



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I

2010

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional
le 21 octobre 2010

par Monsieur ODDOUX Olivier
né le 19 décembre 1982 à Saint Pol / Mer (59)

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE**

**DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE DE
PCR EN TEMPS REEL POUR LE DIAGNOSTIC
D'ESPECE DE *Plasmodium knowlesi***

Membres du Jury

Président : Monsieur le Professeur C. GANTZER, Faculté de Pharmacie, Nancy

Juges : Monsieur le Professeur A. LOZNIEWSKI, Faculté de Médecine, Nancy
Madame le Docteur M. MACHOUART, Faculté de Médecine, Nancy
Monsieur le Docteur J.M. PUYHARDY, HIA Legouest, Metz

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2009-2010

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Mobilité ERASMUS et Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine : Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie : Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du Collège d'Enseignement : Jean-Michel SIMON
Pharmaceutique Hospitalier

DOYEN HONORAIRE

Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON
Marie-Madeleine GALTEAU
Gérard SIEST
Claude VIGNERON

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Andrée IMBS
Marie-Hélène LIVERTOUX
Jean-Louis MONAL
Dominique NOTTER
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMANN
Michel JACQUE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
François MORTIER
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	Biochimie
Pierre LEROY	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	Chimie thérapeutique
Patrick MENU	Physiologie
Jean-Louis MERLIN	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON	Economie de la santé, législation pharmaceutique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	Parasitologie
Mariette BEAUD	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	Chimie Physique
Cédric BOURA	Physiologie
Igor CLAROT	Chimie analytique
Joël COULON	Biochimie
Sébastien DADE	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	Chimie analytique
Béatrice DEMORE	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	Hématologie - Génie Biologique
Adel FAIZ	Biophysique-acoustique
Luc FERRARI	Toxicologie

Stéphane GIBAUDPharmacie clinique
Thierry HUMBERTChimie organique
Frédéric JORANDSanté et environnement
Olivier JOUBERT.....Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZPharmacie galénique
Alexandrine LAMBERTInformatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI.....Hématologie biologique
Christophe MERLINMicrobiologie environnementale et Moléculaire
Blandine MOREAUPharmacognosie
Maxime MOURER.....Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUSInformatique
Christine PERDICAKISChimie organique
Caroline PERRIN-SARRADOPharmacologie
Virginie PICHONBiophysique
Anne SAPIN.....Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDERMycologie, Botanique
Nathalie THILLYSanté publique
Gabriel TROCKLEPharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER.....Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIOUBiochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTIPharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSESémiologie

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUDAnglais

Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois

(Pharmacie - Odontologie)

Anne-Pascale PARRET.....Directeur

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDERES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

SERMENT DE GALIEN



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

De honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

De exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Christophe Gantzer,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de ce travail,

Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Alain Lozniewski,

Vous m'avez accueillit dans votre service et avez accepté de juger ce travail,

Soyez assuré de ma profonde estime.

A Madame le Docteur Marie Machouart,

Pour ta grande aide, ta patience et ton implication en tant que directrice de thèse,

Merci de m'avoir permis de partager ton enthousiasme sans limite.

A Monsieur le Docteur Jean Michel Puyhardy,

Pour votre pédagogie et l'amour de la biologie que vous savez communiquer,

Merci de me faire l'honneur de siéger dans ce jury,

A tout le personnel du laboratoire de parasitologie du CHU de Nancy,
Pour votre accueil chaleureux et votre soutien,
Merci particulièrement à Mélanie et Anne du secteur de Biologie Moléculaire,

Au personnel du laboratoire de l'HIA Legouest de Metz,
Pour tous vos conseils et nos bons moments,
Merci à Anne pour son aide précieuse dans ce travail,

A l'ensemble de mes amis de Nancy, Lille ou d'ailleurs,
Pour votre présence constante à mes côtés, les bons moments passés et futurs,
Et votre joie de vivre,

A Laurie
Tu es présente depuis si longtemps à mes côtés,
Merci pour ta patience, ta tendresse, sois assurée de mon admiration,

A la famille Degraeve,
Pour son accueil, sa sagesse et sa folie,

A ma famille,
Pour votre soutien et confiance inébranlables que vous avez placés en moi,
Merci pour tous vos encouragements, vous êtes responsables de ma réussite

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION	6
PARTIE 1 :	7
INFECTIONS A <i>Plasmodium knowlesi</i>	7
I. Taxonomie	8
II. Historique	10
III. Cycle évolutif	12
III.1. Chez l'hôte définitif	12
III.2. Chez l'hôte intermédiaire	13
III.2.1. Schizogonie hépatocytaire	14
III.2.2. Schizogonie érythrocytaire	15
III.2.2.1. Pénétration dans l'hématie	15
III.2.2.2. Les différents stades parasitaires	17
III.2.2.3. Schéma récapitulatif du cycle évolutif	23
IV. Epidémiologie	24
IV.1. Insectes vecteurs : les anophèles femelles	24
IV.1.1. Conditions nécessaires à la vectorisation	24
IV.1.2. Caractéristiques des anophèles femelles impliquées dans la transmission de <i>P. knowlesi</i>	25
IV.2. Répartition géographique	28
IV.2.1. Généralités	28
IV.2.2. <i>Plasmodium knowlesi</i> dans le monde	29
IV.2.2.1. Analyse des cas d'infections à <i>P. knowlesi</i> par biologie moléculaire	29
IV.2.2.2. Répartition actuelle et hypothèses évolutives	31
V. Manifestations clinico-biologiques	34
VI. Diagnostic	37
VI.1. Diagnostic direct	37
VI.1.1. Techniques microscopiques	37
VI.1.1.1. Le frottis mince	37
VI.1.1.2. La goutte épaisse rapide	37
VI.1.1.3. La technique QBC®	38
VI.1.2. Méthodes Immunochromatographiques	38
VI.1.4. Techniques de biologie moléculaire	41

VI.2. Diagnostic indirect	41
VI.3. Récapitulatif des outils diagnostiques pour <i>P. knowlesi</i>	42
VII. Traitements	44
VII.1. Médicaments antipaludéens	44
VII.1.1. Schizonticides érythrocytaires	44
VII.1.1.1. Alcaloïdes du quinquina : la quinine (Quinimax®)	44
VII.1.1.2. Amino-4-quinoléines	44
VII.1.1.3. Aryl-amino-alcools	45
VII.1.1.4. Les extraits du Qinghaosu	45
VII.1.1.5. Antimétabolites	45
VII.1.1.6. Antibiotiques	46
VII.1.2. Gamétocides	46
VII.2. Schémas thérapeutiques	47
VII.2.1. Traitement curatif des accès simples à <i>P. falciparum</i>	47
VII.2.2. Traitement curatif des accès simples dus aux autres <i>Plasmodium</i> sp	47
VII.2.3. Traitement curatif des accès graves	47
VII.3. <i>P. knowlesi</i> et thérapeutique	48
VII.4. Prophylaxie	49
PARTIE 2 :	50
DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE DE PCR EN TEMPS REEL POUR LE DIAGNOSTIC DE <i>Plasmodium knowlesi</i>	50
I. Problématique	51
II. Contexte scientifique	52
II.1. Le génome de <i>P. knowlesi</i> : état actuel des connaissances	52
II.2. Les gènes d'intérêts pour le diagnostic moléculaire	54
II.3. Approches moléculaires actuelles pour le diagnostic de <i>P. knowlesi</i>	56
II.3.1. PCR nichée ou nested-PCR	56
II.3.2. PCR en temps réel	58
II.4. Choix de la technique à développer	61
III. Matériel et Méthode	62
III.1. Recueil et traitement des échantillons	62
III.2. Etude bioinformatique	63
III.3. Amplification de l'ADN par PCR	64
III.3.1. PCR Classique	64
III.3.1.1. Préparation des mélanges réactionnels (Mix)	64
III.3.1.2. Programmation du thermocycleur	65
III.3.1.3. Révélation	65

III.3.2. PCR en temps réel	66
III.3.2.1. Préparation des mélanges réactionnels (Mix)	66
III.3.2.2. Programmation du LightCycler®	67
III.3.2.3. Révélation.....	68
III.4. Séquençage	68
III.5. Tests de sensibilité	68
III.6. Protocoles actuels pour le diagnostic moléculaire des <i>Plasmodium</i> hors <i>P. knowlesi</i>	69
III.6.1. Laboratoire de parasitologie du CHU de Nancy.....	69
III.6.2. Laboratoire de L'HIA Legouest de Metz.....	70
IV. Résultats.....	71
IV.1. Etude bioinformatique.....	71
IV.2. Evaluation pratique des amorces en PCR en temps réel SYBR Green.....	75
IV.3. Tests d'optimisation	80
IV.3.1. Optimisation du couple d'amorces Pmk8mF / PKfR (réaction 3)	80
IV.3.2. Optimisation du couple d'amorces PKe'F / PKg'R (réaction 8).....	82
IV.4. Test de sensibilité - Calcul de la limite de détection	84
IV.5. Test de spécificité	87
IV.6. Intégration de la détection de <i>P. knowlesi</i> aux protocoles en place.....	94
IV.6.1. Laboratoire du CHU de Nancy.....	94
IV.6.2. Laboratoire de l'HIA Legouest.....	100
IV.7. Interprétation des résultats.....	105
V. Discussion.....	106
CONCLUSION	109
BIBLIOGRAPHIE.....	110
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	119

LISTE DES ABREVIATIONS

A-Type : Asexual Blood Type (ARNr)

A. fumigatus : *Aspergillus fumigatus*

Ac : Anticorps

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ARN : Acide Ribo-Nucléique

ARNr : ARN ribosomique

BET : Bromure d'éthydium

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BPRC : Biomedical Primate Research Center

C. albicans : *Candida albicans*

CD : Cluster de Différentiation

CH : Centre Hospitalier

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMV : Cytomégalovirus

CNR : Centre National de Référence

CSP : Circumsporozoïte Protein

Ct : Cycle Threshold (Cycle seuil)

dNTP : Desoxy Nucleotide Tri-Phosphate

DO : Densité Optique

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique

FP : Ferriprotoporphirine membranaire

FRET : Förster Resonance Energy Transfert (Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes)

HBV : Virus de l'hépatite B

HIA : Hôpital d'Instruction des Armées

HRP II : Histidin Rich Protein II

ICAM : InterCellular Adhesion Molecule (Molécule d'adhésion inter-cellulaire)

Kir : *Knowlesi* interspersed repeats

LDH_p : Lactate Deshydrogénase des *Plasmodium* sp.

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NP : Non Précisé

O-Type : Oocyste Type (ARNr)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P. : *Plasmodium*

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PF : *Plasmodium falciparum*

PK : *Plasmodium knowlesi*

PM : *Plasmodium malariae*

PO : *Plasmodium ovale*

PV : *Plasmodium vivax*

QBC : Quantitative Buffy Coated

S-Type : Sporozoite Type (ARNr)

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SICAv : Schizont Infected cell agglutination variant

SPILF : Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française

sp. : *species*

T. gondii : *Toxoplasma gondii*

TDR : Test de Diagnostic Rapide

Tm : Melting Temperature (Température de Fusion)

VHB : Virus de l'hépatite B

INTRODUCTION

Les parasites du genre *Plasmodium*, agents du paludisme ou malaria, sont considérés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme un fléau mondial, infectant plus de 500 millions d'êtres humains chaque année et provoquant plus d'un million de décès.

Parmi les vertébrés, de nombreux reptiles, oiseaux et mammifères peuvent être atteints par plus d'une centaine d'espèces de *Plasmodium* sp. [1].

Jusqu'à une époque récente, quatre espèces étaient identifiées comme pathogènes humains : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*. En 2008, une cinquième espèce, connue depuis 1931 chez le singe, est déclarée dangereuse pour l'Homme : *P. knowlesi* [2-3]. Sa prévalence dans la population humaine a été sous-estimée pour deux raisons principales :

- L'aspect morphologique du parasite se confond avec celui de *P. falciparum* et *P. malariae* [4],
- Sa répartition géographique est limitée aux pays d'Asie du Sud-Est, zones où sévissent majoritairement *P. vivax* et *P. malariae* [5].

L'épidémiologie et le pouvoir pathogène de *P. knowlesi* imposent aux laboratoires référents en parasitologie de pouvoir diagnostiquer avec certitude et rapidement cette espèce [6]. Ainsi, dans une première partie, les caractéristiques propres à cette nouvelle espèce sont détaillées dans une synthèse bibliographique. La mise au point d'une technique de biologie moléculaire en temps réel est ensuite présentée dans une seconde partie. Enfin, le développement et l'utilisation d'un tel outil sont discutés.

PARTIE 1 :

INFECTIONS A *Plasmodium knowlesi*

I. Taxonomie

Les parasites du genre *Plasmodium* sont des hématozoaires classifiés selon le schéma taxonomique suivant :

- Règne : Animal
- Sous-règne : Protozoaires
- Embranchement : Apicomplexa (Sporozoaires)
- Classe : Haemosporidae
- Ordre : Haemosporida
- Famille : Plasmodidae

Le règne des Protozoaires comprend de nombreux parasites unicellulaires sanguins tels que les *Trypanosoma*, ou digestifs comme les *Entamoeba*, *Giardia*, ou *Trichomonas* [7].

L'Embranchement des Apicomplexes ou Sporozoaires se caractérise par la présence d'un complexe apical composé de structures dont l'ensemble permet la pénétration dans la cellule hôte (conoïde, rhoptries, anneaux polaires, micronèmes, apicoplaste). Ce sont donc des parasites intracellulaires obligatoires, également caractérisés par une multiplication complexe : sexuée ou sporogonique chez l'hôte définitif, et asexuée ou schizogonique chez l'hôte intermédiaire. Deux classes regroupent ensuite ces organismes [7]: les Coccidies comprenant les genres *Isospora*, *Sarcocystis*, *Cryptosporidium* et *Toxoplasma*, et les Hémosporidies (parasitisme intra-érythrocytaire) incluant les genres *Plasmodium* et *Babesia*.

Plus de 172 espèces de *Plasmodium* ont été décrites, parasitant différents hôtes intermédiaires : oiseaux, reptiles, ou mammifères [1]. Parmi celles-ci, cinq espèces peuvent infecter l'Homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi* [2].

La position phylogénétique des espèces plasmodiales les unes par rapport aux autres a été étudiée par l'analyse comparative de séquences du gène codant l'ARN de la petite sous-unité ribosomique de 19 *Plasmodium* sp. Ainsi, dans la figure 1 ci-dessous, *P. knowlesi* est phylogénétiquement très proche de *P. vivax*. Ces deux espèces sont localisées dans le groupe des *Plasmodium* infectant les mammifères. Etonnamment, dans cet arbre,

P. falciparum et *P. malariae*, apparaissent très proches des espèces parasitant les oiseaux et les reptiles.

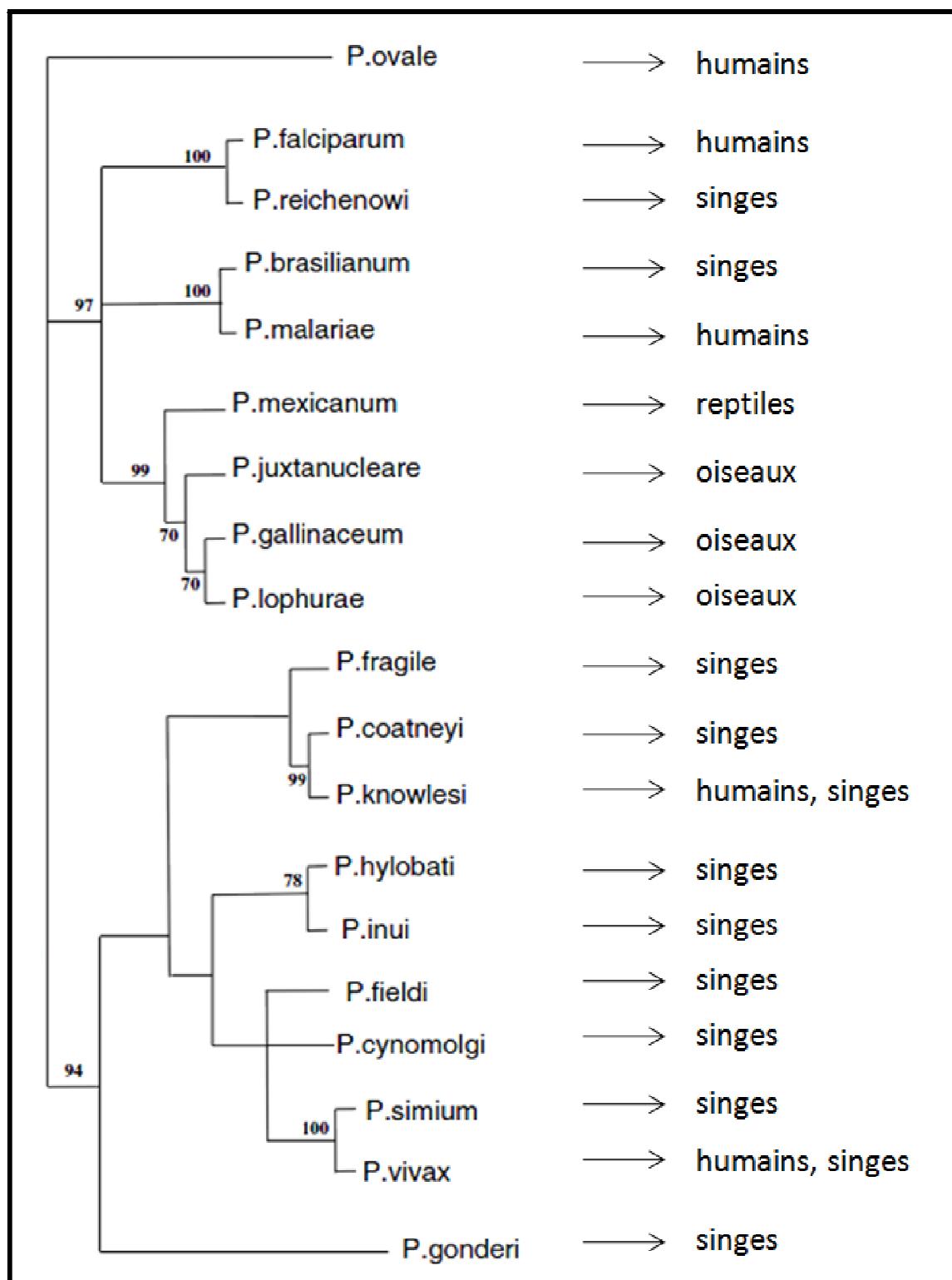


Figure 1 : Arbre phylogénétique de 19 espèces de *Plasmodium* obtenu par l'alignement de 704 séquences du gène codant la petite sous-unité ribosomique 18S [1].

II. Historique

Le paludisme, par ses manifestations cliniques, est connu depuis l'antiquité. Les médecins de l'Inde distinguent déjà, 1000 ans avant J-C, des fièvres à périodicités intermittentes. Illustrées par des hiéroglyphes égyptiens, Hippocrate et Gallien les différencient même suivant leur survenue toutes les 48 heures (tierce) ou 72 heures (quarte) [8]. L'étymologie latine du mot paludisme : *palus*, signifiant marécage, remonte au II^e siècle avant J-C alors que les Grecs et les Romains établissent la corrélation entre ces fièvres et la présence de marais [9].

En 1620, Don Francisco Lopez, père jésuite en Amérique du Sud, met en évidence les vertus fébrifuges de la poudre d'écorce de quinquina et en ramène sur l'Ancien continent. Cette découverte est cruciale, car à cette période le paludisme sévit dans toutes les régions marécageuses d'Europe. Les fièvres sont alors divisées en deux groupes selon leur sensibilité ou leur résistance à ce remède [8].

En 1820, Pelletier et Caventou isolent deux des alcaloïdes actifs du quinquina : la quinine et la cinchonine. Maillot administre pour la première fois avec efficacité la quinine lors de la campagne d'Algérie en 1830. L'utilisation préventive du médicament est proposée dès 1850 [8].

Le 6 novembre 1880, A. Laveran, médecin militaire français, observe des éléments cellulaires intra-érythrocytaires n'appartenant à aucune lignée hématologique. L'hématozoaire du paludisme est découvert [8]. De 1886 à 1890, Golgi, Celli et Marchiava différencient trois espèces parasites de l'Homme selon leurs critères morphologiques : *P. vivax*, *P. malariae* et *P. falciparum* [1].

En 1897, Ross soupçonne le rôle des moustiques du genre *Anopheles* dans la transmission du paludisme, puis Grassi le confirme en 1898 [8].

Stephens identifie en 1922 une quatrième espèce plasmodiale : *P. ovale* [1].

En 1927, J. Wagner von Jauregg, neurologue et psychiatre autrichien, reçoit le prix Nobel de médecine après s'être servi du paludisme pour traiter la syphilis. Il se servait des fièvres induites par l'inoculation de *Plasmodium* pour tuer les bactéries thermosensibles responsables de la syphilis. La fièvre était contrôlée par la quinine [7].

En 1931, R.M. Knowles identifie un *Plasmodium* chez le macaque à longue-queue, *Macaca fascicularis*, qu'il nomme *P. knowlesi*. En 1932, reprenant les travaux de J. Wagner, ce dernier montre que ce *Plasmodium* est transmissible à l'Homme par l'injection de sang de macaque contaminé [2].

En 1961, un des vecteurs de *P. knowlesi* est identifié : *Anopheles hackeri* [10].

En 1965, un militaire américain au retour de la jungle malaisienne développe une fièvre journalière. C'est le premier cas décrit d'infection humaine naturelle à *P. knowlesi*. Le diagnostic s'est révélé complexe, le parasite ayant d'abord été identifié par frottis coloré au May-Grünwald-Giemsa comme *P. falciparum*, puis *P. malariae*. Le diagnostic de *P. knowlesi* ne fut conclut qu'après la mort de singes rhésus (*Macaca mulatta*) inoculés par le sang du patient [11].

En 1968, des expériences menées sur des prisonniers américains montrent qu'une seule piqûre d'un moustique infecté suffit à infecter l'Homme [12]. En 1970, une étude à grande échelle est menée dans la région de Pahang en Malaisie afin d'évaluer la prévalence de *P. knowlesi* dans la population humaine. Mille cent dix-sept échantillons sanguins prélevés de patients asymptomatiques sont injectés à des singes rhésus, mais aucun ne développe d'infection. Le risque pour la population de développer l'infection à *P. knowlesi* est alors estimé comme extrêmement faible [13].

En 2004, grâce à l'apport de la biologie moléculaire, une étude rétrospective menée par l'équipe du Professeur B. Singh montre que les infections à *P. knowlesi* dans le Sud-Est asiatique sont largement sous-diagnostiquées, elle constitue l'espèce plasmodiale la plus représentée dans la population humaine en Malaisie [6].

En 2008, *P. knowlesi* est reconnu par la communauté scientifique comme le cinquième *Plasmodium* humain [3].

III. Cycle évolutif

Les *Plasmodium* sp. évoluent selon un schéma hétéroxène complexe faisant intervenir de nombreux stades parasitaires. Leur pouvoir infectant dépend d'un hôte définitif appartenant aux moustiques du genre *Anopheles* et d'un hôte intermédiaire vertébré variable suivant l'espèce plasmodiale (oiseaux, reptiles, mammifères). La reproduction sexuée du parasite - ou sporogonie - a lieu chez l'anophèle, alors que la reproduction asexuée - ou schizogonie - se déroule chez le vertébré [7, 9].

III.1. Chez l'hôte définitif

Les hôtes définitifs des *Plasmodium* sp. sont exclusivement représentés par les moustiques femelles du genre *Anopheles* (figure 2). Ceux-ci appartiennent à l'ordre des Diptères, et à la famille des *Culicidae* qui regroupe l'ensemble des moustiques [7, 14]. Leur développement comprend 4 étapes successives : l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte. Tous les stades, à l'exception des adultes, volants, sont aquatiques et nécessitent de l'eau douce stagnante et non polluée pour leur survie. Seules les femelles sont hématophages et donc impliquées dans la transmission du paludisme, le repas sanguin leur procurant des protéines indispensables à la constitution de leurs ovaires et de leurs œufs. Leur activité hématophage est très préférentiellement nocturne [9].



Figure 2 : Photo d'anophèle femelle [15].

Lors de la piqûre, le moustique ingère les formes parasitaires circulant dans le sang de l'hôte intermédiaire. Parmi celles-ci, les formes asexuées sont digérées tandis que les gamétocytes poursuivent leur développement [14]. Dans l'estomac de l'anophèle, les gamètes octoploïdes mâles (microgamétocytes) et diploïdes femelles (macrogamétocytes) subissent plusieurs divisions avant de devenir haploïdes. La fécondation a alors lieu entre ces 2 gamètes dans l'intestin moyen pour donner naissance à un œuf diploïde, l'ookinète. Cet œuf s'implante dans la paroi intestinale et s'entoure d'une paroi épaisse. Cette cellule se nomme à présent oocyste [9].

Une étape de méiose a ensuite lieu au sein de l'oocyste, suivie d'une multiplication par sporogonie conduisant à la formation de nombreux sporozoïtes (> 10.000). Une fois à maturité, ceux-ci sont libérés dans la cavité générale de l'anophèle et gagnent les glandes salivaires. Ces sporozoïtes constituent les formes infectantes, et seront injectés à l'hôte intermédiaire lors du prochain repas sanguin [1, 5, 12]. En fonction de la température, de l'anophèle et de l'espèce plasmodiale, ce cycle varie de 10 à 17 jours [9].

III.2. Chez l'hôte intermédiaire

Dans le cas de *P. knowlesi*, l'hôte habituel est un singe, le macaque à longue-queue ou *Macaca fascicularis* ([figure 3](#)) [2]. D'autres singes peuvent également servir d'hôtes : le macaque à queue-de-cochon ou *Macaca nemestrina*, et le Semnopithèque mélalophe ou *Presbytis malalophos* [16]. L'Homme reste un hôte accidentel.



[Figure 3](#) : Macaque à longue queue (*Macaca fascicularis*) [6].

Chez l'hôte intermédiaire, le cycle des *Plasmodium* sp. comprend deux étapes : une première phase hépatocytaire, puis une seconde érythrocytaire.

III.2.1. Schizogonie hépatocytaire

Au cours de son repas sanguin, l'anophèle contaminée injecte les formes infectantes de *Plasmodium*, les sporozoïtes (12 µm de long sur 1 µm de large), dans les micro-capillaires de l'hôte intermédiaire [14, 17]. Rapidement, ces sporozoïtes migrent vers le foie, où ils pénètrent dans les hépatocytes grâce au complexe apical et à la protéine majeure de surface, la protéine circumsporozoïte (CSP) [18]. Après 8 à 15 jours correspondant au temps nécessaire à plusieurs divisions nucléaires, l'hépatocyte grossit et se charge de formes merozoïtes dont l'ensemble constitue un schizonte ou corps bleu (voir *figure 4*). A maturité, celui-ci éclate et libère les merozoïtes dans la circulation sanguine.

Des expériences menées sur les singes rhésus ont montré que pour l'espèce *P. knowlesi*, ces schizontes hépatiques arrivent à maturité plus rapidement que pour tous les autres *Plasmodium* simiens, en seulement 5 jours ½. Leur taille moyenne au stade mature est faible (40 µm) en comparaison des autres *Plasmodium* (jusqu'à 70 µm). La quantité de merozoïtes contenus dans les schizontes matures puis libérés varie en fonction de l'espèce plasmodiale. Pour *P. knowlesi*, le nombre de merozoïtes est élevé, et estimé à environ 30.000, quasiment autant que pour l'espèce *P. falciparum* (40.000). Les espèces *P. malariae*, *P. ovale* et *vivax* contiennent de 10.000 à 15.000 merozoïtes [9, 17].

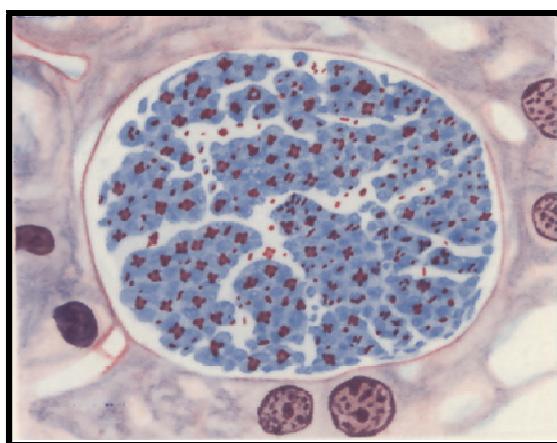


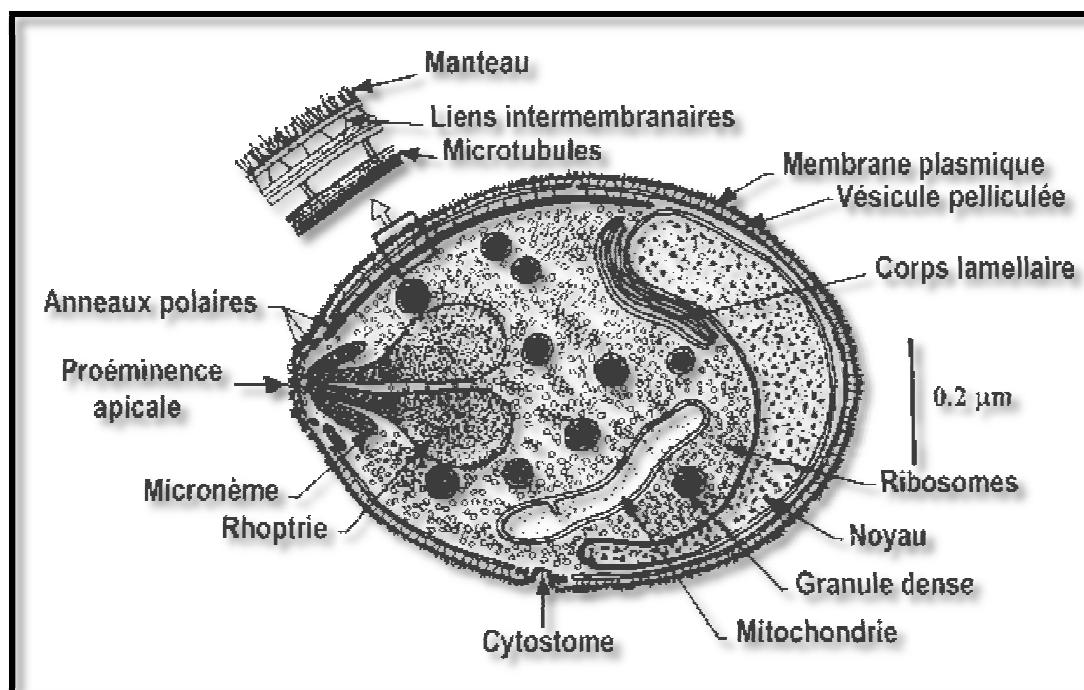
Figure 4 : Stade mature d'un schizonte de *Plasmodium knowlesi* dans une biopsie de foie d'un singe rhésus. Grossissement x 1000, coloration par le Giemsa colophonum [17].

Lors de la contamination, certaines formes parasitaires appelés hypnozoïtes n'évoluent pas mais persistent au sein de l'hépatocyte, en dormance. Ceux-ci sont uninucléés et mesurent 4 à 5 μm . Chez l'Homme, ils sont décrits uniquement pour *P. ovale* et *P. vivax*, et sont responsables de latences et rechutes [9, 19]. Des coupes de foie provenant de singes infectés par *P. knowlesi* n'ont jamais pu montrer la présence d'hypnozoïtes [17, 20-21]. Ceci explique l'absence de rechutes décrites à ce jour concernant cette espèce. Toutefois, ces études semblent insuffisantes pour prédire son comportement dans le foie de l'être humain. D'autres données clinico-biologiques sont nécessaires pour vérifier ou invalider la capacité de *P. knowlesi* à produire ces formes latentes.

III.2.2. Schizogonie érythrocytaire

III.2.2.1. Pénétration dans l'hématie

Lors de l'éclatement du schizonte, les merozoïtes ($1,5 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$) sont libérés et pénètrent dans les hématies grâce à leur organes apicaux : rhoptries, anneaux polaires, micronèmes, apicoplaste.



*Figure 5 : Schéma d'un merozoïte de *Plasmodium* [18].*

La pénétration érythrocytaire s'effectue selon un mécanisme complexe : [14, 18]

- Une première phase permet le contact et l'adhérence entre le manteau glycoprotéique du merozoïte et la surface de l'hématie (*figure 6, étape 1*)
- Puis le complexe apical est orienté vers la membrane érythrocytaire. Une jonction serrée se forme (*figure 6, étapes 2 et 3*)
- Enfin, une phase d'endocytose permet l'inclusion du merozoïte dans l'hématie. Lors de l'invasion, la membrane cellulaire s'invagine et forme une vacuole intra-érythrocytaire parasitophore, contenant le parasite. (*figure 6, étapes 4 et 5*)

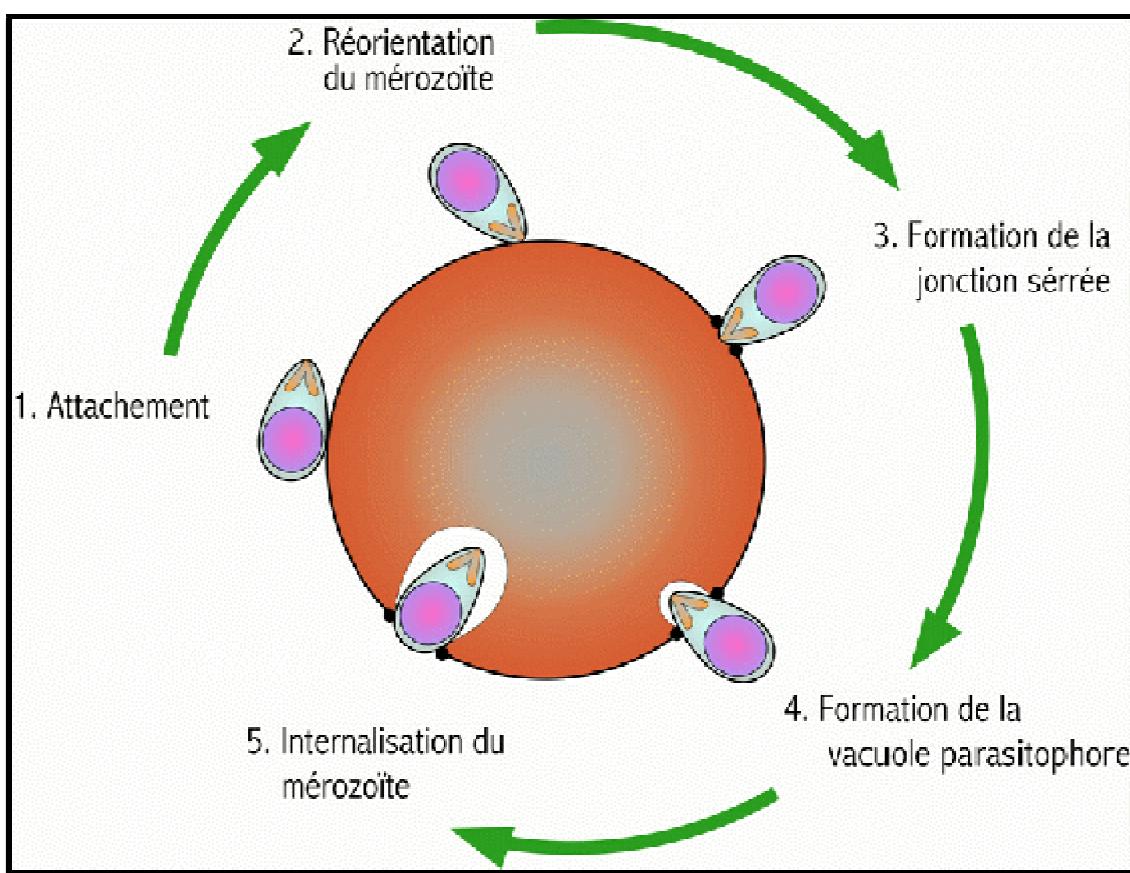


Figure 6 : Schéma des différentes étapes de l'invasion érythrocytaire [18].

Les constituants antigéniques des membranes érythrocytaires jouent un rôle déterminant dans l'invasion du merozoïte. Ainsi, de même que pour *P. vivax*, l'invasion érythrocytaire de *P. knowlesi* est dépendante de la présence sur l'hématie de l'antigène de groupe sanguin Duffy [22-24]. Les patients exempts de cet antigène ne développent pas d'infection, par impossibilité de formation de la jonction serrée [24].

III.2.2.2. Les différents stades parasitaires

Au sein de l'hématie hôte, le parasite évolue selon plusieurs stades successifs, définis par Garnham en 1966 par des critères morphologiques microscopiques observés après coloration au May-Grünwald-Giemsa, et qui diffèrent selon les espèces plasmodiales [25] :

- Trophozoïte jeune : la chromatine nucléaire est condensée en un point, et le cytoplasme s'organise en anneau entourant une vacuole, et forme ainsi une « bague à chaton ».

En 2009, l'équipe du Pr Lee de l'université de Sarawak en Malaisie décrit les morphologies intra-érythrocytaires spécifiques de *P. knowlesi* à partir de 10 patients humains infectés [25]. L'examen des frottis montre des caractéristiques communes entre les formes trophozoïtes jeunes de *P. knowlesi* (*figure 7*) et celles de *P. falciparum* (*figure 8*):

- La taille des hématies parasitées n'est pas significativement modifiée dans les 2 cas.
- Le trophozoïte de *P. knowlesi* occupe environ un tiers de l'hématie parasitée, soit 2,5 à 4 µm, relativement proche de la taille d'un trophozoïte de *P. falciparum* (plus petit, environ 1/5^e de l'hématie). Les trophozoïtes jeunes de *P. malariae*, *P. vivax* et *P. ovale* sont plus grands (environ les 2/3 de l'hématie parasitée). A ce stade, aucun pigment malarique (hémozoïne) n'est visible dans les hématies parasitées par *P. knowlesi*.
- La présence de formes en « bracelet arabe » ou dédoublement de la chromatine en deux points est retrouvée pour les deux espèces (représentant jusqu'à 35 % des formes chez un patient de l'étude de Lee) (*figure 7b*).
- Les formes adhérentes ou accolées à la membrane érythrocytaire, habituellement rencontrées lors des infections à *P. falciparum*, sont également présentes chez *P. knowlesi* (3 des 10 patients) (*figure 7c*).
- Un pluri-parasitisme est également rencontré lors des fortes parasitémies dans les deux cas (*figure 7c*).

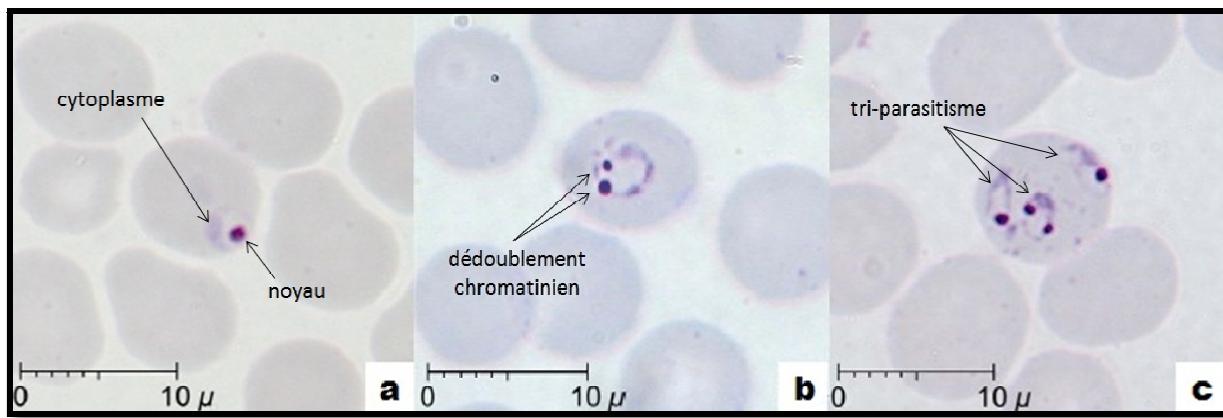


Figure 7 : Frottis sanguins présentant des formes trophozoïtes jeunes de *P. knowlesi*, Grossissement x 1.000. Coloration au Giemsa [25].

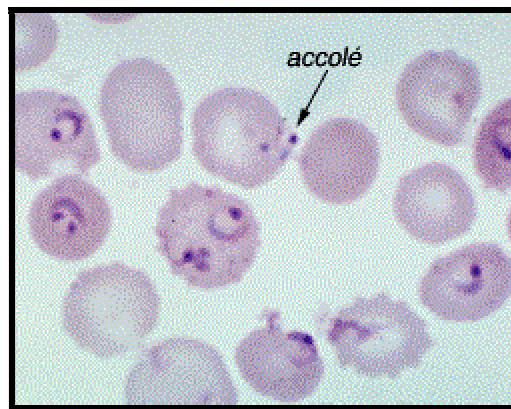


Figure 8 : Frottis sanguin présentant des formes trophozoïtes jeunes de *P. falciparum*, Coloration May-Grünwald-Giemsa, Grossissement x 1.000 [26].

- Trophozoïte âgé ou mature : la chromatine n'est pas divisée, et le cytoplasme densément bleuté (signe d'une intense activité de synthèse protéique). Le pigment malarique (hémozoïne) est inconstamment présent. Celui-ci est synthétisé par les vacuoles digestives du parasite. Pour sa survie et sa maturation, le parasite digère les composants cytoplasmiques cellulaires. L'hémoglobine est donc dégradée, et l'hème se polymérise et forme ce pigment insoluble, noir et puissant pyogène.

