



ROYAUME DU MAROC
UNIVERSITE MOHAMMED V DE RABAT
FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE
RABAT



Année: 2021

Thèse N°: 336

METHODES DE DIAGNOSTIC DU PALUDISME

THESE

Présentée et soutenue publiquement le : / /2021

PAR

Monsieur Ahmed Abdelmoutalib HAYAD

Né le 23 Aout 1991 à Mohammedia

*Pour l'Obtention du Diplôme de
Docteur en Médecine*

Mots Clés : Paludisme; Diagnostic; Microscopie; Goutte épaisse ;
Frottis sanguin; TDR; PCR; LAMP; Nouvelles méthodes

Membres du Jury :

Monsieur Badre Eddine LMIMOUNI

Professeur de Parasitologie

Madame Hafida NAOUI

Professeur de Parasitologie-Mycologie

Monsieur Mourad BOUCHRIK

Professeur de Parasitologie-Mycologie

Madame Souad AZELMAT

Professeur de Biologie Moléculaire

Président

Rapporteur

Juge

Juge



سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا
إنك أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية: 31

صَلَّى
الْعَظِيمِ



**UNIVERSITE MOHAMMED V
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIERABAT**

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 estudiantines
Professeur Brahim LEKEHAL

Vice-Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Taoufiq DAKKA

Vice-Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Younes RAHALI

Secrétaire Général
Mr. Mohamed KARRA

1 - ENSEIGNANTS-CHERCHEURS MEDECINS ET PHARMACIENS

PROFESSEURS DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR :

Décembre 1984

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

Médecine Interne - [Clinique Royale](#)
Anesthésie -Réanimation
Pathologie Chirurgicale

Décembre 1989

Pr. ADNAOUI Mohamed
Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Médecine Interne –[Doyen de la FMPR](#)
Neurologie

Janvier et Novembre 1990

Pr. KHARBACH Aïcha
Pr. TAZI Saoud Anas

Gynécologie -Obstétrique
Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

Pr. AZZOUZI Abderrahim
Pr. BAYAHIA Rabéa
Pr. BELKOUCHI Abdelkader
Pr. BENSOUDA Yahia
Pr. BERRAHO Amina
Pr. BEZAD Rachid
Pr. CHERRAH Yahia
Pr. CHOKAIRI Omar
Pr. KHATTAB Mohamed
Pr. SOULAYMANI Rachida
Pr. TAOUFIK Jamal

Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chirurgie Générale
Pharmacie galénique
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique Méd. [Chef Maternité des Orangers](#)
Pharmacologie
Histologie Embryologie
Pédiatrie
Pharmacologie- [Dir. du Centre National PV Rabat](#)
Chimie thérapeutique

Décembre 1992

Pr. AHALLAT Mohamed
Pr. BENSOUDA Adil
Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
Pr. CHRAIBI Chafiq
Pr. EL OUAHABI Abdessamad
Pr. FELLAT Rokaya
Pr. JIDDANE Mohamed
Pr. ZOUHDI Mimoun

Chirurgie Générale [Doyen de FMPT](#)
Anesthésie Réanimation
Gastro-Entérologie
Gynécologie Obstétrique
Neurochirurgie
Cardiologie
Anatomie
Microbiologie

Mars 1994

Pr. BENJAAFAR Noureddine
Pr. BEN RAIS Nozha
Pr. CAOUI Malika
Pr. CHRAIBI Abdelmjid
Pr. EL AMRANI Sabah
Pr. ERROUGANI Abdelkader
Pr. ESSAKALI Malika
Pr. ETTAYEBI Fouad
Pr. IFRINE Lahssan
Pr. RHRAB Brahim
Pr. SENOUCI Karima

Radiothérapie
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques [Doyen de la FMPA](#)
Gynécologie Obstétrique
Chirurgie Générale – [Directeur du CHIS](#)
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Chirurgie Générale
Gynécologie –Obstétrique
Dermatologie

Mars 1994

Pr. ABBAR Mohamed*
Pr. BENTAHILA Abdelali
Pr. BERRADA Mohamed Saleh
Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
Pr. LAKHDAR Amina
Pr. MOUANE Nezha

Urologie Inspecteur du SSM
Pédiatrie
Traumatologie – Orthopédie
Ophtalmologie
Gynécologie Obstétrique
Pédiatrie

Mars 1995

Pr. ABOUQUAL Redouane
Pr. AMRAOUI Mohamed
Pr. BAIDADA Abdelaziz
Pr. BARGACH Samir
Pr. EL MESNAOUI Abbes
Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
Pr. SEFIANI Abdelaziz
Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale
Chirurgie Générale
Gynécologie Obstétrique
Gynécologie Obstétrique
Chirurgie Générale
Oto-Rhino-Laryngologie
Urologie
Ophtalmologie
Génétique
Réanimation Médicale

Décembre 1996

Pr. BELKACEM Rachid
Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
Pr. GAOUZI Ahmed
Pr. OUZEDDOUN Naima
Pr. ZBIR EL Mehdi*

Chirurgie Pédiatrie
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Néphrologie
Cardiologie Directeur HMI Mohammed V

Novembre 1997

Pr. ALAMI Mohamed Hassan
Pr. BIROUK Nazha
Pr. FELLAT Nadia
Pr. KADDOURI Nouredine
Pr. KOUTANI Abdellatif
Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
Pr. TOUFIQ Jallal
Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique
Neurologie
Cardiologie
Chirurgie Pédiatrique
Urologie
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Psychiatrie Directeur Hôp.Ar-razi Salé
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

Pr. BENOMAR ALI
Pr. BOUGTAB Abdesslam
Pr. ER RIHANI Hassan
Pr. BENKIRANE Majid*

Neurologie Doyen de la FMP Abulcassis
Chirurgie Générale
Oncologie Médicale
Hématologie

Janvier 2000

Pr. ABID Ahmed*
Pr. AIT OUAMAR 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. TACHINANTE Rajae
Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Pneumo-phtisiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Pneumo-phtisiologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Pneumo-phtisiologie
Neurochirurgie
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. GHARBI Mohamed El Hassan
Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae

Neurologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie - [Directeur Hôp. Cheikh Zaid](#)
Urologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Pédiatrie

Décembre 2001

Pr. BALKHI Hicham*
Pr. BENABDELJILIL Maria
Pr. BENAMAR Loubna
Pr. BENAMOR Jouda
Pr. BENELBARHDADI Imane
Pr. BENNANI Rajae
Pr. BENOUACHANE Thami
Pr. BEZZA Ahmed*
Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
Pr. BOUMDIN El Hassane*
Pr. CHAT Latifa
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. KABIRI EL Hassane*
Pr. LAMRANI Moulay Omar
Pr. LEKEHAL Brahim
Pr. MEDARHRI Jalil
Pr. MIKDAME Mohammed*
Pr. MOHSINE Raouf
Pr. NOUINI Yassine
Pr. SABBAAH Farid
Pr. SEFIANI Yasser
Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Anesthésie-Réanimation
Neurologie
Néphrologie
Pneumo-phtisiologie
Gastro-Entérologie
Cardiologie
Pédiatrie
Rhumatologie
Anatomie
Radiologie
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Neuro-Chirurgie
Chirurgie - [Pédiatrique Directeur Hôp. Des Enfants Rabat](#)
Chirurgie Générale
Pédiatrie - [Directeur Hôp. Univ. International \(Cheikh Khalifa\)](#)
Neuro-Chirurgie
Chirurgie Générale [Directeur Hôpital Ibn Sina](#)
Chirurgie Thoracique
Traumatologie Orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique [V-D chargé Aff Acad. Est.](#)
Chirurgie Générale
Hématologie Clinique
Chirurgie Générale
Urologie
Chirurgie Générale
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Pédiatrie

Décembre 2002

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. CHOHO Abdelkrim *
Pr. CHKIRATE Bouchra
Pr. EL ALAMI EL Fellous Sidi Zouhair
Pr. FILALI ADIB Abdelhai

Urologie
Cardiologie
Gastro-Entérologie
Biochimie-Chimie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Chirurgie Générale
Pédiatrie
Chirurgie Pédiatrique
Gynécologie Obstétrique

Pr. HAJJI Zakia
Pr. KRIOUILE Yamina
Pr. OUJILAL Abdelilah
Pr. RAISS Mohamed
Pr. SIAH Samir *
Pr. THIMOU Amal
Pr. ZENTAR Aziz*

Ophtalmologie
Pédiatrie
Oto-Rhino-Laryngologie
Chirurgie Générale
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale

Janvier 2004

Pr. ABDELLAH El Hassan
Pr. AMRANI Mariam
Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
Pr. BENKIRANE Ahmed*
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. HACHI Hafid
Pr. JABOUIRIK Fatima
Pr. KHARMAZ Mohamed
Pr. MOUGHIL Said
Pr. OUBAAZ Abdelbarre *
Pr. TARIB Abdelilah*
Pr. TIJAMI Fouad
Pr. ZARZUR Jamila

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

Janvier 2005

Pr. ABBASSI Abdellah
Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
Pr. ALLALI Fadoua
Pr. AMAZOUZI Abdellah
Pr. BAHIRI Rachid
Pr. BARKAT Amina
Pr. BENYASS Aatif*
Pr. DOUDOUH Abderrahim*
Pr. HAJJI Leila
Pr. HESSISSEN Leila
Pr. JIDAL Mohamed*
Pr. LAAROUSSI Mohamed
Pr. LYAGOUBI Mohammed
Pr. SBIHI Souad
Pr. ZERAIDI Najia

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Rhumatologie
Ophtalmologie
Rhumatologie [Directeur Hôp. Al Ayachi Salé](#)
Pédiatrie
Cardiologie
Biophysique
Cariologie (mise en disponibilité)
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Cardio-vasculaire
Parasitologie
Histo-Embryologie Cytogénétique
Gynécologie Obstétrique

Avril 2006

Pr. ACHEMLAL Lahsen*
Pr. BELMEKKI Abdelkader*
Pr. BENCHEIKH Razika
Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
Pr. BOULAHYA Abdellatif*
Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
Pr. DOGHMI Nawal

Rhumatologie
Hématologie
O.R. L
Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio – Vasculaire. [Directeur Hôpital Ibn Sina Marr.](#)
Gynécologie Obstétrique
Cardiologie

Pr. FELLAT Ibtissam
Pr. FAROUDY Mamoun
Pr. HARMOUCHE Hicham
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. SOUALHI Mouna
Pr. TELLAL Saida*
Pr. ZAHRAOUI Rachida

Cardiologie
Anesthésie Réanimation
Médecine Interne
Microbiologie
Radiologie
Urologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Chirurgie – Pédiatrique
Pharmacie Galénique
Parasitologie
Radiothérapie
Psychiatrie
Endocrinologie
Pneumo – Phtisiologie
Biochimie
Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

Pr. ABIDI Khalid
Pr. ACHACHI Leila
Pr. AMHAJJI Larbi *
Pr. AOUI Sarra
Pr. BAITE Abdelouahed *
Pr. BALOUCH Lhousaine *
Pr. BENZIANE Hamid *
Pr. BOUTIMZINE Nourdine
Pr. CHERKAOUI Naoual *
Pr. EL BEKKALI Youssef *
Pr. EL ABSI Mohamed
Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
Pr. EL OMARI Fatima
Pr. GHARIB Nouredine
Pr. HADADI Khalid *
Pr. ICHOU Mohamed *
Pr. ISMAILI Nadia
Pr. KEBDANI Tayeb
Pr. LOUZI Lhoussain *
Pr. MADANI Naoufel
Pr. MARC Karima
Pr. MASRAR Azlarab
Pr. OUZZIF Ez zohra *
Pr. SEFFAR Myriame
Pr. SEKHSOKH Yessine *
Pr. SIFAT Hassan *
Pr. TACHFOUTI Samira
Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
Pr. TANANE Mansour *
Pr. TLIGUI Houssain
Pr. TOUATI Zakia

Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Traumatologie orthopédie
Parasitologie
Anesthésie réanimation
Biochimie-chimie
Pharmacie clinique
Ophtalmologie
Pharmacie galénique
Chirurgie cardio-vasculaire
Chirurgie générale
Anesthésie réanimation
Psychiatrie
Chirurgie plastique et réparatrice
Radiothérapie
Oncologie médicale
Dermatologie
Radiothérapie
Microbiologie
Réanimation médicale
Pneumo phtisiologie
Hématologie biologique
Biochimie-chimie
Microbiologie
Microbiologie
Radiothérapie
Ophtalmologie
Chirurgie générale
Traumatologie-orthopédie
Parasitologie
Cardiologie

Mars 2009

Pr. ABOUZAHIR Ali *
Pr. AGADR Aomar *
Pr. AIT ALI Abdelmounaim *
Pr. AKHADDAR Ali *
Pr. ALLALI Nazik
Pr. AMINE Bouchra
Pr. ARKHA Yassir
Pr. BELYAMANI Lahcen *
Pr. BJIJOU Younes
Pr. BOUHSAIN Sanae *
Pr. BOUI Mohammed *

Médecine interne
Pédiatrie
Chirurgie Générale
Neuro-chirurgie
Radiologie
Rhumatologie
Neuro-chirurgie [Directeur Hôp.des Spécialités](#)
Anesthésie Réanimation
Anatomie
Biochimie-chimie
Dermatologie

Pr. BOUNAIM Ahmed *
Pr. BOUSSOUGA Mostapha *
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. LAMSAOURI Jamal *
Pr. MARMADE Lahcen
Pr. MESKINI Toufik
Pr. MESSAOUDI Nezha *
Pr. MSSROURI Rahal
Pr. NASSAR Ittimade
Pr. OUKERRAJ Latifa
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *

Chirurgie Générale
Traumatologie-orthopédie
Chirurgie Vasculaire Périphérique
Hématologie clinique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Médecine interne
Gynécologie obstétrique
Rhumatologie
Gastro-entérologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Chimie Thérapeutique
Chirurgie Cardio-vasculaire
Pédiatrie
Hématologie biologique
Chirurgie Générale
Radiologie
Cardiologie
Pneumo-Physiologie

Octobre 2010

Pr. ALILOU Mustapha
Pr. AMEZIANE Taoufiq*
Pr. BELAGUID Abdelaziz
Pr. CHADLI Mariama*
Pr. CHEMSI Mohamed*
Pr. DAMI Abdellah*
Pr. DARBI Abdellatif*
Pr. DENDANE Mohammed Anouar
Pr. EL HAFIDI Naima
Pr. EL KHARRAS Abdennasser*
Pr. EL MAZOUZ Samir
Pr. EL SAYEGH Hachem
Pr. ERRABIH Ikram
Pr. LAMALMI Najat
Pr. MOSADIK Ahlam
Pr. MOUJAHID Mountassir*
Pr. ZOUAIDIA Fouad

Anesthésie réanimation
Médecine Interne [Directeur ERSSM](#)
Physiologie
Microbiologie
Médecine Aéronautique
Biochimie- Chimie
Radiologie
Chirurgie Pédiatrique
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Plastique et Réparatrice
Urologie
Gastro-Entérologie
Anatomie Pathologique
Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique

Decembre 2010

Pr. ZNATI Kaoutar

Anatomie Pathologique

Mai 2012

Pr. AMRANI Abdelouahed
Pr. ABOUELALAA Khalil *
Pr. BENCHEBBA Driss *

Chirurgie pédiatrique
Anesthésie Réanimation
Traumatologie-orthopédie

Pr. DRISSI Mohamed *
Pr. EL ALAOUI MHAMDI Mouna
Pr. EL OUAZZANI Hanane *
Pr. ER-RAJI Mounir
Pr. JAHID Ahmed

Anesthésie Réanimation
Chirurgie Générale
Pneumophtisiologie
Chirurgie Pédiatrique
Anatomie Pathologique

Février 2013

Pr.AHID Samir
Pr.AIT EL CADI Mina
Pr.AMRANI HANCHI Laila
Pr.AMOR Mourad
Pr.AWAB Almahti
Pr.BELAYACHI Jihane
Pr.BELKHADIR Zakaria Houssain
Pr.BENCHEKROUN Laila
Pr.BENKIRANE Souad
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
Pr.EL JAOUDI 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 Meryem
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 *

Pharmacologie
Toxicologie
Gastro-Entérologie
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Réanimation Médicale
Anesthésie-Réanimation
Biochimie-Chimie
Hématologie
Anesthésie Réanimation
Néphrologie
Chimie Analytique et Bromatologie
Traumatologie orthopédie
Anatomie
Cardiologie
Réanimation Médicale
Pédiatrie
Anesthésie Réanimation
Radiologie
Neuro-chirurgie
Médecine Nucléaire
Chimie Thérapeutique
Toxicologie
Pédiatrie
Anatomie Pathologique
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 **Vice-Doyen à la Pharmacie**
Génétique
Neurologie
Ophtalmologie

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 *

Avril 2013

Pr. EL KHATIB MOHAMED KARIM *

Mai 2013

Pr. BOUSLIMAN Yassir*

Mars 2014

Pr. ACHIR Abdellah
Pr. BENCHAKROUN Mohammed *
Pr. BOUCHIKH Mohammed
Pr. EL KABBAJ Driss *
Pr. EL MACHTANI IDRISSE Samira *
Pr. HARDIZI Houyam
Pr. HASSANI Amale *
Pr. HERRAK Laila
Pr. JEAIDI Anass *
Pr. KOUACH Jaouad*
Pr. MAKRAM Sanaa *
Pr. RHISSASSI Mohamed Jaafar
Pr. SEKKACH Youssef*
Pr. TAZI MOUKHA Zakia

Décembre 2014

Pr. ABILKACEM Rachid*
Pr. AIT BOUGHIMA Fadila
Pr. BEKKALI Hicham *
Pr. BENAZZOU Salma
Pr. BOUABDELLAH Mounya
Pr. BOUCHRIK Mourad*
Pr. DERRAJI Soufiane*
Pr. EL AYOUBI EL IDRISSE Ali
Pr. EL GHADBANE Abdedaim Hatim*
Pr. EL MARJANY Mohammed*
Pr. FEJJAL Nawfal
Pr. JAHIDI Mohamed*
Pr. LAKHAL Zouhair*
Pr. OUDGHIRI NEZHA
Pr. RAMI Mohamed
Pr. SABIR Maria
Pr. SBAI IDRISSE Karim*

Aout 2015

Pr. MEZIANE Meryem
Pr. TAHIRI Latifa

Neurologie
Physiologie
Rhumatologie
Anatomie Pathologique
Gastro-Entérologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Gastro-Entérologie
Chirurgie Pédiatrique
Traumatologie Orthopédie

Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale

Toxicologie

Chirurgie Thoracique
Traumatologie- Orthopédie
Chirurgie Thoracique
Néphrologie
Biochimie-Chimie
Histologie- Embryologie-Cytogénétique
Pédiatrie
Pneumologie
Hématologie Biologique
Gynécologie-Obstétrique
Pharmacologie
CCV
Médecine Interne
Gynécologie-Obstétrique

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

Dermatologie
Rhumatologie

PROFESSEURS AGREGES :

Janvier 2016

Pr. BENKABBOU Amine
Pr. EL ASRI Fouad*
Pr. ERRAMI Nouredine*
Pr. NITASSI Sophia

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

Juin 2017

Pr. ABI Rachid*
Pr. ASFALOU Ilyasse*
Pr. BOUAITI El Arbi*
Pr. BOUTAYEB Saber
Pr. EL GHISSASSI Ibrahim
Pr. HAFIDI Jawad
Pr. MAJBAR Mohammed Anas
Pr. OURAINI Saloua*
Pr. RAZINE Rachid
Pr. SOUADKA Amine
Pr. ZRARA Abdelhamid*

Microbiologie
Cardiologie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Oncologie Médicale
Oncologie Médicale
Anatomie
Chirurgie Générale
O.R.L
Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Chirurgie Générale
Immunologie

Mai 2018

Pr. AMMOURI Wafa
Pr. BENTALHA Aziza
Pr. EL AHMADI Brahim
Pr. EL HARRECH Youness*
Pr. EL KACEMI Hanan
Pr. EL MAJJAOUI Sanaa
Pr. FATIHI Jamal*
Pr. GHANNAM Abdel-Ilah
Pr. JROUNDI Imane
Pr. MOATASSIM BILLAH Nabil
Pr. TADILI Sidi Jawad
Pr. TANZ Rachid*

Médecine interne
Anesthésie-Réanimation
Anesthésie-Réanimation
Urologie
Radiothérapie
Radiothérapie
Médecine Interne
Anesthésie-Réanimation
Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Radiologie
Anesthésie-Réanimation
Oncologie Médicale

Novembre 2018

Pr. AMELLAL Mina
Pr. SOULY Karim
Pr. TAHRI Rajae

Anatomie
Microbiologie
Histologie-Embryologie-Cytogénétique

Novembre 2019

Pr. AATIF Taoufiq*
Pr. ACHBOUK Abdelhafid *
Pr. ANDALOUSSI SAGHIR Khalid
Pr. BABA HABIB Moulay Abdellah*
Pr. BASSIR RIDA ALLAH
Pr. BOUATTAR TARIK
Pr. BOUFETTAL MONSEF
Pr. BOUCHENTOUF Sidi Mohammed *
Pr. BOUZELMAT HICHAM *
Pr. BOUKHRIS JALAL *
Pr. CHAFRY BOUCHAIB *
Pr. CHAHDI HAFSA*
Pr. CHERIF EL ASRI ABAD *
Pr. DAMIRI AMAL *

Néphrologie
Chirurgie réparatrice et plastique
Radiothérapie
Gynécologie-Obstétrique
Anatomie
Néphrologie
Anatomie
Chirurgie-Générale
Cardiologie
Traumatologie-Orthopédie
Traumatologie-Orthopédie
Anatomie pathologique
Neuro-chirurgie
Anatomie Pathologique

Pr. DOGHMI NAWFAL*
Pr. ELALAOUI SIDI-YASSIR
Pr. EL ANNAZ HICHAM*
Pr. EL HASSANI MOULAY EL MEHDI*
Pr. EL HJOUJI ABDERRAHMAN *
Pr. EL KAOUI HAKIM *
Pr. EL WALI ABDERRAHMAN*
Pr. EN-NAFAA ISSAM *
Pr. HAMAMA JALAL *
Pr. HEMMAOUI BOUCHAIB*
Pr. HJIRA NAOUFAL *
Pr. JIRA MOHAMED *
Pr. JNIENE ASMAA
Pr. LARAQUI HICHAM *
Pr. MAHFOUD TARIK *
Pr. MEZIANE MOHAMMED *
Pr. MOUTAKI ALLAH YOUNES *
Pr. MOUZARI YASSINE *
Pr. NAOUI HAFIDA *
Pr. OBTEL MAJDOULINE
Pr. OURRAI ABDELHAKIM *
Pr. SAOUAB RACHIDA *
Pr. SBITTI YASSIR *
Pr. ZADDOUG OMAR*
Pr. ZIDOUH SAAD *

Anesthésie-Réanimation
Pharmacie-Galénique
Virologie
Gynécologie-Obstétrique
Chirurgie Générale
Chirurgie Générale
Anesthésie-Réanimation
Radiologie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
O.R.L
Dermatologie
Médecine interne
Physiologie
Chirurgie-Générale
Oncologie Médicale
Anesthésie-Réanimation
Chirurgie Cardio-Vasculaire
Ophtalmologie
Parasitologie-Mycologie
Médecine préventive, santé publique et Hyg.
Pédiatrie
Radiologie
Oncologie Médicale
Traumatologie-Orthopédie
Anesthésie-Réanimation

2 - ENSEIGNANTS-CHERCHEURS SCIENTIFIQUE

PROFESSEURS DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR :

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 .BARKIYOU Malika	Histologie-Embryologie
Pr. BOUHOUCHE Ahmed	Génétique Humaine
Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz	Applications Pharmaceutiques
Pr. DAKKA Taoufiq	Physiologie <u>Vice-Doyen chargé de la Rech. et de la Coop.</u>
Pr. FAOUZI Moulay El Abbes	Pharmacologie
Pr. IBRAHIMI Azeddine	Biologie moléculaire/Biotechnologie
Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med	Chimie Organique
Pr. RIDHA Ahlam	Chimie
Pr. TOUATI Driss	Pharmacognosie
Pr. ZAHIDI Ahmed	Pharmacologie

PROFESSEURS HABILITES :

Pr .BENZEID Hanane	Chimie
Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia	Biochimie-chimie
Pr .DOUKKALI Anass	Chimie Analytique
Pr .EL JASTIMI Jamila	Chimie
Pr. KHANFRI Jamal Eddine	Histologie-Embryologie
Pr.LYAHYAI Jaber	Génétique
Pr. OUADGHIRI Mouna	Microbiologie et Biologie
Pr. RAMLI Youssef	Chimie
Pr. SERRAGUI Samira	Pharmacologie
Pr. TAZI Ahnini	Génétique
Pr. YAGOUBI Maamar	Eau, Environnement

Mise à jour le 09/04/2021

KHALED Abdellah

Chef du Service des Ressources Humaines

FMPR



Dédicaces



A ma merveilleuse mère

Tu représentes pour moi le symbole de la gentillesse par excellence, une source de tendresse et un exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ces enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.

Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon cher père

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect,
mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices
consentis pour mon instruction et mon bien être. Tu as été
pour moi durant toute ma vie le père exemplaire. J'espère
réaliser ce jour un de tes rêves et être digne de ton nom,
ton éducation, ta confiance et des hautes valeurs
que tu m'as inculqué. Que dieu, tout puissant,
te garde, te procure santé, bonheur et longue vie.*

A mes 2 sœurs

*Je vous dédie ce travail en témoignage de l'amour
et de la gratitude pour l'épaule inconditionnelle que vous
représentez pour moi.*

*Je ne saurais exprimer mes sentiments fraternels
et chers que j'éprouve pour vous deux.*

*Que dieu vous protège et consolide les liens sacrés
qui nous unissent.*

A mes grands parents

*Je vous dédie ce travail en témoignage de mon amour
et de ma reconnaissance de votre soutien inconditionnels
et vos encouragements.*

A mes tantes et oncles.

Vous avez toujours été avec moi, rien ne saurait traduire le fond de mes sentiments envers vous. J'espère que vous allez trouver dans ce travail, le témoignage de mes sentiments les plus sincères et les plus affectueux.

A mes cousines et cousins

En témoignage de l'attachement, et de l'affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes meilleurs vœux.

*A tous mes amis proches, d'enfance,
et camarades
de la Faculté de Médecine et Pharmacie.*

Les mots ne sauraient exprimer l'entendue de l'affection que j'ai pour vous et ma gratitude. Je vous dédie ce travail avec tous mes meilleurs vœux.

*A MES ENSEIGNANTS DE PRIMAIRE, SECONDAIRE
ET DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE RAABAT*

*A TOUS CEUX QUI ONT CONTRIBUE DE PRES
OU DE LOIN A L'ELABORATION DE CE TRAVAIL.*



Remerciements



A notre maître et président de thèse

Pr. Badre Eddine LMIMOUNI

*Nous vous remercions de l'honneur que vous
nous avez fait en acceptant de présider notre jury.
Veuillez trouver ici, Professeur, l'expression de nos sincères
remerciements, de notre profonde reconnaissance,
et nos sincères respects.*

*A mon maître et rapporteur
de thèse Pr. Hafida NAOUI*

*C'est avec un grand plaisir que je me suis adressé à vous afin
de bénéficier de votre encadrement. Votre modestie et votre
dévouement dans le travail sont remarquables*

*Je suis très touchée par votre disponibilité malgré vos multiples
responsabilités. Vos enseignements, conseils et remarques
m'ont guidé tout au long de ce travail. Je suis très fier
d'avoir appris auprès de vous et j'espère avoir été
à la hauteur de votre attente.*

*Veillez trouver ici, Professeur, l'expression
de ma profonde gratitude.*

A notre maître et juge Pr. Mourad Bouchrik

*Nous vous remercions vivement d'avoir accepté
de juger notre travail*

*Veillez trouver ici, Professeur, l'expression
de notre grande reconnaissance et nos sincères respects.*

A mon maître et juge Pr. Souad Azelmat

*Nous vous remercions vivement d'avoir accepté
de juger notre travail*

*Veillez trouver ici, Professeur, l'expression de notre grande
reconnaissance et nos sincères respects.*



Liste des abréviations



LISTE DES ABREVIATIONS:

Ac	: Anticorps
ADN	: Acide désoxyribonucléique
Ag	: Antigène
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ARNr	: Acide ribonucléique ribosomique
BM	: Biologie moléculaire
CDC	: Centre de control et de prévention
CLIP	: Cross-Linking Immunoprécipitation and PCR
CRP	: Protéine C réactive
EDTA	: Ethylène diamine tétra-acétique
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FBH	: Fièvre bilieuse hémoglobinurique
FiO₂	: Fraction Inspirée en Oxygène.
FSM	: Frottis sanguin mince
GB	: Globules blancs
GE	: Goutte Epaisse
GER	: Goutte épaisse rapide
GES	: Goutte épaisse classique
GR	: Globules rouges
Hb	: Hémoglobine.

HDL	: Lipoprotéine de haute densité
HRP2	: Protéine-2 riche en histidine
Ht	: Hématocrite.
ICT	: Immunochromatographiques
IFI	: Test des anticorps à fluorescence indirecte
IgG	: Immunoglobuline G.
IgM	: Immunoglobuline M.
IV	: Intraveineux
kDa	: Kilodalton
LAMP	: Loop-mediated isothermal amplification
LDH	: Lactate Déshydrogénase
MGG	: May-Grünwald Giemsa
NASBA	: Nucleic acid sequence-based amplification
OMS	: Organisation mondiale de la santé.
P	: Plasmodium
PA	: Pression artérielle
PAFC	: Cytométrie en flux photoacoustique in vivo
Pao2	: Pression Artérielle d'oxygène.
PCR	: Réaction en chaîne par polymérase
PVE	: Paludisme viscéral évolutif
QBC	: Quantitative Buffy Coat
SPO2	: Saturation pulsée en oxygène.

