cette méthode est distincte de toutes les approches de diagnostic

---

<sup>22</sup> [https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-04/guide\\_meth\\_court\\_test\\_cpagnon\\_vd.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-04/guide_meth_court_test_cpagnon_vd.pdf)

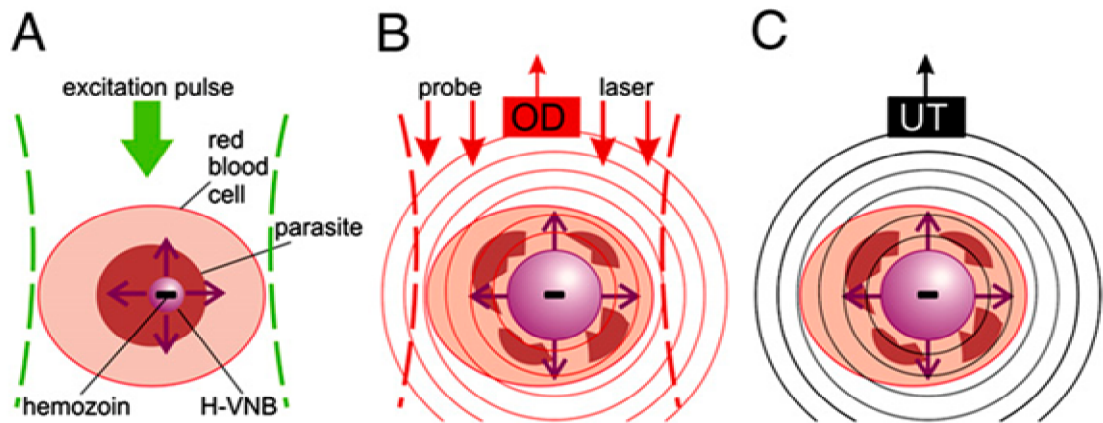
antérieures, qui nécessitent une expertise technique et qui consomment du temps de travail puisqu'elles nécessitent toutes l'utilisation d'un échantillon de sang et de réactifs pour détecter l'infection. Cette détection transdermique de nano-bulles ajoute donc une nouvelle dimension aux diagnostics du paludisme. Elle pourrait, à l'avenir, supporter le diagnostic et le dépistage rapide et hautement sensible par le personnel non médical dans des conditions de terrain, y compris la détection de maladies précoces et asymptomatiques. S'ajoute à cela un aspect curatif avec la destruction spécifique des GR parasités qui entrent dans le champ du laser. Cet aspect a pour le moment été développé avec succès pour l'espèce *P. falciparum* dans un modèle de souris dite « humanisé » acceptant du sang humain.



*Figure 24. Diagnostic transdermique du paludisme (Lukianova-Hleb, E.Y. 2015)*

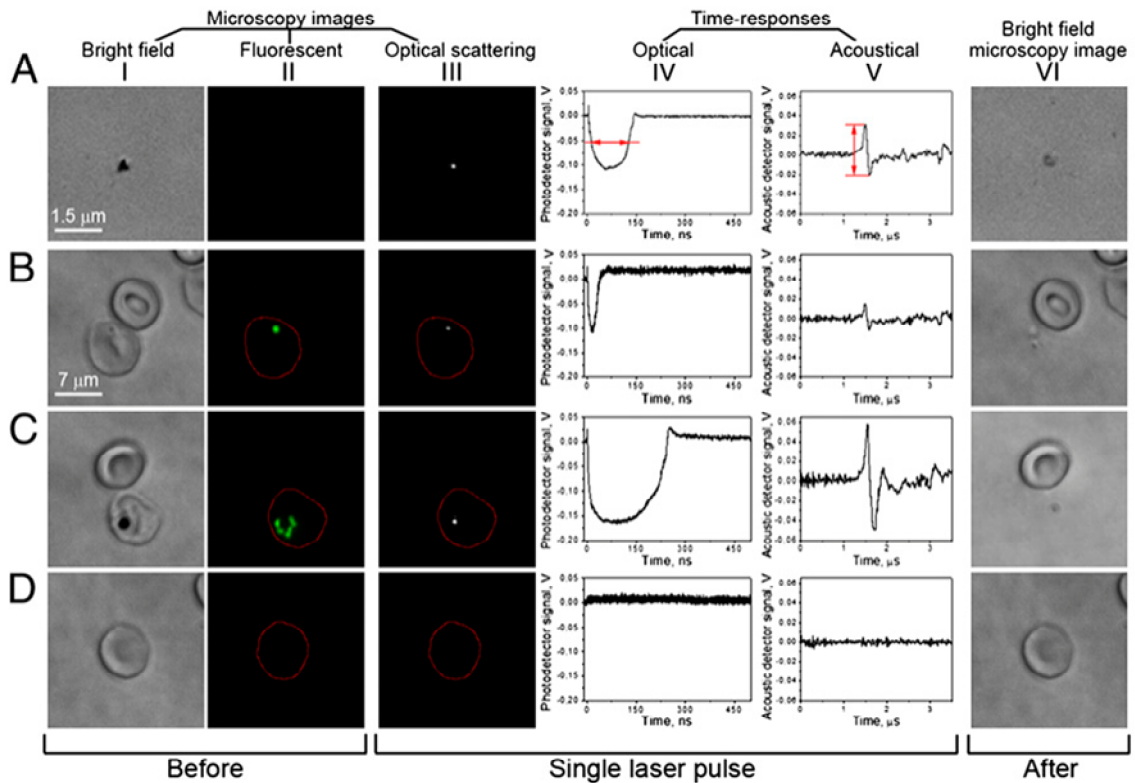
**Prototype expérimental d'un dispositif de diagnostic du paludisme avec le laser pulsé et la sonde intégrée sur un poignet humain. B) Diagramme fonctionnel du prototype et du principe d'excitation optique transdermique avec détection acoustique des nanobulles de vapeurs générées autour de l'hemozoine dans les globules rouges infectés par le paludisme.**

**Flèches vertes = impulsions laser et H-VNB = nano-bulle de vapeur générée par l'hémozoine**



*Figure 25. Principe du diagnostic transdermique du paludisme (Lukianova-Hleb, E. Y. 2014)*

**(A) Génération induite par excitation laser des grains d'hémozoine, de nano-bulles de vapeur (H-VNB = Hemozoin-Generated Vapor Nanobubbles) à l'intérieur d'un parasite du paludisme dans un globule rouge infecté (iRBC = infected Red Blood Cell). (B) Détection des signaux de pression de la nano-bulle par un détecteur optique (OD) et (C) Détection d'une trace acoustique par un transducteur ultrasonore (UT).**



. Figure 26. Effet du laser pulsé sur les globules rouges parasités (Lukianova-Hleb, E.Y. 2014)

L'exposition au laser pulsé (532 nm, 40 ml cm) de l'hémozoïne isolée et des globules rouges humains parasités par *P. falciparum* en culture génère des nano-bulles détectables optiquement et acoustiquement avec destruction des GR infectés. (A) Nanoparticules d'hémozoïne dans l'eau. Les flèches rouges montrent comment mesurer la durée de vie de la trace optique (IV) et de l'amplitude acoustique (V) (B) Globule rouge humain infecté par le stade précoce « ring » ou « anneau » de *P. falciparum* (en bas) et non infecté (en haut). (C) Globule rouge humain infecté par le stade schizonte mature de *P. falciparum* (en bas) et non infecté (en haut). (D) Globule rouge humain non infecté. (I) Images en microscopie à contraste de phase avant l'impulsion laser. (II) Images de fluorescence SYBR-green I qui révèlent la présence du parasite (marquage du matériel nucléaire) avant l'impulsion laser. (III) Même marquage que II après action du laser. (IV) Traces de diffusion optique avec des signaux spécifiques aux nano-bulles dans B et C. (V) Traces acoustiques avec des signaux spécifiques à la nano-bulle dans B et C. (VI) Images en microscopie à contraste de phase après impulsion laser.

Cependant toutes ces nouveautés ne répondent pas à l'ensemble des exigences requises pour le diagnostic en urgence d'un accès palustre. Elles peuvent être un plus et trouver une indication dans un objectif spécifique du diagnostic : sensibilité pour les infections asymptomatiques (bandelettes avec amplification du signal, LAMP PCR), spécificité pour les co-infections (PCR) ou encore faible cout, innocuité et rapidité (diagnostic transdermique) mais elles ne remplacent pas le diagnostic en microscopie optique vieux de plus d'une centaine d'année qui nécessite une expertise technique et du temps d'apprentissage. Compte tenu de tous ces éléments le diagnostic microscopique avec une reconnaissance d'image automatique par un logiciel dédié apparait une solution adaptée.

**Tableau 5. Le diagnostic biologique du paludisme, les points clés**

Le diagnostic du paludisme d'importation devrait associer une technique sensible (goutte épaisse, QBC ou technique de biologie moléculaire à réponse rapide) à un frottis mince (évaluation de la parasitémie et identification des espèces) afin de rendre un diagnostic dans les deux heures.
L'association d'un frottis mince et d'un TDR (test de diagnostic rapide) est une alternative quand cet algorithme ne peut être mis en œuvre.
Le TDR doit impérativement détecter l'antigène HRP2 pour le diagnostic spécifique du paludisme à <i>P. falciparum</i>
L'association frottis mince et TDR n'a cependant pas une sensibilité optimale et en cas de premier résultat négatif ou douteux, il est nécessaire de réitérer le diagnostic 12h à 24h plus tard. Un contrôle par PCR peut également être réalisé dans une structure de référence (pauci-infection, identification d'espèce ou recherche d'association d'espèces)
Des techniques de diagnostic ultrasensibles sont en cours de développement
Une technique théranostique est développée pour traiter en même temps que diagnostiquer l'infection palustre
La mesure de la parasitémie doit être réalisée pour l'espèce <i>P. falciparum</i> et l'espèce <i>P. knowlesi</i>
La parasitémie doit être rendue au clinicien en pourcentage d'hématies parasitées
La mesure de la parasitémie exprime un résultat quantitatif qui est intégré dans le processus décisionnel de prise en charge thérapeutique du patient
L'incertitude de mesure doit être évaluée et communiquée au clinicien par le biologiste au moment du rendu du résultat de la mesure

## II.4. Importance de la mesure de la charge parasitaire

### II.4.1. La charge parasitaire et son évolution

La parasitémie, qui est un reflet indirect mais facilement accessible de la charge parasitaire totale, doit être mesurée pour *P. falciparum* parce qu'elle est un indicateur majeur pour le risque d'accès grave ou la létalité lorsqu'elle est élevée (refs). Le seuil de décision pour le risque d'évolution vers la gravité est très variable suivant les organismes experts qui les établissent et pour un même organisme, il peut évoluer dans le temps (exemple de l'OMS 2000, 2010, 2015 ?). La valeur choisie est très dépendante de facteurs comme

l'ethnie ou l'âge mais elle dépend probablement beaucoup de la conviction des experts qui fixent ce seuil (ref).

#### **II.4.2. La mesure de la charge parasitaire**

La charge parasitaire pour les espèces autres que *P. falciparum* peut être mesurée directement à partir d'un échantillon de sang total d'un patient. Pour l'espèce *P. falciparum*, du fait du phénomène de cytoadhérence qui survient à environ la moitié du cycle 24-28 heures à partir du stade trophozoïte âgé, la mesure directe par comptage des parasites à partir d'un échantillon de sang total ne sera qu'un reflet indirect de la charge parasitaire globale. Les GRP séquestrés dans les capillaires ne sont pas pris en compte (Dondorp, A. M. 2005). Une mesure plus juste peut être réalisée en dosant la protéine riche en histidine 2 de *P. falciparum* (HRP-2). Cette mesure est davantage corrélée avec la biomasse parasitaire et avec la gravité (). Un autre marqueur semble être utilisable en pratique clinique, la numération des leucocytes contenant du pigment malarique (). Cependant, la corrélation entre la parasitémie et la charge parasitaire est acceptable pour définir des seuils décisionnels et cet outil simple et peu onéreux reste le plus utilisé actuellement dans la pratique courante des laboratoires.

### *III. Comparaison de méthodes*

Nous proposons de développer et d'évaluer en collaboration avec la société xRapid, une technique automatisable de diagnostic microscopique par un logiciel de reconnaissance d'images susceptible de répondre à l'ensemble des impératifs du diagnostic de paludisme en urgence. Cette technique pourrait à terme remplacer la goutte épaisse et le frottis sanguin mince dans tous les laboratoires de biologie médicale pour un coût individuel du test acceptable, c'est à dire supportable par les programmes nationaux de lutte contre le paludisme en zone d'endémie africaine. Il s'agit d'un processus complexe pour lequel on distingue 3 sous processus (SP) :

SP-1 : Le diagnostic du paludisme sur une goutte épaisse (GE)

Qualitatif

SP-2 : Le diagnostic du paludisme sur le frottis sanguin mince (FSM)

Qualitatif

SP-3 : La mesure de la parasitémie dans les infections à *P. falciparum*

Quantitatif

Notre travail de thèse porte plus spécifiquement sur le sous-processus 3, la mesure de la parasitémie des échantillons positifs à *P. falciparum*. Comme nous l'avons vu ce paramètre est crucial pour la mise en œuvre de la prise en charge médicale la mieux adaptée. Or cette mesure comporte, dans les conditions actuelles une incertitude non négligeable qui n'est pourtant pas prise en compte dans le rendu du résultat au clinicien en charge du patient.

### III.1. Matériel et méthode

Constitution d'un dossier de validation de méthode, selon le *SH form GTA 04* du COFRAC pour l'accréditation des laboratoires selon la norme 15186 (validation type portée B).

#### III.1.1. Lieux de l'étude

##### III.1.1.1. Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de la Pitié-Salpêtrière, CNR du Paludisme, laboratoire associé

Pour l'exercice de ses missions de surveillance des maladies infectieuses, Santé publique France s'appuie sur un réseau de 38 CNR et 5 CNR – Laboratoires experts (article L 1413-3 du code de la santé publique)<sup>23</sup>. Les Centres nationaux de référence (CNR) sont des laboratoires localisés au sein d'établissements publics ou privés de santé, d'enseignement ou de recherche. Ils sont nommés pour 5 ans par le ministre chargé de la Santé sur proposition de Santé publique France<sup>24</sup>.