Lors de leur maturation, les trophozoïtes augmentent de taille et accroissent leur quantité d'ADN (X-ploïdie). Pour *P. knowlesi*, les trophozoïtes matures possèdent un cytoplasme amiboïde (figure 9a), irrégulier et dense, et mesurent 5 à 6 μm . Le cytoplasme prend parfois une forme « en bande équatoriale » (figure 9b,c), caractéristique reconnue de *P. malariae* (figure 10). Cependant, des granulations de Schüffner peuvent être présentes

dans les formes les plus âgées (*figure 9*), non décrites chez *P. malariae* mais habituelles chez *P. vivax* et *P. ovale*.

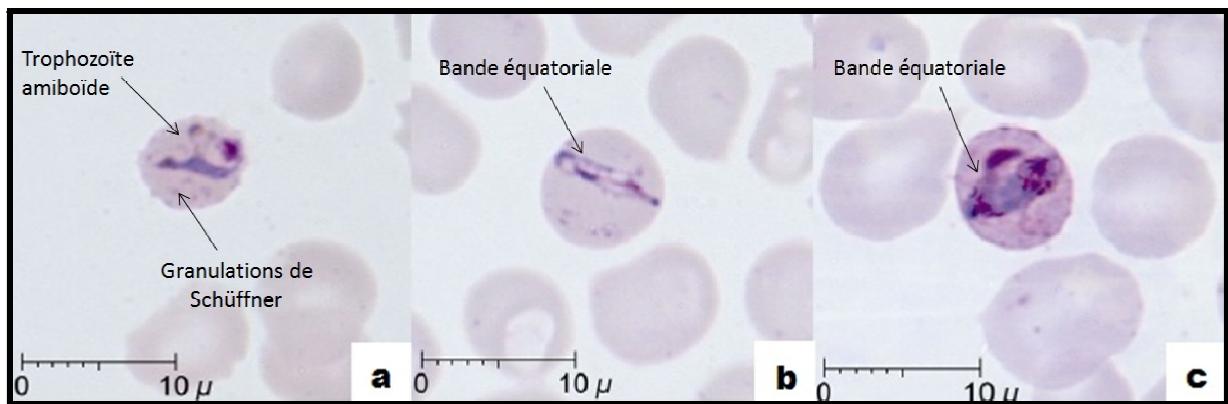


Figure 9 : Frottis sanguins présentant des formes trophozoïtes matures de *P. knowlesi*.
Grossissement x 1.000. Coloration au Giemsa [25].

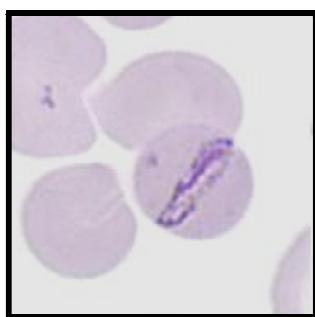


Figure 10 : Frottis sanguin présentant une forme trophozoïte matures de *P. malariae*.
Grossissement x 1.000. Coloration au Giemsa [27].

- Schizonte ou « rosace » : de multiples masses chromatiniennes sont présentes, résultant de la division du noyau, avec en leur centre des agrégats de pigment malarique.

Ces masses chromatiniennes s'individualisent puis forment des merozoïtes. Sur les frottis sanguins analysés dans l'étude de Lee et coll. [25], les schizontes sont fréquents et présents chez 8 des 10 patients. Les formes âgées occupent la quasi-totalité de l'hématie et un maximum de 16 merozoïtes est observé (*figure 11*) (12 à 30 pour *P. falciparum*, 12 à 24 pour *P. vivax* (généralement 16, *figure 12 b*), 4 à 12 pour *P. ovale* (généralement 8, *figure 12 c*), 6 à 12 pour *P. malariae*, *figure 12 a*) [14]. Le pigment est toujours présent, sous forme de fins ou gros agrégats.

Toutefois, certains éléments doivent alerter le biologiste et permettent d'aiguiller le diagnostic. Les patients atteints par *P. knowlesi* présentent généralement un asynchronisme de maturation, avec, simultanément, des formes trophozoïtes et schizontes. Les schizontes de *P. falciparum*, difficilement différenciables de ceux de *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*, ne sont jamais visibles dans la circulation sanguine, à l'exception des formes gravissimes [9, 25].

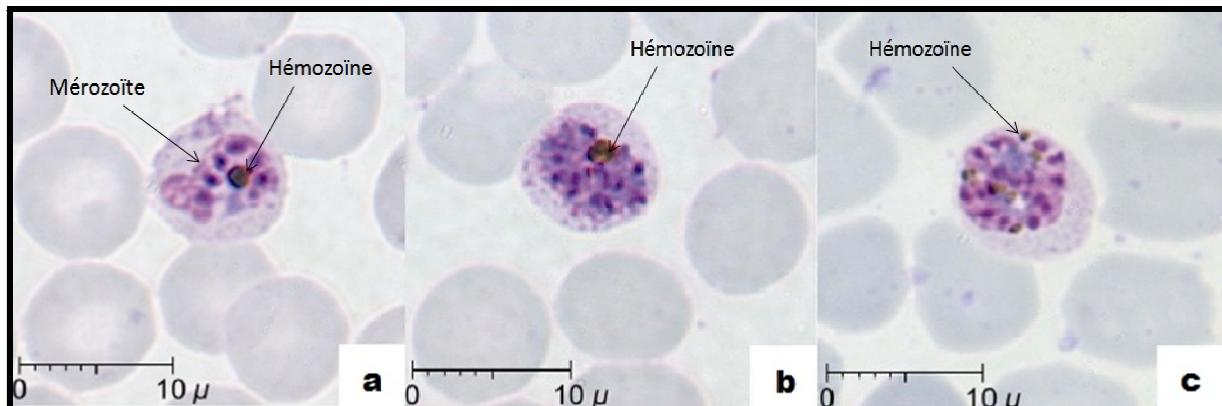


Figure 11 : Frottis sanguins présentant des formes schizontes érythrocytaires de *P. knowlesi*. Grossissement x 1.000. Coloration au Giemsa [25].

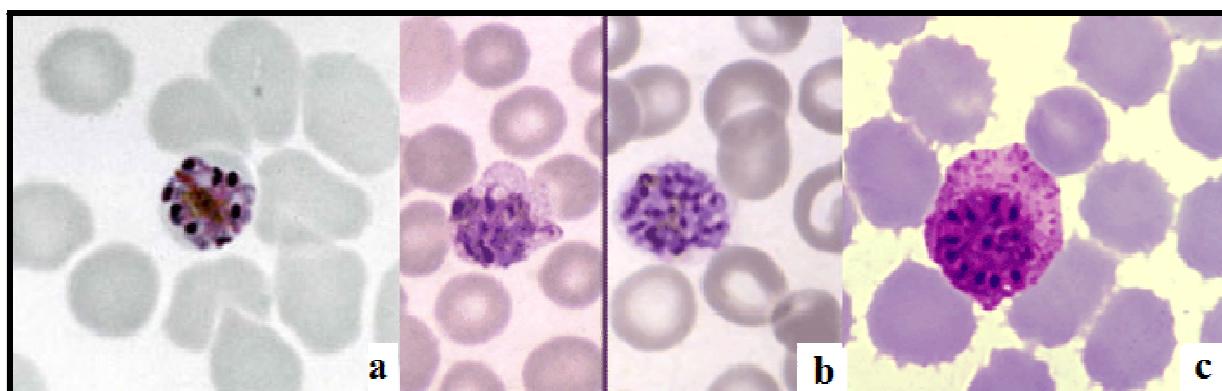


Figure 12 : Frottis sanguins présentant des formes schizontes érythrocytaires de *P. malariae* (a), *P. vivax* (b) et *P. ovale* (c). Grossissement x 1.000. Coloration au May-Grünwald Giemsa [26].

- Gamétocyte : La chromatine est unique, de grande taille. Le pigment malarique est en quantité importante et « constelle » l'hématie.

Après plusieurs cycles de reproduction asexuée dans les érythrocytes, de rares merozoïtes évoluent en gamétocytes. Deux types de gamètes sont à distinguer : les gamétocytes femelles ou macrogamétocytes à noyau diploïde, et les gamétocytes mâles ou microgamétocytes à noyau octoploïde. Leur développement chez l'Homme est bloqué dans la circulation sanguine jusqu'à ce qu'une anophèle les ingère au cours de son repas sanguin. De même que pour les autres espèces, la proportion de gamétocytes dans le sang circulant est faible (environ 2 % des formes érythrocytaires circulantes pour *P. knowlesi* [25]). Les gamétocytes, de forme sphérique, occupent la quasi-totalité de l'hématie. Les macrogamètes présentent une chromatine rosée et placée en périphérie. Le cytoplasme bleu occupe le reste de l'hématie (figures 13 (a) et (b)). Par opposition, le cytoplasme des microgamètes est rose-violacé, et la chromatine plus grosse et irrégulièrement placée dans l'hématie parasitée (figure 13 (c)). Ces morphologies, bien distinctes des formes en croissant de *P. falciparum* (figure 14 (a)), sont difficilement différenciables des gamétocytes des 3 autres *Plasmodium* humains (figures 14 (b) et (c)).

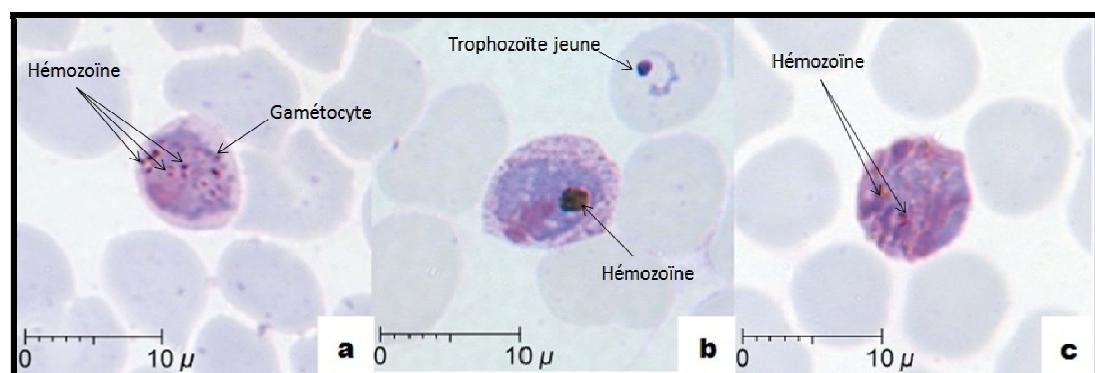


Figure 13 : Frottis sanguins présentant des formes gamétoctyaires de *P. knowlesi*. Macrogamètes : (a) et (b), microgamète : (c). Grossissement x 1.000. Coloration au Giemsa [25].

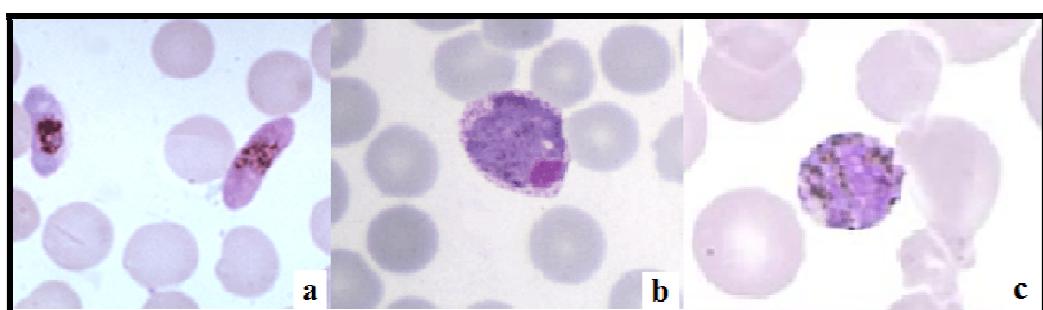


Figure 14 : Frottis sanguins présentant des formes gamétoctyaires de *P. falciparum* (a), *P. vivax* (b) et *P. malariae* (3). Grossissement x 1.000. Coloration au May-Grünwald Giemsa [26].

Les infections à *P. knowlesi*, de même que *P. falciparum*, sont parfois responsables chez l'Homme des parasitémies importantes, contrairement aux autres *Plasmodium* sp. (parasitémies supérieures à 10 % d'hématies parasitées) [25, 28]. Plusieurs éléments du cycle asexué expliquent ces fortes charges parasitaires :

- La maturation des schizontes hépatiques est aussi rapide que pour *P. falciparum* (5 jours ½). Elle est de 15 jours pour *P. malariae*, 7 à 23 jours pour *P. vivax*, 9 jours pour *P. ovale* [9].
- Les schizontes hépatiques contiennent de très nombreux merozoïtes (30.000), quasiment autant que *P. falciparum* (40.000) [9, 17].
- De même que *P. falciparum*, *P. knowlesi* affecte les hématies sans distinction de maturation, contrairement aux autres *Plasmodium* humains (*P. vivax* et *P. ovale* envahissent préférentiellement les réticulocytes et hématies jeunes ; *P. malariae* les hématies matures) [9, 25].
- Le cycle de reproduction asexuée érythrocytaire est le plus rapide de tous les *Plasmodium* humains et simiens : 24 heures (48 heures pour *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* ; 72h pour *P. malariae* [7]). Le rythme des fièvres, caractéristique du paludisme, correspond à la libération de l'hémozoïne lors de l'éclatement des schizontes érythrocytaires. Celui-ci est donc quotidien pour *P. knowlesi*, tierce (1 jour sur 2) pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* et quarte (1 jour sur 3) pour *P. malariae*.

III.2.2.3. Schéma récapitulatif du cycle évolutif

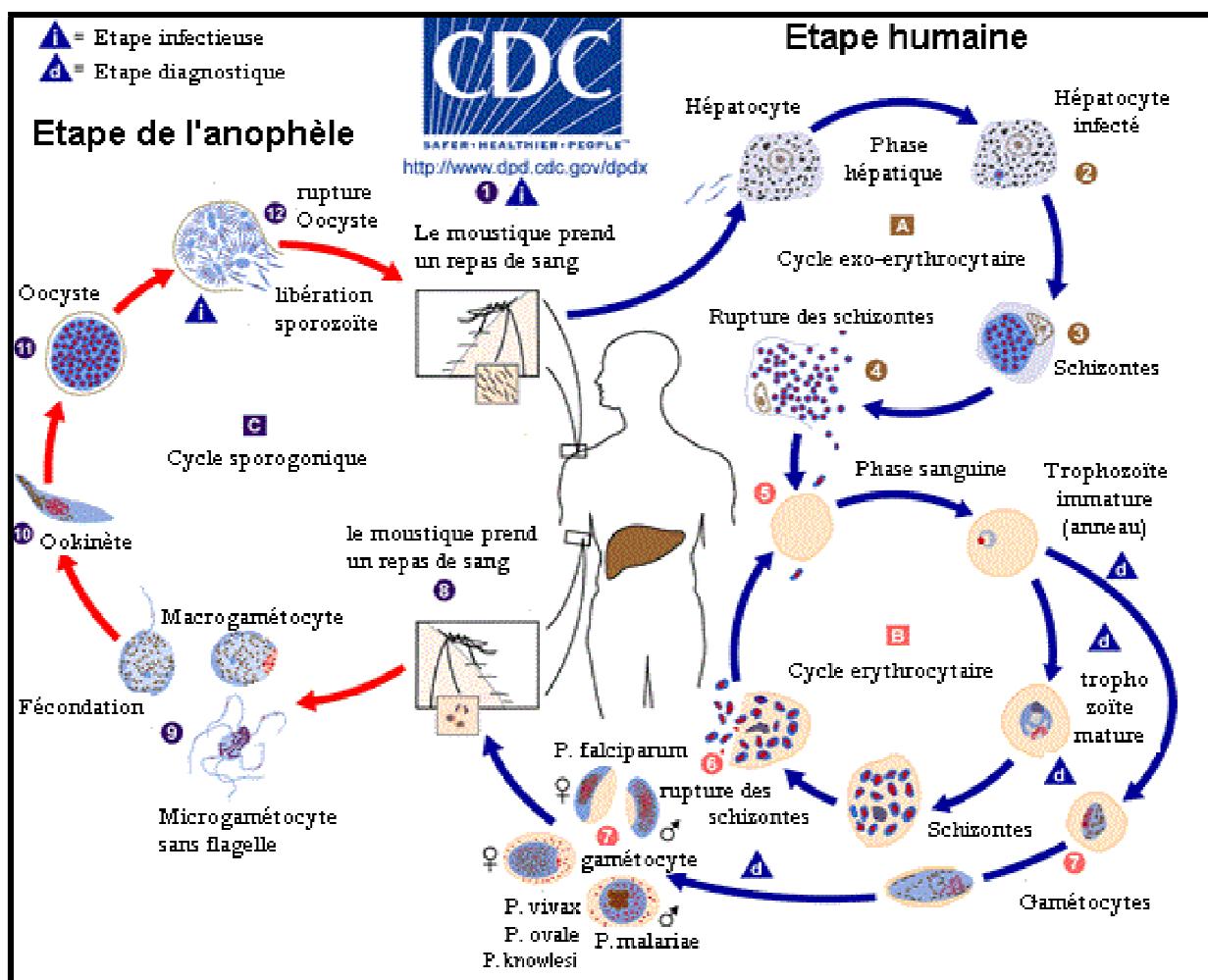


Figure 15 : Schéma représentant le cycle évolutif des *Plasmodium* [29].

IV. Epidémiologie

Un des facteurs limitant l'expansion de *P. knowlesi* à travers le monde est la répartition de son insecte vecteur. Il est donc important de connaître l'épidémiologie et la biologie des anophèles.

IV.1. Insectes vecteurs : les anophèles femelles

Plus de 400 espèces d'anophèles sont décrites à travers le monde [9]. La complexité de ce groupe de moustiques rend leur seule analyse morphologique insuffisante pour l'identification d'espèce. L'apport de la biologie moléculaire dans ce domaine clarifie encore actuellement la taxonomie des anophèles [30-31]. Toutes les anophèles femelles ne sont pas vectrices du paludisme.

IV.1.1. Conditions nécessaires à la vectorisation

Leur capacité à transmettre une ou plusieurs espèces plasmodiales dépend de différents facteurs [30] :

- La longévité de vie des anophèles doit être suffisante pour permettre le cycle sexué complet du *Plasmodium* et ainsi la production de sporozoïtes viables dans les glandes salivaires.
- La préférence trophique du moustique piqueur. Les anophèles piquent de nombreux vertébrés. Celles anthropophiles sont des vecteurs indispensables à la dissémination des *Plasmodium* sp. humains (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*).
- La corrélation entre l'habitat du moustique et celui de l'hôte intermédiaire : forêts, marais, montagnes, zones dégagées,...
- La présence de l'hôte intermédiaire impaludé dans la zone géographique d'habitat du moustique.
- L'heure d'activité de l'anophèle doit coïncider avec le pic de gamétozoïtes dans le sang circulant de l'hôte intermédiaire.

- La température extérieure : c'est un facteur déterminant pour le développement du *Plasmodium* lors de son passage chez l'hôte définitif. Lorsque la température baisse, la sporogonie est fortement ralentie, parfois même stoppée. Les anophèles étant plus largement répandues dans le monde que les *Plasmodium*, des variations de facteurs climatiques (augmentation de la température par exemple) modifient cet écosystème et augmentent la surface endémique du paludisme.

IV.1.2. Caractéristiques des anophèles femelles impliquées dans la transmission de *P. knowlesi*

Le cycle érythrocytaire des *Plasmodium* est synchronisé sur le rythme des repas sanguins des anophèles, bien que l'explication de ce mécanisme soit encore inconnue. Pour *P. knowlesi*, dont le cycle érythrocytaire est quotidien, les densités maximales parasitaires asexuées et sexuées ont respectivement lieu à 20h00 et 02h00 (*figures 16 et 17*) [16]. La transmission de *P. knowlesi* à l'insecte vecteur est donc facilitée, sa période maximale d'activité étant de 19h00 à 06h00 du matin [32-33].

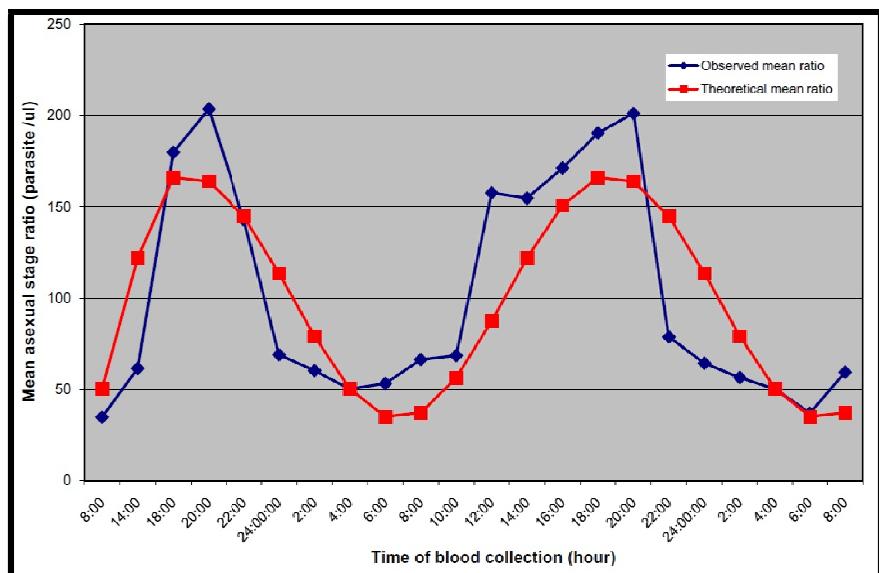


Figure 16 : Graphique présentant la périodicité du cycle schizogonique érythrocytaire de *P. knowlesi* [16].

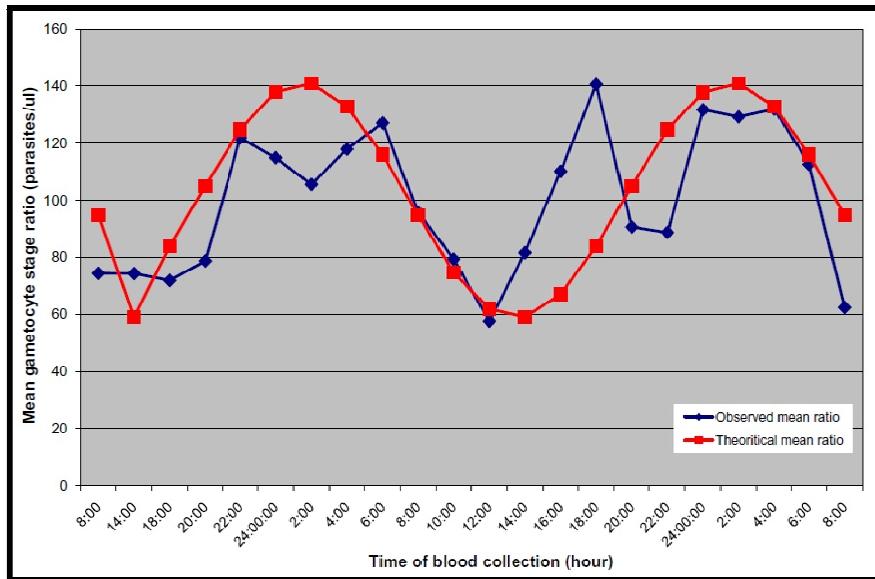


Figure 17 : Graphique présentant la périodicité du cycle gamétoctytaire de *P. knowlesi* [16].

En ce qui concerne *P. knowlesi*, les anophèles vectrices sont donc celles vivant dans les forêts peuplées de singes infectés (Sud-Est asiatique), et dont l'activité hématophage est mixte (anthropophile et simiesque).

Le **Tableau 1** ci-dessous présente les préférences trophiques, les habitats, les répartitions géographiques, et les vecteurs potentiels des 14 espèces d'anophèles les plus représentées en Asie du Sud-Est. Les espèces les plus à risque de transmettre *P. knowlesi* sont celles du groupe *Leucosphyrus* : *A. lateens* et *A. cracens* (les plus incriminées), suivies d'*A. dirus*, *A. leucosphyrus*, *A. balabacensis* et *A. hackeri* [5, 30-31]. Une seule piqûre de ces anophèles contaminées suffit à infecter l'Homme [32]. De plus, elles sont capables de transmettre les autres *Plasmodium* humains, augmentant le risque d'infections mixtes, de diagnostic difficile.

Tableau 1 : Tableau présentant les espèces d'anophèles vectrices de paludismes humains et simiens les plus fréquentes en Asie du Sud-Est [30].

Anopheles species	Mosquito group	Ecological habitat	Preferred host (ratio)	Geographic range	Plasmodium sp. transmitted*
<i>Anopheles latens</i> (<i>leucosphyrus</i>)	Leucosphyrus	Forest, fringe farms	Monkeys and humans (1:1)	Borneo, Malaysia	<i>Pk, Pv, Pc, Pi, Pf</i>
<i>Anopheles cracens</i> (<i>balabacensis</i>)	Leucosphyrus	Forest, orchards	Monkeys and humans (1:5)	Malaysia, Thailand, Philippines	<i>Pk, Pv, Pc, Pi, Pf</i>
<i>Anopheles dirus</i>	Leucosphyrus	Forest, orchards	Monkeys and humans (1:5)	Thailand, Cambodia, Vietnam	<i>Pk, Pv, Pc, Pi, Pf</i>
<i>Anopheles leucosphyrus</i>	Leucosphyrus	Forest, orchards, shaded pools	Monkeys and humans	Indonesia	<i>Pk, Pv, Pc, Pi, Pf</i>
<i>Anopheles balabacensis</i>	Leucosphyrus	Forests, hilly pools, streams	Monkeys	Philippines, Indonesia, Malaysia	<i>Pk, Pv, Pc, Pi, Pf</i>
<i>Anopheles heckeri</i>	Leucosphyrus	Forests, streams, pools	Monkeys	Peninsular Malaysia	<i>Pk, Other simian malaria</i>
<i>Anopheles flavirostris</i>	Non-leucosphyrus	Forest, streams, pools	Humans and monkeys	Philippines	<i>Pv, Pf, Pm, Po</i>
<i>Anopheles maculatus</i>	Non-leucosphyrus	Sunlit streams, pools, clearings	Zoophilic and humans	Southeast Asia, Indonesia	<i>Pv, Pf, Pm, Po, Pc, Pi</i>
<i>Anopheles minimus</i>	Non-leucosphyrus	Clear streams, pools, paddies	Humans	South/Southeast Asia, Philippines	<i>Pv, Pf, Pm, Po</i>
<i>Anopheles lefifer</i>	Non-leucosphyrus	Freshwater swamp, shaded pools	Humans	Malaysia, Thailand	<i>Pv, Pf, Pm, Po, Pc, Pi</i>
<i>Anopheles f. nivariensis</i>	Non-leucosphyrus	Grassy streams, swamps, carals	Humans	South Asia	<i>Pv, Pf, Pm, Po</i>
<i>Anopheles sundanicus</i>	Non-leucosphyrus	Mangrove, sunlit brackish pools	Cattle and humans	South/Southeast Asia	<i>Pv, Pf, Pm, Po, Pc, Pi</i>
<i>Anopheles culicifacies</i>	Non-leucosphyrus	Ditches, wells, pits, riverbeds	Humans	India, Myanmar	<i>Pv, Pf, Pm, Po</i>
<i>Anopheles farauti</i>	Non-leucosphyrus	Shady swampy pools, mangrove	Zoophilic and humans	New Guinea, Solomon Islands	<i>Pv, Pf, Pm, Po</i>

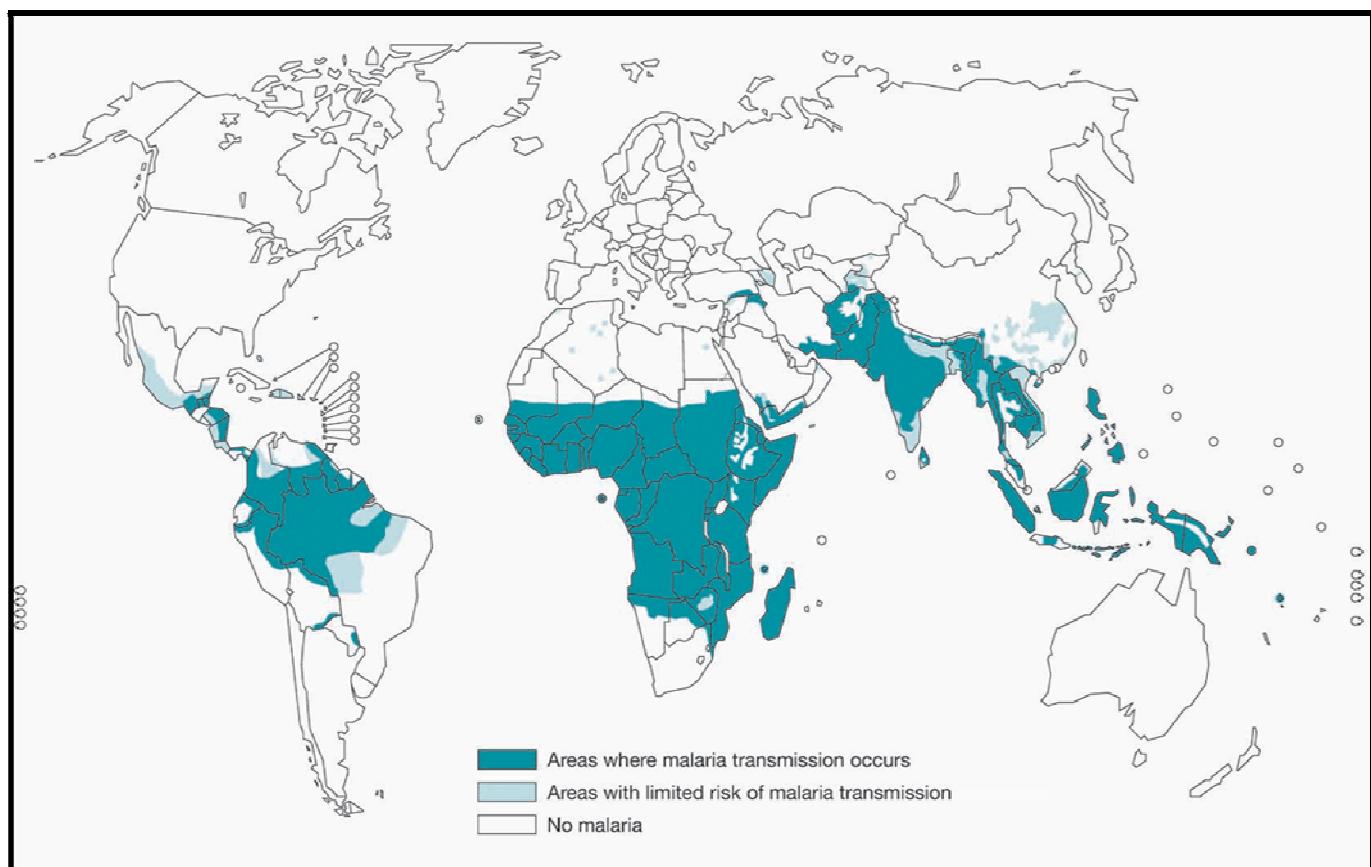
* Abbreviations: *Pk*, *Plasmodium knowlesi*; *Pm*, *Plasmodium falciparum*; *Pv*, *Plasmodium vivax*; *Pc*, *Plasmodium ovale*; *Po*, *Plasmodium malariae*; *Pi*, *Plasmodium inui*; *Pf*, *Plasmodium falciparum*; *Pn*, *Plasmodium cynomolgi*.

IV.2. Répartition géographique

IV.2.1. Généralités

En 2006, l'OMS estimait l'importance du paludisme à 500 millions de cas humains (247 millions de cas référencés) à travers 109 pays répartis dans le monde entier, causant environ un million de décès chaque année [34].

Les zones équatoriales et tropicales associent des températures élevées et des eaux stagnantes essentielles pour le développement des anophèles et pour le bon déroulement du cycle sporogonique palustre. Ces régions sont donc endémiques pour le paludisme, durant toute l'année ou uniquement pendant la saison des pluies [9, 34]. La [figure 18](#) présente les pays où le paludisme est endémique. Sur cette carte, seuls *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* sont représentés.



[Figure 18](#) : Planisphère illustrant les zones impaludées en 2008 [34].

IV.2.2. *Plasmodium knowlesi* dans le monde

IV.2.2.1. Analyse des cas d'infections à *P. knowlesi* par biologie moléculaire

L'épidémiologie de *P. knowlesi* est bien moins documentée que celle des quatre autres *Plasmodium* humains. Bien que l'espèce soit connue depuis 1931 [2], l'impact sur la population humaine a longtemps été considéré comme négligeable [13]. Ce n'est qu'en 2004, avec les outils de la biologie moléculaire, que l'Homme prend conscience du problème de santé publique que cette espèce plasmodiale représente.

En effet, *P. knowlesi* est mis en évidence lorsque l'équipe du Professeur B. Singh entreprend le séquençage du gène codant pour la petite sous-unité ribosomique d'une souche de diagnostic difficile (initialement identifiée comme *P. malariae* d'après les critères morphologiques, mais non confirmée par amplification génique utilisant des amorces spécifiques). Cette même équipe réalise par la suite une analyse rétrospective de 208 prélèvements sanguins diagnostiqués positifs pour la recherche de *P. malariae*, par microscopie optique. L'analyse des séquences du gène codant pour la petite sous-unité ribosomique montre qu'un peu plus de la moitié de ces patients (58 %) sont en réalité infectés par *P. knowlesi* [6]. D'autres études similaires réalisées dans les régions avoisinantes (Thaïlande, Philippines, Singapour, Bornéo, Péninsule Malaisienne) montrent que *P. knowlesi* est largement représenté en Asie du Sud-Est [4, 35-38].

La figure 19 présente les résultats de la plus grosse étude prospective publiée concernant *P. knowlesi*, et porte sur 960 patients hospitalisés pour paludisme en Malaisie [36]. Le diagnostic morphologique par microscopie optique est évalué par rapport à une technique de PCR nichée. Dans la figure 19 A, sur les 218 souches identifiées comme *P. falciparum* par microscopie optique, 14 sont en réalité *P. knowlesi*, seul ou associé à un autre *Plasmodium* (6 %). Pour les 430 isolats identifiés morphologiquement comme *P. vivax* (figure 19 B), 24 sont *P. knowlesi* (6 %). Une unique souche *P. ovale* (figure 19 C), très peu présent dans cette région du monde, a été correctement diagnostiquée en microscopie et confirmée par PCR. Enfin, pour *P. malariae*, (figure 19 D), les résultats sont discordants : sur les 312 souches identifiées par critères morphologiques, seule une correspond réellement à l'espèce *P. malariae*, alors que 228 de ces souches sont *P. knowlesi* d'après l'analyse

moléculaire (73 %). D'un point de vue plus global, les infections dues à *P. knowlesi* représentent plus de 25 % des admissions pour paludisme en Malaisie (266 patients sur les 960 hospitalisés). De plus, la difficulté à différencier *P. knowlesi* de *P. malariae* selon des critères morphologiques est flagrante.

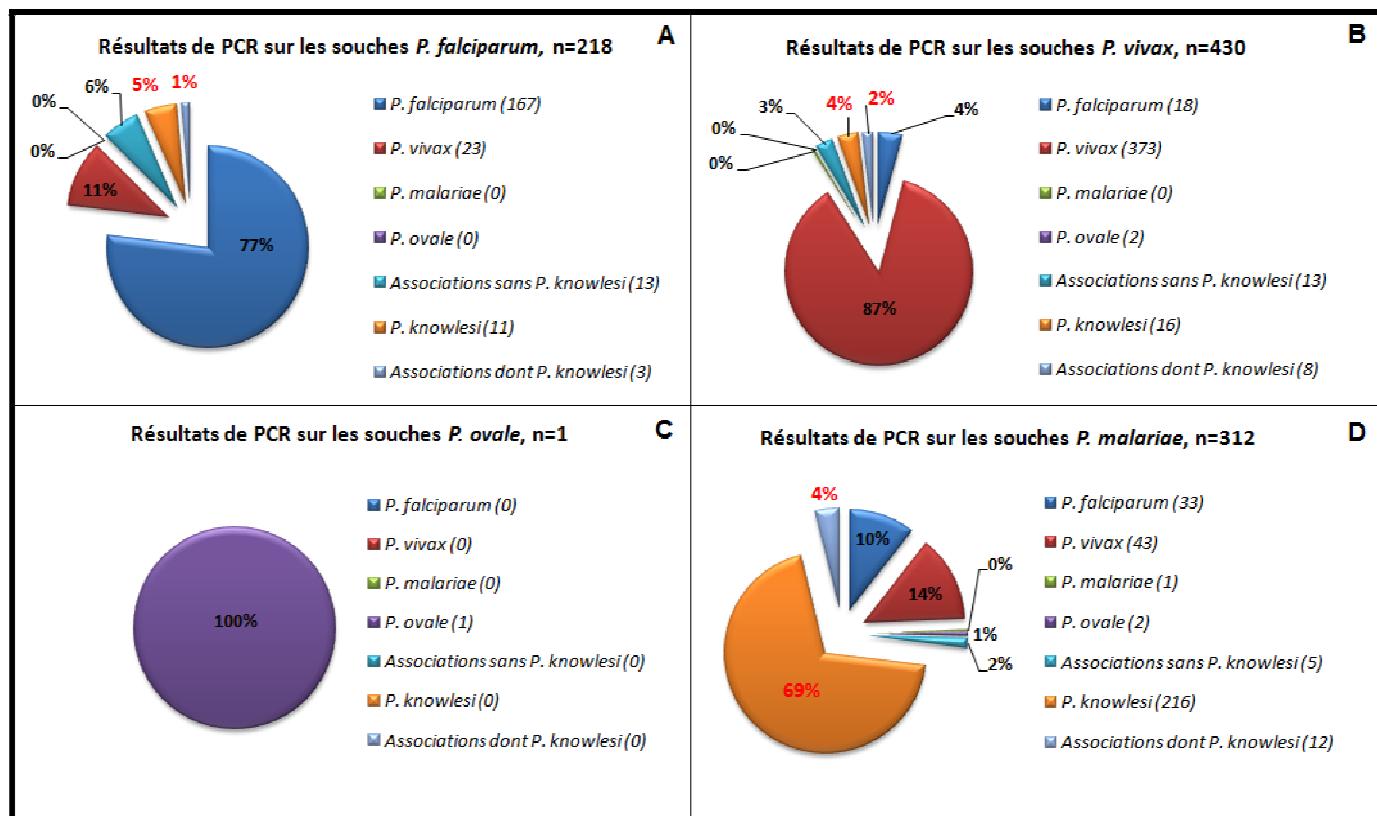


Figure 19 : Présentation des résultats obtenus dans l'étude prospective de Cox-Singh et coll. [36] portant sur 960 patients hospitalisés pour paludisme en Malaisie. Les résultats de microscopie optique sont comparés à ceux de PCR nichée.

IV.2.2.2. Répartition actuelle et hypothèses évolutives

Les infections humaines à *P. knowlesi* sont toujours décrites dans un contexte d'habitat forestier alliant le singe et l'anophèle vectrice. A l'heure actuelle, la transmission interhumaine n'a pas pu être prouvée, mais ne peut pour autant pas être exclue. En effet, les déforestations favorisent le rapprochement de l'Homme et des singes, et les contaminations humaines se multiplient. L'évolution de la contagiosité de cette anthropozoonose est donc délicate à prédire [39].

Les figures 20 et 21 synthétisent les données actuelles concernant la biologie des anophèles vectrices, celle des singes réservoirs, ainsi que les cas d'infections humaines dans le Sud-Est asiatique [5, 39]. A ce jour, plus de 527 cas de transmissions « naturelles » (hors infections volontaires de laboratoire) de *P. knowlesi* sont décrites dans le Sud-Est asiatique. Sachant que dans cette région du monde, l'OMS estime à 100 millions le nombre de cas de paludisme chaque année, et que *P. knowlesi* représente près d' $\frac{1}{4}$ des admissions pour paludisme en Malaisie [36], cette infection pose un réel problème de santé publique [30]. D'autres études à plus grande échelle sont nécessaires pour vérifier l'absence d'infection naturelle à *P. knowlesi* dans d'autres zones du globe.

