



RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2023

Année d'exercice 2022

CNR Paludisme

	<u>Organisme / Structure d'hébergement</u>	<u>Responsable</u>
Laboratoire Coordonnateur	Hôpital Bichat APHP	Sandrine Houzé
Laboratoire Associé	Hôpital Pitié Salpêtrière APHP	Marc Thellier
Laboratoire Associé	IRBA Marseille	Bruno Pradines
Laboratoire Associé	Institut Pasteur de la Guyane	Lise Musset

TABLE DES MATIERES

Résumé analytique.....	4
1. Missions et organisation du CNR	5
1.1. Organigramme.....	5
1.2. Mission et organisation.....	5
1.3. Démarche qualité	5
2. Activités d'expertise.....	7
2.1. Evolution des techniques.....	9
2.2. Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousseaux	10
2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires.....	11
2.4. Collections de matériel biologique.....	11
2.5. Activités d'expertises	12
2.6. Activités de séquençage.....	14
3. Activités de surveillance.....	17
3.1. Description du réseau de partenaires.....	17
3.2. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	20
3.3. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	28
3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	35
3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	36
4. Alertes.....	37
Pole zones non endémiques	37
En Guyane.....	37
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil.....	38
5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé	38
5.2. Accueil stagiaire	39
5.3. Enseignement.....	40
5.4. Conseil et expertise aux autorités sanitaires	41
5.5. Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ..).....	41
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	42
6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	42
6.1.1 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.....	46
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	50
8. Programme d'activité pour les années suivantes	51

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Organigramme du CNR paludisme.	5
Figure 2. Recrutement et exhaustivité atteints entre 2010 et 2022 par le Pôle Zones endémiques.....	9
Figure 3. Nombre d'isolats reçus au Pôle Zones endémiques en provenance du plateau des Guyanes, entre 2012 et 2022.	14
Figure 4. Recrutement et exhaustivité atteints entre 2010 et 2022 par le Pôle Zones endémiques.....	17
Figure 5. Réseau de partenaires guyanais et carte du risque de paludisme en Guyane, février 2019.	18
Figure 6. Évolution du nombre de cas de paludisme en Guyane entre 2010 et 2022.	21
Figure 7. Distribution des cas de paludisme déclarés par les correspondants du réseau du CNR du Paludisme en France métropolitaine en fonction des trois grands profils épidémiologiques pour l'année 2022, N=2832.	22
Figure 8. Evolution du paludisme d'importation, cas déclarés, cas estimés, France métropolitaine 1986 à 2022.	23
Figure 9. Répartition des cas de paludisme importés par âge et par sexe en fonction de l'origine africaine ou caucasienne, CNR du paludisme, France métropolitaine, année 2022, n = 2811.....	24
Figure 10. Distribution mensuelle des cas de paludisme par espèce plasmodiale, France métropolitaine, 2022.	24
Figure 11. Proportion par espèce identifiée en 2022, n=2811, France métropolitaine.	25
Figure 12. Evolution annuelle des proportions de paludisme d'importation des sujets d'origine africaine (en rouge) et caucasienne (en bleu) entre 1996 et 2022.	26
Figure 13. Répartition par type d'accès en 2022, n=2692 France métropolitaine.	27
Figure 14. Évolution des cas graves de paludisme d'importation, cas barres bleues et proportion points rouges, France métropolitaine, 1996-2022.....	28
Figure 15. Répartition croisée des CI ₅₀ DHA/Pipéraquline et DHA/Amodiaquine.	29
Figure 16. Répartition croisée des CI ₅₀ Chloroquine/Amodiaquine et Chloroquine/Méfloquine en 2022.....	30
Figure 17. Répartition croisée des CI ₅₀ de la Chloroquine et de la Pipéraquline en 2022.....	30
Figure 18. Evolution des chimiosensibilités à la doxycycline en 2017 et 2022.....	31
Figure 19. Sensibilité de <i>P. falciparum</i> à la pipéraquline en Guyane. A) génotype associé et B) évolution observée dans le temps de la mutation pfcr C350R (mutants en rouge, sauvage en bleu).....	35
Figure 20. Frottis coloré intensité OT4D objectif 20X immersion.	45
Tableau 1. Activités d'expertise réalisées en 2022 en lien avec le nombre d'isolats reçus.....	13
Tableau 2. Partenaires du Pôle Zones endémiques en Guyane: localisation, fréquence des liaisons avec Cayenne et niveau de participation à la surveillance biologique du paludisme en 2022.	19
Tableau 3. Cas déclarés et cas estimés de paludisme en France métropolitaine, tendances évolutives 2013 -2022. ...	20
Tableau 4. Principales caractéristiques des patients avec un cas de paludisme déclaré dans la base du CNR du paludisme de 2018 à 2022.	23
Tableau 5. Traitement curatif en première intention des accès palustres simples, France métropolitaine, 2022.....	26
Tableau 6. Traitement curatif en première intention des accès palustres graves, France métropolitaine, 2022.	27
Tableau 7. seuils de chimiosensibilité et répartition des isolats testés en fonction de leur CI ₅₀ aux antipaludiques.....	29
Tableau 8. Proportion de souches sauvages pfcr (K76T) par année et par pays ayant un effectif représentatif en 2022.	32
Tableau 9. Proportion de souches ayant un haplotype N86-184F ou 86Y-Y184 pfmdr1 par année et par pays ayant un effectif représentatif en 2022.	33

Résumé analytique

Faits marquants

En 2022, 2818 cas de paludisme ont été rapportés au CNR du paludisme (+21%) par rapport à 2021. Sept cas sont présumés autochtones. Les sujets infectés sont majoritairement originaires d'Afrique subsaharienne (89%). Les cas en provenance des Comores sont en augmentation (n=98, 3,7%) par rapport à 2021 (n=28, 1,2%) ; deux cas au retour de Mayotte. L'espèce *Plasmodium falciparum* est responsable de 88% des cas, stable par rapport à 2021. La proportion des cas à *P. vivax* reste très basse (1,3%). *P. ovale* (5,2%) et *P. malariae* (2,7%) restent aux mêmes niveaux qu'en 2021. Aucun accès à *P. knowlesi* n'a été signalé en 2022. En augmentation par rapport à 2021 (n=390, 17,1%), la proportion des accès graves reste stable en 2022 (n= 474, 17,6%). Deux décès sont notifiés pour une létalité globale de 0,7 pour mille. Les ACT (86%) et l'artésunate (78%) sont les médicaments de première ligne pour respectivement le traitement des accès simples et des accès graves. Le nombre d'échecs thérapeutiques est limité. Il n'est pas observé de changement dans les niveaux de sensibilité in vitro ou de prévalence de mutations associées à la résistance aux antipaludiques en 2022.

En 2022, en Guyane, le CNR paludisme a reçu 68,63% des 51 cas recensés par SpF en région. Ce faible nombre de cas confirme la pertinence de la France de s'engager vers l'élimination du paludisme en Guyane d'ici 2025. Un haut niveau de résistance à la pipéraquline (>50% jusqu'en 2018) de *P. falciparum* associée à la mutation *pfcr* C350R spécifique du plateau des Guyanes, responsable d'échecs thérapeutiques à l'Eurartesim, a fait l'objet d'un signalement. Les tests de dosage rapide du déficit en G6PD sont prometteurs. La forte diminution de la population de *Plasmodium falciparum* a conduit les parasites à sélectionner les régions du génome impliquées dans le passage au stade gamétocyte pour une transmission efficace et rapide.

EXECUTIVE SUMMARY

Highlights

In 2022, 2818 cases of malaria were reported to the CNR du paludisme (+21%) compared with 2021. Seven cases are presumed to be indigenous. Most infected subjects are from sub-Saharan Africa (89%). Cases from the Comoros are increasing (n=98, 3.7%) compared with 2021 (n=28, 1.2%); two cases are returning from Mayotte. The *Plasmodium falciparum* species is responsible for 88% of cases, stable compared with 2021. The proportion of *P.vivax* cases remains very low (1.3%). *P.ovale* (5.2%) and *P.malariae* (2.7%) remain at the same levels as in 2021. No case of *P.knowlesi* was reported in 2022. Up on 2021 (n=390, 17.1%), the proportion of severe cases remained stable in 2022 (n= 474, 17.6%). Two deaths are reported, for an overall case-fatality rate of 0.7 per thousand. ACTs (86%) and artesunate (78%) are the first-line drugs for treating simple and severe attacks respectively. The number of therapeutic failures is limited. No change has been observed in in vitro susceptibility levels or in the prevalence of mutations associated with antimalarial drug resistance in 2022.

In 2022, in French Guiana, the CNR malaria received 68.63% of the 51 recorded cases by SpF. This low number of cases confirms France's commitment to eliminating malaria in French Guiana by 2025. A high level of piperazine resistance (>50% until 2018) in *P. falciparum* associated with the Guiana Shield-specific *pfcr* C350R mutation, responsible for Eurartesim treatment failures, has been reported. Rapid tests for G6PD deficiency show promise. The sharp decline in the *Plasmodium falciparum* population has led the parasites to select the regions of the genome involved in the passage to the gametocyte stage for efficient and rapid transmission.

1. Missions et organisation du CNR

1.1. Organigramme

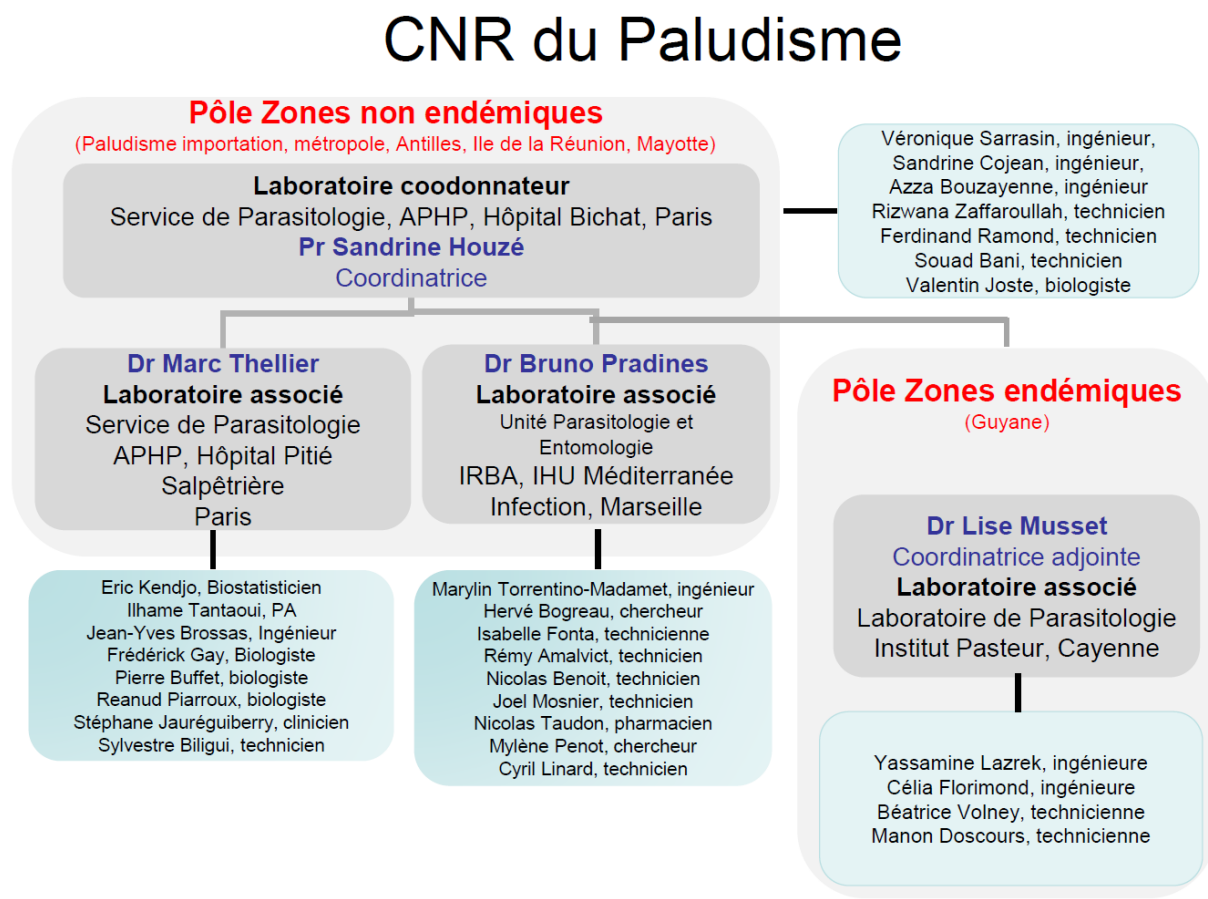


Figure 1. Organigramme du CNR paludisme.

1.2. Mission et organisation

L'organisation du CNR du paludisme en 4 laboratoires (un laboratoire coordonnateur et 3 laboratoires associés (Annexe 1), répartis en 2 pôles, le pôle « zones non endémiques » et le pôle « zones endémiques » n'est pas différente pour l'année 2022 par rapport à l'année précédente.

Les annexes ont été mises à jour concernant les équipes et la taille des collections.

1.3. Démarche qualité

Le laboratoire coordonnateur de Bichat a déposé des demandes d'extension pour l'antipaludogramme et le génotypage des gènes de résistance : la visite des auditeurs COFRAC est programmée pour début 2024 compte-tenu de leurs contraintes d'agenda.

Au pôle zones endémiques, les PCR pour le diagnostic sont accréditées depuis 2017 et le système de management de la qualité déployé à l'ensemble de nos activités y compris recherche et santé publique même si toutes les techniques utilisées pour la surveillance, sans rendu nominatif sont hors champ d'accréditation. La traçabilité et la double vérification sont aujourd'hui la norme dans toutes nos activités y compris recherche.

L'IRBA a engagé un processus de certification globale des activités en particulier des activités rattachées au CNR Paludisme. L'unité parasitologie et entomologie est certifiée Iso 9001. Nous avons été audités en 2022 (dernier audit le 10 février 2022 par l'AFNOR). Le système managérial de l'unité a été audité mais aussi la qualité et la maîtrise des risques (dont la gestion du matériel : contrôle température par sonde de toutes les enceintes thermiques froides ou chaudes (+4°C, -20°C, -150°C, incubateurs à 37°C) avec report téléphonique et gestion informatisée de toutes les non-conformités, contrôle des gaz par sonde (incubateurs CO2 et O2), contrôle annuel des balances niveau accréditation, contrôle annuel des pipettes niveau accréditation...). L'unité UPE s'est engagée dans un processus d'accréditation selon la norme ISO 15189 pour le diagnostic du paludisme. L'unité de Développement Analytiques et Bioanalyse est engagée dans une démarche de bonne pratique de laboratoire. En 2023, elle a commencé à participer aux essais inter-laboratoires (Round Robin) organisés par le réseau international sur la résistance aux antipaludiques (WWARN).

2. Activités d'expertise

Pôle Zones non Endémiques - Eléments clés

Contexte de la surveillance et principaux faits marquants en 2022

Le rapport 2022 de l'OMS, sur les données 2021 confirme le recul de la lutte contre le paludisme dans le monde. Le nombre de cas et l'incidence augmentent et les sujets d'inquiétude sont nombreux. Au niveau mondial, le nombre de cas de paludisme est estimé à 247 millions en 2021 dans 84 pays d'endémie palustre (y compris le territoire de la Guyane française). En 2015, année de référence de la Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030, le nombre de cas de paludisme était estimé à 230 millions. La plupart des cas supplémentaires sont estimés dans la région Afrique de l'OMS. Vingt-neuf pays, tous sauf un (Inde 1,7%) situés en Afrique sub-Saharienne, ont concentré 96 % du nombre total de cas de paludisme dans le monde. Il s'agit dans l'essentiel des cas de l'espèce *Plasmodium falciparum* (98%). Le pourcentage des infections à *Plasmodium vivax* a diminué drastiquement ces 20 dernières années, passant de 8,4% (20,5 millions) en 2000 à 2% (4,9 millions) en 2021. Parmi les sujets d'inquiétude on notera :

- L'émergence d'une résistance partielle à l'artémisinine en Afrique (Ouganda, Rwanda) qui se propage rapidement (cette émergence ne s'est pas répandue depuis la sous-région du Grand Mékong, mais est apparue de novo sur le continent).
- L'implantation et l'extension en Afrique du moustique *Anopheles stephensi*. Il se développe en milieu urbain et résiste aux insecticides. Il a été détecté initialement en Afrique de l'Est, à Djibouti (2012), en Éthiopie et au Soudan (2016), en Somalie (2019) et plus préoccupant encore en Afrique de l'Ouest au Nigéria (2020).
- La perturbation des services de santé durant la pandémie de Covid 19. Elle a retardé la distribution des moustiquaires imprégnées d'insecticide (MI) et des médicaments antipaludiques sur le terrain.