Les centres nationaux de référence (CNR) ont pour missions <sup>25</sup>: **l'expertise** concernant la microbiologie et la pathologie des agents infectieux, le développement, l'optimisation, la validation et la diffusion d'examens de biologie médicale ; l'identification et la confirmation des agents pathogènes, en particulier ceux pour lesquels il n'existe pas de dispositif médical de diagnostic in vitro répondant aux conditions fixées par les articles L. 5221-

---

<sup>23</sup>

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000032723470&categorieLien=id>

<sup>24</sup> <http://invs.santepubliquefrance.fr/Espace-professionnels/Centres-nationaux-de-reference>  
(consulté le 26/05/2017)

<sup>25</sup> <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/2016/6/16/AFSP1615460A/jo/texte/fr>

2 ou L. 5221-5 du code de la santé publique ; **le conseil** scientifique ou technique en réponse à toute demande du ministre chargé de la santé, Santé publique France et des professionnels de santé ; la contribution à **la surveillance épidémiologique** : - par l'animation d'un réseau de laboratoires auxquels peuvent être confiés la réalisation d'examens et qui en transmettent ensuite les résultats,- par la réalisation des analyses nécessaires à la surveillance des agents pathogènes ; **l'alerte** immédiate de Santé publique France, du ministère chargé de la santé et, le cas échéant, de l'agence régionale de la santé de toute constatation de nature à présenter un risque ou une menace sur l'état de santé de la population.

Ainsi, pour répondre au mieux à ses missions sur l'ensemble des territoires français, le CNR du paludisme se réorganise pour la période 2017-2022 avec un laboratoire coordonnateur et trois laboratoires associés. Pour plus de visibilité et d'efficacité dans leur organisation, les laboratoires du CNR se regroupent en un pôle « **zones non endémiques** » chargé du paludisme d'importation en France métropolitaine, aux Antilles et sur l'île de Réunion et un pôle « **zones endémiques** » s'intéressant aux territoires présentant une transmission autochtone du paludisme, la Guyane et l'île de Mayotte (Tableau 4).

Mon travail de thèse s'effectue dans le laboratoire associé du CNR du Paludisme à la Pitié-Salpêtrière, dans le cadre de la mission d'expertise, plus spécifiquement à la mission de participation au développement, à l'optimisation, à la validation, à la diffusion et aux recommandations concernant les examens de biologie médicale (techniques de diagnostic, d'identification et/ou de typage).

## **Le laboratoire associé Pitié Salpêtrière**

Ce laboratoire associé est constitué au sein du service de Parasitologie-mycologie, Centre Hospitalier Universitaire Pitié-Salpêtrière (PSL), AP-HP, adossé à l'Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique iPLESP, UMR\_S 1136 (INSERM/UPMC) et à l'UMR\_S 1134 (Inserm-UPD) Laboratoire GR-EX (Biologie Intégrée du Globule Rouge) à Paris. Ses missions spécifiques au sein de ce CNR sont, l'organisation de la surveillance épidémiologique des cas de paludisme des zones non endémiques (France métropolitaine, Antilles françaises, Ile de la Réunion) et le suivi biologique des cas graves sur le territoire métropolitain. Ce laboratoire possède l'expertise en épidémiologie et a développé la technologie nécessaire à la surveillance biologique des cas graves de paludisme (mesure automatisée de la parasitémie et des hématies pitées).

**Tableau 6. Organisation schématique et activités au sein du CNR du Paludisme**

<b>CNR du Paludisme</b> <b>Coordination Sandrine Houzé</b> Coordination adjointe Lise Musset			
Pôle Zones non endémiques			Pôle Zones endémiques
Laboratoire coordonnateur <b>Hôpital Bichat</b> Paris  Sandrine Houzé Coordonnatrice Responsable	Laboratoire associé <b>Hôpital Pitié Salpêtrière</b> Paris  Marc Thellier Responsable	Laboratoire associé <b>IRBA</b> Marseille  Bruno Pradines Responsable	Laboratoire associé <b>IPG</b> Cayenne  Lise Musset Coordonnatrice adjointe Responsable
BIOLOGIE - Expertise diagnostique (Paludisme, Babesia) - 80% Phénotypage -100% Génotypage -Cryoconservation	CLINIQUE & BIOLOGIE -Accès graves  EPIDEMIOLOGIE -Surveillance France métropolitaine	BIOLOGIE - Expertise diagnostique - 20% Phénotypage (PACA) -Nouveaux marqueurs de résistance - Dosage plasmatiques - Cryoconservation  EPIDEMIOLOGIE - Surveillance des pays en zone tropicale d'intérêt 'militaire'  EXPERTISE ENTOMOLOGIQUE	BIOLOGIE (Guyane, Mayotte) - Expertise diagnostique - Caractérisation du risque par dépistage actif - Phénotypage (PACA) - Nouveaux marqueurs de résistance -Cryoconservation - Expertise d'isolats étrangers  EPIDEMIOLOGIE (Guyane) -Analyse tendancielle annuelle  CONSEILS -Participation aux groupes d'experts locaux et internationaux

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

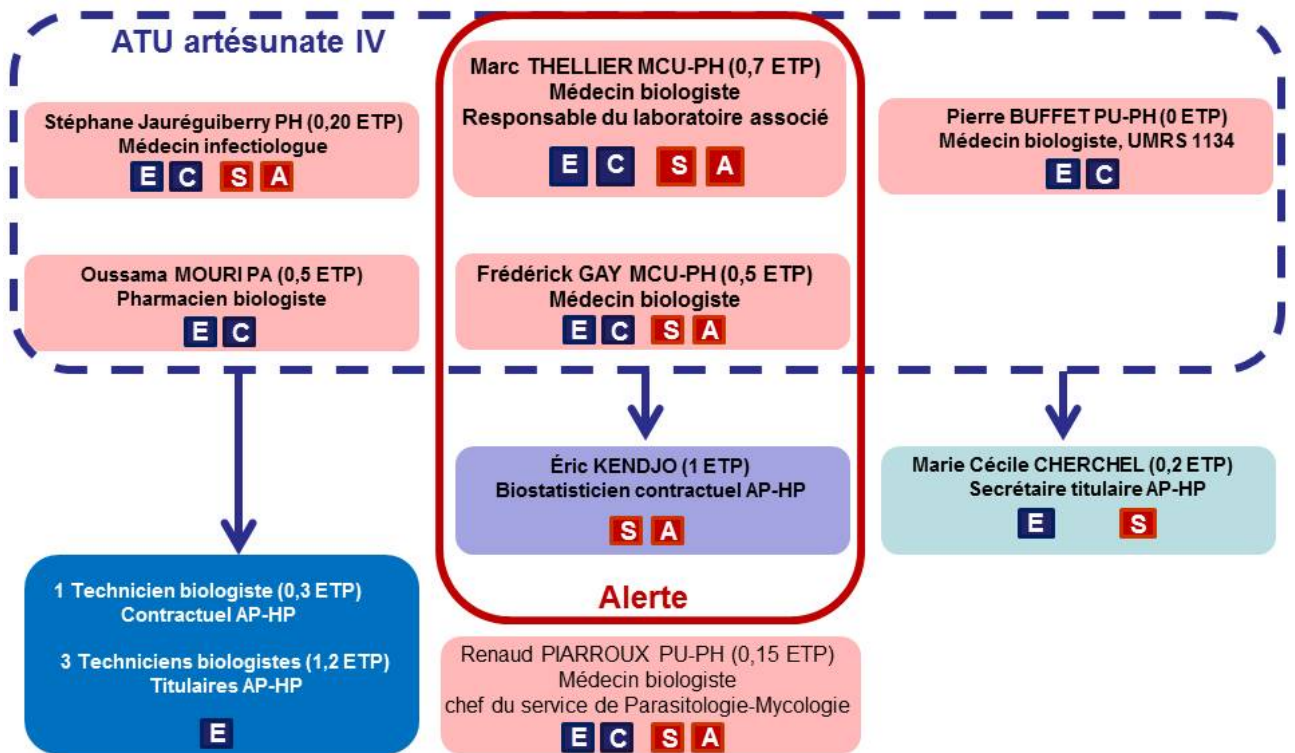
Le laboratoire associé AP-HP, Pitié-Salpêtrière assure pour la France métropolitaine les missions suivantes :

- ✓ Pour la partie épidémiologie, surveillance et alerte :
  - Le suivi et la gestion du réseau des correspondants du CNR Paludisme (attribution des mots de passes, gestion des connexions, diffusion des messages et alerte, mise à jour de la documentation, maintenance...)

- Le développement du logiciel de déclaration en ligne Voozadoo,
  - La sécurité du site de déclaration en ligne et des données, en lien avec la société Epiconcept,
  - La gestion des données (contrôles de saisies, recherche d'informations manquantes, correction des erreurs ...),
  - L'analyse statistique des données épidémiologiques et l'identification des tendances évolutives annuelles
  - L'organisation de la réunion nationale annuelle,
  - L'animation du site Internet
  - La participation à l'identification et à l'investigation des signalements des cas de paludisme inhabituels, en particulier les cas autochtones de France métropolitaine
- ✓ Pour la partie clinique et biologique du paludisme grave
- La coordination et le suivi de la mise à disposition de l'artésunate IV en ATU pour le traitement des accès palustres graves sur l'ensemble du territoire national (mission déléguée par l'ANSM).
  - L'investigation des cas de paludisme dont la présentation clinique répond aux critères de gravité, physiopathologie, réponse aux traitements, effets indésirables
  - Les conseils aux praticiens pour la prise en charge thérapeutique initiale de l'accès grave, pour le diagnostic ou pour la surveillance des effets indésirables du médicament

- La mesure de la parasitémie et de la « pitémie » par une technique de cytométrie en flux pour évaluer le risque de survenue d'une anémie hémolytique post artésunate,

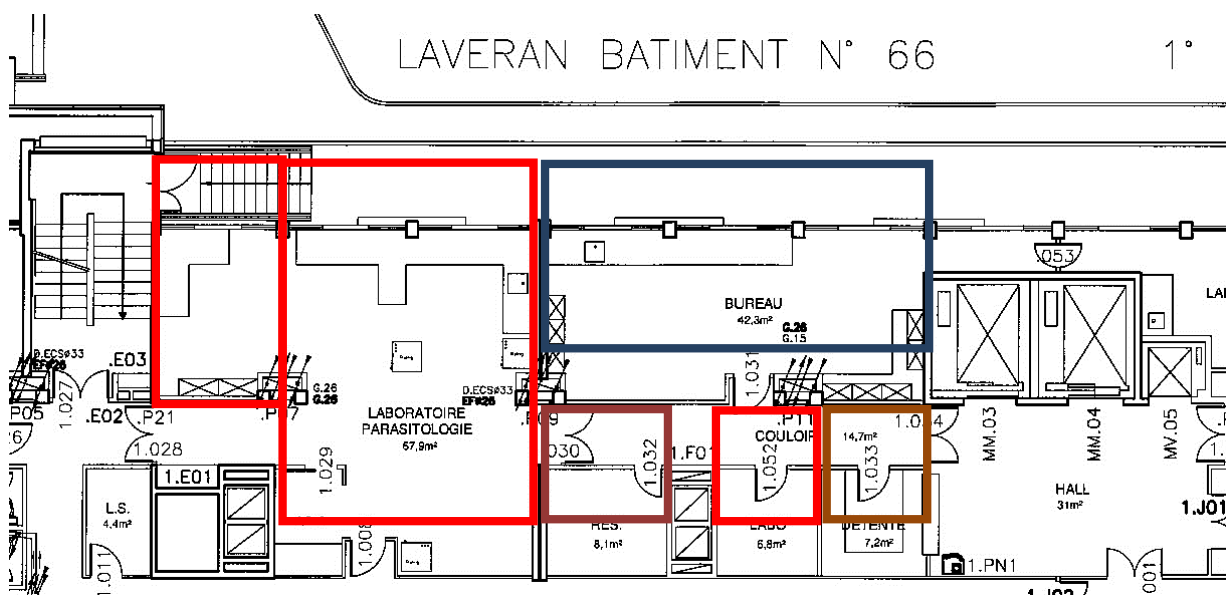
Une particularité de l'action de ce CNR est qu'il participe pleinement à la prise en charge médicale des patients avec la réalisation d'analyses spécifiques : vérification d'espèces (expertise microscopique, PCR), marqueurs moléculaires de résistance, mesure de la sensibilité *in-vitro* des isolats.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



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

*Figure 27. Organigramme du laboratoire associé Hôpital Pitié-Salpêtrière.*

L'Hôpital Pitié-Salpêtrière met à disposition du CNR du Paludisme site PSL environ 135 m<sup>2</sup> de surfaces de locaux au premier étage du Pavillon Laveran (Figure).



**Figure 28. CNR du Paludisme Hôpital Pitié-Salpêtrière, Pavillon Laveran 1er étage, plan des locaux**

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

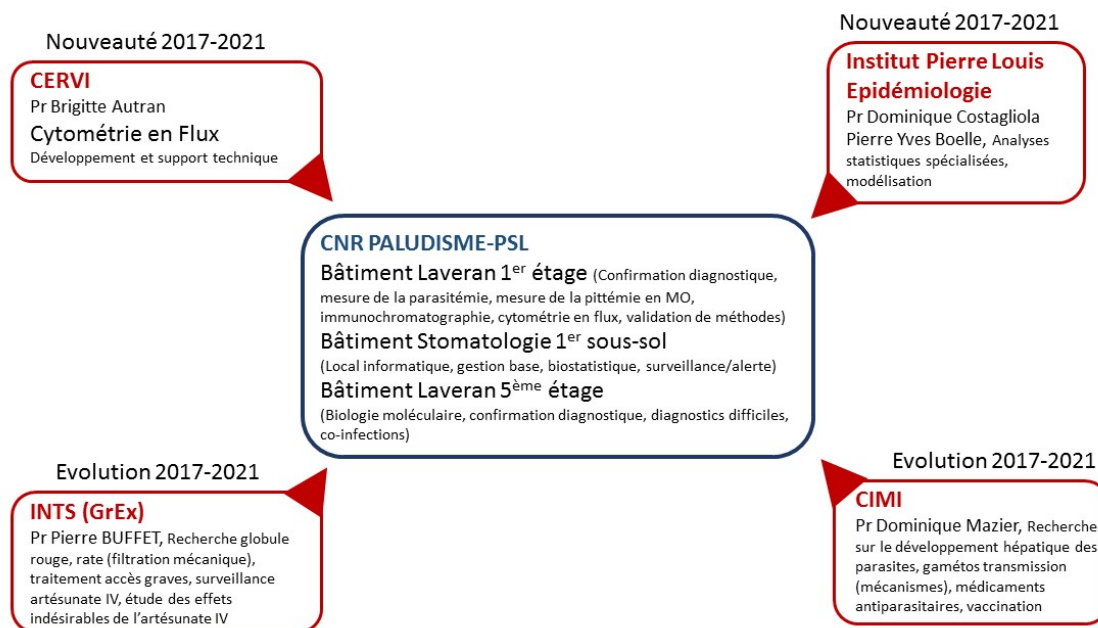
- ✓ Un microscope à contraste de phase et contraste interférentiel « Nomarski »,
- ✓ Un cytomètre en flux de type Accuri 6 ,
- ✓ Une technique de filtration sur microplaques des globules rouges à travers des couches de microsphères.