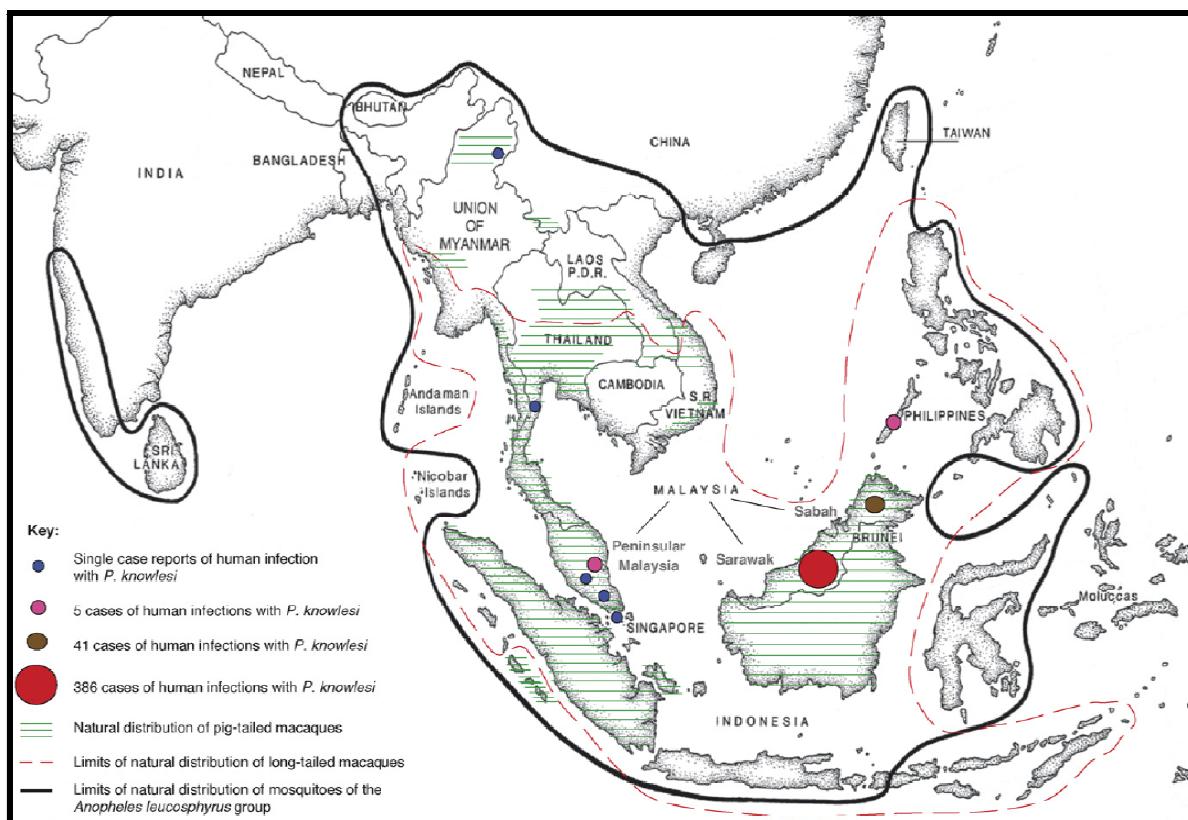


Figure 20 : Répartition des différents acteurs de l'infection à *P. knowlesi* dans le Sud-Est asiatique, 2008 [5].

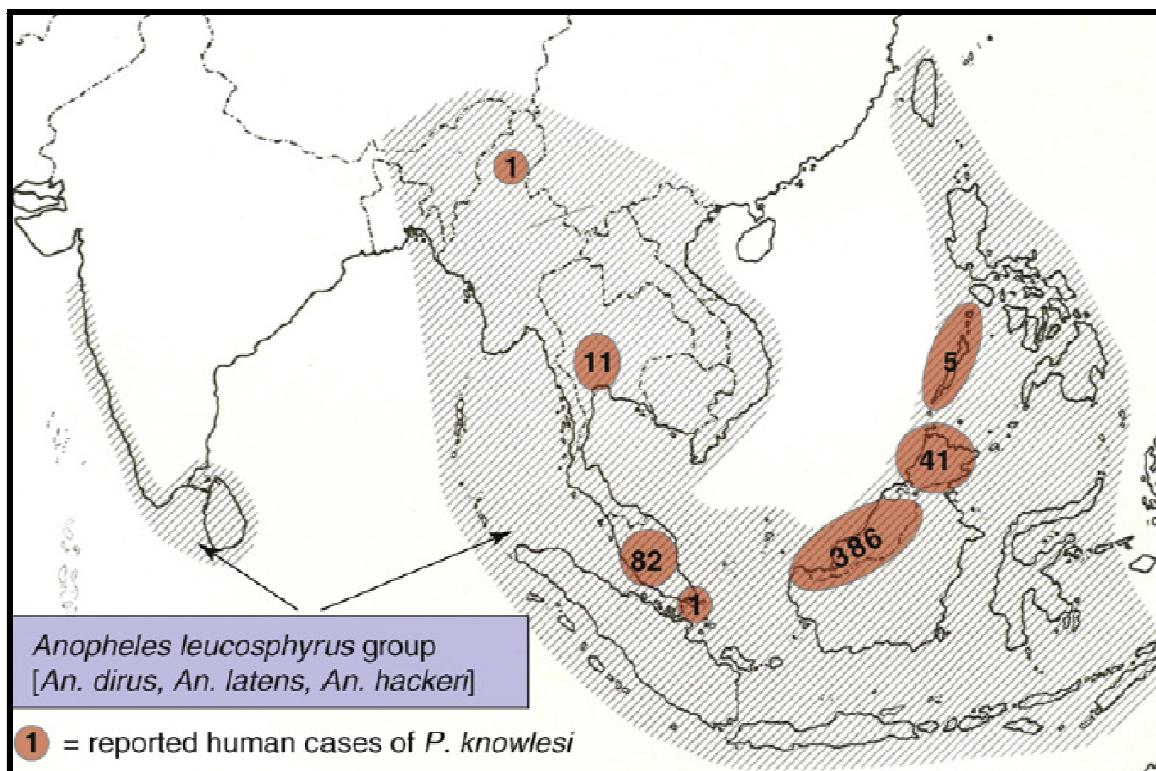


Figure 21 : Mise à jour de 2010 de la carte de la [figure 20](#) [39].

En France métropolitaine, le paludisme a été éradiqué depuis un demi-siècle. L'incidence des cas d'importation était estimée en 2008 à 4500 cas par an [40]. Les cas d'importation de paludisme à *P. knowlesi* se multiplient à travers le monde, comme en Europe (Suède, Finlande, Espagne, France), et aux Etats-Unis [41-44]. Même si à ce jour le CNR français n'a référencé qu'un seul cas (Toulouse), le développement économique et l'attrait touristique pour les régions du Sud-Est asiatique (*figure 22*) laisse supposer que le nombre d'infections importées à *P. knowlesi* va augmenter [40].

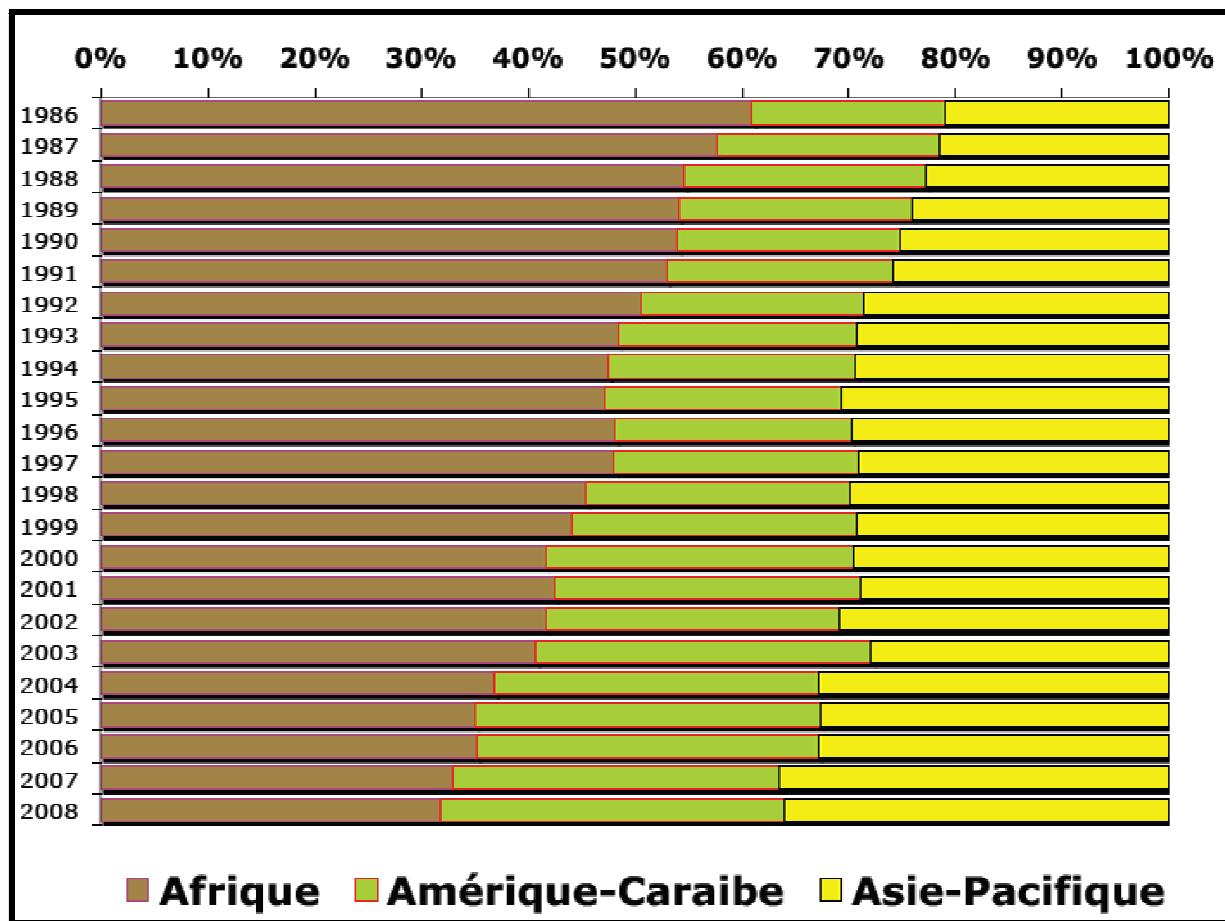


Figure 22 : Evolution au cours du temps des destinations des voyageurs français en pays impaludés [40].

V. Manifestations clinico-biologiques

La première étude prospective d'évaluation des manifestations clinico-biologiques de *P. knowlesi* date de 2009 et porte sur 107 patients admis à l'hôpital de Kapit, Sarawak, Malaisie [45].

Après une incubation hépatique d'une dizaine de jours, les premiers symptômes liés à la schizogonie érythrocytaire apparaissent. La durée moyenne de ces symptômes avant l'hospitalisation est de 3 à 5 jours. Comme tous les paludismes, ces premiers symptômes ne sont pas spécifiques et ressemblent aux symptômes d'une maladie virale systémique mineure : céphalées (94,4 %), malaise (89,7 %), myalgies (87,9 %), toux (56,1 %), douleurs abdominales (52,3 %), hépatomégalie (24,3 %), hypersplénisme (15,0 %), suivis de fièvre (100 %), de frissons (100 %), d'anorexie (83,2 %) et de vomissements (33,6 %). Le tableau biologique montre une thrombopénie à l'admission quasi-constante (98 %) pouvant être sévère (valeur moyenne = 71 Giga / L), une augmentation de la Protéine C-Réactive, et une perturbation du bilan hépatique avec hyper-bilirubinémie et augmentation des transaminases [45]. Il s'agit là du tableau typique d'un paludisme simple, la parasitémie et l'anémie restant limitées [28, 41, 45]. A ce stade, lorsque rien n'indique un dysfonctionnement des organes vitaux, le taux de létalité est faible [46].

La nature de la maladie clinique dépend beaucoup de l'intensité de la transmission palustre dans la région où réside le malade, qui elle-même détermine le niveau d'immunité protectrice acquis. Les résidents des zones d'endémie connaissent souvent bien cette association de symptômes et en font eux-mêmes le diagnostic [28, 38, 41-42, 45-47]. Dans nos régions d'Europe non endémiques, les patients atteints sont majoritairement naïfs du point de vue de leur immunité anti-paludique. Le risque de développer un paludisme grave à la suite d'un séjour en zone d'endémie, est donc très important, et le diagnostic se doit d'être le plus précoce possible. Le cycle rapide de multiplication asexuée de *P. knowlesi* (24 heures) explique la rythmicité journalière des pics fébriles (*figure 23*), et le haut risque d'évolution en paludisme grave [28, 45].

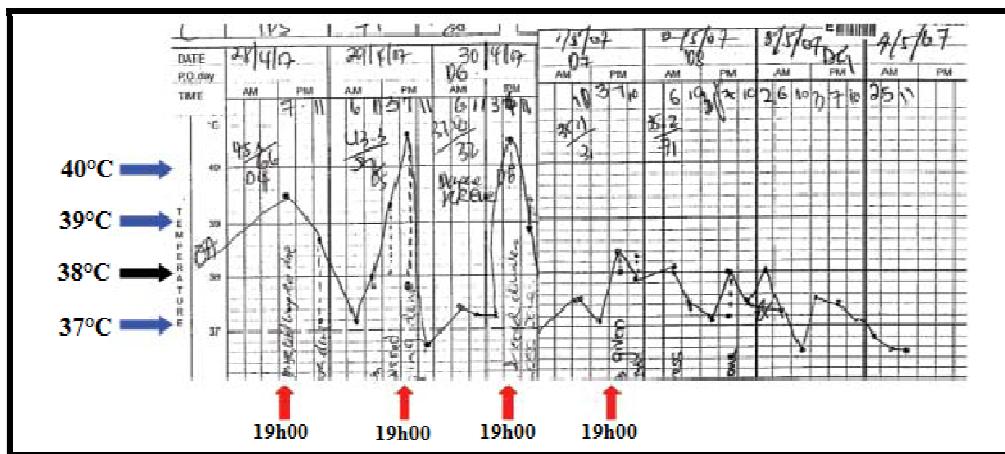


Figure 23 : Courbe de température d'un patient infecté, parasitémie de 0,2 %, Singapour [47].

Les critères de gravités sont définis par l'OMS et la SPILF, et sont résumés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Critères de définition du paludisme grave d'importation chez l'adulte [48].

Pronostic	Critères cliniques ou biologiques	Fréquence
+++	Toute défaillance neurologique incluant :	+++
	<ul style="list-style-type: none"> - obnubilation, confusion, somnolence, prostration - coma avec score de Glasgow < 11 	
+++	Toute défaillance respiratoire incluant :	+
	<ul style="list-style-type: none"> - si VM ou VNI : $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300 \text{ mmHg}$ - si non ventilé $\text{PaO}_2 < 60 \text{ mmHg}$ et/ou $\text{SpO}_2 < 90\%$ en air ambiant et/ou FR > 32/mn - signes radiologiques : images interstitielles et/ou alvéolaires 	
+++	Toute défaillance cardio-circulatoire incluant :	++
	<ul style="list-style-type: none"> - pression artérielle systolique < 80 mmHg en présence de signes périphériques d'insuffisance circulatoire - patient recevant des drogues vasoactives quel que soit le chiffre de pression artérielle - signes périphériques d'insuffisance circulatoire sans hypotension 	
++	Convulsions répétées : au moins 2 par 24 h	+
++	Hémorragie : définition clinique	+
+	Ictère : clinique ou bilirubine totale > 50 $\mu\text{mol/l}$	+++
+	Hémoglobinurie macroscopique	+
+	Anémie profonde : hémoglobine < 7 g/dl, hématocrite < 20 %	+
+	Hypoglycémie : glycémie < 2,2 mmol/l	+
+++	Acidose :	++
	<ul style="list-style-type: none"> - bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/l - ou acidémie avec $\text{pH} < 7,35$ <p>(surveillance rapprochée dès que bicarbonates < 18 mmol/l)</p>	
+++	Toute hyperlactatémie :	++
	<ul style="list-style-type: none"> - dès que la limite supérieure de la normale est dépassée - <i>a fortiori</i> si lactate plasmatique > 5 mmol/l 	
+	Hyperparasitémie : dès que parasitémie > 4 %, notamment chez le non immun (selon les contextes les seuils de gravité varient de 4 à 20 %)	+++
++	Insuffisance rénale :	+++
	<ul style="list-style-type: none"> - créatininémie > 265 $\mu\text{mol/l}$ ou urée sanguine > 17 mmol/l - et diurèse < 400 ml/24 h malgré réhydratation 	

VM : ventilation mécanique ; VNI : ventilation non invasive ; FR : fréquence respiratoire

Sur les 107 patients infectés par *P. knowlesi* dans l'étude, 9,3 % ont développé un ou plusieurs de ces critères de gravité : l'hyperparasitémie (2,8 % des patients ont développé une parasitémie supérieure à 2 %), l'hypotension, l'insuffisance rénale aigüe, l'ictère, l'hypoglycémie, l'acidose lactique, l'anémie sévère ou une détresse respiratoire [46]. Les atteintes nerveuses, fréquentes dans les accès graves à *P. falciparum*, n'ont pas été observées. En l'absence de traitement, le paludisme grave est presque toujours mortel. Malgré le traitement mis en place, 2 patients (1,9 %) sont décédés.

Sept décès suite à des infections naturelles à *P. knowlesi* ont été décris dans la littérature [28, 36, 45]. Tous les patients souffraient d'une parasitémie supérieure à 2 % (parasitémie maximale = 764,720 parasites / μ L soit environ 17 % d'hématies parasitées) et d'une insuffisance respiratoire. L'autopsie d'un des cas correspondant à une parasitémie de 10 %, montre des séquestrations importantes d'hématies parasitées associées à des hémorragies pétéchiales sans inflammation dans le foie, les reins, le cœur, les poumons et le cerveau [28].

Malgré le faible nombre de cas décrits, il semble que la pathogénie des accès graves à *P. knowlesi* soit la conséquence d'obstructions mécaniques liées aux fortes parasitémies, induisant une défaillance multiviscérale. L'accumulation d'hématies parasitées dans la microcirculation évoque l'hypothèse d'une cytoadhérence liée à l'expression de molécules issues de la famille de gènes SICAvar (Schizont Infected Cell Agglutination variant) récemment mise en évidence [28, 49].

La physiopathologie est cependant différente de celle des accès à *P. falciparum* : tous les stades parasitaires de *P. knowlesi* sont retrouvés dans la circulation sanguine, indiquant une faible filtration des éléments parasitaires par la rate et donc peu de frein à l'augmentation de la parasitémie. De plus, aucune surexpression ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule) à la surface des cellules cérébrales endothéliales n'a pu être mise en évidence (molécules induisant une adhérence des hématies parasitées au niveau des artéries cérébrales, responsables des troubles nerveux et du coma du neuropaludisme à *P. falciparum*) [28].

VI. Diagnostic

Le diagnostic rapide du paludisme utilise différentes techniques, simples à mettre en œuvre mais parfois complexes dans leur interprétation.

VI.1. Diagnostic direct

VI.1.1. Techniques microscopiques

VI.1.1.1. Le frottis mince

Systématiquement réalisée, c'est la technique de référence pour le diagnostic du paludisme. Cinq microlitres de sang sont étalés en couche mince (frottis) sur une lame de verre. Après coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG), le frottis est lu au microscope optique (grossissement x 1000) et les différents stades parasitaires sont recherchés dans les hématies du patient. Cette technique a l'avantage de permettre l'identification d'espèce selon les critères morphologiques définis par Garnham (1966) et la quantification de la parasitémie (nombre d'hématies parasitées / nombre d'hématies totales x 100). Elle est peu coûteuse, rapide et obligatoire pour le diagnostic de paludisme. Le seuil de sensibilité est évalué à 100 hématies parasitées / μL de sang (parasitémie de 0,01 %) [50].

VI.1.1.2. La goutte épaisse rapide

Cette technique permet de concentrer les *Plasmodium* éventuellement présents dans l'échantillon, en analysant un volume de sang (5 μL) sur une petite surface (1 cm^2). Après défibrillation, lyse des érythrocytes et coloration de la lame au MGG, les éléments parasitaires sont recherchés au microscope (grossissement x 1000). Du fait de l'hémolyse, les parasites ne s'observent pas dans les hématies, modifiant ainsi certains caractères morphologiques d'identification spécifique. Le lecteur doit ici être expérimenté car

l'identification d'espèce est beaucoup plus difficile que sur le frottis. En revanche, le seuil de sensibilité est bas, évalué à 10 hématies parasitées / μL de sang. La parasitémie est évaluée par rapport au nombre de globules blancs [51].

VI.1.1.3. La technique QBC[®]

La technique QBC[®] (Quantitative Buffy Coat) utilise un fluorochrome, l'acridine orange, intercalant des acides nucléiques. Un volume de 40 à 60 μL de sang est injecté dans un capillaire de verre contenant un flotteur en polystyrène occupant 90 % du diamètre du tube. Suite à une centrifugation, le flotteur se place par gravité au niveau de la zone de séparation érythrocytes-leucocytes et permet une répartition des éléments du sang en une couche monocellulaire. Le noyau des *Plasmodium* apparaît fluorescent, coloré en vert. La lecture du microtube en verre se fait directement au microscope à fluorescence. Cette technique plus coûteuse que les premières citées présente un seuil de sensibilité remarquable, permettant de détecter de une à cinq hématies parasités / μL de sang [52]. Cependant, elle nécessite du matériel spécifique (microscope à fluorescence, filtres de longueur d'onde spécifique de l'acridine orange, centrifugeuse et capillaires), et les réactifs sont difficilement disponibles (uniquement dans les hôpitaux militaires). De plus, elle ne permet pas d'identifier l'espèce plasmodiale ni de déterminer la parasitémie.

VI.1.2. Méthodes Immunochromatographiques

Grâce au développement d'anticorps monoclonaux spécifiques, la détection d'antigène par test rapide est proposée par plusieurs sociétés. Leur simplicité et leur rapidité d'exécution leurs valent le nom de Tests de Diagnostic Rapide (TDR). En pratique, une goutte de sang est déposée sur une bandelette sensibilisée par des anticorps monoclonaux anti-*Plasmodium*. Après migration et révélation par un second anticorps marqué, une bande de précipitation visible à l'œil nu apparaît, signant la présence du genre *Plasmodium*, ou des différentes espèces, suivant le test. En comparaison des techniques précédentes, cet outil simple d'utilisation, ne nécessite pas un personnel spécialisé pour sa réalisation. Cependant,

sa sensibilité et sa spécificité, en particulier pour l'espèce *P. ovale* et ce quelque soit le fournisseur, ne sont jamais de 100 %. Ainsi, ce test rapide ne doit jamais être utilisé isolément mais en complément du frottis et de la goutte épaisse.

Trois types d'antigènes peuvent être recherchés suivant les tests :

- HRP II : Histidin rich Protein II. Cette protéine est exprimée à la surface des hématies parasitées uniquement durant le cycle intra-érythrocytaire non-sexué de *P. falciparum*.
- La lactate deshydrogénase des *Plasmodium* (LDHp) : cette enzyme possède de nombreux sites antigéniques, conduisant à la fabrication de plusieurs anticorps monoclonaux anti-LDHp [53]. Ceux-ci peuvent se fixer sur des épitopes communs à toutes les LDHp (géno-spécifiques) ou spécifiques d'une espèce plasmodiale.
- L'aldolase, antigène « pan-palu », présente chez tous les *Plasmodium* sp.

Afin d'évaluer la capacité de *P. knowlesi* à positiver ces tests rapides, McCutchan et coll. [54] étudient en 2008 la capacité de ces Ac anti-LDHp à se fixer sur la LDHp de *P. knowlesi*. Comme le montre la figure 24 ci-dessous, la LDHp de *P. knowlesi* est capturée par l'Ac monoclonal 6C9, issu d'un épitope commun à tous les *Plasmodium* sp. Elle se fixe également à des panels d'Ac considérés jusqu'alors spécifiques de *P. falciparum* (17E4/7G9) et de *P. vivax* (11D12/13H11). En fonction des Ac anti-LDHp utilisés dans les kits commerciaux, *P. knowlesi* révélera donc une bande Pan-Palu (6C9), *P. falciparum* et *P. vivax*, mais aucune bande *P. ovale* ou *P. malariae*.

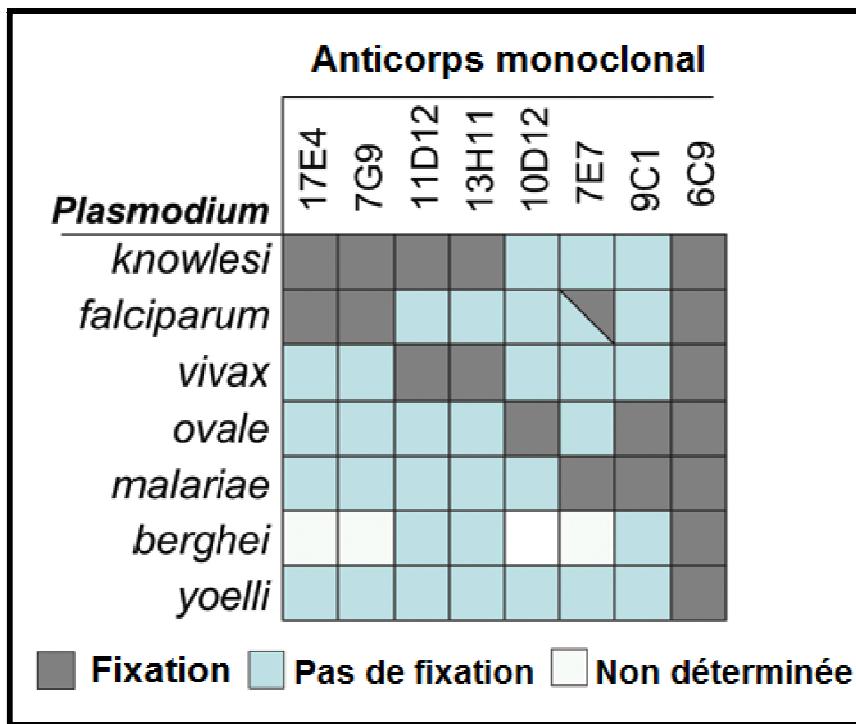


Figure 24 : Synthèse des résultats obtenus lors d'immunocaptures réalisées entre les Ac monoclonaux anti-LDHp et les LDHp de 7 espèces différentes de *Plasmodium* [54].

En 2009, Bronner et coll. [42], testent sur un patient infecté par *P. knowlesi* à faible parasitémie (0,01 %) le Binax Now Malaria®, recherchant les antigènes HRP II et l'aldolase [42]. Le test reste négatif, ce qui est logique en ce qui concerne l'antigène HRP II, mais étonnant pour l'aldolase. D'autres études sont nécessaires afin d'évaluer la capacité de *P. knowlesi* à positiver les tests utilisant l'antigène aldolase.

Le seuil de sensibilité de ces techniques antigéniques est inférieur aux méthodes de référence et permet de détecter 200 hématies parasitées / μL de sang (parasitémie de 0,004 %) [53]. Lorsque le traitement est instauré, les antigènes relargués dans la circulation positivent ces tests, expliquant des cas de tests rapides positifs associés à des parasitémies négatives par méthodes microscopiques, malgré un seuil de sensibilité inférieur.

VI.1.4. Techniques de biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire ont pour but de mettre en évidence le matériel génétique du parasite dans le sang du patient. De nombreuses techniques d'amplification par PCR ou d'hybridation de sondes marquées ont été décrites [6, 14, 44, 55-64].

Sans remplacer les méthodes de référence (microscopie), la biologie moléculaire offre un bénéfice certain dans le diagnostic du paludisme. La microscopie optique, en plus d'être opérateur dépendante, est souvent insuffisante pour les cas de diagnostics difficiles : défaut de sensibilité dans les infections pauci-parasitaires, et défaut de spécificité dans les infections mixtes ou dans les accès palustres dus à *P. knowlesi* (non différenciables morphologiquement de *P. falciparum* et/ou *P. malariae*) [6, 25, 55].

Le seuil de sensibilité varie en fonction de la technique utilisée, mais il est inférieur aux techniques classiques. Pour les méthodes d'amplification, il est de l'ordre de 0,001 à 0,3 parasites par microlitre [55, 60].

Les différentes techniques de biologie moléculaire développées dans la littérature pour le diagnostic de *P. knowlesi* sont détaillées dans la partie 2.

VI.2. Diagnostic indirect

Des méthodes indirectes mettant en évidence les anticorps circulants sont utilisées pour connaître le statut sérologique des patients dans des études épidémiologiques mais également lors des dépistages chez les donneurs de sang. En revanche ces techniques ne présentent aucun intérêt en diagnostic.

La recherche d'anticorps circulants se fait par technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) ou d'IFI (ImmunoFluorescence Indirecte), technique de référence, à l'aide de lames sensibilisées par *P. falciparum* (*falciparum*-Spot IF®, Biomérieux). La lame est incubée avec le sérum du patient, puis révélée par l'ajout d'une anti-globuline humaine marquée à la fluorescéine. La lecture se fait au microscope à fluorescence, où les trophozoïtes intra-érythrocytaires prennent une coloration verte [65].

VI.3. Récapitulatif des outils diagnostiques pour *P. knowlesi*

Parmi les techniques existantes, seules les méthodes directes sont d'intérêt pour le diagnostic du paludisme. En fonction du test utilisé, les seuils de sensibilité diffèrent, et sont récapitulés dans le **Tableau 3** ci-dessous.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des seuils de sensibilité des techniques utilisées pour le diagnostic du paludisme [48].

Méthode		Seuils de détection de la parasitémie pour <i>P. falciparum</i>	
		Nombre de parasites/ μ l	pour 100 hématies
Microscopiques	Frottis mince (20 minutes / 200 champs)	100	0,002
	Goutte épaisse (n champs / 500 leucocytes)	10-50	0,0002-0,001
	QBC malaria	10-50	0,0002-0,001
Tests rapides sur bandelette	Antigène HRP-2 (<i>P. falciparum</i>)	100	0,002
	<i>p</i> LDH (pan-malarique ± <i>pf</i> LDH (<i>P. falciparum</i>))	100-500	0,002-0,01
	Aldolase (pan-malarique)	500	0,01
Génomiques	PCR	5	0,0001

Selon les recommandations de l'OMS (2010) et de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF), l'examen de première intention reste le frottis mince associé à la goutte épaisse rapide [48, 66], car l'association de ces deux techniques permet d'identifier l'espèce responsable et de quantifier la parasitémie à faible coût avec un matériel simple et facilement accessible. Il peut être associé aux tests rapides en cas de doute, ou de traitement préalable. Dans nos régions non endémiques, où le statut

immunitaire de la population est naïf, le paludisme est une urgence diagnostique et le résultat doit être rendu au clinicien en moins de deux heures.

Tout prélèvement positif doit être déclaré au Centre National de Référence sous 48 heures, associé à l'envoi d'un échantillon sanguin pour des études épidémiologiques et de sensibilité aux anti-paludéens.

Les difficultés d'identification morphologique de *P. knowlesi* et sa multiplication rapide (cycle de 24 heures) augmentant le risque d'évolution d'un accès simple en accès grave, rendent les techniques classiques insuffisantes pour identifier cette espèce. L'amplification génique par biologie moléculaire, très sensible et très spécifique, permet de gagner un temps précieux dans l'identification de cette espèce particulièrement pathogène. Cependant, les techniques moléculaires, plus lourdes et coûteuses, restent réservées aux laboratoires spécialisés et présentant un recrutement de patients important.

VII. Traitements

VII.1. Médicaments antipaludéens

VII.1.1. Schizonticides érythrocytaires

VII.1.1.1. Alcaloïdes du quinquina : la quinine (Quinimax®)

Lors de son cycle de développement, le *Plasmodium* dégrade l'hémoglobine en ferriprotoporphirine membranaire (FP). Une fois liée aux protéines de liaison parasitaires, cette FP forme l'hémozoïne. La quinine entre en compétition avec les protéines de liaison, conduisant à la formation d'un complexe lytique membranaire, puis à une perméabilité de la membrane parasitophore et à la mort du parasite [67].

La quinine possède une activité schizonticide très importante, sur tous les *Plasmodium* sp. En revanche, son action sur les gamétocytes est faible, et nulle sur les formes intra-hépatiques [67].

Les effets secondaires cardiaques de cette molécule imposent une surveillance du malade par un électrocardiogramme [67]. Actuellement elle n'est de ce fait plus utilisée qu'en traitement curatif.

VII.1.1.2. Amino-4-quinoléines

Cette classe correspond aux premiers antipaludéens de synthèse. Deux molécules sont utilisées : la chloroquine (Nivaquine®) et l'amodiaquine (Flavoquine®) [67]. Le mécanisme d'action est le même que celui de la quinine.

La chloroquine est très bien tolérée et présente peu d'effets indésirables. C'est l'antipaludéen de choix dans les zones où les souches plasmodiales y sont sensibles, tant en chimioprophylaxie qu'en traitement curatif des accès simples autres qu'à *P. falciparum*.

L'amodiaquine possédant une toxicité hépatique et hématologique n'est plus recommandée.

VII.1.1.3. Aryl-amino-alcools

Ces antipaludéens sont des composés plus actifs, et utilisés dans les zones de chloroquinorésistance.

On compte parmi ces molécules :

- La mèfloquine (Lariam[®]) : le mécanisme d'action est le même que la quinine. Elle est active sur les schizontes de tous les *Plasmodium* sp., mais n'a aucune activité sur les formes hépatiques ou sexuées [67]. Sa demi-vie de 3 semaines permet la prise d'une dose hebdomadaire en chimio prophylaxie.
- L'halofantrine (Halfan[®]) : même mécanisme d'action que la mèfloquine. Elle n'est plus recommandée en première intention en raison de ses effets indésirables cardiaques.

VII.1.1.4. Les extraits du *Qinghaosu*

Plusieurs composés sont commercialisés dans le monde : artémisine, artéméther et artésunate.

Ce sont certainement les composés les plus actifs, ils agissent par alkylation des produits de dégradation de l'hémoglobine synthétisée par le parasite, conduisant *in situ* à la formation de radicaux libres toxiques. Seules les associations sont recommandées par l'OMS, afin de limiter les acquisitions de résistance.

En France, une autorisation de mise sur le marché existe depuis 2007 pour l'association artéméther + luméfantrine (Riamet[®]) [48].

VII.1.1.5. Antimétabolites

- Antifoliniques : proguanil (Paludrine[®]), pyriméthamine (Malocide[®])

Ils inhibent la déhydrofolate réductase plasmodiale, empêchant ainsi la synthèse des bases puriques et pyrimidiques, nécessaires à la réplication de l'ADN.

La pyriméthamine est actif sur les stades pré-érythrocytaires uniquement. Pour limiter l'apparition de résistance et en potentialiser l'action, la pyriméthamine n'est plus utilisée qu'en association.

Le proguanil est actif sur les stades pré-érythrocytaires, le cycle asexué et les sporozoïtes (anophèle) [67]. Il est surtout utilisé en association synergique avec la chloroquine (Savarine®), ou l'atovaquone (Malarone®).

- Inhibiteur de la synthèse pyrimidique : Atovaquone

Elle est active sur tous les stades parasitaires, et reste souvent sensible lors d'acquisition de résistance aux autres antipaludéens (mécanisme d'action indépendant). Cette molécule n'est utilisée qu'en association synergique avec le proguanil (Malarone®). Très bien tolérée et très efficace, son principal inconvénient est son coût élevé [67].

VII.1.1.6. Antibiotiques

La doxycycline (Doxypalu®) possède une action schizonticide utilisée en chimioprophylaxie, notamment dans les zones de chloroquino-résistance. Son effet indésirable majeur est la photosensibilisation, souvent handicapant en milieu impaludé (soleil).

La clindamycine possède un haut pouvoir schizonticide [67], elle est utilisée en association lors de traitements curatifs.

VII.1.2. Gamétocides

La primaquine appartient à la classe des amino-4-quinoléines. Elle est efficace sur les gamétocytes et les formes exo-érythrocytaires, tels que les hypnozoïtes de *P. vivax* et *P. ovale* [67].

L'effet indésirable majeur est son potentiel hémolytique développé chez les patients déficients en Glucose-6-Phospho-Deshydrogénase ou G6PD. Tout traitement par primaquine doit être précédé d'une recherche de cette déficience. Elle est contre-indiquée en cas de déficit majeur [48, 66].

VII.2. Schémas thérapeutiques

VII.2.1. Traitement curatif des accès simples à *P. falciparum*

Les schémas présentés correspondent aux recommandations de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) et sont adaptés des recommandations de l'OMS pour nos régions non-endémiques.

La chloroquine n'est plus utilisée, compte-tenu de la fréquence des résistances de *P. falciparum*. En première intention, la SPILF recommande l'utilisation de l'association Atovaquone+proguanil (Malarone®) ou l'arthéméter+luméfantrine par voie orale, ou en deuxième intention la quinine par voie parentérale associée à la clindamycine [48, 66].

VII.2.2. Traitement curatif des accès simples dus aux autres *Plasmodium* sp.

La très faible fréquence de résistances décrites permettent l'utilisation en première intention de la chloroquine par voie orale, associée à la primaquine pour la prévention des rechutes (*P. vivax* et *P. ovale*) [48, 66].

VII.2.3. Traitement curatif des accès graves

Quelque soit l'espèce, la quinine par voie parentérale reste le traitement de première intention des accès graves à *Plasmodium* sp. Même si l'OMS recommande l'utilisation des associations contenant un dérivé de l'artémisine qui montrent de meilleurs résultats, elles sont peu accessibles dans nos régions. La prise en charge doit se faire dans un service de réanimation, et associer les traitements symptomatiques nécessaires (transfusions, antipyrétiques, glucose, oxygénothérapie, hémodialyse,...) [48, 66].

VII.3. *P. knowlesi* et thérapeutique

Jusqu'en août 2010, aucun protocole de prise en charge thérapeutique précis n'est décrit dans la littérature pour le traitement des infections à *P. knowlesi*. Daneshvar et coll. [68] publient les résultats d'une étude effectuée sur 73 patients présentant des accès simples dus à *P. knowlesi*. Le protocole de traitement recommandé par l'OMS pour le traitement des accès simples à *P. vivax* est administré aux patients : chloroquine *per os* (10 mg / kg en bolus, puis 5 mg / kg à 6 h, 24 h et 48 h), puis primaquine 15 mg à J1 et J2. Le traitement instauré est très efficace, avec une négativation de la parasitémie en moyenne après 3 jours de traitement (suivi évalué par nested-PCR). La primaquine est instaurée par principe de précaution, même si aucune forme hypnozoïte n'a été décrite. Après le retour à domicile des patients, une PCR de contrôle a été effectuée à J28, toutes sont retrouvées négatives.

Devant cette grande sensibilité, la chloroquine est admise comme traitement de référence de prise en charge des accès simples de l'infection à *P. knowlesi* [68]. Les accès graves doivent être traités de la même façon que ceux à *P. falciparum* (quinine par voie parentérale ou associations comprenant un dérivé de l'artémisine).

D'autres antipaludéens ont été testés, *in vivo* : méfloquine [42], quinine [41], atovaquone-proguanil [69], ou *in vitro* : doxycycline [70], clindamycine [71], triméthoprime [72], artémisine [73]. Aucune résistance n'a été observée.

Cependant, dès 1952, Singh et coll. [74] décrivent après des expériences chez le singe des acquisitions de résistance induites au proguanil et à la pyriméthamine.

VII.4. Prophylaxie

La répartition des souches de *Plasmodium* résistantes aux antipaludéens est connue. En fonction de la région visitée, le pays endémique de destination du voyageur est classé selon trois degrés de résistance croissante définis par l'OMS. Les stratégies prophylactiques à adopter sont résumées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Schémas prophylactiques recommandés par la SPILF en fonction du pays de destination (hors femme enceinte) [48].

<i>Pays de destination</i>	<i>Schémas prophylactiques</i>	<i>Durée</i>
Pays du groupe 1	Chloroquine 100 mg (Nivaquine®) une prise par jour	Séjour + 4 semaines après
Pays du groupe 2	Chloroquine 100 mg + proguanil 200 mg (Nivaquine® + Paludrine®) ou Savarine® une prise par jour au cours d'un repas ou Atovaquone 250 mg + proguanil 100 mg (Malarone®) une prise par jour au cours d'un repas	Séjour + 4 semaines après Séjour + 1 semaine après Limitée à 3 mois consécutifs
Pays du groupe 3	Atovaquone 250 mg + proguanil 100 mg (Malarone®) une prise par jour au cours d'un repas ou Méfloquine 250 mg (Lariam®) une prise par semaine ou Monohydrate de doxycycline 100 mg (Doxypalu®, Granudoxy® Gé) une prise par jour, le soir	Séjour + 1 semaine après Limitée à 3 mois consécutifs 10 j avant + séjour + 3 semaines après Séjour + 4 semaines après

Aucune recommandation sur la molécule de chimioprophylaxie à adopter pour les zones endémiques de *P. knowlesi* n'existe, mais la sensibilité à la chloroquine observée dans le traitement des accès laisse supposer que la chloroquine est parfaitement efficace. Cependant, la présence de *P. falciparum* hautement résistant dans ces régions d'Asie du Sud-Est impose la prise du schéma prophylactique correspondant aux pays du groupe 3 présenté dans le tableau précédent [75]. A ce jour, la région de Singapour est déclarée par l'OMS exempte de paludisme, pourtant des cas récents d'infections à *P. knowlesi* ont été décrits [47]. En l'attente d'une réévaluation des cartes de l'OMS, une prophylaxie doit être prise pour tout voyageur se rendant dans cette région.

PARTIE 2 :

**DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE
DE PCR EN TEMPS REEL POUR LE
DIAGNOSTIC DE *Plasmodium knowlesi***

I. Problématique

Ces dernières années, l'augmentation des échanges internationaux a pour conséquence l'évolution des maladies infectieuses et ce malgré des mesures préventives croissantes. Concernant le paludisme, *P. knowlesi* est actuellement considéré comme une espèce émergente. Malgré une répartition géographique initialement bien délimitée, l'espèce a été découverte dans un nombre de plus en plus important de pays du Sud-Est asiatique d'après des études épidémiologiques rétrospectives citées préalablement. L'attrait croissant pour le tourisme de ces pays implique également pour les laboratoires en charge du diagnostic du paludisme une prise de conscience de cette menace grandissante. Ainsi, ces dernières années, plusieurs publications rapportent des cas mortels d'infections à *P. knowlesi* diagnostiquées bien souvent trop tard [4-6, 28, 36, 41-42, 44-45, 76].