Ces évolutions en zone d'endémie risquent de modifier l'épidémiologie du paludisme d'importation tant sur la sensibilité aux antipaludiques, qu'au risque de contracter cette maladie dans des conditions qui étaient à risque limité jusqu'à présent.

En France métropolitaine, pour l'année 2022, un total de 2818 cas de paludisme a été rapporté au Centre national de référence (CNR) du paludisme, dont sept cas présumés autochtones. Il s'agit de 3 cas cryptiques et 4 cas aéroportuaires. Un accroissement très marqué du nombre de cas (+21,3%), par rapport à 2021 est à noter, confirmant et renforçant la tendance observée avant la pandémie COVID-19. La proportion de cas capturés par le réseau de correspondants 46,5% augmente en 2022 de (+1,3%) par rapport à 2021. La lente reconstitution du réseau de correspondants se poursuit après la perte de 7,4% en 2020 (année Covid). On estime ainsi à environ 6000 (6005) le nombre de cas de paludisme importés survenus sur le territoire métropolitain en 2022 contre environ 5000 (4995) en 2021 (+20,2%). Parmi les 84% de cas renseignés, les civils voyageurs comptent pour 90,5% des cas, 3% de plus qu'en 2021 ; la proportion de militaires en opération extérieure 1,5% (n=37) est en nette diminution par rapport à 2021 (n=69, 3,4%) ; les civils résidents en zone endémique (migrants, expatriés et touristes) représentent 8,0% des cas, soit 1,1% de moins qu'en 2021. En dehors de l'évolution pour les militaires, les proportions pour les voyageurs civils varient peu.

L'Afrique Subsaharienne est le continent source de contamination dans 99,2%, stable par rapport à 2021. Les sujets infectés sont majoritairement originaires de ce continent (88,9%), le plus souvent dans le cadre de voyages au pays pour visiter la famille ou des amis (VFR). Les cas en provenance des Comores sont en nette augmentation (n=98, 3,7%) par rapport à 2021 (n=28, 1,2%). Deux cas sont signalés au retour de Mayotte (1 touriste et un militaire). Aucun cas importé de Mayotte n'avait été signalé par notre réseau ces cinq dernières années. L'espèce *P. falciparum* est responsable de près de 90% (88,2%) des cas diagnostiqués en France en 2022, stable par rapport à 2021 (88,8%). L'Afrique subsaharienne concentre logiquement 90% des cas à *P. falciparum*, en légère augmentation par rapport à 2021 (88,8%). Le nombre et la proportion des cas à *P. vivax* restent très bas, 35 cas (1,3%). *Plasmodium ovale* (5,2%)

et *Plasmodium malariae* (2,7%) restent aux mêmes niveaux qu'en 2021. Comme en 2021, aucun accès à *Plasmodium knowlesi* n'a été signalé au CNR du paludisme en 2022. Bien qu'en nette augmentation en valeur absolue par rapport à 2021 (n=390, 17,08%), la proportion des accès graves reste stable en 2022 (n= 474, 17,61%).

Deux décès ont été notifiés en 2022, soit une létalité globale de 0,7 pour mille et de 4,2 pour mille pour les formes graves, marquant ainsi une très forte baisse par rapport aux années précédentes et avec 2021, 8 décès (3,4 pour mille de létalité globale et 20,5 pour mille pour les accès graves). Une des explications pour les décès étant le retard au diagnostic, les différentes alertes lancées par le CNR paludisme en 2021 et 2022 concernant une augmentation de ce risque du fait de la focalisation des soignants sur le risque Covid a peut-être eu l'impact positif escompté.

Prise en charge

Suivant les recommandations nationales de 2017, les médicaments combinés, à base de dérivé d'artémisinine, l'association arténimol-pipéraquine (67,9%), suivie par l'artémether–luméfantrine (18,1%), sont les médicaments de première ligne pour la prise en charge des accès simples. L'artésunate par voie intraveineuse est le traitement de première intention pour les accès graves (77,7%). Une proportion non négligeable d'accès graves est néanmoins traitée *per os* (16,9%).

La surveillance post-thérapeutique recommandée pour la prise en charge du paludisme à *P. falciparum* reste incomplète.

Sur le plan de l'efficacité et de la tolérance des traitements du paludisme importé, le nombre d'échecs thérapeutiques aux différents traitements reste limité mais justifie cependant la recommandation des contrôles post-thérapeutiques tardifs (J28). Parmi les prélèvements expertisés par le CNR en 2022, aucun échec thérapeutique n'a été associé à une résistance avérée aux traitements antipaludiques.

En 2022, le niveau des prévalences des mutations associées aux résistances aux antipaludiques est relativement stable. Les mutations du gène K13 impliquées dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine en Asie du Sud-est ne sont pas détectées sur les souches africaines. Il est nécessaire de surveiller particulièrement la prévalence de ces marqueurs en Afrique pour anticiper l'émergence de la résistance à l'artémisinine en Afrique et d'identifier de nouveaux marqueurs pouvant être impliqués.

Pôle Zones Endémiques – Eléments clés

L'endémie palustre en Guyane en 2022 a continué à baisser avec 51 cas déclarés à la SpF en région ont 9 cas de *P. falciparum* importés d'Afrique. Parmi ces 51 cas, 35 ont été reçus au CNR pour expertise (Figure 2). L'exhaustivité des cas reçus se maintient malgré une légère baisse 68,6% (n=35/51). Des actions de sensibilisation ont dès lors été réalisées à nouveau auprès des acteurs de la commune de Régina, de Kourou et du laboratoire privé Eurofins.

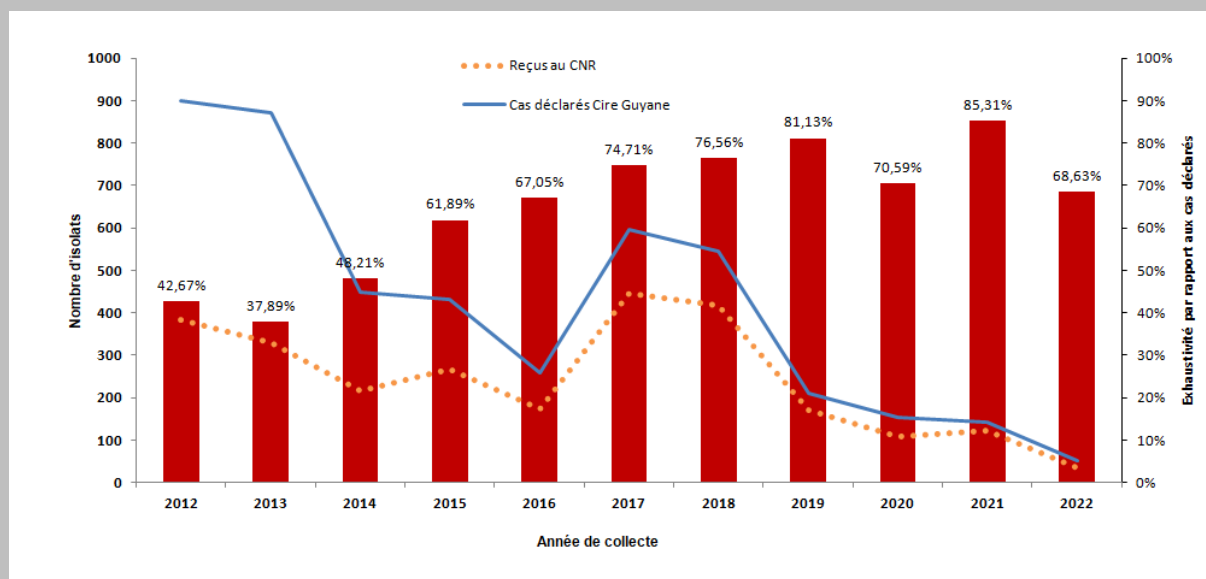


Figure 2. Recrutement et exhaustivité atteints entre 2010 et 2022 par le Pôle Zones endémiques.

Courbe pleine: nombre de cas déclarés à Santé publique France (SpF) en Guyane, Pointillés : nombre d'isolats reçus, Histogrammes : proportion d'isolats collectés en fonction du nombre de cas déclarés à SpF en Guyane.

Côté recherche opérationnelle, en lien avec l'équipe de l'Hôpital de Cayenne, nous avons poursuivi nos efforts de caractérisation du paludisme en zone orpaillée avec un dépistage actif mené sur 358 échantillons prélevés chez des orpailleurs.

En 2022, les activités internationales se sont poursuivies avec l'étude des mutations *pfk13* en lien avec la résistance aux artémisinines et des délétions des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* chez 773 isolats en provenance du Guyana.

A Mayotte, les activités d'expertise sont pour l'instant assurées par le laboratoire de l'IRBA à Marseille.

2.1. Evolution des techniques

Après le laboratoire coordonateur de Bichat, le laboratoire associé de Marseille a développé le NGS après amplification de l'ADN plasmodial.

Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

Mise au point d'une PCR ultra-sensible en temps réel

Cette PCR en temps réel permet de diagnostiquer les deux espèces plasmodiales les plus courantes en Guyane, *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*. L'objectif était de repousser la limite de détection en ciblant des gènes parasitaires davantage répétés que le gène 18S. Cette approche a permis d'améliorer la détection pour *P. vivax* en utilisant comme cible *pvcox1* (0,03 parasites/ μ l vs 0,5P/ μ l) et pour *P. falciparum* en utilisant comme cible *pfvarATS* (0,25 parasites/ μ l vs 1P/ μ l). Ces deux techniques se sont inspirées de méthodes précédemment décrites par Hofmann et al. 2015 et Lloyd et al., 2018. Elles ont été utilisées dans le cadre de la recherche de porteurs asymptomatiques chez les orpailleurs (ORPAL 3) et sont utilisées pour caractériser les dernières poches de transmission du paludisme en Guyane dès 2023.

Pressions médicamenteuses par la pipéraquline

Cette approche est utilisée pour comprendre la dynamique de sélection des régions du génome parasite sous pression médicamenteuse par la pipéraquline. Des pressions successives à l'aide de 200nM de pipéraquline pendant 48h sont réalisées.

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

Pôle Zones non Endémiques

Le laboratoire coordonateur de Paris a évalué deux kits commerciaux de PCR en temps reel : RealStar® Malaria Screen & Type PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics) et VIASURE® Real Time PCR Detection Kit (CerTest Biotec).

Le laboratoire associé de Marseille a évalué un kit commercial de PCR en temps réel multiplexé (Vitassay qPCR Malaria 5 test).

Le laboratoire associé de Marseille a évalué un nouveau test de diagnostic rapide pour une utilisation sur le terrain (Acro rapid Test de Biotec Inc).

Pôle Zones Endémiques: Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

En Guyane, le paludisme est endémique et deux espèces prédominent : *P. falciparum* et *P. vivax*. Avec un meilleur contrôle de l'endémie ces dernières années, *P. vivax* représentait en 2022 98% des cas contractés localement. En effet, la diminution de la transmission de cette espèce est compliquée par la présence de nombreuses reviviscences lorsque les patients ne reçoivent pas de primaquine faute de dosage rapide de l'enzyme G6PD. En effet, la primaquine peut générer des anémies hémolytiques chez les patients souffrant d'un déficit en G6PD, un dosage préalable est donc obligatoire.

A l'heure actuelle, le délai d'obtention d'un dosage en G6PD en Guyane est long puisqu'il est réalisé en France hexagonale avec des conditions pré-analytiques exigeantes. Pour tenter d'améliorer la prise en charge et poursuivre notre chemin vers l'élimination, le projet G6PD facile a été élaboré en 2020. Il vise à évaluer les performances d'un test quantitatif rapide de dosage de l'activité en G6PD par gramme d'hémoglobine, « STANDARD G6PD » de chez SD BIOSENSOR. Ce projet est co-financé par l'ARS Guyane et s'effectue en collaboration avec le laboratoire de parasitologie-mycologie de l'Hôpital de Cayenne, Pr M Demar, et le laboratoire du globule rouge du laboratoire universitaire de l'Hôpital Henri Mondor, Dr S Moutereau.

Un panel de 166 individus a été inclus entre 2020 et début 2023 sur la base de résultats antérieurs de G6PD de l'hôpital de Cayenne et du projet Palustop. Tous les niveaux d'activités en G6PD y sont représentés pour obtenir trois groupes d'individus, 36 sévèrement déficitaires, 18 intermédiaires et 112 normaux. De plus, une vérification de la méthode selon la norme ISO 15189 a été menée.

Les valeurs de sensibilité/spécificité du test rapide pour détecter les hommes et les femmes déficitaires étaient de 100% [IC_{95%}: 87-100]/ 100% [IC_{95%}: 75-100] et 88% [IC_{95%}: 79-97]/ 89% [IC_{95%}: 82-96], respectivement. Concernant les femmes intermédiaires, elles étaient de 61% [IC_{95%}: 39-84]/ 82% [IC_{95%}: 73-91]. Le résultat était peu impacté par la matrice avec un R² de 0,87 en comparant les résultats obtenus sur le terrain à partir de sang veineux ou capillaire.

Sur des échantillons déficitaires, la répétabilité et la reproductibilité de la méthode ont été évaluées avec un coefficient de variation (CV) de 9,4 et 9,7 %, respectivement. Un stockage de quatre jours entre 2 et 8 °C n'a pas eu d'impact sur les résultats des échantillons au-delà du CV, quel que soit le niveau d'activité de la G6PD. Enfin, la robustesse du test a permis de montrer que le temps d'incubation de l'échantillon dans le tampon est important. Il peut être légèrement diminué mais ne doit pas dépasser 5 minutes au risque de fausser le résultat. Le déploiement de cette méthode rapide et simple d'utilisation serait une avancée majeure dans le processus d'élimination de *P. vivax* en Guyane et permettrait d'augmenter la couverture par la primaquine.

2.3. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Un travail conjoint au sein des membres du CNR a été conduit pour comparer et partager nos expériences autour des méthodes ultra-sensibles déployées dans chaque laboratoire.

Pôle Zones non Endémiques

En 2022, aucune technique n'a fait l'objet d'un transfert.

Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

En 2022, aucune technique n'a fait l'objet d'un transfert.

2.4. Collections de matériel biologique

Pôle Zones non Endémiques

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

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

Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

Les isolats reçus dans le cadre de la surveillance de *P. falciparum* sont systématiquement mis en culture afin de compléter la collection de parasites vivants cryopréservés d'intérêt pour l'étude des mécanismes de résistance et l'identification/validation de marqueurs génétiques de résistance. Le taux de réussite de ces adaptations est de plus de 90% depuis 2009. Ce succès intervient parfois jusqu'à 7 jours après le prélèvement des parasites. Le plus tôt étant bien évidemment le mieux. Ainsi en 2022, quatre des 10 isolats de *P. falciparum* ont été adaptés à la multiplication *in vitro* avec la particularité ces dernières années, d'adapter un nombre non négligeable d'isolats en provenance d'Afrique. L'état précis de la collection en lien avec les activités du CNR figurent en annexe 1.

Pour ce qui est des autres collections, elles sont issues des échantillons reçus: ADN, plasma, lames et culots globulaires.

En 2022, des ADN extraits de prélèvements effectués chez des orpailleurs ont été partagés avec l'équipe d'O Duron, Evolution des communautés hôtes-microbes à Mivegec, Montpellier. Ce partage a permis l'identification d'une nouvelle espèce de babésiose chez un orpailleur splénectomisé (Duron et al., 2022, *Emerg Infect Dis*, doi:10.3201/eid2808.212425).

2.5. Activités d'expertises

Pôle Zones non Endémiques

En 2022, le laboratoire coordonateur du Pôle Zones non endémiques a reçu 2111 prélèvements dont 1970 isolats de patients impaludés transmis par les correspondants hospitaliers. Sur tous les prélèvements, une PCR d'espèce est réalisée afin de confirmer les espèces infectantes. Les résultats sont transmis aux correspondants via le serveur de déclaration des cas dans les 7 jours suivant la réception des prélèvements; en cas de résultats pouvant être à l'origine d'une modification de la prise en charge initiale, les correspondants sont contactés directement. Parmi ces isolats, on a confirmé 1844 infectés par *P. falciparum* seul ou associé à une autre espèce, *P. ovale* ou *P. malariae*, 24 par *P. vivax*, 123 par *P. ovale*, 62 par *P. malariae*.

En 2022, 402 tests *in vitro* de chimiosensibilité ont permis d'évaluer la sensibilité des isolats de *P. falciparum* aux antipaludiques : chloroquine, amodiaquine, pipéraquline, méfloquine, quinine, di-hydroartémisinine, pyronaridine, doxycycline.