L'équipe du CNR du Paludisme du laboratoire associé Pitié-Salpêtrière est directement impliquée dans 3 thématiques de recherche regroupées autour de l'épidémiologie, la physiopathologie et la thérapeutique des accès graves et le contrôle de la transmission :

- ✓ En épidémiologie à l'Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (iPLESP), UMR S 1136 dirigée par le Pr D. Costagliola, au sein de l'équipe 1 : Surveillance et modélisation des maladies transmissibles dirigée par Pierre Yves Boelle, nous avons pour objectifs d'évaluer le système de surveillance actuel en particulier la représentativité pour les cas mais également pour les accès graves et pour les décès, puis de déterminer les dénominateurs pour l'incidence globale et les incidences par pays lorsque cela est pertinent avant de développer des modèles prédictifs (un étudiant en thèse sur le sujet).
- ✓ Dans l'étude de la physiopathologie de l'accès grave et des effets indésirables de l'artésunate IV, en collaboration avec le Pr P. Buffet et son équipe du laboratoire d'excellence GR-EX, UMRS 1134. L'infection par *Plasmodium falciparum* provoque de nombreuses altérations de globules rouges conduisant à la rétention de globules rouges parasités dans la microcirculation. Notre objectif de recherche est de mieux comprendre les interactions entre les globules rouges infectés à différents stades de développement du parasite et des espaces microcirculatoires particuliers dépourvus d'endothélium dans la rate et la moelle osseuse. Chez les patients impaludés, ces interactions contribuent - avant et après le début du traitement antipaludique – au contrôle de la multiplication du parasite. Le rôle de la rate (seuils de rétention des GR parasités) dans la persistance de l'infection (filtres des stades asexués) ou dans la transmission du parasite (filtre des gamétocytes) sera exploré ainsi que la clairance parasitaire splénique chez les patients traités par artémisinine. Grace au réseau de

correspondants du Centre national de référence pour le paludisme, nous mettrons en œuvre le suivi des patients français traités avec l'artémisinine en tant que système de surveillance sentinelle pour détecter la propagation de la résistance de *P. falciparum* à l'artémisinine au continent Africain. Grâce à des études sur le terrain en Afrique et en Asie du Sud-Est, nous contribuerons à élucider les déterminants de la clairance parasitaire chez les patients traités par artémisinine.

- ✓ Dans l'étude des stades de développement hépatique et l'évaluation de molécules actives sur ces stades, en collaboration avec le Pr D. Mazier, grâce aux correspondants du CNR du paludisme encore une fois (capture des isolats cliniques) à l'identification et validation pré-clinique de nouvelles cibles thérapeutiques. Cette recherche concerne principalement la biologie et l'immunologie des stades hépatiques des *Plasmodium* humains. Différents modèles développés *in vitro* (hépatocytes primaires humains et simiens) et *in vivo* (souris humanisées ou simianisées), peptides pénétrants, permettent de travailler sur les phénomènes de quiescence/réactivation des hypnozoïtes : pour une meilleure compréhension de ce phénomène biologique et pour identifier de nouvelles drogues/stratégies qui pourraient mener à un traitement innovant et non toxique.



**Figure 29. CNR du Paludisme Hôpital Pitié-Salpêtrière, schéma des liens fonctionnels avec les partenaires pour la recherche et le développement des techniques**

Les laboratoires du CNR Paludisme sont impliqués dans le processus de certification ISO 15189-2012 pour les laboratoires médicaux. La norme a été élaborée par l'Organisation internationale de normalisation du Comité technique 212 (ISO/TC-212). La norme ISO 15189 définit les règles à suivre par les laboratoires médicaux dans le développement de leurs systèmes de gestion de la qualité et d'évaluation de leur propre compétence. Elle est utilisée par les organismes d'accréditation (COFRAC pour la France) pour reconnaître la compétence et la maîtrise des laboratoires d'analyses médicales à réaliser les analyses proposées <sup>26</sup>. Concernant les laboratoires du CNR du Paludisme, les membres du personnel ont les qualités et diplômes requis pour

<sup>26</sup> <http://www.cofrac.fr/en/home/>

leurs postes; les procédures sont écrites et régulièrement mises à jour en fonction des exigences de la norme. Toutes les activités d'analyse sont enregistrées. Les laboratoires du CNR du Paludisme souscrivent à un programme d'évaluation externe de la qualité pour le diagnostic du paludisme.

### **III.1.1.2. La société xRapid**

La société xRapid est une société de nouvelle technologie créée en 2014 par le professeur David Mendels. Le Pr Mendels a développé une solution mobile pour le diagnostic du paludisme après avoir assisté à une conférence sur le sujet. Il a créé et développé les logiciels de reconnaissance d'images xRapid pour produire des tests diagnostiques automatisés du paludisme, suffisamment puissant pour être déployés n'importe où et avec le potentiel de reconnaître d'autres maladies ainsi que des minéraux.

La société est basée principalement à Londres, au Royaume-Uni, avec des bureaux à Marseille, en France, à Jakarta, en Indonésie et à San Francisco, aux États-Unis<sup>27</sup>.

La technologie innovante évaluée : l'application xRapid-Lab est un logiciel capable de reconnaître et de compter les parasites et les GR sur des lames de patients ou de cultures de *Plasmodium*. À l'aide d'un iPhone attaché à un microscope optique, l'application xRapid-Lab capture et analyse les images à partir d'une lame de sang total étalé en frottis mince sur une lame de verre et coloré au Giemsa. Il compte en quelques minutes la parasitémie, en différenciant les stades asexués de développement du parasite et les GR. La solution xRapid-Lab fournit un rapport détaillé pour chacun des échantillons

---

<sup>27</sup> <http://www.xrapid.org/>

testés, proposant un moyen simple de mesure de la parasitémie des différents stades parasitaires dans le sang des patients ou dans les cultures *in-vitro*.

### **III.1.2. Sous processus 3 = mesure de la parasitémie sur le FSM**

#### **III.1.2.1. Matériaux de référence**

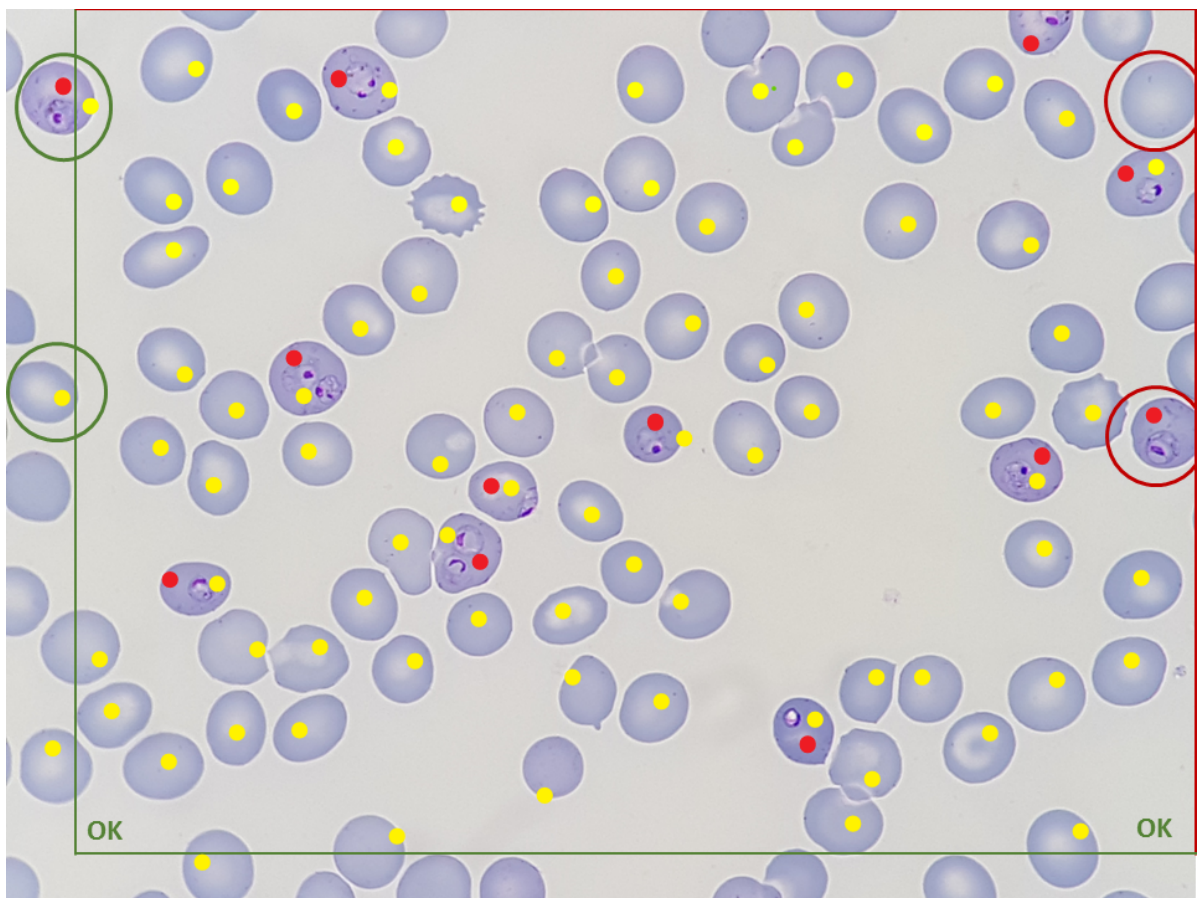
Le matériau de référence est selon la définition du SH GTA 04, « Un matériau suffisamment homogène et stable en ce qui concerne des propriétés spécifiées, qui a été préparé pour être adapté à son utilisation prévue pour un mesurage ou pour l'examen de propriétés qualitatives ». Pour notre travail, nous avons préparés 5 lames de références, à partir d'isolats cliniques de patients avec une infection prouvée avec l'espèce *P. falciparum* seule confirmée en biologie moléculaire.

La parasitémie des lames de références a été établie selon la méthode suivante :

A partir d'un frottis sanguin mince coloré au Giemsa selon la méthode du laboratoire en annexe X, des images de 60 champs microscopiques au grossissement x1000, sont réalisées à l'aide d'un smartphone (Samsung Galaxy S6). Le comptage des GR parasites capturés par l'appareil lors de la prise de vue est vérifié immédiatement sur les champs microscopiques, avant d'être reporté sur une fiche dédiée. Les images sont ensuite transférées dans un fichier .ppt. Un cadre de lecture est ajouté. Par convention, les hématies chevauchant deux des cotés sont prises en compte ainsi que deux des angles. Ce cadre permet d'exclure les hématies non visibles entièrement. Par exemple, sur les côtés rouges, les hématies non visibles entièrement (cercle

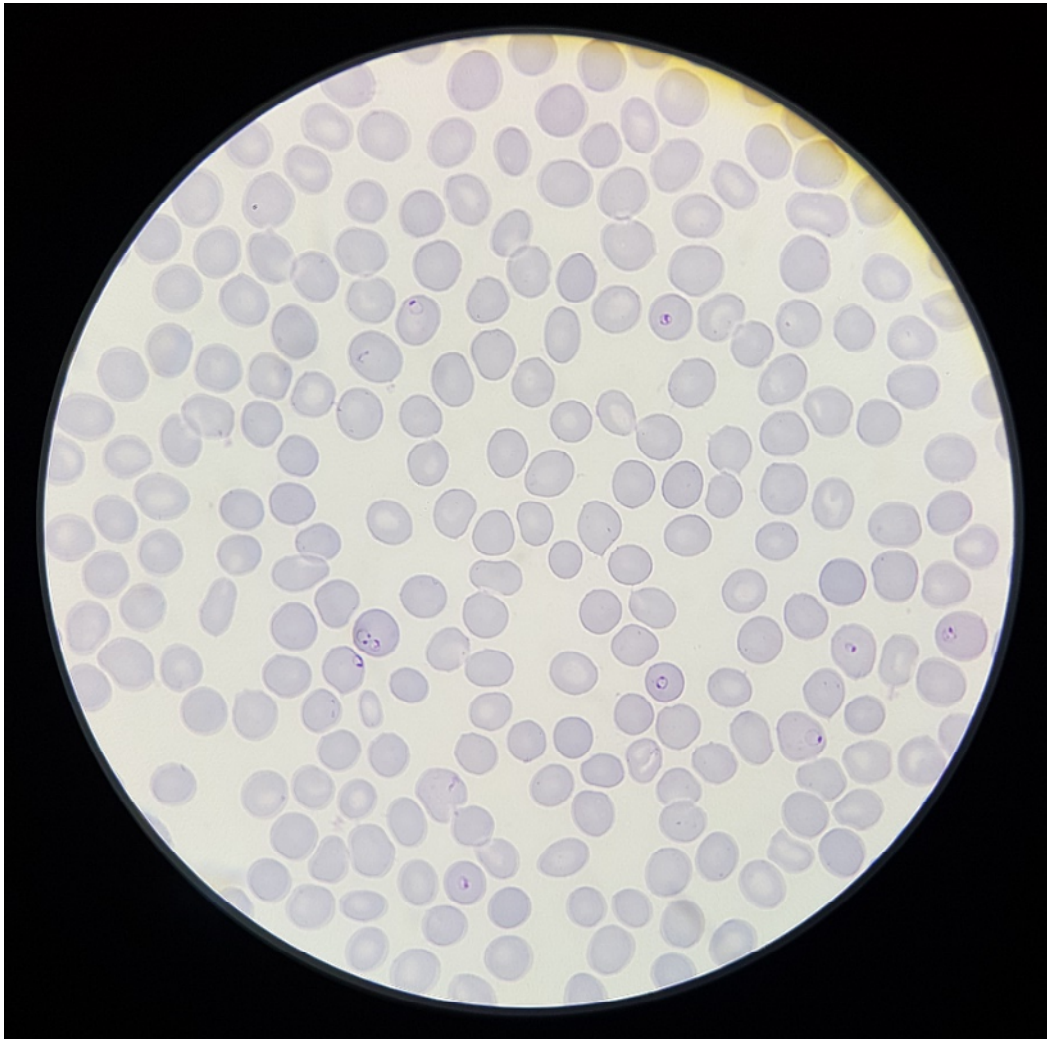
rouge) ne sont pas comptées, alors que sur les côtés verts les hématies chevauchantes, même touchant la ligne (cercle vert), sont prises en compte.