En effet, comme nous l'avons exposé dans les parties précédentes, *P. knowlesi* possède des caractères morphologiques communs avec les espèces *falciparum* et *malariae*, rendant son identification complexe et incertaine avec les outils conventionnels tels que frottis, goutte épaisse et tests rapides [3, 6, 37, 44, 63]. Disposer d'une technique rapide, fiable et utilisable en routine est donc actuellement indispensable pour les centres régionaux impliqués dans les maladies infectieuses de patients au retour de zones d'endémie, qu'ils soient touristes ou professionnels (militaires). Les techniques de biologie moléculaire, en expansion dans le domaine de la microbiologie, semblent aujourd'hui répondre le mieux à ces exigences [6, 44, 63, 66].

Nous présentons dans la partie suivante l'état des lieux de la littérature concernant les méthodes développées en biologie moléculaire pour le diagnostic du paludisme à *P. knowlesi*. Ce bilan étant établi, nous expliquerons le choix de la technique développée dans nos centres et détaillerons la mise en place de ce test actuellement utilisable en routine au CHU de Nancy ainsi qu'à l'HIA Legouest.

II. Contexte scientifique

II.1. Le génome de *P. knowlesi* : état actuel des connaissances

Le génome de *P. knowlesi* a été entièrement séquencé et analysé en 2008, 6 ans après celui de *P. falciparum*, par l'équipe anglaise du Professeur Pain du *Wellcome Trust Institute* [49, 77-79]. C'est le premier génome de *Plasmodium* simien décrit et il est composé de 23,5 mégabases (Mb), réparties en 14 chromosomes. Le pourcentage en bases guanine et cytosine est faible (G+C : 37,5 %) et il contient, comme les autres *Plasmodium* humains, un peu plus de 5000 gènes codants pour des protéines. Pour approximativement 80 % des gènes putatifs de *P. knowlesi*, des gènes orthologues sont décrits chez *P. falciparum* et *P. vivax* [80].

D'un point de vue génomique, *P. knowlesi* se distingue des autres *Plasmodium* principalement par la répartition aléatoire de ses séquences ITS (Intrachromosomal telomeric sequences), habituellement localisées aux sub-télomères, et de deux familles de gènes impliqués dans les variations antigéniques : celle des SICAvar (Schizont Infected Cell Agglutination variant) et celle des *kir* (*Knowlesi* interspersed repeats). (figure 25). Les protéines codées par ces gènes présentent de grandes similitudes de structure avec les effecteurs CD99 de l'immunité cellulaire T de l'hôte impaludé. Ce mimétisme structural, quasiment de 100 % avec l'hôte habituel de *P. knowlesi*, *Macaca mulatta*, joue un rôle primordial dans l'échappement aux mécanismes de défense immunitaire. L'infection de ces singes se traduit par une infection chronique, créant ainsi un réservoir de parasite stable et conséquent [80].

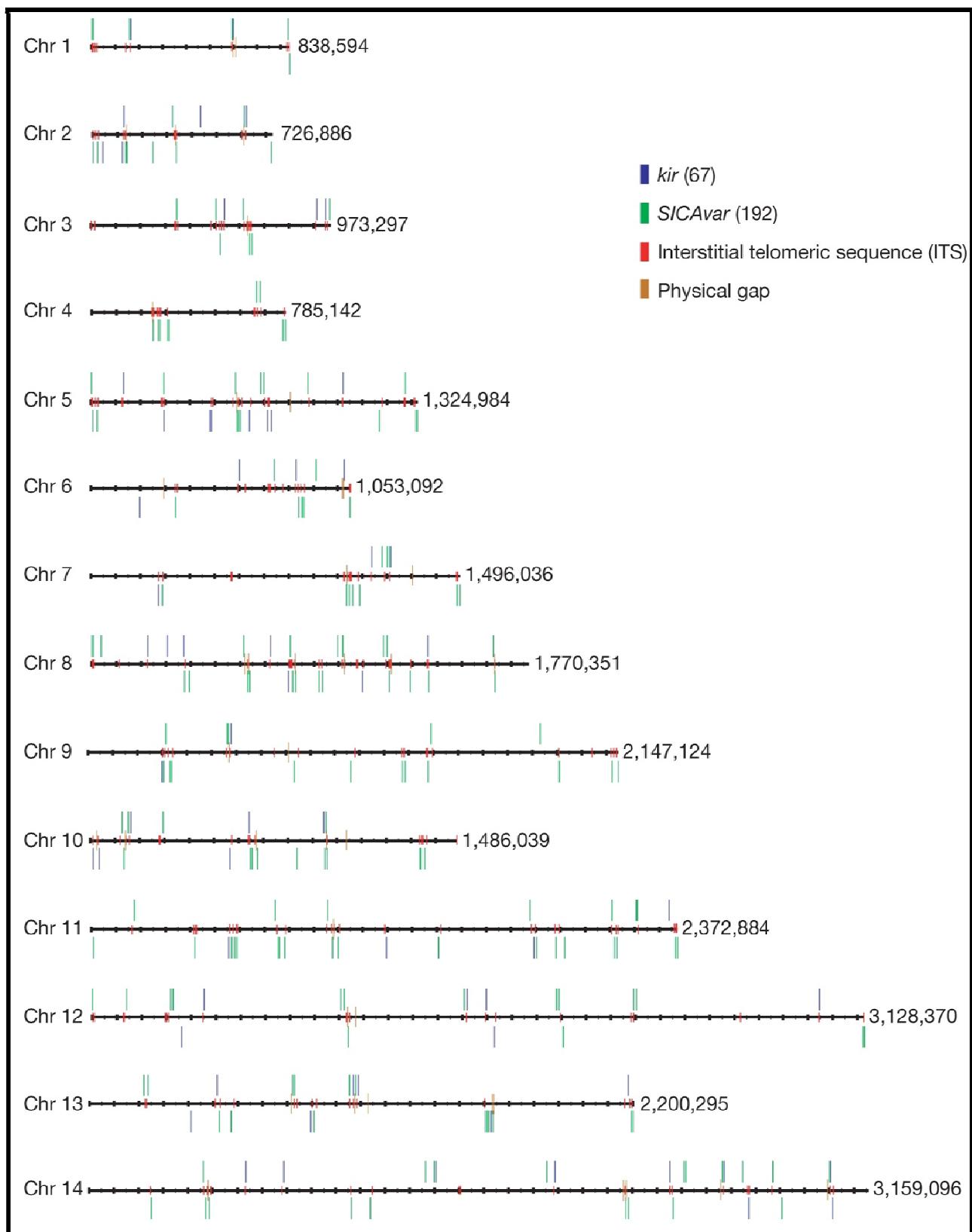


Figure 25 : Schéma des 14 chromosomes constituant le génome de *P. knowlesi*. La répartition des gènes SICAVar (vert), kir (bleu) et des séquences répétées interstitielles télomériques (rouge) est présentée, ainsi que la taille de chaque chromosome en paire de bases [49].

II.2. Les gènes d'intérêts pour le diagnostic moléculaire

Les travaux réalisés en biologie moléculaire sur les *Plasmodium* sp. utilisent majoritairement les gènes codant pour l'ARN ribosomique [6, 60, 62-64, 81]. Ceux-ci étant indispensables à chaque espèce et essentiels à leur survie, ils sont génétiquement très stables au cours du temps et ne présentent qu'un polymorphisme limité. De plus, la répétition de ces gènes en plusieurs copies assure une sensibilité intéressante pour le développement de techniques de biologie moléculaire. Enfin, de nombreuses séquences correspondant à ce gène sont disponibles dans les banques de données nucléotidiques, ce qui enrichit la pertinence de l'étude bioinformatique [60].

L'organisation des gènes codant pour l'ARN de la petite sous-unité ribosomique 18S (gènes 18S ADNr) des *Plasmodium* sp. suit un modèle différent de celui des eucaryotes. Plusieurs types d'ARNr ont été décrits, suivant le stade parasitaire considéré: le type A (= asexual blood stage), S (= sporozoite stage) et O (= oocyste stage) (*figure 26*) [82]. Le type O n'est à l'heure actuelle décrit que pour *P. vivax*, et le nombre de copies des gènes varie de 4 (*P. berghei*) à 7 (*P. falciparum*) [83]. Pour *P. knowlesi*, 3 copies du gène de type A et 2 copies du gène de type S sont dénombrées. Un grand nombre de séquences de chaque type sont archivées dans la bibliothèque nucléotidique du Centre National d'Informations Biotechnologiques (NCBI).

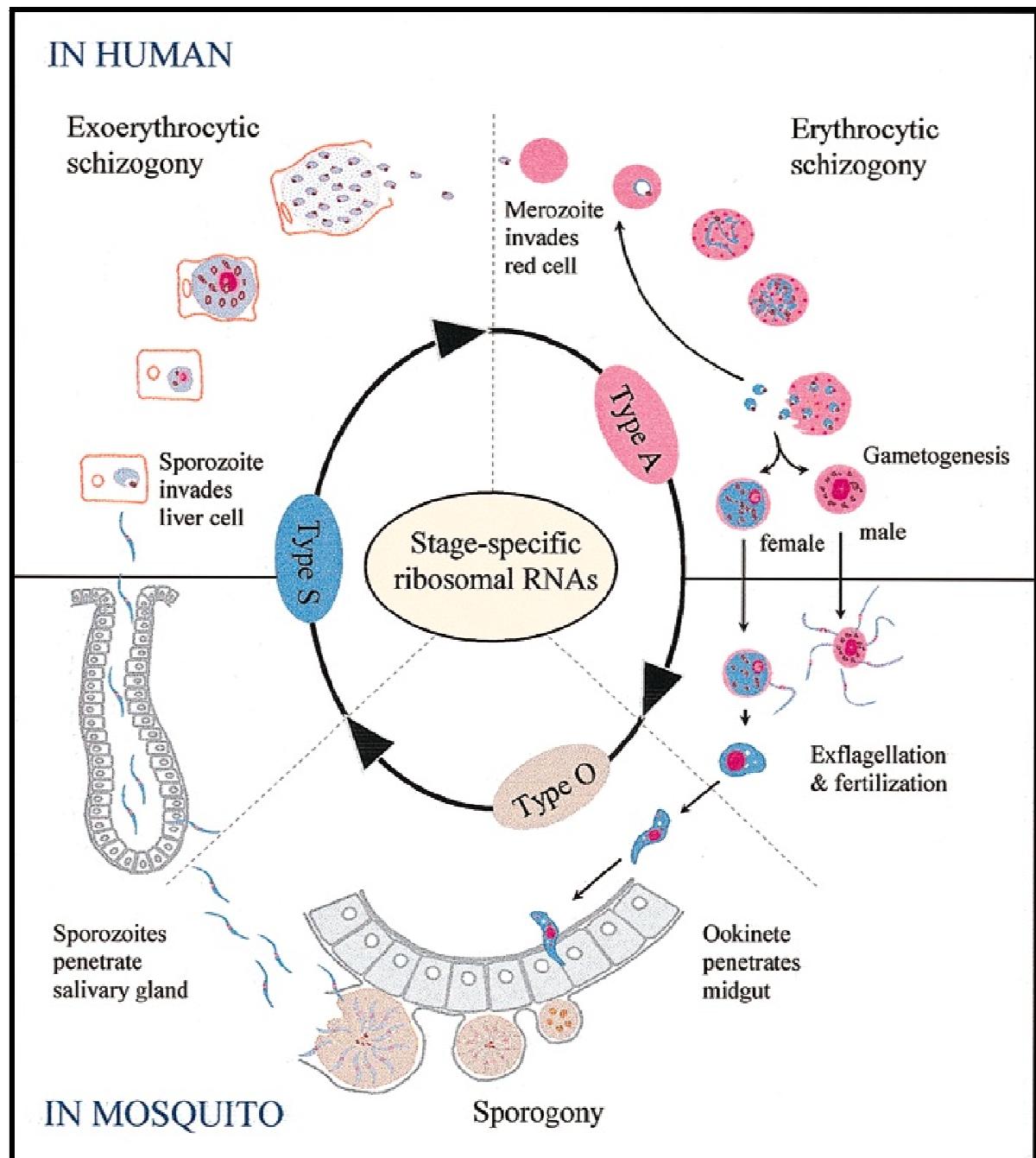


Figure 26 : Représentation schématique du cycle de développement de *Plasmodium* sp. et du type d'ARNr exprimé en fonction des différentes étapes parasitaires [82].

II.3. Approches moléculaires actuelles pour le diagnostic de *P. knowlesi*

II.3.1. PCR nichée ou nested-PCR

La PCR (ou Polymerase Chain Reaction) « classique » permet d'amplifier une séquence d'ADN de manière exponentielle, grâce à une enzyme polymérase. Brièvement, après extraction et dénaturation de l'ADN, un couple d'amorces s'hybride à chaque extrémité de la matrice cible. La séquence est ensuite recopiée en présence d'une enzyme (l'ADN polymérase), de 4 nucléotides (Adénosine, Guanine, Thymine et Cytosine) et de MgCl₂. Cette réaction est répétée n fois aboutissant à la synthèse de 2ⁿ copies de la séquence initiale [84]. Les produits d'amplification issus de la PCR classique sont analysés par migration électrophorétique des amplicons dans un gel d'agarose contenant un produit s'intercalant dans l'ADN double brin, tel que le Bromure d'Ethydium (BET), et fluorescent en lumière UV (longueur d'onde de 200 nm).

La PCR nichée consiste à amplifier une seconde fois le produit d'amplification issu de la première PCR, soit avec des amorces différentes ciblant une zone interne dans le premier fragment amplifié, soit avec les mêmes amorces que dans la première réaction (PCR semi-nichée) [64]. L'intérêt majeur de cette deuxième amplification est d'augmenter fortement la sensibilité de la technique.

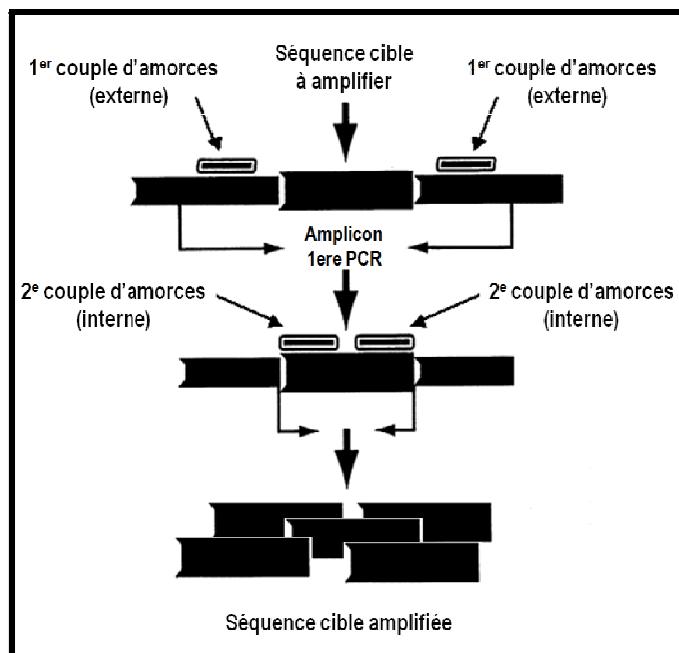


Figure 27 : Représentation schématique d'une amplification d'ADN par PCR nichée [85].

Cette technique apparaît fréquemment dans la littérature pour l'identification des *Plasmodium* sp. Ainsi, en 1993, Snounou et coll. [62] proposent une PCR nichée spécifique de chacune des 4 espèces de *Plasmodium* potentiellement rencontrées chez l'Homme. Cette technique cible le gène 18S ADNr (codant la petite sous-unité ribosomique de l'ARN). La première réaction d'amplification, spécifique du genre *Plasmodium*, aboutit à la synthèse d'un fragment de 1.200 paires de bases. Les amorces de la deuxième PCR sont choisies pour être spécifiques d'espèce. Les produits d'amplification sont révélés après migration électrophorétique sur gel d'agarose contenant du BET. La limite de détection varie de 50 à 0,1 parasites / μ L de sang. Par la suite, cette technique a été utilisée par d'autres auteurs : en 1996, Roper et coll. [61] étudient ainsi la prévalence du paludisme au Soudan et en 1999, Singh et coll. [86] mènent une étude épidémiologique en Malaisie à l'aide de cet outil.

En 2004, Singh et coll. [6] publient une PCR nichée spécifique de *P. knowlesi* ciblant le gène 18S ADNr de type S : la première PCR, utilisant le couple d'amorce rPLU1 / rPLU5 (figure 28 A), permet une amplification spécifique du genre *Plasmodium*. La deuxième réaction intègre le couple d'amorces Pmk8 / Pmkr9 (figure 28 A). Une des deux amorces est spécifique de *P. knowlesi* alors que la seconde est commune à l'ensemble des espèces ; un fragment d'environ 160 pb est amplifié.

En 2010, Imwong et coll. [64] constatent l'existence d'amplifications aspécifiques en utilisant la technique développée par Singh et coll. [6]. En effet, 8 souches de *P. vivax* (sur 30 souches testées) sont amplifiées et révèlent un fragment de même taille que celui attendu lors de l'amplification spécifique de *P. knowlesi*. Cette réaction croisée s'explique par une proximité phylogénique étroite entre *P. vivax* et *P. knowlesi*. Trois nouvelles amorces spécifiques de *P. knowlesi* sont dessinées à partir du gène 18S ADNr de type A dans le but d'amplifier spécifiquement l'espèce en PCR semi-nichée. Une première PCR utilise les amorces PkF1060 et PkR1550 (figure 28 B). Pour la deuxième réaction, l'amorce interne PkF1140 est associée à l'amorce anti-sens PkR1550, employée lors de l'amplification précédente (figure 28 B).

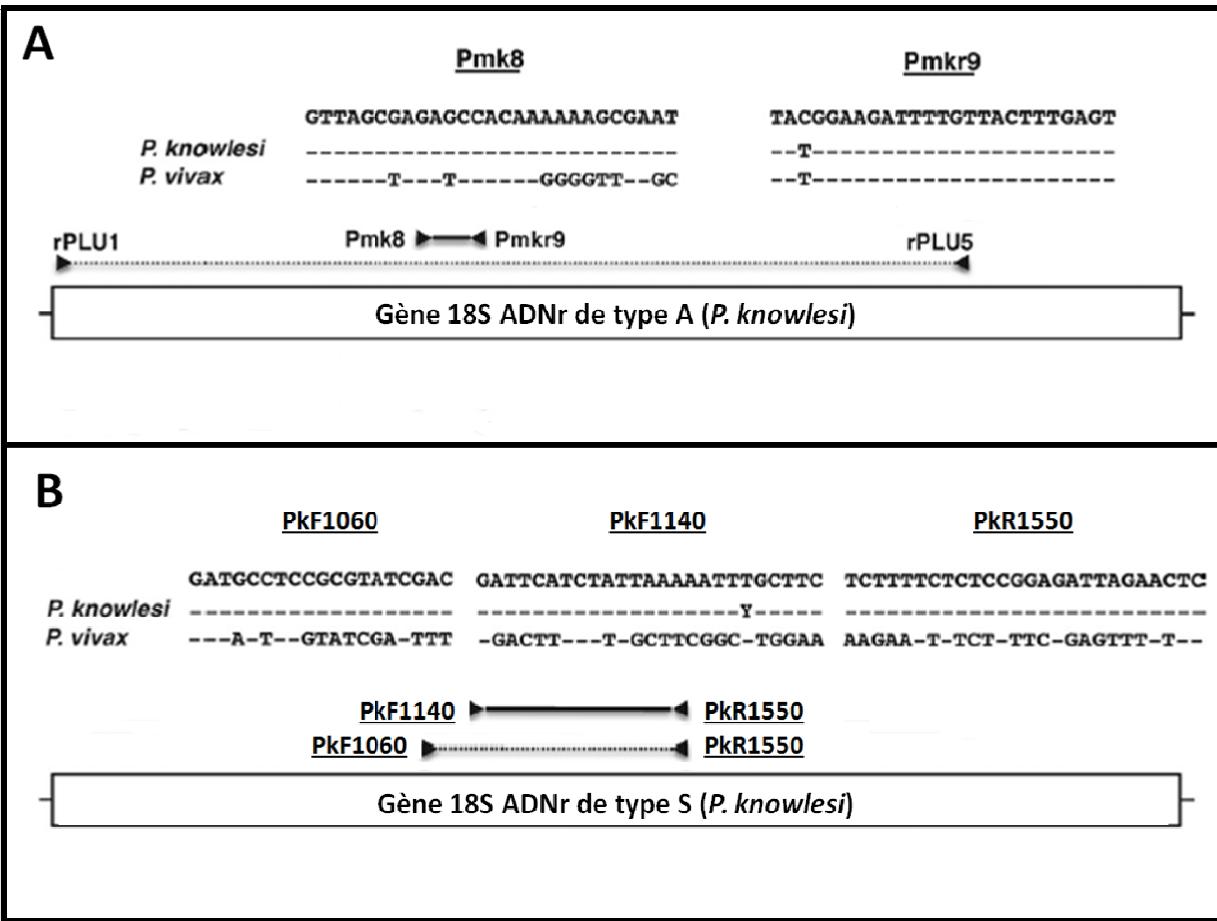


Figure 28 : Représentation schématique des localisations des amorces utilisées pour l'amplification spécifique de *P. knowlesi* dans les études de Singh et coll. [6] (A) et Imwong et coll. [64] (B).

Les polymorphismes entre les séquences de *P. vivax* et *P. knowlesi* sont précisés et les positions des nucléotides identiques sont identifiés par un tiret (-).

II.3.2. PCR en temps réel

A la différence de la PCR classique, la PCR en temps réel permet un suivi de l'amplification tout au long de l'analyse, par une révélation directe des produits amplifiés dans le milieu réactionnel. Différentes techniques de révélation existent : SYBR Green, FRET (ou Transfert d'énergie par résonance de type Förster), TaqMan,...

En 2010, deux publications utilisent la PCR en temps réel pour l'amplification de *P. knowlesi* [44, 63]. L'article de Ta et coll. [44] décrit une PCR en temps réel spécifique du genre *Plasmodium*, suivie d'un séquençage des produits d'amplification, contraignant en

routine. Seule l'équipe de Babady et coll. [63] publie une technique de PCR en temps réel spécifique de *P. knowlesi*. L'amplification et la révélation sont réalisées sur un automate LightCycler® (Roche) grâce à la technologie FRET.

Le LightCycler® est l'association d'un thermocycleur à chaleur tournante, et d'un microspectrofluorimètre (*figure 29*). La fluorescence émise peut donc être lue tout au long de l'amplification réalisée dans des capillaires en verre (*figure 29*, flèche noire).

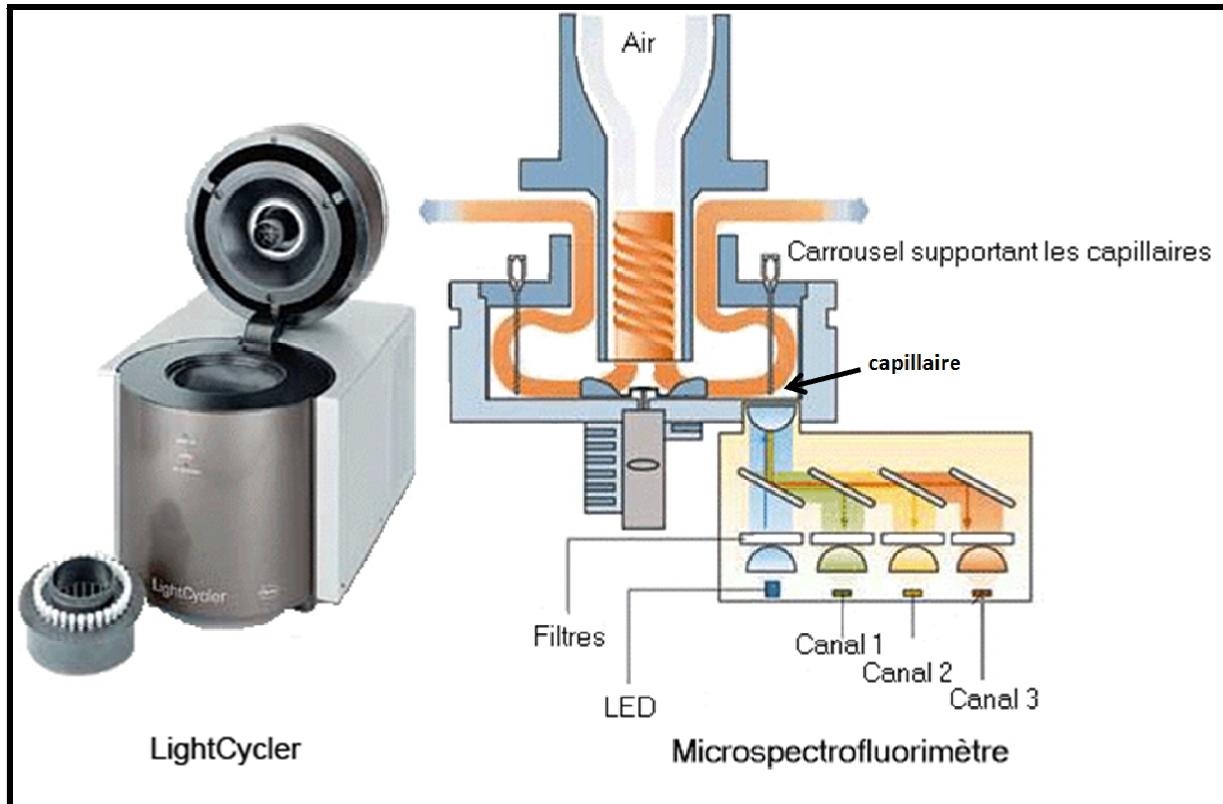


Figure 29 : Photographie du LightCycler® v1.2 et sa représentation schématique

<http://www.ifr122.cnrs.fr/pages/pcr.htm>

La technologie FRET permet une révélation des produits amplifiés en temps réel grâce à l'utilisation de 2 sondes ajoutées au mélange réactionnel. Une des deux sondes est marquée à son extrémité 3' par un fluorophore « donneur » et l'autre en 5' par un « accepteur ». Elles sont choisies pour s'hybrider à une zone de la séquence cible en étant séparées de 1 à 5 bases. Lorsqu'elles sont séparées dans le mélange réactionnel, seule la fluorescence du donneur (directement excitable par la lampe de l'automate) est émise et détectable par le microspectrofluorimètre. En revanche, lorsque la température d'hybridation des sondes est atteinte, elles se fixent l'une à la suite de l'autre sur la séquence amplifiée cible. L'énergie du fluorophore « donneur » est alors transférée à

l'« accepteur », provoquant l'émission fluorescente de celui-ci [87]. L'acquisition de la fluorescence est alors mesurée au début de chaque nouveau cycle d'amplification. Elle est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée au moment de l'hybridation.

En fin de réaction, la température de fusion des sondes (ou Melting Temperature = Tm) est calculée. Elle correspond à la température à laquelle 50 % des sondes sont hybridées aux brins d'ADN et est donc spécifique de la séquence amplifiée. Une augmentation progressive de la température associée à une mesure continue de la fluorescence permet de la calculer. A l'extinction de la fluorescence, la Tm est atteinte.

La spécificité de la technique est donc directement dépendante de 3 facteurs : des séquences du couple d'amorces, des sondes choisies, et de la cible amplifiée.

Cette technologie, utilisée par l'équipe de Babady et coll. [63] permet l'identification des 5 *Plasmodium* humains en suivant la stratégie suivante :

- Utilisation d'un couple d'amorces spécifiques du genre *Plasmodium* sp.
- Utilisation d'un couple de sondes non spécifiques d'espèce dont l'accepteur émet une longueur d'onde de 640 nm. L'espèce plasmodiale est déduite de la Tm obtenue. Cependant, ce couple de sondes ne permet pas de différentier *P. knowlesi* de *P. vivax*, les Tm étant les mêmes.
- Utilisation d'un second couple de sondes spécifiques de *P. knowlesi* dont l'accepteur émet une longueur d'onde de 705 nm.

II.4. Choix de la technique à développer

La PCR nichée [6, 64] présente de nombreux inconvénients. Les manipulations sont longues, nombreuses, et nécessitent l'utilisation de gels contenant du BET (cancérogène). De plus, la ré-amplification d'un premier produit PCR expose à un très haut risque de contaminations. Cette technique ne doit pas être utilisée en méthode diagnostique [55].

La PCR en temps réel est un outil diagnostique présentant l'avantage d'être plus rapide (révélation *in situ*), de ne pas utiliser de BET et de se réaliser en système clos, d'où le faible risque de contaminations. De plus, le rendement d'amplification est supérieur à la PCR classique, offrant ainsi une meilleure sensibilité [55, 60]. Toutefois, la technique FRET décrite par l'équipe de Babady et coll. [63] impose, par l'homologie entre *P. vivax* et *P. knowlesi*, l'utilisation de 2 couples de sondes (4 sondes) pour chaque identification d'espèce de *Plasmodium*. Ces sondes, très coûteuses, limitent l'utilisation de cette technique en routine.

Les laboratoires du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Nancy et de l'Hôpital d'instruction des Armées (HIA) Legouest de Metz utilisent actuellement pour le diagnostic des *Plasmodium* sp. (hors *P. knowlesi*), en complément des techniques morphologiques et antigéniques, une adaptation de la technique de PCR décrite en 2003 par De Monbrison et coll. [60]. Pour chacune des 4 espèces humaines plasmodiales, un couple d'amorces spécifiques ciblant le gène 18S ADNr de type A est utilisé. La révélation de l'amplification est réalisée grâce à un agent fluorescent s'intercalant dans l'ADN double brin, le SYBR Green. Cette technique possède l'avantage d'être sensible (seuil de sensibilité = 0,3 parasite / μ L), rapide (3 heures), peu coûteuse et spécifique d'espèce. Il est donc intéressant de faire évoluer cette méthode en développant sur ce même modèle un cinquième couple d'amorces spécifiques de *P. knowlesi*.

III. Matériel et Méthode

III.1. Recueil et traitement des échantillons

En raison du faible nombre de cas identifiés jusqu'à présent en Europe, l'obtention de souches de *P. knowlesi* a été très difficile. Les deux souches utilisées dans cette étude proviennent d'extrait d'ADN et/ou de sang congelé adressés par le Dr Anu Kantele du laboratoire de Parasitologie du CH d'Helsinki, Finlande (nommée souche PK1) et par le Dr Clemens Kockens du Centre de Recherche Biomédical sur les Primates (BPRC) de Rijswijk, Pays-Bas (souche PK2). Le Centre National de Référence du paludisme français, contacté au début de l'étude, ne disposant d'aucune souche de *P. knowlesi*, s'est engagé à mettre à disposition les échantillons potentiellement reçus, dans le cadre d'une collaboration future.

Les échantillons de *P. falciparum* (n=7), *P. vivax* (n=6), *P. ovale* (n=6) et *P. malariae* (n=4) utilisés dans cette étude proviennent des collections d'ADN du CHU de Nancy et de l'HIA Legouest de Metz. Ils sont issus de sang veineux de patients ou militaires revenant de pays d'endémie. Ces sangs ont été recueillis dans des tubes contenant un anticoagulant (EDTA), puis l'ADN a été extrait avec l'automate Magna Pure, kit LC Microbiology Kit Mgrade® de Roche (Nancy) ou l'automate EZ1, EZ1 DNA Tissue kit, Bacteria card® de Qiagen (Metz).

Les ADN de *Toxoplasma gondii*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, virus de l'Hépatite B (VHB), et Cytomégalovirus ont été fournis par les laboratoires de Parasitologie, de Bactériologie et de Virologie du CHU de Nancy. Ces échantillons ont été utilisés pour les tests de spécificité de la technique développée.

Les ADN extraits et les prélèvements sanguins sont conservés congelés à -20°C jusqu'à utilisation.

III.2. Etude bioinformatique

Afin d'identifier des amorces amplifiant spécifiquement le gène codant la petite sous-unité ribosomique 18S de l'espèce *P. knowlesi*, une étude bioinformatique a été réalisée.

Quatre-vingt-sept séquences correspondant aux gènes 18S ADNr de *Plasmodium* sp. [1, 58, 83, 86, 88-90] ont été recueillies à partir de deux banques de données nucléotidiques : NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> et PlasmoDB : Malaria Parasite Genome Project <http://plasmodb.org/>. Parmi celles-ci, nous comptons 50 séquences de *P. knowlesi* dont 37 de type A et 13 de type S, 10 de *P. falciparum* dont 5 de type A et 5 de type S, 14 de *P. vivax* dont 11 de type A et 3 de type S, 8 de *P. ovale* dont 7 de type A et une de type non précisé, 5 séquences de *P. malariae* dont 1 de type A et 4 de type non précisé. Les numéros d'accession des séquences utilisées et leurs caractéristiques sont présentés dans le tableau en **annexe 1**.

Ces séquences, d'une taille approximative de 2.000 nucléotides, ont ensuite été alignées entre elles dans le but de délimiter les zones conservées et spécifiques de chaque espèce. Les amorces permettant une amplification de *P. knowlesi* ont été dessinées dans les zones conservées pour cette espèce et présentant le nombre le plus important de polymorphismes avec les autres espèces.

Les alignements et analyses de séquences ont été réalisés grâce au logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor® (version 7.0.5.3), et au programme BLAST® du NCBI, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>).

Dans cet alignement, les zones d'intérêt décrites dans la littérature ont été recherchées [6, 64]. Six autres amorces ont été choisies dans les zones conservées de *P. knowlesi*.

Le dessin de nouvelles amorces a tenu compte de plusieurs exigences à respecter pour une utilisation la plus optimale de celles-ci en PCR temps réel [87] :

- Taille de l'amplicon cible compris entre 100 et 500 paires de bases
- 40 à 70 % de bases guanine / cytosine
- Taille des amorces de 20 à 30 nucléotides
- Température d'hybridation des amorces comprise entre 55°C et 68°C

III.3. Amplification de l'ADN par PCR

III.3.1. PCR Classique

III.3.1.1. Préparation des mélanges réactionnels (Mix)

La préparation du mélange réactionnel nécessaire à la réaction d'amplification se fait dans un volume final de 50 µL, comprenant 5 µl de l'extrait d'ADN ainsi que les différents réactifs aux concentrations citées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : Volume des réactifs utilisés pour la PCR classique

	Pour 1 Tube	Concentration finale
Tampon MgCl₂ (20 mM)	5 µL	2 mM
Mélange de dNTP (2 mM)	5 µL	0,2 mM
Amorce sens 40 µM	0,5 µL	0,4 µM
Amorce anti-sens 40 µM	0,5 µL	0,4 µM
Taq Polymérase (5 U / µL)	0,4 µL	2 U
Eau	33,6 µL	-

La méthode de PCR classique a été utilisée pour la fabrication de plasmides nécessaires dans cette étude pour effectuer les tests de sensibilité, et afin de posséder une réserve de contrôles positifs, les souches de *P. knowlesi* ayant été reçues en faible quantité sont précieuses. Les PCR ont été réalisées avec les couples d'amorces PK1'F / PKg'R pour le gène 18S ADNr de type A, et Pmk8mF / PKiR pour le gène 18S ADNr de type S.

III.3.1.2. Programmation du thermocycleur

Les PCR classiques ont été réalisées selon la programmation décrite par Imwong et coll. en 2009 [64] :

Tableau 6 : Programmation du thermocycleur (temps et températures) en PCR classique

	Etapes	Temps et Températures
	Dénaturation initiale	5 minutes à 95°C
Cycles d'amplifications répétés 30 fois	Dénaturation	1 minute à 94°C
	Hybridation des amorces	1 minute à 50°C
	Elongation	1 minute à 72°C
	Refroidissement	∞ à 15°C

Après amplification, les échantillons sont conservés à +4°C.

III.3.1.3. Révélation

Les produits amplifiés sont révélés par migration électrophorétique dans un gel d'agarose contenant un intercalant de l'ADN double brin, le BET, qui fluoresce sous lumière UV. La fluorescence induite en lumière UV permet de visualiser les bandes d'ADN amplifiées, dont la taille (en nombre de paires de bases) est estimée semi-quantitativement grâce à la migration conjointe d'une solution contenant des brins d'ADN de longueur connue (marqueur de taille).

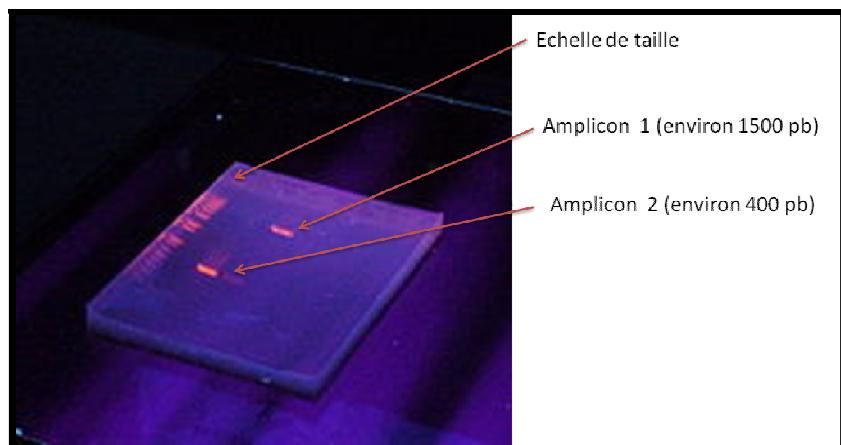


Figure 30 : Photo d'un gel d'agarose additionné de BET en lumière UV après migration électrophorétique de deux produits d'amplification et d'une solution de marqueurs de taille.

III.3.2. PCR en temps réel

III.3.2.1. Préparation des mélanges réactionnels (Mix)

Au CHU de Nancy et à l'HIA Legouest de Metz, l'automate de PCR en temps réel utilisé est un LightCycler® commercialisé par la société Roche.

La technologie utilisée pour le développement du diagnostic de *P. knowlesi* est celle d'une révélation des produits d'amplification par utilisation de l'agent intercalant SYBR Green.

Le SYBR Green est un composé organique aromatique intercalant de l'ADN double brin. Lorsqu'il est inséré dans l'ADN et excité, cet agent a la propriété d'émettre une fluorescence d'une longueur d'onde de 530 nm. La mesure de cette fluorescence est réalisée à la fin de chaque cycle d'amplification et permet ainsi un suivi tout au long de l'analyse. En fin de réaction, la température de fusion (Tm), spécifique de la séquence amplifiée, est mesurée. Contrairement à la technologie FRET décrite dans le chapitre précédent, cette température correspond à la température pour laquelle 50 % des séquences sont hybridées entre elles (et non des sondes). Elle se traduit par une diminution brutale de la fluorescence (échappement de l'intercalant par des-hybridation des séquences) lors de l'augmentation progressive de la température.

Les réactifs commercialisés dans le kit SYBR GREEN Master Mix I® (Roche) comprennent deux mélanges : 1a et 1b contenant l'intercalant fluorescent SYBR Green, les dNTP, la Taq Polymérase et le MgCl₂ (1 mM). Les réactions ont lieu dans des capillaires et comprennent un volume final de 20 µL, dont 5 µL d'ADN extrait à amplifier.

Le **Tableau 7** présente les concentrations en réactifs initialement recommandées par la société Roche, avant optimisation.

Tableau 7 : Volume des réactifs utilisés pour la PCR en temps réel.

	Pour 1 Capillaire	Concentration finale
Tampon MgCl₂	2,4 µL	4 mM
Mélange Lightcycler 1a+1b	5 µL	-
Amorce sens 10 µM	1 µL	0,5 µM
Amorce anti-sens 10 µM	1 µL	0,5 µM
Eau	8,6 µL	-

Lors des tests d'optimisation, des concentrations en MgCl₂ allant de 1 mM à 4 mM, et en amorces de 0,3 à 0,5 µM ont été évaluées. Les conditions optimales définies sont présentées ultérieurement.

III.3.2.2. Programmation du LightCycler®

Les conditions d'amplification ont été optimisées dans le but d'intégrer le diagnostic moléculaire de *P. knowlesi* au protocole déjà en place pour les 4 autres espèces, à la fois dans le service de Parasitologie du CHU de Nancy mais aussi à l'HIA Legouest de Metz. Ainsi, le programme utilisé s'appuie sur la publication datant de 2003 de De Monbrison et coll. [60] :

Tableau 8 : Programmation du LightCycler (temps et températures) en PCR en temps réel

	Etapes	Temps et Températures
Cycles d'amplifications répétés 40 fois	Dénaturation initiale	8 minutes à 95°C
	Dénaturation	10 secondes à 95°C
	Hybridation des amorces	10 secondes à 58°C
	Elongation	30 secondes à 72°C
Courbes de Fusion	Dénaturation	2 secondes à 95°C
	Hybridation	20 secondes à 50°C
	Dénaturation progressive	0,2°C/seconde jusque 98°C
	Refroidissement	30 secondes à 35°C

A l'issue de l'amplification, les capillaires sont conservés à +4°C.

III.3.2.3. Révélation

L'agent intercalant SYBR Green est présent dès le début de la réaction dans le capillaire. L'analyse des intensités de fluorescence est réalisée par le microspectrofluorimètre contenu dans l'appareil (*figure 29*). Les résultats sont ensuite retransmis au logiciel Lightcycler Software® pour l'interprétation des Densités Optiques (DO) obtenues. La lecture du cycle seuil d'amplification (Ct) et de la température de fusion (Tm) définit respectivement le début d'amplification et sa spécificité.

III.4. Séquençage

Certains produits d'amplification ont été séquencés après purification (kit QIAquick PCR Purification®, Qiagen), en utilisant le kit BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing® sur un séquenceur automatique ABI Prism 3700® de la société Applied Biosystems®.