TDR : Test de diagnostic rapide
TEP : Transfert d'électrons photo-induits
UV : Ultraviolet
VM : Ventilation Mécanique.
WHT : World Health Technology



Liste des illustrations



LISTE DES FIGURES:

Figure 1: Morphologie des différents stades d'évolution de <i>P. falciparum</i>	9
Figure 2: Morphologie des différents stades d'évolution de <i>P. ovale</i>	10
Figure 3: Anophèle femelle.....	12
Figure 4. Cycle parasitaire de <i>Plasmodium falciparum</i>	15
Figure 5: Goutte épaisse sur lame.	30
Figure 6: Parcours réalisé lors de l'examen microscopique d'une goutte épaisse ou d'un frottis sanguin.....	33
Figure 7: Étapes de réalisation de la goutte épaisse rapide.	34
Figure 8: Goutte épaisse négative.....	35
Figure 9: Goutte épaisse positive ; Aspect de ciel étoilé avec de nombreux trophozoïtes.	35
Figure 10 (a, b, c) : Étapes d'élaboration d'un frottis sanguin.	37
Figure 11: Parcours réalisé lors d'un examen microscopique du frottis mince.	39
Figure 12: Exemples de différents éléments cellulaires observés sur frottis sanguin mince et pouvant induire la confusion lors du diagnostic parasitologique du Paludisme.	42
Figure 13: Aspects morphologiques des différentes espèces.	44
Figure 14: Aspects morphologiques de <i>P. knowlesi</i>	45
Figure 15: Trophozoïtes et gamétocytes de <i>P.falciparum</i> sur goutte épaisse au grossissement 1000.	48
Figure 16: Différents aspects du <i>Plasmodium falciparum</i> sur FSM : Trophozoïtes et gamétocyte grossissement*1000.	49
Figure 17: Trophozoïte âgé de <i>P. vivax</i> sur FSM au grossissement 1000.	50
Figure 18: Trophozoïtes de <i>P. ovale</i> sur FSM au grossissement 10000.....	50
Figure 19: Schizontes de <i>P. ovale</i> sur FSM au grossissement 1000	51
Figure 20: Gamétocyte de <i>P. ovale</i> sur FSM au grossissement 1000.	51
Figure 21: Aspect de bande équatoriale (Trophozoïte âgé) du <i>Plasmodium malariae</i> au grossissement 1000.....	52
Figure 22: Schizonte de <i>Plasmodium malariae</i> au grossissement *1000.	52
Figure 23: <i>P.knowlesi</i> trophozoïtes jeunes Idem <i>P. falciparum</i>	53

Figure 24: <i>P.knowlesi</i> trophozoïtes âgés Idem <i>P. malariae</i>	53
Figure 25: Principe de la QBC.	58
Figure 26: Diagramme schématique du tube QBC.....	59
Figure 27: Aspect des parasites fluorescents par la technique QBC.	59
Figure 28: Descriptif des étapes de fonctionnement des tests de diagnostic rapide.....	62
Figure 29: Tests de diagnostic rapide du paludisme à deux et trois bandes avec des dispositifs de transfert de sang	71
Figure 30: Test de diagnostic rapide PALUTOP®+4 Optima avec 3 bandes.	72
Figure 31: Schéma du principe de l'ELISA.	76
Figure 32: Principe de la PCR nichée.....	82
Figure 33: Représentation schématique du mécanisme LAMP.	88
Figure 34: Principe de la méthode LAMP illumigene.....	89
Figure 35: Représentation schématique de l'amplification NASBA.	91
Figure 36: Logigramme du diagnostic du paludisme.	105

LISTE DES TABLEAUX:

Tableau I: Caractéristiques des différentes formes pathogènes de Plasmodium.	11
Tableau II: Critères cliniques et biologiques du paludisme.	19
Tableau III: Critères morphologiques microscopiques pour l'identification de l'espèce plasmodiale lors du diagnostic du paludisme.	47
Tableau IV: Protéines plasmodiales associées au diagnostic des différentes espèces de <i>Plasmodium</i>	66
Tableau V: Caractéristiques des biomarqueurs dans les tests de diagnostic rapide (TDR) du paludisme. (pour des parasitémies supérieures à 0.002%)	66
Tableau VI: Comparaison de la sensibilité et de la spécificité de quelques types de TDR à <i>P.falciparum</i>	67
Tableau VII: Comparaison de la sensibilité et de la spécificité de quelques types de TDR à <i>P.non falciparum</i>	68
Tableau VIII: Facteurs affectant la précision des TDR.	74
Tableau IX: Comparaison de la spécificité des TDR PLDH et des TDR HRP2 après traitement efficace.....	74
Tableau X: Les amorces de la PCR nichée pour la détection des espèces plasmodiales.	82
Tableau XI: Comparaison des techniques de recherche du paludisme.....	103



Sommaire



SOMMAIRE

INTRODUCTION	2
GENERALITES	4
I.HISTORIQUE	5
II.EPIDEMIOLOGIE	6
II-1- ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES.....	6
A - Situation dans le monde.....	6
B- Situation au Maroc	6
II-2- AGENT PATHOGENE :.....	8
II-3- VECTEUR :.....	12
II-4- TRANSMISSION :.....	13
II-5- CYCLE PARASITAIRE DU PLASMODIUM :.....	13
III. -CLINIQUE :.....	16
III-1- LA PHASE D'INCUBATION :.....	16
III-2- L'ACCES PALUSTRE SIMPLE :.....	16
III-3- L'ACCES PALUSTRE GRAVE.....	18
IV. SIGNES BIOLOGIQUES NON SPECIFIQUES :.....	20
V. TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE	22
V-1- TRAITEMENT[18].....	22
V-1-1- prise en charge d'accès palustre simple.....	22
a. Accès palustre non compliqué à P. Falciparum.....	22
b. Accès palustre non compliqué à P. non falciparum.....	22
V-1-2- Prise en charge d'un accès palustre grave.....	23
V-2- PROPHYLAXIE ET PREVENTION.....	24
V-2-1- Prévention individuelle.....	24

a.	Lutte contre les piqûres de moustiques	24
b.	Chimioprophylaxie médicamenteuse	24
	V-2-2- Prévention Collective	25
	METHODES DE DIAGNOSTIC DU PALUDISME	26
I.	-METHODES DE DIAGNOSTIC CLASSIQUES	28
I-1	TECHNIQUES MICROSCOPIQUES CONVENTIONNELLES :	28
A-	Prélèvements :	28
B-	La Goutte Épaisse :	29
B-1-	La Goutte épaisse classique :	29
B-2-	La Goutte épaisse rapide :	30
B-3	Lecture :	32
B-4	Avantages :	33
B-5	Inconvénients :	33
C-	Le Frottis Sanguin Mince :	36
I-2	QBC: QUANTITATIVE BUFFY COAT MALARIA	56
A-	Principe	56
B-	Sensibilité et spécificité :	60
C-	Avantages :	60
2-5	INCONVENIENTS :	60
I-3	LES TESTS DE DIAGNOSTIC RAPIDES DU PALUDISME	61
A-	Principe :	61
B-	Antigènes plasmodiaux détectés par les TDR	63
B-1	L'HRP :	63
B-2	L'aldolase :	65
B-3	La p-LDH :	65

C- Performance des TDR.....	67
D- Avantages	72
E- Inconvénients	72
I-4-METHODES SEROLOGIQUES.....	75
A. Test ELISA.....	76
B. IFI (Test des anticorps à fluorescence indirecte)	77
II. NOUVELLES TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC DU PALUDISME.....	78
II-1 METHODES MOLECULAIRES POUR LE DIAGNOSTIC DU PALUDISME.	78
A. Tests d'amplification géniques par PCR.....	78
A-1 VARIANTES DE LA PCR.....	81
a- La PCR nichée.....	81
b- La PCR en temps réel.	83
c- La Transcriptase inverse PCR	84
d- La CLIP PCR :	85
B. Techniques d'amplification isotherme	85
B-1 LAMP.	86
B-2 NASBA.....	90
II-2 METHODES EN COURS DE DEVELOPPEMENT	92
A. La cytométrie en flux :.....	92
B. Diagnostic spécifique du plasmodium à l'aide d'un aptamère paludique.	93
C. Diagnostic par des méthodes non sanguines	94
C-1 Test basé sur la salive avec amplification d'acide nucléique.....	94
C-2 Détection de protéines de plasmodium basée sur la salive.....	95
C-3 Test de paludisme à base d'urine	96
D. La Spectroscopie	97

D-1 Technologies de spectroscopie en développement.	97
D-2 Technologie Spectraphone	98
E. Méthodes de détection d'Hémozoïne parasitaire :.....	99
E-1 Analyseurs hématologiques	99
E-2 Technologies en cours de développement pour la détection de l'hémozoïne.	100
III.COMPARAISON DES PRINCIPALES METHODES DE DC DU PALUDISME.....	103
IV.RECOMMANDATIONS.....	104
CONCLUSION	106
RESUMES	109
BIBLIOGRAPHIE	113



Introduction



I.INTRODUCTION

Le paludisme ou malaria est une parasitose causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmise par la piqûre de certaines espèces de moustiques femelles du genre Anophèles. La forme la plus grave et parfois mortelle est causée par *Plasmodium falciparum*. Les autres espèces humaines de paludisme, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et parfois *P. knowlesi* peuvent provoquer une maladie aiguë et grave, mais les taux de mortalité sont faibles.[1]

Le paludisme est la maladie infectieuse la plus importante dans les régions tropicales et subtropicales et continue d'être un problème de santé mondial majeur en raison du nombre très élevé de cas de paludisme dans le monde, de la prévalence croissante des souches de parasites résistantes aux médicaments et de l'augmentation massive des voyages internationaux et des migrations. Selon le dernier rapport de l'OMS sur le paludisme dans le monde, publié en décembre 2020, il y a eu 229 millions de cas de paludisme et 409 000 décès dus à la maladie en 2019. [2]

Maladie potentiellement mortelle en l'absence d'une prise en charge rapide, son diagnostic est une véritable urgence.

Le diagnostic clinique peut être difficile, par conséquent, des diagnostics de confirmation utilisant des technologies de laboratoire sont nécessaires de toute urgence.

Le biologiste a donc un rôle crucial à jouer dans le diagnostic du paludisme. Il doit pouvoir conclure à la présence ou à l'absence du parasite, préciser l'espèce, quantifier la parasitémie. Le biologiste dispose de nombreux outils. Lesquels utiliser ?

Avant de répondre à cette question, il est important de bien connaître les différentes techniques utilisables, leur sensibilité, la spécificité, le temps consommé, la rentabilité, l'intensité du travail ainsi que leur besoin en matériel et en ressources humaines qualifiées.

Notre travail a pour but de passer en revue les différentes méthodes utilisées et les nouvelles techniques en cours de développement dans le diagnostic du paludisme ainsi que de mettre la lumière sur leur apport, avantages et limites.



Généralités



I. HISTORIQUE

Le paludisme est une des plus anciennes maladies de l'humanité. Ses manifestations cliniques ont été décrites par les premières civilisations.

En 1880 fut la découverte du parasite par Alphonse Laveran.

La période entre 1885-90 a été marquée par la découverte de trois premières espèces parasitaires de l'Homme *P. vivax*, *P. malariae* et *P. falciparum* par Marchiafava et Celli alors que *P. ovale* a été découverte en 1922 par Stephen.[3]

En 1955, l'OMS a lancé un programme mondial d'éradication du paludisme. Ce programme a été un succès dans les régions de paludisme instable, où le niveau de transmission était faible. Mais il a malheureusement échoué dans les régions de forte endémie palustre, particulièrement en Afrique tropicale. Au vu de la découverte de souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à la chloroquine et de la résistance des moustiques aux insecticides, la situation est devenue préoccupante. Devant son demi-échec, l'OMS a mis fin à la campagne d'éradication moins de 20 ans plus tard, au profit d'un programme de lutte visant à contenir les effets néfastes du paludisme, plutôt qu'à l'éradiquer. [3]

Au Maroc, le paludisme a sévi pendant des siècles et depuis le lancement du programme de lutte contre le paludisme en 1965, le nombre de cas autochtones a nettement diminué et les efforts déployés ont permis en 1973 d'éradiquer l'espèce de *P. falciparum* responsable du paludisme grave et en 2004, le tout dernier foyer de *P. vivax* a été neutralisé. [4]

Depuis l'année 2005, aucun cas autochtone de paludisme n'a été enregistré dans notre pays [5]. Tous les cas notifiés à partir de cette date sont des cas importés de l'étranger. Cette réalisation a permis à notre pays d'être certifié « exempt de paludisme » par l'OMS en 2010. [6]

II. EPIDEMIOLOGIE

II-1- ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES

A - Situation dans le monde

Le paludisme, 1ère endémie parasitaire mondiale et troisième fléau infectieux mondial, est une maladie parasitaire à transmission vectorielle qui sévit dans les régions intertropicales dont trois principales zones de forte transmission : l'Afrique subsaharienne, l'Asie du Sud-Est et l'Amérique du Sud (figure 1).

On compte chaque année plusieurs millions de cas aigus de paludisme dans le monde et des milliers de décès. Environ 90% de ces décès surviennent en Afrique.

Selon le dernier rapport du paludisme de l'OMS en 2020, le taux d'incidence des cas de paludisme (cas pour 1 000 habitants exposés au risque de paludisme) est passé de 80 en 2000 à 57 en 2019. Le nombre total de cas de paludisme a diminué, passant de 238 millions en 2000 à 229 millions en 2019.

Le taux d'incidence de la mortalité quant à lui (décès pour 100 000 habitants exposés au risque de paludisme) a diminué de 25 en 2000 à 10 en 2019. Le nombre total de décès liés au paludisme a diminué, passant de 736 000 en 2000 à 409 000 en 2019. [2]

B- Situation au Maroc

Après plusieurs décennies de lutte contre le paludisme, le Maroc a été certifié par l'OMS indemne de paludisme autochtone en 2010. En effet depuis l'année 2005 aucun cas de paludisme autochtone n'a été enregistré.

La situation épidémiologique a été exclusivement, depuis cette année, dominée par la notification de cas importés de l'étranger, principalement d'Afrique subsaharienne.

Actuellement, chaque année on enregistre une centaine de cas de paludisme d'importation(509 cas en 2015, 415 en 2016).[7]

II-2- AGENT PATHOGENE :

Le paludisme est dû à un protozoaire appartenant au genre *Plasmodium*.

Il existe de très nombreuses espèces de *Plasmodium* (plus de 140) touchant diverses espèces animales mais seulement cinq sont retrouvées en pathologie humaine.

Il s'agit de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et plus récemment, des cas d'infection à *Plasmodium knowlesi* ont été enregistrés. Celui-ci étant un parasite habituel des singes (macaques) d'Asie.

Les cinq espèces diffèrent par des critères biologiques, cliniques, par leur répartition géographique et par leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques (tableau 1).

D'emblée, il faut différencier *P. falciparum* des autres espèces. En effet c'est celui qui est le plus largement répandu à travers le monde, qui développe des résistances aux antipaludiques et qui est responsable des formes cliniques potentiellement mortelles.[9]

Sur le plan morphologique, Le Plasmodium se présente, chez l'Homme, sous forme d'un très petit protozoaire intra-érythrocytaire de quelques micromètres de diamètre et de morphologie variable selon l'espèce et le stade d'évolution parasitaire :

Le Trophozoïte : Il se présente généralement sous forme d'une « bague à chaton » d'un à deux micromètres de diamètre selon l'espèce et l'âge du trophozoïte. Il est constitué, après coloration au MGG, d'un noyau rouge

repoussé en périphérique et d'un cytoplasme bleu pâle entourant une vacuole nutritive claire, avec parfois présence d'un pigment brun-doré ou noirâtre appelé « pigment malarique » ou « hémozoïne ».

Le Schizonte : Il prend la forme de « rosace » avec les noyaux en périphérique et l'hémozoïne au centre.

Le Gamétocyte : de forme de faucille rose ou bleu ou en banane pour le *P. falciparum* et pour les autres espèces, formation ronde rose (gamétocyte mâle) ou bleu (gamétocyte femelle), avec un gros noyau rouge et des pigments noirâtres de positions différentes selon l'espèce et le potentiel sexuel du gamétocyte.

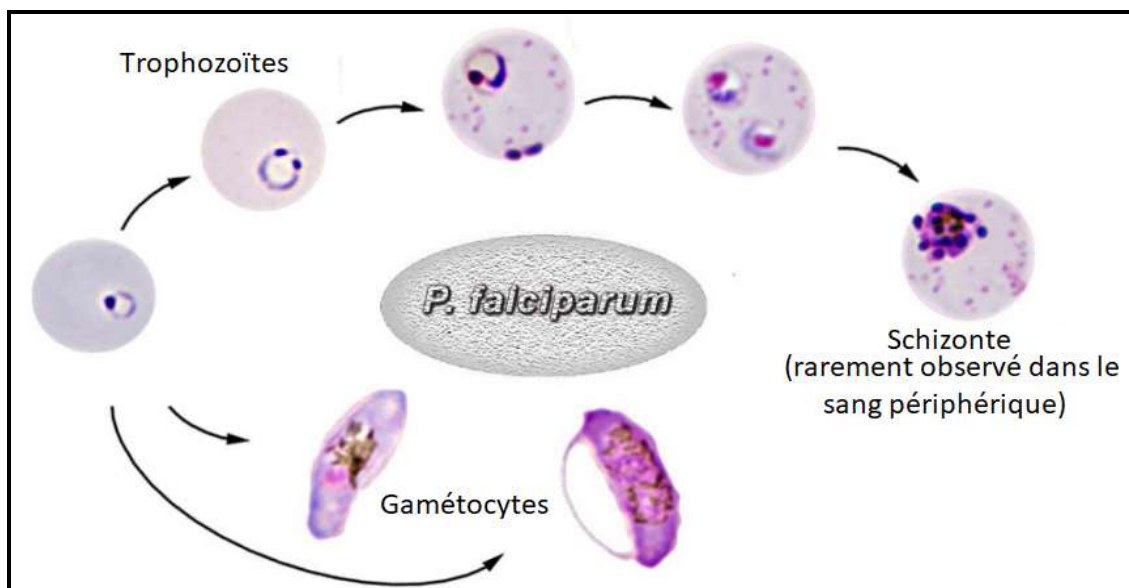


Figure 1: Morphologie des différents stades d'évolution de *P. falciparum*. [10]

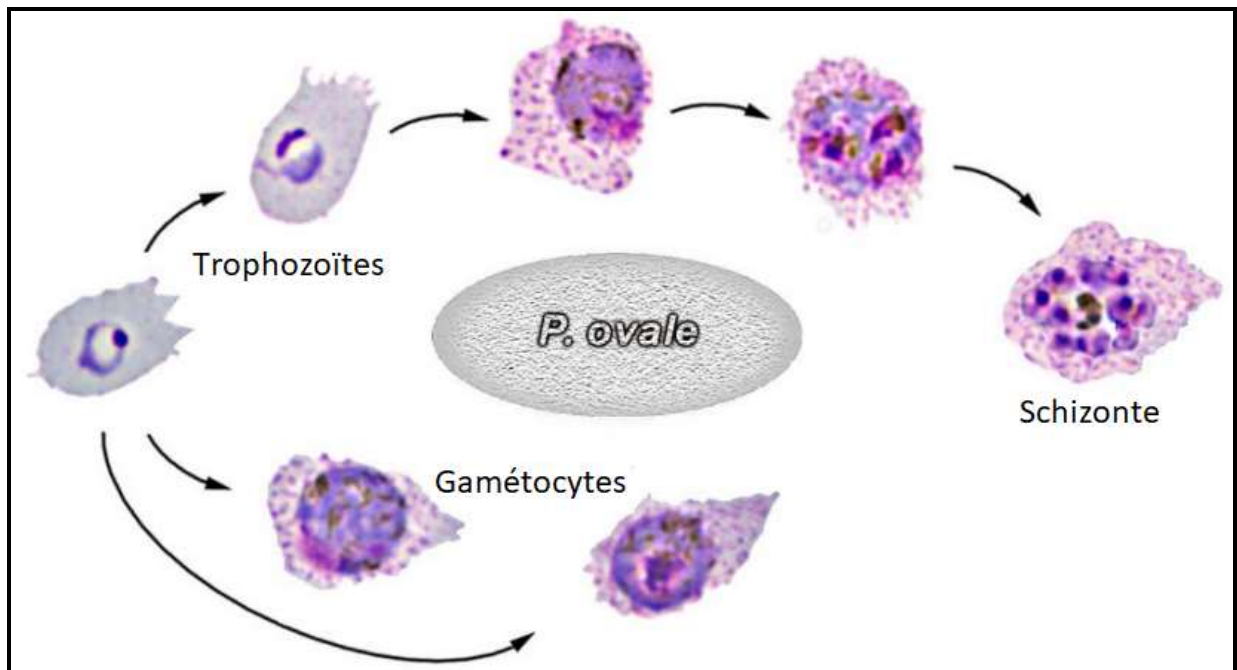


Figure 2: Morphologie des différents stades d'évolution de *P. ovale*. [10]

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. knowlesi</i>
Répartition géographique	Afrique, Asie du Sud-Est, Amérique du Sud, Océanie Toute l'année en régions équatoriales, en période chaude et humide en régions subtropicales	Amérique du Sud, Asie, Océan Indien (Comores, Madagascar)	Afrique intertropicale du centre et de l'ouest	Afrique, Asie du Sud-Est, Amérique du Sud, Océanie	Asie du Sud-Est
Clinique	Fièvre tierce maligne	Fièvre tierce bénigne	Fièvre tierce bénigne	Fièvre quarte	Fièvre quotidienne
Forme grave	Neuropaludisme	Quelques cas graves rapportés en Inde et en Amazonie			10% de forme grave
Période d'incubation	7 à 12 jours	11 à 15 jours	15 jours voir plus	15 à 21 jours	

Tableau I: Caractéristiques des différentes formes pathogènes de Plasmodium. [9]

II-3- VECTEUR :

Le vecteur est un moustique du genre Anophèle. Environ 500 espèces ont été identifiées, mais seulement 60 d'entre elles sont des vecteurs du paludisme humain. Il s'agit plus spécifiquement d'un diptère dont le développement nécessite deux cycles : Un cycle aquatique qui comprend 3 stades le stade zytotique, larvaire, pupaire et un cycle aérien qui représente le stade imagal (adulte).

Le vecteur adulte est particulier en termes de comportement puisqu'il se caractérise par un vol silencieux de préférence aux heures nocturnes et humides pour éviter la déshydratation, une piqûre indolore majoritairement en seconde partie de la nuit. [10]



Figure 3 : Anophèle femelle. [11]

II-4- TRANSMISSION :

La transmission vectorielle par piqûre d'anophèle femelle est la voie principale de transmission du Plasmodium. D'autres voies sont possibles mais exceptionnelles notamment par voie sanguine par transfusion de sang contenant des hématozoaires de Plasmodium ou suite à un accident d'exposition au sang (AES). La transmission materno-fœtale dite verticale est possible. [12]

II-5- CYCLE PARASITAIRE DU PLASMODIUM : [13]

Le Plasmodium possède un cycle parasitaire hétéroxène faisant intervenir deux hôtes (figure 5) :

- l'hôte définitif, où s'effectue la reproduction sexuée, est un moustique femelle hématophage du genre Anophèles.
- l'hôte intermédiaire, où s'effectue la reproduction asexuée, est représenté par l'homme.

Ce cycle asexué **chez l'homme** comporte une étape hépatique ou **la schizogonie exo-érythrocytaire** et une étape sanguine ou **schizogonie érythrocytaire** :

✓ L'homme est contaminé lors du repas sanguin d'un anophèle femelle par des sporozoïtes mobiles et infectants qui vont gagner la circulation lymphatico-sanguine pour rejoindre les hépatocytes de l'hôte et s'y multiplier. Après maturation et formation de schizontes intra-hépatiques, l'hépatocyte se rompt et libère de nouvelles formes mérozoïtes qui gagnent la circulation sanguine. Cette phase est cliniquement silencieuse et de durée variable. Au cours de cette phase, certaines formes parasites ne vont pas se multiplier et vont rester à un état quiescent au niveau de l'hépatocyte, ce sont les hypnozoïtes qui vont reprendre

leur cycle après un certain temps et vont être à l'origine d'accès de reviviscence, ce phénomène se voit avec le *P. vivax* et le *P. ovale*.

✓ La phase sanguine dite “intra-érythrocytaire” correspond à la phase clinique de l'infection. Elle débute lors de la libération des mérozoïtes intra-hépatiques dans la circulation sanguine. Ces formes parasitaires, après avoir pénétré dans le globule rouge, se différencient en trophozoïtes et se multiplient par reproduction asexuée (schizogonie) pour se transformer en schizonte multi nucléé. À maturité, la membrane du globule rouge parasité par un schizonte mûr se rompt et des mérozoïtes filles sont libérés, qui parasiteront de nouveaux globules rouges, perpétuant ainsi le cycle intra-érythrocytaire. Ce cycle asexué est de 48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, 72 heures pour *P. malariae* et 24 heures pour *P. knowlesi*. Une partie des formes trophozoïtes asexuées peut se différencier en gamétocytes mâle ou femelle.

Chez le vecteur : Après le repas sanguin, seuls les gamétocytes continuent le cycle parasite, ils se différencient en gamètes mâles et femelles dans la cavité abdominale du moustique où il y aura fécondation, puis naissance d'un ookinète. Cet oeuf libre et mobile quittera la lumière du tube digestif du moustique pour se fixer sur la paroi externe de l'estomac et se transformer en oocyste dans lequel une centaine de sporozoïtes seront produits. Ceux-ci migreront à maturation jusqu'aux glandes salivaires de l'anophèle pour être libérés lors d'un prochain repas sanguin.

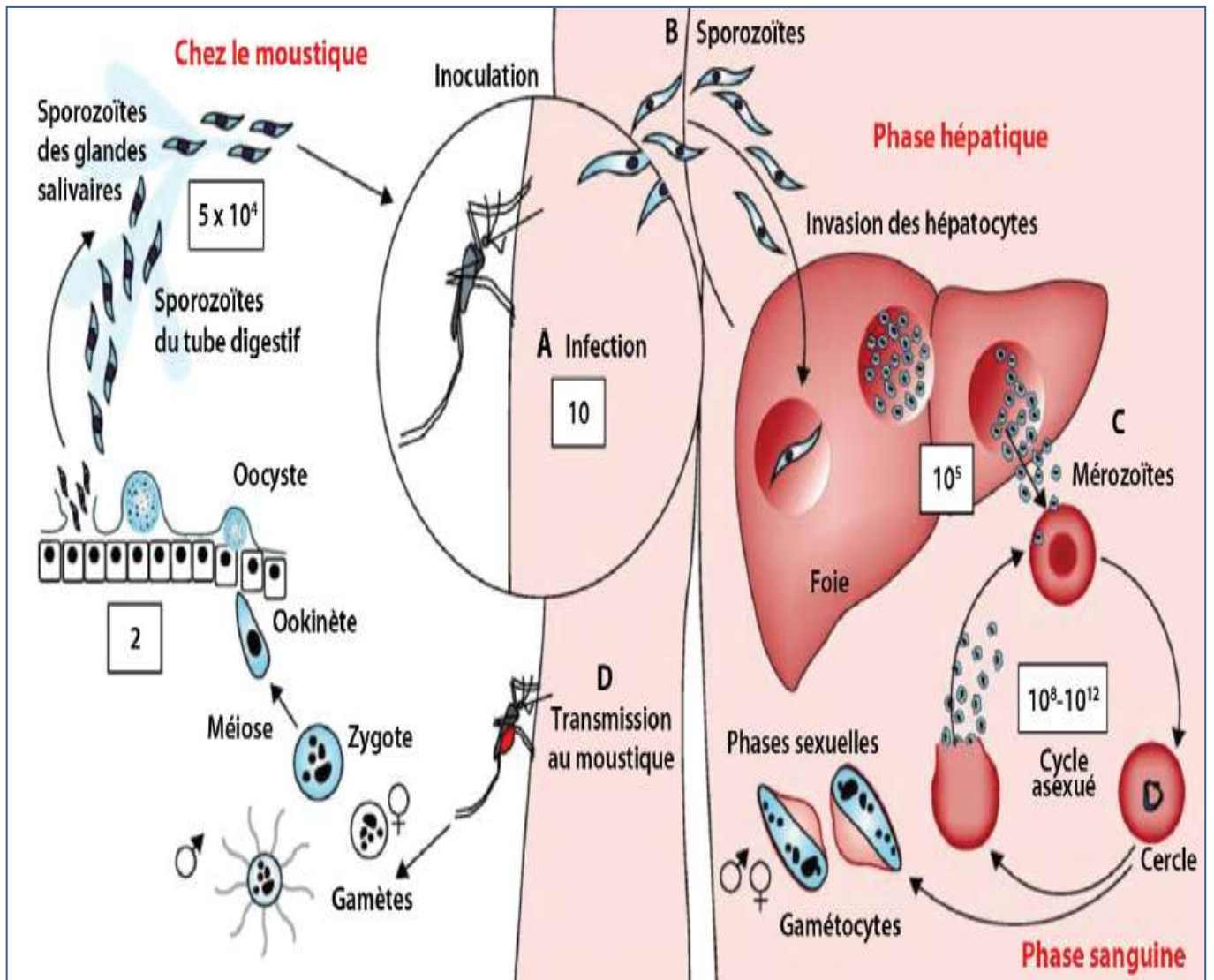


Figure 4 : Cycle parasitaire de *Plasmodium falciparum*. [14]

III. -CLINIQUE :

Les manifestations cliniques du paludisme sont diverses et elles sont exclusivement liées à la phase érythrocytaire. Leur gravité varie en fonction de l'espèce plasmodiale, de la parasitémie et de la réceptivité génétique et immunitaire de son hôte.

III-1- LA PHASE D'INCUBATION :

La phase d'incubation est asymptomatique. Elle correspond au délai entre la piqûre infectante et les premiers symptômes. Ceux-ci apparaissent au début de la phase de lyse érythrocytaire qui peut survenir dans un intervalle allant de 7 jours à plusieurs mois.[15]

III-2- L'ACCES PALUSTRE SIMPLE :

L'accès palustre non grave est caractérisé par une symptomatologie peu spécifique.

D'abord, l'accès de **primo-invasion** :

Initialement, le sujet infecté présente une asthénie et une fièvre. Le tableau clinique peut-être trompeur, d'où l'intérêt de suspecter le paludisme devant toute fièvre ou une autre symptomatologie dans un contexte de séjour en zone d'endémie palustre jusqu'à preuve du contraire.[15]

Après quelques jours d'évolution, la fièvre devient intermittente. Une succession de frissons/ fièvre/sueurs se met en place sur une dizaine d'heures. Elle se répète tous les jours pour *P. knowlesi*, tous les deux jours pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, et tous les trois jours pour *P. malariae* : c'est **la fièvre périodique** ; Cependant, cette périodicité n'est pas toujours aussi régulière. Il s'y associe de manière variable des céphalées, des courbatures et une symptomatologie digestive (douleurs, nausées, vomissements, diarrhées). [16]

Les **accès de reviviscences** peuvent se voir également en cas de *P. vivax* et *P. ovale*.

Au début de l'accès palustre, l'examen physique est pauvre. Une splénomégalie apparaît secondairement. Un ictère cutané-conjonctival peut découler de l'hémolyse. Chez l'enfant, l'hépatomégalie est classique. Ce tableau clinique est non spécifique.

Le diagnostic est en premier lieu évoqué dans un contexte épidémiologique ; en zone d'endémie, l'accès palustre est la première cause de fièvre. En revanche, dans les pays hors zone d'endémie, la non spécificité du tableau clinique peut conduire à un retard de diagnostic.

L'évolution peut se faire vers l'accès palustre grave (principalement dans l'infection à *P. falciparum*), vers la guérison (prise en charge rapide et adéquate), vers les accès de reviviscence (*P. vivax* ou *P. ovale*) ou vers les accès tardifs (*P. malariae*)

D'autres formes cliniques sont possibles au cours du paludisme :

Le paludisme viscéral évolutif (PVE) : infections palustres répétées chez des enfants non encore prémunis, il se caractérise par une anémie, une splénomégalie et une fièvre modérée avec faible parasitémie ; l'espèce souvent incriminée est le *Plasmodium falciparum*.

La splénomégalie palustre hyper immune : Splénomégalie non fébrile chez des adultes vivant en zone d'endémie avec recherche de Plasmodium négative

La néphropathie quartane : due à *P. malariae*, liée à une glomérulopathie par dépôt de complexes immuns

La Fièvre bilieuse hémoglobinurique (FBH) : En rapport avec les prises de quinine dans une zone d'endémie à *P. falciparum* et aussi avec des molécules de

structure chimique apparentée (halofantrine). Elle se manifeste par une fièvre élevée, une hémoglobinurie macroscopique due à une hémolyse intra-vasculaire, anémie aigue et insuffisance rénale aigüe.

III-3- L'ACCES PALUSTRE GRAVE

La définition stricto sensu repose sur des critères clinico-biologiques réactualisés régulièrement. La dernière recommandation de la Société de pathologie infectieuse

La gravité du paludisme est intimement liée à l'hypoxie cellulaire des organes vitaux ayant une micro vascularisation terminale et, en premier lieu, du cerveau et du rein.

Le neuropaludisme fait suite à un accès non grave. C'est ce qui explique toute l'urgence diagnostique et thérapeutique de cette maladie qui provoque un coma calme plus ou moins vigile et des épisodes de convulsion, mais aucun syndrome méningé dans la plupart des cas. L'évolution peut rapidement être fatale en l'absence d'une prise en charge adaptée. Chez les survivants adultes, il n'y a généralement pas de séquelles. En revanche, 15 % des enfants soignés présentent des troubles cognitifs et de l'apprentissage, des paralysies séquellaires ou une cécité corticale [14].

L'atteinte rénale résulte principalement d'une nécrose tubulaire hypoxémique. L'insuffisance rénale aigüe est généralement asymptomatique. [14]

En plus du tableau neurologique et l'atteinte rénale, d'autres signes de gravités peuvent se voir notamment, l'anémie sévère, l'acidose et hypoglycémie, un syndrome de détresse respiratoire aigüe et un ictère cutané-conjonctival.