*Figure. Photo d'un champ microscopique prise avec un smartphone Samsung Galaxy S6, intégrée dans le logiciel PowerPoint de Microsoft office360 avec marquage des globules rouges avec l'outil stylet*



### Parasitémie « classique »

Il s'agit d'une méthode dite « manuelle ». La mesure est réalisée par un opérateur humain en microscopie optique au grossissement x1000 en se positionnant sur une zone où les GR sont répartis de manière homogène sans se chevaucher. Cette méthode de comptage consiste à estimer le nombre de GR présents sur un champ microscopique en comptant le nombre de GR présents sur un quart de champs. La valeur obtenue est ensuite multipliée par le nombre de champs lus (20 à 30 champs) pour avoir le dénominateur qui va servir à calculer la parasitémie. Le numérateur correspond au nombre de globules rouges parasités compté sur la totalité des champs lus. On notera qu'aucun repère ne matérialise le quart de champs utilisé pour la numération.

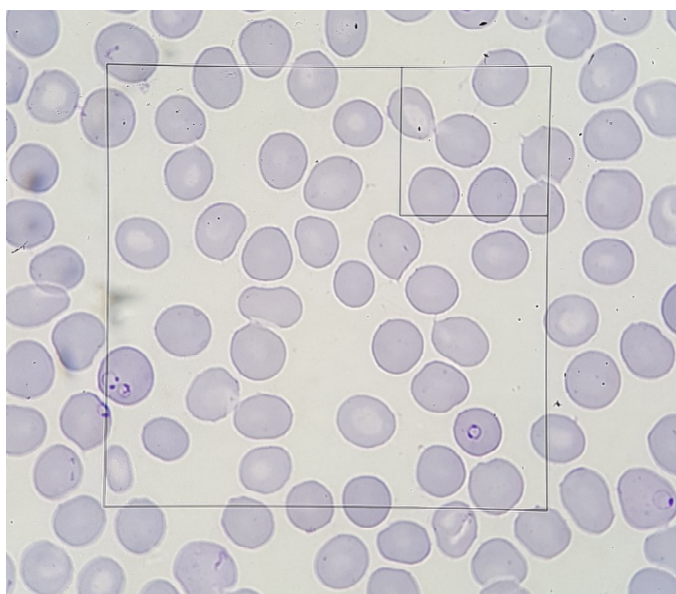


*Figure 30. Photographie d'un champ microscopique au grossissement x1000 d'un frottis sanguin mince d'un sang parasité par Plasmodium falciparum.*

### Parasitémie Miller

Il s'agit d'une méthode dite « manuelle ». La mesure est réalisée par un opérateur humain en microscopie optique. L'estimation du pourcentage des globules rouges infectés par *P. falciparum* sur un FSM à l'aide d'une cellule de Miller a été décrit par Marianne Lebbad dans *Methods in Malaria Research*

5<sup>e</sup> édition, 2008 (ref) <sup>28</sup>. Elle s'est inspirée de la méthode décrite par G. Brecker pour la numération des réticulocytes (Brecker, G. 1950). Dans cette méthode, le dénominateur est estimé à l'aide d'une cellule gravée sur une lentille. Cette cellule se compose d'un petit carré à l'intérieur d'un carré dix fois plus grand (Figure 31).



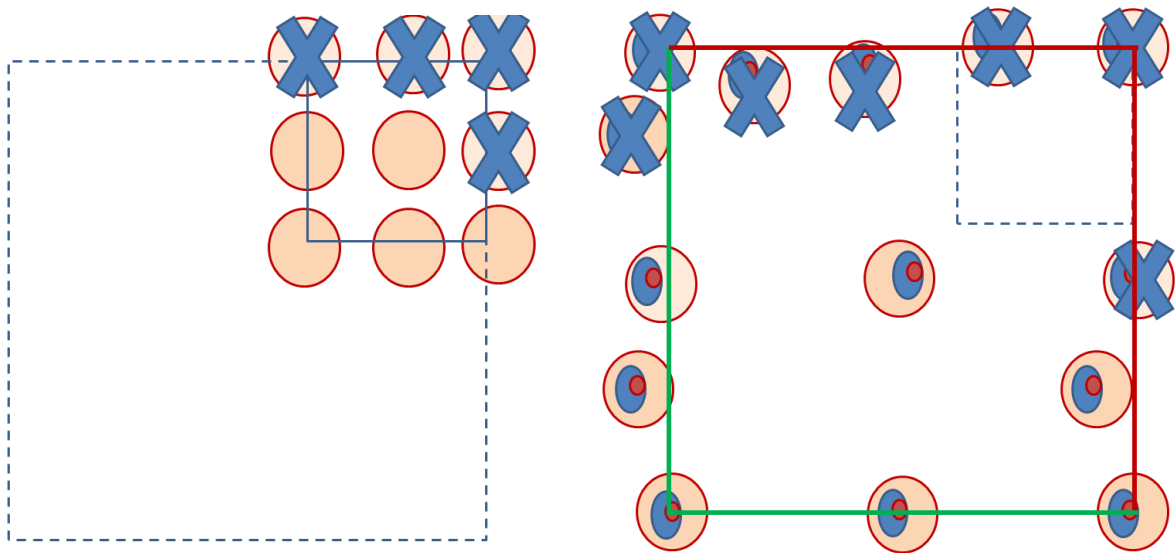
***Figure 31. Photographie d'un champ microscopique au grossissement x1000 d'un frottis sanguin mince d'un sang parasité par Plasmodium falciparum avec une cellule de Miller***

La mesure est basée sur le principe de l'estimation du compte d'un événement rare dans un événement fréquent. Ici l'événement rare correspond aux hématies parasitées, qui vont être comptées sur le grand carré. Les globules rouges sont les événements fréquents et sont comptés sur le petit carré. Par convention, les hématies chevauchant des côtés sont comptées ainsi que deux angles, ceci est valable pour les deux carrés. La mesure est répétée sur 50

---

<sup>28</sup> [http://ki.se/sites/default/files/methods\\_in\\_malaria\\_research.pdf](http://ki.se/sites/default/files/methods_in_malaria_research.pdf)

champs, choisis aléatoirement. La lecture se fait au grossissement x1000 sur un microscope optique, sur les zones du frottis où les hématies sont réparties de manière homogène sans chevauchement.



*Figure 32. Méthode de comptage des globules rouges sur une cellule de Miller*

Les résultats sont rapportés sur une fiche, et la parasitémie calculée avec la formule suivante :

$$\text{Parasitémie en \%} = \frac{\text{Total GRP\_GC}}{\text{GR\_PC} \times 10} \times 100$$

### Parasitémie xRapid

Dans cette situation, la quantification des parasites ainsi que des globules rouges est effectuée par un logiciel de reconnaissance d'images et non par le microscopiste.

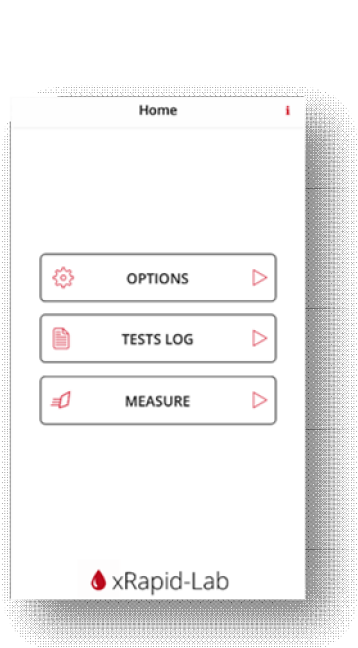
A l'aide d'un smartphone (iPhone 6S), branché sur l'oculaire d'un microscope optique équipé d'une lampe du type LED, on arrive à capturer des images d'un frottis sanguin mince, qui vont être analysées par le logiciel afin d'identifier les globules rouges et les parasites et de donner un compte précis et une parasitémie.



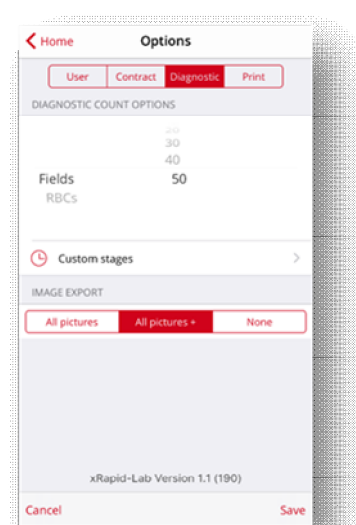
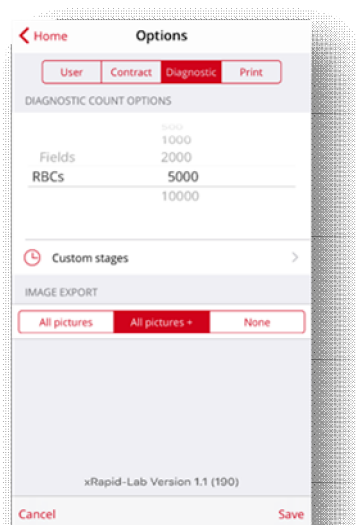
*Figure 33. Dispositif xRapid composé d'un microscope à lampe LED et d'un iPhone 6S avec sa coque et le cylindre qui permet la fixation sur l'oculaire du microscope*

Le dispositif comprend un iPhone 6S muni d'un système d'attache composé d'une coque et d'un cylindre. Le cylindre est imprimé en 3D pour s'adapter au microscope fourni avec le dispositif (Figure). L'application permettant de quantifier les parasites sur un FSM est xRapid-Lab. C'est une application libre disponible sur App Store.

L'interface simple et fonctionnelle, permet d'identifier l'utilisateur et l'échantillon à analyser, de paramétrer l'application, et de stocker les comptes rendus d'analyses. Elle offre la possibilité de choisir le nombre de champs à analyser (de 10 à 50) ou de fixer un nombre d'hématies à atteindre (de 500 à 10 000). Les images des champs capturées sont enregistrées systématiquement dans la galerie photos et les comptes rendus stockés sur l'application.



*Figure. Ecran de démarrage de l'application*

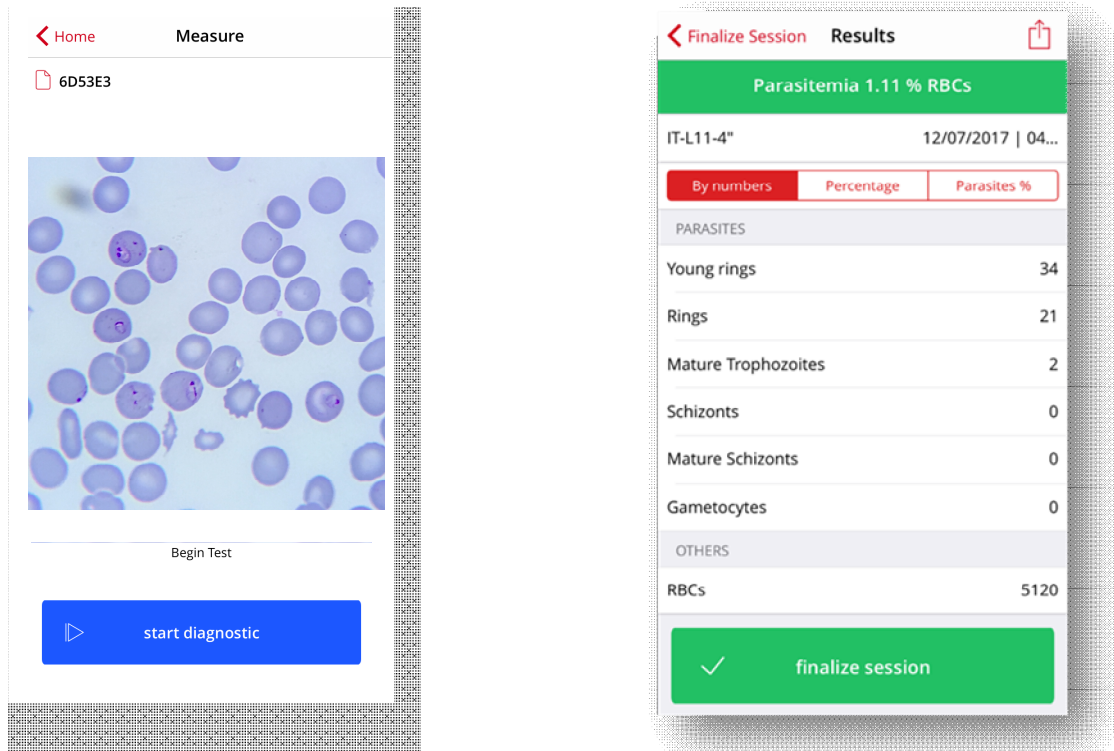


*Figure. Captures d'écran des options de paramétrage*

Dès que le smartphone est branché sur le microscope, application peut être lancée.

L'étape de la mise au point est cruciale, elle permet d'avoir une image nette et interprétable. Comme pour les trois premières méthodes, la lecture se fait sur

des zones où les hématies réparties d'une façon homogène. Le déplacement sur la lame se fait manuellement à l'aide des commandes de déplacement du microscope, à chaque champ l'utilisateur capture une image. L'analyse s'arrête spontanément quand le nombre d'hématies ou de champs préprogrammé est atteint.



*Figure. Capture des écrans de démarrage et de fin d'une analyse*

L'application offre la possibilité de sauvegarder, exporter et convertir les compte-rendu sous différents formats (PDF, PNG).

### III.1.2.2. Répétabilité

Fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de répétabilité -  
Différence entre les résultats du dosage répété de la même analyse effectuée dans les mêmes conditions.

L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyte concerné. L'évaluation de la répétabilité est indispensable lors de l'installation d'un nouvel analyseur afin de connaître les performances initiales.

Pour un même analyseur, ce calcul doit être effectué pour **chaque analyte** à mesurer et à **plusieurs niveaux de concentration**.

Nous avons sélectionné 5 lames de FSM, de parasitémies différentes : 0,7%, 1,4%, 3,4%, 3,8% et 11,8%. Pour le logiciel xRapid, la répétabilité est faite sur les 5 FSM. Chaque lame a été lue 10 fois par le même opérateur, dans les mêmes conditions, avec le même matériel et dans le délai le plus court possible.

Pour les méthode classique et Miller, 3 lames ont servi à évaluer la répétabilité, celles portant les parasitémies : 0,7%,3,4% et 3,8%, dont deux proches du seuil décisionnel fixé à 4%.

### III.1.2.3. Fidélité intermédiaire

Fidélité de mesure selon un ensemble de conditions de reproductibilité -  
Différence entre les résultats du dosage répété de la même analyse effectuée dans des conditions différentes.