Les études de génotypage ont porté sur 892 isolats pour lesquels au moins un marqueur moléculaire de résistance a été analysé en 2022. Les analyses statistiques ont été réalisées en gardant uniquement les isolats pour lesquels on avait la donnée du pays de contamination soit 830 isolats :

- l'étude du gène *pfcytb*, impliqué dans la résistance à l'atovaquone-proguanil, qui a été réalisée pour 8 isolats de *P. falciparum* (suspicion de résistance à l'atovaquone-proguanil),
- l'étude du gène *pfcr1*, impliqué dans la résistance à la chloroquine, qui a été réalisée pour 619 isolats de *P. falciparum*,
- l'étude du gène *pfdhfr*, impliqué dans la résistance au proguanil, qui a été réalisée pour 367 isolats de *P. falciparum*,
- l'étude du gène *pfmdr1*, impliqué dans la diminution de sensibilité aux partenaires des dérivés de l'artémisinine dans les ACT, qui a été réalisée pour 914 isolats de *P. falciparum*,
- l'étude du nombre de copies du gène *pfmp2*, impliqué dans la diminution de sensibilité à la pipéraquline, qui a été réalisée pour 437 isolats de *P. falciparum*,
- l'étude du gène *pfK13*, impliqué dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine, qui a été réalisée pour 806 isolats de *P. falciparum*.

En 2022, le laboratoire associé site Pitié-Salpêtrière a reçu 549 échantillons de 301 patients en accès grave, adressés par 51 hôpitaux (dont 14 extérieurs au réseau du CNR) pour une recherche d'hémolyse post traitement par artésunate ou un dérivé d'artémisinine (PADH).

Les analyses de cytométrie en flux pour la mesure de la parasitémie et de la pitémie (comptage du nombre de globules rouges qui ont été parasités par *P. falciparum* et remis en circulation après que le parasite ait été tué par le médicament) ont été interprétables pour 523 échantillons (95%), de 292 patients. Parmi les 26 échantillons non interprétables, deux étaient des *P. ovale* et 24 présentaient une forte hémolyse.

Pour les 280 échantillons prélevés entre le J2 et le J7 (prédiction de la PADH) de 138 patients, 58 (42%) avaient une pitémie $\geq 4\%$ considérée comme prédictive de la survenue d'une PADH. Les services prescripteurs ont été alertés du risque. L'évolution clinique des patients, en cours de recueil et d'analyse, a pu confirmer lorsque les données étaient disponibles, la survenue de la PADH dans les jours qui ont suivi.

Biologie moléculaire : des PCR multiplex sont réalisées sur les échantillons du J0 des accès graves pour vérifier l'espèce et s'assurer de l'absence de co-infection. Sur la période, 260 échantillons de 254 patients ont été analysés,

toutes positives pour l'espèce *P. falciparum*, sauf 2 *P. ovale*.

Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

En 2022, le Pôle Zones endémiques a reçu 35 isolats de patients impaludés en provenance de cinq partenaires. Parmi ces isolats, on en dénombrait huit infectés par *P. falciparum*, 23 par *P. vivax*, trois cas par *P. malariae*. Ont également été reçus, neuf isolats négatifs.

Au-delà de ces isolats « J0 » reçus dans le cadre du dépistage passif, le laboratoire a également reçu 28 prélèvements dans le cadre du suivi de l'efficacité thérapeutique des antipaludiques conduite en partenariat avec le CHAR et le service de santé des armées.

Quatre demandes d'expertise diagnostic par PCR en temps réel dans le cadre du dépistage passif ont été demandées pour des dossiers compliqués et de nombreux isolats ont été reçus dans le cadre de notre expertise internationale et de nos projets de recherche opérationnelle (cf Tableau 1, Figure 3).

Tableau 1. Activités d'expertise réalisées en 2022 en lien avec le nombre d'isolats reçus.

Activité d'expertise	Provenance	2022		Activités et analyses conduites sur les échantillons
Dépistage passif	Partenaires guyanais (cf Tableau 2)	8	<i>Pf</i>	Phénotypage (isotopique, RSA/PSA) Génotypage (<i>pfcytb</i> , <i>pfK13</i> , <i>pfcr</i> , <i>pfhrp</i>)
		0	<i>Pf/Pv</i>	
		423	ND	PCR diagnostic de confirmation, CNR + projets
Demande d'expertise diagnostique	CNR Paludisme	4	ND	PCR diagnostique pour des dossiers compliqués
Suivi efficacité thérapeutique	Hôpital de Cayenne	28	<i>Pf</i> et/ou <i>Pv</i>	Variable en fonction des dossiers (génotypage, dosage plasmatique, phénotypage)
Dépistage actif	ORPAL 3	389	ND	Dépistage actif par PCR
Expertise internationale	Guyana	798	<i>Pf</i>	Génotypage <i>pfK13</i> et <i>pfhrp</i>
Phénotypage d'isolats d'années antérieures	Guyane	56	<i>Pf</i>	RSA/PSA essentiellement

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

En 2022, la chimiosensibilité à onze molécules de quatre isolats de *P. falciparum* en provenance d'Afrique collectés dans le cadre du dépistage passif a pu être déterminée.

Les études de génotypage ont porté sur :

- l'étude du gène *pfcytb*, a été réalisée pour 21 isolats de *P. falciparum* dont cinq isolats issus du projet ORPAL 3 et 11 provenant d'Afrique. Aucun mutant 268 n'a été observé,
- l'étude du gène *pfK13* a été réalisée 789 isolats en provenance du Guyana et 9 en provenance d'Afrique et de Guyane, tous étaient sauvages pour la partie propeller en lien avec la résistance,
- l'étude du gène *pfcr* a permis d'identifier quatre profils CVMNK (sensible à la CQ) et quatre CVIET (résistant) en lien avec les isolats africains et un SVMNT/350C résistant à la CQ mais sensible à la pipéraquline en provenance de Guyane.

Excepté la PCR diagnostique multiplex qui est rendu au prescripteur dans les cinq jours (n=4 en 2022), les autres analyses ne font pas l'objet d'un rendu de résultat individuel pour le patient mais sont uniquement analysées de manière groupée pour un suivi des tendances.

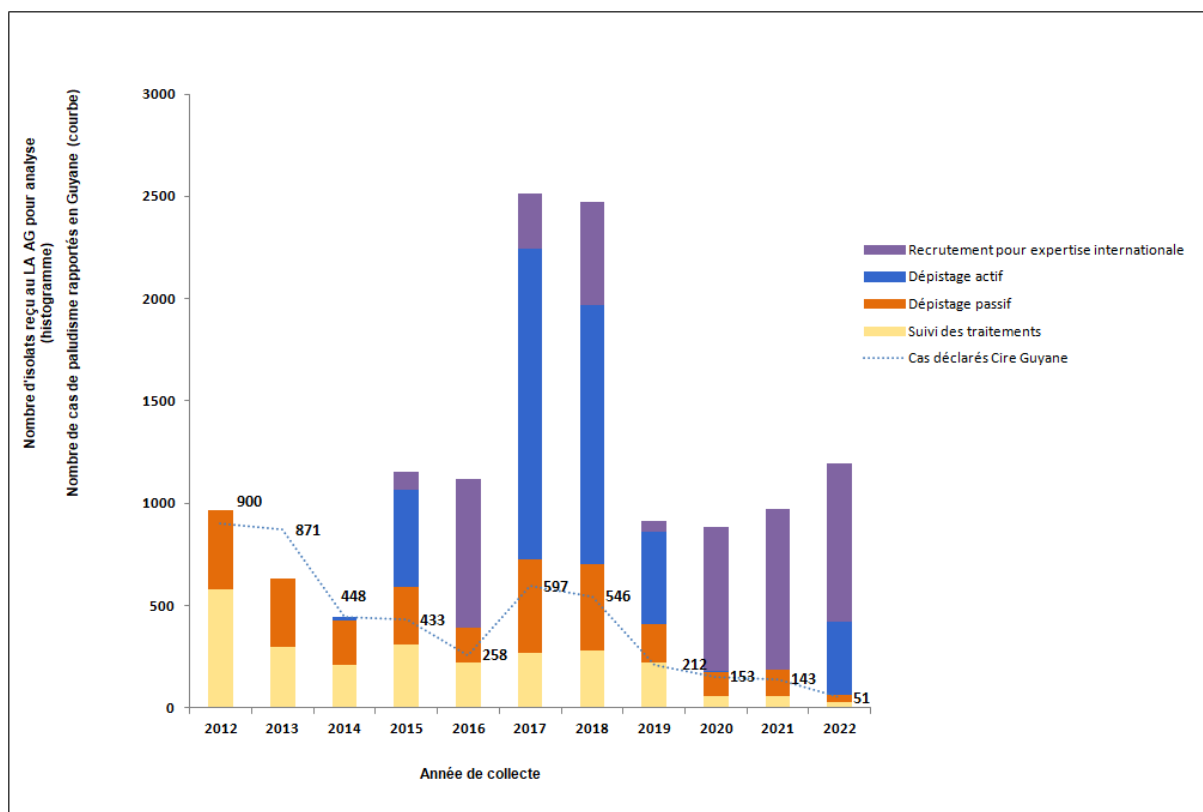


Figure 3. Nombre d'isolats reçus au Pôle Zones endémiques en provenance du plateau des Guyanes, entre 2012 et 2022.

Courbes : nombre de cas déclarés à SpF en région (recueil exhaustif des cas). Histogrammes : nombre d'isolats reçus et dans quel cadre.

2.6. Activités de séquençage

Pôle Zones non Endémiques

Pour la surveillance des résistances aux antipaludiques, les recherches des mutations au sein des gènes *pfdhfr*, *pfcyt b*, *pfmdr1* et *pfK13* sont réalisées par PCR dans le laboratoire coordonnateur du CNR puis séquençage des produits d'amplification obtenus sur la plateforme de génétique de l'hôpital Bichat (Pr C Boileau). Ces analyses moléculaires sont limitées depuis 2018, aux isolats pour lesquelles les données d'efficacité *in vivo* ou les phénotypes *in vitro* de sensibilité aux antipaludiques sont disponibles afin de limiter les coûts de réalisation, et de privilégier l'obtention de données exploitables.

Par ailleurs, le Pôle Zones non Endémiques utilise de plus en plus le séquençage génome entier pour analyser les isolats. L'expertise bioinformatique est réalisée par notre collaborateur, R Coppée travaillant à l'Université de Paris Cité. Les séquençages sont réalisés par la plateforme de l'Institut Cochin, moyennant finances.

- Ce séquençage mis en place vise à répondre in fine à des questions de recherche en santé publique. Sont ainsi abordé grâce à ces analyses de génome entier :
- La recherche de marqueurs de résistance associés aux échecs thérapeutiques après traitement par les dérivés de l'artémisinine,
- L'analyse de la diversité génétique des isolats de *P. falciparum* à l'origine des cas de paludisme autochtone pour identifier l'origine géographique des parasites

- L'analyse de la diversité génétique des isolats de *P. ovale* afin d'établir une phylogénie de ce parasite et développer des outils pour la caractérisation des reviviscences.

Dans le futur, ce séquençage entier souhaiterait être généralisé de manière à être plus exhaustif, gagner du temps et surtout disposer des génomes et des phénotypes des parasites.

Le laboratoire associé de Marseille possède sa propre plateforme de séquençage (Sanger, analyse de fragments, nombre de copies de gènes) et a accès à la plateforme de séquençage et à l'expertise bio-informatique de l'IHU Méditerranée Infection (WGS, NGS) et de l'IRBA à Brétigny (NGS). Cependant, un certain nombre d'échantillons ont été externalisés auprès d'une plateforme commerciale (Biofidal, Lyon) à partir de 2019. En 2022, aucun génome total n'a été séquencé. En 2022, 508 isolats de *P. falciparum* (397 dans le cadre du paludisme d'importation, 35 de Mayotte, 76 non CNR) ont été séquencés pour les gènes *pfcr1*, *pfdhfr*, *pfdhps*, *pfmdr1*, *pfk13* pour la recherche de résistance dans la cadre de la surveillance et plus de 600 isolats pour l'identification-validation à des fins de recherche de gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux antipaludiques (*pfcr1* (nouvelles mutations), *pfmdr5*, *pfmdr6*, *pfcoronine*).

Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

Le Pôle Zones Endémiques utilise de plus en plus le séquençage génome entier pour analyser les isolats et leurs 32 mégabases de génome répartis en 14 chromosomes. En lien avec les données de phénotypage qu'il génère pour *P. falciparum*, c'est un outil très puissant pour identifier de nouveaux marqueurs de résistance. L'expertise bioinformatique est réalisée sous forme de prestation ou collaboration avec différents partenaires, A. Early du Broad Institute, S. Tirera du Laboratoire des Interactions Virus-Hôtes de l'Institut Pasteur de la Guyane et P. Campagne de Biomix à l'Institut Pasteur à Paris.

En 2022, le CNR a investi en matériel de stockage de séquence de manière à disposer de l'ensemble de ses données brutes, tout particulièrement des fichiers « fastq ». Ces fichiers sont pour partie rendus publiques lorsque les résultats sont publiés. Pour le reste, ils sont partagés lors de collaborations scientifiques.

Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Externe au CNR : Service de génétique de l'hôpital Bichat, Cochin, ICM Pitié Salpêtrière, IHU Méditerranée Infection, Prestataire Société BioFidal (Lyon) Interne au Laboratoire associée Marseille (Sanger) Plateforme Biomix - Institut Pasteur à Paris
	Sanger , Illumina

Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?	
<input type="checkbox"/> NON	Si NON ou accès limité, précisez les raisons
<input checked="" type="checkbox"/> OUI	Externe : collaboration avec un doctorant de l'UMR 261 Interne au Laboratoire associé Marseille et IRBA Pour le pôle zone endémiques: Hub bioinformatique de l'Institut Pasteur à Paris et collaboration avec le Broad Institute à Boston
	Outils utilisés pour l'analyse des séquences : Sequencher pour Sanger, pipeline "maison" pour le NGS

Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?

NON

Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?

OUI

Investigation de cas nosocomiaux ; reviviscence d'accès à *Plasmodium ovale*, évaluation de l'évolution génétique de la population parasitaire en Guyane liée à la forte diminution de transmission

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

**analyse phylogénétique, comparaison de souches, recherche de marqueurs de résistance.
En complément des études de microsatellites (comparaion de souches) et du séquençage Sanger
(étude des marqueurs de résistance)**

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

0 en 2022

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

*1003 isolats de P. falciparum (892 dans le cadre du paludisme d'importation, 35 de Mayotte, 76 non CNR)
250 isolats guyanais*

Aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues)

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences :génomés assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Dans les bases de données fermées : Précisez

Le laboratoire coordinateur de Bichat et le labo de Marseille déposent les séquences produites dans la base European Nucleotide Archive (ENA) avec les métadatas disponibles associées

Partage de séquences produites par les CNR

Absence de partage des séquences, mais elles sont publiées.

3. Activités de surveillance

Pôle Zones Endémiques – Eléments clés

L'ensemble des activités de surveillance concernant la Guyane sont résumées dans le bulletin de rétro-information de l'année 2022 accessible sur notre site internet pasteur-cayenne.fr. Le niveau d'exhaustivité du Pôle Zones Endémiques par rapport au nombre de cas déclarés en Guyane reste bon malgré une légère baisse.

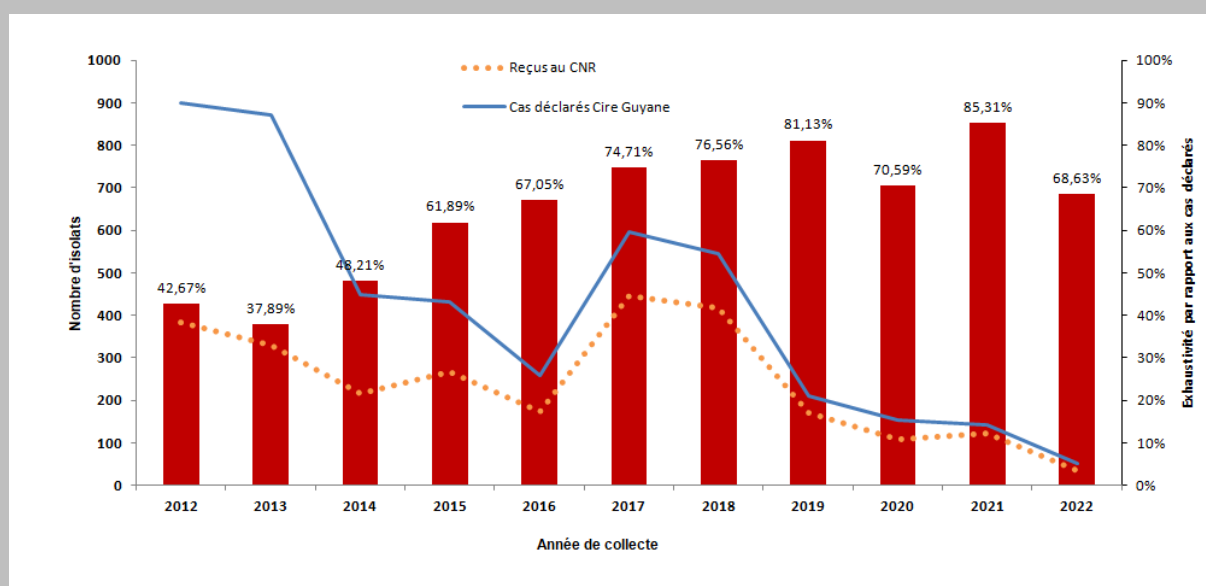


Figure 4. Recrutement et exhaustivité atteints entre 2010 et 2022 par le Pôle Zones endémiques.