Critères cliniques de gravité	Pronostic
Défaillance neurologique obnubilation, confusion, somnolence, prostration ou coma avec un score de glasgow<11	+++
Défaillance respiratoire : VM avec Pao ₂ /fiO ₂ <300mmHg, PaO ₂ <60mmHg et/ou SpO ₂ <90% en air ambiant, ou images radiologiques interstitielles ou alvéolaires (œdème pulmonaire)	+++
Défaillance cardio-circulatoire : PA <80mmHg, signes périphériques d'insuffisance circulatoire	+++
Convulsions répétées : >2/24h	++
Hémorragie clinique	++
Ictère clinique ou bilirubine totale >50pmol/l (>30mg/l)	+
Hémoglobinurie macroscopique	+
Critères biologiques de gravité	Pronostic
Anémie profonde : Hb <7g/dl, Ht<20%,	+
Hypoglycémie <2.2mmol/l (ou < 0.49/l)	+
Acidose : Bicarbonates <15mmol/l ou pH<7,35	+++
Hyperlactatémie	+++
Insuffisance rénale : créatininémie > 26Sumoll (>30 mg/l) ou urée >17mmol/l (> 1g/l) et diurèse <400ml/24h malgré réhydratation	+++
Parasitémie > 4%	+++

Tableau II: critères cliniques et biologiques du paludisme. [17]

IV. SIGNES BIOLOGIQUES NON SPECIFIQUES :

Au cours des accès palustres, un certain nombre de perturbations biologiques peuvent être prises en compte, principalement : la thrombopénie, l'anémie, la lymphopénie, l'hypocholestérolémie majeure avec hypoHDLémie, et l'élévation de la CRP et de la LDH

La thrombopénie est une anomalie fréquente et précoce au cours du paludisme, indépendamment de l'espèce plasmodiale en cause et du tableau clinique. Elle est d'intensité variable, mais parfois sévère (moins de 50 000/mm³). C'est un très bon signe d'orientation mais sa valeur pronostique est encore controversée.

L'anémie, dont les mécanismes physiopathologiques sont multiples, est un bon signe d'orientation mais elle peut manquer, surtout au début d'un accès de primo-invasion. Elle est plus souvent présente chez un sujet présentant des accès de reviviscence ou une rechute.

Parmi les leucocytes, les lymphocytes sont les plus touchés par ces modifications hématologiques au cours des accès palustres. Les mécanismes physiopathologiques responsables de la lymphopénie sont complexes

Les modifications du bilan lipidique touchent surtout la fraction HDLc, cette hypoHDLémie peut être expliquée par une inhibition de la lécithine-cholestérol acyl transférase et de la lipoprotéine lipase qui participent à l'élaboration de l'HDLc, par le parasite ou ses produits. [18]

La protéine C réactive, un marqueur d'inflammation le plus utilisé en clinique, a été significativement élevé dans plusieurs séries des cas de paludisme, Elle est largement utilisée dans la surveillance de l'évolution de l'accès palustre et de l'efficacité thérapeutique, en raison de sa cinétique parallèle à l'évolution clinique avec un possible décalage de 24H par rapport à la fièvre. [18]

L'augmentation observée de la LDH lors de l'infection palustre pourrait s'expliquer par la combinaison de deux processus physiopathologiques : Les lésions hépatocellulaires aiguës consécutives à la schizogonie hépatique, et l'hémolyse intravasculaire massive des GR parasités à l'issue des schizogonies érythrocytaires.

Quoique non spécifique, la perturbation regroupée de ces paramètres, associée à des données cliniques avec notion de séjour en zone d'endémie, augmente la probabilité diagnostique en faveur du paludisme

V. TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

V-1- TRAITEMENT[17]

V-1-1- prise en charge d'accès palustre simple

a. Accès palustre non compliqué à *P. Falciparum*

Chez l'adulte, une combinaison thérapeutique à base d'un dérivé de l'artémisinine (ACT) « l'artéméther- luméfantrine » est indiquée en première intention en l'absence d'antécédents cardiaques.

En deuxième intention, l'atovaquone –proguanil, peut être préconisé.

La quinine en troisième intention ou quand la voie parentérale est souhaitée. Chez la femme enceinte, l'atovaquone-proguanil est utilisable lors du premier trimestre. A partir du deuxième trimestre, l'artéméther-luméfantrine (déconseillée au premier trimestre de la grossesse) doit être privilégiée. La quinine est préconisée en deuxième intention tout au long de la grossesse.

Chez l'enfant, les dérivés de l'artémisinine sont indiqués en première intention en l'absence d'antécédents cardiaques. La méfloquine et l'atovaquone-proguanil sont des médicaments de deuxième intention. La quinine orale est devenue un médicament de troisième intention.

b. Accès palustre non compliqué à *P. non falciparum*

La prise en charge d'accès non compliqué à *P. non falciparum* se base principalement sur la chloroquine. A noter que les seules chimiorésistances connues à la chloroquine concernent le *P. vivax* en Asie du Sud-Est essentiellement. Dans ce cas, l'ACT sera préféré.

Une autre molécule « la primaquine », active sur les formes hépatocytaires en hypnozoïtes, doit être prescrite également dès le premier accès pour prévenir les accès de reviviscence à *P. vivax* ou *P. ovale*, après avoir éliminé un déficit en G6PD chez le patient. Or, elle est contre indiquée en cas de grossesse ou d'allaitement. [19] [20]

V-1-2- Prise en charge d'un accès palustre grave

Les modalités de cette prise en charge reposent sur les principes suivants :

- L'hospitalisation en urgence dans une unité de soins intensifs ou de réanimation ;
- La mise en route immédiate d'un traitement antipaludique à base d'artésunate par voie IV, qui présente comme avantage sa rapidité d'action (supérieure à celle de la quinine) et sa capacité à diminuer le phénomène de « cytoadhérence ». Après au minimum 48 heures de traitement IV, un relais per os par un traitement complet de première intention du paludisme simple est possible dès que l'état du malade le permet. En cas de contre-indication ou d'indisponibilité de l'artésunate, la quinine IV peut être administrée ;
- La prise en charge symptomatique des défaillances d'organes.

Chez l'enfant et la femme enceinte, les principes de prise en charge sont les mêmes, en tenant compte d'un risque plus élevé d'hypoglycémie. A noter que les doses de charge chez l'enfant sont contre-indiquées. [19] [20]

V-2- PROPHYLAXIE ET PREVENTION

Aucun moyen préventif n'assure à lui seul une protection totale. Pour être efficace, il convient donc d'insister sur la nécessité de l'observance simultanée d'une protection contre les piqûres de moustiques associés à la Chimio prophylaxie médicamenteuse

V-2-1- Prévention individuelle

a. Lutte contre les piqûres de moustiques

Trois outils ont fait la preuve de leur efficacité à partir du coucher du soleil :

- Les moustiquaires imprégnées d'insecticide (pyréthrine de synthèse) ;
- Le port de vêtements longs couvrants les parties découvertes, si possible imprégnés d'insecticide ;
- L'application d'un répulsif sur les zones cutanées découvertes. Mais il faut faire attention au choix des produits chez l'enfant et la femme enceinte. [20] [19]

D'autres mesures complémentaires peuvent être également utilisées, notamment la ventilation, la climatisation et les insecticides diffusibles d'intérieur ^[34].

b. Chimio prophylaxie médicamenteuse

Les recommandations de chimio prophylaxie prennent essentiellement en compte le risque d'infection par *P. falciparum*, et elles s'adressent essentiellement aux voyageurs. Elle doit donc être envisagée de manière systématique pour tout sujet se rendant en zone impaludée.

Il n'existe pas de schéma prophylactique idéal. Le choix de la chimio prophylaxie doit être discuté et adapté à chaque voyageur. Il dépend de la zone visitée, du

sujet concerné, de la saison, de l'altitude, de la durée et des conditions de séjour, du type d'activité et du budget du voyageur. Les indications de la chimioprophylaxie doivent également reposer sur la balance bénéfico-risque : dans les situations de faible risque palustre, la balance n'est pas en faveur d'une prescription.

Parmi les cinq antipaludiques disponibles, trois dominent les indications (atovaquone-proguanil, doxycycline et méfloquine) en raison de leur efficacité élevée et comparable. Le choix entre eux dépend en pratique essentiellement des possibilités financières des voyageurs et des contraintes de prise.

En pratique, ces recommandations sont susceptibles d'évoluer avec le temps. La référence à des documents actualisés comme le Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire permet de suivre ces évolutions.

V-2-2- Prévention Collective

La prévention collective du paludisme est difficile et jusqu'à présent, les programmes d'éradication du paludisme à l'échelle mondiale avaient échoué. Elle repose actuellement sur plusieurs axes :

- Une prévention de la transmission par l'utilisation généralisée de moustiquaires imprégnées d'insecticide dans toute la population, et par la pulvérisation intra domiciliaire d'insecticide ;
- Une prise en charge rapide et adaptée des accès palustres ;
- Le développement de nouvelles molécules et surtout des combinaisons thérapeutiques contenant un dérivé de l'artémisinine ;
- La poursuite de la lutte anti vectorielle par le contrôle des gîtes à moustiques ;
- La recherche d'un vaccin d'efficacité satisfaisante.



*Méthodes de diagnostic
du paludisme*



Le diagnostic du paludisme tient une place essentielle dans la prise en charge initiale de cette maladie, Le diagnostic de certitude est basé sur la recherche des parasites dans le sang. Afin de garantir la meilleure évolution clinique possible par le choix d'une action thérapeutique en aval qui soit la plus adaptée, le biologiste médical et les techniciens de laboratoire doivent donc être capables de confirmer ou d'infirmier, de façon certaine et rapide, l'hypothèse diagnostique.

Les outils de biologie médicale habituellement utilisés pour le diagnostic de certitude de paludisme sont soit directs, c'est-à-dire basés sur la mise en évidence directe du parasite au sein des hématies, soit indirects, par détection d'antigènes de Plasmodium circulant dans le sang, voire d'anticorps anti-Plasmodium dans de rares cas très particuliers. En plus de repérer les formes parasitaires, les approches directes permettent l'identification de l'espèce ou des espèces plasmodiales impliquées, de leurs stades, ainsi qu'une appréciation de la charge parasitaire sanguine

I. -METHODES DE DIAGNOSTIC CLASSIQUES

I-1 TECHNIQUES MICROSCOPIQUES CONVENTIONNELLES :

Depuis la découverte des Plasmodium par Laveran en 1880, le diagnostic biologique de paludisme repose sur l'examen microscopique des frottis minces et des gouttes épaisses.

Idéalement, la goutte épaisse devrait être utilisée pour la détection des parasites, alors que le frottis sanguin mince est plus approprié pour identifier le Plasmodium, et les deux techniques peuvent être utilisés pour quantifier la parasitémie. [21]

Les recommandations de la conférence de consensus de 2007, demandent d'associer frottis mince et goutte épaisse.

Ce sont des méthodes faciles et peu coûteuses, qui ne nécessitent aucun appareillage particulier, une lame et lamelle et un microscope optique sont suffisants.[22]

A- Prélèvements :

Pour l'examen direct, le plus simple est de recueillir, sur une lame porte-objet de microscope, une ou deux gouttes de sang capillaire par piqûre au bout du doigt (face latérale de l'annulaire), au lobe de l'oreille ou au talon (chez l'enfant) et de confectionner immédiatement les étalements. Cette méthode est très utilisée en zones d'endémie et elle permet de pallier au retard d'acheminement du prélèvement au laboratoire, or elle ne sert que pour le FSM et la GE, et elle ne permet pas le recours à d'autres étalements en cas de problème technique (échec de coloration par exemple). Pour cela un prélèvement sanguin obtenu par ponction veineuse sur anticoagulant (EDTA : éthylène diamine tétra-acétique) est le plus pratiqué et il doit être acheminé en urgence au laboratoire pour que les formes parasitaires ne soient pas altérées.

B- La Goutte Épaisse :

Considérée comme la technique de référence dans le diagnostic du Paludisme par l’OMS, cette méthode, très ancienne, est une micro-concentration qui permet de révéler la présence de parasites du genre Plasmodium par coloration de leur noyau et de leur cytoplasme après deshémostatisation de la préparation et lyse des hématies.

Cette technique a longtemps souffert d’une lenteur de réalisation qui ne lui conférait alors qu’un rôle de confirmation à distance du frottis sanguin mince, ainsi que d’une difficulté de lecture qui ne la réservait qu’aux laboratoires les plus experts. Le développement d’alternatives rapides et plus aisées à interpréter l’a définitivement fait entrer en première ligne du diagnostic d’urgence du paludisme, d’autant plus qu’elle présente une bien meilleure sensibilité que le frottis, permettant en effet l’analyse d’un volume sanguin supérieur [23], le seuil de détection a ainsi été estimée à 1 à 10 parasites / μ l de sang, ce qui permet, en cas de négativité et sous réserve qu’elle ait été lue en entier, d’éliminer l’hypothèse diagnostique de paludisme avec une très grande valeur prédictive négative. [24]

C’est une excellente technique mais de réalisation un peu délicate et qui nécessite une bonne expérience pour la lecture. Cependant, le diagnostic d’espèce n’est pas toujours possible. [16]

B-1- La Goutte épaisse classique :

La technique consiste à :

- Faire un étalement épais de l’échantillon sanguin au centre de la lame sous forme d’un cercle en faisant 3 à 6 mouvements circulaires de

l'intérieur vers l'extérieur en sens unique, ces mouvements sont plus prolongés en cas de sang capillaire pour défibriner le prélèvement. [37]

- Laisser sécher sur la paillasse en position horizontale, à température ambiante, à l'abri des mouches, des insectes et de la poussière (exemple : avec le couvercle d'une boîte de Pétri). [25]
- Hémolyse de l'échantillon via différents types d'agents comme la saponine ou l'eau distillé et enfin coloration de la préparation comme le frottis sanguin mince [24]

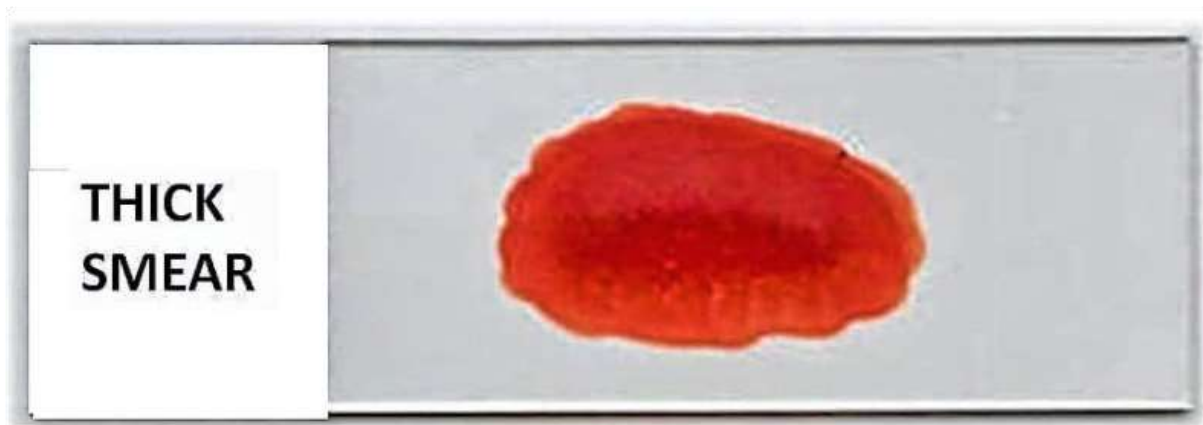


Figure 5: Goutte épaisse sur lame. [26]

B-2- La Goutte épaisse rapide :

La goutte épaisse rapide est le développement de la goutte épaisse classique. Les deux méthodes reposent sur le même principe mais avec quelques variantes telles que la calibration du dépôt de l'échantillon à 2 μ l de sang total prélevé sur anticoagulant, le séchage immédiat de la goutte à l'étuve à 37°C, la lyse globulaire avec une solution iso-osmotique hémolysante à base de saponine.

- Une goutte de 2µl de sang (5 à 20 µl dans la méthode classique) bien homogénéisé est déposée sur une lame puis immédiatement étalée par un coin d'une lame pour permettre d'obtenir une préparation homogène.
- La lame est séchée à l'étuve à 37° ou au sèche-cheveux pendant 2min.
- Dès que la goutte est sèche la lame est plongée dans le réactif de lyse (la solution hémolysante), après 2min il faut suivre attentivement la lyse, elle doit être complète (avec obtention d'une pellicule blanche sur lame) mais non excessive (altération des parasites et des GB).
- Dès que l'hémolyse est complète, la lame est rincée délicatement à l'eau du robinet et colorée ensuite.
- Séchage au ventilateur puis lecture au microscope à l'objectif 100 avec l'huile d'immersion. [27]

Les avantages de cette technique sont donc une réalisation rapide, (environ 10 minutes hors lecture), un rendu de résultat rapide (médiane à 45 minutes) et une sensibilité équivalente à la technique non modifiée avec un seuil de détection à 4 parasites/µl.

Plusieurs études ont comparé la goutte épaisse classique à la goutte épaisse rapide. Cette comparaison est basée généralement sur les éléments suivants : le volume de sang utilisé pour chaque méthode, le temps de séchage, la coloration MGG et coloration RAL rapide, le temps de la lyse des érythrocytes, la qualité de l'hémolyse, la sensibilité et le temps total de la réalisation des deux techniques. [28]

Ces études empiriques ont trouvé que la goutte épaisse rapide présente plusieurs avantages.

*La calibration de volume de sang à 2 µl permet de rendre des résultats quantitatifs en parasite par µl pour les faibles parasitémies.

*Bien que le volume utilisé semble petit par rapport aux 5-20 µl recommandés par GEC, il est largement suffisant pour la pratique car le protocole de la GER consiste à examiner la totalité de la goutte de 2 µl alors qu'en examinant la GEC il est suffisant de vérifier 100-200 champs qui correspondent à un volume de 0,25-0,5 µl de sang seulement.

*L'utilisation d'un incubateur à 37°C permet également de réduire le temps de séchage 2-3 min. L'emploi de la solution hémolysante comme agent hémolysant, sert à réduire le temps d'hémolyse et d'éviter les artéfacts obtenus par la lyse avec de l'eau de robinet. [28]

*La coloration RAL rapide présente plus d'avantage que la coloration MGG notamment la réalisation facile et rapide (30 sec), un rendu de résultat rapide.

*En ce qui concerne la sensibilité, ces deux techniques ont la même sensibilité, mais le temps total pour la réalisation de la GER est plus rapide (jusqu'à 15 minutes) que la GEC (40-50 minutes). [28]

B-3 Lecture :

La lecture se fait comme le frottis sanguin mince par immersion dans l'huile au fort grossissement x1000, l'examen de 100 champs d'une goutte épaisse contenant 15-20 GB par champ permet de poser le diagnostic.

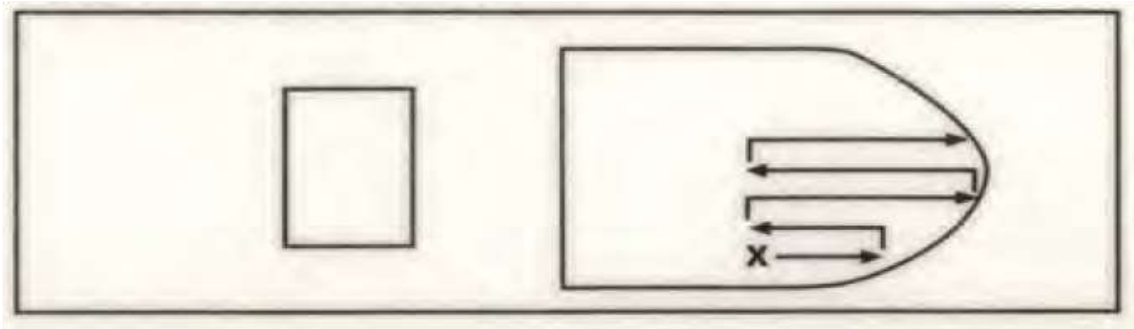


Figure6: parcours réalisé lors de l'examen microscopique d'une goutte épaisse ou d'un frottis sanguin.[29]

B-4 Avantages :

La goutte épaisse permet une concentration des parasites 20 fois plus qu'un frottis et permet de détecter des taux de faibles parasitémies environ une moyenne de 5 parasites/ μ l, soit une parasitémie de 0.0001% à 0.0002%.

Elle permet aussi un comptage relativement précis. Le résultat s'exprime soit en nombre de parasites pour 200 globules blancs (GB), soit en nombre de parasites pour 2 μ l de sang total (si < 1 , parasite / 200 GB).

B-5 Inconvénients :

Sa lecture par un biologiste qui n'en a pas l'habitude est délicate. En effet, du fait que la lyse par choc osmotique altère souvent les parasites qui sont ainsi difficiles à identifier par un œil peu exercé. Cela nécessite une solide expérience et une longue pratique. Par ailleurs, contrairement au frottis sanguin mince, l'intégrité des cellules sanguines n'est plus préservée, ce qui peut compliquer la lecture de la lame par un opérateur non averti. Les éléments parasitaires restent repérables grâce à leur noyau qui apparaît bien coloré sur un fond violet pâle, et entouré d'un anneau cytoplasmique bleu-gris plus ou moins épais en fonction de l'espèce plasmodiale.



Figure 7: Étapes de réalisation de la goutte épaisse rapide. [Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, HMIMV, Rabat]

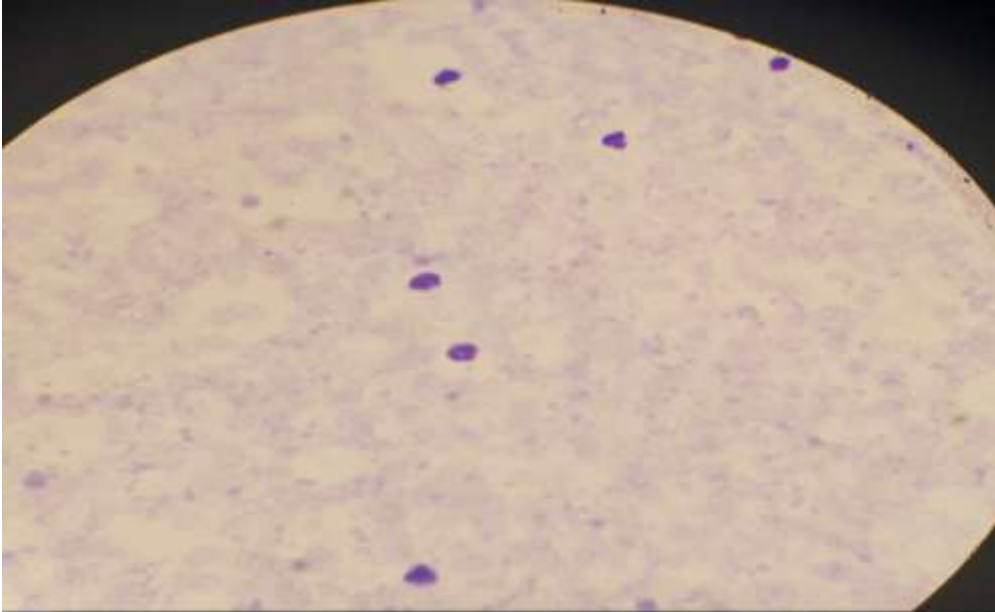


Figure 8: Goutte épaisse négative. [Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, HMIMV, Rabat]

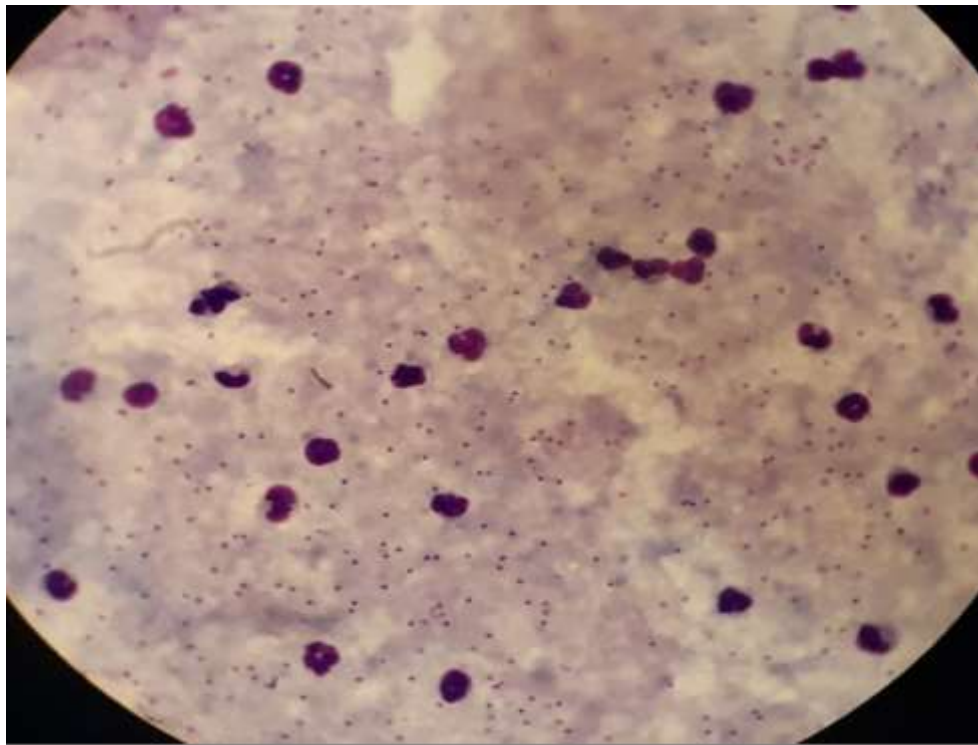


Figure 9: Goutte épaisse positive ; Aspect de ciel étoilé avec de nombreux trophozoïtes. [Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, HMIMV, Rabat]

C- Le Frottis Sanguin Mince :

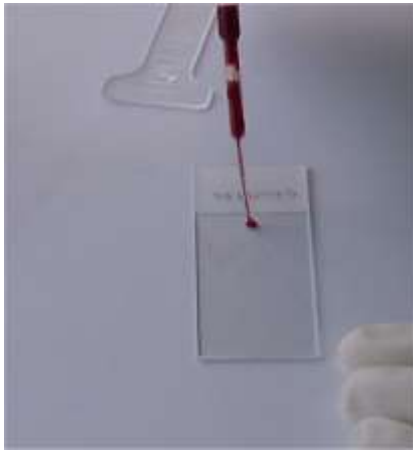
Il s'agit de la seule technique qui permet à la fois de détecter la présence du parasite, de calculer la charge parasitaire et de déterminer de façon aisée l'espèce le plasmodium en cause.

Le frottis sanguin est un étalement d'une goutte de sang sur une lame de verre dans le but d'observer les cellules qui y sont présentes et de les dénombrer. Il permet également de repérer d'éventuels parasites dans le sang comme l'agent du paludisme. Pour atteindre ce but, le frottis doit être coloré par une coloration de May Grunwald- Giemsa, Giemsa simple ou par le kit RAL pour pouvoir identifier les cellules et les parasites.

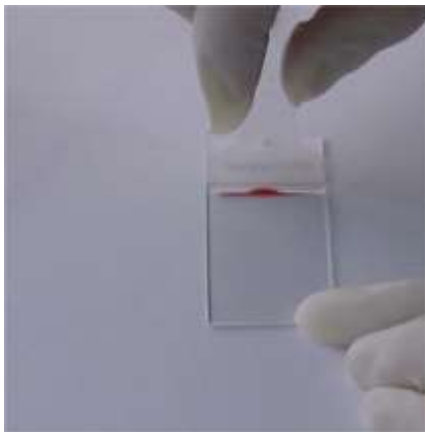
C-1 Préparation :

Le prélèvement peut être comme pour la goutte épaisse, un sang capillaire ou souvent un sang veineux sur anticoagulant(EDTA).

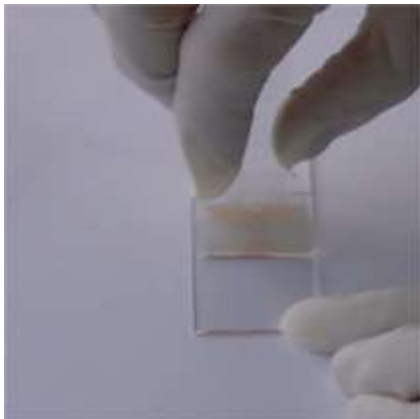
La technique consiste à étaler une goutte de sang sur une lame de verre standard en un frottis mince effectué de manière à ne comporter qu'une monocouche cellulaire. Le frottis sanguin mince, ainsi est constitué en forme de « langue de chat ».



a- Déposer une petite goutte à l'une des extrémités de la lame propre et parfaitement dégraissée.



b- Positionner l'étaleur de façon à prendre la totalité de la goutte en la laissant se répartir de façon homogène.



c- Appliquer un mouvement de translation horizontale en maintenant la spatule d'un angle de 45° environ sans appuyer tout au long de la lame et laisser sécher.

Figure 10 (a, b, c): Étapes d'élaboration d'un frottis sanguin. [30]

C-2 Coloration :

Ils existent plusieurs techniques de coloration des frottis sanguins, les plus utilisés sont la méthode de la coloration au Giemsa et la coloration de May-Grünwald-Giemsa ou MGG. Le May-Grünwald contient un colorant acide, l'éosine et un colorant basique, le bleu de méthylène. Alors que le Giemsa contient lui aussi de l'éosine, en plus d'un colorant basique, l'azur de méthylène.

a- Technique de Giemsa :

Elle consiste à :

- Fixer les lames dans du méthanol 100% pour 3 minutes et rincer à l'eau du robinet.
- Faire une solution fraîche de 10% de Giemsa dans de l'eau distillée.
- Colorer pendant 30min.
- Rincer la lame à l'eau du robinet et sécher soigneusement en utilisant du papier absorbant.

b- Technique de May-Grünwald-Giemsa: [31]

Elle consiste à

- Verser sur le frottis 10 à 15 gouttes de liquide de May-Grunwald de manière à le bien recouvrir. Laisser agir pendant 3 min. Il est essentiel que le liquide ne sèche pas.
- Ajouter autant de gouttes de tampon phosphate que l'on a mis précédemment. Mélanger en inclinant la lame. Laisser agir pendant 2 min.

- Rejeter le May Grünwald et sans laver, verser du Giemsa dilué dans la proportion de 3 gouttes pour 2cm au cube d'eau distillé. Laisser agir pendant 20 min environ.
- Laver rapidement sous le jet d'eau
- Faire sécher le frottis.

C-3 Lecture :

1-3-1 Méthode :

La lame est attentivement lue à l'aide d'un microscope optique, au fort grossissement x 1 000 sous immersion à l'huile. L'opérateur doit choisir des champs microscopiques où la répartition des hématies semble homogène, sans superposition.

Il est nécessaire de parcourir au moins 400 champs pour proclamer une lame négative, ce qui correspond à environ 20 minutes de lecture pour un lecteur expérimenté.