Il est souhaitable que les niveaux testés pour évaluer la fidélité intermédiaire soient identiques à ceux testés en répétabilité (établissement de la robustesse).

L'essai de fidélité intermédiaire (reproductibilité intra-laboratoire) consiste à analyser un même échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages, ... Il permet de paramétrer les critères d'acceptation des antécédents en combinaison avec les variations biologiques notamment dans le cas de systèmes d'aides à la décision.

Ecart-type= $CV \times m / 100 = \sigma$  *Fidélité intermédiaire*

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Les 5 lames de référence ont été lues par des opérateurs différents (permet de mesurer la variabilité inter opérateurs). Les lames de FSM présentent des parasitémies différentes. La parasitémie classique et la parasitémie Miller ont été mesurées sur nos lames de références par 20 à 25 opérateurs. La parasitémie avec xRapid avec 10 opérateurs différents.

#### **III.1.2.4. Justesse**

La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence (ou valeur vraie).

Dans les LBM, les matériaux de référence certifiés sont peu utilisés en pratique courante ; il est donc difficile de parler stricto sensu de «valeur vraie» et par là-même de justesse.

Une approche de la justesse peut être envisagée en comparant la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible, assimilée à la « valeur vraie » = valeur assignée. L'écart observé correspond au biais. Le biais peut être évalué à partir des résultats obtenus avec des échantillons de contrôle titrés ou des valeurs observées dans des programmes de contrôle interne couplés à une comparaison inter-laboratoire (externalisation des CIQ).

La connaissance de la valeur vraie repose actuellement sur les valeurs assignées associées aux échantillons de contrôle. Ce sont des valeurs consensuelles (moyenne de l'ensemble des participants (si les seuils de décision pour l'examen concerné sont standardisés (HAS, consensus, ...)) ou moyenne par groupe de pairs en fonction des méthodes, des analyseurs ou des fournisseurs).

L'évaluation de l'erreur de justesse ( $E_{\text{justesse}}$ ) se base sur l'estimation d'un écart (biais) obtenu entre la moyenne des résultats de mesure ( $\bar{x}$ ) et la valeur de référence ( $V_{\text{réf}}$ ).

$$E_{\text{justesse}} = \bar{x} - X_{\text{réf}}$$

L'incertitude due à cette erreur de justesse se quantifie à partir de cet écart et du choix d'une loi uniforme :

$$U_{\text{justesse}} = E_{\text{justesse}} / \sqrt{3}$$

Nous utilisons les mêmes lames de référence ayant servi aux tests de répétabilité

### III.1.2.5. Exactitude

L'exactitude est définie comme l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande. Comme la justesse, l'exactitude devrait être vérifiée à partir d'étalons primaires, de matériaux de référence certifiés (MRC) ou de méthodes de référence traçables au SI ou à des étalons internationaux. A ce jour, les laboratoires évaluent l'exactitude à partir des résultats des Evaluations Externes de la Qualité.

Une étude d'exactitude correspond à la comparaison du résultat **d'un seul dosage** d'un échantillon inconnu à une valeur cible consensuelle (cf. §6.1.3). **L'écart observé correspond à l'inexactitude (erreur d'exactitude).**

L'évaluation de l'exactitude est pertinente lorsque le nombre de participants à l'EEQ est suffisant (cf. SH REF 02 §4.6).

Il est rappelé qu'une analyse des résultats obtenus lors des campagnes d'EEQ est nécessaire à l'octroi ou au maintien de l'accréditation (cf. SH REF 02 §5.6.4, 5.6.5 & 5.6.7).

En pratique :

Utiliser les lames des EEQ

### III.1.2.6. Incertitude de mesure

La norme NF EN ISO 15189 précise que « *le laboratoire doit déterminer l'incertitude de mesure de chaque procédure de mesure dans la phase analytique utilisée pour consigner les grandeurs mesurées sur les échantillons des patients [...] et régulièrement examiner les estimations d'incertitude de mesure* » (cf. §5.5.1.4). De plus, les composantes

d'incertitude de la phase analytique pour chaque mesurande doivent être établis (cf. tableau de maîtrise des risques du document SH FORM 43). Un calcul d'incertitude doit en outre être déterminé pour les paramètres quantitatifs (cf. SH REF 02).

La démarche est de définir le mesurande et d'analyser le processus de mesure:

- identifier les facteurs susceptibles d'influencer le résultat de mesure ;
- identifier, parmi ceux-ci, ceux dont l'influence est considérée comme non significative, en précisant les raisons de cette décision (preuve ou élément connu)
- apporter la preuve de la maîtrise des facteurs qui ont une influence significative sur les résultats.

Elle est à poursuivre, en application des directives d'EA, pour l'expression de l'incertitude pour les essais quantitatifs (document EA 4/16), en mettant en œuvre une méthode d'évaluation de l'incertitude en fonction des informations disponibles (Cf SH GTA 14).

L'incertitude doit faire l'objet d'une réévaluation régulière (une périodicité annuelle est recommandée).

La norme EN 482 exprime de la manière suivante l'incertitude globale (en %):

$$\frac{|\bar{x} - x_{\text{réf}}| + 2 s}{x_{\text{réf}}} \times 100$$

$\bar{x}$  : moyenne des mesures

$x_{\text{réf}}$  : valeur vraie

s : écart-type des mesures

### **III.1.2.7. Etendue de mesure**

L'étendue de mesure comprend la limite de détection, la limite de quantification et la limite supérieure de linéarité.

Seuil de positivité ou limite de détection : Pour les méthodes dites « qualitatives », la limite de détection correspond au seuil de positivité.

Limite de quantification : La limite de quantification est la plus petite valeur qui peut être fournie pour un échantillon de patient.

Limite de linéarité : après la dilution d'un échantillon de concentration très élevée, les résultats obtenus permettront de vérifier l'existence d'une relation linéaire entre les dilutions effectuées et les concentrations observées (s'assurer de l'adéquation du diluant nécessaire et des pipettes utilisées). La limite supérieure de linéarité et la limite de quantification permettent de définir le domaine de mesure de la méthode.

On maîtrise les différents éléments dont la dilution dans le sang idem non parasité.

### **III.1.2.8. Comparaison de méthodes**

Comparaison des résultats obtenus avec une lecture classique, une lecture avec une cellule de Miller et avec le dispositif xRapid, sur les échantillons cliniques des patients suspects de paludisme se présentant aux urgences de l'hôpital ou dans le service des maladies infectieuses. Sera évaluée également

une mesure automatisée en cyrtométrie de flux. Environ 250 à 300 patients sont attendus.

### **III.1.2.9. Interférences et spécificité analytique**

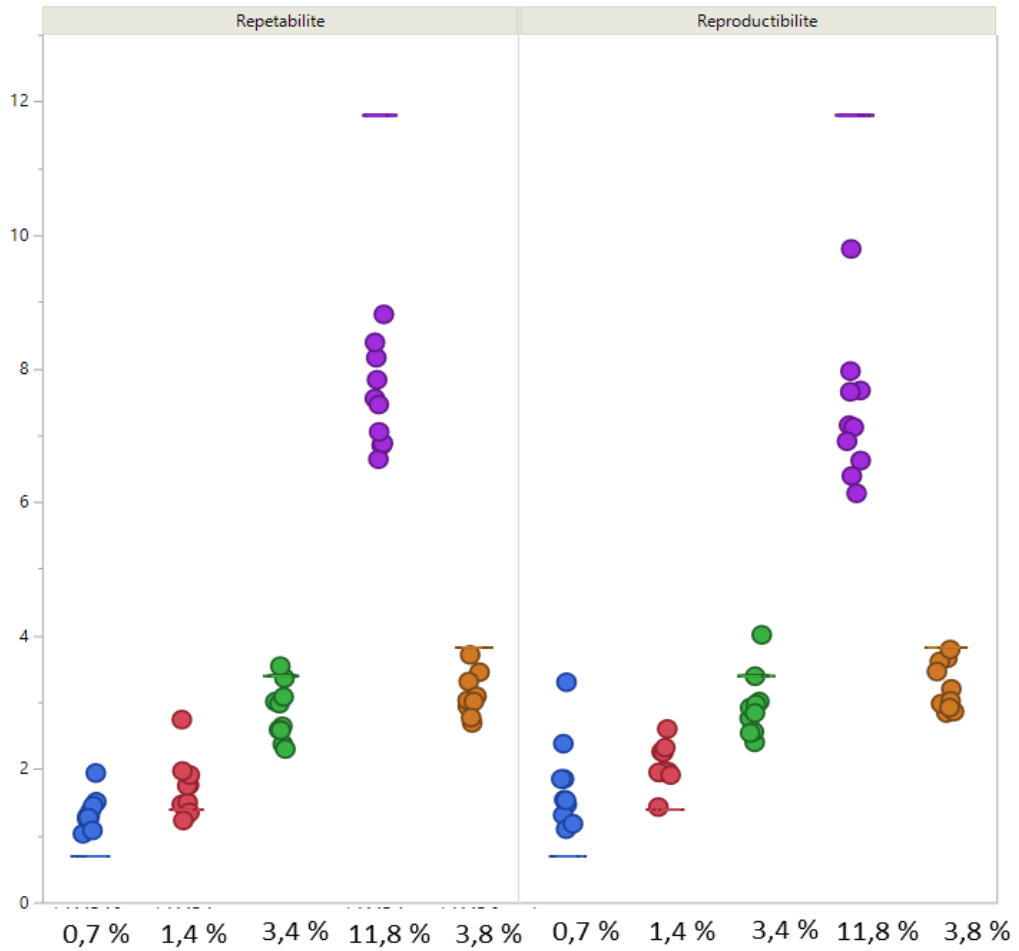
Une méthode « sélective » ou « spécifique » permet le dosage d'un analyte sans interférence dans une matrice complexe. Des substances dites « interférentes » altèrent le signal de mesure pouvant entraîner des résultats erronés.

Une étude expérimentale pertinente doit être effectuée dans le cas d'une portée de type B afin d'établir l'influence de substances présentes dans la matrice et potentiellement interférentes.

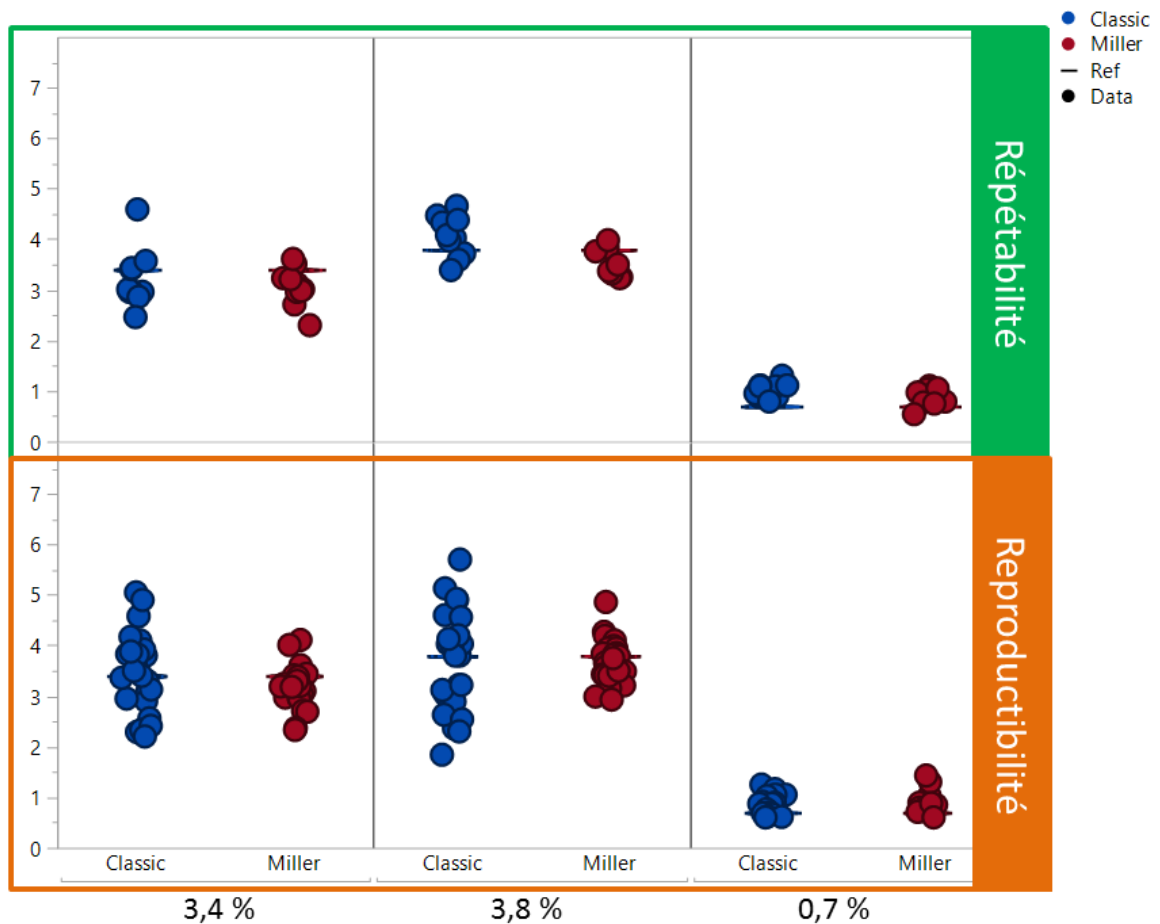
Nous évaluerons l'impact de la présence d'artéfacts, de corps de Howell Jolly sur la mesure de la parasitémie avec le logiciel xRapid.