Courbe pleine : nombre de cas déclarés à la Cire Guyane, pointillée : nombre d'isolats reçus, histogrammes : proportion d'isolats collectés en fonction du nombre de cas déclarés à Santé publique France.

Le niveau de sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux antipaludiques a été déterminé par la méthode isotopique pour onze molécules et le test de survie pour deux molécules (Figure 4). Aucun profil particulier différent de ceux décrit les années antérieures n'a été observé.

3.1. Description du réseau de partenaires

En Guyane

La Guyane, dont la superficie est équivalente à celle du Portugal, est le département le plus vaste de France. Elle est couverte à plus de 80 % par une forêt tropicale associée à un réseau hydrologique très dense (Figure 2). Ses infrastructures en moyen de communication sont peu développées. Cette situation fait qu'à l'exception du littoral, un grand nombre de villages situés le long des fleuves ne sont accessibles que par voie fluviale ou aérienne.

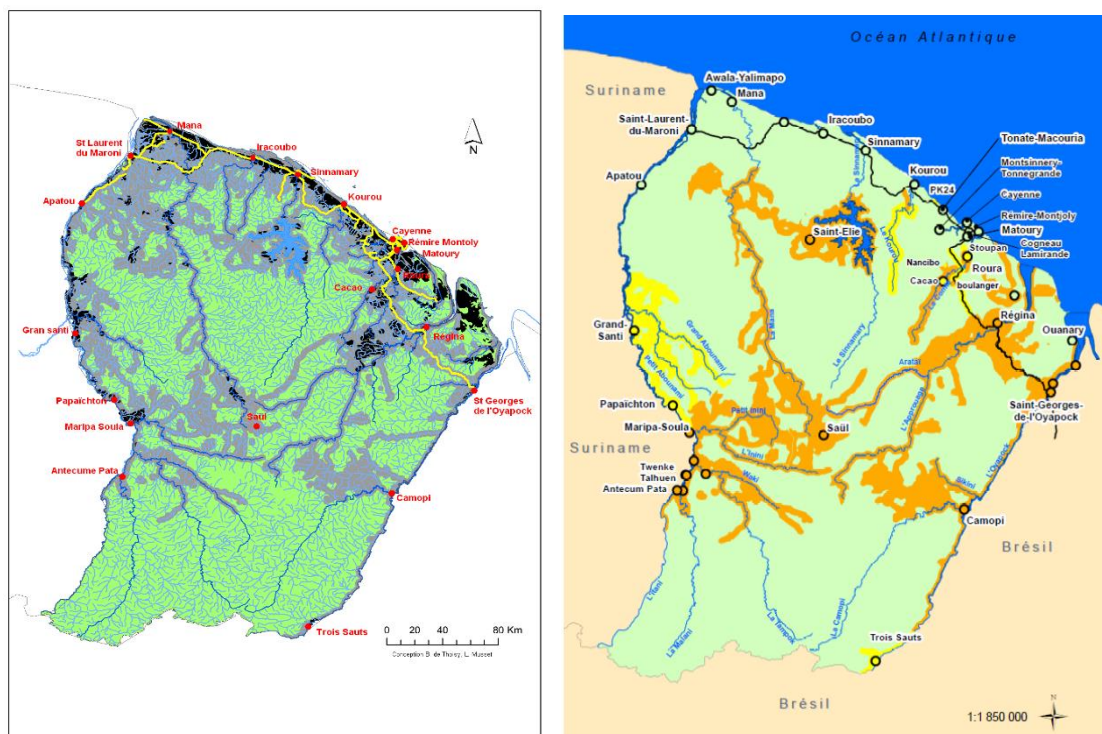


Figure 5. Réseau de partenaires gyanais et carte du risque de paludisme en Guyane, février 2019.

a) : En jaune, réseau routier (national et départemental), en vert : forêt primaire, en gris : zones forestières avec impact anthropique, en noir : absence de forêt (savane ; marécage ; zones urbaine, d'orpaillage étendue, agricole...). b) : vert : pas de transmission au cours de l'année précédente, jaune : risque faible de transmission et absence dans les bourgs, orange : risque fort de transmission.

Les zones d'endémie permanente du paludisme sont essentiellement localisées dans ces zones difficiles d'accès (Figure 5) et très souvent victimes d'activités d'orpaillage illégal. Quelques foyers de transmission à *P. vivax* sont situés le long du fleuve Oyapock et dans le secteur du Haut-Maroni. L'isolement géographique de certains villages participe à cette transmission dès lors que le centre de santé est situé à près d'une heure ou plus du lieu d'habitation. C'est le cas notamment du village de Trois Palétuviers à St Georges. Certains villages entre Gran Santi et Papaïchton sont situés jusqu'à quatre heures de pirogue de la première structure de soin (Figure 5).

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

En fonction des données de diagnostic recueillies, une carte du risque de paludisme est établie en lien avec les différents acteurs du territoire. La dernière mise à jour de 2019 est présentée Figure 5.

Toutes les structures de soin et de diagnostic constituent le réseau de partenaires du Pôle Zones endémiques (Tableau 2). L'envoi des échantillons vers le Pôle Zones endémiques repose sur le volontariat du personnel soignant ou des biologistes. Pour animer ce réseau, des missions sont organisées tout au long de l'année, tout particulièrement dans les CDPS où la rotation des médecins est importante (en moyenne tous les 6 mois) ce qui rend difficile la pérennisation de la participation à la surveillance. Dans ce cadre, nous participons aussi à la réunion annuelle des CDPS aussi appelé conseil de Pôle qui a lieu en décembre chaque année.

En 2014, conjointement avec SpF en Guyane (CIRE à l'époque) et le Laboratoire Hospitalo-Universitaire de Parasitologie Mycologie (LHUPM) de l'Hôpital de Cayenne un système de recueil de données commun a été mis en place dans les CDPS. Ce recueil coordonné ne sollicite les partenaires qu'une seule fois. Ainsi chaque organisme reçoit les renseignements dont il a besoin à partir d'un tube et d'une fiche de renseignement unique. Le circuit est le

suivant : le CDPS envoie un tube et une feuille au LHUPM qui réalise à son niveau un contrôle du diagnostic précédemment fait par TDR grâce à un frottis mince et une goutte épaisse. Le LHUPM saisit également les données nécessaires à SpF pour sa surveillance à visée d'alerte. Le tube et la feuille sont alors transmis au CNR qui réalise les analyses biologiques requises en fonction du dossier en question.

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

Depuis 2021, nos données sont systématiquement croisées avec celles de SpF en Guyane de façon à compléter les données manquant à chacun et rendre le plus exhaustif possible le recueil des cas de paludisme diagnostiqués dans le système de soin en Guyane.

Tableau 2. Partenaires du Pôle Zones endémiques en Guyane: localisation, fréquence des liaisons avec Cayenne et niveau de participation à la surveillance biologique du paludisme en 2022.

Partenaires	Commune	Liaison (fréquences)	Nombre d'accès déclarés (SpF Guyane)	Isolats transmis au PZE	
				Nb	%
CH	Ouest Guyanais	Route (quotidienne)	3	3	100%
Poste de santé	Maripasoul a	Avion (quotidienne)	5	4	80%
Poste de santé	Grand- Santi	Avion (quotidienne)	3	1	33%
Poste de santé	Taluen	Pirogue + avion (occasionnelle)	2	0	0%
Centres de santé	Antecum Pata	Avion + pirogue (occasionnelle)	5	5	100%
CH	Cayenne	Routière (quotidienne)	11	9	82%
LBM Eurofins	CAY/RM/S TL	Routière (quotidienne)	3	0	0%
LBM Eurofins	Kourou	Routière (quotidienne)	4	4	100%
Centre de santé	Régina	Routière (hebdomadaire)	7	2	29%
Centre de santé	St Georges de l'Oyapack	Routière (bi- hebdomadaire)	6	2	33%
Centre de santé	Trois Sauts	Pirogue (occasionnelle)	2	0	0%
Total			51	30	59%

CH : Centre Hospitalier, LBM : Laboratoire de Biologie Médicale, Nb: nombre, PZE: pôle zones endémiques, SpF Guyane : Santé publique France en région Guyane. CAY: Cayenne, RM: Rémire-Montjoly, STL: Saint Laurent du Maroni

L'île de Mayotte

Les cas diagnostiqués sur l'île de Mayotte sont déclarés dans la base voozanoo par le CNR lui-même. Depuis début 2022, un correspondant local assure l'envoi des prélèvements de sang total sur tube EDTA (et non plus qu'un échantillon collecté sur papier buvard) vers l'Unité parasitologie et entomologie de l'IRBA afin de réaliser le phénotypage et le génotypage des souches liés aux résistances aux antipaludiques et la caractérisation des foyers de transmission émergents locaux.

En France métropolitaine

Les correspondants du Pôle Zones non Endémiques (ZNE) sont des correspondants hospitaliers métropolitains ou des départements régions d'outre-mer (DROM) : 72 correspondants réguliers notifient les cas de paludisme sur la base sécurisée Voozanoo : <https://cnr-palu.voozanoo.net/palu/#!>

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

Avant analyse, les données brutes de la base sont validées par l'identification et le traitement des doublons de déclaration, des doublons de transmission d'échantillons et la correction des incohérences. L'analyse des cas de paludisme d'importation en France, décrit le profil épidémiologique global des cas déclarés.

Tableau 3. Cas déclarés et cas estimés de paludisme en France métropolitaine, tendances évolutives 2013 -2022.

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
Nb de cas déclarés	2171	2299	2504	2450	2721	2840	2812	1005	2318	2811
Variation / année antérieure en %	17,0%	5,9%	8,9%	-2,2%	11,1%	4,4%	-1,0%	-64,3%	130,6%	21,3%
Hors CESPAs	2129	2246	2438	2436	2709	2823	2805	966	2284	2774
Hors CESPAs, variation / année antérieure en %	16,1%	5,5%	8,6%	-0,1%	11,2%	4,2%	-0,6%	-65,6%	136,4%	21,5%
Hors CESPAs, proportion de cas capturés par le réseau	51,1%	51,4%	51,4%	51,6%	52,0%	51,0%	50,7%	43,3%	45,2%	46,5%
Hors CESPAs correspondants constants	2025	2197	2403	2362	2541	2723	2669	913	2155	2621
Hors CESPAs correspondants constants variation en %/année n-1	14,3%	8,5%	9,4%	-1,7%	7,6%	7,2%	-2,0%	-65,8%	136,0%	21,6%
Nombre total de cas estimés	4210	4420	4810	4735	5220	5550	5540	2270	4995	6005
Nombre total de cas estimés variation / année antérieure	17,5%	5,1%	8,7%	-1,5%	10,3%	6,3%	-0,2%	-59,0%	120,0%	20,2%
Cas observés corrigés (enquête exhaustive)	4210									
Cas observés corrigés variation en % / total cas estimés	2,0									

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

En 2022, le nombre de cas de paludisme d'importation reportés par le réseau 2 811, estimé à environ 6 005 cas pour l'ensemble de la France métropolitaine, est en forte hausse par rapport à 2021 (+20%, Tableau 3). C'est la principale information pour cette année de surveillance. Cela est probablement dû en grande partie à la transmission du parasite qui se maintient à un niveau très élevé en Afrique sub-Saharienne. On observe en effet, depuis 2014, et de manière encore plus marquée depuis la crise Covid de 2020, que le nombre et l'incidence des cas de paludisme augmente en zone d'endémie africaine. La reprise des vols commerciaux en 2021 et 2022 vers ce continent et l'augmentation importante du nombre de cas de paludisme importés indique clairement que ce risque n'est pas maîtrisé par les mesures actuelles de prévention.

La proportion de cas capturés par le réseau du CNR, 46,5% en 2022, est en augmentation par rapport à 2021 (45,2%). Une enquête capture recapture est programmée depuis janvier 2022 pour aboutir en 2023, pour évaluer la représentativité de notre réseau de surveillance à partir de la base de données du PMSI. Cependant, en dépit des démarches entreprises depuis février 2022, nous n'avons pas encore obtenu l'accès à cette base.

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

Distribution des cas de paludisme à Mayotte

En 2022, 34 cas de paludisme ont été déclarés à Santé publique France et ont tous été adressés au CNR. soit 100% d'échantillons transmis, dont 33 cas de *P. falciparum* (1 *P. malariae*).

Les 34 cas déclarés étaient tous des cas importés en 2022: ces cas proviennent essentiellement des Comores (22 cas, 65%), de Madagascar (2 cas, 6%), et d'Afrique (10 cas, 29%, Tanzanie, Cameroun, Burkina-Faso, Gabon, Somalie et Congo RDC).

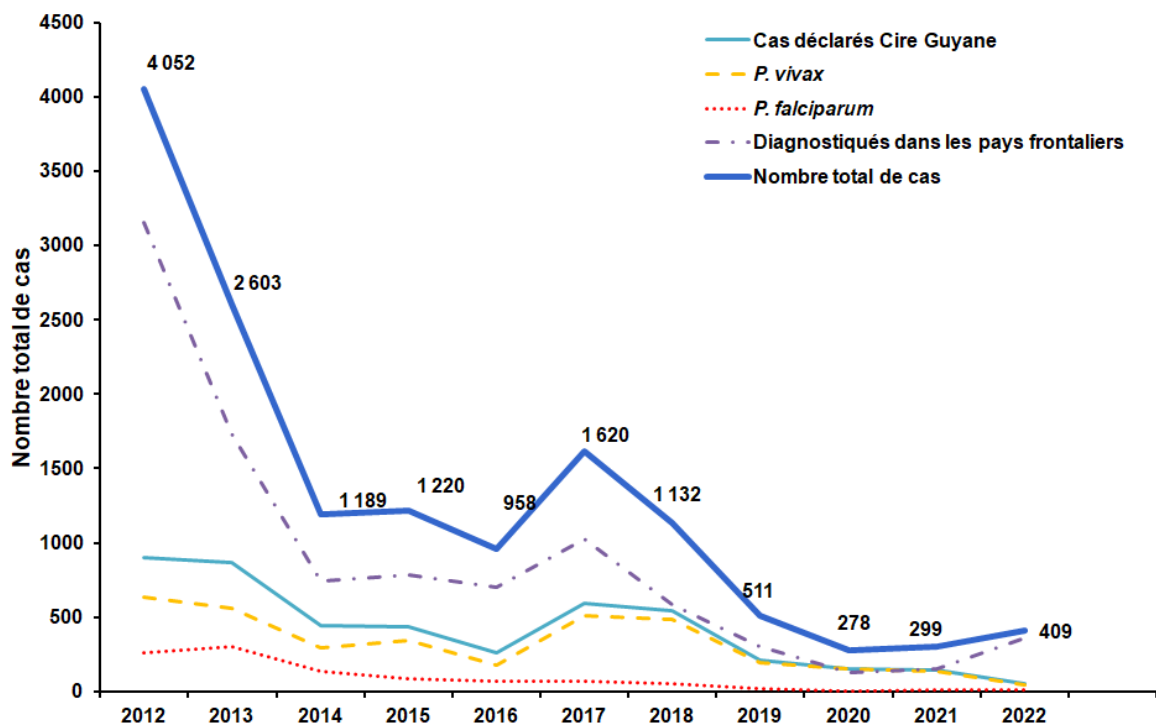
Les données épidémiologiques de Mayotte sont publiées régulièrement par la Cire Océan Indien. Le dernier en date retraçant l'historique 2021-2022 est disponible à l'adresse suivante : <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2023/surveillance-du-paludisme-a-mayotte.-bilan-de-la-surveillance-2021-2023>.

Distribution des cas de paludisme en Guyane

L'année 2022 a été marquée par une nouvelle baisse du nombre de cas de paludisme (n=51) (Figure 6). Cette baisse n'est pas liée à un défaut de déclaration puisque les données du CNR et de SpF en région ont été croisées. Il s'agit plutôt du bénéfice obtenu grâce aux projets de recherche opérationnelle tel que PALUSTOP ou MALAKIT et à l'attention particulière mise par les équipes de santé mobiles pour que l'ensemble des patients impaludés par *P. vivax* se voit prescrire de la primaquine.