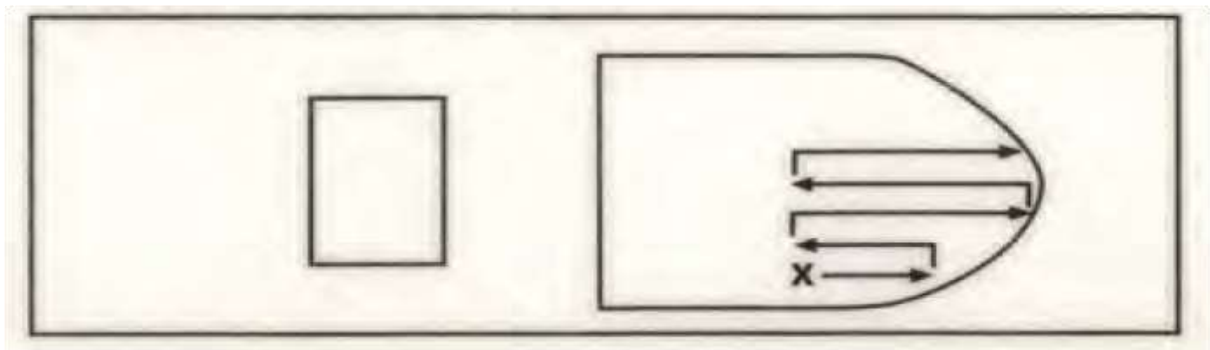


Figure 11: Parcours réalisé lors d'un examen microscopique du frottis mince. [29]

Autres méthodes de lecture :

Bien que la microscopie optique des frottis sanguins minces et des gouttes épaisses reste la référence pour la détection du Plasmodium, il existe une forte demande pour des techniques de microscopie plus sensibles et automatisées afin de déterminer correctement la parasitémie

L'auto analyseur de World Health Technology (WHT) est un système automatisé de balayage des lames et a été l'un des premiers appareils à avoir été testé et à avoir donné des résultats comparables à ceux de nombreux lecteurs de lames humains dans une étude réalisée en 2012. [32]

Un prototype de Global Good Fund a été testé en 2017 et a montré une limite de détection estimée à 100 parasites / μl pour *P. falciparum* en analysant 0,2 μl de sang. [33]

Une approche plus récente utilise un dispositif prototype de microscope numérique, l'Autoscope, qui utilise un algorithme de microscopie automatisé basé sur l'apprentissage par la machine pour simplifier la détection des espèces de Plasmodium ainsi que la détermination de la parasitémie. [34]

Cependant l'Autoscope et le personnel formé ont tous les deux manqué les mêmes lames à faible parasitémie qui ont été déterminées positives par réaction en chaîne par polymérase (PCR). [34]

C-4- Résultats :

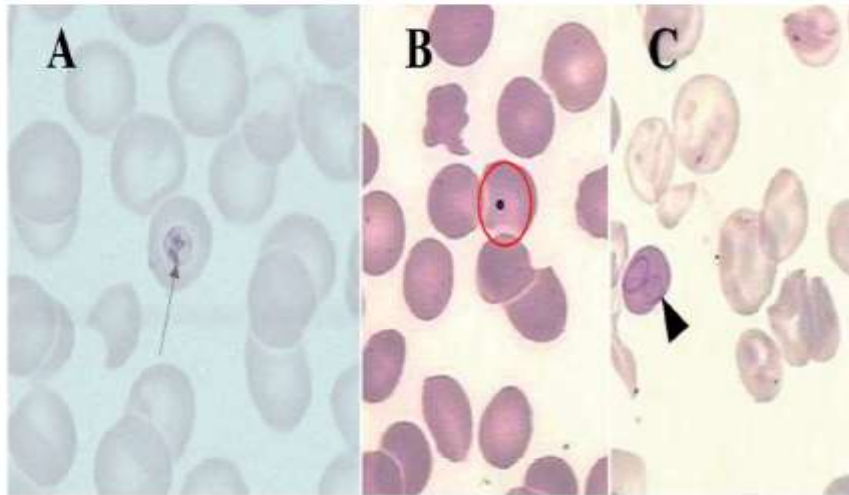
Un diagnostic positif est défini par la présence du parasite en intra érythrocytaire.

Les parasites du genre Plasmodium sont endo-érythrocytaires : ils sont repérables au sein de l'hématie par la couleur soutenue rose-orangée à violette de leur noyau et la teinte bleu nuage de leur cytoplasme (figure 8).

Le microscopiste doit être averti de la possibilité de confusion qui existe avec des plaquettes superposées aux globules rouges ou avec les corps de Howell-Jolly et anneaux de Cabot qui sont des reliquats de structures nucléaires érythrocytaires (figure 9).

Le seuil de détection est d'environ 100 parasites par microlitre et la lecture doit comprendre au minimum 200 champs microscopiques (objectif à immersion x 100) en raison de la fréquence de charges parasitaires faibles. Cependant, si la goutte épaisse n'est pas réalisable, le nombre de champs observés doit être porté à 800 pour arriver à une sensibilité similaire.

L'identification des espèces repose sur la taille des hématies parasitées et les stades parasitaires.



A – Une plaquette superposée au cytoplasme d'une hématie (fine flèche grise); B – Un corps de Howell-Jolly (cercle rouge), reliquat nucléaire érythrocytaire; C – Un anneau de Cabot (pointe noire), reste de fuseau mitotique érythrocytaire.

Figure 12: Exemples de différents éléments cellulaires observés sur frottis sanguin mince et pouvant induire la confusion lors du diagnostic parasitologique du Paludisme. [35]

C-5 Le diagnostic d'espèces plasmodiales dans le frottis sanguin mince :

Les principales caractéristiques morphologiques concourant au diagnostic d'espèce sont résumées dans le tableau III. Cependant, il faut savoir qu'il n'existe pas un seul et unique critère universel permettant de poser le diagnostic de telle ou telle espèce de façon certaine et définitive. Il faudrait rassembler un faisceau d'arguments au cours de l'observation de la lame pour garantir une identification correcte.

Pour toutes ces raisons, il apparaît déraisonnable de porter un diagnostic de paludisme et une identification d'espèce sur l'observation d'un seul élément parasitaire isolé. L'opérateur est appelé donc à procéder à la lecture d'un grand nombre de champs microscopiques. [31]

Le diagnostic d'espèce repose sur l'aspect global du frottis, la morphologie de l'hématie parasitée ainsi que la morphologie du parasite.

Le frottis sanguin a un aspect monotone ou monomorphe en cas de parasitisme par le *P.falciparum* alors pour les autres espèces, on peut voir les différents stades parasitaires (Trophozoïte, schizonte et gamétocyte) donc un aspect panaché du frottis.

Concernant l'hématie parasitée, la taille et la forme peut varier selon les espèces plasmodiales : Dans le cas d'une infection par *P. falciparum* par exemple, le parasite est retrouvé dans des hématies qui conservent une taille standard par rapport aux hématies saines environnantes. Avec cette espèce, plusieurs trophozoïtes peuvent par ailleurs être observés au sein d'une seule et unique hématie.

Pour *P. vivax* et *P. ovale*, l'hématie parasitée est plus jeune, donc plus grande, et peut s'allonger dans le sens du frottis et avoir un aspect ovalisé ou frangé pour le *P.ovale*. ; Les trophozoïtes de *P.malariae* parasitent plutôt des hématies âgées, dont la taille paraît diminuée par rapport aux hématies saines. Par ailleurs, au sein de ces hématies parasitées, on peut trouver selon les espèces, les granulations de Schüffner en cas de *P.vivax* et *P.ovale*, les taches de Maurer en cas de *P.falciparum* et les taches de Ziemann en cas de *P. malariae*

Concernant la morphologie du parasite, la taille, la finesse des trophozoïtes, leur aspect, leur disposition et leur nombre au sein de l'hématie parasitée permettent d'orienter l'identification de l'espèce plasmodiale. L'aspect de gamétocytes en faucille se voit en cas de *P.falciparum* et enfin le nombre de mérozoïtes des schizontes peut aider également au diagnostic de l'espèce plasmodiale.

Exceptionnellement diagnostiqué, *P. knowlesi* présente une morphologie microscopique très similaire à celle de *P. malariae*, et sa distinction nécessite obligatoirement le recours à des techniques diagnostiques additionnelles. [35]

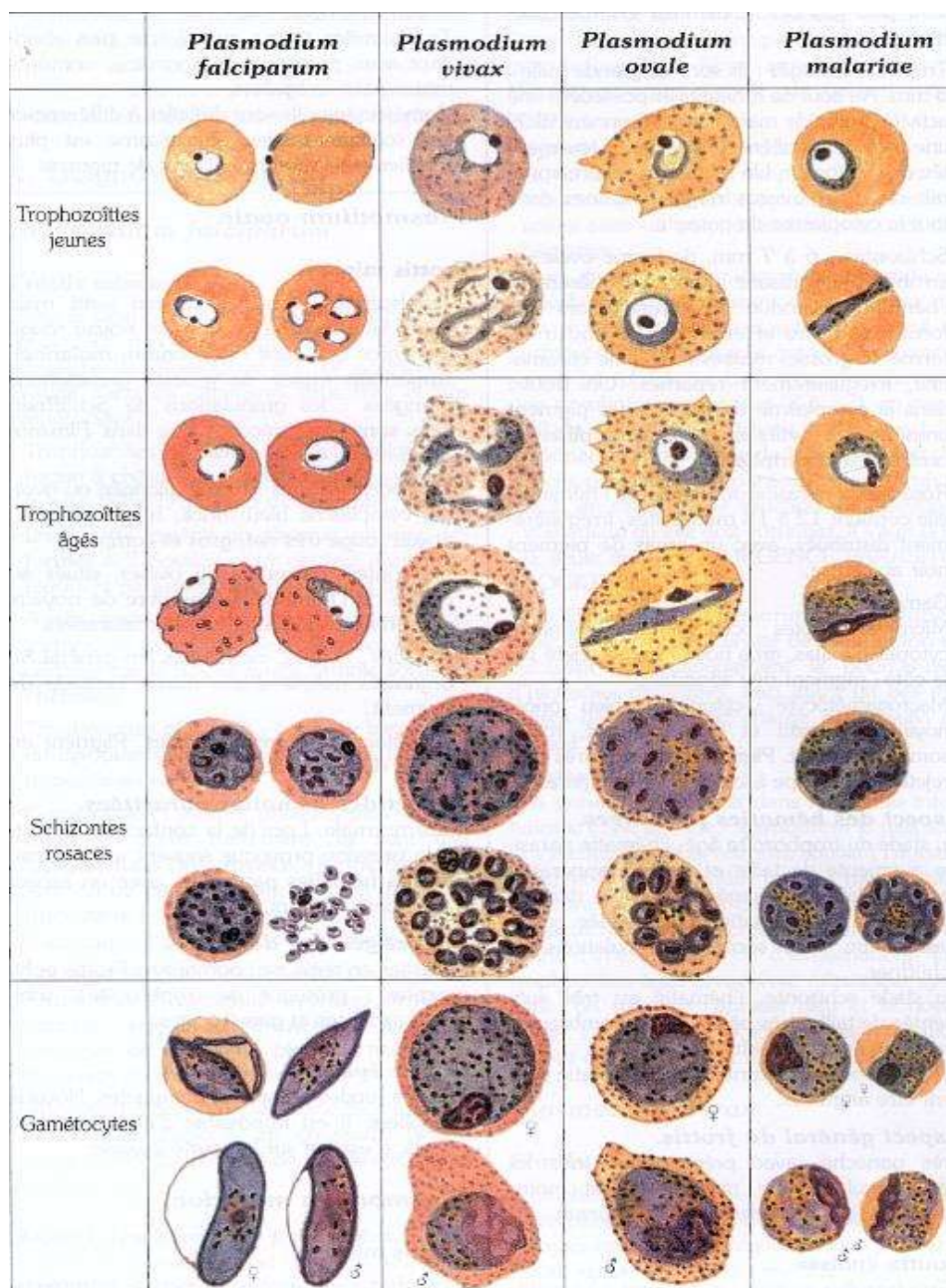


Figure 13: aspects morphologiques des différentes espèces. [37]

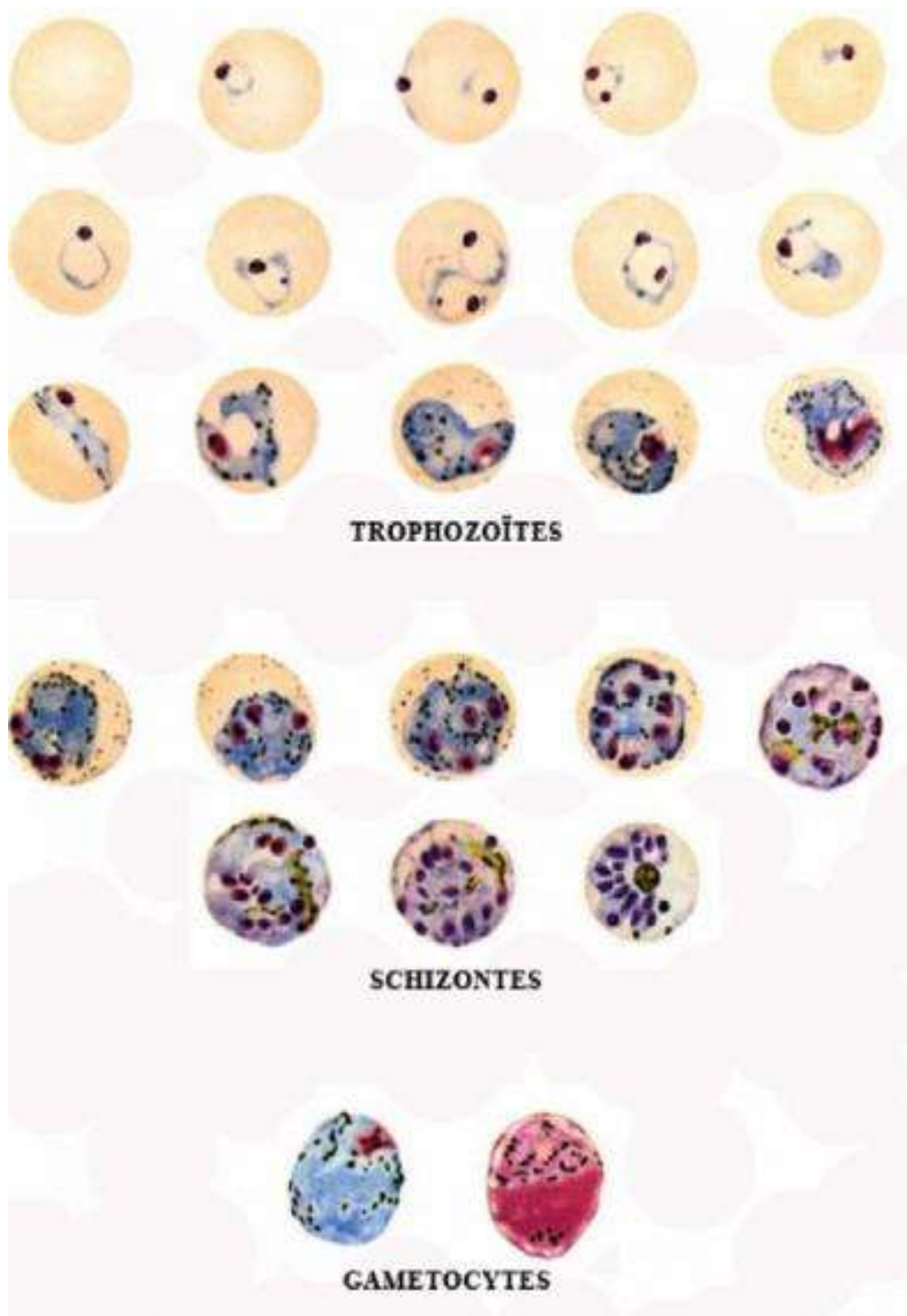


Figure 14: aspects morphologiques de *P. knowlesi*. [38]

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. knowlesi</i>
Frottis	-Monotone (un seul stade d'évolution) Exceptionnellement panaché (accès pernicieux).	-Panaché	-Panaché	-Panaché -Parfois d'aspect sale : Pigment malarique abondant	Panaché
Hématie parasitée	-Taille et forme normales. -Tâches de Maurer assez épaisses -Pluriparasitisme très fréquent (plusieurs trophozoïtes par GR). -Parasitémie élevée pouvant dépassée les 10%.	-Agrandie (atteinte élective des GR jeunes) -Polygonale ou parfois déformée. -Granulations de Schüffner fines et tardives. -Parasitémie dépasse rarement 2%.	-Parfois agrandie, (atteinte élective des GR jeunes). -Souvent ovalisée ou frangée. -Granulations de Schüffner grosses et précoces Pluriparasitisme Possible -Parasitémie dépasse rarement 2%.	-Taille normale, parfois réduite (atteinte élective des GR âgées). -Granulations de Ziemann peu nombreuses et peu colorables (difficiles à observer) -Parasitémie <2%.	-Taille et forme normales. -Parasitémie élevée.
Trophozoïte jeune	Petite taille avec un cytoplasme fin et un petit noyau. Aspect en « bague à chaton », en « bracelet arabe » quand le noyau est scindé en deux ou parfois marginé (accolé à la paroi de l'hématie),	- cytoplasme épais et un gros noyau,	- anneau large avec un gros noyau. -	-Petit anneau compact à cytoplasme épais et à gros noyau. -Pigment malarique précoce en traînées ou en gros amas.	Au stade jeune il ressemble au <i>P. falciparum</i> et au stade de trophozoïte âgé, il ressemble au <i>P. malariae</i>

Trophozoïte âgé	Forme élargie et plus ou moins déformée.	Forme irrégulière de grande taille, d'aspect amiboïde.	-Forme allongée ou ovoïde, rarement amiboïde.	- Très épais, ou en bande équatoriale (typique de l'espèce). -Gros amas ou traînées d'Hémozoïne.
Schizonte	Absent sur le frottis sanguin sauf en cas d'accès grave	16 à 24 mérozoïtes	10 à 16 mérozoïtes.	- 8 à 12 mérozoïtes disposés en périphérie (aspect en marguerite). -Hémozoïne épais en position centrale.
Gamétocyte	-Falciforme (d'où son nom) en « banane » ou en « saucisse ». -Granules d'Hémozoïne entourant le noyau (gamétocyte femelle) ou dispersés dans le cytoplasme (gamétocyte mâle).	-Arrondi, volumineux, occupant la totalité de l'hématie. -Cytoplasme parsemé de fin pigment noirâtre.	-Arrondi et pâle, N'occupant pas tout le volume de l'hématie agrandie. -Pigment noirâtre en forme de bâtonnets.	-Semblable à celui de <i>P. vivax</i> , mais plus petit. -Cytoplasme parsemé d'Hémozoïne.

Tableau III: Critères morphologiques microscopiques pour l'identification de l'espèce plasmodiale lors du diagnostic du paludisme. [35]



Figure 15: Trophozoïtes (cercle rouge) et gamétocytes (flèche rouge) de *P.falciparum* sur goutte épaisse au grossissement 1000. [Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, HMIMV, Rabat]

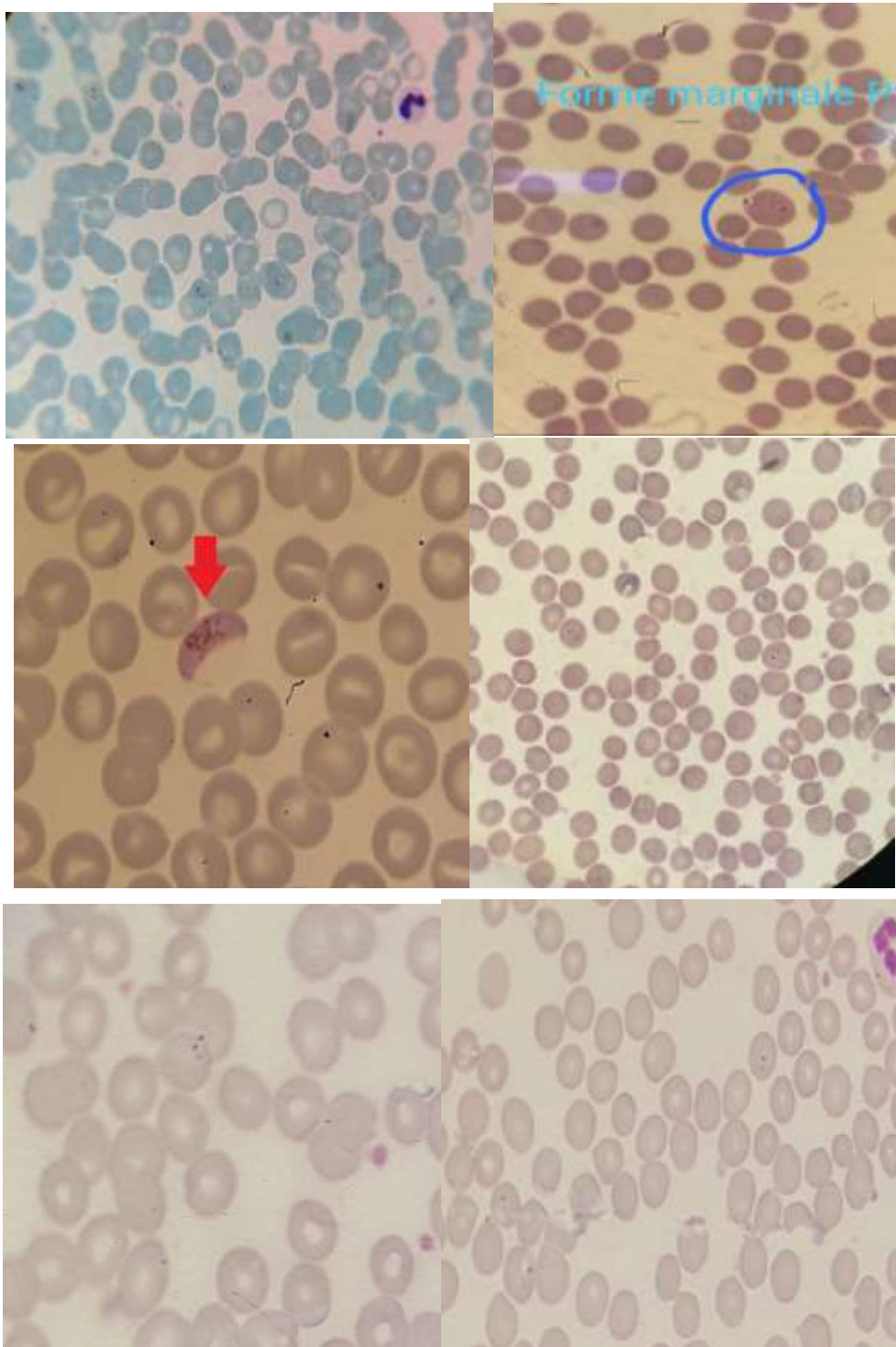


Figure 16: Différents aspects du *Plasmodium falciparum* sur FSM : Trophozoïtes et gamétocyte (flèche rouge) grossissement*1000. Noter la taille et la finesse des trophozoïtes et l'aspect monotone du Frottis [Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, HMIMV, Rabat]

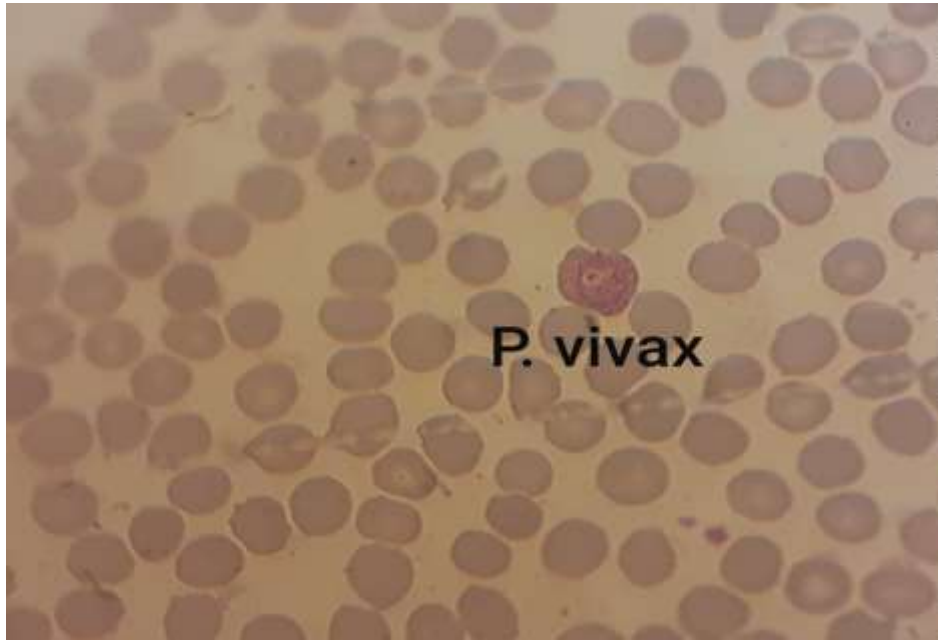


Figure 17: Trophozoïte âgé de *P. vivax* sur FSM au grossissement 1000. [Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, HMIMV, Rabat]

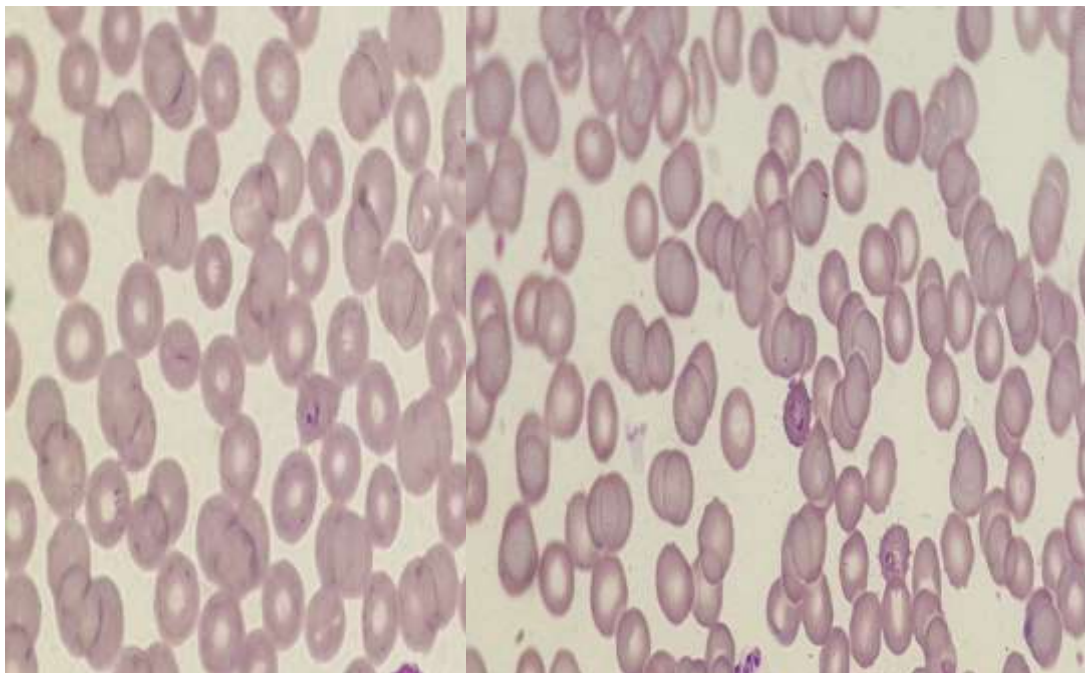


Figure 18: Trophozoïtes de *P. ovale* sur FSM au grossissement 10000. [Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, HMIMV, Rabat]

Aspect ovalisé et frangé des hématies avec présence des granulations de Schüffner

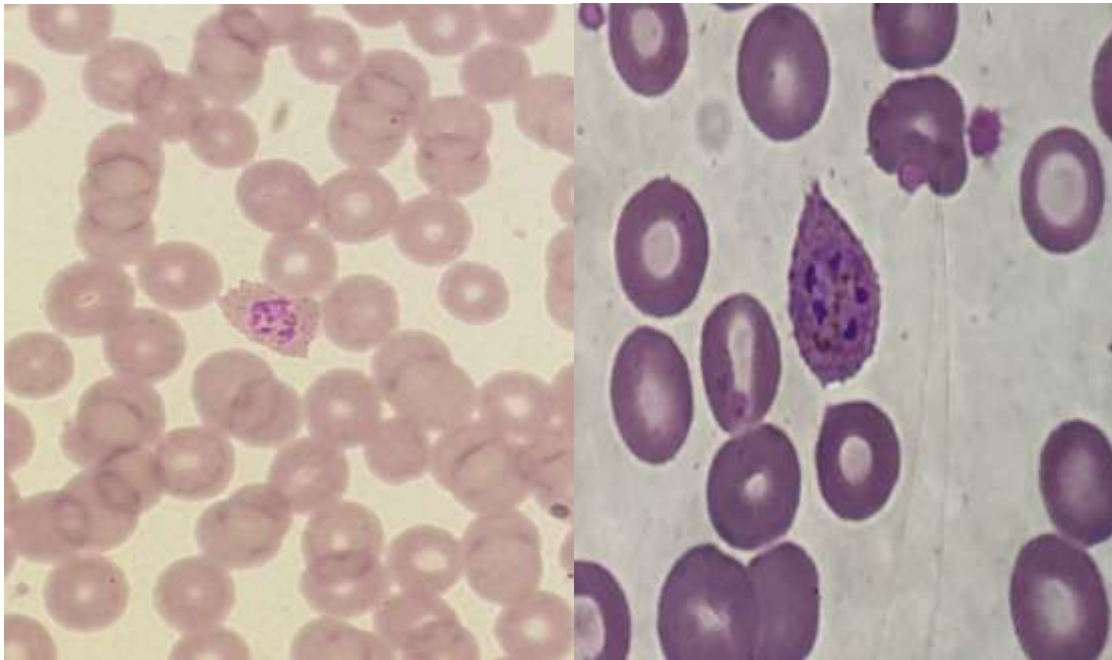


Figure 19: Schizontes de *P. ovale* sur FSM au grossissement 1000. [Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, HMIMV, Rabat]

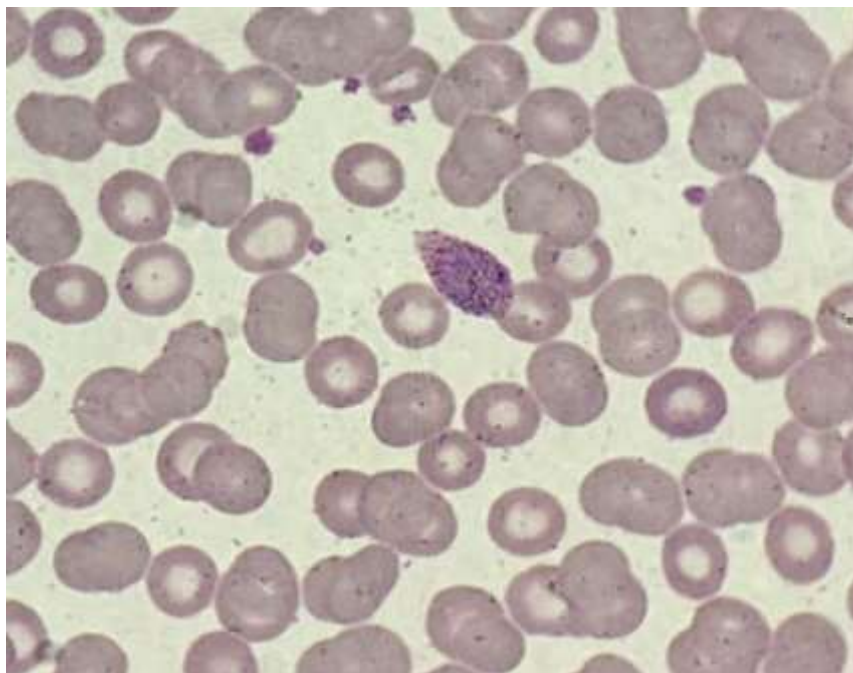


Figure 20: Gamétocyte de *P. ovale* sur FSM au grossissement 1000. [Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, HMIMV, Rabat]

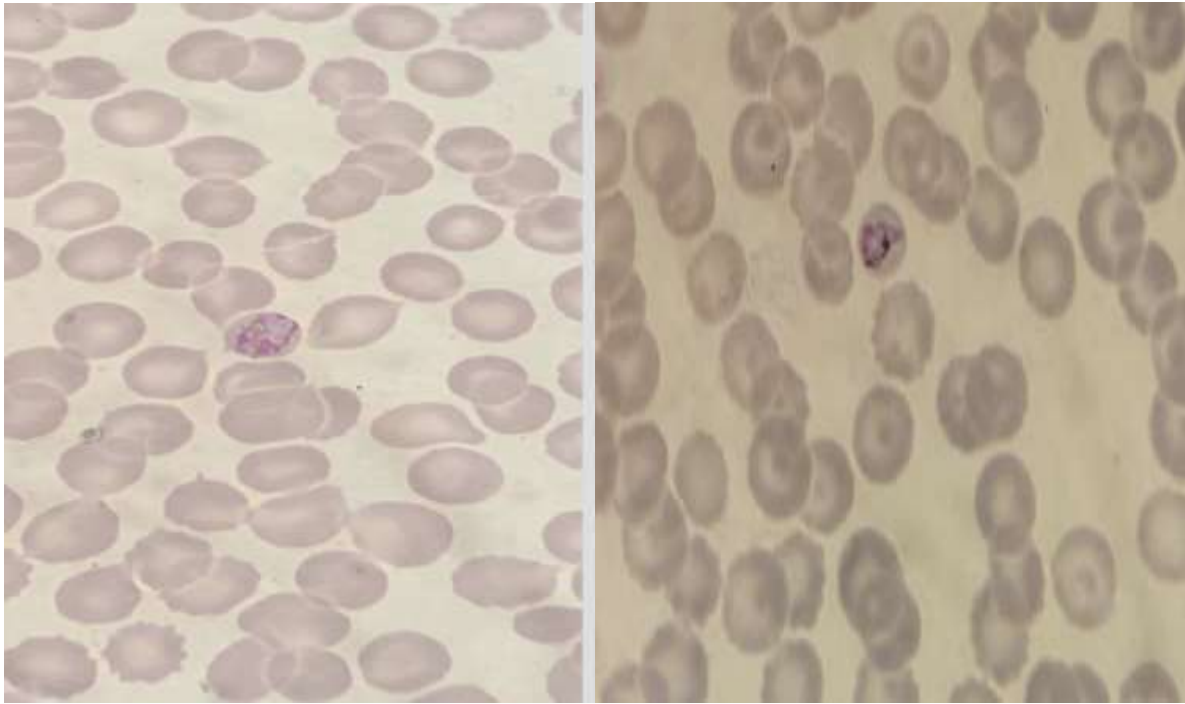


Figure 21: Aspect de bande équatoriale (Trophozoïte âgé) du *Plasmodium malariae* au grossissement 1000. [Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, HMIMV, Rabat]