## III.2. Résultats

### 1.4.1. Répétabilité



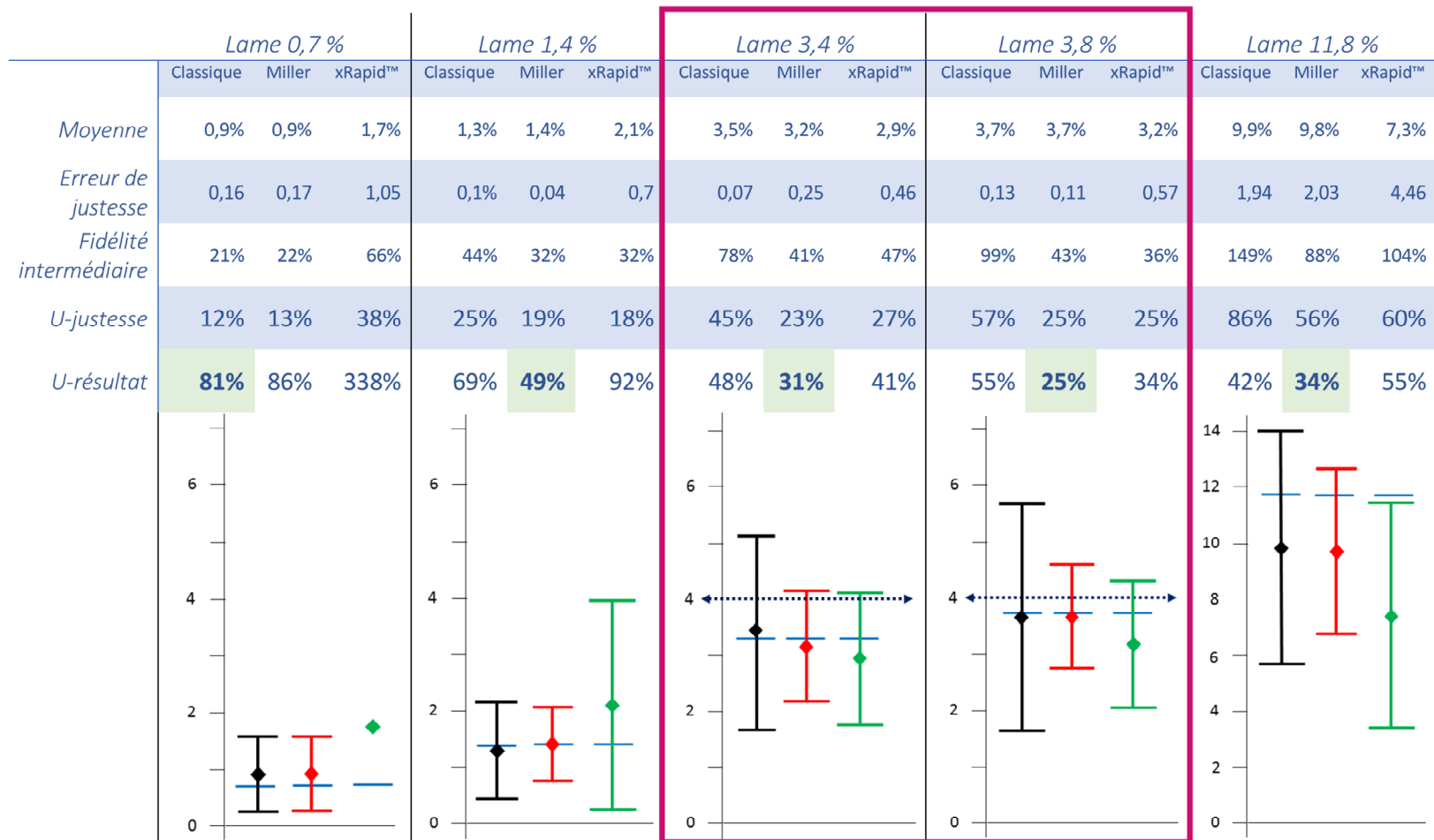
**Figure. Représentation graphique des données de reproductibilité et répétabilité obtenues par xRapid-Lab**

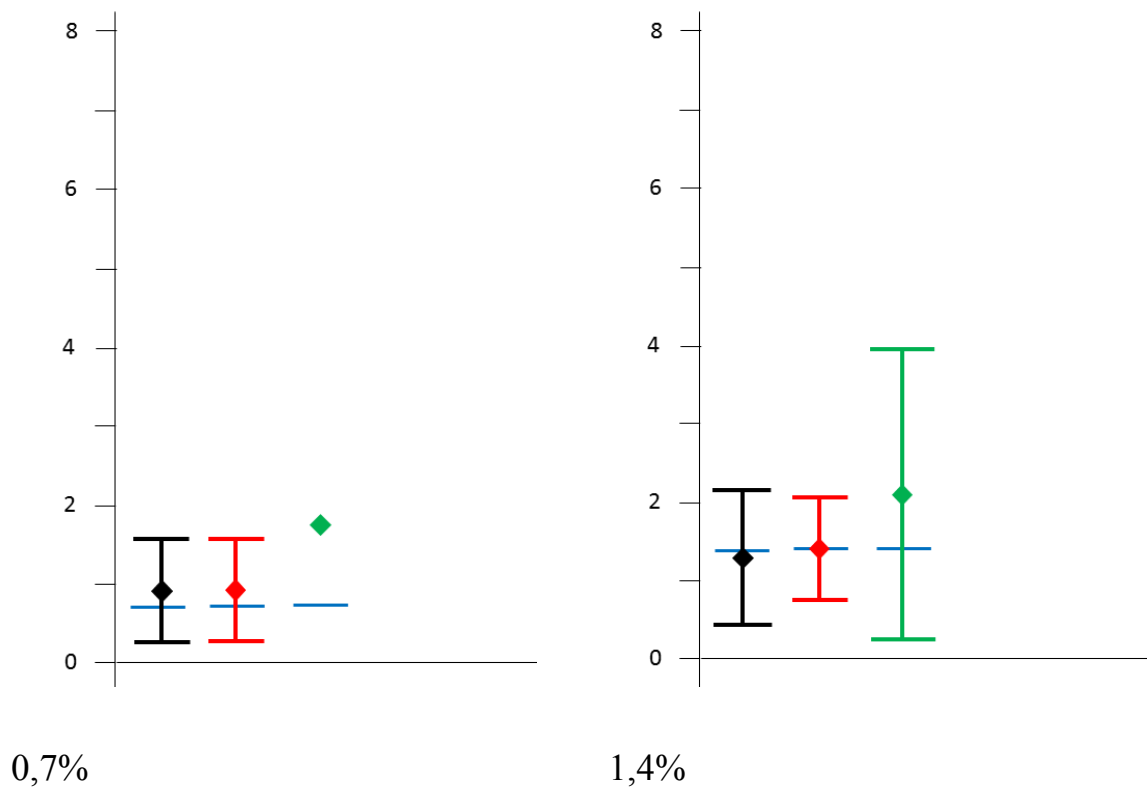


*Figure. Représentation graphique des données de reproductibilité et de répétabilité obtenues par la technique classique (bleu) et la technique de Miller (rouge)*

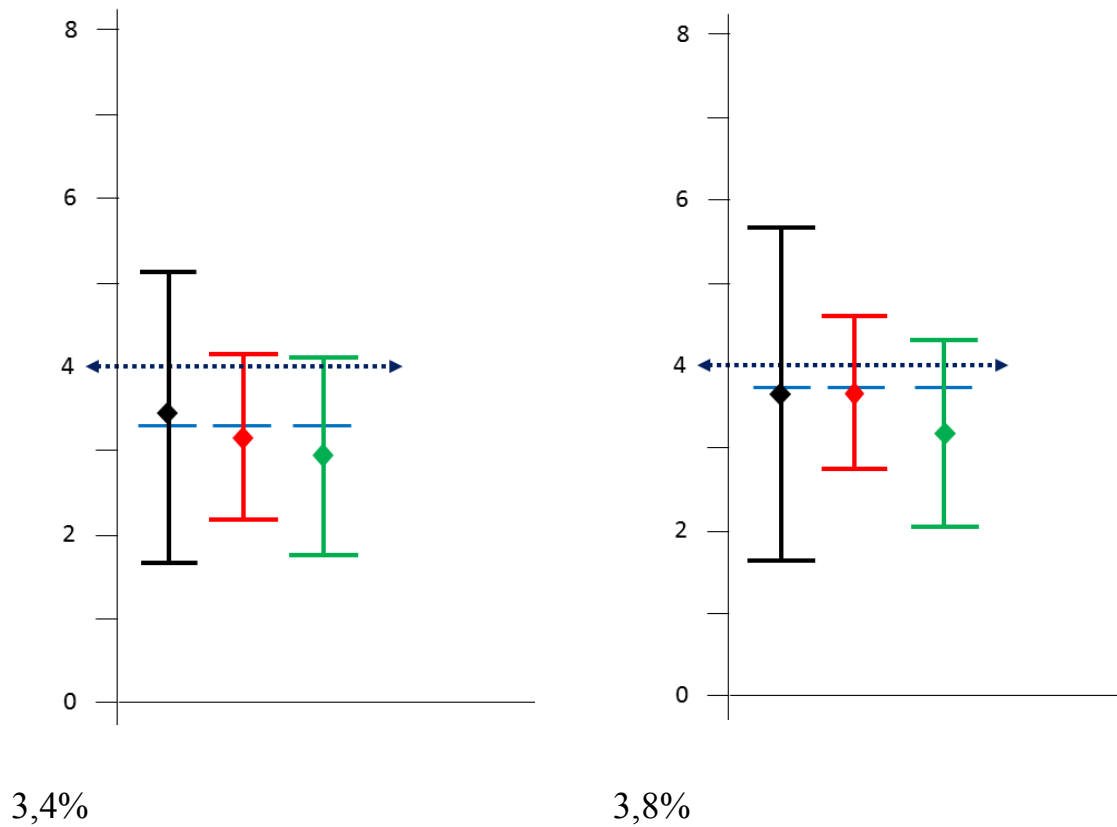
#### 1.4.2. Fidélité intermédiaire, justesse, exactitude, incertitude

*Tableau. Résultats de la comparaison des 5 lames de références avec expression graphique de l'incertitude de mesure pour les différentes parasitémies*

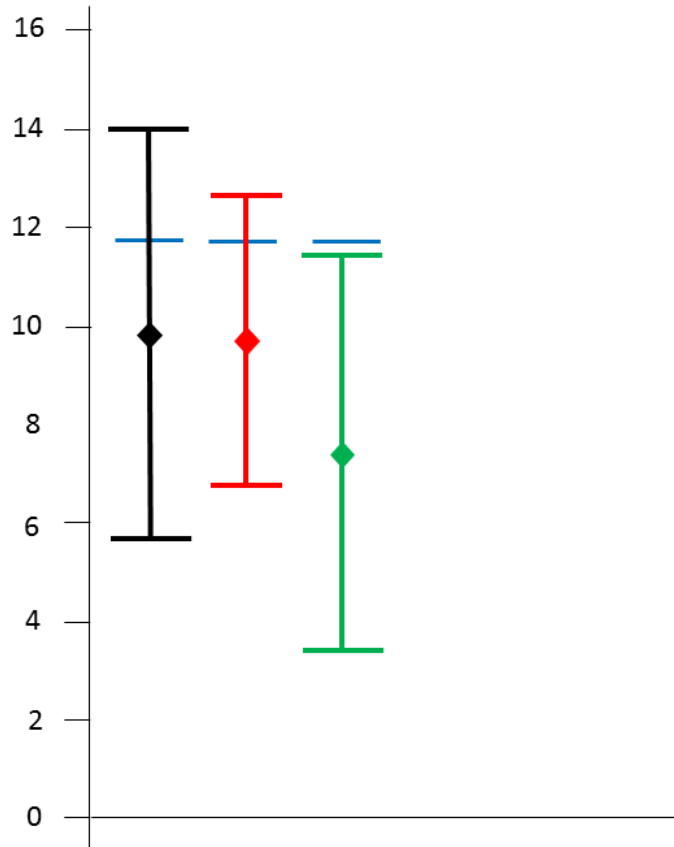




**Figure. Valeurs cibles, moyenne des mesures et incertitude globale de mesure des techniques classique (noir), Miller (rouge) et xRapid (vert) pour les valeurs de parasitémie basses 0,7 % et 1,4 %**



*Figure. Valeurs cibles, moyenne des mesures et incertitude globale de mesure des techniques classique (noir), Miller (rouge) et xRapid (vert) pour les valeurs de parasitémie moyennes 3,4 % et 3,8 % (autour de la valeur du seuil de décision de 4 %, trait pointillé bleu)*



11,8%

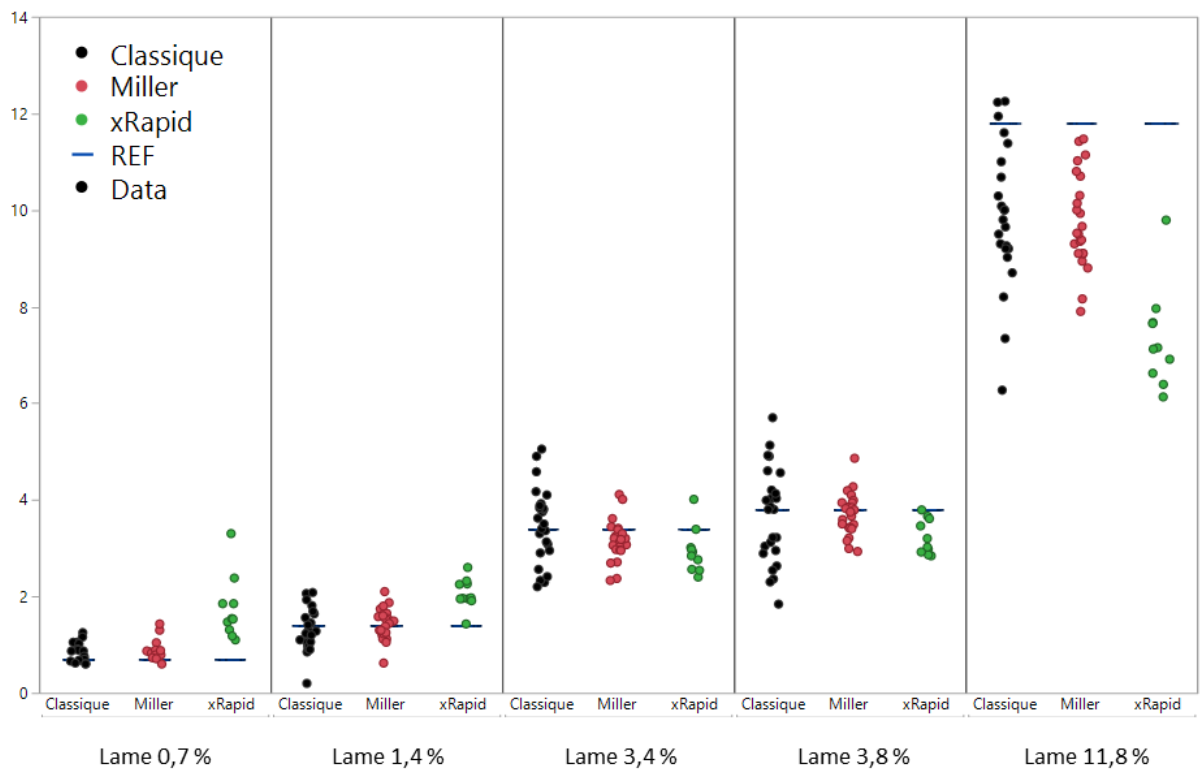
*Figure. Valeurs cibles, moyenne des mesures et incertitude globale de mesure des techniques classique (noir), Miller (rouge) et xRapid (vert) pour les valeurs de parasitémie hautes 11,8 %*