Le paludisme à *P. falciparum* est en net recul ce qui est le signe d'une bonne prise en charge. Les cas sont essentiellement importés d'Afrique (n=9/10). Par contre, les patients infectés par *P. vivax* représentent 98% des cas autochtones.

En 2022, six patients ont été hospitalisés pour paludisme (trois au CH de Cayenne et trois au CH de Kourou) soit un pourcentage de cas hospitalisés 11,8%. Aucun ne présentait de signes de gravité.



(Source Santé publique France, Programmes Nationaux de lutte contre le paludisme, Brésil et Suriname).

Figure 6. Évolution du nombre de cas de paludisme en Guyane entre 2010 et 2022.

Distribution des cas de paludisme en France métropolitaine

Distribution des cas

Pour l'année 2022, un total de 2 832 cas de paludisme a été déclaré au CNR du paludisme par les correspondants du réseau. Parmi ces cas, 14 sont déclarés par des correspondants hors métropole, et 7 sont à transmission autochtone, probables ou confirmés et donc exclus de l'analyse. Ainsi 2811 cas, correspondant à des cas importés en France métropolitaine, sont analysés dans ce rapport. On distingue trois profils épidémiologiques, 2134 (75,9%) voyageurs civils, 190 (6,8%) voyageurs résidents en zone d'endémie palustre et 37 (1,3%) militaires en opérations extérieures. Dans 16% des cas, la nature de séjour n'était pas renseignée (Figure 7)

Les analyses des cas possiblement acquis sur le territoire métropolitain montrent qu'il s'agissait, de quatre cas d'origine probablement aéroportuaire et de trois cas dont l'étiologie reste incertaine (cryptiques).

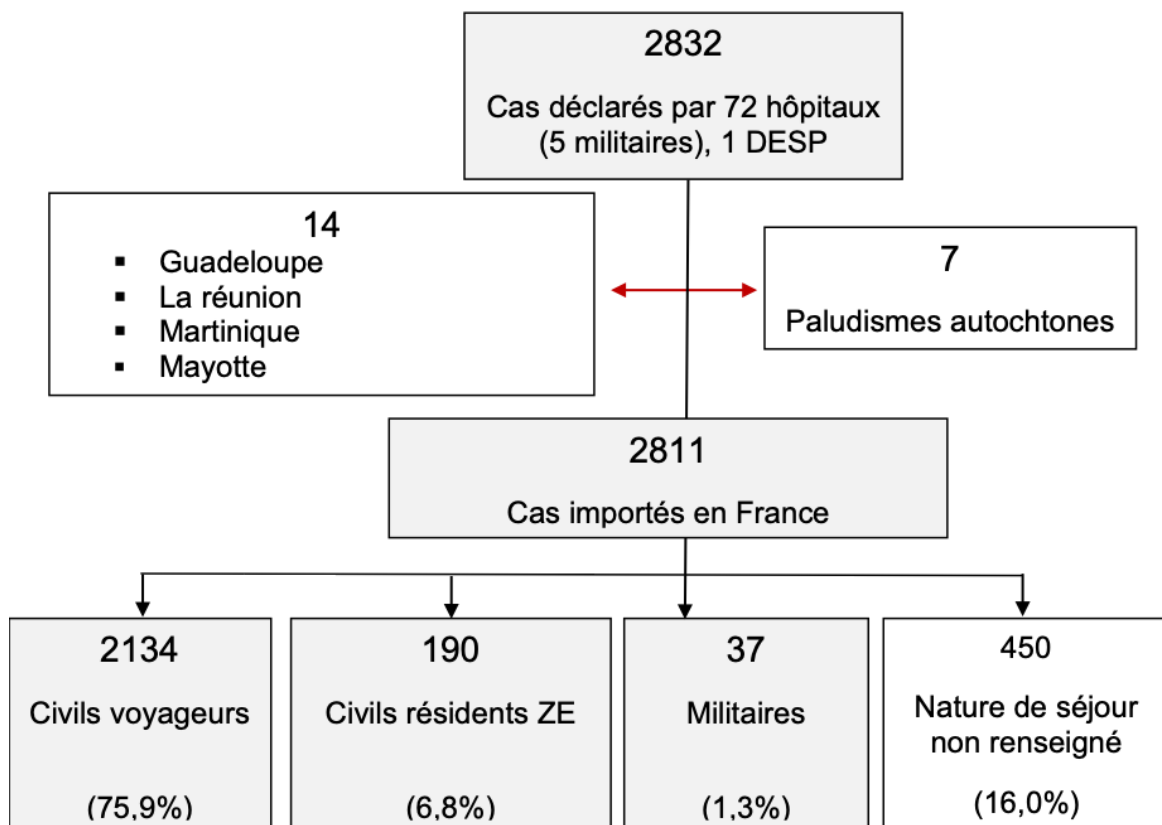


Figure 7. Distribution des cas de paludisme déclarés par les correspondants du réseau du CNR du Paludisme en France métropolitaine en fonction des trois grands profils épidémiologiques pour l'année 2022, N=2832.

Evolution annuelle des cas

Sans tenir compte des cas non renseignés, la proportion des populations en 2022 était de 90,4%, 8,1% et 1,6% pour respectivement les civils voyageurs, les civils résidents en zone d'endémie palustre et les militaires, contre 85,6%, 10,9% et 3,5% en 2021 (Figure 8). Il peut s'agir de fluctuations annuelles ou de changements politiques exerçant une influence sur les séjours dans les zones endémiques. En particulier la dégradation de la situation politique entre la France et le Mali ou la République Centrafricaine.

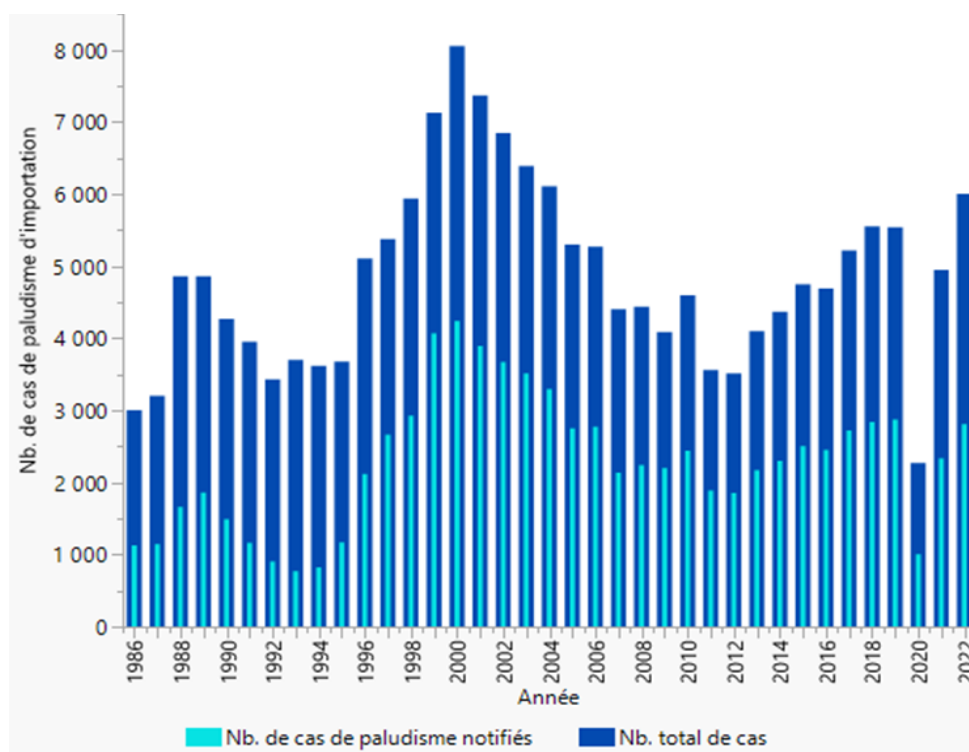


Figure 8. Evolution du paludisme d'importation, cas déclarés, cas estimés, France métropolitaine 1986 à 2022.

Principales caractéristiques de la population

Le profil type d'un patient avec un paludisme d'importation est celui d'un homme adulte, d'origine Africaine, de retour d'un voyage de plus de deux semaines dans son pays d'origine pour visiter la famille ou les amis, sans prise de chimioprophylaxie (Tableau 4 et chapitres spécifiques).

Tableau 4. Principales caractéristiques des patients avec un cas de paludisme déclaré dans la base du CNR du paludisme de 2018 à 2022.

	2018		2019		2020		2021		2022	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Sexe										
Femme	1125	39,6%	1169	41,6%	348	34,6%	921	39,7%	1068	38,0%
Homme	1717	60,4%	1641	58,4%	657	65,4%	1397	60,3%	1743	62,0%
Total	2842	100,0%	2810	100,0%	1005	100,0%	2318	100,0%	2811	100,0%
Age (ans)										
<2	23	0,8%	33	1,2%	7	0,7%	32	1,4%	31	1,1%
2 à 14	318	11,2%	266	9,5%	44	4,4%	243	10,5%	344	12,2%
15 à 59	2215	77,9%	2192	78,0%	827	82,3%	1817	78,4%	2121	75,5%
>=60	287	10,1%	319	11,4%	127	12,6%	225	9,7%	314	11,2%
Total	2843	100,0%	2810	100,0%	1005	100,0%	2317	100,0%	2810	100,0%
Origine										
Africain	2125	85,5%	2231	88,1%	705	74,8%	1422	87,6%	2333	87,8%
Caucasien	333	13,4%	278	11,0%	219	23,2%	187	11,5%	279	10,5%
Asiatique	11	0,4%	7	0,3%	2	0,2%	7	0,4%	13	0,5%
Autre	17	0,7%	16	0,6%	16	1,7%	8	0,5%	32	1,2%
Total	2486	100,0%	2532	100,0%	942	100,0%	1624	100,0%	2657	100,0%

Répartition des cas en fonction de l'âge, du sexe et de l'origine Africaine ou Caucasienne

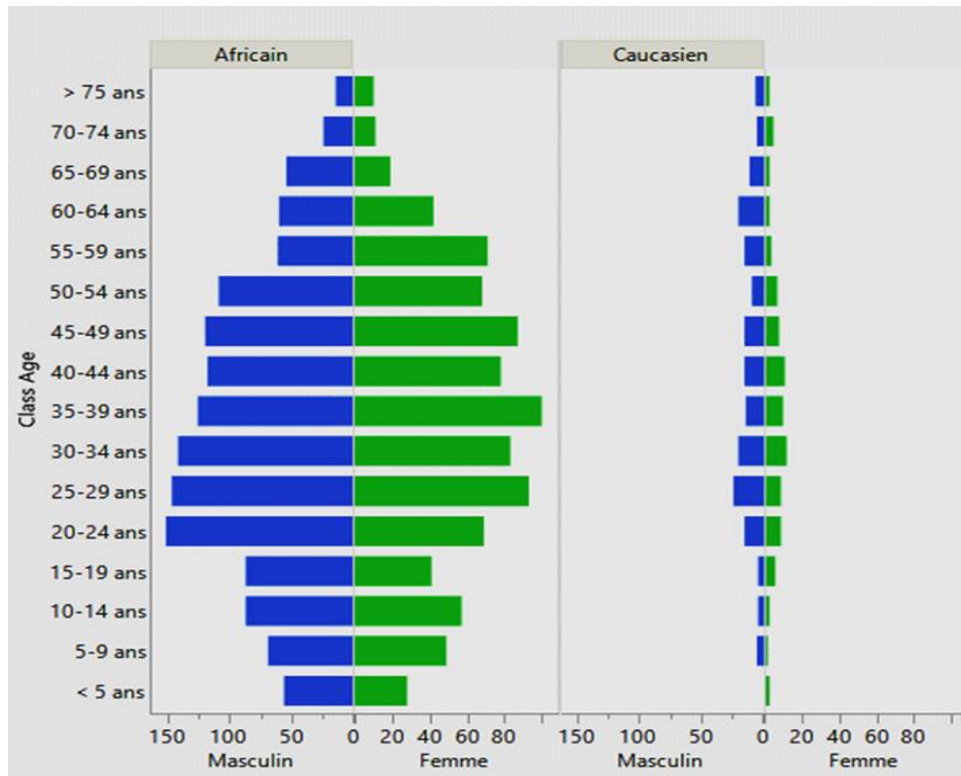


Figure 9. Répartition des cas de paludisme importés par âge et par sexe en fonction de l'origine africaine ou caucasienne, CNR du paludisme, France métropolitaine, année 2022, n = 2811.

Distribution mensuelle des cas

La distribution des cas de paludisme d'importation pour l'année 2022 montre comme à l'accoutumé, une forte saisonnalité pour *P. falciparum* avec un petit pic en hiver et un grand pic en été associés aux vacances de fin d'année et d'été (Figure 10).

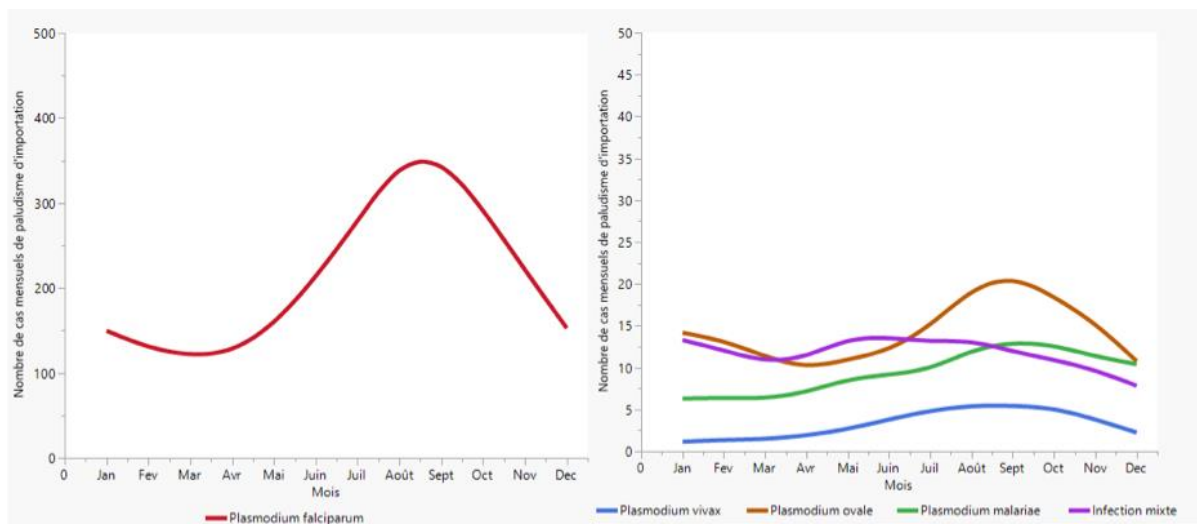


Figure 10. Distribution mensuelle des cas de paludisme par espèce plasmodiale, France métropolitaine, 2022.

Distribution des cas et des espèces plasmodiales

En 2022, les cas concernent principalement les sujets d'origine africaine (88,9%), résidant en France ou arrivant d'Afrique, stable par rapport à 2021 (87,6%) et ils sont dus en majorité à l'espèce *P. falciparum* (88,2%), stable par rapport à 2021 (88,9%, Figure 11). La répartition des autres espèces varie peu. Aucun cas à *Plasmodium knowlesi* n'a été rapporté par le réseau en 2022. La pyramide des âges est comme à l'habitude très déséquilibrée entre les sujets

d'origine caucasienne et africaine. La proportion des femmes et celle des enfants est plus marquée pour les sujets d'origine africaine, en rapport avec la typologie des voyageurs : une majorité de sujets visitant la famille et les amis (VFR) (voyage en famille d'une durée souvent supérieure à 3 semaines).

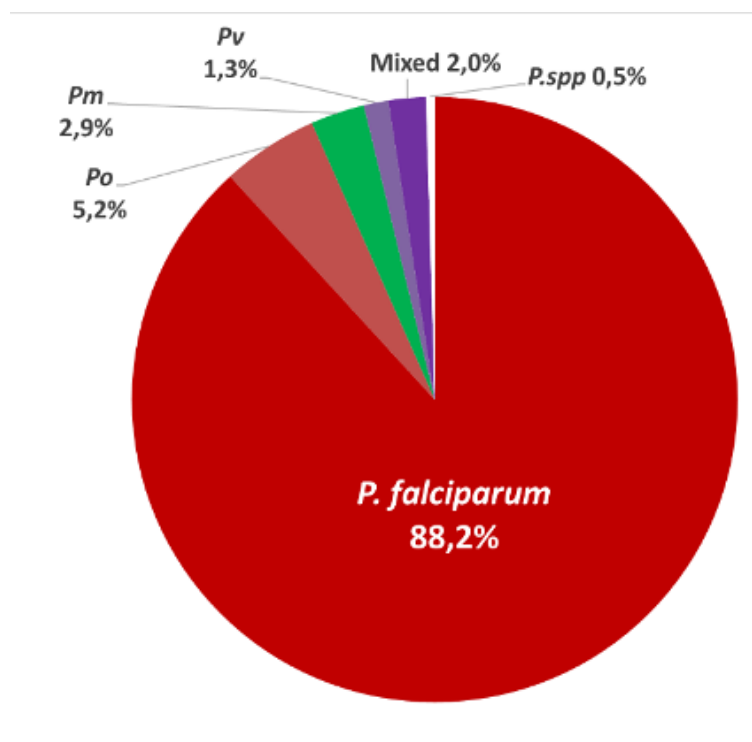


Figure 11. Proportion par espèce identifiée en 2022, n=2811, France métropolitaine.