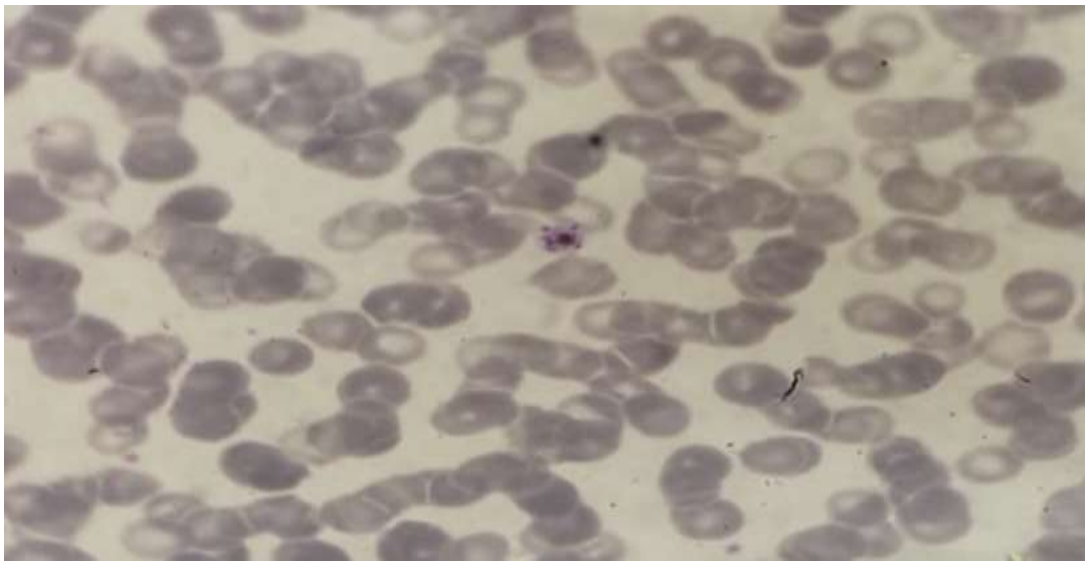


Figure 22: Schizonte de *Plasmodium malariae* au grossissement *1000. [Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, HMIMV, Rabat]



Figure 23: *P.knowlesi* trophozoïtes jeunes Idem *P. falciparum*. [39]

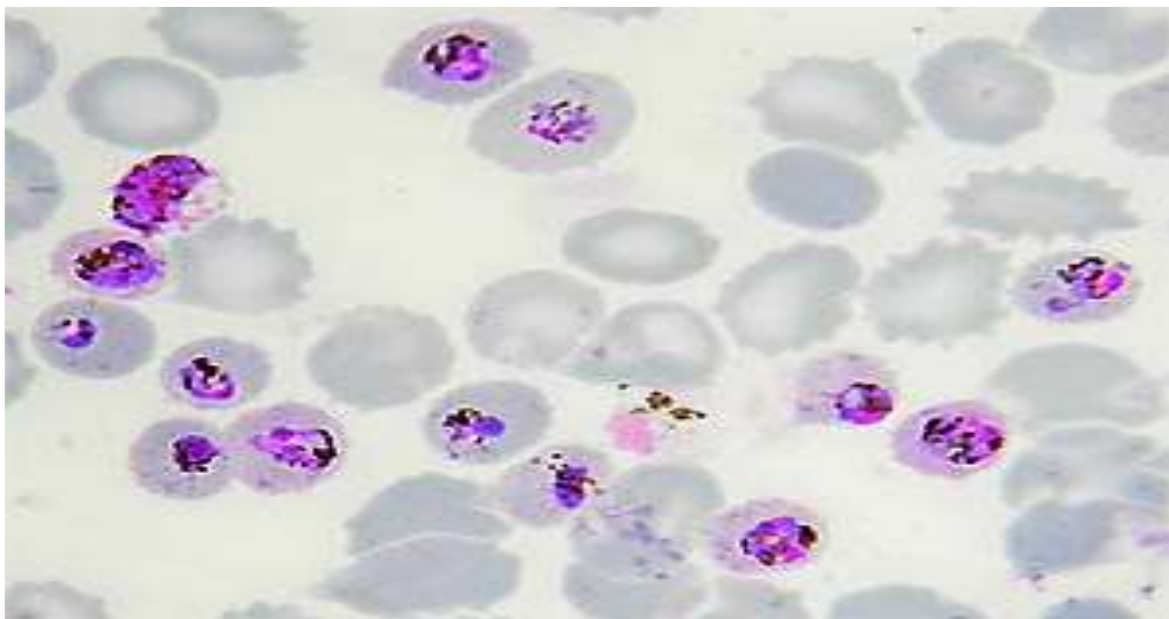


Figure 24: *P.knowlesi* trophozoïtes âgés Idem *P. malariae*. [39]

C-6 Estimation Du Niveau De La Parasitémie [40]

a- Importance :

- Évaluer la sévérité de l'infection, particulièrement pour *Plasmodium falciparum*, puisque la parasitémie figure parmi les critères de gravité qui définissent un accès grave.
- Évaluer l'efficacité du traitement et déceler une éventuelle résistance aux antipaludéens

b- MÉTHODE :

Pour évaluer le pourcentage de parasitémie :

Formule utilisée pour calculer le pourcentage de GR infectés Compter le nombre de globules rouges parasités par des formes asexués du parasite (trophozoïtes et schizontes).

Une parasitémie strictement supérieure à 4 % est un indice de gravité. [41]

$\frac{\text{Nombre de GR infectés}}{\text{Nombre de GR comptés}} \times 100 = \text{\% de GR infectés}$
--

Formule utilisée pour calculer le pourcentage de GR infectés

On peut calculer la parasitémie en calculant le nombre de PA/ μ l de préférence sur base d'un nombre exact de GR/ μ l du patient ou sinon sur base d'un nombre standard de 5.10^6 GR/ μ l

$\frac{\text{Nombre de GR infectés}}{\text{Nombre de GR comptés}} \times \text{nombre de GR}/\mu\text{l du patient} = \text{Nombre de PA}/\mu\text{l}$
--

Formule utilisée lorsque le nombre exact de GR du patient est connu

La 3^{ème} possibilité est de compter le nombre de parasites par rapport aux GB :

$\frac{\text{Nombre de PA}}{\text{Nombre de GB comptés}} \times \text{nombre de GB}/\mu\text{l du patient} = \text{Nombre de PA}/\mu\text{l}$

Formule utilisée lorsque le nombre exact de GB du patient est connu

En plus de cette méthode classique de comptage manuelle de la parasitémie et qui la plus utilisée, d'autres méthodes peuvent être préconisées comme l'utilisation de la cellule de Miller. D'autres méthodes utilisent un logiciel de reconnaissance d'image, avec une mesure automatique sur des parasites et des globules rouges. [41]

C-7 Avantages du frottis sanguin mince:

*Une préparation rapide, facile à lire, permettant l'identification des espèces et le calcul de la parasitémie en pourcentage d'hématies parasitées ; sans oublier son coût modéré.[42]

C-8 Inconvenients :

La lecture est longue et on ne peut parler de négativité qu'après étude d'un minimum de 50000 hématies correspondant à environ 200 champs au grossissement $\times 1\ 000$.

Les frottis minces sont moins sensibles lorsque la parasitémie est faible. En effet, le seuil de sensibilité des frottis est de 50 à 100 parasites par μl .

Les difficultés et les pièges de lecture à éviter sont d'ordre technique comme un étalement épais ou mal coloré ou peuvent être dues à des formes atypiques du parasite ou à des artefacts comme les dépôts de colorant, les plaquettes ou les corps de Jolly, d'où l'importance de la qualité de la coloration, le bichromatisme des parasites étant essentiel pour leur reconnaissance. [42]

I-2 QBC: QUANTITATIVE BUFFY COAT MALARIA

A- Principe

Le QBC ou *Quantitative Buffy Coat Malaria* est un test qualitatif, conceptualisé en 1974. Cette technique microscopique de fluorescence est une technique de concentration qui repose sur l'utilisation d'un fluorochrome: l'acridine orange, qui marque les brins d'acides nucléiques des noyaux plasmodiaux et des globules blancs. [43]

La recherche du Plasmodium se fait sur 50 μl de sang recueillis. Après incorporation de l'acridine dans le spécimen sanguin à analyser, celui-ci est placé dans un microtube capillaire (tube à hématocrite). Après centrifugation (5min à 5000g dans une centrifugeuse à micro hématocrite), la séparation des différentes couches cellulaires de l'échantillon se fait selon leur densité respective : les leucocytes puis les hématies et enfin les plaquettes. Les hématies

parasitées se retrouvent au voisinage de la couche leucocytaire et se répartissent en monocouche autour du flotteur (les gamétocytes ou les schizontes de *P. ovale* ou de *P. vivax* peuvent être retrouvés dans la couche leucocytaire ou dans la frange séparant plasma et plaquettes sanguines).

Le tube doit être examiné avec un microscope équipé d'une lumière UV ou avec un microscope classique équipé d'un objectif à immersion relié à une source de lumière froide par une fibre optique, cette lumière étant modifiée par un filtre dichroïque.

Après observation en lumière ultraviolette, à 480 nm de longueur d'onde, les globules rouges étant normalement dépourvus de toute structure nucléaire propre, seuls ceux hébergeant un ou des parasites sont repérables, puisque *Plasmodium* spp. est un protozoaire possédant un vrai noyau. Les globules rouges infectés se trouvent entre les couches de globules rouges et de globules blancs dans le tube du QBC (Figure 26).

Le noyau des *Plasmodium*, fortement fluorescent, est coloré en vert tandis que le cytoplasme, jaune pâle, est plus ou moins visible. (figure 28).

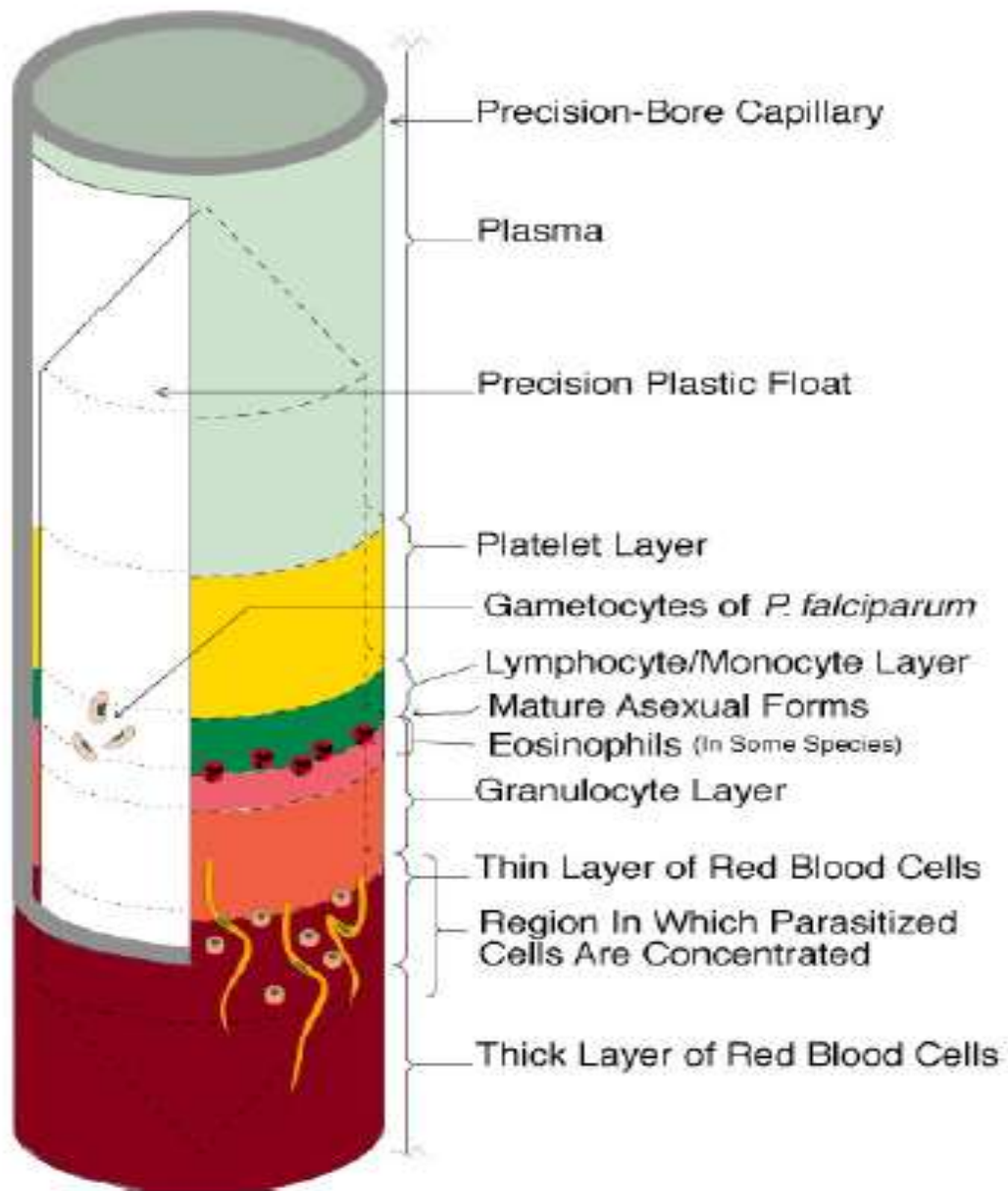


Figure 25: Principe de la QBC. [44]

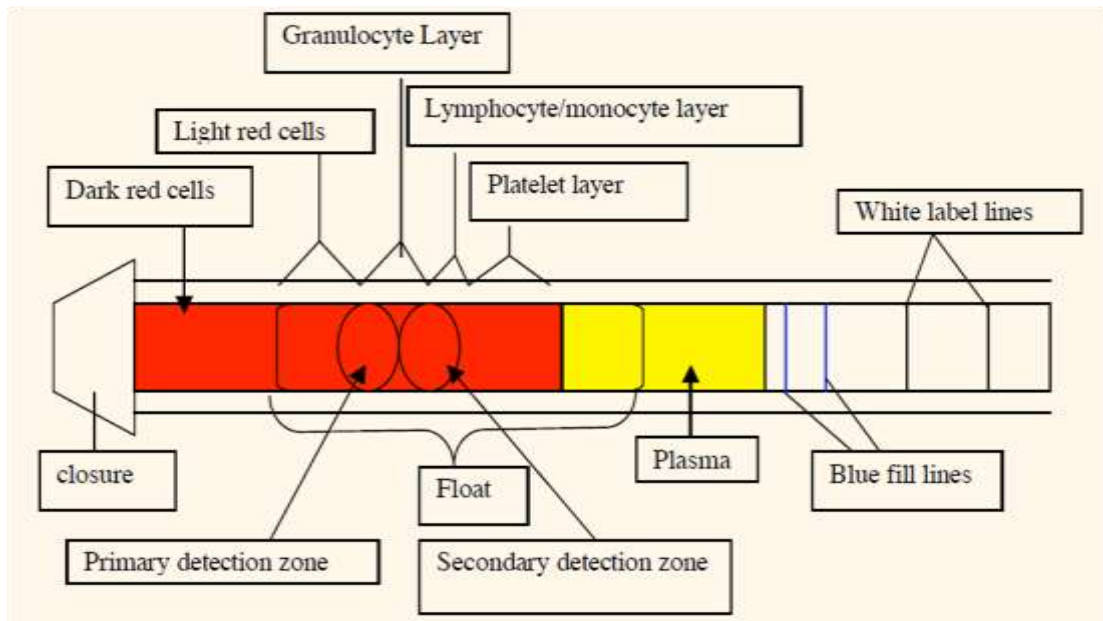


Figure 26: Diagramme schématique du tube QBC. [43]

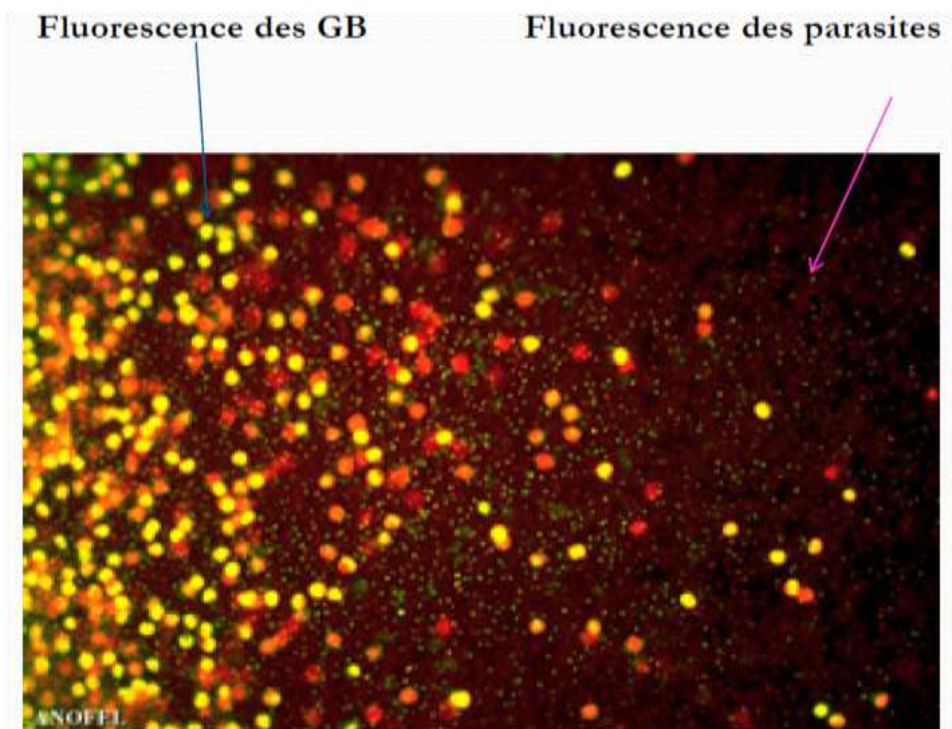


Figure 27: Aspect des parasites fluorescents par la technique QBC. [45]

B- Sensibilité et spécificité :

La sensibilité de cette technique serait comparable à celle de la GE pour des infections supérieures à 100 parasites/ μ l. Elle varie de 41% à 93% pour des parasitémies inférieures à 100 parasites/ μ l. [46]

La spécificité de la technique pour la détection de *P.falciparum* est élevée, supérieure à 93%. Elle chute à 52% pour les infections causées par les autres espèces plasmodiales. [47] [48]

C- Avantages :

- La méthode est peu coûteuse lorsqu'elle est utilisée à grande échelle, chaque kit QBC contient 100 tests pour un coût moyen de 1,53 £ par test.
- Elle est plus sensible que les frottis conventionnels, car le volume de sang prélevé est plus important.
- Cette technique est d'apprentissage facile, et très rapide, ne nécessitant que quelques minutes, très simple à mettre en œuvre
- Le test QBC peut être conservé pendant trois jours après centrifugation à 16-37°C, ou jusqu'à deux semaines lorsqu'il est réfrigéré à 4°C avant l'examen.
- La différence entre une infection actuelle et infection récente est facile à faire. Une infection récente de pigmentation sous forme de zones de coloration noire à l'intérieur la couche des lymphocytes/monocytes uniquement. [43][49]

2-5 INCONVENIENTS :

- L'identification des espèces n'est pas toujours possible.
- Elle nécessite là encore du personnel formé..
- Son emploi nécessite un matériel et des réactifs coûteux ce qui limite son utilisation. Il ne permet pas non plus le diagnostic d'espèce et le calcul de la parasitémie. [44-45]

I-3 LES TESTS DE DIAGNOSTIC RAPIDES DU PALUDISME

Grâce au développement de la biotechnologie, les tests de diagnostic rapide ont connu un grand développement en biologie car contrairement aux tests diagnostiques traditionnels, les TDR permettent un diagnostic rapide de la maladie en zone tropicale, où les microscopes et les autres techniques de détection du Plasmodium ne sont pas toujours disponibles, ces tests sont particulièrement intéressants.

Cependant, pour une interprétation précise des résultats, il est nécessaire de connaître pour chacun de ces tests leur sensibilité, valeur prédictive positive et négative. [51] [24] [35]

A- Principe :

La détection rapide d'antigènes parasitaires, bactériens ou viraux par immunochromatographie sur membrane consiste à déposer l'échantillon à tester à l'une des extrémités d'une membrane de nitrocellulose fixée sur un support plastique ou carton. Si l'antigène recherché est présent, il se lie avec un anticorps marqué le plus souvent à l'or colloïdal. Sous l'effet d'un tampon de lyse/migration, les complexes antigènes-anticorps migrent par capillarité et sont arrêtés par des anticorps de capture fixés sur la membrane. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une ligne colorée. L'excès de complexe conjugué continue à migrer et est immobilisé par un anticorps (anti-lapin ou anti-souris), l'accumulation des complexes colorés entraîne l'apparition d'une ligne colorée, cette seconde ligne valide le bon fonctionnement de la réaction.

Si la réaction est négative, seule la ligne de contrôle est colorée. Un test ne présentant pas de bande sur la zone contrôle est invalide que la zone test soit marquée ou non.

L'apparition des bandes est rapide en 15 à 20 mn. [52]

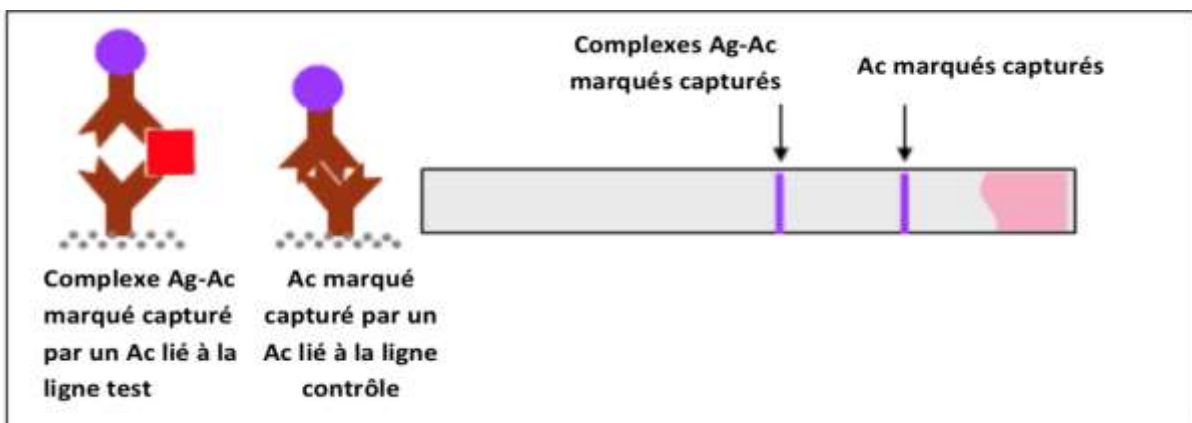
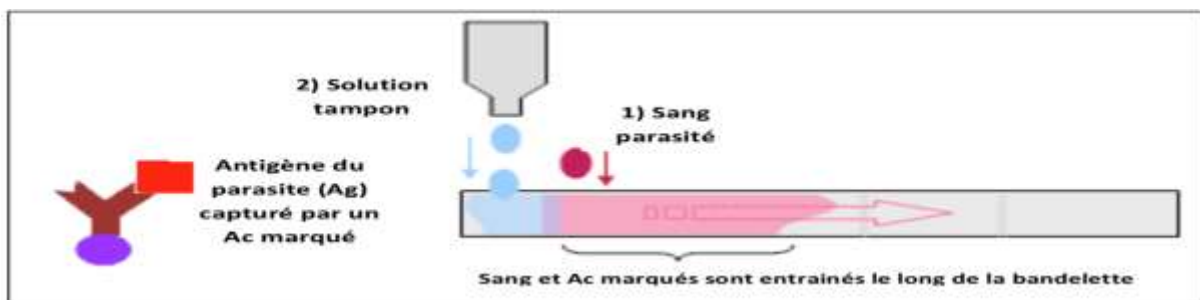
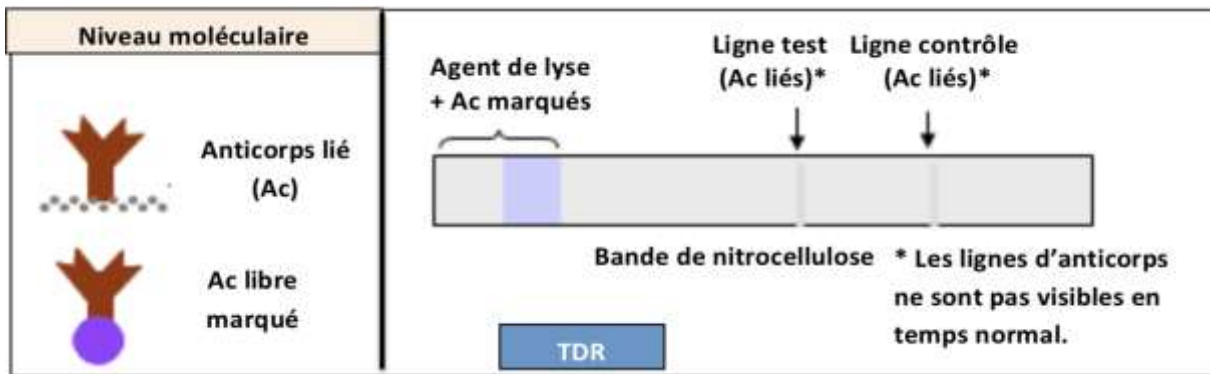


Figure 28: Descriptif des étapes de fonctionnement des tests de diagnostic rapide. [53]

B- Antigènes plasmodiaux détectés par les TDR

Les TDR du paludisme détectent des antigènes spécifiques (des protéines) produits par les plasmodiums présentes dans le sang des personnes infectées. Certains TDR détectent les infections monospécifiques (soit *P. falciparum* soit *P. vivax*), d'autres détectent des infections mixtes (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*), tandis que d'autres distinguent les infections par *P. falciparum* et non *falciparum*, ou des espèces spécifiques (tableau IV).

Les antigènes ciblés par les TDR du paludisme actuellement sur le marché sont les suivants :

- la protéine-2 riche en histidine (HRP2) ;
- la lactate déshydrogénase (pLDH)
- l'aldolase

Le test HRP2 utilise une protéine spécifique qui ne détecte que *P. falciparum* alors que la pLDH peut être non spécifique, commune à toutes les espèces du Plasmodium (PpanLDH) ou plus spécifique pour le *P. falciparum* (PfLDH) et *P. vivax* (PvLDH).

L'aldolase est une protéine qui est présente dans toutes les espèces du paludisme, et qui peut donc être utilisé pour le diagnostic du paludisme.

B-1 L'HRP :

L'HRP2 est une protéine soluble de 30kDa, stable à la chaleur, synthétisée uniquement par *Plasmodium falciparum* à tous les stades érythrocytaires et par les gamétocytes jeunes. Cette protéine est libérée lors d'une rupture du schizonte

et se trouve donc dans le sang de l'individu infecté. Le rôle exact de cette protéine est inconnu.

Les TDR basés sur Pf-HRP2 ont pour avantages d'avoir une bonne sensibilité et spécificité pour *Plasmodium falciparum* et d'avoir une meilleure stabilité thermique. En 2010 Baker et al. décrivent un grand polymorphisme dans la structure du gène *pfhrp2* mais concluent que la diversité protéique associée ne semble pas être une cause majeure de variation de sensibilité des TDR. De plus, il est décrit une corrélation positive entre la concentration de cette protéine dans le sang, la densité parasitaire et la sévérité clinique. Ainsi, Pf-HRP2 pourrait être utilisée comme biomarqueur de la sévérité/gravité d'un accès palustre. Cependant elle reste circulante longtemps après la mort des parasites. Ainsi les TDR basés sur PfHRP2 ne peuvent donc pas être utilisés dans le suivi de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques car la protéine persiste jusqu'à 28 jours dans le sang périphérique après l'élimination du parasite.

Par ailleurs, ces tests antigéniques ont plusieurs limites : Il existe des réactions croisées avec la protéine PfHRP3, qui a une composition en acides aminés proche de PfHRP2 pouvant donc être reconnue par les anticorps anti-PfHRP2.

En cas de forte parasitémie, l'excès d'antigène peut entraîner un résultat faussement négatif ou faiblement positif, appelé effet prozone. Ce phénomène est dû à la saturation des anticorps fixés sur la membrane, par l'excès d'antigènes libres entraînant un défaut de capture des complexes Ag/Ac marqués et donc un défaut de détection.

Certains auteurs ont décrit une absence totale ou partielle de production de la protéine PfHRP2 par certains isolats de *P. falciparum* due à une délétion du gène *pfhrp2* codant pour cet antigène.

B-2 L'aldolase :

Une protéine commune à toutes les espèces de plasmodies (pan-plasmodiales). L'aldolase est une enzyme clé du cycle du glucose, commune aux cinq espèces de Plasmodium contaminant l'Homme. L'aldolase est retrouvée dans les membranes des stades schizontes. Il n'a pas été observé de souches non sécrétrices d'aldolase. Cet antigène commun aux cinq espèces de Plasmodium est une cible détectée par certains tests de diagnostic rapide et combinée à la recherche d'un antigène spécifique de *P. falciparum*. Une des limites de ce type de test est sa réactivité fréquemment mise en défaut pour détecter *P. ovale* et sa sensibilité modérée dans la détection de *P. malariae* alors que sa capacité à détecter *P. falciparum* et *P. vivax* est bonne. A noter qu'une aldolase spécifique de *P. vivax* (iso-enzyme) est commercialisée.

B-3 La p-LDH :

La Plasmodium lactate déshydrogénase est une enzyme qui est présente chez toutes les plasmodies humaines. Cette enzyme qui est la dernière enzyme impliquée dans le cycle du glucose est synthétisée par les stades érythrocytaires asexués et les gamétocytes matures.

La pLDH est produite par des parasites vivants. Par conséquent sa recherche peut être utilisée pour suivre l'efficacité d'un traitement anti paludique. Il existe des isoformes spécifiques d'espèce(s) plasmodiale(s) :

- *P. vivax* (pLDH-Pv)
- *P. falciparum* (pLDH-Pf)
- *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae* (pLDHPvom)

Les limites de ces tests sont la diminution de sensibilité avec les faibles parasitémies et les réactions croisées entre pLDH-Pv et *P. knowlesi*.