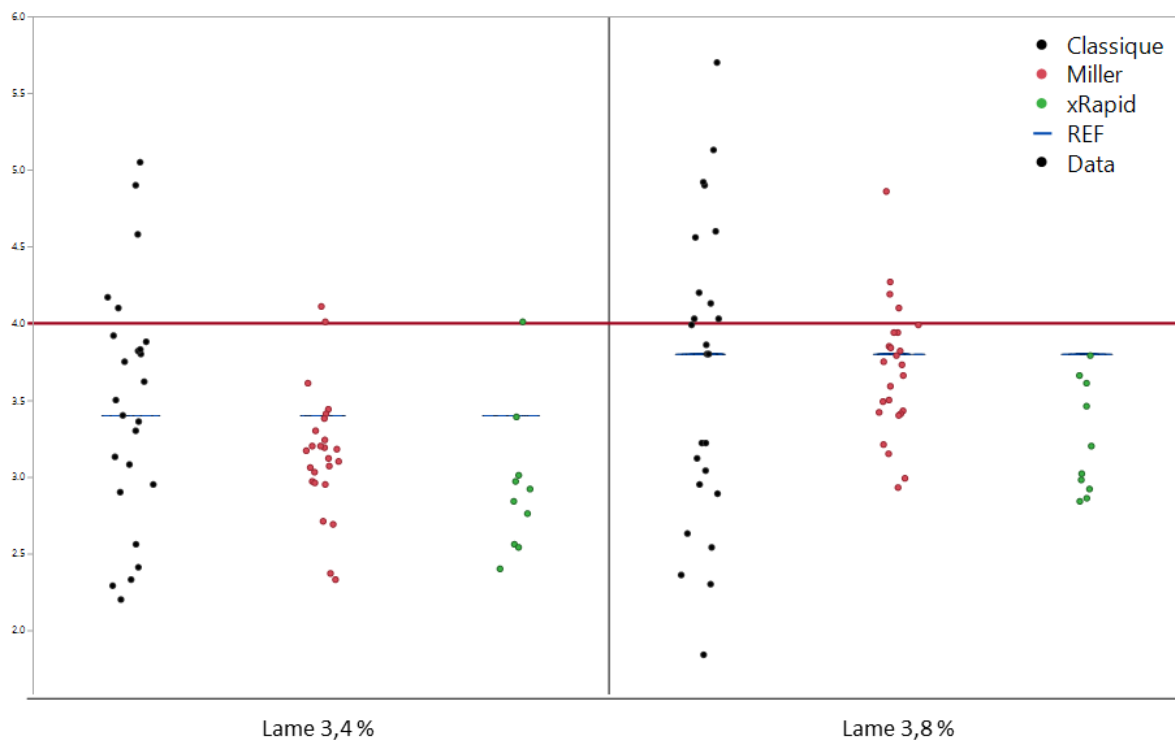
### 1.4.3. Etendue de mesure

En cours

### 1.4.4. Comparaison de méthodes

En cours, au 1<sup>er</sup> juillet, 152 échantillons de 152 patients ont été recueillis, les lames préparées, les échantillons testés en HRP-2 et en PCR spécifiques de genre et d'espèces.





### 1.4.5. Interférences et spécificité analytique

Les corps de Howell-Jolly sont reconnus et comptés comme des parasites par le logiciel xRapid-Lab version 1.1.

Des artéfacts de colorations sont reconnus et comptés comme des parasites par le logiciel xRapid-Lab version 1.1.

### III.3. Analyse des résultats, discussion

La définition reconnue internationalement de l'incertitude de mesure (VIM) est la suivante : Paramètre non négatif qui caractérise la dispersion des valeurs attribuées à un mesurande, à partir des informations utilisées. L'incertitude est un indicateur de la qualité d'un résultat et de la fiabilité

qu'on peut lui accorder, elle est associée à tout résultat de mesure. Pourquoi quantifier l'incertitude de mesure ? La connaissance de l'incertitude constitue une aide pour le clinicien dans sa prise de décision diagnostique ou thérapeutique, ou apporte au biologiste médical un élément important pour l'interprétation du résultat, par exemple lorsque ce dernier est comparé à un résultat antérieur ou à un seuil de décision reconnu (Cf. SH REF 02 §5.6). L'évaluation de l'incertitude de mesure est une démarche qui repose sur un besoin de mieux connaître la qualité du résultat et ainsi donner confiance dans son utilisation.

Concernant notre étude comparative, de manière générale et pour les techniques manuelles, on observe que les résultats des méthodes de lecture en microscopie optique, mesure classique et cellule de Miller, sont tout à fait en adéquation avec les résultats attendus. La répétabilité est meilleure que la reproductibilité (résultats plus justes et moins dispersés) comme illustré par la figure . La moyenne d'un grand nombre de lecture 20 à 25 microscopistes tends à être très proche de la valeur de la référence, comme illustré par la figure . Ceci conforte notre démarche et la qualité des résultats obtenus, en particulier pour la constitution des lames de référence et la mesure de la parasitémie de référence sur ces lames. L'incertitude globale pour la mesure de la parasitémie est meilleure avec la cellule de Miller qu'avec la méthode classique (Figure). Cela est vrai pour les parasitémies voisines du seuil décisionnel de 4 %. L'incertitude globale est d'environ 30 % pour la cellule de Miller versus plus de 50 % pour la méthode classique. La lecture avec une cellule de Miller permet de réduire l'incertitude de mesure d'un facteur 2 par rapport à une mesure classique et confirme, là encore, l'importance de la

maitrise du dénominateur. La mesure semi-automatique avec la solution xRapid devait logiquement réduire cette incertitude. Cela n'a pas été le cas. Si dans les parasitémies voisines du seuil de décision les résultats obtenus, proche de ceux d'une lecture en cellule de Miller, 30-40 % d'incertitude globale, étaient compatibles avec une utilisation de la technique dans cette indication, les résultats des lames de références pour la parasitémie basse 0,7 % et la parasitémie élevée 11,8 % sont rédhibitoires. On observe en effet une erreur systématique pour les parasitémies élevées, les résultats sont systématiquement inférieurs à la référence, ainsi que pour les parasitémies basses, 0,7 % et 1,4 %, les résultats sont systématiquement supérieurs à la référence (Figure). Il y a donc un problème matériel ou logiciel qui doit être corrigé. Pour l'erreur systématique à la baisse pour la parasitémie haute, une hypothèse pourrait être l'agglutination des hématies parasitées par des stades très matures (voir photos en annexe ), rendant le comptage automatique inopérant pour les hématies agglutinées contenant davantage d'hématies parasitées. A l'inverse pour les parasitémies basses, des artéfacts de coloration ont pu être comptés par l'application comme un résultat positif. On notera également des résultats disparates pour la mesure des lames de contrôles externes de qualité. Tantôt avec une bonne corrélation avec la médiane des résultats des participants (CNQ 2014), tantôt avec des résultats très discordants (résultats non présentés). Quoiqu'il en soit, la recherche et la correction de ces erreurs systématiques ne sont pas possibles à notre niveau et elles n'ont pas été prises en compte pour le moment par la société xRapid. Une nouvelle version du logiciel est attendue.

Comme indiqué dans notre première partie, la mesure de la parasitémie et son rendu quantitatif sont des éléments fondamentaux pour la prise en charge thérapeutique d'un sujet avec un accès palustre. La prise en charge initiale de l'accès dépend souvent de sa valeur rendue au clinicien, seuil actuel des 4 %. La technique de référence vieille de plus d'une centaine d'année permet un compte et un rendu acceptable pour ce tri, même s'il n'y a pas réellement eu d'enquête bien menée pour évaluer l'impact de ce diagnostic sur la prise en charge et l'évolution des patients. Néanmoins, il semble difficilement acceptable à l'heure de la norme ISO 15189 et de l'accréditation des laboratoires, de rendre une valeur chiffrée sans fournir d'indications sur sa significativité ou sur son interprétation. Les textes réglementaires imposent que les comptes rendus d'examens comportent une interprétation des résultats (Cf. SH REF 02). Lorsqu'il s'agit d'un seuil décisionnel, la connaissance de l'incertitude globale de la valeur considérée est un élément supplémentaire utile pour le biologiste et le clinicien pour définir la prise en charge la mieux adaptée en fonction du contexte (SH-GTA 14). L'incertitude associée à ce résultat permet une meilleure évaluation en confortant le diagnostic et la prise de décision thérapeutique. Le paragraphe §5.6.2 de la norme NF EN ISO 15189 stipule que : "le laboratoire doit déterminer l'incertitude des résultats, dans les cas où cela est pertinent et possible. Toutes les composantes importantes de l'incertitude doivent être prises en compte". L'évaluation de l'incertitude s'applique également aux examens délocalisés (norme NF EN ISO 22870), au même titre que les autres.

*IV. Conclusion générale  
et perspectives*

En dépit des progrès réalisés dans la lutte contre le paludisme ces quinze dernières années, le contrôle de la maladie et son éradication reste un vrai défi à relever pour l'humanité. En 2015, 3,2 milliards de personnes exposées au niveau mondial en 2015, la maladie est transmise 91 pays ou territoires et elle provoque encore 429 000 décès au niveau mondial. Presque tous, 99 % dus à une espèce *P. falciparum*. Les anophèles vecteurs de la maladie et les parasites développent rapidement de stratégies de résistance aux médicaments employés contre eux. *Plasmodium falciparum* est l'espèce redoutée car les stades matures peuvent cytoadérer. Cette cytoadhérence entre les GR parasité par les stades asexués « matures » (trophozoïtes âgés, schizontes) et les cellules endothéliales vasculaires est responsable d'un ralentissement du flux sanguin dans les capillaires (**phénomène mécanique**) / d'une réaction inflammatoire tissulaire « cytokines » (**phénomène inflammatoire**). Le phénomène mécanique est prédominant sauf dans de rares exceptions (charges parasitaires faibles avec accès grave chez certains individus particulièrement réactifs à la présence des antigènes parasitaires). Si l'évolution de l'accès n'est pas maîtrisée par le traitement ou une réponse immune adaptée, l'évolution est défavorable avec hyperparasitémie, apparition de phénomènes d'**apoptoses**. On observe alors des micros hémorragies tissulaires. Le diagnostic du paludisme d'importation devrait associer une technique sensible goutte épaisse, QBC ou technique de biologie moléculaire à réponse rapide à un frottis mince (évaluation de la parasitémie et identification des espèces) afin de rendre un diagnostic en moins de deux heures. L'association d'un frottis mince et d'un TDR (test de diagnostic rapide) est une alternative quand cet algorithme ne peut être mis en œuvre.

Dans ce cas, Le TDR doit impérativement détecter l'antigène HRP2 pour le diagnostic spécifique du paludisme à *P. falciparum*. Des techniques de diagnostic ultrasensibles sont en cours de développement, en particulier une technique theranostique pour traiter en même temps que diagnostiquer l'infection palustre. La mesure de la parasitémie doit être réalisée pour l'espèce *P. falciparum* et l'espèce *P. knowlesi*. la parasitémie doit être rendue au clinicien en pourcentage d'hématies parasitées. La mesure de la parasitémie exprime un résultat quantitatif qui est intégré dans le processus décisionnel de prise en charge thérapeutique du patient. L'incertitude de mesure doit être évaluée et communiquée au clinicien par le biologiste au moment du rendu du résultat de la mesure. La mesure semi automatique par un smartphone de la parasitémie est un vrai échec.

## *V. Résumé*

## Résumé

**Titre:** Importance de la quantification de la charge parasitaire dans les infections à *Plasmodium falciparum*.  
Evaluation d'une méthode de quantification semi-automatique par reconnaissance d'image en microscopie optique.

**Auteur :** Ilhame Tantaoui

**Mots clés :** *Plasmodium falciparum*, physiopathologie, accès grave, parasitémie, Cellule de Miller, semi-automatique.

Une infection aigue à *Plasmodium falciparum* peut mettre en jeu le pronostic vital du patient. Une parasitémie supérieure à 4 % permet de classer le patient en accès grave. Cependant, la mesure de cette valeur, qui est un seuil décisionnel pour le clinicien, est réalisée par comptage manuel sans précision du degré d'incertitude de cette mesure.

Notre thèse se compose de 2 parties, une recherche bibliographique sur la physiopathologie du paludisme à *P. falciparum* et une étude comparative de trois méthodes de mesure de la parasitémie. Dans l'étude comparative, la mesure est réalisée en microscopie optique. La première méthode de comptage consiste à estimer le nombre de globules rouges présents en comptant le nombre de GR sur un quart de champs. Cette valeur est ensuite utilisée pour calculer le dénominateur. La seconde méthode utilise une cellule de Miller qui permet d'estimer le nombre de globule rouge présent sur chaque champ. La troisième méthode utilise un logiciel de reconnaissance d'image, xRapid Lab, avec une mesure automatique sur des parasites et des globules rouges. La parasitémie de référence a été mesurée en comptant de manière exhaustive chaque hématie présente (comptage sur des images photographiques). Cinq lames de références avec des parasitémies différentes sont lues successivement pour la répétabilité et la reproductibilité

Les 3 méthodes de mesure donnent des résultats conformes et acceptables pour la précision de la mesure. L'incertitude de mesure est mieux contrôlée avec les méthodes cellule de Miller et semi-automatique pour les parasitémies proches du seuil décisionnel de 4 %.

## Abstract

**Title:** Importance of quantification of parasitic load in *Plasmodium falciparum* malaria. Evaluation of a semi-automated counting method using a lab software for optical microscopy image recognition

**Author:** Ilhame Tantaoui

**Key words:** *Plasmodium falciparum*, severe malaria, parasitaemia, Miller cell, semi-automated

An acute infection with *Plasmodium falciparum* species can be life threatening. If greater than 4%, it is a criterion to classify the patient as severe malaria. It is then a decision-making threshold for the clinician in charge of the patient. However, the measurement of this value is performed only once by manual counting and most often without giving the degree of uncertainty.

Our thesis consists of two parts, a bibliographic research on the pathophysiology of *P. falciparum* malaria and its interest in clinical practice and a comparative study of three methods of measurement of parasitemia. The measurement was carried out in light microscopy. In the first method, the number of RBCs on a microscopic field was estimated by counting the number of RBCs seen on a quarter of field. The corresponding value was then used to calculate the denominator as a function of the number of microscopic fields examined. In the second method, we used a Miller cell to estimate the number of RBCs present on each field examined. In the third method, we used an image recognition software, with an automatic count of both parasites and RBCs on a smartphone. The reference parasitemia was measured by counting exhaustively each red blood cell examined on photographic images. Five reference slides with different parasitemias were read successively for repeatability and reproducibility.