Pays de contamination

Les pays de contamination sont toujours majoritairement situés en Afrique subsaharienne, 99,2% en 2022 (99,5% en 2021).

En 2022, les 4 principaux pays à l'origine des cas (environ 62 % des cas) étaient, comme à l'habitude, la Côte d'Ivoire (n=677), le Cameroun (n=529), la Guinée (n=247) et le Mali (n=191).

Les cas en provenance des Comores sont en nette augmentation (n=98, 3,7%) par rapport à 2021 (n=28, 1,2%). Deux cas sont signalés au retour de Mayotte (1 touriste et un militaire). Aucun cas importé de Mayotte n'avait été signalé par notre réseau ces cinq dernières années.

En 2022, les cas en provenance de Djibouti ont fortement diminué n=4 (0,15% des cas) après une forte progression entre 2019 et 2021 : n=7 en 2019 (0,3% des cas), n=17 en 2020 (1,8% des cas) et n=19 en 2021 (0,8% des cas).

Chimioprophylaxie

La variable "chimioprophylaxie" est complétée dans 2186 cas (78%). Dans 1733 cas (80%) le patient déclare n'avoir pris aucun médicament pour prévenir le paludisme. Lorsque les patients allèguent avoir pris une chimioprophylaxie, seuls 87/453 patients (19%) déclarent l'avoir correctement suivie. Dans 27/87 cas (30%) l'espèce en cause n'est pas *P. falciparum*, mais *P. ovale* (n=15), *P. vivax* (n=4) ou *P. malariae* (n=8) qui échappent souvent à la chimioprophylaxie.

Répartition des cas en fonction de l'origine Africaine ou Caucasienne

Après l'épisode de 2020 et la restriction des voyages imposé par la pandémie Covid 19 (augmentation marquée de la proportion des sujets d'origine caucasienne), les chiffres des sujets d'origine africaine repartent à la hausse en nombre et en proportion en 2021, confirmé en 2022 (Figure 12).

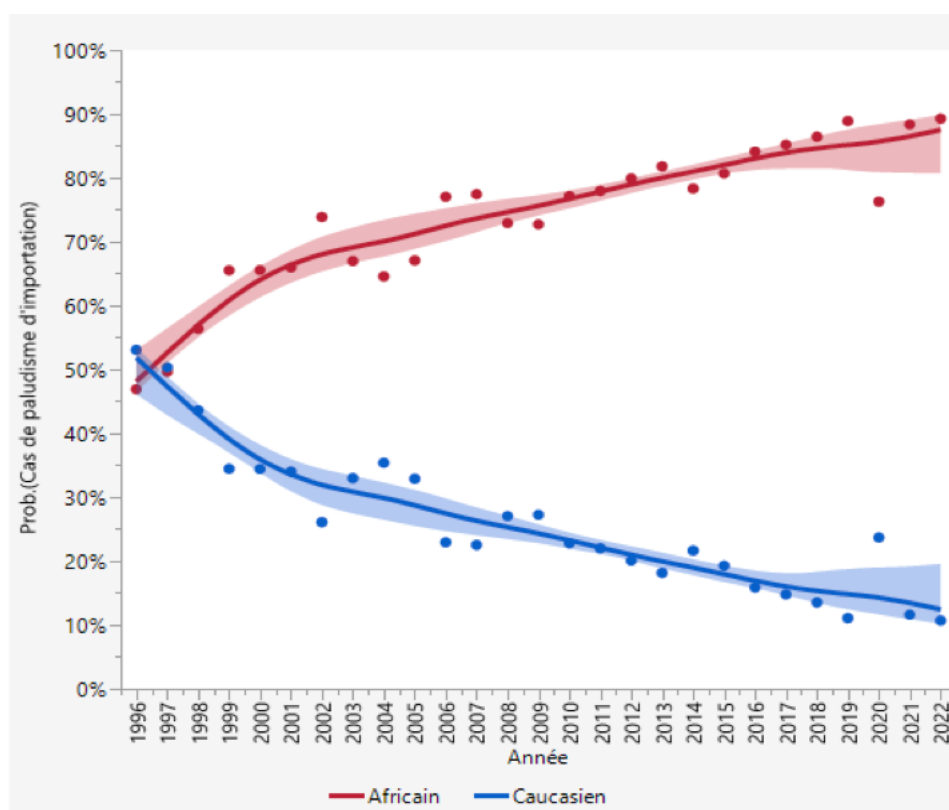


Figure 12. Evolution annuelle des proportions de paludisme d'importation des sujets d'origine africaine (en rouge) et caucasienne (en bleu) entre 1996 et 2022.

Traitement curatif de l'accès

Accès simples

Les traitements de première intention sont majoritairement des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine respectant ainsi les recommandations françaises de 2017. L'association arténimol-pipéraquine est en première place, probablement en raison de modalités de prise plus faciles que l'artémether-luméfantrine (Tableau 5).

Tableau 5. Traitement curatif en première intention des accès palustres simples, France métropolitaine, 2022.

Médicament curatif première intention	< 15 ans		≥ 15 ans	
	N	%	N	%
Arténimol + pipéraquine	164	58,8%	1203	69,4%
Artemether + Luméfantrine	90	32,3%	274	15,8%
Atovaquone + Proguanil	5	1,8%	102	5,9%
Chloroquine	8	2,9%	36	2,1%
Quinine per os	0	0,0%	5	0,3%
Quinine IV	1	0,4%	52	3,0%
Artésunate IV	7	2,5%	40	2,3%
Autre	4	1,4%	22	1,3%
Total	279		1734	

Accès graves

Sans surprise, c'est l'artésunate qui est le plus utilisé en première intention, presque 80% chez les enfants comme chez les adultes. Cependant, dans 20% des cas chez les enfants et 16% des cas chez les adultes, c'est un traitement per os qui est instauré. Le médicament choisi est très majoritairement un ACT, ce qui s'explique pour des patients qui vont bien, pas d'autre signe de gravité que l'hyperparasitémie. Avec très peu de passage secondaire à la voie intraveineuse (Tableau 6, une analyse spécifique est en cours).

Tableau 6. Traitement curatif en première intention des accès palustres graves, France métropolitaine, 2022.

Médicament curatif première intention	< 15 ans		≥ 15 ans	
	N	%	N	%
Artésunate IV	35	79,5%	306	77,5%
Arténimol + pipéraquline	4	9,1%	44	11,1%
Artemether + Lumefantrine	3	6,8%	14	3,5%
Atovaquone + Proguanil	2	4,5%	7	1,8%
Quinine IV	0	0,0%	19	4,8%
Autre	0	0,0%	5	1,3%
Total	44		395	

Accès palustres graves

En 2022, le nombre et la proportion des formes graves, 474 (17,6%), resté élevé, du même ordre en proportion qu'en 2021 (n=390, 17,1%, Figure 13, Figure 14). L'espèce est connue pour tous les patients. Il s'agit de *P. falciparum* seul ou avec la présence d'autres espèces plasmodiales dans 470 cas (99,2 %) inchangé par rapport à 2021. Dans 2 cas il s'agissait *P. vivax* seul (un cas avec Hb<7g/l, un cas avec choc et hyperlactatémie), dans 1 cas de *P. ovale* seul (bilirubinémie isolée >50* μ mol/l) et dans 1 cas de *P. malariae* seul (obnubilation et doute avec *P. falciparum*). La parasitémie à J0 est connue pour 442 patients avec une infection par *P. falciparum* (94%). Elle est de 4,95% en médiane avec des extrêmes allant de 0,01% à 31,5%.

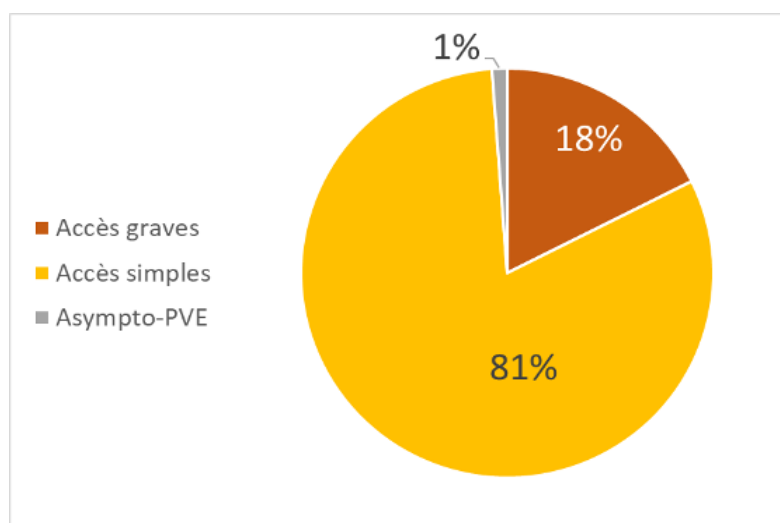


Figure 13. Répartition par type d'accès en 2022, n=2692 France métropolitaine.

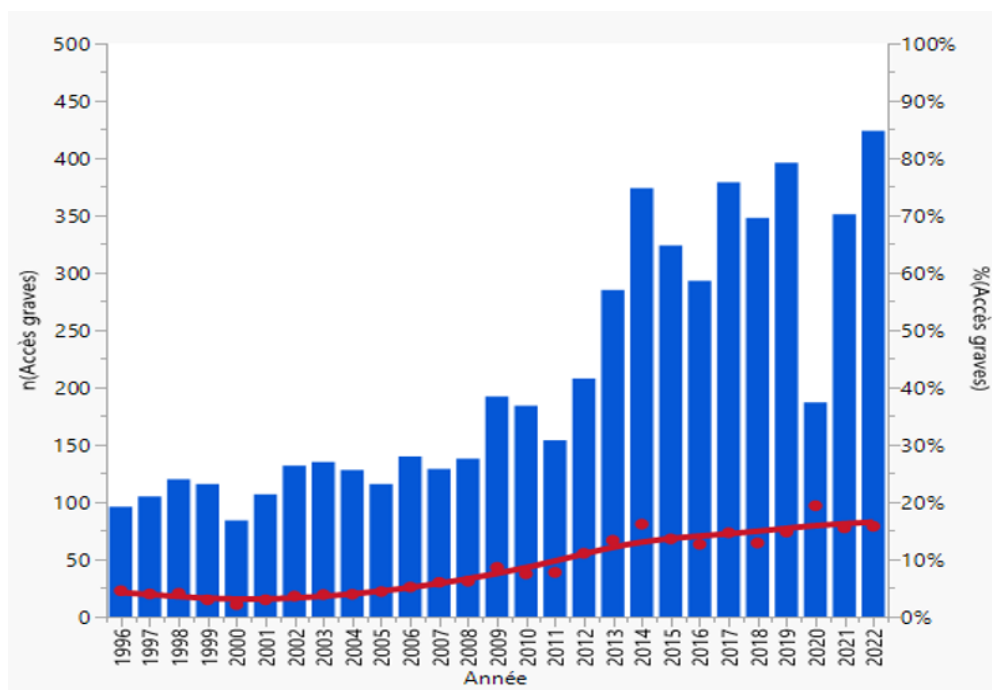


Figure 14. Évolution des cas graves de paludisme d'importation, cas barres bleues et proportion points rouges, France métropolitaine, 1996-2022.

Décès

Deux décès ont été notifiés en 2022, soit une létalité globale de 0,7 pour mille et de 4,2 pour mille pour les formes graves, marquant ainsi une très forte baisse par rapport aux années précédentes et avec 2021, 8 décès (3,4 pour mille de létalité globale et 20,5 pour mille pour les accès graves). Une des explications pour les décès étant le retard au diagnostic, les différentes alertes lancées par le CNR paludisme en 2021 et 2022 concernant une augmentation de ce risque du fait de la focalisation des soignants sur le risque Covid a peut-être eu l'impact positif escompté.

3.3. Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Chimiosensibilité *in vitro* mandature 2017-2022

En 2022, la chimiosensibilité *in vitro* de 402 isolats de *Plasmodium falciparum* a été déterminée vis-à-vis d'au moins un antipaludique (chloroquine, monodéséthylamodiaquine, quinine, méfloquine, luméfantine, dihydroArtémisinine (DHA), pipéraquline, pyronaridine ou doxycycline) par incorporation d'hypoxanthine tritiée ou par un test ELISA. Les données portent sur la totalité de ces isolats car très peu ont été soumis à une pression médicamenteuse par auto-traitement ou chimioprophylaxie avant prélèvement.

Le Tableau 7 présente les seuils de résistance appliqués à l'étude de la sensibilité des isolats aux antipaludiques ainsi que le pourcentage d'isolats ayant montré des CI_{50} (concentration inhibant 50% de la croissance parasitaire) supérieures aux seuils.

Tableau 7. seuils de chimiosensibilité et répartition des isolats testés en fonction de leur CI_{50} aux antipaludiques.

Molécule antipaludique	Nombre d'isolats 2022*	Seuil de résistance	% d'isolats avec une CI_{50} > seuil				Références
			2017	2019-20	2021	2022	
Chloroquine	396	110 nM	14,3%	16,6%	50,9%	10,86%	Dedet et al., 1988
Amodiaquine	375	60 nM	2,8%	13,5%	22,3%	13,6%	Ringwald et al., 1998
Quinine	383	800 nM	1,3%	1,47%	0,9%	1,31%	Basco & Le Bras, 1994
Méfloquine	386	40 nM	47%	14,2%	39,8%	41,97%	Brasseur et al., 1990
Luméfantine	325	150 nM	0%	0%	0%	0,92%	Pradines et al., 1999
DHA	397	12 nM	0,8%	0,2%	0%	0,25%	Basco & Le Bras, 1993
Pyronaridine	128	60 nM	3,2%	0,9%	-	0,78%	Pascual et al., 2015
Pipéraquline	397	90 nM	0%	0,4%	2,8%	0,25%	Amato et al., 2017
Doxycycline	402	35 μ M	6,5%	7,9%	15,2%	9,45%	Briolant et al., 2009

Le nombre d'échantillons de sensibilité diminuée aux antipaludiques est resté stable entre 2017 et 2022 pour la quinine, la pyronaridine et la dihydroartémisinine. En revanche une diminution de la sensibilité a été constatée pour l'amodiaquine, la chloroquine, la pipéraquline, la doxycycline et la méfloquine, les valeurs sont donc stables en faisant abstraction des résultats de 2021 qui ne correspondaient qu'aux données de l'IRBA. Le pourcentage d'isolats présentant une diminution de sensibilité à la méfloquine reste élevé, la surveillance accrue à cette molécule doit être poursuivie. Les premiers isolats présentant une diminution de sensibilité à la luméfantine ont été répertoriés, ce phénomène devra être surveillé les années suivantes.

Les CTA étant utilisés en première ligne en France pour traiter les cas de paludisme non compliqués, une analyse croisée des CI_{50} à la DHA versus pipéraquline (Figure 15) ou versus amodiaquine (Figure 15) a été réalisée : aucun isolat ne présente de diminution de sensibilité croisée aux antipaludiques impliqués dans les CTA. Sur les 3 isolats présentant une CI_{50} élevée à la luméfantine, les valeurs de la CI_{50} à la DHA sont restées en dessous de 1 nM, le graphique n'a pas été représenté pour cette étude.

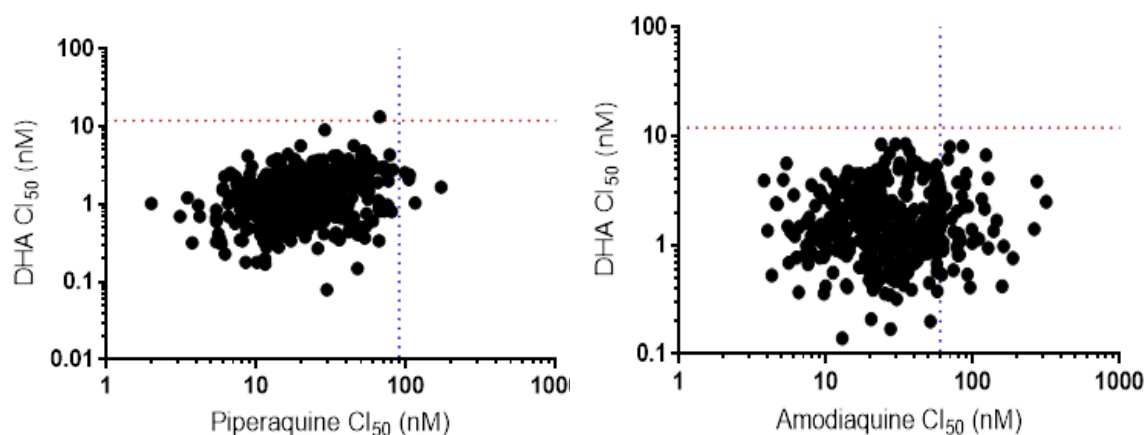


Figure 15. Répartition croisée des CI_{50} DHA/Pipéraquline et DHA/Amodiaquine.