III.5. Tests de sensibilité

Afin d'évaluer le seuil de sensibilité de la technique, il est nécessaire de disposer d'une solution contenant un nombre connu de copies du gène codant la sous-unité ribosomique 18S. La réalisation d'un plasmide permet, par l'obtention d'un fragment de taille connue, d'en calculer sa concentration (en copies / μ L). Nous avons fabriqué deux plasmides en utilisant les couples d'amorces PK1'F / PKg'R pour le gène A et Pmk8mF / PKiR pour le gène S (décris dans la partie Résultats) à l'aide du kit commercial Qiagen PCR Cloning Kit® selon les conditions décrites par le fabricant.

Très brièvement, la séquence à cloner est intégrée grâce à un mix de ligation au sein d'un plasmide, puis inoculé par cet intermédiaire dans des cellules compétentes (bactéries). Ces bactéries sont mises en cultures et seules sont sélectionnées celles ayant intégré le plasmide. Après multiplication, l'ADN plasmidique est sélectivement ré-extrait puis purifié.

On obtient ainsi une solution pure et concentrée du fragment du gène d'intérêt. Cette solution peut ensuite être dosée et sa concentration en copies / μL évaluée.

III.6. Protocoles actuels pour le diagnostic moléculaire des *Plasmodium* hors *P. knowlesi*

III.6.1. Laboratoire de parasitologie du CHU de Nancy

Le diagnostic moléculaire du paludisme est réalisé par PCR en temps réel SYBR Green, sur LightCycler V1,2®. La technique en place est issue du travail publié par l'équipe de De Monbrison et coll. (2003) [60], et d'une étude bioinformatique développée au laboratoire du CHU de Nancy. Quatre mix réactionnels sont préparés, chacun correspondant à l'amplification spécifique d'une des 4 espèces plasmodiales humaines (en dehors de *P. knowlesi*). A l'exception de *P. malariae* où sont utilisées deux amores spécifiques (PM1 et PM2), les autres couples sont constituées d'une amorce commune aux *Plasmodium* (PSP1AS) et d'une amorce spécifique de l'espèce recherchée (PFS1S, PVS1 et POS1). La programmation du LightCycler utilisée est décrite dans le **Tableau 8**. Les amores utilisées, ciblant les gènes 18S ADNr, sont présentées dans le **Tableau 9** ci-dessous :

Tableau 9 : Amores utilisées pour l'identification spécifique des quatre *Plasmodium* sp. au laboratoire de parasitologie du CHU de Nancy

Dénomination	Séquences	Source	Cible(s)
PSP1AS	5'-CTACTCCTATTAAATCGTAAC-3'	Laboratoire de Parasitologie Nancy	PF, PV, PO
PFS1	5'-CATTAAACTGGTTGGAAAAC-3'	Laboratoire de Parasitologie Nancy	PF
PVS1	5'-TGCAGCTTTGCTACTACGTG-3'	Laboratoire de Parasitologie Nancy	PV
POS1	5'-GCATTCCTTATCCAAATGTG-3'	Laboratoire de Parasitologie Nancy	PO
PM1	5'-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC-3'	F. de Monbrison, S. Picot [60]	PM
PM2	5'-AAAATTCCCATGCATAAAAATTATACAAA-3'	F. de Monbrison, S. Picot [60]	PM

III.6.2. Laboratoire de L'HIA Legouest de Metz

Le diagnostic par biologie moléculaire à l'HIA Legouest est également réalisé en PCR en temps réel SYBR Green, sur LightCycler V2®. Les amorces et conditions opératoires sont celles décrites dans la publication de De Monbrison et coll. [60]. Des polymorphismes de la région ciblée pour *P. ovale* dans la technique ayant été mis en évidence en 2004 par l'équipe de Win et Coll. [58], le laboratoire de l'HIA Legouest de Metz a dessiné une amorce supplémentaire (POV2V) ajoutée au mix réactionnel *P. ovale* (POV1-POV2). Cinq mix réactionnels sont préparés : 1 mix « PanPalu » spécifique du genre *Plasmodium* mais non de l'espèce en présence, et 1 mix pour chaque espèce humaine de *Plasmodium* (PF, PV, PO et PM).

Tableau 10 : Amorces utilisées pour l'identification spécifique des quatre *Plasmodium* sp. au laboratoire de l'HIA Legouest de Metz.

Dénomination	Séquences	Source	Cible(s)
PSP1	5'-AGTTACGATTAATAGGAGTAG-3'	F. de Monbrison, S. Picot [60]	PF, PV, PO, PM
PSP2	5'-CCAAAGACTI'TGATTCTCAT-3	F. de Monbrison, S. Picot [60]	PF, PV, PO, PM
PanPalu	5'-AGTGTGTATCAATCGAGTTTC-3'	F. de Monbrison, S. Picot [60]	PF
PfAIR	5'-AGTTCCCCTAGAATAGTTACA-3'	F. de Monbrison, S. Picot [60]	PF
PV1	5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3'	F. de Monbrison, S. Picot [60]	PV
PV2	5'-CTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3'	F. de Monbrison, S. Picot [60]	PV
POV1	5'-ATCTCTTTGCTATTTTTAGTATTGGAGA-3'	F. de Monbrison, S. Picot [60]	PO
POV2	5'-CCAAAGACTTGTATTCTCAT-3'	F. de Monbrison, S. Picot [60]	PO
POV2V	5'-ATCTCCTTACTTTGTACTGGAGA-3'	Laboratoire HIA Legouest	PO
PM1	5'-ATAACATAGTTGTACGTTAGAATAACCGC-3'	F. de Monbrison, S. Picot [60]	PM
PM2	5'-AAAATTCCCATGCATAAAAATTATACAAA-3'	F. de Monbrison, S. Picot [60]	PM

IV. Résultats

IV.1. Etude bioinformatique

La première étape indispensable au développement d'une méthode de diagnostic moléculaire est une analyse rigoureuse de séquences. Celle-ci permet en effet de situer les zones polymorphes dans le gène ciblé et donc de localiser avec précision les amorces en fonction de la spécificité souhaitée.

L'alignement des 37 séquences de *P. knowlesi* du gène 18S ADNr de type A nous montre un pourcentage d'homologie supérieur à 97 %, avec seulement 8 zones polymorphes. L'étude des 13 séquences publiées du gène 18S ADNr de type S en dénombre 11.

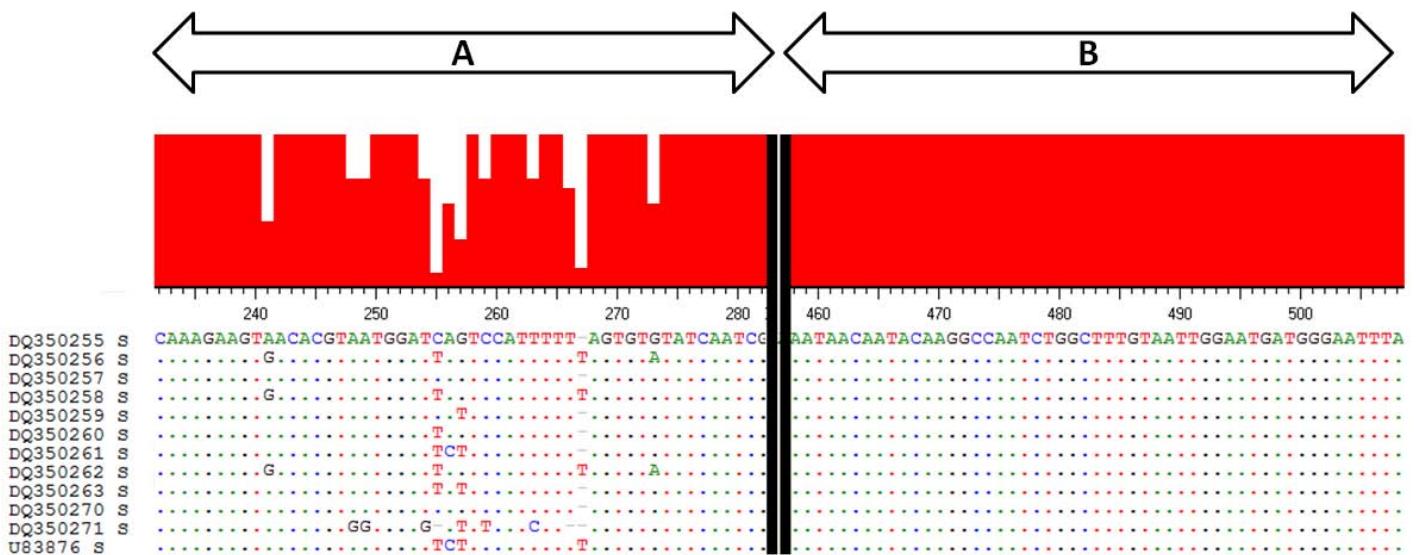


Figure 31 : Exemple de zones polymorphes (A) ou non (B) au sein du gène 18S ADNr de type S de *P. knowlesi*.

Afin de garantir la spécificité de la technique, les amorces sont choisies dans des zones spécifiques de l'espèce *P. knowlesi*. Pour cartographier ces régions, les séquences de chaque type de gène (S, A) de *P. knowlesi* ont été alignées avec celles des 4 autres espèces de *Plasmodium* de même type. Au total, nous avons mis en évidence 10 régions d'intérêt dont 6 sur le gène A et 4 sur le gène S, ne présentant pas de polymorphisme et spécifiques

de *P. knowlesi*. Parmi ces zones, 4 sont communes avec celles déjà décrites dans la littérature, 3 sur le gène de type A et 1 sur le gène de type S [6, 63-64].

En fonction des contraintes imposées par l'utilisation de la PCR en temps réel, nous avons dessiné ou modifié par rapport à la littérature 13 amorces, détaillées dans le **Tableau 11**.

Tableau 11 : Descriptif des amorces choisies pour l'amplification génomique de *P. knowlesi*

Déno- mination	Séquence	Amorce correspondante	Gène 18S	Source
PK1F	5'-GATGCCTCCGCGTATCGAC-3'	PKeR	A	Imwong et coll. [64]
PKeF	5'-GAGTTTTCTTTCTCTCCGG-3'	PKgR	A	Laboratoire de Parasitologie Nancy
PKeR	5'-CCGGAGAGAAAAGAAAAACTC-3'	PK1F	A	Laboratoire de Parasitologie Nancy
PKgR	5'-CTTCAAAATCCAACAAATCCAC-3'	PKeF	A	Laboratoire de Parasitologie Nancy
PK1'F	5'-GATTCTATCTATTAGAATTGCTTC-3'	PKe'R	A	Imwong et coll. [64]
PKe'F	5'-TCTTTCTCTCCGGAGATTAGAACTC-3'	PKg'R	A	Imwong et coll. [64]
PKe'R	5'-GAGTTCTAATCTCCGGAGAGAAAAGA-3'	PK1'F	A	Imwong et coll. [64]
PKg'R	5'-CAAATCCACTATATTCAATTCTACA-3'	PKe'F	A	Laboratoire de Parasitologie Nancy
Pmk8mF	5'-GAGAGCCACAAAAAGCGAAT-3'	PKfR	S	Singh et coll. [6] modifiée
PKfF	5'-GATAGTCTCTCGGGGATAG-3'	PKhR, PKiR	S	Laboratoire de Parasitologie Nancy
PKhF	5'-TGCGGTGCATATAATGAGTAC-3'	PKiR	S	Laboratoire de Parasitologie Nancy
PKhR	5'-GTACTCATTATATGCACGGCA-3'	PKfF	S	Laboratoire de Parasitologie Nancy
PKiR	5'-GTGAAATGGCATCATAATCCAG-3'	PKfF, PKhF	S	Laboratoire de Parasitologie Nancy

L'absence d'homologie entre les amorces dessinées et une séquence humaine ou un organisme pathogène susceptible d'être présent dans la circulation sanguine humaine a ensuite été vérifiée en utilisant le programme BLAST®. Celui-ci compare par alignement les séquences des amorces aux données de la banque NCBI.

Les figures 32 et 33 présentent sous forme schématique les régions dans lesquelles les amorces spécifiques de *P. knowlesi* ont été dessinées.

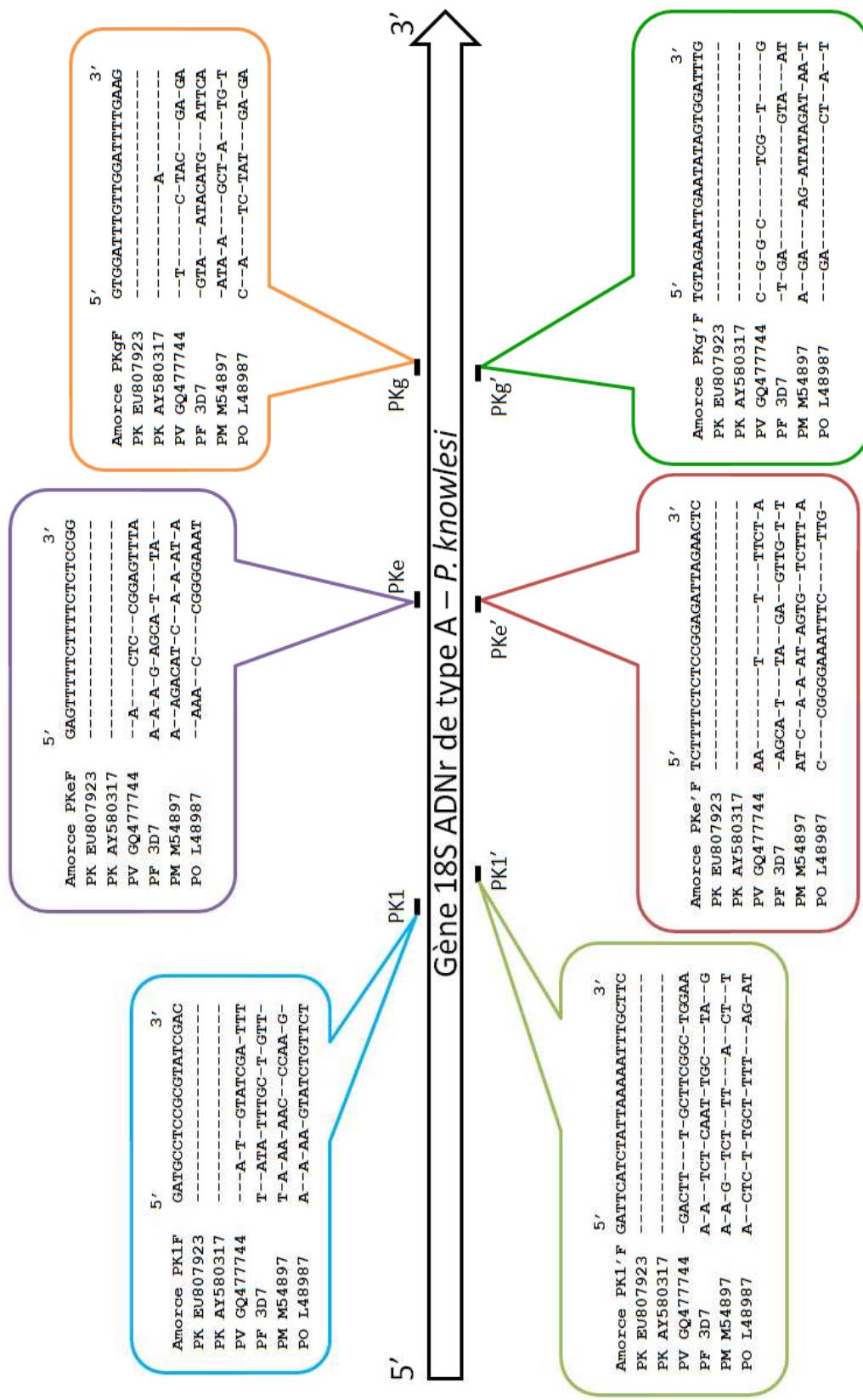


Figure 32 : Localisation schématique des amores choisies dans le gène 18S ADNr de type A de *P. knowlesi*. Pour chaque amorce, la présence ou non de polymorphisme dans la région homologue des autres *Plasmodium* humains est indiquée dans les cadres de couleur.

Les 6 zones de fixation PK1, PKe, PK1', PKe', PKg et PKg' sont localisées sur le gène 18S ADNr de type A de *P. knowlesi*. Pour chaque zone, les cadres de couleur présentent les alignements des séquences sens (5'→3') de deux souches de *P. knowlesi*, d'une souche de chaque autre *Plasmodium* humain et de l'amorce correspondante.

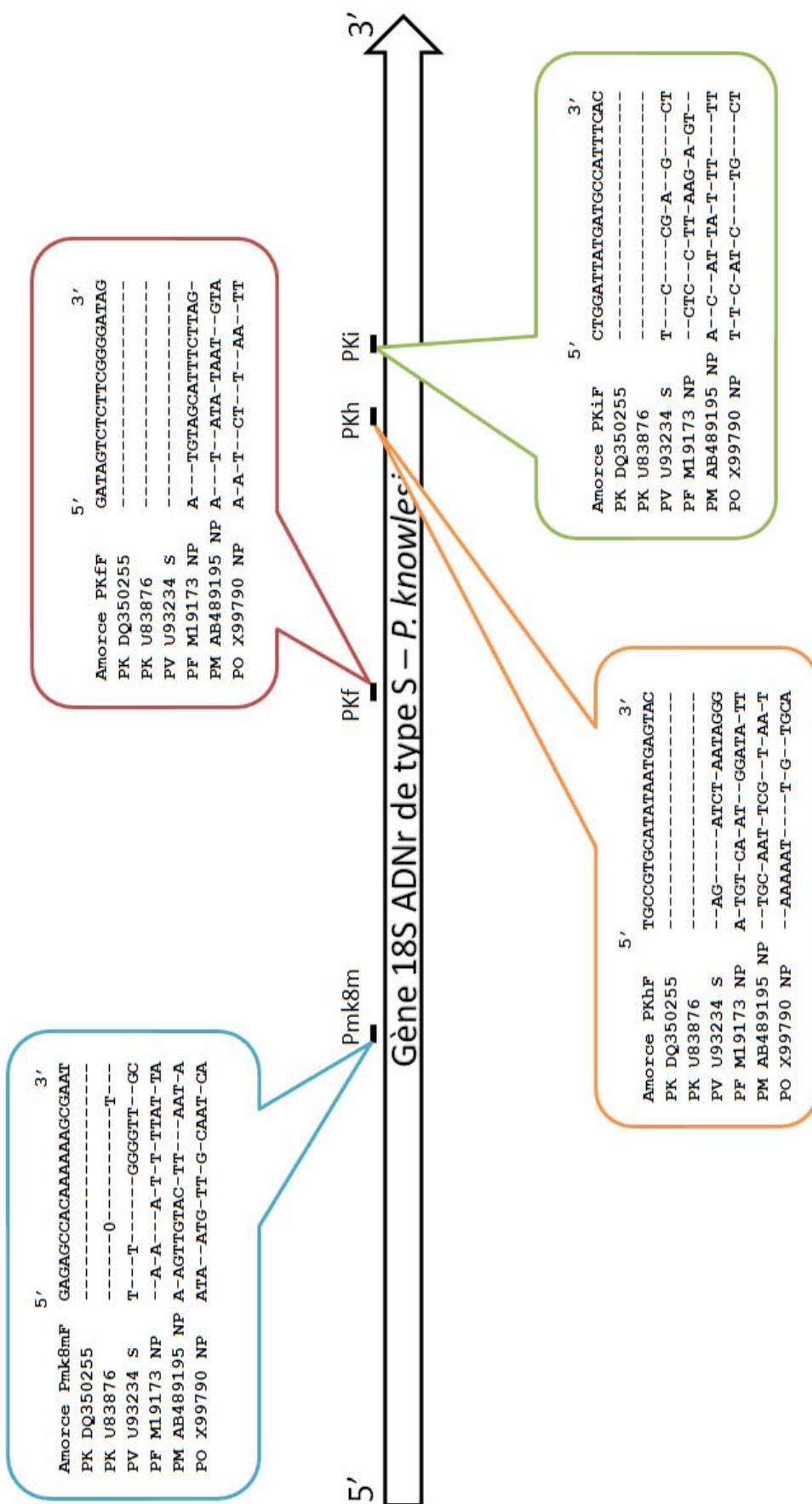


Figure 33 : Localisation schématique des amorces choisies dans le gène 18S ADNr de type S de *P. knowlesi*. Pour chaque amorce, la présence ou non de polymorphisme dans la région homologue des autres *Plasmodium* humains est indiquée dans les cadres de couleur.

Les 4 zones de fixation Pmk8m, PKf, PKh et PKi sont localisées sur le gène 18S ADNr de type S de *P. knowlesi*. Pour chaque zone, les cadres de couleur présentent les alignements des séquences sens (5'→3') de deux souches de *P. knowlesi*, d'une souche de chaque autre *Plasmodium* humain et de l'amorce correspondante.

IV.2. Evaluation pratique des amorces en PCR en temps réel SYBR Green

Suite à l'étude bioinformatique, les amorces dessinées ont été évaluées en pratique par 8 réactions, présentées dans le **Tableau 12** ci-dessous.

Pour chaque couple d'amorces, nous avons évalué le rendement d'amplification en testant l'extrait d'ADN de *P. knowlesi* PK1, correspondant à l'extrait d'ADN d'un patient à faible parasitémie (inférieure à 1 % [41]). Sans connaître précisément le nombre de copies du gène 18S ADNr de l'échantillon, les réactions dont le cycle seuil d'amplification (Cycle threshold = Ct) est supérieur à 30 sont écartées, car non utilisables en diagnostic du fait de leur trop faible sensibilité (réactions 1 et 7). Le séquençage des produits d'amplification et la comparaison à la base de données BLAST® nous a confirmé l'identité de l'espèce plasmodiale ciblée et amplifiée.

Dans un second temps, la spécificité de chaque couple d'amorces vis-à-vis de *P. knowlesi* a été vérifiée en testant les extraits ADN de *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae*, et le plasmide du gène 18S ADNr (A ou S) de *P. knowlesi*. En première approche, seuls les ADN de *T. gondii* et *C. albicans* ont été utilisés dans les réactions en tant que pathogènes potentiellement présents dans le sang. Le plasmide a été dilué au 1/100^e pour les essais ciblant le gène de type S et au 1/1.000^e pour ceux ciblant le gène de type A. Les amorces avec lesquelles des amplifications aspécifiques ont été obtenues, et dont la Tm est très proche de celle de *P. knowlesi*, ont également été éliminées (réactions 2, 4, 5, 6, 7).

Tableau 12 : Synthèse des résultats obtenus avec les 8 couples d'amorces utilisés

Réaction	Amorce sens	Amorce antisens	Type de gène 18S ADNr	Taille du fragment amplifié	Ct	Tm	Interprétation
1	PK1F	PKeR	A	446 pb	> 38	80,9°C	Très faible rendement d'amplification
2	PKeF	PKgR	A	340 pb	27,59	85,1°C	Réactions croisées avec les autres <i>Plasmodium</i> sp.
3	Pmk8mF	PKfR	S	459 pb	23,60	79,5°C	Bon rendement d'amplification, très faibles réactions aspécifiques à Tm différents
4	PKfF	PKhR	S	356 pb	24,11	86,1°C	Réactions croisées avec les autres <i>Plasmodium</i> sp.
5	PKfF	PKiR	S	464 pb	23,47	84,9°C	Réactions croisées avec les autres <i>Plasmodium</i> spp.
6	PKhF	PKiR	S	87 pb	24,80	80,4°C	Réactions croisées avec les autres <i>Plasmodium</i> sp.
7	PK1'F	PKe'R	A	374 pb	30,12	81,3°C	Faible rendement d'amplification, réactions croisées avec les autres <i>Plasmodium</i> sp.
8	PKe'F	PKg'R	A	312pb	24,60	85,3°C	Bon rendement d'amplification, très faibles réactions aspécifiques à Tm différents

L'exemple de la réaction 4 présente le couple d'amorces le plus problématique (PKfF / PKhR) : les ADN de toutes les espèces plasmodiales non ciblées ont été fortement amplifiées (Cycle seuil : Ct = 24) et présentent des valeurs de Tm qui diffèrent de moins de 2°C de celles obtenues avec l'ADN de *P. knowlesi* (*figures 34 A et B*).

A l'issue de l'analyse de ce premier test, deux couples d'amorces se démarquent : Pmk8mF / PKfR (réaction 3) ciblant le gène S (*figure 35 A et B*) et PKe'F / PKg'R (réaction 8) (*figure 36 A et B*) ciblant le gène A. Avec ces deux couples, l'ADN de *P. knowlesi* est amplifié à partir d'un cycle seuil précoce, les Tm permettent d'identifier *P. knowlesi* parmi les autres micro-organismes et les réactions aspécifiques sont certes présentes mais l'hypothèse est émise de pouvoir les réduire après optimisation des conditions. Les conditions d'amplification ont été optimisées pour ces deux couples d'amorces, en faisant varier les concentrations d'amorces et de MgCl₂.

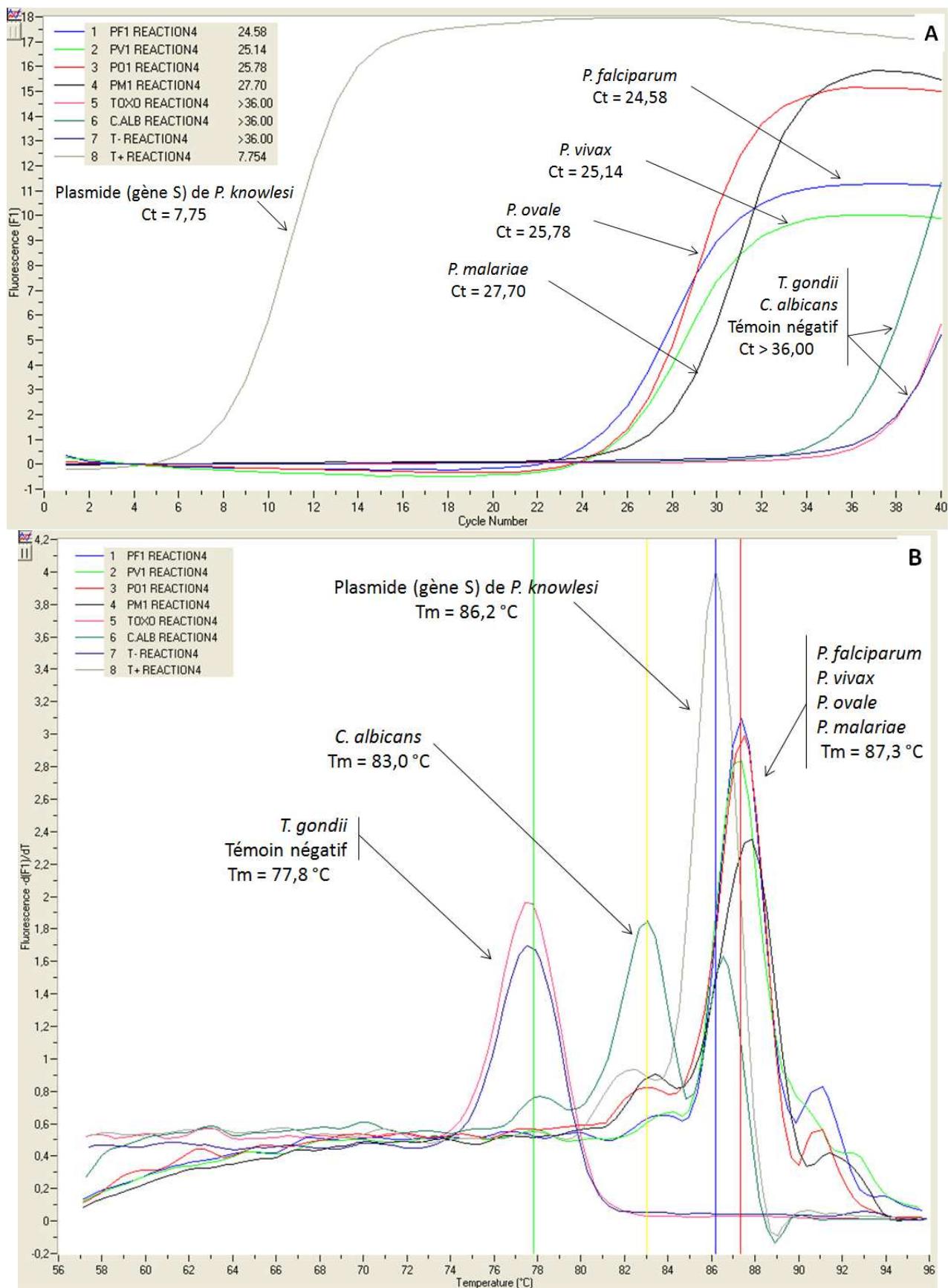


Figure 34 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenues en utilisant les amores PKfF / PKhR (réaction 4) en PCR en temps réel SYBR Green.

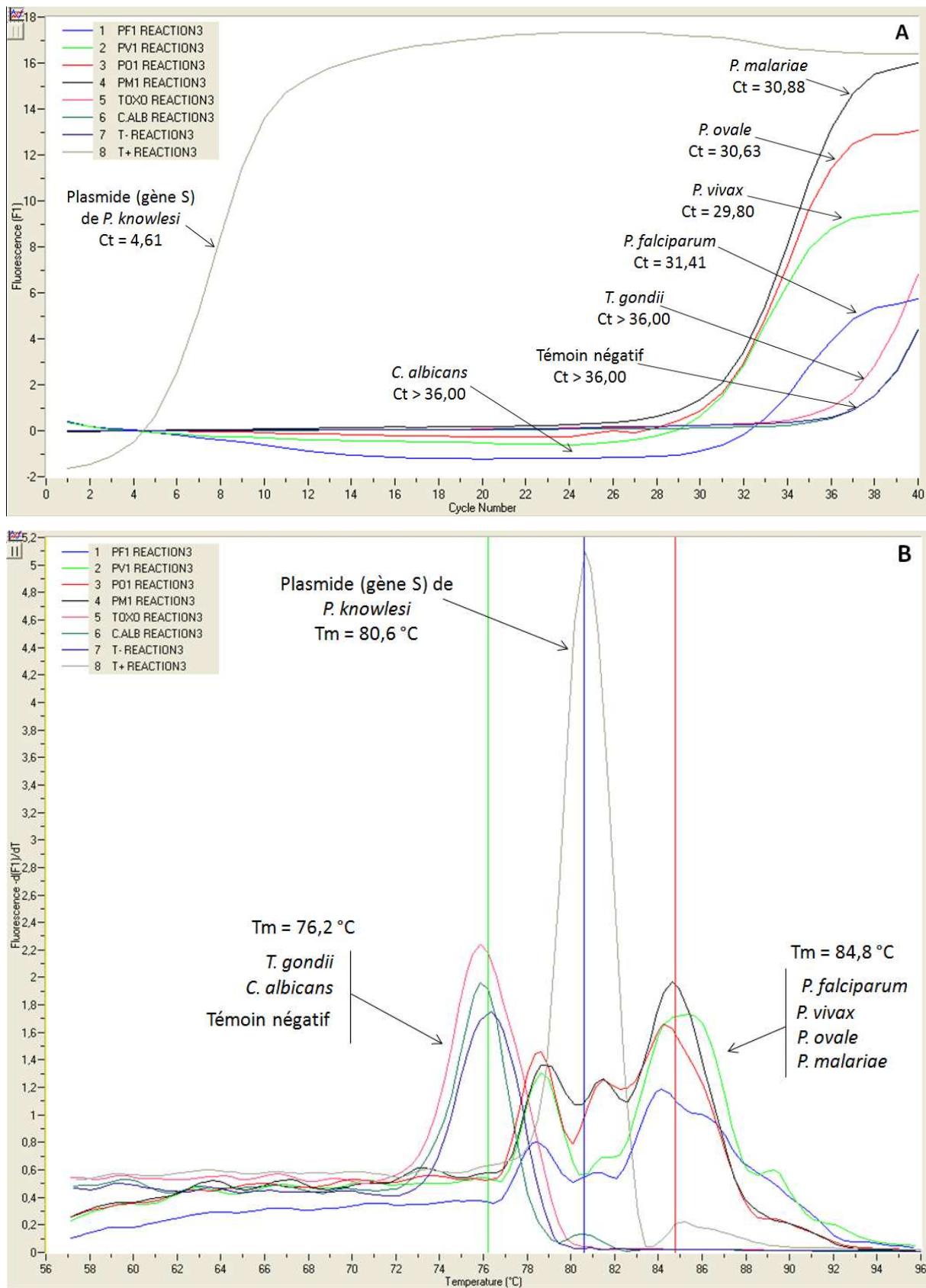


Figure 35 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenues en utilisant les amores Pmk8mF / PKfR (réaction 3) en PCR en temps réel SYBR Green avant optimisation des conditions.

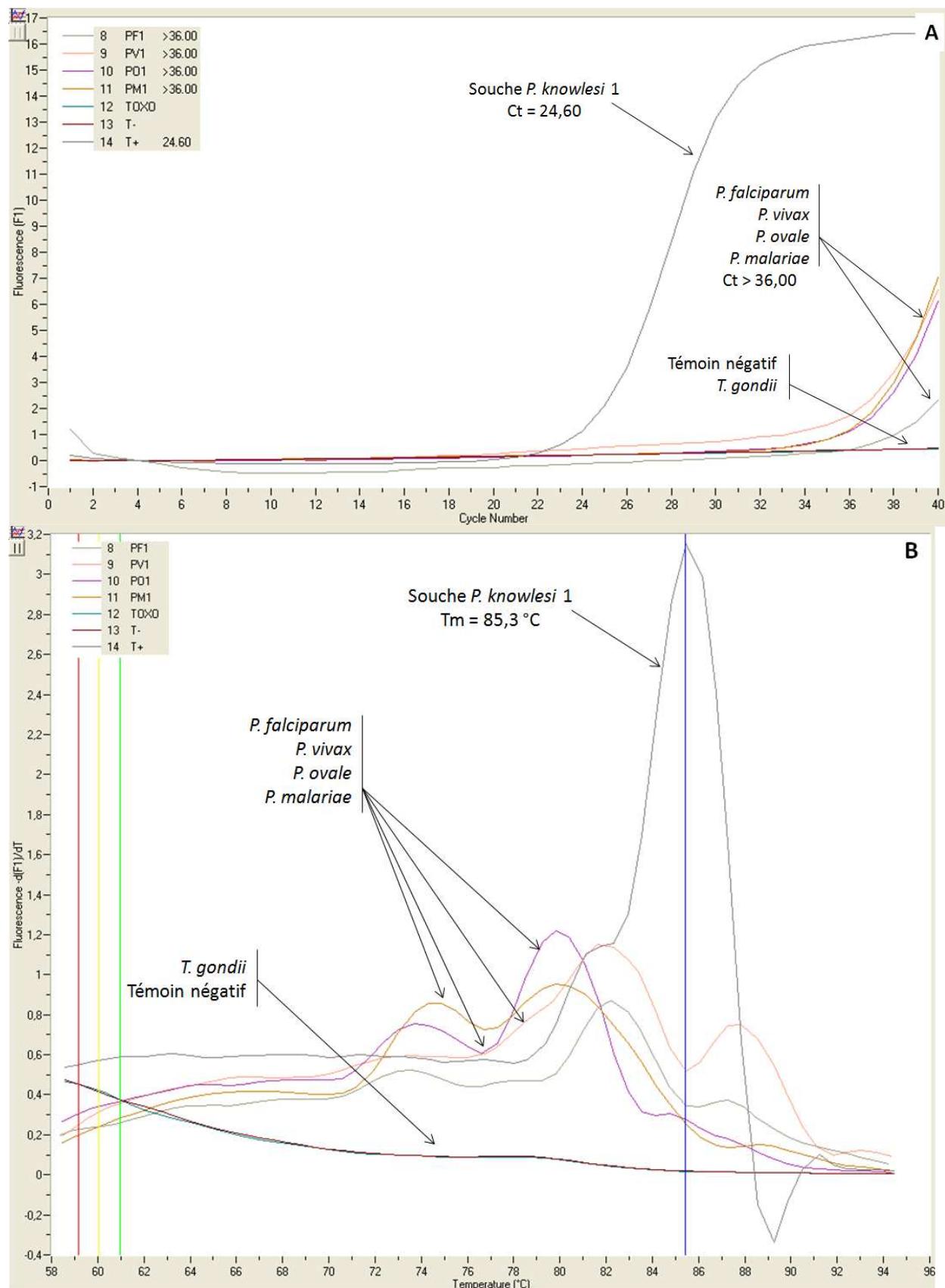


Figure 36 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenues en utilisant les amores PKe'F / PKg'R (réaction 8) en PCR en temps réel SYBR Green avant optimisation des conditions.

IV.3. Tests d'optimisation

Les conditions initiales d'amplification ont été celles décrites dans le chapitre « Matériel et Méthode » et correspondent aux concentrations initialement conseillées par la société Roche, fabricant du kit SYBR GREEN Master Mix I®.

Afin d'obtenir les meilleurs rendements d'amplification possibles avec les deux couples d'amorces sélectionnés et de limiter les réactions aspécifiques, il est nécessaire d'optimiser les concentrations en MgCl₂ et en amorces [87]. Les différentes concentrations testées sont celles de 1, 2, 3 et 4 mM de MgCl₂, et de 0,3, 0,4, et 0,5 µM d'amorces.

IV.3.1. Optimisation du couple d'amorces Pmk8mF / PKfR (réaction 3)

Les premiers tests réalisés avec le couple d'amorces Pmk8mF / PKfR ont montré une bonne sensibilité (C_t = 23,60) et des réactions croisées avec des courbes de fusion différentes de celle obtenue pour *P. knowlesi* (*figures 37 A et B*). L'optimisation des concentrations de MgCl₂ et d'amorces a pour objet d'éliminer ou d'atténuer ces réactions croisées.

Les concentrations optimales et donc à retenir sont celles pour lesquelles :

- le C_t est le plus précoce pour le témoin positif (meilleur rendement d'amplification)
- aucune amplification croisée n'est obtenue ou le plus tardivement possible (évaluation de la spécificité)
- les T_m obtenus pour *P. knowlesi* et d'éventuels autres échantillons diffèrent suffisamment de façon à éviter toute confusion lors de l'identification (vérification de la spécificité)

Ainsi, pour le couple d'amorces Pmk8mF / PKfR, les concentrations optimales retenues sont 3 mM de MgCl₂ et 0,4 µM de chacune des amorces. Avec ces conditions d'amplification, les amorces permettent d'amplifier *P. knowlesi* et de le différencier des autres ADN de *Plasmodium* sp. (*P. falciparum*, *figure 37 B*). Cependant, les dimères d'amorces apparaissant à la concentration de 0,4 µM d'amorces, ainsi que la persistance des réactions aspécifiques réduisent l'intérêt initial de cette sélection.

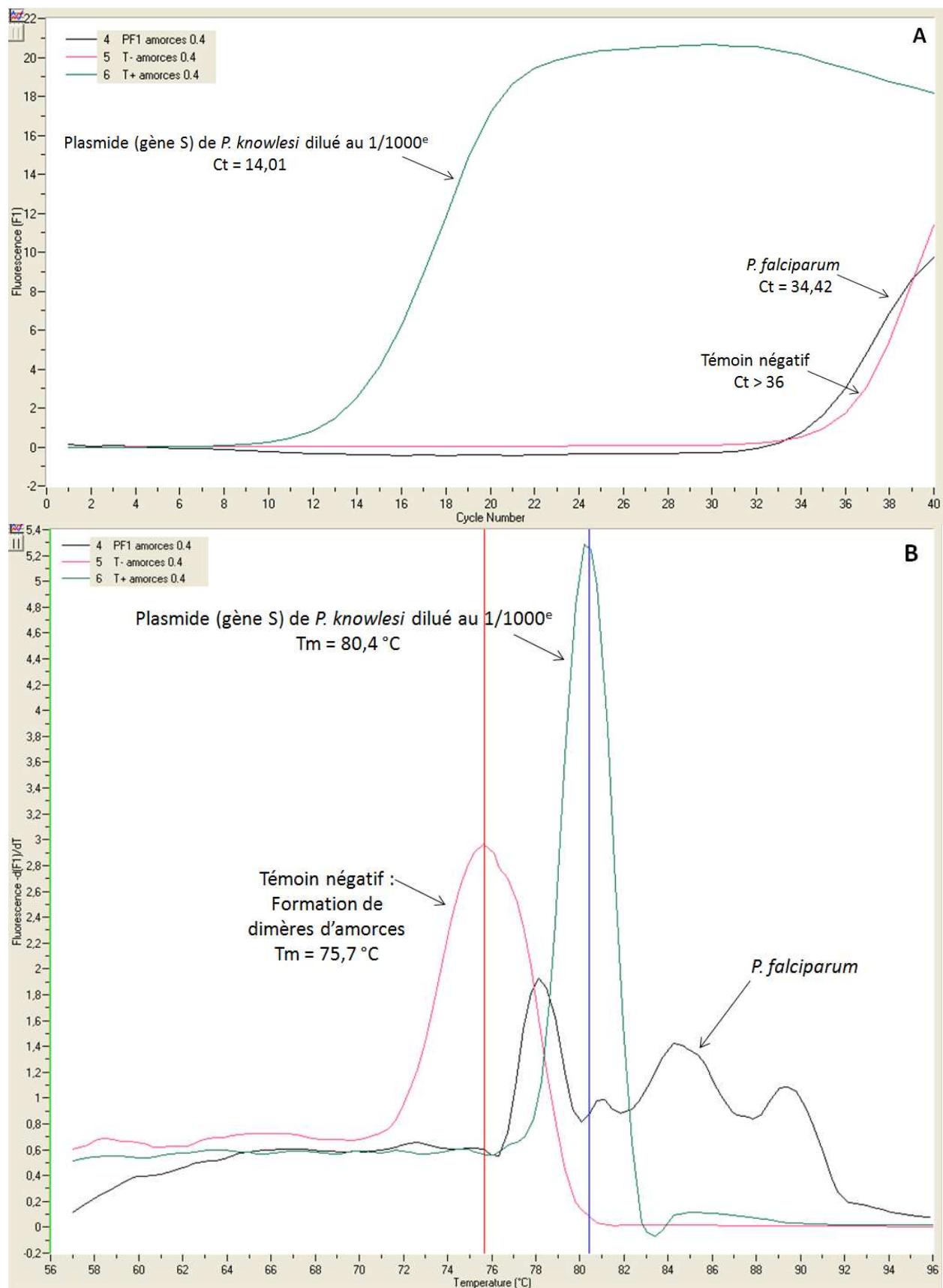


Figure 37 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenues en utilisant les amores Pmk8mF / PKfR (réaction 3) en PCR en temps réel SYBR Green après optimisation des conditions.