Espèces plasmodiales	Pf-HRP2	pLDH				Aldolase
		Pf-pLDH	PanpLDH	PvompLDH	Pv-pLDH	
<i>P. falciparum</i>	+	+	+			+
<i>P. vivax</i>			+	+	+	+
<i>P. malariae</i>			+	+		+
<i>P. ovale</i>			+	+		+
<i>P. knowlesi</i>			+			+

Tableau IV: Protéines plasmodiales associées au diagnostic des différentes espèces de *Plasmodium*. [35]

Biomarqueur	Sous-type de biomarqueur	Parasite détecté	Sensibilité ¹	Spécificité ¹
PfHRP2		<i>Plasmodium falciparum</i>	96-100 %	99 %
Aldolase	Pv aldolase Pan aldolase	<i>P. vivax</i> Tous	84 %	99 %
pLDH	Pf pLDH Pv pLDH Pan pLDH	<i>P. falciparum</i> <i>P. vivax</i> Tous	79-98 %	98-100 %

Tableau V: Caractéristiques des biomarqueurs dans les tests de diagnostic rapide (TDR) du paludisme. (pour des parasitémies supérieures à 0.002%) [54]

C- Performance des TDR

De nombreuses méta-analyses publiées ont fourni des données comparatives sur la performance des TDR disponibles sur le marché. On prend l'exemple de l'étude de Bell et coll. qui a classé ces TDR du paludisme en 7 types en se basant sur l'antigène utilisé dans le réactif et a comparé leur sensibilité et spécificité par rapport aux techniques microscopiques ou PCR.

Plasmodium falciparum

	<i>Test type</i>	<i>Sensibilité (95% CI)</i>	<i>Spécificité (95% CI)</i>
HRP-2 (microscope)	Type 1: HRP-2 (P. falciparum specific)	94.8% (93.1% à 96.1%)	95.2% (93.2% à 96.7%)
	Type 2 : HRP-2 (P. falciparum specific) et aldolase (pan-specific)	96.0% (94.0% à 97.3%)	95.3% (87.3% à 98.3%)
	Type 3 : HRP-2 (P. falciparum specific) et pLDH (pan-specific)	99.5% (71.0% à 100.0%)	90.6% (80.5% à 95.7%)
PLDH (microscope)	Type 4 :pLDH (P. falciparum specific) et pLDH (pan-specific)	91.5% (84.7% à 95.3%)	98.7% (96.9% à 99.5%)
	Type 5 : pLDH (P. falciparum specific) et pLDH (P. vivax-specific)	98.4% (95.1% à 99.5%)	97.5% (93.5% à 99.1%)

Tableau VI: Comparaison de la sensibilité et de la spécificité de quelques types de TDR à *P.falciparum*.

- **Plasmodium non falciparum**

	<i>Test type</i>	<i>Sensibilité (95% CI)</i>	<i>Spécificité (95% CI)</i>
P. non falciparum (microscope)	Type 2 : HRP-2 (P. falciparum specific) et aldolase (pan-specific)	78% (73% à 82%)	99% (97% à 99%)
	Type 3 : HRP-2 (P. falciparum specific) et pLDH (pan-specific)	78% (69% à 84%)	99% (98% à 99%)
	Type 4 : pLDH (P. falciparum specific) et pLDH (pan-specific)	89% (79% à 95%)	98% (97% à 99%)
P. non falciparum (PCR)	Type 3	81% (72% à 88%)	99% (97% à 99%)
P.vivax avec ou sans co infection (microscope)	Type 6 : HRP-2 (P. falciparum specific) et pLDH (P. vivax-specific)	95% (86% à 99%)	99% (99% à 100%)

Tableau VII: Comparaison de la sensibilité et de la spécificité de quelques types de TDR à *P.non falciparum*.

La sensibilité et la spécificité de tous les TDR sont telles qu'ils peuvent remplacer les services de diagnostic ou élargir la couverture diagnostique dans le paludisme à *P. falciparum* non compliqué. Les tests utilisant l'anticorps anti-HRP-2 pourraient être plus sensibles mais sont moins spécifiques que les tests utilisant l'anticorps anti-LDHp, sachant toutefois que les différences sont minimes. L'antigène HRP-2 persiste même après un traitement efficace et ne peut donc pas être utilisé pour détecter les échecs du traitement. [55]

Des critères de choix du test adéquat ont été définis par l'OMS. Pour ceci il faut répondre à trois questions : quoi, où et qui ? L'objectif essentiel de l'OMS est d'identifier les infections à *P. falciparum*. [56]

Différents types de TDR sont disponibles sur le marché :

- Simples : 2 bandes, une de contrôle et une antigénique
- Combinés : à plusieurs bandes (3 bandes, 4 bandes)

Les experts convoqués lors de la réunion inaugurale du Comité de pilotage de la politique de lutte antipaludique, qui s'est tenue à Genève début 2012, ont mis à jour les recommandations de l'OMS pour l'achat des TDR. Les produits doivent être choisis en fonction des critères suivants, après évaluation par le programme d'évaluation des tests de diagnostic rapide du paludisme :

- Pour la détection de *P. falciparum* dans tous les contextes de transmission, le score de détection sur panel d'évaluation constitué d'échantillons contenant *P. falciparum* doit être au minimum de 75 % à 200 parasites/ μ l ;

- Pour la détection de *P. vivax* dans tous les contextes de transmission, le score de détection sur panel d'évaluation constitué d'échantillons contenant *P. vivax* doit être au minimum de 75 % à 200 parasites/ μ l ;
- Le taux de faux positifs doit être inférieur à 10 % ;
- Le taux de tests non valides doit être inférieur à 5 %.

En décembre 2017, le programme OMS de pré qualification des dispositifs de diagnostic in vitro et le Programme mondial de lutte antipaludique ont annoncé que tous les tests de diagnostic rapide du paludisme qui diagnostiquent *P.falciparum* uniquement par la détection de la protéine riche en histidine 2 (HRP2) devront être pré-qualifiés pour l'achat par l'OMS à compter du 1er janvier 2018.

À l'heure actuelle, aucun TDR combiné basé sur la détection de Pf-LDH et visant à déceler une infection à *P. falciparum* et à la distinguer d'une infection non-Pf ne respecte les critères recommandés par l'OMS en matière de score de détection sur panel d'évaluation, pour les deux panels *P. falciparum* à densité parasitaire faible (200 p/ μ l) exprimant et n'exprimant pas HRP2 (mixte pfhrp2-/pfhrp3+ et pfhrp2-/ pfhrp3-).

Plusieurs études au fil des années ont montré que la sensibilité des TDR au paludisme diminue avec une faible parasitémie.

Dans une étude à 2 centres au Mozambique et en Tanzanie incluant 1898 malades la sensibilité des TDR HRP2 était de 94% à parasitémie > 1000p/ μ l contre 69.6 % à parasitémie < 1000p/ μ l, alors que la sensibilité des TDR pLDH était de 88% à parasitémie > 1000p/ μ l contre 45.7% à parasitémie < 1000p/ μ l.

[57] [58]

Dans une autre étude en Malaisie le pLDH a été capable d'identifier *P. knowlesi* avec une sensibilité de 97% à parasitémie > 1000p/ μ l mais seulement 25% à parasitémie <1000p/ μ l, alors que la sensibilité de *P. vivax* était de 94% à parasitémie > 1000p/ μ l qui a diminué à 60% à parasitémie < 1000p/ μ l. [57]
[59]

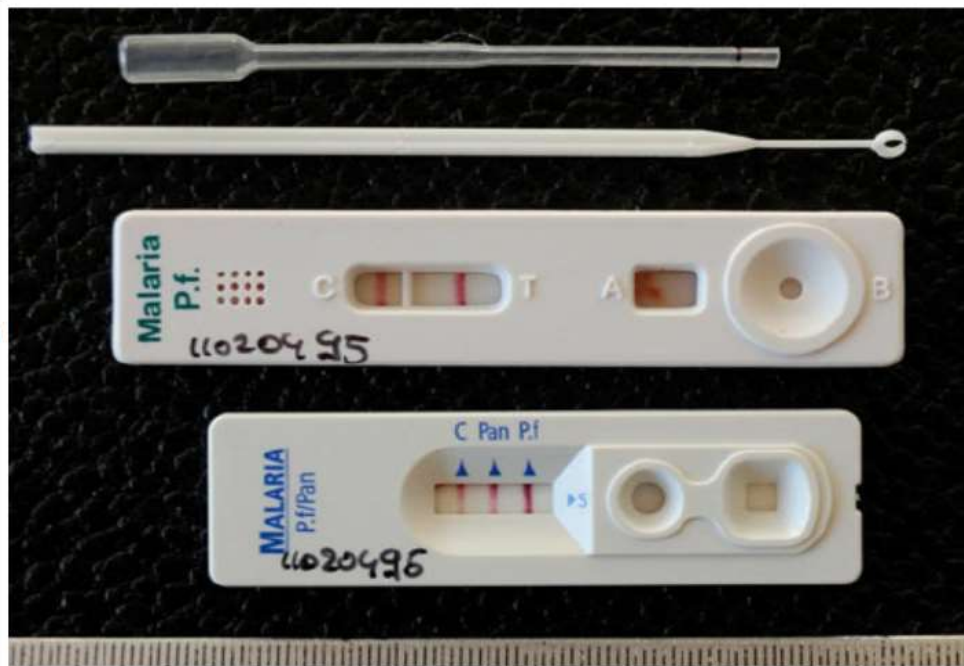


Figure 29: Tests de diagnostic rapide du paludisme à deux et trois bandes avec des dispositifs de transfert de sang (pipette et boucle). [60]



Figure 30: Test de diagnostic rapide PALUTOP®+4 Optima avec 3 bandes. [61]

D- Avantages

Les TDR antigéniques sont simples d'utilisation, rapides et d'un apport précieux en poste isolé. Ils permettent une recherche simultanée de *P. falciparum* et d'autres espèces d'hématozoaires.

La sensibilité est supérieure à 95 % à partir de 100 parasites par microlitre.

E- Inconvénients

Les tests rapides ont des limites :

*Les faux négatifs sont dus à une faible parasitémie de l'ordre de 100 parasites par μL , soit 0,002 % d'hématies infectées. Or, il est fréquent de mettre en évidence en pathologie d'importation ou chez le voyageur non immun en zone d'endémie sous chimioprophylaxie non ou mal adaptée des parasitémies très faibles. Le résultat des TDR peut donc être faussement négatif.

*Les faux positifs, moins bien connus, sont dus à une lecture trop tardive après le dépôt des réactifs, à la présence d'auto-anticorps ou de facteur rhumatoïde à des taux élevés. De plus, la persistance de la circulation de l'HRP2 après disparition des parasites du sang circulant est trouvée jusqu'à 15 jours après négativité des tests microscopiques. Si ce phénomène peut expliquer la plupart des faux positifs, il peut cependant permettre un diagnostic rétrospectif de paludisme à *P. falciparum*. La clairance des pLDH est par contre beaucoup plus rapide et reflète mieux la viabilité des parasites. Par ailleurs, il est positif en présence de gamétocytes isolés.

*Les TDR sont sensibles à l'humidité et à la chaleur [62] et aux conditions extrêmes. Ils peuvent être conservés pendant 2 mois. L'OMS exige un contrôle de qualité pour les lots de TDR du paludisme. Des recommandations pour la mise en œuvre pratique de ces contrôles sont disponibles. [63]

Facteurs spécifiques aux parasites	Facteurs spécifiques aux TDR
<ul style="list-style-type: none"> - Suppression de gène HRP2 - Délétion du gène HRP3 - Faible parasitémie - Parasitémie élevée (effet prozone) 	<ul style="list-style-type: none"> - Qualité d'analyse - Stabilité thermique de la carte TDR - Âge de la carte ou du réactif - Variabilité de lot à lot dans la qualité du dosage.
Facteurs spécifiques à l'opérateur	Facteurs divers
<ul style="list-style-type: none"> - Opérateur : Placement inapproprié du réactif ou de la goutte de sang - Opérateur : Interprétation de la ligne faible 	<ul style="list-style-type: none"> - Variation régionale (c.-à-d. carte du TDR HRP2 dans une région élevée de non-falciparum) - Post-traitement de positivité prolongée (le plus significatif avec HRP2 qui est un mauvais test de guérison et affecte la capacité de tester la réinfection pendant 4 à 6 semaines)

Tableau VIII: Facteurs affectant la précision des TDR. [57]

	<i>J1</i>	<i>J7</i>	<i>J28</i>
<i>pHRP</i>	17.3%	29.9%	73.6%
<i>pLDH</i>	87%	<i>Entre J7 et J28</i>	
		92-100%	

Tableau IX: Comparaison de la spécificité des TDR PLDH et des TDR HRP2 après traitement efficace. [57]

I-4-METHODES SEROLOGIQUES

Diverses techniques existent pour mettre en évidence les anticorps (Ac) développés contre le Plasmodium : immunofluorescence, électrosynérèse ou méthodes immunoenzymatiques (ELISA)

Le CDC a répertorié des tests pour trois des espèces de Plasmodium : falciparum, vivax et malariae. Du fait de l'apparition tardive des Ac anti-trophozoïte, 10 jours en moyenne après la crise aiguë, la recherche des Ac, IgM comprises, n'a pas d'intérêt en situation d'urgence. Cette recherche d'Ac est cependant classiquement décrite comme utile dans d'autres situations cliniques:

- Pour confirmer rétrospectivement un diagnostic chez un patient ayant pris un traitement sans diagnostic biologique (traitement présomptif)
- Pour confirmer des formes chroniques de paludisme chez un patient originaire de zone d'endémie notamment en cas de paludisme viscéral évolutif et la splénomégalie palustre hyper immune et permettre l'instauration d'un traitement d'éradication approprié. Dans le PVE, des IgG retrouvées à des taux élevés signent la chronicité de l'infection
- Dans les dons de sang, de cellules et d'organes
- Dans les enquêtes épidémiologiques de zones impaludées, mais il n'est pas possible avec les tests immuno-enzymatiques actuels de distinguer les infections récentes et anciennes. Des faux positifs aux tests sérologiques ont été identifiés, par réaction croisée avec des Ac dirigés contre d'autres parasites intra érythrocytaires proches comme Babesia.

[64]

A. Test ELISA

La technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

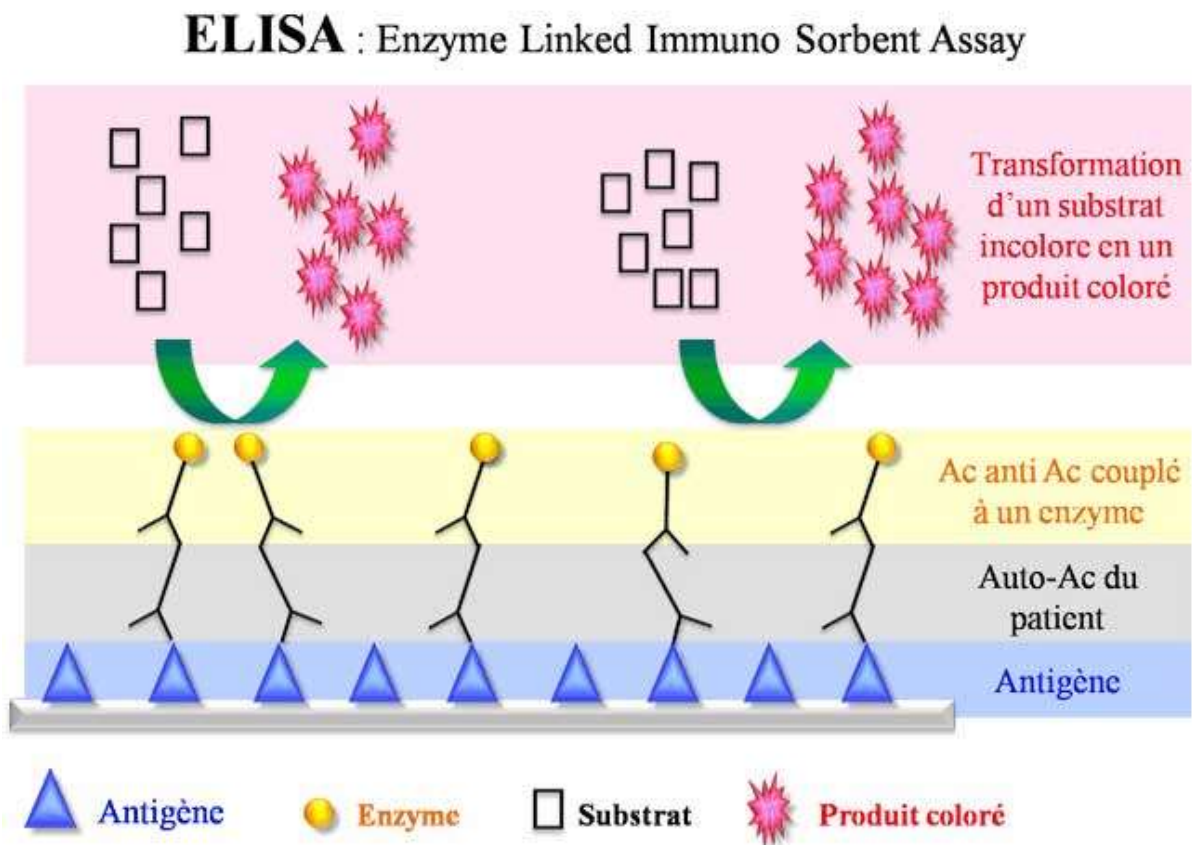


Figure 31: Schéma du principe de l'ELISA. [65]

B. IFI (Test des anticorps à fluorescence indirecte)

Le principe de cette technique se base sur la détection des Ac dirigé contre les trophozoïtes érythrocytaires matures de sang parasité étalé en frottis mince ou en goutte épaisse.

La détection des anticorps du paludisme peut être effectuée à l'aide du test des anticorps fluorescents indirects (IFI). Un test spécifique à l'espèce est disponible pour les quatre espèces humaines : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*. Les schizontes des espèces de Plasmodium au stade sanguin sont utilisés comme antigène. Le sérum du patient est exposé aux organismes ; si un anticorps homologue est présent, il se fixe à l'antigène et forme un complexe antigène-anticorps (Ag-Ac). On ajoute ensuite des anticorps antihumains marqués par fluorescence, qui se fixent aux anticorps spécifiques du paludisme du patient. Lorsqu'on l'examine au microscope à fluorescence, une réaction positive se manifeste par une fluorescence vert pomme des parasites. Des réactions croisées se produisent souvent entre les espèces de Plasmodium et les espèces de Babesia.

Le principal avantage de cette méthode est le fait qu'elle est relativement facile à réaliser. Cependant, comme la fluorescence est déterminée par un examen visuel, elle est difficile à standardiser. De plus, la préparation de diapositives distinctes par individu demande beaucoup de travail, et les réponses d'anticorps dérivés sont grossières puisque les échantillons préparés sont utilisés en entier.

II. NOUVELLES TECHNIQUES DE DC DU PALUDISME

II-1 METHODES MOLECULAIRES POUR LE DIAGNOSTIC DU PALUDISME.

A. Tests d'amplification géniques par PCR

L'amplification en chaîne par polymérase (ACP) ou PCR (Polymérase Chain Reaction) permet l'amplification de la séquence d'ADN cible in vitro. C'est une réaction enzymatique qui permet de sélectionner puis d'amplifier en une très grande quantité un fragment d'ADN particulier, présent en très faible quantité au départ parmi des milliers d'autres fragments. C'est une succession de cycles qui se répètent en boucle permettant de doubler la quantité du gène cible à chaque cycle. Le produit d'une réaction PCR est ensuite visualisé sur gel d'agarose à l'aide de molécules fluorescentes ou détectés en temps réel avec des sondes spécifiques.

La PCR a été introduite pour la première fois pour l'identification des parasites du paludisme par Snounou et al. en 1993, où des paires d'amorces spécifiques à chaque espèce ont été conçues pour une amplification spécifique, et les amplicons ont été analysés par électrophorèse. Le test s'est avéré plus sensible et plus précis que le diagnostic microscopique routine [66], la PCR est capable de détecter des densités parasitaires extrêmement faibles, surpassant les méthodes de détection microscopique et antigénique en termes de sensibilité et de spécificité. Ils présentent une limite de détection améliorée pour l'infection palustre, inférieure à 0,02 parasite/ μ L [67] [68].

Cependant, la PCR nécessite un laboratoire très bien équipé et des techniciens formés en biologie moléculaire. Par conséquent, la PCR du paludisme est utilisée pour la recherche, la surveillance et comme norme de référence par rapport à laquelle d'autres méthodes sont évaluées.

En général, la PCR du paludisme comme toute les PCR, comprend les étapes suivantes :

1. Préparation de l'échantillon :

Il existe différentes méthodes pour l'extraction des acides nucléiques dont l'objectif est d'obtenir des acides nucléiques suffisamment purifiés capables d'interagir avec les réactifs d'amplification sans interférence ou inhibition. Le degré de purification d'un échantillon varie en fonction de la méthode utilisée : méthode maison ou kits commerciaux ou méthodes automatisées.

2. Amplification :

Cette étape nécessite la réalisation de copies multiples de l'acide nucléique du parasite, et se fait à l'aide de réactifs spécialisés et d'une machine à cycle thermique qui varie la température requise pour que les réactions aient lieu.

Le choix de l'équipement approprié dépend des besoins ; par exemple, pour les soins aux patients, un appareil à faible débit mais permettant d'obtenir rapidement des résultats est souhaitable. Dans une étude de surveillance, avec de multiples échantillons, un instrument à haut débit serait préférable.

3. Détection :

Les produits de l'amplification PCR doivent ensuite être détectés. Plusieurs approches de détection sont possibles : électrophorèses sur gel d'agarose, méthode immuno-enzymatique ou détection en temps réel. Dans certains cas, l'instrument PCR automatise le processus de détection.

Avantage de la PCR :

- Sensibilité : La PCR est une technique très sensible car capable de générer une très grande quantité d'acide nucléique à partir de quelques copies de la séquence recherchée.
- Spécificité élevée.

Limite de la PCR : La PCR reste une technique parfois délicate à réaliser et à interpréter du faite :

- des risques d'inter contamination lors des prélèvements.
- de la possible dégradation des acides nucléiques en particulier de l'ARN ainsi que de la présence d'inhibiteurs de PCR lors de certains prélèvements.
- de la contamination facile du milieu réactionnel lors de l'analyse au laboratoire.
- Des faux positifs dus à la sensibilité extrême de la technique.
- La contamination par aérosols de produits PCR.

A-1 VARIANTES DE LA PCR

a- La PCR nichée

Une version actualisée de la PCR classique a été développée par Snounou *et al.* en 1993, il s'agit de la PCR nichée. Elle est utilisée pour confirmer les cas positifs dans les programmes de surveillance et est, jusqu'à date considérée comme la référence dans de nombreux pays. [66]

Principe :

Dans cette technique, deux couples d'amorces différents sont successivement utilisés:

- Un couple d'amorces externes : Ce couple d'amorces permet tout d'abord d'obtenir un premier fragment d'ADN amplifié, selon une PCR classique. Les fragments d'ADN obtenus servent alors de matrice pour une seconde PCR.
- Un couple d'amorces internes : Ce couple d'amorces délimite une région située à l'intérieur (ou nichée) du fragment nucléotidique obtenu avec le 1er couple d'amorces, et donnera des fragments de taille inférieure à ceux obtenus avec la 1ère.

En cas de paludisme, le gène de l'ARNr18, présent dans les différents espèces, est amplifié en premier lieu puis des sondes spécifiques à l'espèce sont utilisées permettant une identification d'espèce. Les produits PCR sont ensuite analysés par diverses méthodes de détection.

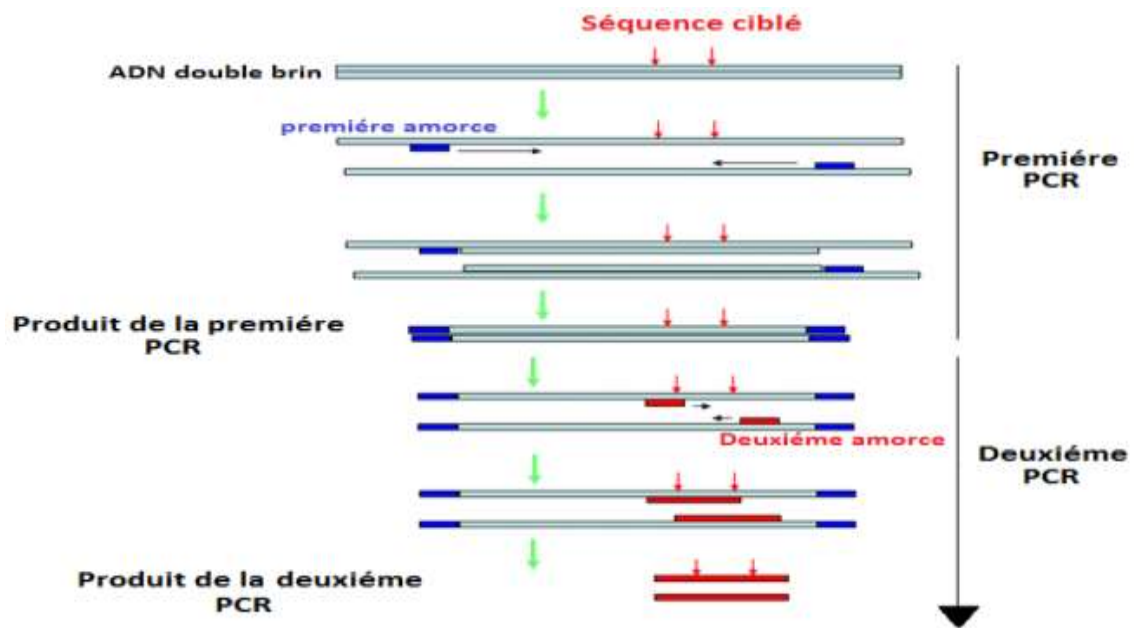


Figure 32: Principe de la PCR nichée. [69]

Espèces	Amorces	Séquence (5' – 3')	Taille du produit PCR
Plasmodium sp	rPLUS5 rPLUS6	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	1,100
<i>P. Falciparum</i>	rFAL1 rFAL2	TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC	205
<i>P.vivax</i>	rVIV1 rVIV2	CGCTTCTAGCTTAATCCACAT AACTGATAC ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA	120
P.ovale	rOVA1 rOVA2	ATCTCTTTTGCTATTTTTTAG TATTGGAGA GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG	800
P.malariae	rMAL1 rMAL2	ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC AAAATTCCCATGCATAAAAAA TTATACAAA	140

Tableau X: Les amorces de la PCR nichée pour la détection des espèces plasmodiales. [66]

Avantage :

- Permet une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité.

Inconvénients :

- Nécessite beaucoup de temps de manipulation.
- Cette technique reste très exposée aux risques de contamination (du fait des PCR successives).

b- La PCR en temps réel.

Afin d'éviter les manipulations post-amplification et de permettre l'observation en temps réel du processus d'amplification, la PCR en temps réel a été développée.

Principe :

Cette technique utilise des marqueurs fluorescents pour le suivi continu de la formation des amplicons tout au long de la réaction. L'intensité de la fluorescence de ces marqueurs fluorescents est étroitement liée à la quantité de produits d'amplification. Les marqueurs fluorescents les plus courants comprennent des colorants d'intercalation d'ADN non spécifiques tels que le SYBR Green [70], des sondes oligonucléotidiques spécifiques de la séquence cible [71] et des amorces fluorogènes à transfert d'électrons photo-induits (TEP) [72]. Elle implique l'amplification du gène du parasite, la détection dans le même tube fermé, et un suivi en temps réel de l'évolution de la réaction.

Une PCR multiplex en temps réel a été introduite pour le diagnostic du paludisme par Rougemont et al. [72], dans laquelle un ensemble d'amorces génériques (plasmo1 et plasmo2) a été conçu pour cibler une région hautement

conservée du gène de l'ARNr 18S du genre Plasmodium pour l'amplification ; l'ensemble d'amorces était suffisamment polymorphe en interne pour concevoir quatre sondes spécifiques de l'espèce, l'étiquette fluorescente, pour *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*.

Intérêts :

LA PCR en temps réel fournit un résultat semi-quantitatif, différencie les espèces, et peut être réalisée en 1 heure (sans compter les 30 minutes de préparation de l'échantillon), contre plus de 6 heures pour la PCR conventionnelle et la PCR nichée.

Elle présente également un risque moindre de contamination, car les récipients d'amplification sont fermés et l'amplification et la détection se déroulent simultanément dans le même récipient.

c- La Transcriptase inverse PCR

+ Principe :

La RT-PCR se déroule en deux phases :

Une première phase correspond à la copie d'ARN messager en ADN complémentaire (ADN) et une seconde phase correspond à une réaction PCR classique sur l'ADN synthétisé.

+ Limite :

La RT-PCR comme tous les tests basés sur l'ARN sont généralement très exigeants en termes d'installations et de techniques car ils reposent sur la purification de l'ARN et la transcription inverse, et la labilité de l'ARN par

rapport à la durabilité de l'ADN décourage également ces tests pour une utilisation clinique [73].

d- La CLIP PCR :

Cross-Linking Immunoprécipitation and PCR

Cette méthode développée par Cheng et al atteint la sensibilité de la RT-PCR en éliminant le recours à la purification de l'ARN et à la transcription inverse.

+ Principe :

l'ARNr 18S est libéré du sang, puis capturé sur des plaques à 96 puits et quantifié par la quantité de sondes ligaturées qui s'y lient de manière continue [68]. Elle est à haut débit grâce à son format de plaque à 96 puits, et peut être réalisée directement à partir d'environ 20 µL de sang total ou de taches de sang séché.

+ Avantages :

Cette technique a une limite de détection de 0.01 parasite/ µL

Plusieurs échantillons sont testés ensemble réduisant le coût du test

B. Techniques d'amplification isotherme

Malgré tous les progrès significatifs réalisés par la PCR ces dernières années, il est encore difficile d'adopter cette technologie pour les tests au point de service, en grande partie parce qu'elle dépend d'un équipement de laboratoire et d'une source d'énergie coûteuse pour obtenir les meilleures performances, et parce que son délai d'exécution est relativement long.

Les techniques d'amplification isothermique ont le potentiel pour le diagnostic de terrain de l'infection palustre. Elles éliminent le besoin d'une analyse

coûteuse et ces technologies ne nécessitent pas de thermocycleurs à forte consommation d'énergie et produisent des résultats en peu de temps (30 minutes à 1 heure). Ces technologies comprennent l'amplification isotherme médiée par boucle (LAMP) et l'amplification basée sur la séquence d'acide nucléique (NASBA). [74]

B-1 LAMP.

a- Principe.

La technique LAMP est une méthode moléculaire rapide qui permet l'amplification de l'ADN dans des conditions isothermes. [75]

Elle utilise une ADN polymérase à forte activité de déplacement de brin et 2 ou 3 séries d'amorces spécialement conçus pour reconnaître 6 à 8 séquences distinctes du gène cible.

Le brin déplacé forme une structure tige-boucle à l'extrémité 5' et l'amorce inverse peut s'hybrider à ce brin à l'extrémité 3'.

Un nouveau brin d'ADN est généré avec une structure tige-boucle aux deux extrémités et l'ADN structuré en haltère entre dans le cycle d'amplification exponentiel.

Les séquences cibles sont amplifiées dans un tube unique en moins d'une heure à une température constante de 60-65 °C, en utilisant un équipement de base tel qu'un bain-marie ou un bloc thermique.

Les produits amplifiés sont visualisés simplement sur un gel d'agarose ou par une augmentation de la turbidité ou encore par fluorescence à l'aide de colorants fluorescents intercalaires comme le SYBR Green. [76]

La méthode LAMP a été adoptée pour le dépistage de *P. falciparum* en 2006 par Poon et al, pour éviter de dépendre d'un turbidimètre et d'autres équipements de laboratoire. [77]

Plusieurs techniques LAMP ont été utilisées mais la dernière en date (illumigene) permet de détecter toutes les 5 espèces plasmodiales y compris *P. knowlesi* avec des densités parasitaires de l'ordre de 1 parasite/microlitre de sang.

b- Procédure de la technique LAMP (illumigene)

La LAMP utilise des amorces conçues spécialement pour donner une amplification de l'ADN dans des conditions isothermiques. Le test développé ici, a pour cible une région du génome du plasmodium conservé au sein des Plasmodiums humains. Le kit a pour cible une séquence d'ADN mitochondriale non codante de 214 pb. Le dérivé de l'amplification est constitué du pyrophosphate de magnésium qui donne une solution trouble.