The 3 measurement methods give consistent results and were acceptable for the accuracy of the measurement. The measurement uncertainty, was better controlled with Miller's and semi-automated methods for parasitaemias close to the 4% decisional threshold.

## ملخص

**العنوان:** أهمية قياس نسبة الطفيلي في الالتهابات المنجلية المتصورة تقييم لطريقة القياس الكمي نصف الأوتوماتيكي عن طريق التعرف على الصور بواسطة المجهر الضوئي

**من طرف:** إلهام الطنطاوي

**الكلمات الأساسية:** الملاريا المنجلية-حالة وخيمة-الفيزيولوجيا المرضية -نسبة الطفيلي - التعرف على الصور.

أهمية قياس نسبة الطفيلي في التهابات المنجلية المتصورة. تقييم لطريقة القياس الكمي نصف الأوتوماتيكي عن طريق التعرف على الصور بواسطة المجهر الضوئي.

تطور الملاريا المنجلية إلى حالة وخيمة قد يهدد حياة الشخص المصاب يعتبر في فرنسا وجود نسبة تفوق 4% من كريات الدم المصابة لدى الشخص البالغ، كمعيار كافي لتصنيف المريض في حالة حادة. إذن قياس هذه النسبة حالة طارئة يجب القيام به في أي ساعة من النهار والليل فوق تشخيص نوع من المتصورة غير أن قياس نسبة الطفيليات في الدم، وهي القيمة التي تعتبر عتبة لاتخاذ قرار بالنسبة الطبيب، يعد بطريقة يدوية (من طرف تقني أو اختصاصي بيولوجي)، دون تحديد درجة الارتياح

هذه الدراسة تتكون من جزئين، جزء بيولوجرافي حول الفيزيولوجيا المرضية وأهميتها في استراتيجية العلاج وجزء آخر دراسة على شكل مقارنة 3 طرق لقياس نسبة الطفيليات في الدم باستعمال المجهر الإلكتروني، طريقتان يدويتين، وطريقة نصف أوتوماتيكية يتم قياس بواسطة المجهر الضوئي بالانتقال إلى منطقة تتوزع فيها كريات الدم الحمراء بطريقة حساب عدد من كريات الدم الحمراء الحاضر في ربع حقل تعتبر جميع الحقول متساوية من حيث عدد كريات الحمراء من ثم استخدام القيمة لحساب نسبة كريات الدم المصابة يستخدم الأسلوب الثاني خلية ميلر لتقدير عدد خلايا الدم الحمراء موجودة في الحقل، يستخدم الأسلوب الثالث تطبيق يعتمد على مكتبة صور للتعرف على الخلايا والطفيليات، ثم عدّها كلياً ويتم الحصول على أفضل النتائج (أصغر الارتياح في القياس) مع تقنية نصف الآلي.

تمكن طرق القياس الثلاث من الحصول على نتائج متسقة ومقبولة لدقة القياس الارتياح الذي يجب أن يكون إثنان أو ثلاث انحرافات معيارية، يتم السيطرة عليه أكثر بالطريقة نصف الأوتوماتيكية وخليّة ميلر خصوصاً بالنسبة للنسب المجاورة لعتبة القرار 4%

*VI. Références  
bibliographiques*

- [1] World Health Organization WHO. World Malaria Report 2016. Geneva, Switzerland: WHO; 2016.
- [2] Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, et al. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*. 2010;467(7314):420-5.
- [3] Baron JM, Higgins JM, Dzik WH. A revised timeline for the origin of *Plasmodium falciparum* as a human pathogen. *J Mol Evol*. 2011;73(5-6):297-304.
- [4] Hublin JJ, Ben-Ncer A, Bailey SE, Freidline SE, Neubauer S, Skinner MM, et al. New fossils from Jebel Irhoud, Morocco and the pan-African origin of *Homo sapiens*. *Nature*. 2017;546(7657):289-92.
- [5] Joy DA, Feng X, Mu J, Furuya T, Chotivanich K, Krettli AU, et al. Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science*. 2003;300(5617):318-21.
- [6] Tanabe K, Mita T, Jombart T, Eriksson A, Horibe S, Palacpac N, et al. *Plasmodium falciparum* accompanied the human expansion out of Africa. *Curr Biol*. 2010;20(14):1283-9.
- [7] Nerlich A. Paleopathology and Paleomicrobiology of Malaria. *Microbiol Spectr*. 2016;4(6).
- [8] Lalremruata A, Ball M, Bianucci R, Welte B, Nerlich AG, Kun JF, et al. Molecular identification of *falciparum* malaria and human tuberculosis co-infections in mummies from the Fayum depression (Lower Egypt). *PLoS One*. 2013;8(4):e60307.

- [9] Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, Hasan N, et al. Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family. *JAMA*. 2010;303(7):638-47.
- [10] Mouchet J, Carnevale, P., Coosemans, M., et al. . Biodiversité du paludisme dans le monde. Montrouge: John Libbey Eurotext; 2004.
- [11] Dondorp AM, Pongponratn E, White NJ. Reduced microcirculatory flow in severe *falciparum* malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology. *Acta Trop*. 2004;89(3):309-17.
- [12] OMS. Stratégie technique mondiale contre le paludisme 2016–2030. Royaume uni: OMS; 2015.
- [13] World Health Organization WHO. World Malaria Report 2014. Geneva, Switzerland: WHO; 2015.
- [14] Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, et al. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*. 2012;379(9814):413-31.
- [15] Menard D, Ariey F. Towards real-time monitoring of artemisinin resistance. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(4):367-8.
- [16] Danis K, Lenglet A, Tseroni M, Baka A, Tsiodras S, Bonovas S. Malaria in Greece: historical and current reflections on a re-emerging vector borne disease. *Travel Med Infect Dis*. 2013;11(1):8-14.

- [17] Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 2004;363(9414):1017-24.
- [18] Moyes CL, Henry AJ, Golding N, Huang Z, Singh B, Baird JK, et al. Defining the geographical range of the *Plasmodium knowlesi* reservoir. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(3):e2780.
- [19] publique HCdls. Place de l'artésunate injectable dans le traitement du paludisme grave chez l'adulte et l'enfant—1<sup>er</sup> février 2013. Haut Conseil de la santé publique; 2013.
- [20] Tonkin ML, Roques M, Lamarque MH, Pugniere M, Douguet D, Crawford J, et al. Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide. *Science*. 2011;333(6041):463-7.
- [21] Pas d'auteurs listés Ss, SPILF, , CUMIT S, SF Parasitologie, SF Pédiatrie, SMV, SPE, et al. Recommandations pour la pratique clinique 2007. Prise en charge et prévention du paludisme d'importation a *Plasmodium falciparum*. (Revision de la conférence de consensus 1999). Texte long. *Med Mal Infect*. 2008;38(2):68-117.
- [22] World Health Organization WHO. Severe *falciparum* malaria. . *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94 Suppl 1:S1-90.
- [23] Dondorp AM, Lee SJ, Faiz MA, Mishra S, Price R, Tjitra E, et al. The relationship between age and the manifestations of and mortality associated with severe malaria. *Clin Infect Dis*. 2008;47(2):151-7.

- [24] Bruneel F, Tubach F, Corne P, Megarbane B, Mira JP, Peytel E, et al. Severe imported falciparum malaria: a cohort study in 400 critically ill adults. *PLoS One*. 2010;5(10):e13236.
- [25] Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*. 2011;117(2):381-92.
- [26] Buffet PA, Safeukui I, Milon G, Mercereau-Puijalon O, David PH. Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria. *Curr Opin Hematol*. 2009;16(3):157-64.
- [27] Del Portillo HA, Ferrer M, Brugat T, Martin-Jaular L, Langhorne J, Lacerda MV. The role of the spleen in malaria. *Cell Microbiol*. 2012;14(3):343-55.
- [28] Deroost K, Pham TT, Opdenakker G, Van den Steen PE. The immunological balance between host and parasite in malaria. *FEMS Microbiol Rev*. 2016;40(2):208-57.
- [29] Ogonda LA, Orago AS, Otieno MF, Adhiambo C, Otieno W, Stoute JA. The levels of CD16/Fc gamma receptor IIIA on CD14+ CD16+ monocytes are higher in children with severe *Plasmodium falciparum* anemia than in children with cerebral or uncomplicated malaria. *Infect Immun*. 2010;78(5):2173-81.
- [30] Mecheri S. Contribution of allergic inflammatory response to the pathogenesis of malaria disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(1):49-56.

- [31] Magowan C, Wollish W, Anderson L, Leech J. Cytoadherence by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is correlated with the expression of a family of variable proteins on infected erythrocytes. *J Exp Med.* 1988;168(4):1307-20.
- [32] Howard RJ, Gilladoga AD. Molecular studies related to the pathogenesis of cerebral malaria. *Blood.* 1989;74(8):2603-18.
- [33] Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell.* 1995;82(1):89-100.
- [34] Magowan C, Nunomura W, Waller KL, Yeung J, Liang J, Van Dort H, et al. *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 1 associates with the band 3 binding domain of ankyrin in the infected red cell membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1502(3):461-70.
- [35] Adams S, Turner GD, Nash GB, Micklem K, Newbold CI, Craig AG. Differential binding of clonal variants of *Plasmodium falciparum* to allelic forms of intracellular adhesion molecule 1 determined by flow adhesion assay. *Infect Immun.* 2000;68(1):264-9.
- [36] Fernandez-Reyes D, Craig AG, Kyes SA, Peshu N, Snow RW, Berendt AR, et al. A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Hum Mol Genet.* 1997;6(8):1357-60.

- [37] Silamut K, Phu NH, Whitty C, Turner GD, Louwrier K, Mai NT, et al. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *Am J Pathol.* 1999;155(2):395-410.
- [38] Hunt NH, Grau GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* 2003;24(9):491-9.
- [39] Pino P, Vouldoukis I, Kolb JP, Mahmoudi N, Desportes-Livage I, Bricaire F, et al. *Plasmodium falciparum*--infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. *J Infect Dis.* 2003;187(8):1283-90.
- [40] Wilson NO, Huang MB, Anderson W, Bond V, Powell M, Thompson WE, et al. Soluble factors from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce apoptosis in human brain vascular endothelial and neuroglia cells. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;162(2):172-6.
- [41] Wennicke K, Debierre-Grockiego F, Wichmann D, Brattig NW, Pankuweit S, Maisch B, et al. Glycosylphosphatidylinositol-induced cardiac myocyte death might contribute to the fatal outcome of *Plasmodium falciparum* malaria. *Apoptosis.* 2008;13(7):857-66.
- [42] Lamikanra AA, Theron M, Kooij TW, Roberts DJ. Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. *PLoS One.* 2009;4(12):e8446.
- [43] Mishra SK, Newton CR. Diagnosis and management of the neurological complications of *falciparum* malaria. *Nat Rev Neurol.* 2009;5(4):189-98.

- [44] Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N, South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial g. Artesunate versus quinine for treatment of severe *falciparum* malaria: a randomised trial. *Lancet*. 2005;366(9487):717-25.
- [45] World Health Organization WHO. Guidelines for the treatment of malaria -- 3d edition. Geneva, Switzerland: WHO; 2015.
- [46] Gangneux JP, Vignes S, Poinsignon Y, Derouin F. Paludisme viscéral évolutif et splénomégalie palustre hyperimmune. *Bull Soc Pathol Exot*. 1999;92(1):27-8.
- [47] World Health Organization WHO. Recommendations on the role of mass drug administration, mass screening and treatment, and focal screening and treatment for malaria. WHO; 2015.
- [48] Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ*. 1988;66(5):621-6.
- [49] Warhurst DC, Williams JE. ACP Broadsheet no 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Pathol*. 1996;49(7):533-8.
- [50] Lalloo DG, Shingadia D, Bell DJ, Beeching NJ, Whitty CJ, Chiodini PL, et al. UK malaria treatment guidelines 2016. *J Infect*. 2016;72(6):635-49.

- [51] Wongsrichanalai C, Chuanak N, Webster HK, Prasittisuk M. Practical uses of acridine orange fluorescence microscopy of centrifuged blood (QBC Malaria Test) and the QBCII Hematology System in patients attending malaria clinics in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1992;23(3):406-13.
- [52] Gay F, Traore B, Zanoni J, Danis M, Gentilini M. Evaluation du systeme QBC pour le diagnostic du paludisme. *Sante*. 1994;4(4):289-97.
- [53] Secardin Y, Le Bras J. Essai de diagnostic d'espèce des *Plasmodium* humains par la technique QBC. *Med Trop (Mars)*. 1999;59(3):276-8.
- [54] Hoffmann JJ, Pennings JM. Pseudo-reticulocytosis as a result of malaria parasites. *Clin Lab Haematol*. 1999;21(4):257-60.
- [55] Mendelow BV, Coetzer TL. Automated malaria detection. *Br J Haematol*. 1999;106(1):257-8.
- [56] Hanscheid T, Pinto BG, Cristino JM, Grobusch MP. Malaria diagnosis with the haematology analyser Cell-Dyn 3500: What does the instrument detect? *Clin Lab Haematol*. 2000;22(5):259-61.



## Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.
- D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.
- D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.
- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.



## قسم الصيدلي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

### أقسم بالله العظيم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- أن أزاو مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأداب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلي أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحظى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"

جامعة محمد الخامس - الرباط  
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم: 85

سنة : 2017

**أهمية قياس نسبة الطفيلي  
في الالتهابات المنجلية المتصورة  
تقييم لطريقة القياس الكمي نصف الأوتوماتيكي  
عن طريق التعرف على الصور بواسطة المجهر الضوئي**

**أطروحة**

قدمت ونوقشت علانية يوم : 20 يونيو 2017

من طرف

**الآنسة: إلهام الطنطاوي**

المزودة في : 19 نونبر 1991

**لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة**

**الكلمات الأساسية:** الملاريا المنجلية - حالة وخيمة - الفيزيولوجيا المرضية - نسبة الطفيلي - التعرف على الصور.

**تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة**

رئيس

السيد: مارك تيليبي

أستاذ في علم الطفيليات

مشرف

السيد: بدر الدين الميموني

أستاذ في علم الطفيليات والفطريات

السيد: منصف الراحي

أستاذ في الطب الباطني

السيد: يونس رحالي

أستاذ في الصيدلة الغالينية

أعضاء

السيد: أحمد بنانة

أستاذ في إدارة الأدوية والمعلوماتية

السيد: محمد معيوط

أستاذ في القانون الصيدلي