IV.3.2. Optimisation du couple d'amorces PKe'F / PKg'R (réaction 8)

Les concentrations offrant la meilleure spécificité tout en conservant une très bonne sensibilité sont les concentrations de 4 mM de MgCl₂ et de 0,3 µM d'amorces. Les volumes réactionnels correspondant aux concentrations optimales sont présentés dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 : Concentrations optimisées pour la préparation des Mix de la réaction 8 en PCR temps réel (pour 5 µL d'ADN à amplifier).

	Pour 1 Capillaire	Concentration finale
Tampon MgCl₂	2,4 µL	4 mM
Mélange Lightcycler 1a+1b	5 µL	-
Amorce sens 10µM	0,6 µL	0,3 µM
Amorce anti-sens 10 µM	0,6 µL	0,3 µM
Eau	8,6 µL	-

La *figure 38 A et B* présente les courbes d'amplification et de fusion obtenues avec les concentrations optimales retenues en MgCl₂ et en amorces. Une très légère réaction aspécifique est visible pour la souche *P. vivax* testée. Cependant, son amplification tardive, et l'aspect écrasé et décalé de sa courbe de fusion élimine le risque de confusion diagnostique. Les essais d'optimisation ont montré que ces résultats étaient répétables. L'évaluation des conditions optimales a donc essentiellement reposée sur l'obtention d'une amplification spécifique de *P. knowlesi* la plus précoce possible.

Suite à ces tests d'optimisation, le couple PKe'F / PKg'R, offrant une meilleure sensibilité et spécificité, est retenu.

Après avoir sélectionné le plus performant des deux couples d'amorces, des tests de spécificité et de sensibilité doivent être réalisés. Ceux-ci ont été réalisés en parallèle et pour une meilleure compréhension des résultats obtenus en spécificité, nous présentons tout d'abord l'évaluation de la sensibilité de la technique.

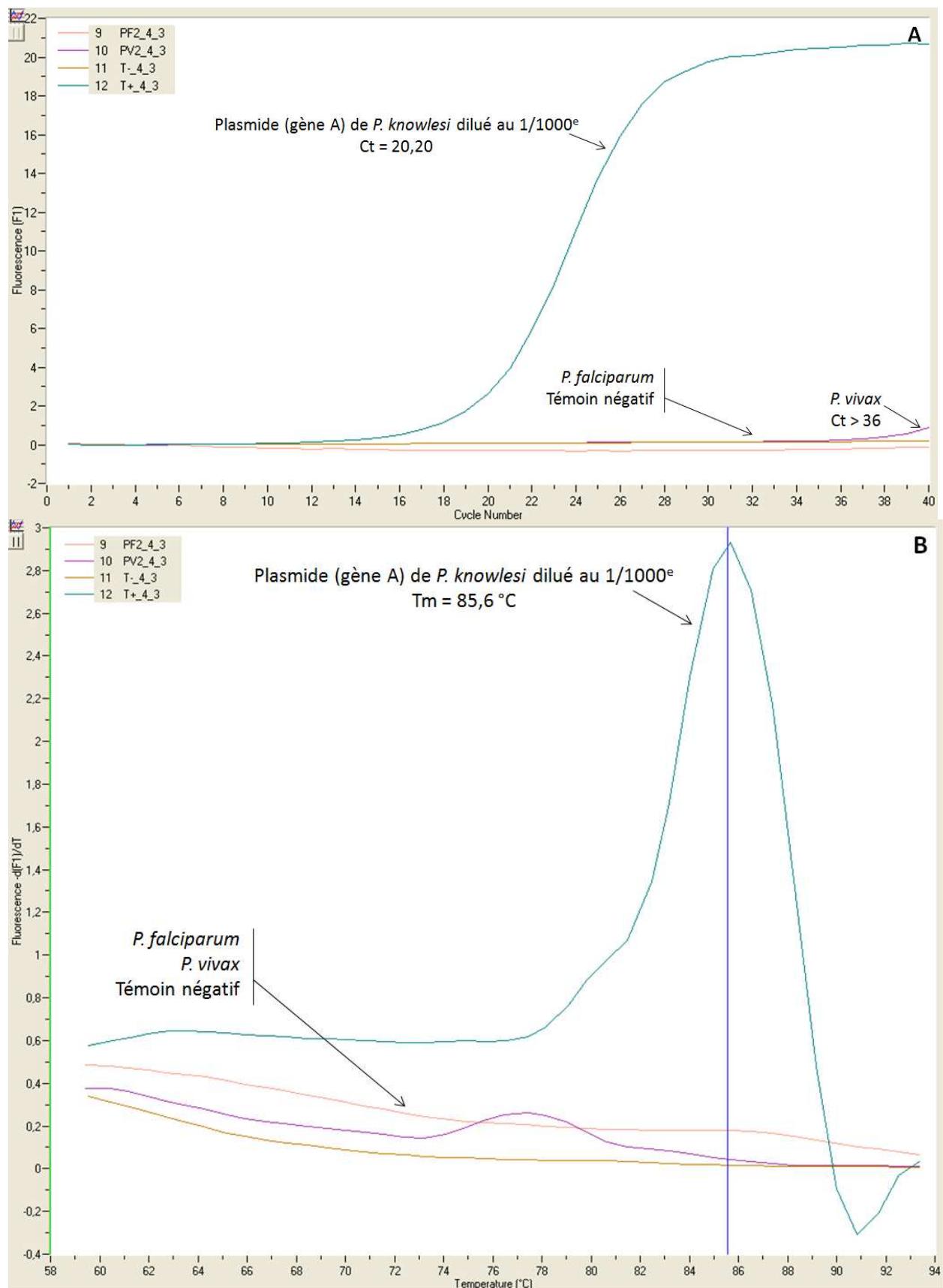


Figure 38 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenues en utilisant les amores PKe'F / PKg'R (réaction 8) en PCR en temps réel SYBR Green après optimisation des conditions.

IV.4. Test de sensibilité - Calcul de la limite de détection

La fabrication d'un plasmide contenant le gène 18S ADNr de type A permet de disposer d'une solution de titre connu en nombre de copies du gène à amplifier par microlitre. Après dosage de la concentration d'ADN plasmidique par spectrométrie, les calculs ci-dessous sont réalisés et la solution est évaluée à $3,56 \cdot 10^{10}$ copies du gène / μL :

- Dosage de la concentration du fragment amplifié, par spectrophotométrie et après purification sur colonne (kit QIAquick PCR Purification®, Qiagen) :
181,3 ng d'ADN / μL .
- Calcul du nombre de paires de bases (pb) du plasmide :
3850 pb (séquences d'insertion plasmidique, données fabricant) + 765 pb (séquence amplifiée à cloner) = 4615 pb
- Calcul de la masse moléculaire d'un fragment :
Masse moléculaire d'un fragment = Nombre de paires de bases x (masse moléculaire d'un nucléotide x 2)
4615 (pb) x 660 (g / mol) = $3,05 \cdot 10^6$ g / mol
- Calcul du nombre de copies de gène cible :

$$x \text{ (copies/}\mu\text{L)} = \frac{\text{Nombre d'Avogadro (copies/mol)} * \text{Concentration (g/}\mu\text{L)}}{\text{Masse Moléculaire (g/mol)}}$$

$$x = \frac{6 \cdot 10^{23} \text{ (copies/mol)} * 1,81 \cdot 10^{-7} \text{ (g/}\mu\text{L)}}{3,05 \cdot 10^6 \text{ (g/mol)}} = 3,56 \cdot 10^{10} \text{ (copies/}\mu\text{L)}$$

A partir de cette solution mère concentrée, une gamme de dilutions en cascade de raison 10, allant de 10^{10} à 1 copies / μL a été réalisée. L'amplification de chaque point de gamme est réalisée puis analysée selon les conditions optimisées présentées précédemment.

L'amplification reste significative des concentrations 10^8 copies / μl jusqu'à 10^2 copies / μL ($\text{Ct} < 36$, et $\text{Tm} = 85,3^\circ\text{C}$) (*figure 39 A et C*). Au dessus de 10^8 copies/ μL , la trop grande quantité d'ADN inhibe le rendement de PCR et minore les Ct obtenus, ces

concentrations ne peuvent donc être considérées dans la droite de régression (*figure 39 B*). En deçà de 10^2 copies / μL ($\text{Ct} = 34$), seuil de notre technique, les résultats des doublons ne sont plus reproductibles et donc ne sont plus fiables.

La droite de régression calculée permet une quantification de l'échantillon en nombre de copies / μL de gène 18S ADNr. Or, seule la parasitémie, correspondant à un nombre d'hématies parasitées par rapport aux hématies saines, est corrélée avec la clinique. La quantification génique, en nombre de copies / μL de gène ciblé, n'est pas proportionnelle à la parasitémie. En effet, au cours de leur maturation, les trophozoïtes des *Plasmodium* sp. multiplient leur matériel génétique pour atteindre la forme schizonte (multiplication asexuée). Un trophozoïte en début de maturation possède donc seulement 3 copies du gène 18S ADNr de type A. En fin de maturation, les trophozoïtes mûrs et les schizontes en contiennent 48 copies (16 merozoïtes). Un nombre important de copies du gène par μL de sang ne permet donc pas de présumer des stades parasitaires présents dans l'échantillon ni du nombre d'hématies parasitées.

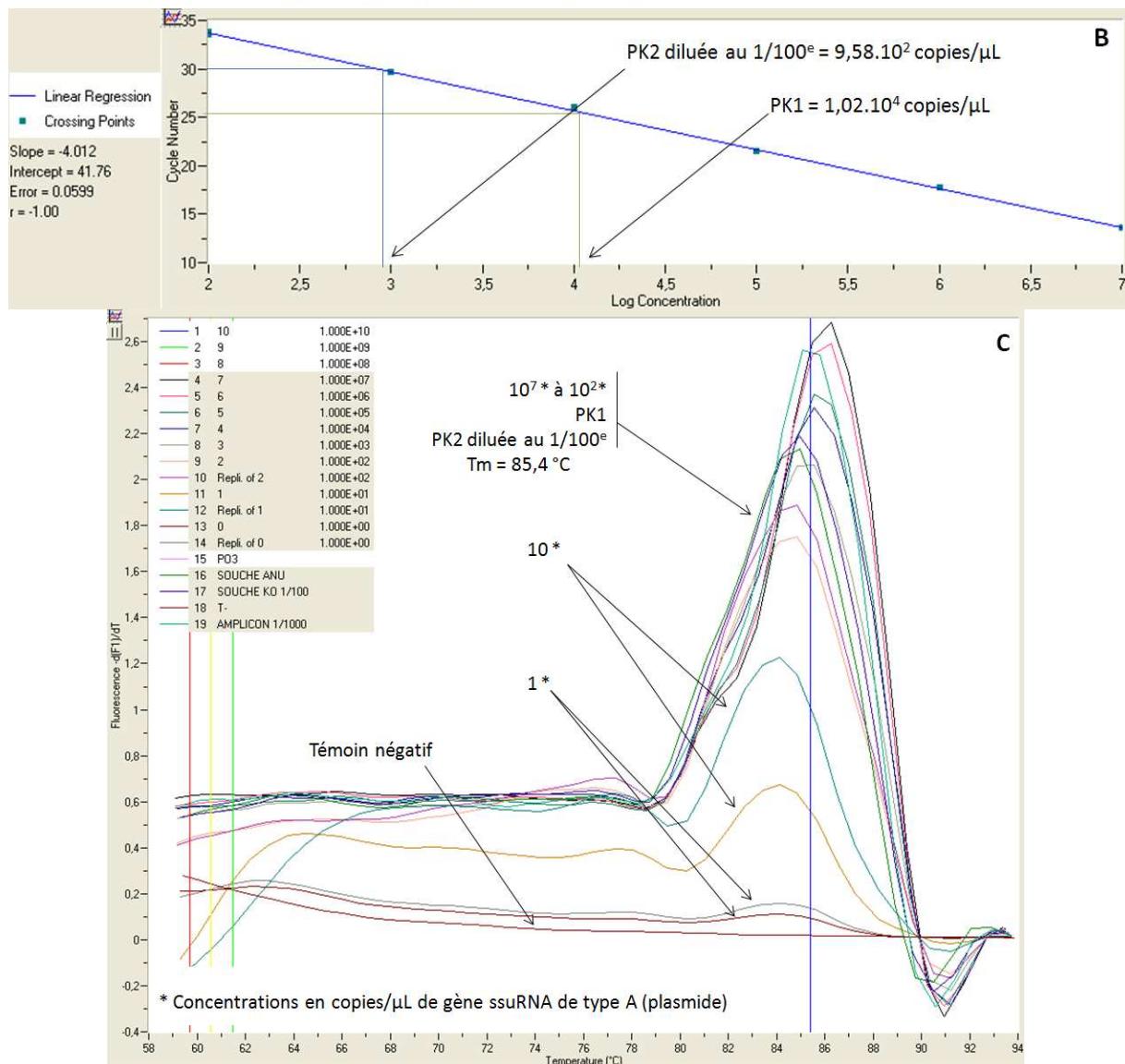
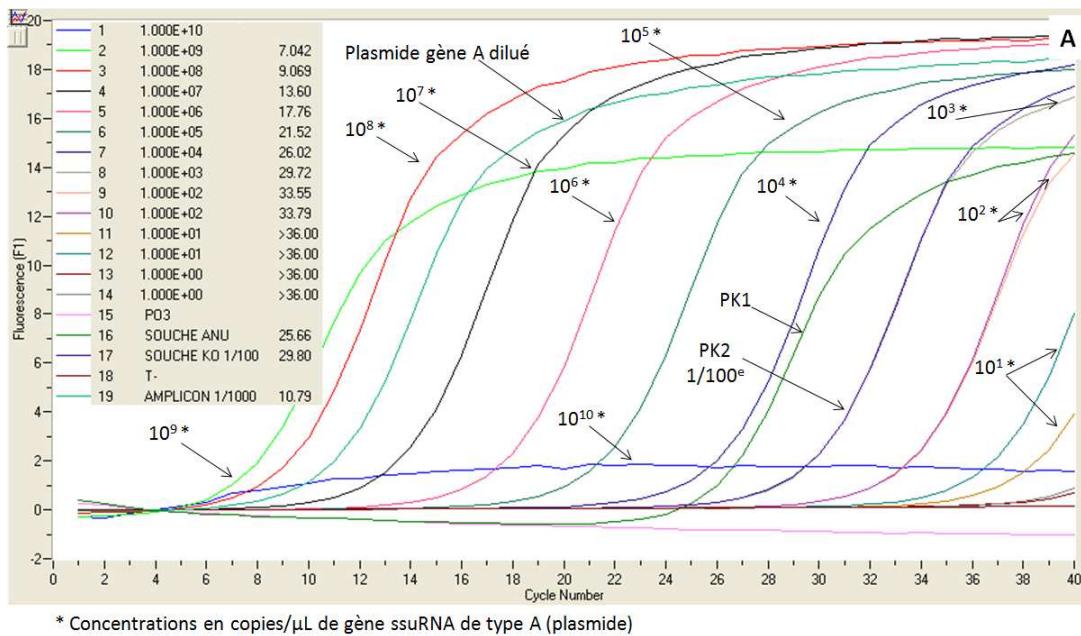


Figure 39 : Courbes d'amplification (A), de fusion (C) et droite de régression (B) obtenues lors des tests de sensibilité utilisant les amorce PKe'F / PKg'R (réaction 8) en PCR en temps réel SYBR Green.

IV.5. Test de spécificité

Pour évaluer la spécificité et la répétabilité du couple d'amorces PKe'F / PKg'R, plusieurs ADN issus de pathogènes potentiellement rencontrés au niveau sanguin ont été testés, ainsi que plusieurs souches des 4 espèces de *Plasmodium* sp. : cinq de *P. falciparum*, quatre de *P. vivax*, cinq de *P. ovale*, trois de *P. malariae*, une d'*Aspergillus fumigatus*, une de *Toxoplasma gondii*, une de *Candida albicans*, une de *Staphylococcus aureus*, une de *Pseudomonas aeruginosa*, une de Cytomégalovirus et une de virus de l'hépatite B. Les deux souches de *P. knowlesi* PK1 et PK2 ainsi que le plasmide du gène 18S ADNr de type A dilué au 1/1.000^e ont été utilisés comme contrôles positifs.

Les concentrations retenues pour la préparation du Mix réactionnel sont celles optimisées présentées dans le **Tableau 13**.

La figure 40 (A à J) ci-dessous présente les résultats obtenus. Le plasmide de *P. knowlesi* dilué (correspondant à 10⁷ copies du gène) présente une amplification à partir de 10 cycles. Les deux ADN de *P. knowlesi* envoyés par les laboratoires des Pays-Bas et Finlande sont respectivement amplifiés à partir de 26 et 28 cycles.

Toutes les courbes d'amplification obtenues pour des ADN autres que *P. knowlesi* ne montrent aucune émission de fluorescence visible avant le 36^e cycle d'amplification.

L'interprétation des amplifications tardives doit tenir compte des témoins positifs d'une part et de l'aspect des courbes de fusion d'autre part. Ainsi les courbes de fusion issues de l'amplification des pathogènes distincts des *Plasmodium* sp. montrent que ces réactions sont non spécifiques (figure 40 A et B).

L'analyse des courbes de fusion correspondant aux amplifications des ADN de *Plasmodium* doit être rigoureuse. Pour *P. falciparum* et *P. malariae* (figure 40 C, D, E, F), les courbes de fusion obtenues ne présentent pas l'aspect en pic caractéristique par comparaison aux courbes des témoins positifs, et ne se forment pas spécifiquement à 85,3°C et peuvent donc être écartées lors d'une analyse de spécificité.

Parmi les courbes issues de l'amplification de *P. vivax* et de *P. ovale* (figure 40 G, H, I, J), toutes n'ont pas le même aspect et plusieurs d'amplification posent problème du fait de leur sortie tardive. Pour certaines, l'amplification spécifique est écartée du fait de l'aspect non caractéristique de la courbe de fusion ou du Tm bien différent de 85°C. Cependant deux

courbes posent un problème un peu plus important et nécessite une attention plus particulière pour l'analyse : une pour *P. vivax* (figure 40 G et H, courbe violette) et une pour *P. ovale* (figure 40 I et J, courbe marron). Pour ces deux souches, les amplifications visibles sont détectées tardivement, après le seuil de sensibilité évalué dans le chapitre précédent ($C_t = 34$) soit à un $C_t > 36$. La T_m de la courbe de fusion est de $82,3^{\circ}\text{C}$, soit 3°C de différence par rapport au T_m de *P. knowlesi*. Ces deux souches présentent donc des réactions légèrement aspécifiques, de faible intensité pour *P. vivax* (intensité de fluorescence très faible), d'intensité légèrement supérieure pour celle de *P. ovale*, mais leur profil analysé en parallèle du contexte clinico-biologique et épidémiologique permet de les différencier de *P. knowlesi*.

L'interprétation des graphes doit donc toujours se faire en analysant à la fois les courbes d'amplification (seuil = 34 cycles) et de fusion ($T_m = 85,3^{\circ}\text{C} +/- 0,5^{\circ}\text{C}$).

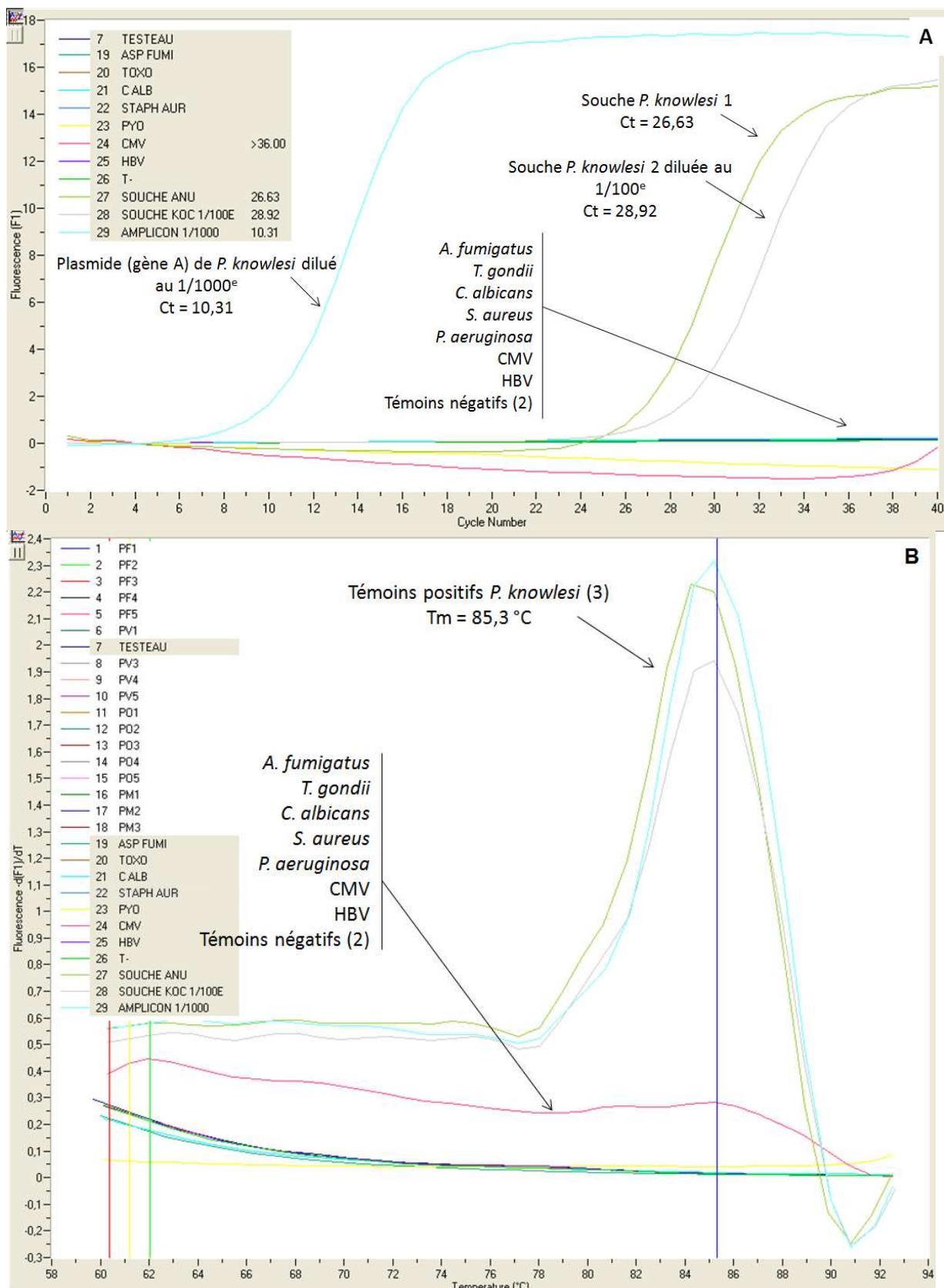


Figure 40 : Courbes d'amplification (A, C, E, G, I) et de fusion (B, D, F, H, J) obtenues lors des tests de spécificité effectués avec le couple d'amorces PKe'F / PKg'R (réaction 8) en PCR en temps réel SYBR Green.

Les chiffres entre parenthèse correspondent au nombre d'échantillons testés.

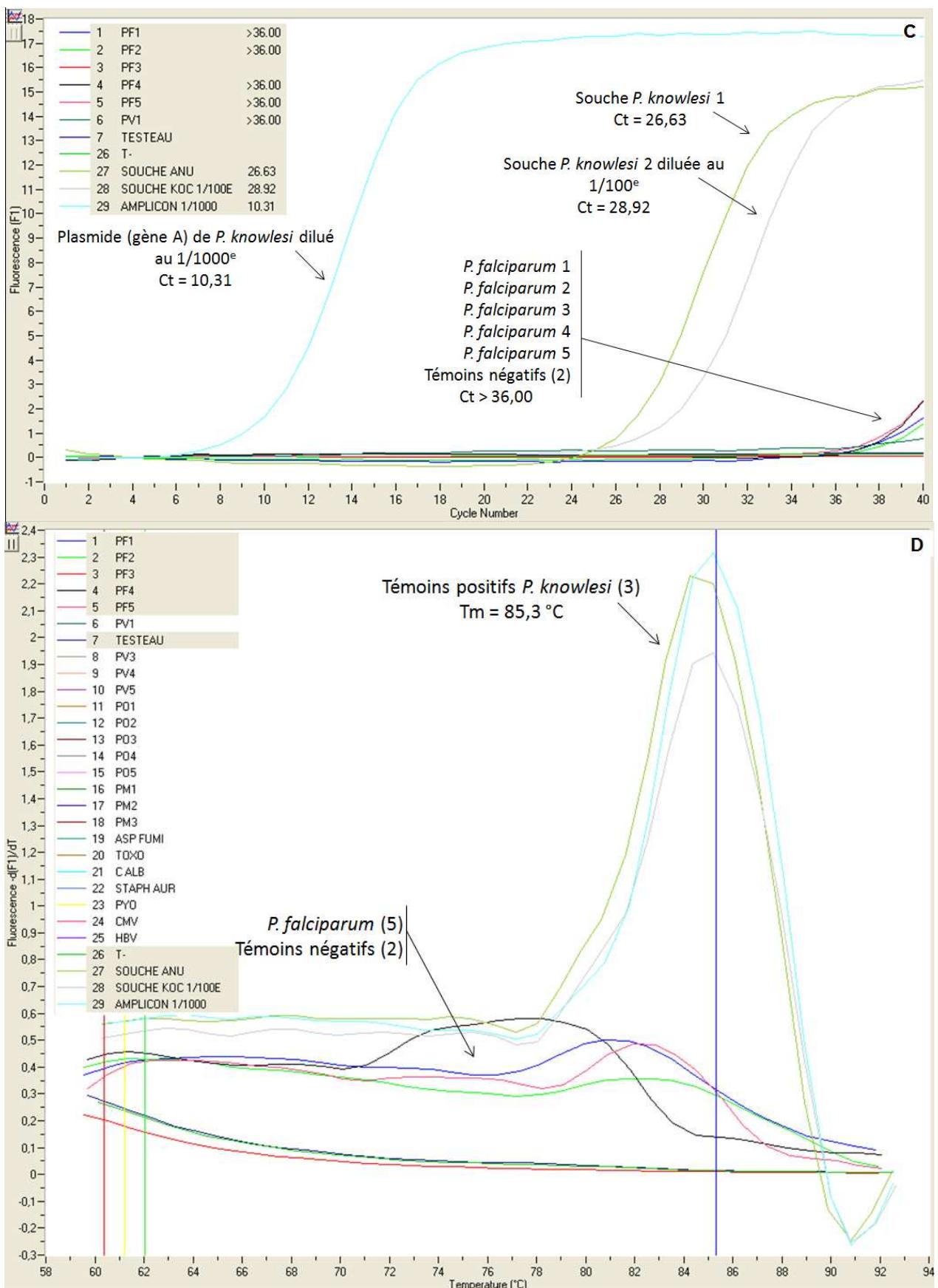


Figure 40 : Courbes d'amplification (A, C, E, G, I) et de fusion (B, D, F, H, J) obtenues lors des

tests de spécificité effectués avec le couple d'amorces PKe'F / PKg'R (réaction 8) en PCR en

temps réel SYBR Green.

Les chiffres entre parenthèse correspondent au nombre d'échantillons testés.

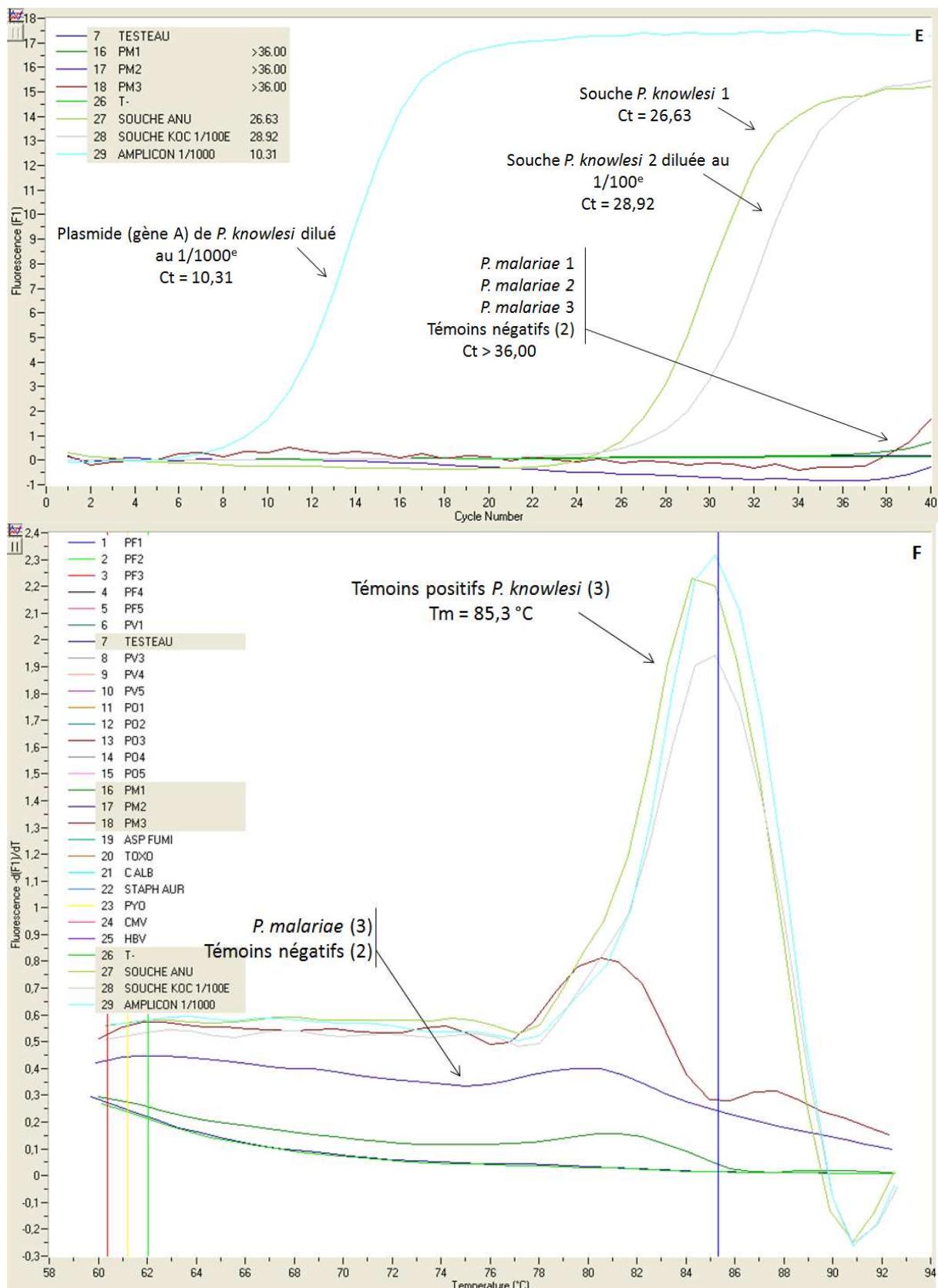


Figure 40 : Courbes d'amplification (A, C, E, G, I) et de fusion (B, D, F, H, J) obtenues lors des tests de spécificité effectués avec le couple d'amorces PKe'F / PKg'R (réaction 8) en PCR en temps réel SYBR Green.

Les chiffres entre parenthèse correspondent au nombre d'échantillons testés.

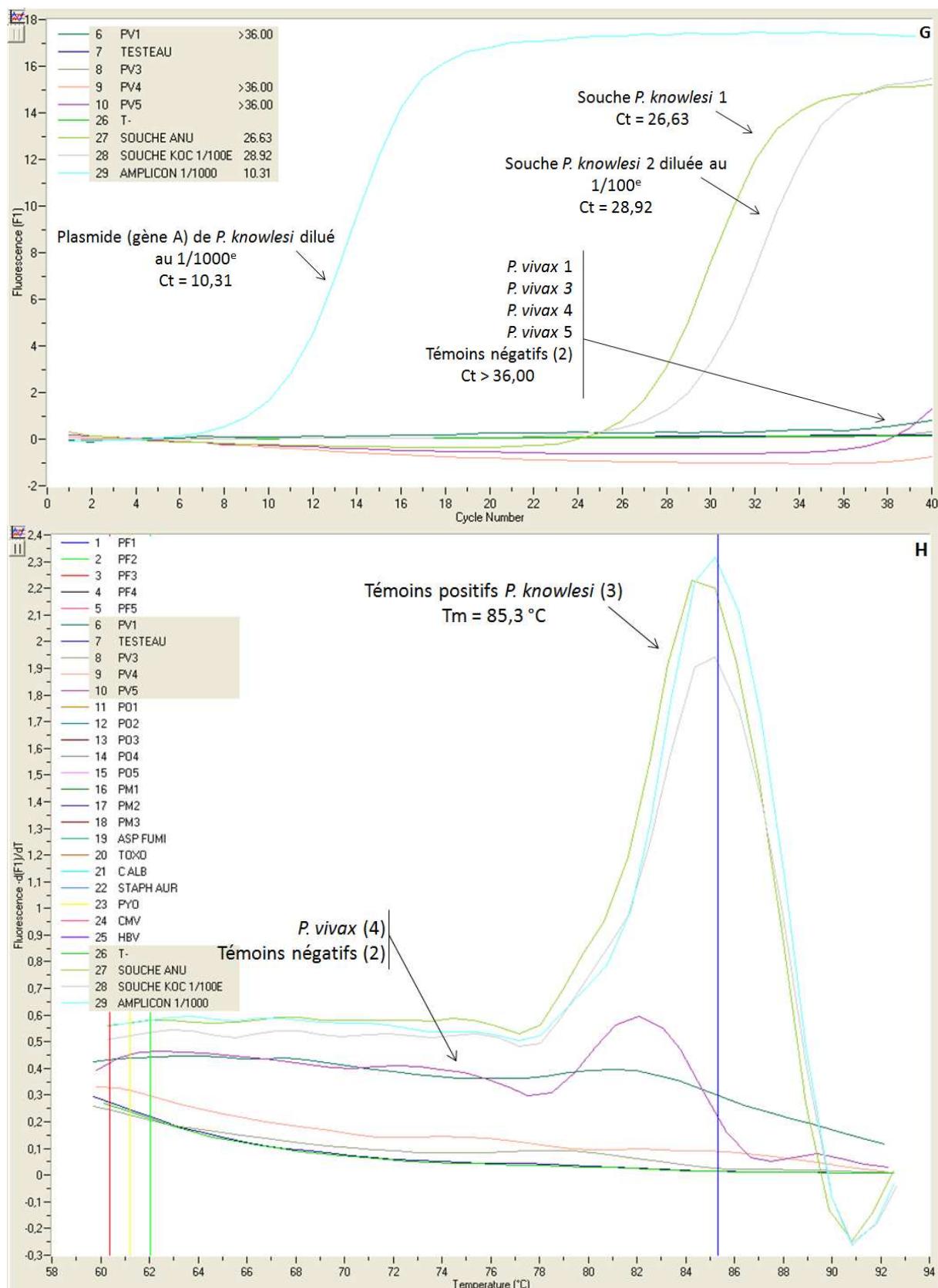


Figure 40 : Courbes d'amplification (A, C, E, G, I) et de fusion (B, D, F, H, J) obtenues lors des tests de spécificité effectués avec le couple d'amorces PKe'F / PKg'R (réaction 8) en PCR en temps réel SYBR Green.

Les chiffres entre parenthèse correspondent au nombre d'échantillons testés.

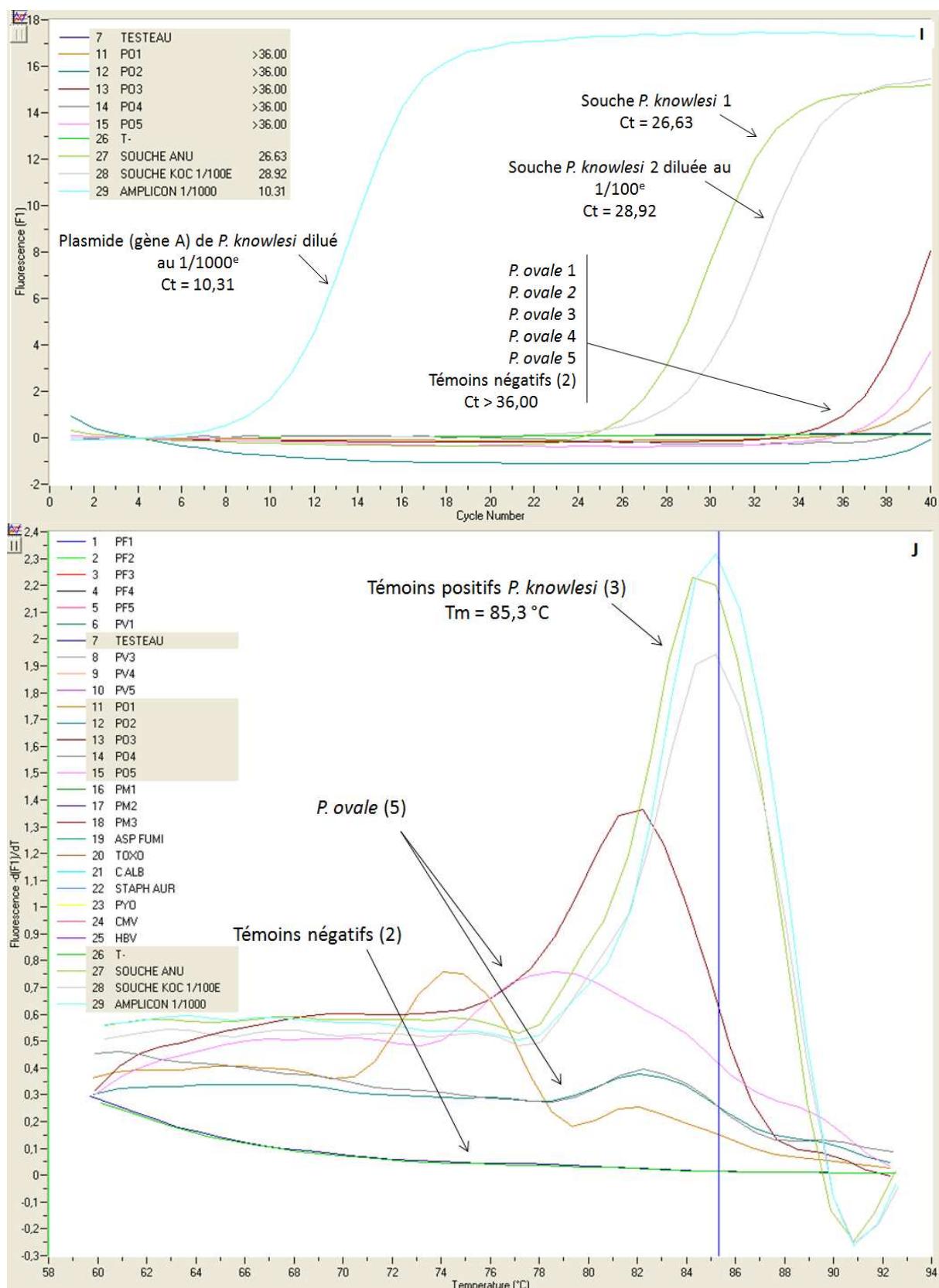


Figure 40 : Courbes d'amplification (A, C, E, G, I) et de fusion (B, D, F, H, J) obtenues lors des tests de spécificité effectués avec le couple d'amorces PKe'F / PKg'R (réaction 8) en PCR en temps réel SYBR Green.

Les chiffres entre parenthèse correspondent au nombre d'échantillons testés.

IV.6. Intégration de la détection de *P. knowlesi* aux protocoles en place

De façon à intégrer le diagnostic de *P. knowlesi* dans le protocole actuellement en place au CHU de Nancy et à l'HIA Legouest de Metz, l'absence d'amplification de *P. knowlesi* avec les amorces utilisées spécifiquement pour les autres *Plasmodium* sp. dans ces deux centres a été testée.

IV.6.1. Laboratoire du CHU de Nancy

Aucune réaction croisée n'a été observée entre les amorces spécifiquement utilisées pour *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* et l'ADN de *P. knowlesi*. (*figures 41, 42 et 43*). En revanche, une amplification importante est obtenue avec les amorces PVS1/PSP1AS ciblant *P. vivax* (*figure 44* : Ct = 29,99 (A) et Tm différent de seulement 2°C (B)).