Les caractéristiques de l'absorbance sont détectées et interprétées par un système incubateur-lecteur. Le changement des caractéristiques d'absorbance dû au précipité indique la présence de la séquence d'ADN cible. Il existe deux protocoles : S-PREP et M- PREP qui tous les 2 utilisent le sang total recueilli sur tube contenant de l'EDTA. [25]

c- Sensibilité du Test illumigene-Malaria

Il permet de détecter tous les stades parasitaires (formes asexuées et gamétocytes) de toutes les espèces plasmodiales humaines : *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale*, *P.malariae*, et *P.knowlesi*, avec une sensibilité variant de 0,2 parasite/ μ l pour *P.falciparum* à 0,06 parasite/ μ l pour *P.vivax*. [25]

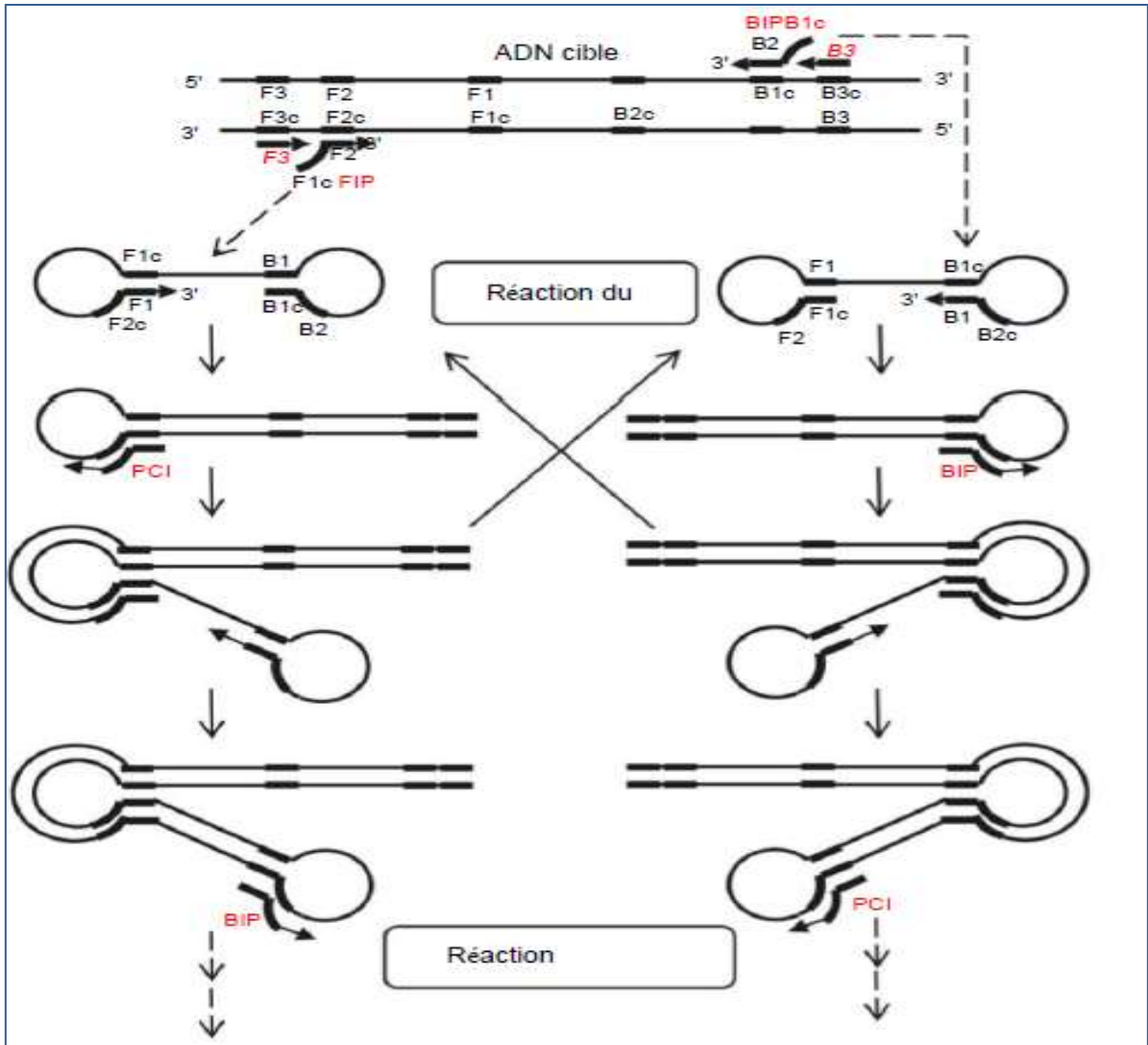


Figure 33: Représentation schématique du mécanisme LAMP. [78]

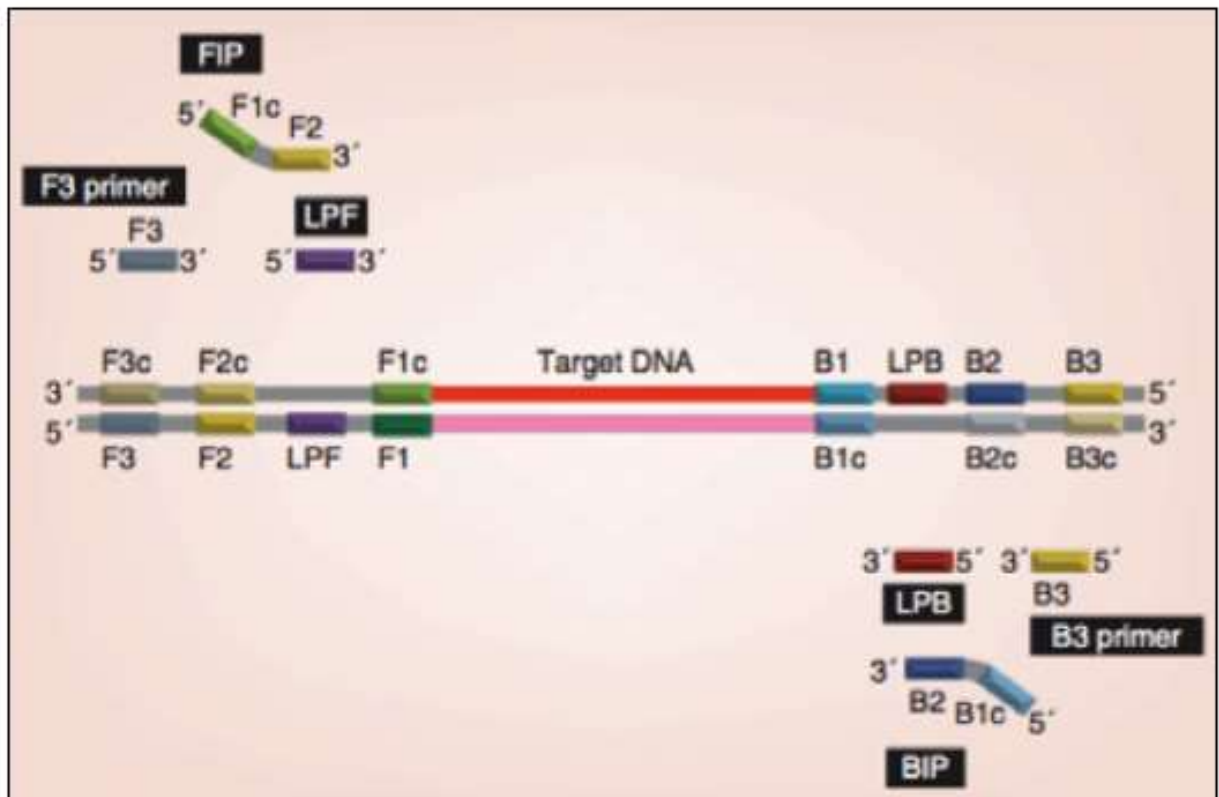


Figure 34: Principe de la méthode LAMP illumigene. [25]

B-2 NASBA

L'amplification quantitative basée sur la séquence d'acide nucléique (QT-NASBA) utilise l'ARN plutôt que l'ADN pour l'amplification.

Elle permet d'obtenir une sensibilité et une spécificité élevées, avec une faible limite de détection comparable aux méthodes PCR. Bien que les plateformes QTNASBA soient assez fréquemment utilisées pour le dépistage du VIH, elles ne sont qu'occasionnellement utilisées pour le dépistage du paludisme.

Principe :

La NASBA a été appliquée pour la première fois à la détection des parasites du paludisme en 1997, sur la base de l'amplification de l'ARNr 18S[173]. Par la suite, différentes versions quantitatives (QT-NASBA) ont été développées [174,175].

Les tests QT-NASBA ont été utilisés pour détecter différentes espèces de Plasmodium et des parasites submicroscopiques chez les patients fébriles [176-178]. Étant donné que les gamétocytes peuvent être différenciés en fonction des transcriptions d'ARNm spécifiques du stade sexuel, les tests QT NASBA ont été conçus et largement utilisés pour la détection, la classification et la quantification des gamétocytes [179,180].

Avantages :

*Détecent les formes asexuées du paludisme et présente une limite de détection de 0.01-1 parasite/ μ L. [79] [80]

*Cette technique n'a pas besoin d'un équipement de cyclage thermique, elle est plus rapide (~1 heure) que les tests PCR, utilise une procédure de préparation

d'échantillon plus simple, peut être utilisée avec de plus petits volumes de sang et n'est pas sujette à des erreurs de manipulation.

*Efficace pour la surveillance du traitement

✚ Inconvénient :

*Coût élevé des équipements nécessaires

*La technique NASBA représente une alternative attrayante à la PCR et à son utilisation dans le diagnostic du paludisme, mais des recherches supplémentaires sont nécessaires pour réduire les coûts et en faire une technologie facile à utiliser sur le terrain. [81]

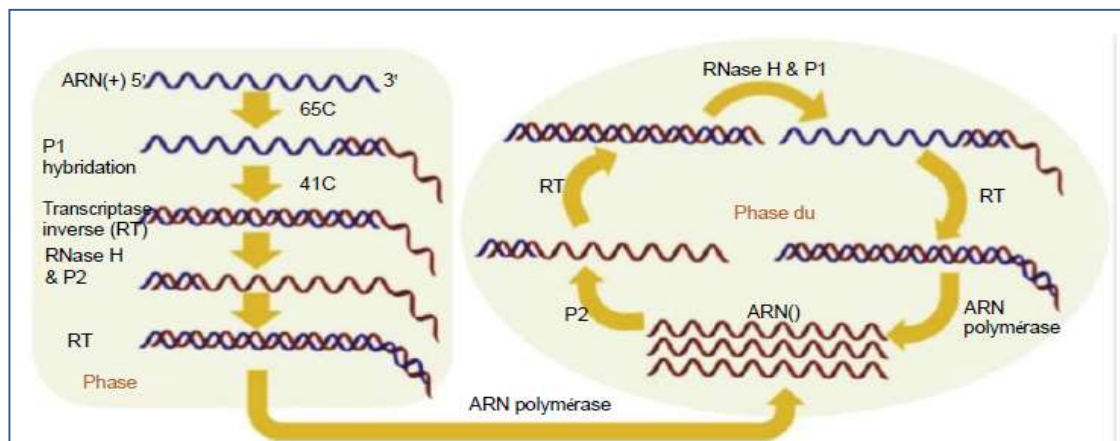


Figure 35: Représentation schématique de l'amplification NASBA. [82]

II-2 METHODES EN COURS DE DEVELOPPEMENT

A. La cytométrie en flux :

La cytométrie en flux a été initialement développée dans les années 1950, elle consiste à faire le tri et la mesure par laser de divers paramètres de plusieurs milliers de cellules par seconde dans un flux rapide. [83]

Cette technique permet d'évaluer la parasitémie sanguine après coloration spécifique de l'acide nucléique (ADN) des parasites, en profitant du fait que les globules rouges circulants normaux manquent d'acides nucléiques, tandis que les réticulocytes ne contiennent que de l'ARN. La parasitémie dans les échantillons de sang peut donc être déterminée en comptant et en comparant le rapport des globules rouges qui se colorent positivement pour l'ADN au nombre total de globules rouges analysés. [83]

Avantage :

Elle devient particulièrement importante pour l'étude de la croissance et de l'invasion des parasites du paludisme en raison de la vitesse et de la quantité d'informations qu'elle fournit

Inconvénients :

La cytométrie en flux est une approche très sophistiquée pour détecter avec précision les parasites du Plasmodium, mais l'équipement peut être coûteux et peut nécessiter d'être utilisé et soigneusement entretenu par un personnel qualifié pour assurer un diagnostic approprié.

La présence de réticulocytes pourrait être confondue avec un parasite si l'on n'utilisait pas de colorations spécifiques à l'ADN.

Une autre approche prometteuse dans la détection des parasites Plasmodium est la cytométrie en flux photoacoustique in vivo et non invasive (PAFC), qui irradie les érythrocytes circulants directement dans les vaisseaux périphériques à travers la peau en utilisant des faisceaux laser linéaires focalisés ainsi que des ondes photoacoustiques induites par le laser ou de la lumière fluorescente qui sont détectées par des transducteurs à ultrasons et des photo détecteurs respectivement. [103]

B. Diagnostic spécifique du plasmodium à l'aide d'un aptamère paludique.

Les aptamères, ou "anticorps chimiques", sont des oligonucléotides courts et monocaténares, tels que l'ADN, l'ARN ou des molécules synthétiques d'acides nucléiques synthétiques, obtenus par des techniques d'évolution in vitro et définis par une haute affinité ainsi qu'une grande spécificité pour interagir avec toute cible correspondante souhaitée en se repliant en structures tertiaires distinctes. [84] [85]

L'application diagnostique d'aptamères peut être avantageuse parce que les oligonucléotides sont peu coûteux, faciles à synthétiser, ont une grande stabilité dans des conditions environnementales difficiles, et peuvent être stockés sans dégradation fonctionnelle. [86]

La sélection de l'aptamère idéal commence généralement par une bibliothèque aléatoire d'oligonucléotides qui est incubée avec la molécule cible, suivie de cycles de sélection par affinité et d'étapes d'amplification par PCR afin de déterminer la séquence présentant la plus grande affinité. Plusieurs aptamères ont déjà été commercialisés à ce jour. [85]

Jusqu'à présent, divers aptamères ciblent des protéines de parasites Plasmodium, telles que pLDH, la mobilité rapide du Groupe Box 1 (HMGB1), PfEMP1 et pGDH ont été testées. [84] [87] [88]

L'avenir nous dira si la flexibilité chimique des aptamères peut être exploitée pour optimiser la liaison et la stabilité dans le sang, le plasma ou les échantillons, mais les aptamères représentent une approche très prometteuse pour le diagnostic du paludisme. [89]

C. Diagnostic par des méthodes non sanguines

Le prélèvement de sang à des fins de diagnostic peut être difficile dans les zones endémiques.

Les fluides corporels tels que la salive et l'urine ou les matières fécales représentent une bonne alternative car ils peuvent être obtenus de manière non invasive et testés pour rechercher la présence de parasites de Plasmodium en utilisant différents marqueurs et approches techniques tels que la PCR, la PCR nichée, et immunochromatographique. [90] [91]

La réussite de la détection de l'ADN ou des protéines de Plasmodium dépend de leur concentration dans le liquide corporel choisi pour la détection.

C-1 Test basé sur la salive avec amplification d'acide nucléique

Ce diagnostic de paludisme basé sur la salive implique la détection du gène, ARNr 18S ou Gène de la dihydrofolate réductase de P. falciparum dans la salive à l'aide d'une réaction en chaîne par polymérase nichée.

La sensibilité et la spécificité de cette méthode vont de 86,36 % à 95 % et

la limite de détection pour cette méthode est de 1 à 10 parasites par μL de sang. [92]

Les tests basés sur la salive sont non invasifs et nécessitent moins de formation pour le personnel de santé pour la collecte d'échantillons. Cependant, la méthode implique toujours l'utilisation de la PCR et le personnel de santé aura besoin d'une formation avancée sur le protocole PCR réel. La procédure prend environ six heures, peut être un obstacle majeur à sa mise en œuvre. On peut estimer que le coût du test sera similaire à celui d'un test PCR à base de sang puisqu'il nécessite deux réactions PCR à l'aide d'un thermocycleur.

C-2 Détection de protéines de plasmodium basée sur la salive

Ce test basé sur la salive détecte la présence de Plasmodium protéines dans la salive d'une personne infectée avant même l'apparition des symptômes. Une étude menée au Nigéria a utilisé le kit suivant : La bandelette réactive OptiMAL-IT (RDT), pour détecter la pLDH dans la salive des enfants. La sensibilité du test utilisant la salive entière était de 77,9 %. [93]

Cependant, une étude au Mali a une sensibilité plus élevée de 97,2 % et une spécificité de 95,4 % par rapport à la microscopie. La limite de détection pour cette méthode est élevée à environ 1000 parasites par μL de sang. [94]

Dans une étude distincte menée au Cameroun, en Zambie et en Sierra Leone, un prototype de dosage immunologique à flux latéral (LFIA) a été développé pour détecter la présence de la protéine PSSP17, une protéine de gamétocytes femelles qui est vraisemblablement plus abondante dans les échantillons de salive. Le résultat est visible grâce à l'utilisation d'une lampe de poche à diode électroluminescente ultraviolette. Lorsque la lampe de poche est utilisée sur la

bandelette réactive, une fluorescence est émise et visible à l'œil nu. La limite de détection de la méthode est comprise entre 1 et 10 gamétocytes par μL de sang. Le test peut être complété entre 3 et 30 min. La sensibilité approximative de la méthode chez les patients symptomatiques était de 83 % par rapport à la PCR comme référence absolue. [114]

Le diagnostic basé sur la salive dans la méthode non invasive et la méthode pLDH utilisée est similaire à celui des TDR basés sur le sang. La sensibilité varie et les résultats des tests doivent être confirmés par microscopie. La limite de détection est également trop élevée et des recherches supplémentaires doivent être menées pour l'améliorer jusqu'à une plage acceptable.

C-3 Test de paludisme à base d'urine

Les tests urinaires de paludisme impliquent la détection de Plasmodium protéine HRP2. Un test disponible dans le commerce, connu sous le nom de test urinaire de paludisme (UMT), est le seul test de paludisme non sanguin qui a fait l'objet d'un essai complet d'évaluation avant commercialisation, son processus est simple, il implique le prélèvement d'environ 5 gouttes (100-200 μl) d'urine, et de tremper cet échantillon dans le test et de lire les résultats après 10 minutes. Le résultat est lu visuellement : une ligne indique l'absence de paludisme et deux lignes indiquent le paludisme. Le produit de première génération ne détecte que *P. falciparum* ; un produit de deuxième génération qui détectera à la fois le paludisme à *P. falciparum* et à *P. vivax* est en cours de développement. [95]

Des essais cliniques multicentriques menés au Nigeria avec des patients fébriles et apyrétiques, en utilisant l'UMT, ont confirmé la sensibilité et la spécificité de la méthode à 79 % et 89 %, respectivement, par rapport au kit du test BinaxNOWMalaria. La sensibilité et la spécificité ont augmenté à 93 % et 83 %, respectivement.

respectivement, lorsqu'elles sont utilisées chez les enfants fébriles de moins de cinq ans. La limite de détection pour ce test est de 125 parasites/ μ L, et chaque test coûte environ 1,50 \$. [95]

Le test urinaire du paludisme ne nécessite pas d'équipement coûteux ou de personnel hautement qualifié, mais sa limitation est qu'il ne détecte que pHRP-2 à partir de l'espèce *P. falciparum*.

D. La Spectroscopie

La spectroscopie implique l'absorption de longueurs d'onde particulières de rayonnement électromagnétique (EMR) (par exemple la lumière) par des molécules dans un échantillon. La façon dont différentes molécules interagissent avec longueurs d'onde particulières de l'EMR est unique et fournit des informations sur les caractéristiques des molécules. Ces informations sont utilisées pour classer et caractériser l'échantillon.

D-1 Technologies de spectroscopie en développement.

SpectraWave et SpectraNet :

Claro Scientific a développé un Système de diagnostic POC basé sur la technologie de profilage optique avec un produit sans réactif. Le système a une large application, cependant, en réponse au besoin d'améliorer le diagnostic du Paludisme , Claro a développer un système de diagnostic du paludisme et de numération sanguine complète.

Ce système de diagnostic combine deux technologies :

1. l'instrument SpectraWave pour préparation d'échantillons, analyse spectrale multidimensionnelle (MDS) et transmission des fichiers de données de l'échantillon.

2. SpectraNet un logiciel informatique et un système de base de données qui analyse, interprète et stocke les données de l'échantillon et fournit les résultats de l'analyse.

La technologie présente le grand avantage de collecter jusqu'à 1 million de données quantitatives de l'échantillon. Le logiciel analyse ensuite le profil de l'échantillon à l'aide d'un modèle d'interprétation.

Le processus de réalisation d'un test de paludisme implique la collecte d'une piqûre de sang, l'échantillon est directement injecté dans l'appareil et dilué avec une solution saline. Le système fonctionne sans réactifs et en cinq minutes, il fournit des résultats quantitatifs.

Les premières études ont démontré une limite de détection de 200 parasites/ μ l.
[96]

D-2 Technologie Spectraphone

La technologie de QuantaSpec est un système de détection moléculaire qui, basé sur une évaluation de laboratoire, devrait atteindre une sensibilité et une spécificité bien supérieures à celles de la microscopie, avec une limite de détection comparable aux tests basés sur la PCR. Ce test a été développé sur un système de spectroscopie infrarouge sophistiquée et coûteuse en laboratoire. La méthode de test nécessite la préparation d'un frottis sanguin fin coloré au Giemsa à partir d'un échantillon de sang prélevé par piqûre au doigt sur une lame de verre dotée d'un revêtement infrarouge réfléchissant spécial

(Similaire à la microscopie). La lame est insérée dans un instrument qui mesure le spectre infrarouge de l'échantillon sur la lame.

L'analyse des données générées par l'échantillon repose sur le principe que chaque molécule a une signature infrarouge unique, ce qui signifie que certaines

longueurs d'onde de la lumière sont absorbées ou réfléchies. Un algorithme informatique est appliqué pour interpréter automatiquement le spectre infrarouge de l'échantillon et fournir un résultat à l'opérateur de test. Des algorithmes ont été développés pour classer l'échantillon comme positif pour le paludisme, différencier *P. falciparum* et *P. vivax*, et différencier les espèces sensibles à la chloroquine et résistantes à la chloroquine. [96]

E. Méthodes de détection d'Hémozoïne parasitaire :

Plusieurs nouvelles plateformes basées sur la détection de l'hémozoïne sont en développement pour le diagnostic du Paludisme.

L'hémozoïne a été découverte et liée au paludisme dans les années 1800, mais n'a jamais été utilisée comme moyen principal de diagnostic du paludisme. Bien qu'il soit possible de voir l'hémozoïne à certaines étapes du cycle de vie du parasite en utilisant la microscopie, il n'est pas toujours détectable par microscopie traditionnelle. Les technologies décrites ci-dessous tirent parti des propriétés uniques de l'hémozoïne, notamment ses propriétés optiques (les cristaux d'hémozoïne diffusent et dépolarisent la lumière d'une manière unique et différemment d'un globule rouge) et des propriétés magnétiques (il est légèrement magnétique en raison de sa dérivé de l'hémoglobine contenant du fer).

E-1 Analyseurs hématologiques

Les analyseurs d'hématologie sont principalement utilisés pour effectuer des numérations globulaires complètes, Ce sont de grands instruments de laboratoire largement disponibles dans les laboratoires des pays développés.

Bien qu'ils ne soient pas spécifiquement conçus pour détecter le paludisme, plusieurs groupes ont exploré l'utilisation d'analyseurs d'hématologie automatisés pour la détection du paludisme.

Les analyseurs d'hématologie sont largement utilisés et le coût par test est comparable à celui d'autres examens de laboratoire courants. Malgré ces avantages, la validation et l'adoption du diagnostic du Paludisme à l'aide d'analyseurs hématologiques est limité. Ceci est dû à de nombreux facteurs, y compris : la performance variable; le coût des analyseurs automatisés (plusieurs dizaines de mille dollars); la taille et la complexité du fonctionnement de ces instruments ; et la nécessité de développer des algorithmes pour identifier et classer les anomalies indicatives du paludisme, permettant interprétation automatisée des résultats. [96]

E-2 Technologies en cours de développement pour la détection de l'hémozoïne.

✚ Le DFxP :

L'appareil, appelé Dark-Field Cross Polarization (DFxP), détecte l'hémozoïne, combine, optimise et automatise deux méthodes de microscopie : le fond noir et la microscopie à polarisation croisée. Les deux méthodes existent depuis des années, mais aucune n'a été largement déployé pour le diagnostic du paludisme. Le DFxP présente plusieurs avantages : Il utilise le traitement d'image par un logiciel et produit des images automatisées de l'hémozoïne qui sont beaucoup plus faciles à interpréter, et contrairement aux méthodes microscopiques qui nécessitent la préparation d'un échantillon de sang sur lame de verre et fixation, le DFxP ne nécessite aucune préparation d'échantillon. Il consiste seulement à

introduire dans l'appareil un échantillon de sang prélevé par piqûre du doigt, le microscope DFxP examine plusieurs et différents champs de vision à l'aide d'un illuminateur à champ sombre et de polariseurs croisés. Ensuite un logiciel de traitement d'image identifie et quantifie les cristaux d'hémozoïne présents dans l'échantillon. [96]

Caractéristiques du test :

- L'appareil fournit un résultat quantitatif mais ne différencie pas les espèces.
- La limite de détection des globules rouges infectés est de 1-5 par million, ce qui équivaut à une parasitémie de 5-25/ μ l.
- Le délai de traitement est de moins de 3min et permet le scanne d'une centaine d'échantillons par jour.
- Le dispositif n'utilise pas de réactifs, et il est censé être très stables dans des conditions chaudes et humides.

La technologie magnéto optique (MOT)

Développé par l'université d'Exeter au royaume unis, Le MOT est conçu pour être un appareil POC robuste et portable, suffisamment simple pour être utilisé par un agent de santé peu qualifié et suffisamment bon marché pour concurrencer la microscopie et les TDR.

L'appareil de première génération utilise des échantillons de sang prélevés au doigt pour détecter l'hémozoïne. La technologie consiste à appliquer un champ magnétique à un échantillon, provoquant l'alignement de tous les cristaux des

hémozoïne présents (en l'absence de champ magnétique, les cristaux d'hémozoïne s'orientent au hasard). Le dispositif MOT utilise ensuite des lasers polarisés pour comparer la transmittance de la lumière avant et après l'application du champ magnétique à l'échantillon. Un photo-détecteur dans l'appareil mesure le changement de transmittance de la lumière et un microprocesseur interprète le changement de lumière et fournit le résultat à l'opérateur de test. [96]

Caractéristiques du test :

- Le résultat est qualitatif et ne permet pas le diagnostic d'espèce.
- L'appareil quantifie également la teneur en hémozoïne, qui, d'après des études préliminaires en laboratoire, est corrélée aux niveaux de parasitémie.
- La sensibilité est $> 90\%$ et la spécificité est de 100%
- Le délai de traitement est une minute, un échantillon traité à la fois.

III. COMPARAISON DES PRINCIPALES METHODES DE DIAGNOSTIC DU PALUDISME

Techniques	Détection Qualitative	Diagnostic d'espèces	Quantitative	Stades parasitaires	Seuil de détection (parasites/ μ l)	Délai de réponse	Suivi
Frottis sanguin	Oui	Oui	Oui	Oui	100	Moins de deux heures	Oui Contrôles à J3, J7 et J28 La présence de gamétocytes ne signe pas un échec thérapeutique, ces formes non pathogènes n'étant pas la cible des antipaludiques
Goutte épaisse	Oui	Difficile	Oui	Oui	10	Moins de deux heures	
QBC malaria test®	Oui	/	/	/	10	10-15 minutes	Non recommandé
TDR PfHRP2	Oui	Oui	/	/	100	15-20 minutes	Non recommandé PfHRP2 reste présente dans le sang 28 jours après le traitement.
TDR Aldolase	Oui	+/-	/	/	100	15-20 minutes	Non recommandé
TDR pLDH	Oui	+/-	/	/	100	15-20 minutes	Non recommandé Sauf si microscopie non disponible (élimination dans le sang en cinq à six jours)
LAMP	Oui	/	/	/	0,2 à 2	40 minutes	Non recommandé
PCR	Oui	Oui	/	/	1 à 0,005	Plus de deux heures	Non recommandé Reste positive jusqu'à 30 jours après traitement

Tableau XI : Comparaison des techniques de recherche du paludisme. [54]

IV. RECOMMANDATIONS

- Les dernières recommandations dans le diagnostic du Paludisme fournissent aux laboratoires un schéma clair des techniques à mettre en place (figure 35).
- Le diagnostic devrait en premier lieu 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.[97]
- En pratique, 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 oeuvre.
- 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. La biologie moléculaire sera utilisée dans les centres de référence pour confirmation du résultat (pauci-infection, identification d'espèce ou recherche d'association d'espèces) ou si des discordances sont mises en évidence. [97]
- Tout diagnostic positif doit être communiqué immédiatement et directement au clinicien prescripteur, et tracé par le laboratoire.
- La sérologie ne figure pas dans ce logigramme de recherche de paludisme en urgence. En effet, l'apparition tardive des anticorps anti-trophozoïtes, en général postérieure de dix jours à la crise aiguë, ne lui confère aucun intérêt en situation d'urgence. Elle se révèle cependant utile dans certaines situations : Confirmation rétrospective du diagnostic de paludisme chez un patient ayant pris un traitement

en l'absence de diagnostic biologique, dépistage prétransfusionnel ou avant un don d'organe (recherche de porteurs asymptomatiques), la recherche de paludisme viscéral évolutif chez les adultes et les enfants et enquêtes épidémiologiques dans les zones d'endémie. [54]

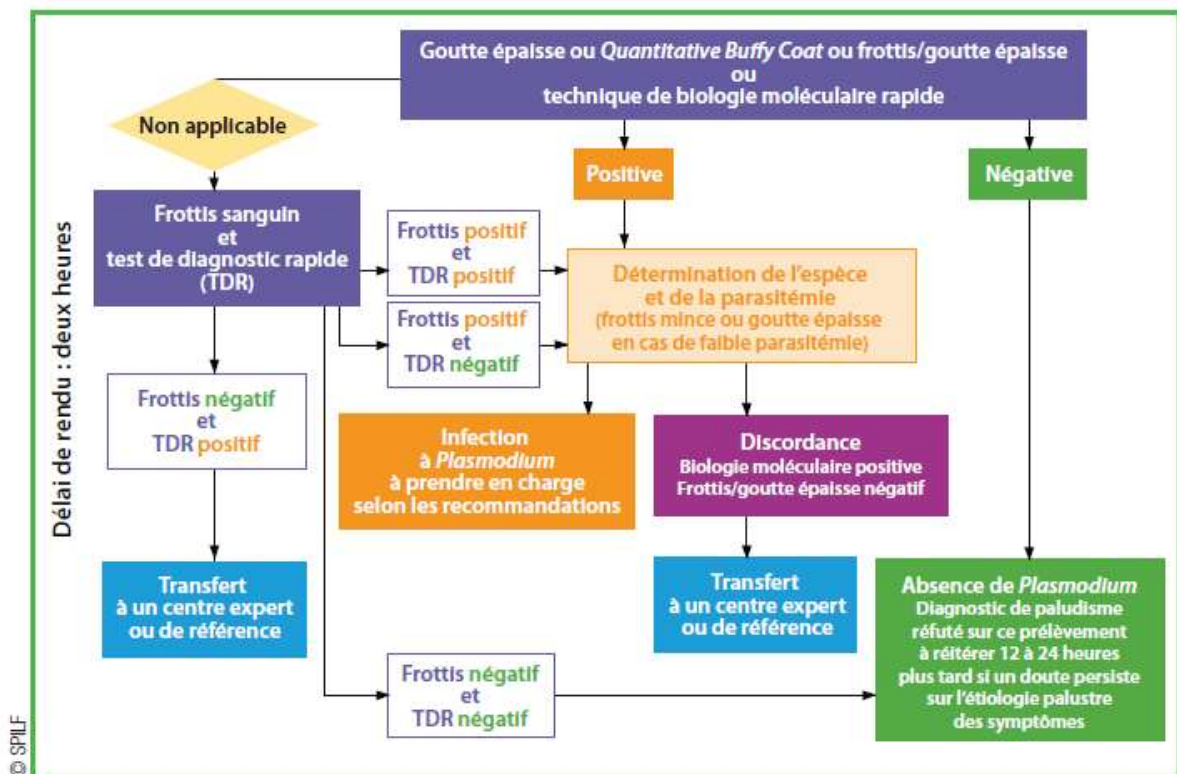


Figure 36: Logigramme du diagnostic du paludisme. [54]



Conclusion



Le Paludisme reste l'une des maladies les plus répandues et mortelles dans le monde, et représente donc un fléau mondial.