Répartition des isolats cliniques en fonction des valeurs de CI_{50} de la pipéraquline (en abscisse) et des valeurs de CI_{50} de la DHA (en ordonnées). Le trait en pointillé rouge représente le seuil de résistance à la DHA (12nM) et le trait en pointillé bleu le seuil de résistance à la pipéraquline (90 nM).

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

Etant donné les similitudes des molécules de la chloroquine, de l'amodiaquine, de la méfloquine et de la pipéraquline, une analyse des répartitions croisées des CI_{50} par rapport à la chloroquine a été effectuée. En 2022, 4,39% des isolats présentaient une CI_{50} au-dessus des seuils de résistance à la fois pour la chloroquine et l'amodiaquine, quant à la chloroquine/méfloquine, le pourcentage était de 5.25% en 2022 (Figure 16) et 0,85% pour chloroquine/pipéraquline (Figure 16).

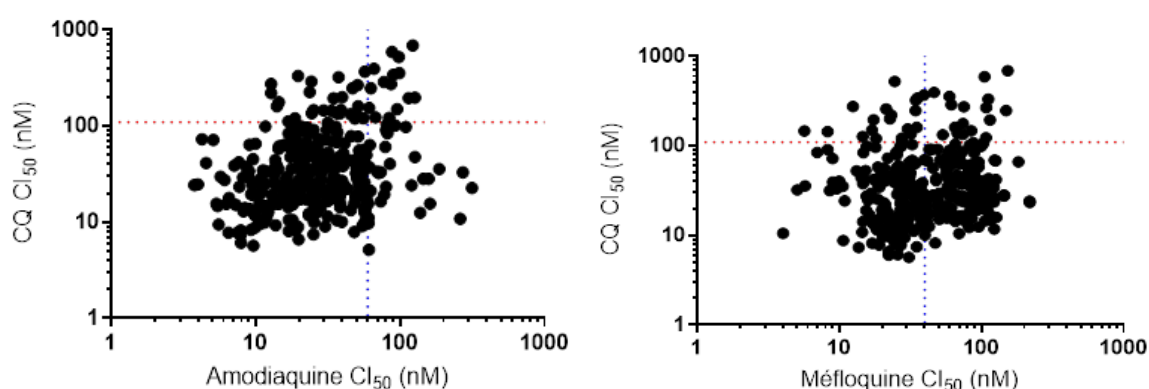


Figure 16. Répartition croisée des CI_{50} Chloroquine/Amodiaquine et Chloroquine/Méfloquine en 2022.

Répartition des isolats cliniques en fonction des valeurs de CI_{50} de l'amodiaquine (en abscisse) et des valeurs de CI_{50} de la chloroquine (CQ) (en ordonnées, Figure 16). Le trait en pointillé rouge représente le seuil de résistance à la CQ (110 nM) et le trait en pointillé bleu le seuil de résistance à l'amodiaquine (60 nM).

Répartition des isolats cliniques en fonction des valeurs de CI_{50} de la méfloquine (en abscisse) et des valeurs de CI_{50} de la chloroquine (CQ) (en ordonnées, Figure 16). Le trait en pointillé rouge représente le seuil de résistance à la CQ (110 nM) et le trait en pointillé bleu le seuil de résistance à la méfloquine (40 nM).

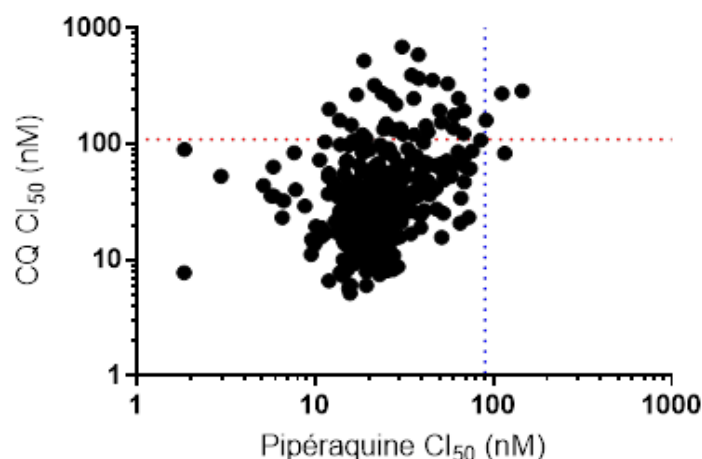


Figure 17. Répartition croisée des CI_{50} de la Chloroquine et de la Pipéraquline en 2022.

Répartition des isolats cliniques en fonction des valeurs de CI_{50} de la méfloquine (en abscisse) et des valeurs de CI_{50} de la chloroquine (CQ) (en ordonnées, Figure 17). Le trait en pointillé rouge représente le seuil de résistance à la CQ (110 nM) et le trait en pointillé bleu le seuil de résistance à la pipéraquline (90 nM).

Enfin, en 2022 : 402 isolats ont pu être analysés avec la doxycycline. Le nombre d'isolats présentant des $CI_{50} > 35 \mu\text{M}$ en 2022 (9,45%) est en diminution et similaire aux années précédant 2021 (Figure 18).

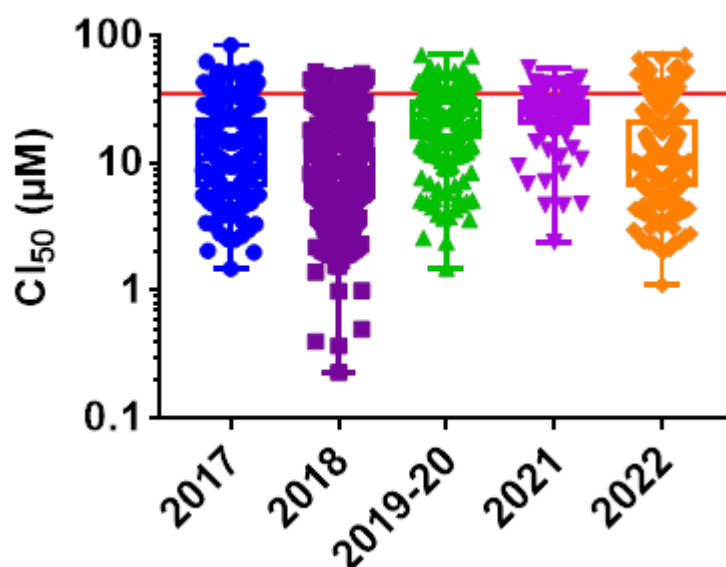


Figure 18. Evolution des chimiosensibilités à la doxycycline en 2017 et 2022

2017 n° : 310 ; 2018 n° : 430 ; 2019-20 n°508 ; 2021 n° : 112 ; 2022 n° : 402
La ligne rouge représente le seuil de résistance à 35 μM (Briolant et al., 2009).

Surveillance moléculaire de la résistance aux antipaludiques : Génotypage des isolats

En 2022, les études de génotypage ont porté sur 892 isolats pour lesquels au moins un marqueur moléculaire de résistance a été analysé. Les analyses statistiques ont été réalisées en gardant uniquement les isolats pour lesquels on avait la donnée du pays de contamination soit 830 isolats.

La mutation 76 du gène *pfcr* : résistance à la chloroquine

En 2022, parmi les 619 isolats génotypés pour *pfcr*, la proportion d'isolats sauvages *pfcr*76 est de 84,5% (79.7% en 2021, 78% en 2019-2020, 79,5% en 2018, 71,6% en 2017, 66,3 en 2016, 64,7% en 2015, 59,9% en 2014, 54,8% en 2013, 52,5% en 2012, 44,4% en 2011, 50,5% en 2010, 43,1% en 2009, 43,2% en 2008). Ces résultats montrent l'atteinte d'un plateau depuis 2018 suite à la diminution de la proportion de souches résistantes à la chloroquine au cours des années précédentes.

Le Bénin (42%), la Guinée (42%), le Sénégal (40%) et le Congo (31%) présentent encore de fortes proportions d'isolats mutés (**Tableau 2**).

Tableau 8. Proportion de souches sauvages *pfcr1* (K76T) par année et par pays ayant un effectif représentatif en 2022.

Pays	2016	2017	2018	2019-2020	2021	2022
Bénin	31%	21%	57%	43%	42%	58%
Burkina-Faso	86%	85%	93%	100%	100%	100%
Cameroun	74%	82%	89%	94%	97%	99%
Comores	67%	86%	100%	98%	94%	100%
Congo	37%	44%	44%	51%	57%	69%
Côte d'Ivoire	82%	82%	92%	92%	90%	91%
Gabon	50%	60%	61%	73%	90%	96%
Guinée	31%	29%	36%	41%	42%	58%
Mali	67%	65%	77%	73%	80%	74%
Nigéria	79%	54%	75%	71%	56%	86%
RCA	91%	97%	97%	98%	96%	100%
Sénégal	63%	38%	54%	67%	42%	60%
Tchad		77%	89%	61%	67%	72%
Togo	75%	86%	95%	84%	100%	93%
Afrique	72%	80%	80%	80%	80%	85%

La mutation du gène *pfmdr1* : résistance à la méfloquine et à la luméfantine

Parmi les 914 isolats génotypés pour *pfmdr1* en 2022, la proportion d'isolats sauvages *pfmdr1* est de 93% pour le codon 86, de 45% pour le codon 184 et de 98% pour le codon 1246.

La proportion d'haplotypes N86-184F (sélectionnés dans les cas de résistance à l'association artéméter-luméfantine) est de 61% en 2022 (55% en 2021, 52% en 2019-2020, 48% en 2018 et 57% en 2017). La prévalence de cet haplotype est très faible aux Comores (2%) et au Congo (30%) (Pays ayant un effectif représentatif) (Tableau 9).

La proportion d'haplotypes 86Y-Y184 (sélectionnés dans les cas de résistance à l'association dihydroartémisinine-pipéraquline) est de 3% en 2022 (2% en 2021, 3% en 2019-2020, 4% en 2018 et 1,5% en 2017). Cet haplotype est essentiellement identifié aux Comores (27%), au Congo (6%), en Côte d'Ivoire (2%), au Tchad (2%) et au Cameroun (1,3%) en 2022 (Tableau 9).

Quinze isolats (1,8%) sont mutés en position 1246 (D1246Y) en 2022 et proviennent des Comores (18,2% de l'ensemble des isolats des Comores), de Côte d'Ivoire (1,4%), du Cameroun (0,7%) et du Gabon (3,2%).

Tableau 9. Proportion de souches ayant un haplotype N86-184F ou 86Y-Y184 *pfmdr1* par année et par pays ayant un effectif représentatif en 2022.

Pays	2017		2018		2019-2020		2021		2022	
Bénin	50%	0%	65%	0%	57%	2,5%	50%	0%	68%	0%
Burkina-Faso	75%	0%	61%	0%	80%	0%	67%	0%	83%	0%
Cameroun	54%	2,5%	52%	3%	59%	0,5%	59%	0%	50%	1,3%
Comores	18%	0%	2%	26%	7%	30%	7%	21%	2%	27%
Congo	38%	4%	37%	8%	37%	4%	70%	0%	30%	6%
Côte d'Ivoire	61%	0%	58%	1%	60%	0%	67%	2%	73%	2%
Gabon	50%	0%	38%	2%	46%	0%	52%	0%	58%	0%
Guinée	51%	0%	43%	4%	56%	1%	72%	0%	57%	0%
Mali	52%	0%	46%	8%	70%	0%	55%	0%	71%	0%
Nigéria	60%	0%	75%	0%	62%	0%	56%	0%	78%	0%
RCA	77%	0%	60%	0%	35%	15%	52%	0%	84%	0%
Sénégal	67%	0%	53%	0%	66%	0%	60%	10%	57%	0%
Tchad	56%	0%	45%	0%	41%	0%	31%	0%	67%	2%
Togo	68%	0%	54%	0%	71%	0%	50%	0%	57%	0%
Afrique	57%	1,5%	48%	4%	52%	3%	55%	2%	61%	3%

La proportion de copies de *Pfmdr1* (impliqué dans la résistance à la méfloquine) est de 88% pour une copie et de 12% pour 2 copies. La présence de 2 copies de *Pfmdr1* au Bénin (11,8% de l'ensemble des isolats du pays), au Cameroun (12,2%), au Congo (9,5%), en Côte d'Ivoire (10,2%), au Gabon (16,7%), en Guinée (14%), au Mali (19,6%), au Nigéria (16,7%), en Sierra Leone (20%), au Tchad (22,7%) et au Togo (12,5%).

Les mutations du gène *pfdhfr* : résistance aux antifoliques

En 2022, l'étude du gène *pfdhfr*, impliqué dans la résistance au proguanil et à la pyriméthamine, a été réalisée pour 367 isolats de *P. falciparum*. La proportion d'isolats triple mutés *pfdhfr* N51I, C59R, S108N (IRN) est de 86% en 2022 (93% en 2021, 96% en 2019-2020, 87% en 2018 et 85% en 2017). Les proportions d'isolats avec des triples mutations (S108N, N51L et C59R) sont relativement stables et élevées depuis 2008 (> 80%). Les isolats totalement sauvages NCS ne représentent que 2,2% des échantillons en 2022 (2,9% en 2021, 3,4% en 2019-2020). Les isolats des Comores présentent une proportion de souches triples mutées (IRN) relativement faible en 2022 (37,5%) (66% en 2021, 96% en 2019-2020, 37% en 2018) (il n'est plus détecté en 2022 et 2021 de souches totalement sauvages NCS aux Comores).

Polymorphisme du gène *K13-propeller*

En 2022, le gène *K13* impliqué dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine, a été séquencé pour 806 isolats de *P. falciparum*. Un seul échantillon a présenté une mutation (A578S, Comores) mais qui n'est pas considérée comme associée à une diminution de sensibilité aux dérivés de l'artémisinine.

Nombre de copies du gène codant la plasmepsine 2

La proportion de copies de *Pfmp2* (impliqué dans la résistance à la pipéraquline) est de 90% pour une copie et de 10% pour 2 copies. La présence de 2 copies de *Pfmp2* au Bénin (6% de l'ensemble des isolats du pays), au Burkina-Faso (14,2%), au Cameroun (120%), en République de Centrafrique (14,2%), au Comores (16,7%), au Congo (14,3%), en Côte d'Ivoire (8,6%), en Guinée (10,8%), au Mali (15,2%), au Sénégal (27,3%), au Tchad (9,1%) et au Togo (12,5%).

Evolution des génotypes en 2022

Au cours de ces dernières années, la proportion d'isolats sauvages pour la mutation *pfcr76* a progressé passant de 35% en 2006 à 85% en 2022. La diminution de la pression médicamenteuse dans les pays d'endémie africains avec l'utilisation des combinaisons thérapeutiques de dérivés d'artémisinine en première ligne de traitement en est l'explication la plus probable. Cependant, de fortes proportions d'isolats mutés restent observées dans un certain nombre de pays comme le Bénin (42%), la Guinée (42%), le Sénégal (40%) et le Congo (31%).

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

L'haplotype 86Y-Y184 (sélectionné dans les cas de résistance à l'association dihydroartémisinine-pipéraquline) est principalement identifié Comores, au Cameroun, en Côte d'Ivoire et au Gabon mais n'est pas associé à la mutation en position 1246. Ces données montrent qu'il est nécessaire de maintenir une surveillance accrue de la prévalence des différents marqueurs moléculaires de résistance.

86% des isolats sont triple-mutés sur *pfdhfr* (S108N, N51I, C59R) impliquant une résistance élevée à la pyriméthamine. Les isolats totalement sauvages NCS ne représentent plus que 2,2% des échantillons en 2022. Seuls les isolats des Comores présentent une proportion de souches triples mutées (IRN relativement faible 37,5%) mais il n'est plus détecté depuis 2021 de souches totalement sauvages NCS aux Comores.

Les mutations du gène K13 impliquées dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine en Asie du Sud-est ne sont pas détectées sur les souches africaines. Il est nécessaire de surveiller particulièrement la prévalence de ces marqueurs en Afrique pour anticiper l'émergence de la résistance à l'artémisinine en Afrique et d'identifier de nouveaux marqueurs pouvant être impliqués.