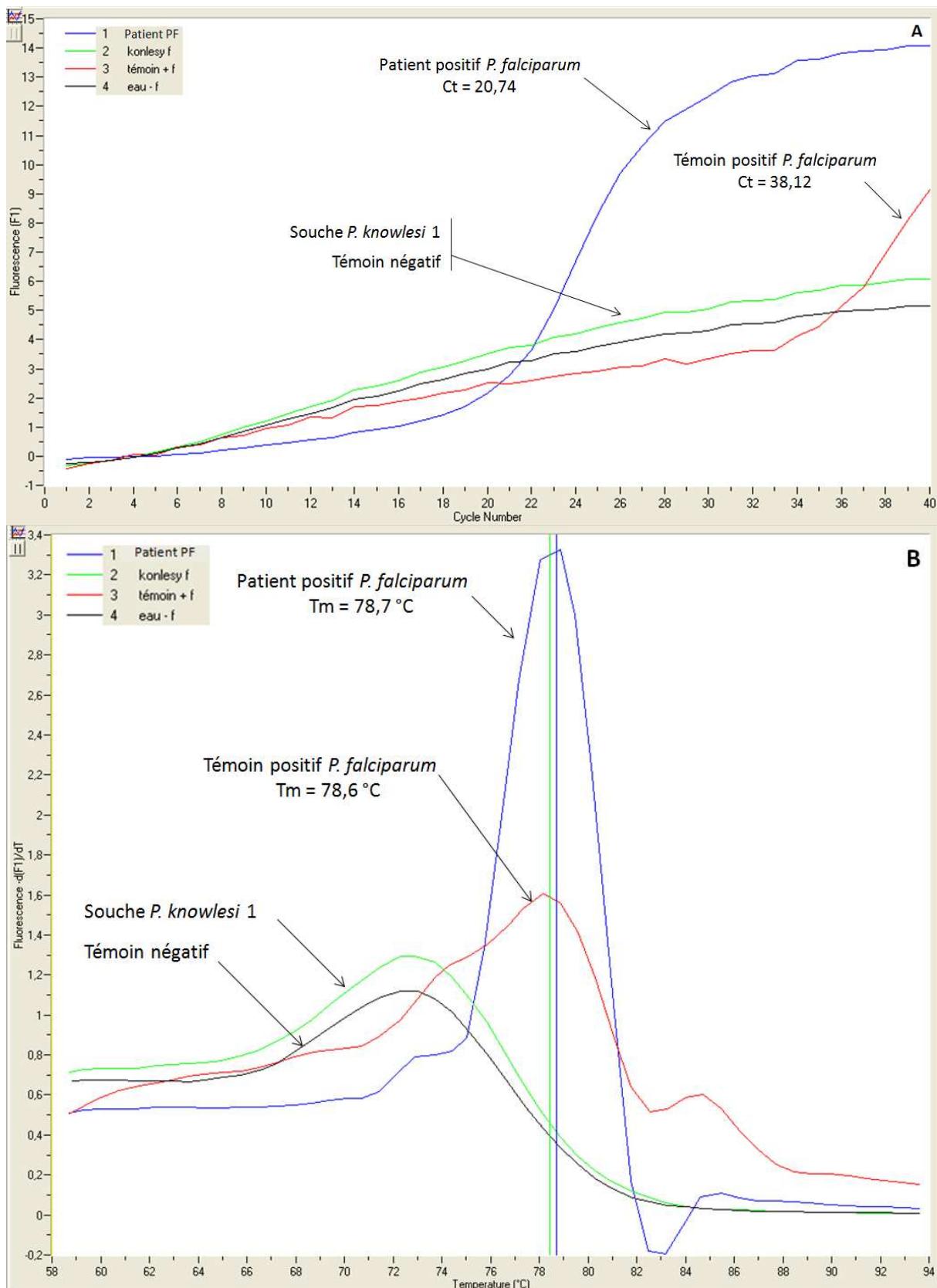


Figure 41 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenues lors des tests de spécificité envers *P. knowlesi* pour les amores spécifiques de *P. falciparum* (PFS1 / PSP1AS) utilisées en PCR temps réel SYBR Green au CHU de Nancy.

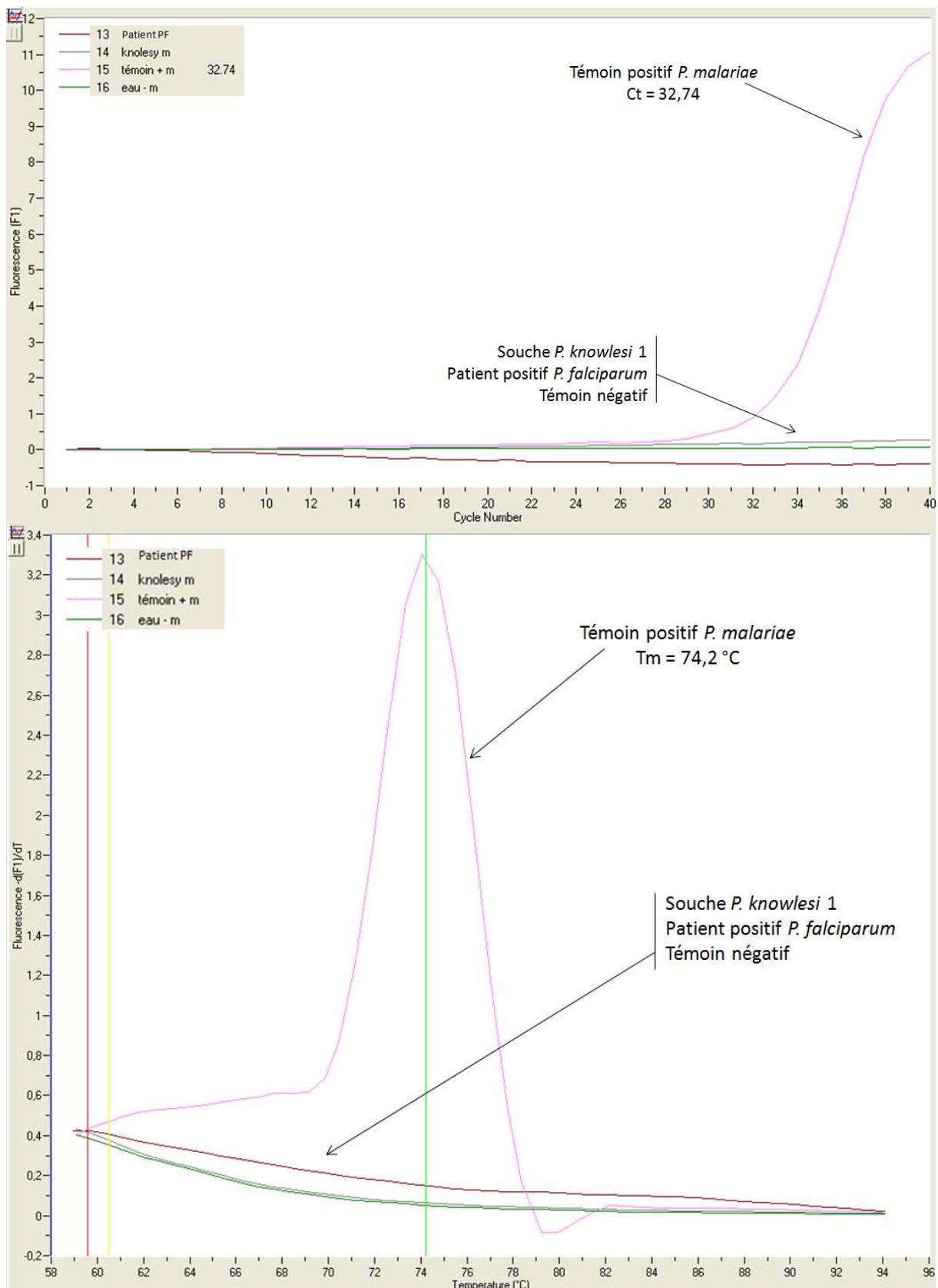


Figure 42 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenus lors des tests de spécificité envers *P. knowlesi* pour les amorces spécifiques de *P. malariae* (PM1 / PM2) utilisées en PCR temps réel SYBR Green au CHU de Nancy.

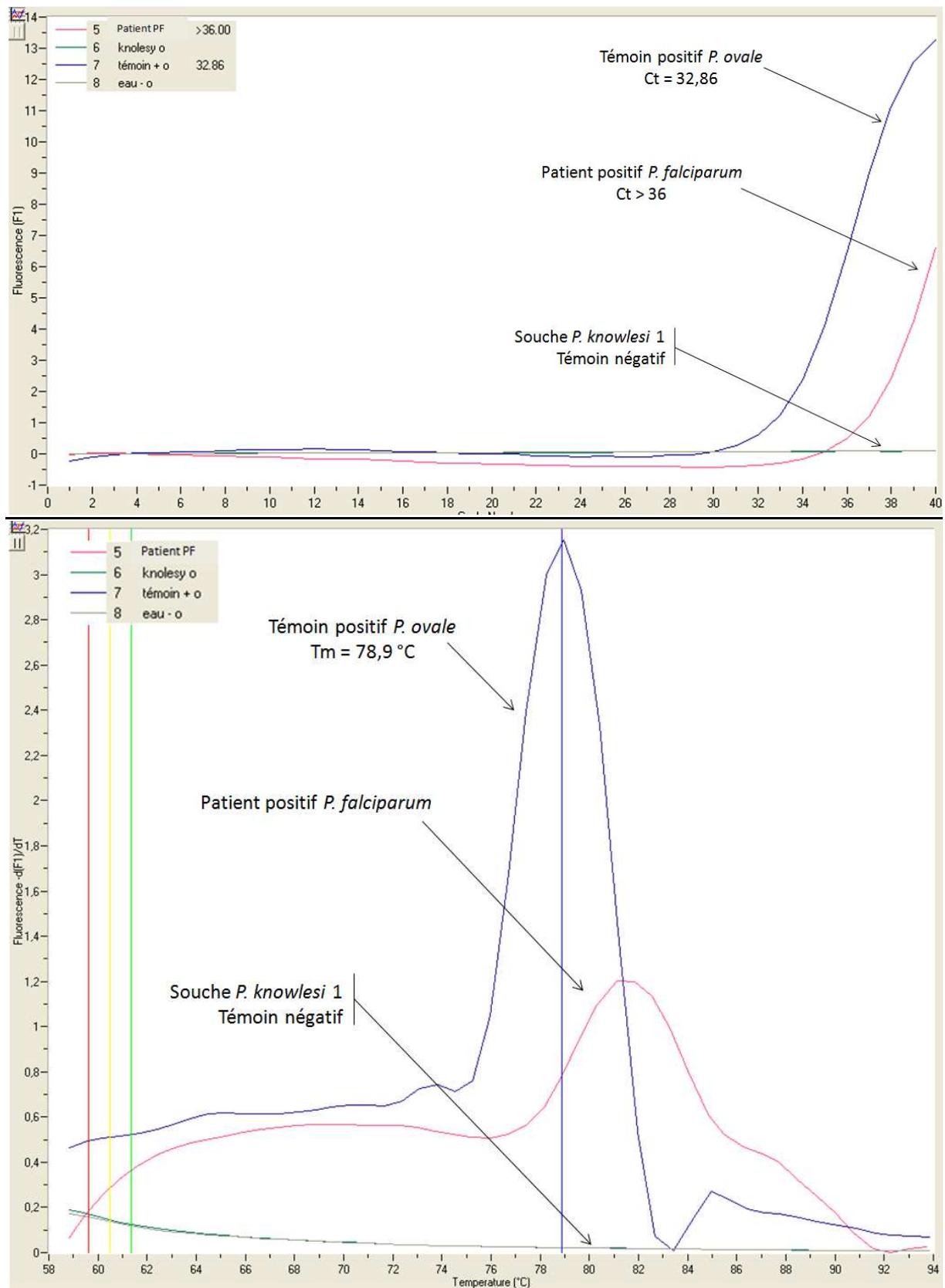


Figure 43 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenus lors des tests de spécificité envers *P. knowlesi* pour les amorces spécifiques de *P. ovale* (POS1 / PSP1AS) utilisées en PCR temps réel SYBR Green au CHU de Nancy.

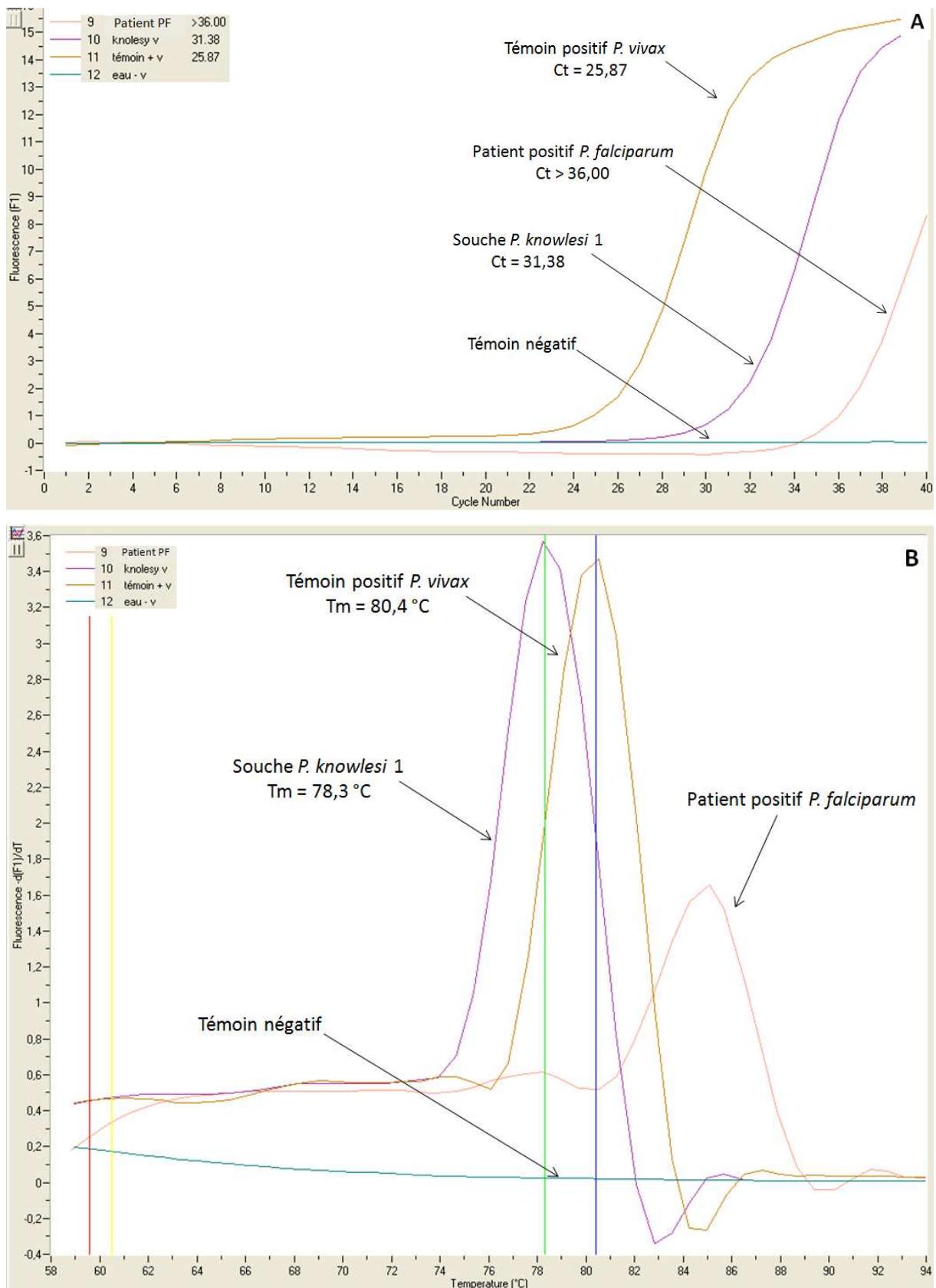


Figure 44 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenus lors des tests de spécificité envers *P. knowlesi* pour les amores spécifiques de *P. vivax* (PVS1/PSP1AS) utilisées en PCR temps réel SYBR Green au CHU de Nancy.

Pour pallier à cette absence de spécificité des amorces PVS1 / PSP1AS, *P. knowlesi* a été amplifié à l'aide des amorces PV1 / PV2 décrites par De Monbrison et coll. [60] (figure 45). Aucune réaction d'amplification croisée n'ayant été obtenue, ces amorces sont donc introduites au laboratoire de parasitologie du CHU de Nancy et remplacent PVS1 / PSP1AS.

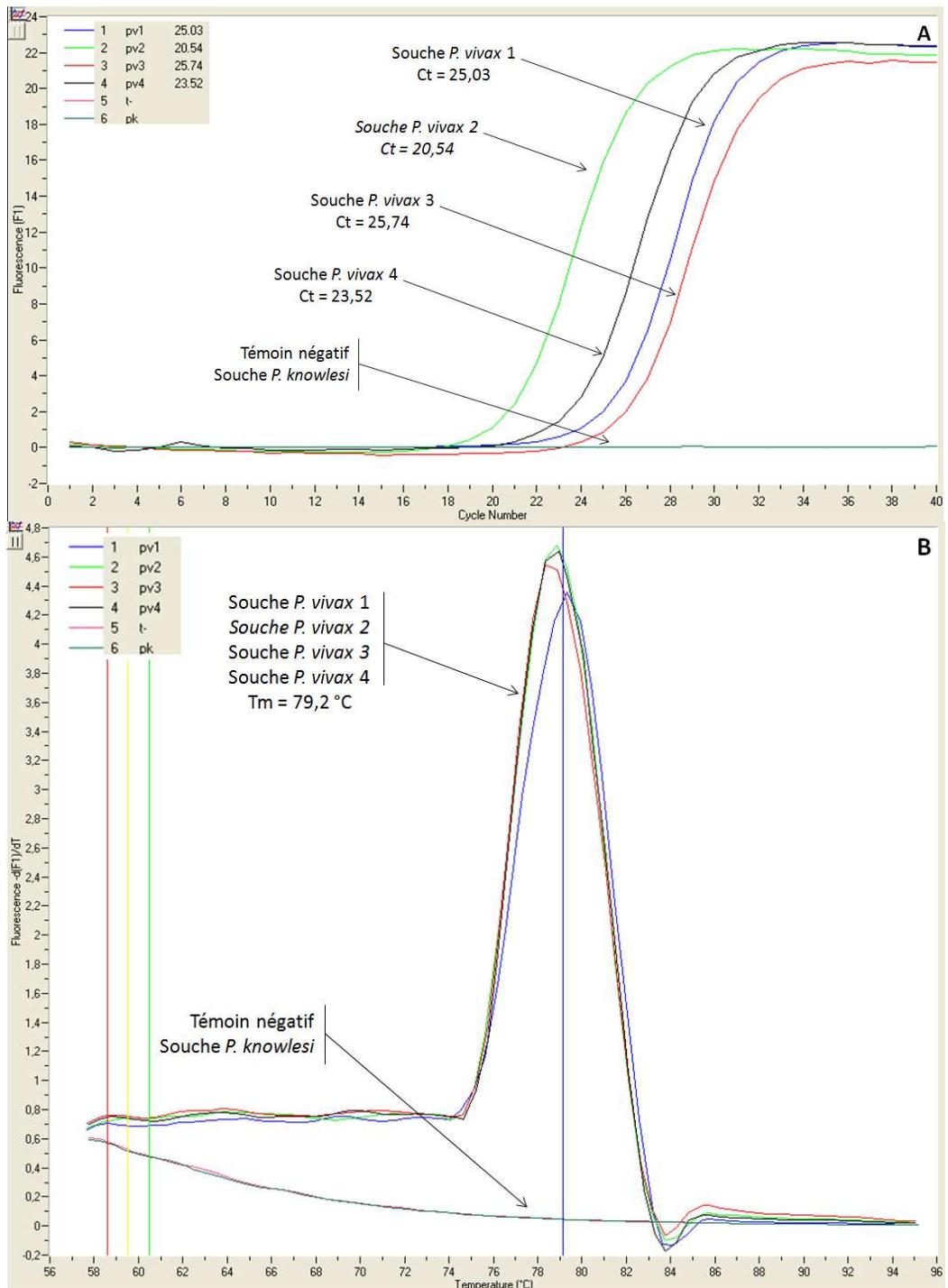


Figure 45 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenus lors des tests de spécificité envers *P. knowlesi* pour les amorces spécifiques de *P. vivax* (PV1 / PV2) utilisées en PCR temps réel SYBR Green au CHU de Nancy.

IV.6.2. Laboratoire de l'HIA Legouest

Selon une étude bioinformatique que nous avons menée (non présentée ici), les amorces génospécifiques PSP1 / PSP2 utilisées à l'HIA Legouest dans la réaction « PanPalu » sont capables de se fixer à *P. knowlesi*. De plus, les zones de fixation de ces amorces sont toutes deux à l'intérieur de notre séquence plasmidique (gène 18S ADNr de type A), entraînant ainsi son amplification. La figure 46 présente les résultats obtenus de l'amplification de *P. knowlesi* en utilisant ces amorces PSP1 / PSP2.

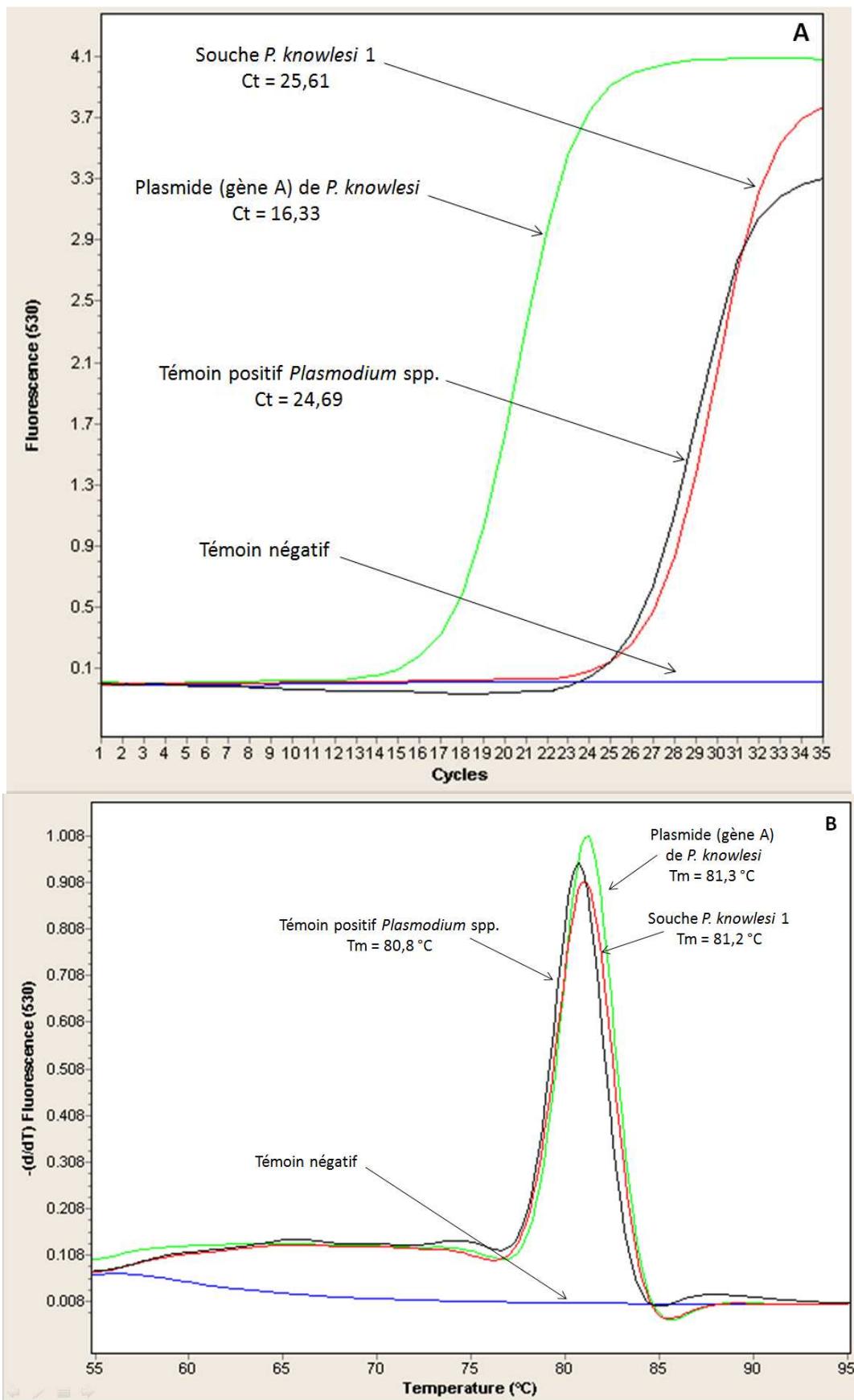


Figure 46 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenues en utilisant les amores génospécifique PSP1 / PSP2 à l' HIA Legouest.

Secondairement, les amorces spécifiques d'espèces utilisées à l'HIA Legouest de Metz ont été testées vis à vis de *P. knowlesi*. La figure 47 présente les résultats obtenus lors de chacune des 4 réactions utilisant les amorces PanPalu / PfalR pour *P. falciparum* (figure 47 A), PV1 / PV2 pour *P. vivax* (figure 47 B), POV1 / POV2 / POV2V pour *P. ovale* (figure 47 C) et PM1 / PM2 pour *P. malariae* (figure 47 D). Nous n'observons aucune amplification aspécifique, ni pour le plasmide, ni pour la souche *P. knowlesi* 1 testée.

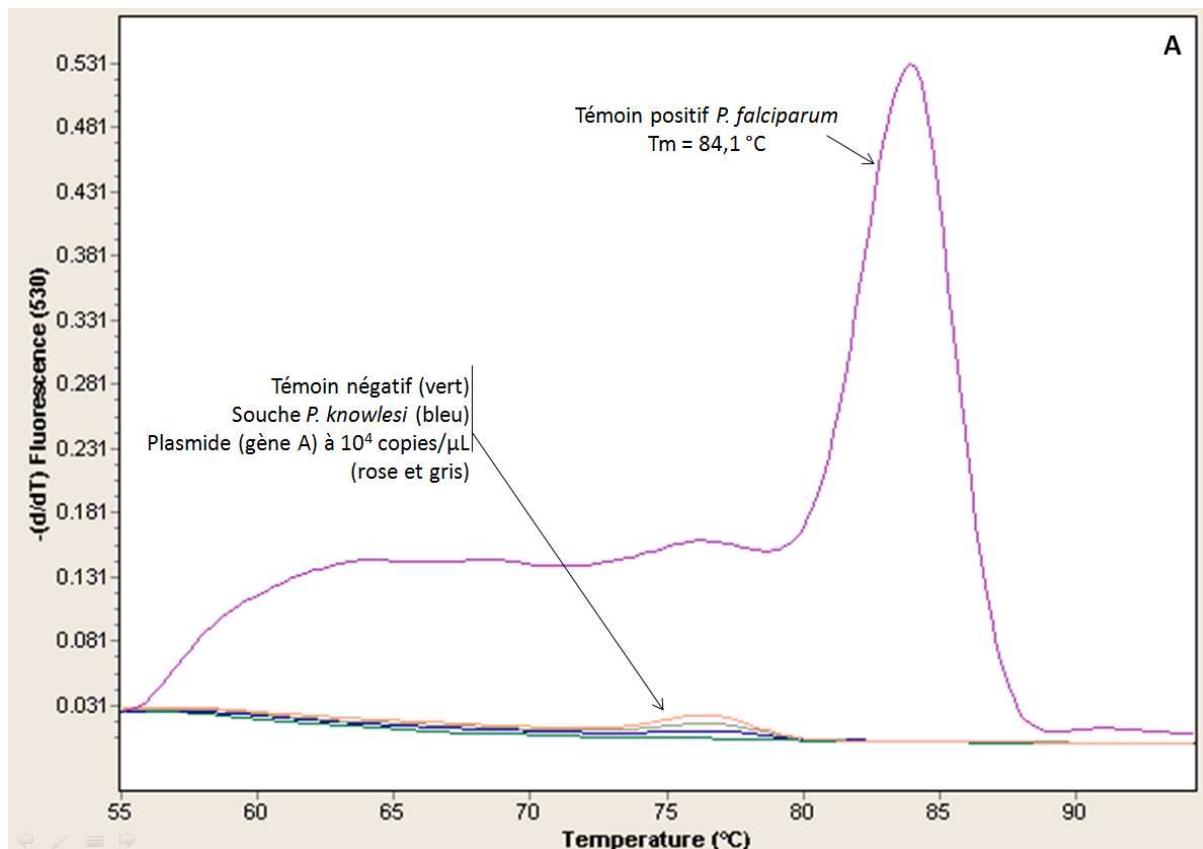


Figure 47 : Courbes de fusion obtenues lors des amplifications de *P. knowlesi* avec les 4 couples d'amorces spécifiques de *P. falciparum* (A), *P. vivax* (B), *P. ovale* (C) et *P. malariae* (D).

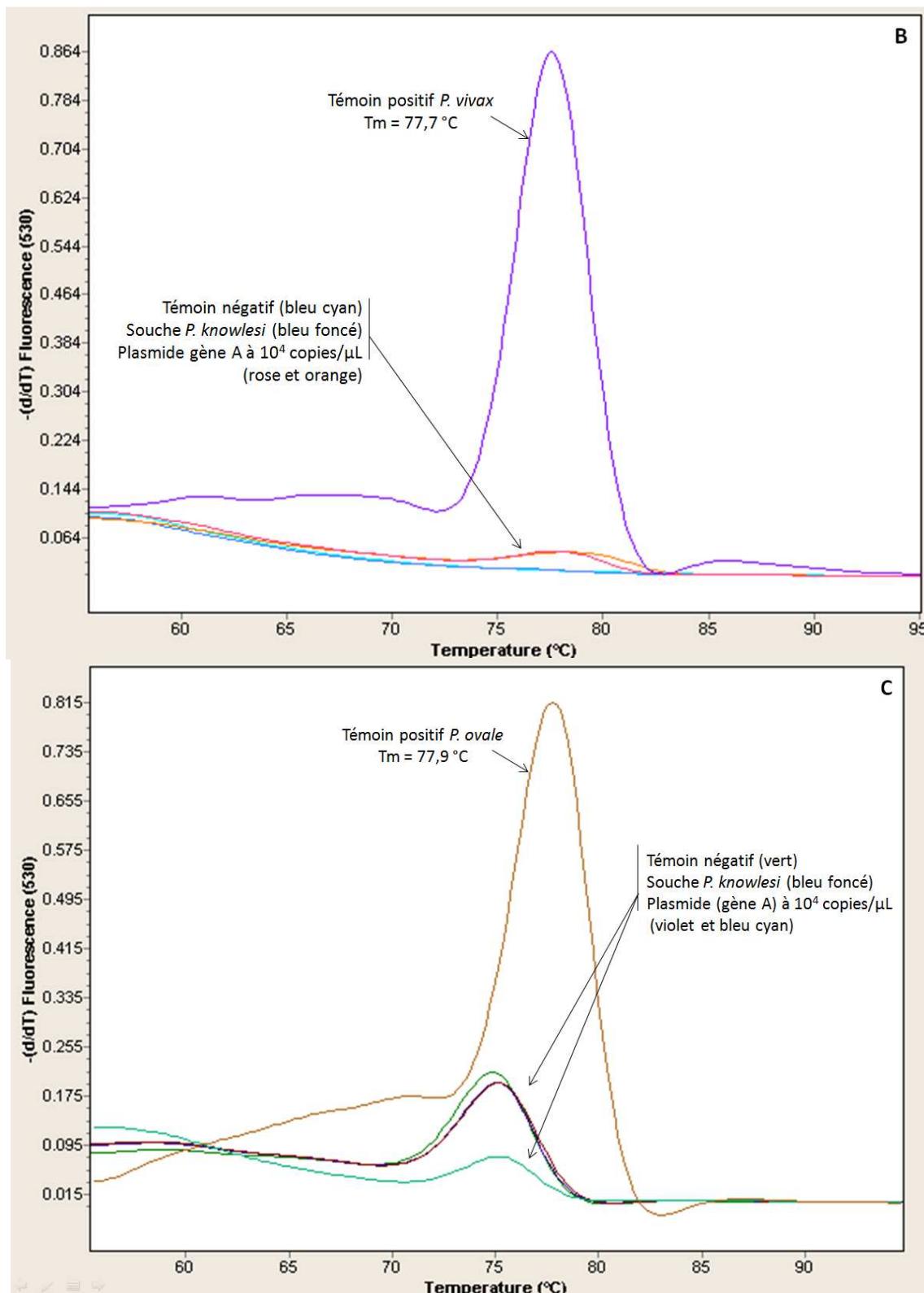


Figure 47: Courbes de fusion obtenues lors des amplifications de *P. knowlesi* avec les 4 couples d'amorces spécifiques de *P. falciparum* (A), *P. vivax* (B), *P. ovale* (C) et *P. malariae* (D).

Des variations de fluorescence sont observées sur les courbes des *P. knowlesi* et du témoin négatif (figure 47 C). Elles correspondent à la formation de dimères d'amorces, et n'ont pas d'impact sur la positivité de ces courbes.

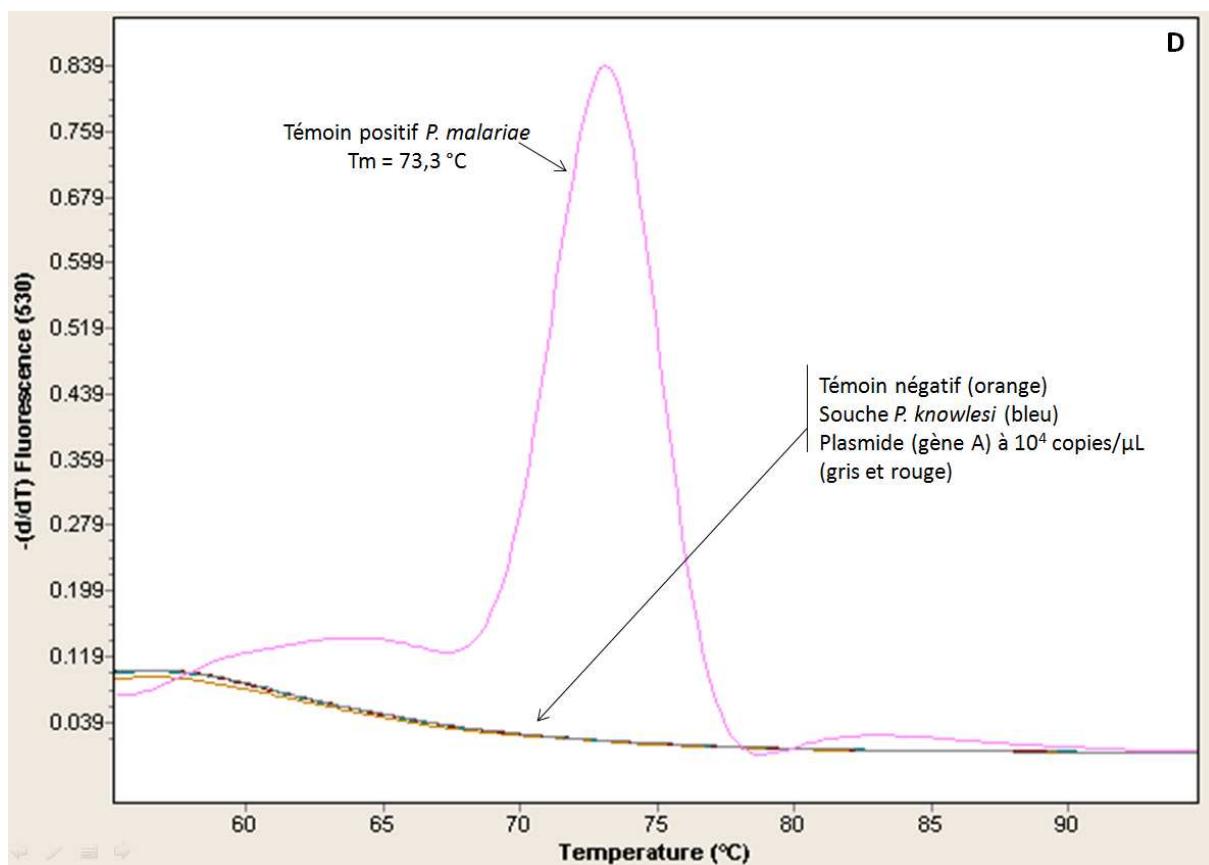


Figure 47 : Courbes de fusion obtenues lors des amplifications de *P. knowlesi* avec les 4 couples d'amorces spécifiques de *P. falciparum* (A), *P. vivax* (B), *P. ovale* (C) et *P. malariae* (D).

IV.7. Interprétation des résultats

Les tests de sensibilité effectués au CHU de Nancy montrent que les résultats sont interprétables jusqu'à la concentration de 10^2 copies du gène 18S ADNr / μL , équivalent à un $\text{Ct} = 34$.

Les tests de spécificité n'ont montré aucune réaction aspécifique en deçà de 36 cycles d'amplification. Au delà de 36 cycles, des réactions aspécifiques, dues essentiellement à la limite de la technique SYBR Green, peuvent apparaître. L'interprétation des résultats obtenus doit donc tenir compte à la fois des courbes d'amplification et de température de fusion. Les amplifications survenant avant le 34^e cycle, et dont la Tm est de $85,3^\circ\text{C}$ ($+/- 0,5^\circ\text{C}$) sont des amplifications spécifiques de *P. knowlesi* et interprétables comme telles. Les amplifications survenant après ce cycle seuil, ou dont la Tm est inférieure à $84,8^\circ\text{C}$ ou supérieure à $85,8^\circ\text{C}$ doivent être considérées avec prudence.

En effet, même si le seuil de sensibilité de la technique développée est bas, inférieur aux techniques conventionnelles, il est cependant délicat de différencier une infection à très faible parasitémie et sortant tardivement en PCR, d'une réaction aspécifique due à la présence d'une autre espèce de *Plasmodium* sp. Ces résultats tardifs ne peuvent être rendus négatifs qu'après une expertise plus poussée, et après confrontation aux résultats de microscopie, d'amplification génique des 4 autres espèces, ainsi qu'aux données clinico-biologiques et épidémiologiques du patient.

Cette technique, exploitable par les Centres hospitaliers de Nancy et de l'HIA Legouest de Metz, est incluse dans le panel des analyses moléculaires actuellement en place pour le diagnostic du paludisme.

V. Discussion

Récemment, *P. knowlesi* a été reconnu comme la cinquième espèce plasmodiale pathogène pour l'Homme. La découverte récente de nombreux cas humains d'infections à *P. knowlesi* en Asie du Sud-Est et la multiplication des cas d'importation en Europe [41-42, 44, 91] imposent aux laboratoires de parasitologie de faire évoluer leur stratégie diagnostique du paludisme [4-6, 28, 32, 36-39, 45, 63]. En effet, cette nouvelle espèce, tout comme *P. falciparum* expose le patient à un risque mortel. De plus, les échanges internationaux sont actuellement favorisés par l'expansion économique, et l'attrait vers les pays asiatiques augmente constamment du fait de l'ouverture de plus en plus importante de ces pays au tourisme. A l'avenir, les cas d'importation sont susceptibles d'être plus nombreux [40].

Les techniques diagnostiques utilisées couramment dans les laboratoires de biologie médicale ne permettent pas l'identification de l'espèce *P. knowlesi*. En effet, ses caractères morphologiques se confondant avec ceux de *P. falciparum* et *P. malariae*, rendent inadéquates les techniques de frottis mince et de goutte épaisse rapide [4, 25]. Les tests rapides, peu évalués à l'heure actuelle, sont peu sensibles et leur efficacité à révéler *P. knowlesi* n'est pas prouvée [42, 54].

La réglementation actuelle impose aux laboratoires de biologie médicale d'évoluer selon la norme ISO 15189 en vue de l'accréditation COFRAC®. Pourtant, à ce jour, aucun kit commercialisé et certifié CE n'existe pour le diagnostic d'espèce de *P. knowlesi*, que ce soit par tests rapides antigéniques ou par biologie moléculaire.

Les publications actuelles décrivant des outils de biologie moléculaire pour le diagnostic d'espèce de *P. knowlesi* se contredisent : en 2010, Imwong et coll. [64] montrent que les amorces utilisées par Singh et coll. [6] manquent de spécificité et amplifient *P. vivax*. Babady et coll. [63] proposent une technique de PCR en temps réel de technologie FRET, coûteuse et inadaptable dans nos laboratoires car ne s'intégrant pas aux techniques utilisant le SYBR Green actuellement en place pour le diagnostic moléculaire des autres espèces.

Devant le besoin de cet outil diagnostique, l'absence de kit standardisé, et le coût des sondes FRET, nous nous sommes orientés vers la PCR en temps réel avec une détection SYBR Green. D'autre part la PCR en temps réel est un outil sensible, spécifique et susceptible de

répondre plus aisément aux normes demandées par l'accréditation (par opposition à la PCR nichée) [44, 60, 63].

Indispensable pour le diagnostic de *P. knowlesi*, la PCR n'est pourtant pas utilisée en première intention et ne remplace en aucun cas ni la microscopie optique, ni les tests antigéniques dans la stratégie diagnostique du paludisme. Elle est donc réservée aux cas pour lesquels le diagnostic est rendu difficile, par exemple par l'impossibilité de différentier morphologiquement deux espèces (*P. vivax* et *P. ovale*, *P. malariae* ou *P. falciparum* et *P. knowlesi*), par la suspicion d'une infection mixte, ou par une incohérence entre la clinique et le résultat des techniques classiques (clinique très évocatrice d'un patient en retour de pays d'endémie et tests conventionnels négatifs) [60].