Le diagnostic du paludisme est essentiellement parasitologique. Le rôle du biologiste est capital car un résultat faussement négatif peut faire courir un risque vital au patient en retardant le traitement d'une pathologie grave. Un diagnostic rapide et fiable est par conséquent, une nécessité impérative pour tous les laboratoires d'analyses médicales.

L'identification des espèces est primordiale du point de vue thérapeutique et pronostique principalement en raison des résistances associées à *P. falciparum* et des complications graves qu'il peut entraîner.

Au vu des avantages et limites des différentes techniques disponibles, l'examen microscopique du FS et de la GE reste la technique de référence à pratiquer en première intention. Il permet d'obtenir un diagnostic de certitude dans des délais compatibles avec l'urgence représentée par la maladie. Les tests antigéniques, récemment développés, représentent un appoint intéressant à la démarche diagnostique particulièrement pour les laboratoires non spécialisés. Ils ne peuvent cependant, en aucun cas se substituer aux techniques microscopiques classiques. Le QBC est une technique simple, fiable et rapide mais présente l'inconvénient d'être exigeante en matériel. Les techniques de biologie moléculaires sont d'un grand apport surtout en cas de difficultés de confirmation microscopique liées à de faibles parasitémies et qui permettent également l'identification des espèces en cause.

Cependant, plusieurs nouvelles méthodes qui ne nécessitent pas une grande expertise technique sont maintenant disponibles ou en cours de développement, malgré qu'une confirmation supplémentaire par examen microscopique soit nécessaire si les résultats du test sont positifs, et qu'ils présentent des problèmes tels que leurs couts élevés ou leurs disponibilités limités dans les laboratoires.



Résumés



RESUME

Titre : Méthodes de diagnostic du paludisme.

Auteur : HAYAD Ahmed Abdelmoutalib.

Mots clés : Paludisme - Diagnostic - Microscopie - Goutte épaisse- Frottis sanguin-TDR - PCR- LAMP -Nouvelles méthodes.

Le Paludisme est une maladie grave potentiellement mortelle en absence d'une prise en charge rapide et appropriée. Son diagnostic est une urgence médicale.

Différentes méthodes de diagnostics sont actuellement disponibles. L'examen microscopique d'un frottis sanguin et d'une goutte épaisse demeure la méthode de référence en termes de sensibilité et de spécificité.

Les TDR détectant les antigènes plasmodiaux sont simples, rapides et n'exigent pas de compétences particulières. En revanche, leurs performances sont dépendantes de la parasitémie du sujet infecté. Ces tests doivent donc être considérés complémentaires.

L'amplification génique par PCR est actuellement la technique la plus sensible. Néanmoins, c'est une technique longue et onéreuse. Son indication se justifie principalement en cas de difficulté du diagnostic microscopique.

les méthodes isothermes, comme la LAMP et le NASBA pourraient constituer une approche intéressante et alternative à la PCR dans le futur.

Les méthodes sérologiques n'ont qu'une place limitée dans le diagnostic du paludisme viscéral évolutif.

Les tests non invasifs telles que le test basé sur la salive avec amplification d'acide nucléique, le test de détection de protéines plasmodiales basé sur la salive, et le TDR à base d'urine, font partie des tests récents qui pourrait jouer un rôle important dans le diagnostic du Paludisme.

Les nouvelles méthodes alternatives ou en cours de développement qui permettent d'améliorer les performances sont soit coûteuses, soit plus longues, soit nécessitent un niveau d'expertise qui les rend inadaptées aux applications au point-of-care. Ces lacunes nécessitent l'exploration de techniques de détection plus efficaces avec le potentiel d'applications au point-of-care, en particulier dans des contextes où les ressources sont limitées.

SUMMARY

Title : Methods of malaria diagnosis

Author : HAYAD Ahmed Abdelmoutalib.

Key words : Malaria - Diagnosis - Microscopy - Thick drop - Blood smear- TDR - PCR- LAMP - New methods

Malaria is a serious disease potentially fatal in the absence of a rapid and appropriate management. Its diagnosis is a medical emergency.

Different diagnostic methods are currently available. The microscopic examination of a blood smear and a thick drop remains the reference method in terms of sensitivity and specificity.

RDTs detecting plasmodial antigens are simple, rapid and do not require special skills. However, their performance is dependent on the parasitaemia of the infected subject. These tests should therefore be considered complementary.

Gene amplification by PCR is currently the most sensitive technique. Nevertheless, it is a long and expensive technique. Its indication is mainly justified in case of difficulty of microscopic diagnosis.

Isothermal methods, such as LAMP and NASBA could be an interesting alternative approach to PCR in the future.

Serological methods have only a limited place in the diagnosis of progressive visceral malaria.

Non-invasive tests such as the saliva-based nucleic acid amplification test, the saliva-based plasmodial protein test, and the urine-based RDT are among the recent tests that could play an important role in malaria diagnosis.

New alternative methods or methods under development that improve performance are either costly, time consuming, or require a level of expertise that makes them unsuitable for point-of-care applications. These shortcomings necessitate the exploration of more effective detection techniques with the potential for point-of-care applications, particularly in resource-limited settings.

ملخص

العنوان : طرق تشخيص الملاريا.

تأليف : هياض أحمد عبد المطلب.

الكلمات المفتاحية: الملاريا - التشخيص - الفحص المجهرى - الدم مسحة السمكة القطرة-- PCR -DRT - LAMP - طرق جديدة.

الملاريا مرض خطير يهدد الحياة بدون علاج سريع ومناسب. تشخيصه هو حالة طبية طارئة.

تتوفر حاليًا أساليب تشخيص مختلفة. يظل الفحص المجهرى لمسحة الدم والطبقة السمكة المعيار الذهبي من حيث الحساسية والنوعية.

اختبارات التشخيص السريع التي تكشف عن مستضدات البلازموديوم بسيطة وسريعة ولا تتطلب مهارات خاصة. من ناحية أخرى، فإن أداؤها يعتمد على تطفل الدم لدى الشخص المصاب. لذلك يجب اعتبار هذه الاختبارات مكتملة.

بعد تضخيم الجينات بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) أكثر التقنيات حساسية حاليًا. ومع ذلك، فهي تقنية طويلة ومكلفة. دلالاته لها ما يبررها بشكل رئيسي في حالة صعوبة التشخيص المجهرى.

يمكن أن تكون الطرق المتساوية الحرارة، مثل LAMP و NASBA نهجًا مثيّرًا للاهتمام وبدلاً لـ PCR في المستقبل.

المتطورة الحشوية الملاريا تشخيص في فقط محدود مكان لها المصلية الاساليب

الاختبارات غير الغازية مثل الاختبار يعد تضخيم الحمض النووي القائم على اللعاب ، واختبار الكشف عن بروتين البلازموديوم المعتمد على اللعاب ، واختبار RDT القائم على البول بعضًا من الاختبارات الحديثة التي قد تلعب دورًا مهمًا في تشخيص الملاريا.

الطرق البديلة أو المتطورة الجديدة التي تعمل على تحسين الأداء إما باهظة الثمن أو تستغرق وقتًا أطول، أو تتطلب مستوى من الخبرة يجعلها غير مناسبة لتطبيقات نقاط الخدمة. تتطلب هذه الثغرات استكشاف تقنيات كشف أكثر فاعلية مع إمكانية تطبيقات نقطة الخدمة ، لا سيما في المناطق محدودة الموارد.



Bibliographie



- [1] « **White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, et al.** Malaria. *Lancet Lond Engl.* 2014 Feb 22 ;383(9918):723–35. »
- [2] « **World Malaria Report 2020** | Medicines for Malaria Venture ». https://www.mmv.org/newsroom/publications/world-malaria-report-2020?gclid=Cj0KCQjwhr2FBhDbARIsACjwLo3m_g9Pa_dafKFm9xycBfYxgI4tSNjj4-VgWD7w7fuVTGw1oz1YkQaAgXzEALw_wcB.
- [3] **P. Ambroise-Thomas**, « La petite et la grande histoire du paludisme », *Bull. Académie Natl. Médecine*, vol. 191, n° 9, p. 1849-1858, déc. 2007, doi: 10.1016/S0001-4079(19)32879-1.
- [4] **T. APIDPM**, « Santé Maghreb - Revue de presse ». <http://www.santemaghreb.com/actus.asp?id=593> (consulté le mai 27, 2021).
- [5] « **Ministère de la Santé.** Santé en chiffres. Bilan des maladies parasitaires 2005- 2007. Rabat : DPRF, 2007. www.santé.gov.ma ».
- [6] **W. H. Organization**, « Morocco certified malaria-free = Le Maroc certifié exempt de paludisme », *Wkly. Epidemiol. Rec. Relevé Épidémiologique Hebd.*, vol. 85, n° 24, p. 235-236, 2010.
- [7] « **Ouardirhi A.** Journée mondiale du paludisme : Le Maroc indemne du paludisme autochtone en 2010. »,
- [8] « **Le Paludisme, Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL)**, 2014 [Internet]. Disponible sur: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf> ».
- [9] « **Institut national de sante publique du Québec (INSPQ)**, « Identification morphologique des parasites de la malaria », avril 2005 [En ligne]. <https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/372IdentificationMorphologiqueParasitesMalaria.pdf> ».
- [10] *Paludisme. Mycologie, Association Française des Enseignants de Parasitologie et. 2016.*
- [11] **A. H. Futura**, « Lutte contre le paludisme : les génomes des moustiques décryptés », *Futura*. <https://www.futura-sciences.com/sante/actualites/sequencage-adn-lutte-paludisme-genomes-moustiques-decryptes-56309/>.
- [12] « Paludisme. Agent pathogène - Base de données EFICATT - INRS ». https://www.inrs.fr/publications/bdd/eficatt/fiche.html?refINRS=EFICATT_Paludisme.

- [13] **N. Argy et S. Houzé**, « Épidémiologie et cycle parasitaire d'un fléau mondial, le paludisme », *Actual. Pharm.*, vol. 57, n° 574, p. 18-20, mars 2018, doi: 10.1016/j.actpha.2018.01.004.
- [14] « **White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT et al.** Malaria. *The Lancet*. 2014;383(9918):723-35. ».
- [15] **C. Danthu**, « Le paludisme, une symptomatologie aspécifique », *Actual. Pharm.*, vol. 57, n° 574, p. 21-24, mars 2018, doi: 10.1016/j.actpha.2018.01.005.
- [16] « **Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales (CMIT)**. E. Pilly. *Maladies infectieuses et tropicales*. Paris: *CMIT Alinéa Plus*; 2017. ».
- [17] « **GUIDE DE PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DU PALUDISME IMPORTE** », p. 20.
- [18] « **Chagnon A.** Contribution de certaines anomalies biologiques au diagnostic du paludisme. *Med Mal Infect*. 1999;29(Suppl 3):302–6.) »,
- [19] « Association française des enseignants et praticiens hospitaliers de parasitologie et mycologie médicales (ANOFEL), *Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales : Chapitre 5 « Paludisme »*, 6e édition, Elsevier Masson SAS - France, 2019 : 46–76 »,
- [20] « Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF), « *Prise en charge et prévention du paludisme d'importation* », *Mise à jour 2017 des recommandations pour la pratique clinique (RPC) 2007 : p 12.* »
- [21] « **Research Malaria Microscopy Standards Working Group.** Microscopy for the detection, identification and quantification of malaria parasites on stained thick and thin films. Geneva: World Health Organization, 2015. 39. **Dondorp AM, Desakorn V, Pongtavornpinyo W, et al.** Estimation of the total parasite biomass in acute falciparum malaria from plasma PfHRP2. *PLoS Med*. 2005 Aug;2(8):e204. ».
- [22] « **Stahl J-P.** *Prise en charge et prévention du paludisme d'importation à Plasmodium falciparum : recommandations pour la pratique clinique 2007 (texte long)*. 2007;91. ».
- [23] « **Thellier M, Datry A, Alfa Cissé O, et al.** Diagnosis of malaria using thick bloodsmears: definition and evaluation of a faster protocol with improved readability. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002 Mar ;96(2):115–24. ».
- [24] **G. Desoubeaux et J. Chandénier**, « Diagnostic biologique du paludisme d'importation », *Rev. Francoph. Lab.*, vol. 2017, n° 497, p. 34-43, déc. 2017, doi: 10.1016/S1773-035X(17)30412-4.

- [25] « GUIDE-NATIONAL-DE-DIAGNOSTIC-BIOLOGIQUE-DU-PALUDISME.pdf ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.pnlp.sn/wp-content/uploads/2018/02/GUIDE-NATIONAL-DE-DIAGNOSTIC-BIOLOGIQUE-DU-PALUDISME.pdf>
- [26] « Preparation of Peripheral Blood Smear - The Thin & Thick Blood Smear | Hematology Practicals », *Paramedics World*, avr. 28, 2018. <https://paramedicsworld.com/hematology-practicals/preparation-peripheral-blood-smear/medical-paramedical-studynotes>.
- [27] **A. Norgan, H. Arguello, L. Sloan, E. Fernholz, et B. Pritt**, « A method for reducing the sloughing of thick blood films for malaria diagnosis », *Malar. J.*, vol. 12, p. 231, juill. 2013, doi: 10.1186/1475-2875-12-231.
- [28] « **Thellier M, Datry A, Alfa -Cissé O, San C, Billigui S, Silvie O, et al.** Diagnosis of malaria using thick bloodsmears:definition and evaluation of a faster protocol with improved readability. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 2002: 115–124 p.]. »,
- [29] **World Health Organization**, *Planches pour le diagnostic microscopique du paludisme*. Place of publication not identified: World Health Organization, 2011.
- [30] « Examen parasitologique du sang ». http://bioimage.free.fr/par_image/technique_sang.php .
- [31] **S/Abdessemed**, « Coloration et examen des frottis sanguins », [En ligne]. Disponible sur: <https://www.slideshare.net/salahabdessemed1/coloration-et-examen-des-frottis-sanguins-57848049>
- [32] « **W. R. Prescott, R. G. Jordan, M. P. Grobusch, V. M. Chinchilli, I. Kleinschmidt, J. Borovsky, M. Plaskow, M. Torrez, M. Mico, C. Schwabe**, *Malar. J.* 2012, 11, 155. ».
- [33] « **J. J. Pollak, A. Houry-Yafin, S. J. Salpeter**, *Front. Public Health* 2017, 5, 219. ».
- [34] « **K. Torres, C. M. Bachman, C. B. Delahunt, J. Alarcon Baldeon, F. Alava, D. Gamboa Vilela, S. Proux, C. Mehanian, S. K. McGuire, C. M. Thompson, T. Ostbye, L. Hu, M. S. Jaiswal, V. M. Hunt, D. Bell**, *Malar. J.* 2018, 17, 339. ».
- [35] **E. Masson**, « Diagnostic biologique du paludisme d'importation », *EM-Consulte*. <https://www.em-consulte.com/article/1184267/figures/diagnostic-biologique-du-paludisme-d-importation>.
- [36] « Malaria », *Diagnostic Parasitology*. <http://diagnosticparasitology.weebly.com/malaria.html>.

- [37] « Développement et Santé | Diagnostic parasitologique du paludisme ». <https://devsante.org/articles/diagnostic-parasitologique-du-paludisme>.
- [38] « Plasmodium knowlesi: A Malaria Parasite of Monkeys and Humans* **William E. Collins** Division of Parasitic Diseases and Malaria, Center for Global Health, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia ».
- [39] « diag_bio_palu.pdf ». [En ligne]. Disponible sur: https://www.infectiologie.org.tn/pdf_ppt_docs/cmi/sousse_01032012/diag_bio_palu.pdf
- [40] **L. Trudel, M. Couillard, et Laboratoire de santé publique du Québec**, *Identification morphologique des parasites de la malaria: cahier de stage*. Montréal, Qué.: Laboratoire de santé publique du Québec, 2005. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.deslibris.ca/ID/201312>
- [41] « **Peyron F.** Le diagnostic parasitologique du paludisme : techniques de laboratoire classiques et nouvelles. *Med Mal Infect 1999; 29 Suppl: 295-301.* ».
- [42] **B. Gitta et N. Kilian**, « Diagnosis of Malaria Parasites Plasmodium spp. in Endemic Areas: Current Strategies for an Ancient Disease », *BioEssays*, vol. 42, n° 1, p. 1900138, 2020, doi: 10.1002/bies.201900138.
- [43] « 7930_cli_sept08_p014_p25_reformatted.pdf ». [En ligne]. Disponible sur: https://druckerdiagnostics.com/wp-content/uploads/2017/05/7930_cli_sept08_p014_p25_reformatted.pdf
- [44] « **Dr Moyenga.** - ppt télécharger ». <https://slideplayer.fr/amp/468244/>.
- [45] « **Gay Traore B, Zanomi J, Danis M, Gentilinni.** Evaluation du système QBC pour le diagnostic du paludisme. *Santé 1994; 4: 289-297.* »,
- [46] **G. O. Adeoye et I. C. Nga**, « Comparison of Quantitative Buffy Coat technique (QBC) with Giemsa-stained thick film (GTF) for diagnosis of malaria », *Parasitol. Int.*, vol. 56, n° 4, p. 308-312, déc. 2007, doi: 10.1016/j.parint.2007.06.007.
- [47] « **Assimadi JK, Agbodjan-Djossou OA, Ayewada K et al.** Prise en charge du paludisme. *Développement et Santé. 2001 ; 153* »,
- [48] « **Talarmin F, Sicard JM, Mounem M, Verrot D, Husser JA.** Pludisme d'importation en Moselle: à propos de 75 cas en trois ans. *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et médicales Elsevier). Rev Méd Interne 2000, 21: 242-6.* »,
- [49] **G. P. Prashanth**, « Quantitative buffy coat (QBC) test for rapid diagnosis of malaria », *Eur. J. Pediatr.*, vol. 171, n° 1, p. 199-200; author reply 201-202, janv. 2012, doi: 10.1007/s00431-011-1589-0.

- [50] « **D. Lenz, P. G. Kremsner, B. Lell, B. Biallas, M. Boettcher, B. Mordmüller, A. A. Adegnika**, *Malar. J.* 2011, 10, 194. »
- [51] « Malaria rapid diagnostic test performance. Results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 3 (2010-2011) [Internet]. WHO. Available from: www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241502566/en/ ».
- [52] « **Gillet P, Scheirlinck A, Stokx J, et al** (2011) Prozone in malaria rapid diagnostics tests: how many cases are missed? *Malar J* 10:166 ».
- [53] « **OMS**. Tests diagnostiques rapides du paludisme, 2004. Accessible à : http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43395/1/929061188X_fre.pdf?ua=1 ».
- [54] « Groupe recommandations de la Société de pathologie infectieuse de langue française (SPILF). Prise en charge et prévention du paludisme d'importation. Mise à jour 2017 des RPC 2007. www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/2017-palu-texte-final.pdf ».
- [55] « Tests de diagnostic rapide du paludisme ».
https://www.cochrane.org/fr/CD008122/INFECTN_tests-de-diagnostic-rapide-du-paludisme.
- [56] « **OMS** (2016) Public announcement to rapid diagnostic test manufacturers, procurement agencies and national malaria control programmes. (en ligne) ».
- [57] **M. J. Kavanaugh, S. E. Azzam, et D. M. Rockabrand**, « Malaria Rapid Diagnostic Tests: Literary Review and Recommendation for a Quality Assurance, Quality Control Algorithm », *Diagnostics*, vol. 11, n° 5, p. 768, avr. 2021, doi: 10.3390/diagnostics11050768.
- [58] « **Hendriksen, I.C.E.; Mtove, G.; Pedro, A.J.; Gomes, E.; Silamut, K.; Lee, S.J.; Mwambuli, A.; Gesase, S.; Reyburn, H.; Day, N.P.J.; et al.** Evaluation of a PfHRP2 and a pLDH-based Rapid Diagnostic Test for the Diagnosis of Severe Malaria in 2 Populations of African Children. *Clin. Infect. Dis.* 2011, 52, 1100–1107. ».
- [59] « **Barber, B.E.; William, T.; Grigg, M.J.; Piera, K.; Yeo, T.W.; Anstey, N.M.** Evaluation of the Sensitivity of a pLDH-Based and an Aldolase-Based Rapid Diagnostic Test for Diagnosis of Uncomplicated and Severe Malaria Caused by PCR-Confirmed Plasmodium knowlesi, Plasmodium falciparum, and Plasmodium vivax. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51, 1118–1123. »
- [60] « Fig. 3 Two- and three-band (below) malaria rapid diagnostic tests... », *ResearchGate*. <https://www.researchgate.net/figure/Two-and-three-band->

below-malaria-rapid-diagnostic-tests-MRDTs-with-blood-transfer_fig3_51057521.

- [61] « PALUTOP®+4 Optima - Test rapide de paludisme by BIOSYNEX | MedicalExpo ». <https://www.medicaexpo.fr/prod/biosynex/product-67564-756555.html>.
- [62] « **Chiodini PL, Bowers K, Jorgensen P, et al** (2007) The heat stability of Plasmodium lactate dehydrogenase-based and histidinerich protein 2-based malaria rapid diagnostic tests. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101(4):331–7 »,
- [63] « **Jacobs J, Barbé B, Gillet P, et al** (2014) Harmonization of malaria rapid diagnostic tests: best practices in labelling including instructions for use. *Malar J* 13:505 »,
- [64] **H. Noedl**, « Malaria Diagnostic Platform, ELISA », in *Encyclopedia of Malaria*, M. Hommel et P. G. Kremsner, Éd. New York, NY: Springer New York, 2014, p. 1-6. doi: 10.1007/978-1-4614-8757-9_107-1.
- [65] « ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ». https://www.memobio.fr/html/immu/im_au_eli.html.
- [66] « **G. Snounou, et al.**, Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections, *Mol. Biochem. Parasitol.* 58 (2) (1993) 283–292. »,
- [67] « **M. Imwong, et al.**, High-throughput ultrasensitive molecular techniques for quantifying low-density malaria parasitemias, *J. Clin. Microbiol.* 52 (9) (2014) 3303–3309. »,
- [68] « **Z. Cheng, et al.**, Capture and ligation probe-PCR (CLIP-PCR) for molecular screening, with application to active malaria surveillance for elimination, *Clin. Chem.* 61 (6) (2015) 821–828. »,
- [69] « dg-infections-snc.pdf ». [En ligne]. Disponible sur: https://www.infectiologie.org.tn/pdf_ppt_docs/diaporama/inf_virales/dg-infections-snc.pdf
- [70] « **J.C. Polanco, et al.**, Plasmodium vivax: parasitemia determination by real-time quantitative PCR in Aotus monkeys, *Exp. Parasitol.* 100 (2) (2002) 131–134. »,
- [71] « **F. Perandin, et al.**, Development of a real-time PCR assay for detection of Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, and Plasmodium ovale for routine clinical diagnosis, *J. Clin. Microbiol.* 42 (3) (2004) 1214–1219. »,
- [72] « **N.W. Lucchi, et al.**, Molecular diagnosis of malaria by photo-induced electron transfer fluorogenic primers: PET-PCR, *PLoS One* 8 (2) (2013) e56677. ».

- [73] « **P.A. Zimmerman, R.E. Howes**, Malaria diagnosis for malaria elimination, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 28 (5) (2015) 446–454. »,
- [74] « **E.C. Oriero, et al.** Molecular-based isothermal tests for field diagnosis of malaria and their potential contribution to malaria elimination, *J. Antimicrob. Chemother.* 70 (1) (2015) 2–13. »,
- [75] « **Y.L. Lau, et al.**, Loop-mediated isothermal amplification assay for identification of five human plasmodium species in Malaysia, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94 (2) (2016) 336–339. »,
- [76] « **S. Azelmat, H. Naoui, M. Bouchrik, B. Lmimouni et al**, New molecular tools for diagnosis of parasitic infections, *J Clin Microbiol.* V8 31 (2019). »
- [77] « **L.L. Poon, et al**, Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting Plasmodium falciparum DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification, *Clin. Chem.* 52 (2) (2006) 303–306. »,
- [78] « **T. Notomi, et al**, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Res.* 28 (12) (2000) E63. »,
- [79] « **Schneider P, Wolters L, Schoone G, et al.** Real-time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of Plasmodium falciparum. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan;43(1):402-5. »,
- [80] « **Mens PF, Schoone GJ, Kager PA, et al.** Detection and identification of human Plasmodium species with real-time quantitative nucleic acid sequence-based amplification. *Malar J.* 2006 Oct 3;5:80. »,
- [81] « **Oriero EC, Jacobs J, Van Geertruyden JP, et al.** Molecular-based isothermal tests for field diagnosis of malaria and their potential contribution to malaria elimination. *J Antimicrob Chemother.* 2015 Jan;70(1):2-13. »,
- [82] « **C.C. Chang, et al.**, Diagnostic devices for isothermal nucleic acid amplification, *Sensors (Basel)* 12 (6) (2012) 8319–8337. »,
- [83] « **J. P. Robinson, B. Rajwa, V. Patsekina, V. J. Davisson.** Expert Opin. Drug Discov. 2012, 7, 679. »,
- [84] « **Y.-W. Cheung, J. Kwok, A. W. L. Law, R. M. Watt, M. Kotaka, J. A. Tanner**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110, 15967. »,
- [85] « **H. Kaur, J. G. Bruno, A. Kumar, T. K. Sharma**, *Theranostics* 2018, 8, 4016. »,
- [86] « **G. Figueroa-Miranda, L. Feng, S. C.-C. Shiu, R. M. Dirkwager, Y.-W. Cheung, J. A. Tanner, M. J. Schöning, A. Offenhäusser, D. Mayer**, *Sens. Actuators B* 2018, 255, 235. »,

- [87] « **K.-A. Frith, R. Fogel, J. Dean. Goldring, R. G. E. Krause, M. Khati, H. Hoppe, M. E. Cromhout, M. Jiwaji, J. L. Limson, *Malar. J.* 2018, 17, 191.** »,
- [88] « **J. Ospina-Villa, C. López-Camarillo, C. A. Castañón-Sánchez, J. Soto- Sánchez, E. Ramírez-Moreno, L. Marchat, *Genes* 2018, 9, 584.** »,
- [89] « **D. F. Joseph, J. A. Nakamoto, O. A. Garcia Ruiz, K. Penaranda, A. E. Sanchez-Castro, P. S. Castillo, P. Milón, *PLoS One* 2019, 14, e0211756.** ».
- [90] « **S. Kasetsirikul, J. Buranapong, W. Srituravanich, M. Kaewthamasorn, A. Pimpin, *Malar. J.* 2016, 15, 358.** »
- [91] « **K. O. Mfuh, S. Tassi Yunga, L. F. Esemu, O. N. Bekindaka, J. Yonga, J. C. Djontu, C. D. Mbakop, D. W. Taylor, V. R. Nerurkar, R. G. F. Leke, *Malar. J.* 2017, 16, 434.** ».
- [92] « **Ongagna-Yhombi, SY; Corstjens, P. ; Geva, E. ; Abrams, WR; Barbier, Californie; Malamud, D.; Mharakurwa, S.** Essai amélioré pour détecter *Plasmodium falciparum* en utilisant une PCR semi-nichée ininterrompue et une analyse quantitative de flux latéral. *Malar. J.* 2013, 12. ».
- [93] « **Gbotosho, GO ; Happi, CT ; Folarine, O.; Keyamo, O.; Sowunmi, A.; Oduola, AM** Détection rapide de la lactate déshydrogénase et génotypage de *Plasmodium falciparum* dans la salive des enfants atteints de paludisme aigu non compliqué. *Un m. J. Trop. Méd. Hyg.* 2010, 83, 496-501. [».
- [94] « **Ouattara, A. ; Doumbo, S. ; Saye, R.; Beavogui, AH ; Traoré, B. ; Djimdé, UNE.; Niangaly, A.; Kayentao, K.; Diallo, M. ; Doumbo, d'accord ; et al.** Utilisation d'une bandelette réactive à base de pLDH dans le suivi diagnostique et thérapeutique des patients atteints de paludisme au Mali. *Malar. J.* 2011, dix ».
- [95] « **Oyibo, WA ; Ezeigwe, N.; Ntadom, G. ; Oladosu, OO ; Rainwater-Loveth, K.; O'Meara, W. ; Okpokoro, E.; Brieger, W.** Essai clinique pivot multicentrique sur l'urine Test de paludisme pour le diagnostic rapide de *Plasmodium falciparum* Paludisme. *J. Clin. Microbiol.* 2016, 55, 253-263. [»,
- [96] « **malaria_diagnostics_landscape_2011-300dpi.pdf** » [En ligne].
 Disponible sur:
http://www.unitaid.org/assets/malaria_diagnostics_landscape_2011-300dpi.pdf

[97] « 2017-palu-texte-final.pdf ». [En ligne]. Disponible sur:
<https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/2017-palu-texte-final.pdf>

Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis à devenir membre de la profession médicale, je m'engage solennellement à consacrer ma vie au service de l'humanité.

- *Je traiterai mes maîtres avec le respect et la reconnaissance qui leur sont dus.*
- *Je pratiquerai ma profession avec conscience et dignité. La santé de mes malades sera mon premier but.*
- *Je ne trahirai pas les secrets qui me seront confiés.*
- *Je maintiendrai par tous les moyens en mon pouvoir l'honneur et les nobles traditions de la profession médicale.*
- *Les médecins seront mes frères.*
- *Aucune considération de religion, de nationalité, de race, aucune considération politique et sociale ne s'interposera entre mon devoir et mon patient.*
- *Je maintiendrai le respect de la vie humaine dès la conception.*
- *Même sous la menace, je n'userai pas de mes connaissances médicales d'une façon contraire aux lois de l'humanité.*
- *Je m'y engage librement et sur mon honneur.*

قسم أبقر اط

بسم الله الرحمان الرحيم

أقسم بالله العظيم

في هذه اللحظة التي يتم فيها قبولي عضوا في المهنة الطبية أتعهد علانية:

- ◀ بأن أكرس حياتي لخدمة الإنسانية.
 - ◀ وأن أحترم أساتذتي وأعترف لهم بالجميل الذي يستحقونه.
 - ◀ وأن أمارس مهنتي بوازع من ضميري وشرفي جاعلا صحة مريضى هدفي الأول.
 - ◀ وأن لا أفشي الأسرار المعهودة إلي.
 - ◀ وأن أحافظ بكل ما لدي من وسائل على الشرف والتقاليد النبيلة لمهنة الطب.
 - ◀ وأن أعتبر سائر الأطباء إخوة لي.
 - ◀ وأن أقوم بواجبي نحو مرضاي بدون أي اعتبار ديني أو وطني أو عرقي أو سياسي أو اجتماعي.
 - ◀ وأن أحافظ بكل حزم على احترام الحياة الإنسانية منذ نشأتها.
 - ◀ وأن لا أستعمل معلوماتي الطبية بطريق يضر بحقوق الإنسان مهما لاقيت من تهديد.
 - ◀ بكل هذا أتعهد عن كامل اختيار ومقسما بشرفي.
- والله على ما أقول شهيد.



المملكة المغربية
جامعة محمد الخامس بالرباط
كلية الطب والصيدلة
الرباط



أطروحة رقم: 336

سنة : 2021

طرق تشخيص الملاريا

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم : / / 2021

من طرف

السيد أحمد عبد المطلب هياض
المزاد في 23 غشت 1991 بـ بالمحمدية

لنيل شهادة

دكتور في الطب

الكلمات الأساسية : الملاريا؛ التشخيص؛ الفحص المجهرى؛ الدم مسحة السمكة القطرة؛
TDR ؛ PCR ؛ LAMP ؛ طرق جديدة

أعضاء لجنة التحكيم:

رئيس	السيد بدر الدين الميموني أستاذ في علم الطفيليات
مشرف	السيدة حفيظة الناوي أستاذة في علم الطفيليات والفطريات
عضو	السيد مراد ب و شريق أستاذ في علم الطفيليات والفطريات
عضو	السيدة سعاد أزلمات أستاذة في علم البيولوجيا الجزيئية