L'étude bioinformatique, sur laquelle repose la mise au point de la méthode diagnostique, intègre la somme des séquences publiées à ce jour dans les bases de données nucléotidiques. Il est donc capital d'être conscient qu'une telle technique doit être réévaluée régulièrement, puisque le contenu des bases de données de séquences augmente quotidiennement. L'exemple de Win et coll. (2004) [58] décrit l'existence d'une forme variante de *P. ovale* : un polymorphisme dans le gène 18S ADNr de type A est découvert pour certaines souches de *P. ovale* dans les zones de fixation des amorces décrites dans les publications antérieures [60]. De ce fait la spécificité des amorces vis-à-vis de *P. ovale* est remise en question. Cet exemple prouve que l'utilisation d'une technique moléculaire en diagnostic médical doit tenir compte de l'enrichissement permanent des banques nucléotidiques.

La détection SYBR Green, peu coûteuse, possède toutefois des limites : le SYBR Green s'intercale dans l'ADN double brin quelque soit sa nature c'est-à-dire non spécifiquement. Toute amplification aspécifique va donc créer une intensité de fluorescence qu'il faut savoir analyser. L'interprétation finale doit donc être réalisée par un spécialiste, capable non seulement d'interpréter les profils de courbes obtenues en biologie moléculaire, mais aussi de vérifier l'adéquation entre le résultat obtenu et les autres techniques employées, le tableau clinico-biologique du patient, et son anamnèse épidémiologique (voyage en Asie du Sud-Est ou non).

La méthode décrite dans cette étude est actuellement en place au CHU de Nancy et à l’HIA Legouest de Metz, et est dès lors déjà exploitable. Il serait néanmoins intéressant de faire des tests complémentaires de spécificité / sensibilité avec un plus grand nombre de souches de ces cinq *Plasmodium* humains, et de mettre en place un contrôle interne, dont l’intérêt est de repérer les inhibitions d’amplification.

CONCLUSION

En l'absence de tests commercialisés pour le diagnostic de *P. knowlesi*, les laboratoires de ville ou les hôpitaux périphériques doivent pouvoir s'adresser vers les centres spécialisés les plus proches pour tout diagnostic vital posant un problème. Les laboratoires de Parasitologie des CHU ou d'unités militaires doivent donc posséder les outils les plus à même de répondre à une activité spécialisée en tant que référents locaux.

En l'état actuel des connaissances et des moyens disponibles dans les centres hospitaliers du CHU de Nancy et de l'HIA Legouest de Metz, la technique la plus adaptée au diagnostic de *P. knowlesi* est la PCR en temps réel SYBR Green. Cependant, dans la littérature, d'autres méthodes diagnostiques émergent telle que la loop-PCR ou la spectrométrie de masse qui viendront certainement à terme enrichir et/ou remplacer le panel d'outils pour la détection des microorganismes et donc des *Plasmodium* sp. [56, 92-93].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M.C. Leclerc, J.P. Hugot, P. Durand, F. Renaud,
Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from new and old world primates
(including humans): an 18S rDNA cladistic analysis.
Parasitology (2004); **129**:677-684.
- [2] R.M. Knowles, B. Das Gupta,
A study of monkey-malaria and its experimental transmission to man.
Indian Medical Gazette (1932); **67**:301-320.
- [3] N.J. White,
Plasmodium knowlesi: the fifth human malaria parasite.
Clin Infect Dis (2008); **46**:172-173.
- [4] K.S. Lee, J. Cox-Singh, G. Brooke, A. Matusop, B. Singh,
Plasmodium knowlesi from archival blood films: further evidence that human infections are widely distributed and not newly emergent in Malaysian Borneo.
Int J Parasitol (2009); **39**:1125-1128.
- [5] J. Cox-Singh, B. Singh,
knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance?
Trends Parasitol (2008); **24**:406-410.
- [6] B. Singh, L. Kim Sung, A. Matusop, A. Radhakrishnan, S.S. Shamsul, J. Cox-Singh, A. Thomas, D.J. Conway,
A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings.
Lancet (2004); **363**:1017-1024.
- [7] ANN O'FEL – Parasitologie et Mycologie
Association Française des Professeurs de Parasitologie.
5^e édition ed.: Editions C. et R; (1992).
- [8] D. Malvy, F. Djossou, R. Thiebaut, M. Le Bras,
Plasmodes – Malaria : Formes cliniques, diagnostic.
Encyclopédie Médico-chirurgicale (2000); **8**:507-520.
- [9] P. Ambroise-Thomas, P. Carneval, H. Felix, J. Mouchet,
Le paludisme.
Elsevier Masson Consulte - Pédiatrie - Maladies infectieuses (1984); **4**:320-420.
- [10] R.H. Wharton, D.E. Eyles,
Anopheles hackeri, a vector of *Plasmodium knowlesi* in Malaya.
Science (1961); **134**:279-280.
- [11] W. Chin, P.G. Contacos, G.R. Coatney, H.R. Kimball,
A Naturally Acquired Quotidian-Type Malaria in Man Transferable to Monkeys.
Science (1965); **149**:865.

- [12] W. Chin, P.G. Contacos, W.E. Collins, M.H. Jeter, E. Alpert, Experimental mosquito-transmission of *Plasmodium knowlesi* to man and monkey. *Am J Trop Med Hyg* (1968); **17**:355-358.
- [13] M. Warren, W.H. Cheong, H.K. Fredericks, G.R. Coatney, Cycles of jungle malaria in West Malaysia. *Am J Trop Med Hyg* (1970); **19**:383-393.
- [14] F. Gambier, Mise au point et évaluation de techniques de Biologie Moléculaire dans le diagnostic des *Plasmodium* humains. Henri Poincaré - Nancy I (2003).
- [15] J.M. Molina, Protection contre le Paludisme. <http://www.chu-stlouis.fr/voyage/palu.htm>
- [16] F. Anderios, A. Noorain, I. Vythilingam, In vivo study of human *Plasmodium knowlesi* in *Macaca fascicularis*. *Exp Parasitol* (2010); **124**:181-189.
- [17] P.C. Garnham, R. Lainson, W. Cooper, The tissue stages and sporogony of *Plasmodium knowlesi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1957); **51**:384-396.
- [18] E. Bischoff, Qu'est ce que le paludisme? (2001) <http://ebischoff.free.fr/Palu/palu2.html>
- [19] W.A. Krotoski, W.E. Collins, R.S. Bray, P.C. Garnham, F.B. Cogswell, R.W. Gwadz, R. Killick-Kendrick, R. Wolf, R. Sinden, L.C. Koontz, P.S. Stanfill, Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg* (1982); **31**:1291-1293.
- [20] W.A. Krotoski, W.E. Collins, Failure to detect hypnozoites in hepatic tissue containing exoerythrocytic schizonts of *Plasmodium knowlesi*. *Am J Trop Med Hyg* (1982); **31**:854-856.
- [21] F.B. Cogswell, The hypnozoite and relapse in primate malaria. *Clin Microbiol Rev* (1992); **5**:26-35.
- [22] L.H. Miller, S.J. Mason, J.A. Dvorak, M.H. McGinniss, I.K. Rothman, Erythrocyte receptors for (*Plasmodium knowlesi*) malaria: Duffy blood group determinants. *Science* (1975); **189**:561-563.
- [23] S.J. Mason, L.H. Miller, T. Shiroishi, J.A. Dvorak, M.H. McGinniss, The Duffy blood group determinants: their role in the susceptibility of human and animal erythrocytes to *Plasmodium knowlesi* malaria. *Br J Haematol* (1977); **36**:327-335.

[24] C.E. Chitnis, A. Chaudhuri, R. Horuk, A.O. Pogo, L.H. Miller,
The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial
parasites to erythrocytes.
J Exp Med (1996); **184**:1531-1536.

[25] K.S. Lee, J. Cox-Singh, B. Singh,
Morphological features and differential counts of *Plasmodium knowlesi* parasites in naturally
acquired human infections.
Malar J (2009); **8**:73.

[26] Formation continue : *Plasmodium* sp. Frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa,
grossissement x 1.000.

<http://en.impact-malaria.com/iml/cx/en/index.jsp>

[27] L. De Gentile,
Présentation d'un cas clinique d'une infection à *P. malariae*. (2009)
http://www.med.univ-angers.fr/discipline/lab_hema/Archives_ABP/html/2009%2023.htm

[28] J. Cox-Singh, J. Hiu, S.B. Lucas, P.C. Divis, M. Zulkarnaen, P. Chandran, K.T. Wong, P. Adem, S.R. Zaki, B. Singh, S. Krishna,
Severe malaria - a case of fatal *Plasmodium knowlesi* infection with post-mortem findings: a case report.
Malar J (2010); **9**:10.

[29] Malaria LifeCycle. (2010) February 8, 2010.
<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>

[30] S. Manguin, C. Garros, I. Dusfour, R.E. Harbach, M. Coosemans,
Bionomics, taxonomy, and distribution of the major malaria vector taxa of *Anopheles* subgenus *Cellia*
in Southeast Asia: an updated review.
Infect Genet Evol (2008); **8**:489-503.

[31] M.A. Sallum, E.L. Peyton, R.C. Wilkerson,
Six new species of the *Anopheles leucosphyrus* group, reinterpretation of *An. elegans* and vector
implications.
Med Vet Entomol (2005); **19**:158-199.

[32] I. Vythilingam, C.H. Tan, M. Asmad, S.T. Chan, K.S. Lee, B. Singh,
Natural transmission of *Plasmodium knowlesi* to humans by *Anopheles latens* in Sarawak, Malaysia.
Trans R Soc Trop Med Hyg (2006); **100**:1087-1088.

[33] C.H. Tan, I. Vythilingam, A. Matusop, S.T. Chan, B. Singh,
Bionomics of *Anopheles latens* in Kapit, Sarawak, Malaysian Borneo in relation to the transmission of
zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi*.
Malar J (2008); **7**:52.

[34] WHO - Malaria. (2010)
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>

- [35] I. Vythilingam, Y.M. Noorazian, T.C. Huat, A.I. Jiram, Y.M. Yusri, A.H. Azahari, I. Norparina, A. Noorrain, S. Lokmanhakim,
Plasmodium knowlesi in humans, macaques and mosquitoes in peninsular Malaysia.
Parasit Vectors (2008); **1**:26.
- [36] J. Cox-Singh, T.M. Davis, K.S. Lee, S.S. Shamsul, A. Matusop, S. Ratnam, H.A. Rahman, D.J. Conway, B. Singh,
Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening.
Clin Infect Dis (2008); **46**:165-171.
- [37] C. Putaporntip, T. Hongsrimuang, S. Seethamchai, T. Kobasa, K. Limkittikul, L. Cui, S. Jongwutiwes,
Differential prevalence of *Plasmodium* infections and cryptic *Plasmodium knowlesi* malaria in humans in Thailand.
J Infect Dis (2009); **199**:1143-1150.
- [38] J. Luchavez, F. Espino, P. Curameng, R. Espina, D. Bell, P. Chiodini, D. Nolder, C. Sutherland, K.S. Lee, B. Singh,
Human Infections with *Plasmodium knowlesi*, the Philippines.
Emerg Infect Dis (2008); **14**:811-813.
- [39] M.R. Galinski, J.W. Barnwell,
Monkey malaria kills four humans.
Trends Parasitol (2009); **25**:200-204.
- [40] M. Danis, E. Kendjo, M. Thellier, I. Vaugier, F. Legros,
Données épidémiologiques du Paludisme en France (2008)
- [41] A. Kantele, H. Marti, I. Felger, D. Muller, T.S. Jokiranta,
Monkey malaria in a European traveler returning from Malaysia.
Emerg Infect Dis (2008); **14**:1434-1436.
- [42] U. Bronner, P.C. Divis, A. Farnert, B. Singh,
Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo.
Malar J (2009); **8**:15.
- [43] Simian malaria in a U.S. traveler--New York, 2008.
MMWR Morb Mortal Wkly Rep (2009); **58**:229-232.
- [44] T.T. Ta, A. Salas, M. Ali-Tammam, C. Martinez Mdel, M. Lanza, E. Arroyo, J.M. Rubio,
First case of detection of *Plasmodium knowlesi* in Spain by Real Time PCR in a traveller from Southeast Asia.
Malar J (2010); **9**:219.
- [45] C. Daneshvar, T.M. Davis, J. Cox-Singh, M.Z. Rafa'ee, S.K. Zakaria, P.C. Divis, B. Singh,
Clinical and laboratory features of human *Plasmodium knowlesi* infection.
Clin Infect Dis (2009); **49**:852-860.
- [46] Directives pour le traitement du paludisme. Organisation Mondiale de la Santé (OMS); (2006).

[47] O.T. Ng, E.E. Ooi, C.C. Lee, P.J. Lee, L.C. Ng, S.W. Pei, T.M. Tu, J.P. Loh, Y.S. Leo, Naturally acquired human *Plasmodium knowlesi* infection, Singapore.
Emerg Infect Dis (2008); **14**:814-816.

[48] M. Danis,
Prise en charge et prévention du paludisme d'importation : recommandations pour la pratique clinique.
Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) (2008).

[49] A. Pain, U. Bohme, A.E. Berry, K. Mungall, R.D. Finn, A.P. Jackson, T. Mourier, J. Mistry, E.M. Pasini, M.A. Aslett, S. Balasubramanian, K. Borgwardt, K. Brooks, C. Carret, T.J. Carver, I. Cherevach, T. Chillingworth, T.G. Clark, M.R. Galinski, N. Hall, D. Harper, D. Harris, H. Hauser, A. Ivens, C.S. Janssen, T. Keane, N. Larke, S. Lapp, M. Marti, S. Moule, I.M. Meyer, D. Ormond, N. Peters, M. Sanders, S. Sanders, T.J. Sargeant, M. Simmonds, F. Smith, R. Squares, S. Thurston, A.R. Tivey, D. Walker, B. White, E. Zuiderwijk, C. Churcher, M.A. Quail, A.F. Cowman, C.M. Turner, M.A. Rajandream, C.H. Kocken, A.W. Thomas, C.I. Newbold, B.G. Barrell, M. Berriman,
The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*.
Nature (2008); **455**:799-803.

[50] D. Chabasse, L. de Gentile,
[Individual prevention of malaria caused by *Plasmodium falciparum*].
Allerg Immunol (Paris) (1999); **31**:320-325.

[51] M. Thellier, A. Datry, O. Alfa Cisse, C. San, S. Biligui, O. Silvie, M. Danis,
Diagnosis of malaria using thick bloodsmears: definition and evaluation of a faster protocol with improved readability.
Ann Trop Med Parasitol (2002); **96**:115-124.

[52] QBC Malaria Test: Features and Benefits (2010)
<http://www.qbcdiagnostics.com/products/fm/malaria/fab.asp>

[53] R. Piper, J. Lebras, L. Wentworth, A. Hunt-Cooke, S. Houze, P. Chiodini, M. Makler,
Immunocapture diagnostic assays for malaria using *Plasmodium* lactate dehydrogenase (pLDH).
Am J Trop Med Hyg (1999); **60**:109-118.

[54] T.F. McCutchan, R.C. Piper, M.T. Makler,
Use of malaria rapid diagnostic test to identify *Plasmodium knowlesi* infection.
Emerg Infect Dis (2008); **14**:1750-1752.

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

[56] E.T. Han, R. Watanabe, J. Sattabongkot, B. Khuntirat, J. Sirichaisinthop, H. Iriko, L. Jin, S. Takeo, T. Tsuboi,
Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis.
J Clin Microbiol (2007); **45**:2521-2528.

- [57] H. Swan, L. Sloan, A. Muyombwe, P. Chavalitshevinkoon-Petmitr, S. Krudsood, W. Leowattana, P. Wilairatana, S. Looareesuwan, J. Rosenblatt, Evaluation of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of malaria in patients from Thailand. *Am J Trop Med Hyg* (2005); **73**:850-854.
- [58] T.T. Win, A. Jalloh, I.S. Tantular, T. Tsuboi, M.U. Ferreira, M. Kimura, F. Kawamoto, Molecular analysis of *Plasmodium ovale* variants. *Emerg Infect Dis* (2004); **10**:1235-1240.
- [59] F. Perandin, N. Manca, A. Calderaro, G. Piccolo, L. Galati, L. Ricci, M.C. Medici, M.C. Arcangeletti, G. Snounou, G. Dettori, C. Chezzi, Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* (2004); **42**:1214-1219.
- [60] F. de Monbrison, C. Angei, A. Staal, K. Kaiser, S. Picot, Simultaneous identification of the four human *Plasmodium* species and quantification of *Plasmodium* DNA load in human blood by real-time polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2003); **97**:387-390.
- [61] C. Roper, I.M. Elhassan, L. Hviid, H. Giha, W. Richardson, H. Babiker, G.M. Satti, T.G. Theander, D.E. Arnot, Detection of very low level *Plasmodium falciparum* infections using the nested polymerase chain reaction and a reassessment of the epidemiology of unstable malaria in Sudan. *Am J Trop Med Hyg* (1996); **54**:325-331.
- [62] G. Snounou, S. Viriyakosol, X.P. Zhu, W. Jarra, L. Pinheiro, V.E. do Rosario, S. Thaithong, K.N. Brown, High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* (1993); **61**:315-320.
- [63] N.E. Babady, L.M. Sloan, J.E. Rosenblatt, B.S. Pritt, Detection of *Plasmodium knowlesi* by real-time polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* (2009); **81**:516-518.
- [64] M. Imwong, N. Tanomsing, S. Pukrittayakamee, N.P. Day, N.J. White, G. Snounou, Spurious amplification of a *Plasmodium vivax* small-subunit RNA gene by use of primers currently used to detect *P. knowlesi*. *J Clin Microbiol* (2009); **47**:4173-4175.
- [65] A. Assal, C. Kauffmann-Lacroix, M.H. Rodier, M.L. Darde, D. Houssay, J.L. Jacquemin, [Comparison of two techniques for detection of anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: *falciparum*-spot IF (Biomerieux) and Malaria IgG Celisa (BMD). Preliminary results]. *Transfus Clin Biol* (1999); **6**:119-123.
- [66] Directives pour le traitement du paludisme. 2e Edition ed.: Organisation Mondiale de la Santé (OMS); (2010).

- [67] D. Malvy, F. Djossou,
Plasmodes : traitement, prévention.
Encyclopédie Médico-chirurgicale (2000); **8**:507-520.
- [68] C. Daneshvar, T.M. Davis, J. Cox-Singh, M.Z. Rafa'ee, S.K. Zakaria, P.C. Divis, B. Singh,
Clinical and parasitological response to oral chloroquine and primaquine in uncomplicated human
Plasmodium knowlesi infections.
Malar J (2010); **9**:238.
- [69] M. Figtree, R. Lee, L. Bain, T. Kennedy, S. Mackertich, M. Urban, Q. Cheng, B.J. Hudson,
Plasmodium knowlesi in human, Indonesian Borneo.
Emerg Infect Dis (2010); **16**:672-674.
- [70] G.P. Dutta, P.P. Singh,
Blood schizontocidal activity of some antibiotics against *Plasmodium knowlesi* infection in Assamese
monkey.
Indian J Med Res (1979); **70 Suppl**:91-94.
- [71] K.G. Powers, M. Aikawa, K.M. Nugent,
Plasmodium knowlesi: morphology and course of infection in rhesus monkeys treated with
clindamycin and its N-demethyl-4'-pentyl analog.
Exp Parasitol (1976); **40**:13-24.
- [72] W.E. Rothe, D.P. Jacobus, W.G. Walter,
Treatment of trophozoite-induced *Plasmodium knowlesi* infection in the rhesus monkey with
Trimethoprim and sulfalene.
Am J Trop Med Hyg (1969); **18**:491-494.
- [73] R. Bajpai, G.P. Dutta, R.A. Vishwakarma,
Blood schizontocidal activity of a new antimalarial drug, arteether (alpha/beta), against *Plasmodium
knowlesi* in rhesus monkeys.
Trans R Soc Trop Med Hyg (1989); **83**:484.
- [74] J. Singh, A.P. Ray, P.C. Basu, C.P. Nair,
Acquired resistance to proguanil in *Plasmodium knowlesi*.
Trans R Soc Trop Med Hyg (1952); **46**:639-649.
- [75] I.n.d.v.s. (InVS),
Recommandations sanitaires pour les voyageurs 2009.
Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire (BEH) (2009).
- [76] J. Cox-Singh,
knowlesi malaria in Vietnam.
Malar J (2009); **8**:269.

[77] N. Hall, A. Pain, M. Berriman, C. Churcher, B. Harris, D. Harris, K. Mungall, S. Bowman, R. Atkin, S. Baker, A. Barron, K. Brooks, C.O. Buckee, C. Burrows, I. Cherevach, C. Chillingworth, T. Chillingworth, Z. Christodoulou, L. Clark, R. Clark, C. Corton, A. Cronin, R. Davies, P. Davis, P. Dear, F. Dearden, J. Doggett, T. Feltwell, A. Goble, I. Goodhead, R. Gwilliam, N. Hamlin, Z. Hance, D. Harper, H. Hauser, T. Hornsby, S. Holroyd, P. Horrocks, S. Humphray, K. Jagels, K.D. James, D. Johnson, A. Kerhornou, A. Knights, B. Konfortov, S. Kyes, N. Larke, D. Lawson, N. Lennard, A. Line, M. Maddison, J. McLean, P. Mooney, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, D. Ormond, C. Price, M.A. Quail, E. Rabinowitsch, M.A. Rajandream, S. Rutter, K.M. Rutherford, M. Sanders, M. Simmonds, K. Seeger, S. Sharp, R. Smith, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, K. Taylor, A. Tivey, L. Unwin, S. Whitehead, J. Woodward, J.E. Sulston, A. Craig, C. Newbold, B.G. Barrell,
Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 1, 3-9 and 13.
Nature (2002); **419**:527-531.

[78] M.J. Gardner, S.J. Shallom, J.M. Carlton, S.L. Salzberg, V. Nene, A. Shoaibi, A. Ciecko, J. Lynn, M. Rizzo, B. Weaver, B. Jarrahi, M. Brenner, B. Parvizi, L. Tallon, A. Moazzez, D. Granger, C. Fujii, C. Hansen, J. Pederson, T. Feldblyum, J. Peterson, B. Suh, S. Angiuoli, M. Pertea, J. Allen, J. Selengut, O. White, L.M. Cummings, H.O. Smith, M.D. Adams, J.C. Venter, D.J. Carucci, S.L. Hoffman, C.M. Fraser,
Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 2, 10, 11 and 14.
Nature (2002); **419**:531-534.

[79] M.J. Gardner, N. Hall, E. Fung, O. White, M. Berriman, R.W. Hyman, J.M. Carlton, A. Pain, K.E. Nelson, S. Bowman, I.T. Paulsen, K. James, J.A. Eisen, K. Rutherford, S.L. Salzberg, A. Craig, S. Kyes, M.S. Chan, V. Nene, S.J. Shallom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Pertea, J. Allen, J. Selengut, D. Haft, M.W. Mather, A.B. Vaidya, D.M. Martin, A.H. Fairlamb, M.J. Fraunholz, D.S. Roos, S.A. Ralph, G.I. McFadden, L.M. Cummings, G.M. Subramanian, C. Mungall, J.C. Venter, D.J. Carucci, S.L. Hoffman, C. Newbold, R.W. Davis, C.M. Fraser, B. Barrell,
Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.
Nature (2002); **419**:498-511.

[80] A. Pain, C. Hertz-Fowler,
Plasmodium genomics: latest milestone.
Nat Rev Microbiol (2009); **7**:180-181.

[81] G. Snounou,
Detection and identification of the four malaria parasite species infecting humans by PCR amplification.
Methods Mol Biol (1996); **50**:263-291.

[82] J. Li, R.R. Gutell, S.H. Damberger, R.A. Wirtz, J.C. Kissinger, M.J. Rogers, J. Sattabongkot, T.F. McCutchan,
Regulation and trafficking of three distinct 18 S ribosomal RNAs during development of the malaria parasite.
J Mol Biol (1997); **269**:203-213.

[83] J. Thompson, R.M. van Spaendonk, R. Choudhuri, R.E. Sinden, C.J. Janse, A.P. Waters,
Heterogeneous ribosome populations are present in *Plasmodium berghei* during development in its vector.
Mol Microbiol (1999); **31**:253-260.

[84] L.Bigois,
Identification simultanée des quatre espèces de *Plasmodium* humains sur microplaques par hybridation de produits PCR avec des sondes spécifiques.
Université Henri Poincaré - Faculté de Pharmacie de Nancy (2003).

[85] K. Knox, D. Carrigan,
Detection of HHV-6, EBV and HTLV-2 Genomic DNAs by Nested PCR. (2005)
http://www.ivpresearch.org/nested_pcr.htm

[86] B. Singh, A. Bobogare, J. Cox-Singh, G. Snounou, M.S. Abdullah, H.A. Rahman,
A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies.
Am J Trop Med Hyg (1999); **60**:687-692.

[87] O. Landt,
Selection of Hybridization Probe Sequences for Use with the LightCycler®
LightCycler® Technical Notes - Roche Molecular Biochemicals.
Berlin: TIB MOLBIOL.

[88] Y. Nishimoto, N. Arisue, S. Kawai, A.A. Escalante, T. Horii, K. Tanabe, T. Hashimoto,
Evolution and phylogeny of the heterogeneous cytosolic SSU rRNA genes in the genus *Plasmodium*.
Mol Phylogenet Evol (2008); **47**:45-53.

[89] S.H. Qari, Y.P. Shi, N.J. Pieniazek, W.E. Collins, A.A. Lal,
Phylogenetic relationship among the malaria parasites based on small subunit rRNA gene sequences:
monophyletic nature of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*.
Mol Phylogenet Evol (1996); **6**:157-165.

[90] A.A. Escalante, F.J. Ayala,
Phylogeny of the malarial genus *Plasmodium*, derived from rRNA gene sequences.
Proc Natl Acad Sci U S A (1994); **91**:11373-11377.

[91] A. Kantele, S. Jokiranta,
[*Plasmodium knowlesi*--the fifth species causing human malaria].
Duodecim (2010); **126**:427-434.

[92] W. Moussaoui, B. Jaulhac, A.M. Hoffmann, M. Kostrzewa, P. Riegel, G. Prevost,
MALDI-TOF Mass Spectrometry identifies 90 % of bacteria directly from Blood Culture vials.
Clin Microbiol Infect (2010).

[93] H. Iseki, S. Kawai, N. Takahashi, M. Hirai, K. Tanabe, N. Yokoyama, I. Igarashi,
Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method as a tool for diagnosis of infection by the zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi*.
J Clin Microbiol (2010); **48**:2509-2514.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Arbre phylogénique de 19 espèces de <i>Plasmodium</i> [1].....	9
Figure 2 : Photo d'anophèle femelle [15].	12
Figure 3 : Macaque à longue queue (<i>Macaca fascicularis</i>) [6].	13
Figure 4 : Schizonte hépatique de <i>Plasmodium knowlesi</i> [17]	14
Figure 5 : Schéma d'un merozoïte de <i>Plasmodium</i> [18]	15
Figure 6 : Schéma des différentes étapes de l'invasion érythrocytaire [18]	16
Figure 7 : Trophozoïtes jeunes de <i>P. knowlesi</i> [25].....	18
Figure 8 : Trophozoïtes jeunes de <i>P. falciparum</i> [26]	18
Figure 9 : Trophozoïtes matures de <i>P. knowlesi</i> [25].....	19
Figure 10 : Trophozoïte matures de <i>P. malariae</i> [27].....	19
Figure 11 : Schizontes érythrocytaires de <i>P. knowlesi</i> [25].....	20
Figure 12 : Schizontes érythrocytaires de <i>P. malariae</i> (a), <i>P. vivax</i> (b) et <i>P. ovale</i> (c) [26].....	20
Figure 13 : Gamétocytes de <i>P. knowlesi</i> [25].....	21
Figure 14 : Gamétocytes de <i>P. falciparum</i> (a), <i>P. vivax</i> (b) et <i>P. malariae</i> (3) [26].....	21
Figure 15 : Schéma représentant le cycle évolutif des <i>Plasmodium</i> [29].	23
Figure 16 : Périodicité du cycle schizogonique érythrocytaire de <i>P. knowlesi</i> [16]	25
Figure 17 : Périodicité du cycle gamétoctaire de <i>P. knowlesi</i> [16].....	26
Figure 18 : Planisphère illustrant les zones impaludées en 2008 [34].....	28
Figure 19 : Présentation des résultats obtenus dans l'étude prospective de Cox-Singh et coll. [36]	30
Figure 20 : Répartition des différents acteurs de l'infection à <i>P. knowlesi</i> dans le Sud-Est asiatique, 2008 [5].....	32
Figure 21 : Mise à jour de 2010 de la carte de la figure 20 [39].	32
Figure 22 : Evolution au cours du temps des destinations des voyageurs français en pays impaludés [40].....	33
Figure 23 : Courbe de température d'un patient infecté, Singapour [47].....	35
Figure 24 : Synthèse des résultats obtenus lors d'immunocaptures réalisées entre les Ac monoclonaux anti-LDHp et les LDHp de 7 espèces différentes de <i>Plasmodium</i> [54].....	40
Figure 25 : Schéma des 14 chromosomes constituant le génome de <i>P. knowlesi</i> [49]	53

Figure 26 : Représentation schématique du cycle de développement de <i>Plasmodium</i> sp. et du type d'ARNr exprimé en fonction des différentes étapes parasitaires [82].....	55
Figure 27 : Représentation schématique d'une amplification d'ADN par PCR nichée [85].....	56
Figure 28 : Représentation schématique des localisations des amores utilisées pour l'amplification spécifique de <i>P. knowlesi</i> dans les études de Singh et coll. [6] (A) et Imwong et coll. [64] (B).....	58
Figure 29 : Photographie du LightCycler® v1.2 et sa représentation schématique	59
Figure 30 : Gel d'agarose additionné de BET après migration électrophorétique de deux produits d'amplification et d'une solution de marqueurs de taille.....	65
Figure 31 : Exemple de zones polymorphes (A) ou non (B) au sein du gène 18S ADNr de type S de <i>P. knowlesi</i>	71
Figure 32 : Localisation schématique des amores choisies dans le gène 18S ADNr de type A de <i>P. knowlesi</i>	73
Figure 33 : Localisation schématique des amores choisies dans le gène 18S ADNr de type S de <i>P. knowlesi</i>	74
Figure 34 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenues en utilisant les amores PKfF / PKhR (réaction 4) en PCR en temps réel SYBR Green.....	77
Figure 35 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenues en utilisant les amores Pmk8mF / PKfR (réaction 3) en PCR en temps réel SYBR Green avant optimisation des conditions.....	78
Figure 36 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenues en utilisant les amores PKe'F / PKg'R (réaction 8) en PCR en temps réel SYBR Green avant optimisation des conditions.....	79
Figure 37 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenues en utilisant les amores Pmk8mF / PKfR (réaction 3) en PCR en temps réel SYBR Green après optimisation des conditions.....	81
Figure 38 : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenues en utilisant les amores PKe'F / PKg'R (réaction 8) en PCR en temps réel SYBR Green après optimisation des conditions.....	83
Figure 39 : Courbes d'amplification (A), de fusion (C) et droite de régression (B) obtenues lors des tests de sensibilité utilisant les amores PKe'F / PKg'R (réaction 8) en PCR en temps réel SYBR Green.....	86

<i>Figure 40</i> : Courbes d'amplification (A, C, E, G, I) et de fusion (B, D, F, H, J) obtenues lors des tests de spécificité effectués avec le couple d'amorces PKe'F / PKg'R (réaction 8) en PCR en temps réel SYBR Green.....	89
<i>Figure 41</i> : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenues lors des tests de spécificité envers <i>P. knowlesi</i> pour les amorces spécifiques de <i>P. falciparum</i> (PFS1 / PSP1AS) utilisées en PCR temps réel SYBR Green au CHU de Nancy.....	95
<i>Figure 42</i> : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenus lors des tests de spécificité envers <i>P. knowlesi</i> pour les amorces spécifiques de <i>P. malariae</i> (PM1 / PM2) utilisées en PCR temps réel SYBR Green au CHU de Nancy.....	96
<i>Figure 43</i> : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenus lors des tests de spécificité envers <i>P. knowlesi</i> pour les amorces spécifiques de <i>P. ovale</i> (POS1 / PSP1AS) utilisées en PCR temps réel SYBR Green au CHU de Nancy.....	97
<i>Figure 44</i> : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenus lors des tests de spécificité envers <i>P. knowlesi</i> pour les amorces spécifiques de <i>P. vivax</i> (PVS1/PSP1AS) utilisées en PCR temps réel SYBR Green au CHU de Nancy.....	98
<i>Figure 45</i> : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenus lors des tests de spécificité envers <i>P. knowlesi</i> pour les amorces spécifiques de <i>P. vivax</i> (PV1 / PV2) utilisées en PCR temps réel SYBR Green au CHU de Nancy.....	99
<i>Figure 46</i> : Courbes d'amplification (A) et de fusion (B) obtenues en utilisant les amorces génospécifique PSP1 / PSP2 à l' HIA Legouest.....	101
<i>Figure 47</i> : Courbes de fusion obtenues lors des amplifications de <i>P. knowlesi</i> avec les 4 couples d'amorces spécifiques de <i>P. falciparum</i> (A), <i>P. vivax</i> (B), <i>P. ovale</i> (C) et <i>P. malariae</i> (D).	102

Tableau 1 : Tableau présentant les espèces d'anophèles vectrices de paludismes humains et simiens les plus fréquentes en Asie du Sud-Est [30].....	27
Tableau 2 : Critères de définition du paludisme grave d'importation chez l'adulte [48].	35
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des seuils de sensibilité des techniques utilisées pour le diagnostic du paludisme [48].	42
Tableau 4 : Schémas prophylactiques recommandés par la SPILF en fonction du pays de destination (hors femme enceinte) [48].	49
Tableau 5 : Volume des réactifs utilisés pour la PCR classique	64

Tableau 6 : Programmation du thermocycleur en PCR classique.....	65
Tableau 7 : Volume des réactifs utilisés pour la PCR en temps réel.....	67
Tableau 8 : Programmation du LightCycler en PCR en temps réel.....	67
Tableau 9 : Amorces utilisées pour l'identification spécifique des quatre <i>Plasmodium</i> sp. au laboratoire de parasitologie du CHU de Nancy.....	69
Tableau 10 : Amorces utilisées pour l'identification spécifique des quatre <i>Plasmodium</i> sp. au laboratoire de l'HIA Legouest de Metz.	70
Tableau 11 : Descriptif des amorces choisies pour l'amplification de <i>P. knowlesi</i>	72
Tableau 12 : Synthèse des résultats obtenus avec les 8 couples d'amorces utilisés	76
Tableau 13 : Concentrations optimisées pour la préparation des Mix de la réaction 8 en PCR temps réel (pour 5 µL d'ADN à amplifier).	82

ANNEXE

Annexe 1 : Liste des séquences du gène 18S ADNr.

Séquence	Base nucléotidique	Organisme	Type de Gène 18S ADNr	Numéro d'accession
1	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	AY327549
2	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	AY327550
3	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	AY327551
4	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	AY327552
5	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	AY327553
6	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	AY327554
7	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	AY327555
8	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	AY327556
9	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	AY327557
10	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	AY580317
11	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	DQ350264
12	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	DQ350265
13	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	DQ350266
14	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	DQ350267
15	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	DQ350268
16	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	DQ350269
17	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	DQ641518
18	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	DQ641519
19	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	DQ641520
20	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	DQ641521
21	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	DQ641522
22	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	DQ641523
23	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	DQ641524
24	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	DQ641525
25	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	EU807923
26	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	FJ009010
27	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	FJ009011
28	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	FJ009012
29	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	FJ009013
30	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	FJ009014
31	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	FJ009015
32	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	FJ009016
33	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	FJ009017
34	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	FJ009018
35	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	FJ009019
36	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	FJ804768
37	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	A	U72542
38	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	S	FJ830935
39	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	S	DQ350255
40	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	S	DQ350256
41	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	S	DQ350257
42	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	S	DQ350258

Séquence	Base nucléotidique	Organisme	Type de Gène 18S ADNr	Numéro d'accession
43	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	S	DQ350259
44	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	S	DQ350260
45	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	S	DQ350261
46	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	S	DQ350262
47	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	S	DQ350263
48	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	S	DQ350270
49	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	S	DQ350271
50	NCBI	<i>P. knowlesi</i>	S	U83876
51	NCBI	<i>P. falciparum</i>	A	M19172
52	PlasmoDB	<i>P. falciparum</i>	A	PF_3D7
53	PlasmoDB	<i>P. falciparum</i>	A	PF_DD2
54	PlasmoDB	<i>P. falciparum</i>	A	PF_HB3
55	PlasmoDB	<i>P. falciparum</i>	A	PF_IT
56	NCBI	<i>P. falciparum</i>	S	AJ250700
57	NCBI	<i>P. falciparum</i>	S	S82955
58	NCBI	<i>P. falciparum</i>	S	U36465
59	NCBI	<i>P. falciparum</i>	S	U36466
60	NCBI	<i>P. falciparum</i>	S	U36467
61	NCBI	<i>P. vivax</i>	A	DQ978767
62	NCBI	<i>P. vivax</i>	A	DQ978768
63	NCBI	<i>P. vivax</i>	A	DQ978769
64	NCBI	<i>P. vivax</i>	A	DQ978770
65	NCBI	<i>P. vivax</i>	A	DQ978771
66	NCBI	<i>P. vivax</i>	A	DQ978772
67	NCBI	<i>P. vivax</i>	A	DQ978773
68	NCBI	<i>P. vivax</i>	A	DQ978774
69	NCBI	<i>P. vivax</i>	A	GQ477744
70	NCBI	<i>P. vivax</i>	A	U83877
71	NCBI	<i>P. vivax</i>	A	U93233
72	NCBI	<i>P. vivax</i>	S	U03080
73	NCBI	<i>P. vivax</i>	S	U07368
74	NCBI	<i>P. vivax</i>	S	U93234
75	NCBI	<i>P. ovale</i> (classique 1)	A	AB182489
76	NCBI	<i>P. ovale</i> (classique 2)	A	AB182490
77	NCBI	<i>P. ovale</i> (variant 1)	A	AB182491
78	NCBI	<i>P. ovale</i> (variant 2)	A	AB182492
79	NCBI	<i>P. ovale</i> (variant 3)	A	AB182493
80	NCBI	<i>P. ovale</i>	A	AJ001527
81	NCBI	<i>P. ovale</i>	A	L48987
82	NCBI	<i>P. ovale</i>	NP	X99790
83	NCBI	<i>P. malariae</i>	A	M54897
84	NCBI	<i>P. malariae</i>	NP	AB489195
85	NCBI	<i>P. malariae</i>	NP	AB489196
86	NCBI	<i>P. malariae</i>	NP	AF487999
87	NCBI	<i>P. malariae</i>	NP	AF488000

NP : Non précisé

DEMANDE D'IMPRIMATUR 13444

Date de soutenance : jeudi 21 octobre 2010, 16h30

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par Olivier ODDOUX

Sujet : Développement d'une technique de PCR en temps réel
pour le diagnostic d'espèce de *P. knowlesi*

Jury :

Président : M. le Pr. C. GANTZER
Directeur : Mme le Dr. M. MACHOUARTJuges : M. le Pr. A. LOZNIEWSKI
M. le Dr. J.M. PUYHARDY

Vu et approuvé,

Nancy, le 22 SEP. 2010

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1

Vu,

Nancy, le 16 septembre 2010,

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

M. le Pr C. GANTZER

Mme le Dr. M. MACHOUART

Vu,

Nancy, le 28.09.2010

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Pour le Président
et par Délegation,
La Vice-Présidente du Conseil
des Etudes et de la Vie Universitaire,

N° d'enregistrement :

N° d'identification :

TITRE

Développement d'une technique de PCR en temps réel pour le diagnostic d'espèce de *P. knowlesi*

Thèse soutenue le 21 octobre 2010 à 16h30

Par Olivier ODDOUX

RESUME :

Depuis 2008, une cinquième espèce de paludisme, *Plasmodium knowlesi*, est reconnue comme pathogène de l'Homme. Les études épidémiologiques ont montré que sa transmission naturelle est, à l'heure actuelle, géographiquement limitée au Sud-Est asiatique. Les cas d'importation, favorisés par l'expansion économique et touristique de ces pays, se multiplient peu à peu dans le monde entier.

Le diagnostic microscopique de *P. knowlesi* est rendu difficile par ses caractéristiques morphologiques proches des espèces *P. falciparum* et *P. malariae*. Dès lors, son implication réelle en pathologie humaine a été jusqu'à présent sous-évaluée par les méthodes conventionnelles d'identification. Potentiellement mortelle, la prise en charge de cette infection constitue pourtant, au même titre que *Plasmodium falciparum*, une urgence vitale. Dans cette étude, une technique de PCR en temps réel ciblant le gène de la petite sous-unité ribosomique a été développée. Cette technique s'insère aujourd'hui dans la prise en charge diagnostique du paludisme par biologie moléculaire dans les laboratoires du CHU de Nancy et de l'HIA de Legouest.

MOTS CLES : Paludisme, *Plasmodium knowlesi*, diagnostic, biologie moléculaire, PCR, Temps réel, SYBR Green.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
Docteur Marie Machouart	Laboratoire de parasitologie-mycoloie CHU de Nancy	Expérimentale	x

Thèmes	1 – Sciences fondamentales	2 – Hygiène/Environnement
	3 – Médicament	4 – Alimentation – Nutrition
	5 - Biologie	6 – Pratique professionnelle