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

En 2022, le profil de résistance à onze molécules de *P. falciparum* a été déterminé selon la technique du semi-microtest isotopique et du test de survie pour la sensibilité à la pipéraquline et la dihydroartémisinine pour quatre des cinq isolats testés sur les huit reçus en 2022.

Ces analyses n'ont pas mis en évidence de résistance particulière, ces quatre prélèvements étaient en provenance d'Afrique. Pour une analyse plus précise des tendances observées en Guyane ces dernières années, l'annexe 8 présente les résultats par antipaludique.

Sur 155 isolats testés vis-à-vis de la dihydro-artémisinine, 8,3% IC95 [4,0 – 12,8] étaient résistants avec un seuil fixé à 2% de survie. Aucune mutation *pfK13* n'a été observée, même chez les phénotypes au-dessus du seuil (compris entre 2 et 5% de survie). Pas d'inquiétude particulière à ce jour concernant cette molécule.

Sur 131 isolats testés, 39,7% IC95 [31,3 – 48,1] se sont avérés résistants à la pipéraquline. Les isolats résistants ont été responsables de quatre cas d'échec thérapeutique sur sept patients traités. Des études plus approfondies ont permis de mettre en évidence une association significative avec la présence de la mutation pfcr C350R ($p < 0.001$, Figure 19). Sur la base de la présence de cette mutation, une étude rétrospective a été conduite et a permis de montrer que la résistance à la pipéraquline en Guyane a commencé à être sélectionnée en 2002 et est aujourd'hui présente sur les trois pays du plateau des Guyanes, Guyana, Suriname et Guyane. **Compte tenu de l'importance de ces résultats, un signalement a été fait auprès des autorités sanitaires en suggérant de revoir les recommandations thérapeutiques actuelles.**

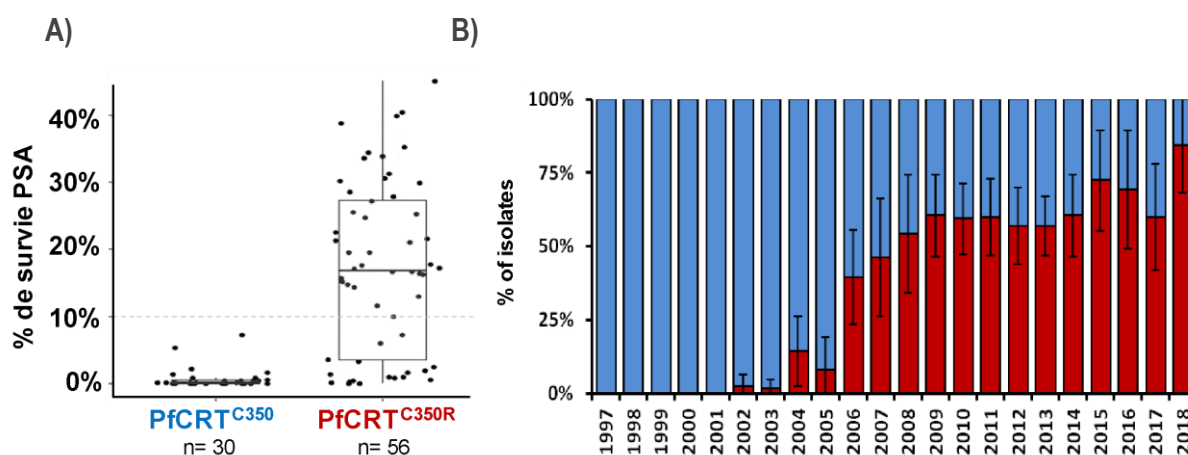


Figure 19. Sensibilité de *P. falciparum* à la pipéraquline en Guyane. A) génotype associé et B) évolution observée dans le temps de la mutation pfcr C350R (mutants en rouge, sauvage en bleu).

PfCRT : chloroquine resistant transporter, PSA : pipéraquline survival assay.

3.4. Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Contribution à la surveillance du paludisme autochtone en France hexagonale

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

Contribution à la surveillance du paludisme d'importation

Le CNR participe au réseau EuroTravNet (European Travel Medicine Network) (Dr P Parola) initié par l'International Society of Travel Medicine, collabore avec le laboratoire national anglais (Pr P Chiodini) et le réseau WWARN (Dr P. Guérin). Les données du CNR relative au paludisme en France sont annuellement transmises à l'ECDC (Dr W Van Bortel) et à l'OMS Europe pour enrichir la base CISID (Centralized Information System for Infectious Diseases).

Contribution à la surveillance du paludisme endémique

Les interactions SpF/Pôle Zones Endémiques s'effectuent par l'intermédiaire du bureau en région ou directement avec le département des maladies infectieuses. Les membres de SpF en Guyane sont en charge du recueil exhaustif des données épidémiologiques concernant les cas de paludisme diagnostiqués en Guyane dans l'ensemble des centres de diagnostic à savoir : CDPS, LBM et hôpitaux. Cette mission de recueil est assurée par une équipe composée de membres de SpF et de l'ARS au sein de la Plateforme de Veille, d'Alerte et de Gestion Sanitaire (PVAGS). Cette plateforme fait suite à la création des agences régionales de santé en 2010. Elle a repris les missions de l'ancienne cellule de veille sanitaire. Elle a pour vocation d'assurer un dispositif de qualité de réception et de traitement des signaux par des équipes pluridisciplinaires intra ou extra institutionnelles, avec un appui permanent et la mobilisation des compétences d'évaluation et d'investigation de SpF. Ses missions reposent spécifiquement sur des activités de

surveillance, d'investigations épidémiologiques, d'évaluation de risque et de coordination de la gestion. Ainsi, toutes les observations inhabituelles (résistance, foyer épidémique important...) font l'objet d'un signalement de la part du Pôle Zones Endémiques auprès de la PVAGS et de SPF selon des modalités bien définies (cf § Alerte). Concernant le paludisme en Guyane, la déclaration hebdomadaire à la PVAGS des cas diagnostiqués fait office de déclaration obligatoire.

Régulièrement, SpF en Guyane publie une analyse des données épidémiologiques collectées en Guyane sous forme d'un Point Epidémiologique Périodique (PEP) ou, annuellement dans le Bulletin de Veille Sanitaire (BVS).

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

Depuis 2014, le laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane est Centre Collaborateur de l'OMS pour la surveillance des résistances aux antipaludiques. Cette désignation a été renouvelée en 2022 pour quatre ans. A ce titre, le laboratoire intervient dans la surveillance des résistances et de la pertinence des outils diagnostics sur le plateau des Guyanes et en Amazonie en général. Les échanges sont ainsi réguliers avec les Ministères de la santé des pays concernés, le bureau en charge du paludisme de la PAHO basé à Washington DC et le programme global de lutte contre le paludisme de l'OMS basé à Genève. Il surveille également la présence de parasites délétés au niveau des gènes *pfhrp* 2 et 3 en lien avec la détection à l'aide des tests de diagnostic rapide ou peut être amené à conduire des investigations autour de phénomènes anormaux ou épidémiques dans les pays demandeurs.

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Evaluation de réactifs de qPCR par rapport à la LAMP pour le diagnostic du paludisme

Le laboratoire coordinateur de Bichat a évalué le nouveau réactif de PCR, Ampliquick malaria (Biosynex) par rapport à la LAMP dans le diagnostic du paludisme.

Ce travail a été valorisé par une publication : Bouzayene A, Zaffaroullah R, Bailly J, Ciceron L, Sarrasin V, Cojean S, Argy N, Houzé S, Joste V; French National Malaria Reference Centre study group. Evaluation of two commercial kits and two laboratory-developed qPCR assays compared to LAMP for molecular diagnosis of **malaria**. *Malar J.* 2022 Jun 27;21(1):204. doi: 10.1186/s12936-022-04219-1.

Evaluation de kits de tests de diagnostic rapide (TDR) du paludisme (2022-2023)

Le laboratoire associé de Marseille a évalué un nouveau test de diagnostic rapide pour une utilisation sur le terrain (Acro rapid Test de Biotech Inc). L'analyse est en cours.

Publication sur la thématique : Gendrot M, **Madamet M, Fonta I, Benoit N, Amalvict R, Mosnier J**, French National Reference Centre for Imported Malaria Study Group, **Pradines B**. Comparative assessment of the sensitivity of ten commercial rapid diagnostic kits for the detection of *Plasmodium*. *Diagnostics*, 2022,12:2240.

Evaluation de nouveaux outils de diagnostic du paludisme par biologie moléculaire (2021-2022)

Le laboratoire associé de Marseille a évalué un kit commercial de PCR en temps réel multiplexé (Vitassay qPCR Malaria 5 test).

Publication sur la thématique : **Madamet M, Amalvict R, Benoit N**, French National Reference Centre for Imported Malaria Study Group, **Pradines B**. Assessment of a commercial real-time PCR (Vitassay qPCR Malaria 5 test) to detect human malaria infection in travelers returning to France. *Diagnostics*, 2022,12:2747.

Nous avons évalué un certain nombre de gènes pouvant être potentiellement impliqués dans la résistance à la pipéraquline ou à la dihydroartémisinine (nouvelles mutations sur *pfcr1*, *pfmdr5*, *pfmdr6*, exonucléase, RING E3 ubiquitin protein ligase, *pfact*, *pfugt*, *pfcarl*, *pfpm2*, *pfcoronine*). Ces différents gènes ne semblent pas être impliqués dans une quelconque résistance à la pipéraquline ou à la dihydroartémisinine. Depuis plus de 12 mois, nous avons mis en culture une souche sensible à la pipéraquline sous pression discontinue de pipéraquline. Sa sensibilité a été diminuée d'un facteur 5. Nous allons continuer cette pression pendant plusieurs mois jusqu'à obtenir une souche très résistante qui sera comparée à la souche sensible par des méthodes de génomique, transcriptomique, protéomique et de métabolomique.

4. Alertes

Pole zones non endémiques

Il n'y a pas eu de signalement spécifique inhabituel en 2022.

En Guyane

Courant 2022, nous avons signalé la problématique de la résistance à la pipéraquline en Guyane aux autorités sanitaires. Ce signalement est toujours en cours de traitement.

5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

5.1. Conseil et expertise aux professionnels de santé

Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

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

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

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

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

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

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

La périodicité de ce bulletin est annuelle. Le dernier bulletin paru est celui concernant l'année 2022 (cf. site internet pasteur-cayenne.fr). Il est très largement diffusé par voie électronique à l'ensemble de nos partenaires (CDPS, Organisation Panaméricaine de la Santé, OMS, SpF en Guyane, ARS, SPF, DGS, médecins de ville...).

Pôle Zones non endémiques : Laboratoire associé Pitié-Salpêtrière

CNR de la Pitié Salpêtrière : expertise des cas graves, appel systématique des médecins en charge des patients, conseils thérapeutique, prévention de la PADH. Réponse par courriel (Pr Buffet, Pf Jaureguiberry, Dr Thellier, Dr Gay, Dr Tantaoui)

Surveillance épidémiologique et veille sanitaire, chapitre 27 « Maladies à transmission vectorielle en zone intertropicale : l'exemple du paludisme » Coordonnateurs : Pascal Astagneau et Pascal Crépey <https://www.lavoisier.fr/livre/medecine/surveillance-epidemiologique/descriptif-9782257207517> (co auteur Marc Thellier)

Parasitologie et mycologie médicales – Guide des analyses et pratiques diagnostiques Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicales. Anofel, mise à jour 2022. <https://anofel.net/enseignement-recherche/productions-anofel/> (co auteur Marc Thellier)

REMIC 2022 - Référentiel en microbiologie médicale -7ème édition 2022, Chapitre 112, "Paludisme", p997-1004. Société Française de Microbiologie, Société Française de Parasitologie, Société Française de Mycologie Médicale <https://www.sfm-microbiologie.org/boutique/remic-v7-2022/> (Co auteur Marc Thellier)

5.2. Accueil stagiaire

VSSA Océane DELANDRE, « Etude de la résistance à l'association dihydroartémisinine-pipéraquline (Euratésim) utilisée dans le traitement de première intention du paludisme simple à *Plasmodium falciparum* dans les armées », Université de la Méditerranée, Marseille. **Direction thèse** 2020-2023 (Bruno Pradines).

Marie ALI, « Détermination du mode d'action des nouveaux composés antipaludiques, les analogues de purine », Université de Montpellier, Montpellier. **Co-direction thèse** 2020-2023 (Bruno Pradines).

Mahmoud BOUALAM, « Histoire naturelle du paludisme en Europe préindustrielle », Université de la Méditerranée, Marseille. **Co-direction thèse** 2020-2023 (Bruno Pradines).

Ayman Ztouti. Master 2 Biologie moléculaire et cellulaire, parcours biochimie et biologie moléculaire. *Détermination du lien génotype-phénotype de l'enzyme Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (G6PD) dans les zones à forte prévalence de Plasmodium vivax en Guyane : implications dans la prise en charge.* **Février – Juillet 2022.** 4 mois. Encadré par Lise Musset.

Robin Lioutaud. Master 2 Sciences du médicament et produits de santé. *Diagnostic différentiel d'espèces plasmodiales : mise en place d'une méthode de qPCR ultrasensible et RT-PCR pour la détection des gamétocytes.* **Janvier – Juillet 2022.** 5 mois. Encadré par Lise Musset et Yassamine LAZREK-SANDOT.

Sandi Traore. Licence Chimie Sciences de la Vie. UPEC. *Détection des gamétocytes de P. falciparum par RT PCR.* Avril - juin 2022. 2 mois. Encadrée par Azza Bouzayene. Laboratoire coordinateur de Bichat.

Emma Masmoudi. Master 2 BMC. Université Paris Sorbonne. *Génotypage des souches de P. falciparum.* Janvier - juin 2022. 6 mois. Encadrée par Véronique Sarrasin et Sandrine Houzé. Laboratoire coordinateur de Bichat.

Idir Aniss Acherar, « Détection et identification de plasmodiums sur des images microscopiques » Thèse en préparation à Sorbonne université à l'école doctorale Santé publique (ED 393), se partageant entre l'Institut Pierre Louis d'épidémiologie et de santé publique (IPLESP) et le Laboratoire d'informatique médicale et d'ingénierie des connaissances en e-Santé (LIMICS), depuis le 2020-2023 Direction de thèse et co encadrement (Renaud Piarroux - Marc Thellier).

Fégens Saint-Louis, "Comorbidities associated with imported falciparum malaria among international travelers in France, 1996 to 2018: Text mining approach" Master à 2 Sorbonne université à l'école doctorale Santé publique (ED 393), à l'Institut Pierre Louis d'épidémiologie et de santé publique (IPLESP) (Eric Kendjo)

Mathilde Lacroix, « Infections chroniques à *Plasmodium falciparum*, situations cliniques et conséquences » Thèse d'exercice de pharmacie, présentée dans le cadre du D.E.S. Biologie Médicale, soutenue le 28 septembre 2022. (Marc Thellier)

5.3. Enseignement

Formation d'internes, de techniciens et de stagiaires au CNR du Paludisme laboratoire coordonateur Bichat : de manière systématique pour la formation au diagnostic du paludisme : 12 à 15 internes par semestre, 1 à 2 technicien par an (laboratoire de garde avec un fort turn-over, 3 en 2021 par exemple).

Participation de S Houzé à l'enseignement de Master 1 santé Paris Cité, Master 2 microbiologie Paris Saclay, Master 2 Pharmacologie clinique et préclinique, Paris Cité, DIU Médecine tropicale et santé internationale, DIU Médecine du voyage et santé des voyageurs, D.I.U. Pathologies infectieuses : prévention, vaccination, traitement.

Participation de S Houzé et de V Joste à l'enseignement en parasitologie des 1^{er} et 2^{ème} cycles des études pharmaceutiques, Paris Cité,

Participation de S. Houzé, de M. Thellier, de V. Joste au DES de biologie médicale, module parasitologie, université Paris Cité;

Participation de B Pradines aux cours de Master 1^{ère} année « UE S2 Introduction à la recherche : recherche en maladies infectieuses : le paludisme. Aix Marseille Université » et 2^{ème} année « Maladies transmissibles – Pathologies tropicales, module : Emergence et ré-émergence des maladies infectieuses, entomologie médicale. Aix Marseille Université » et au DESU « Concepteur de projet en expérimentation animale, Pathologies des animaux de laboratoire : Zoonoses. Université de la Méditerranée ».

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

Participation de B Pradines, R Amalvict, N Benoit, I Fonta et J Mosnier à la formation « Séminaire Guyane », EVDG & CEFOS, « Tests de diagnostic rapide et résistance » au profit des militaires partant en Guyane ».

Participation de L Musset au DU de médecine tropicale de l'Université de Guyane.

Cours de 2^{ème} année IFSI Guyane par L Musset.

Marc Thellier : Interview pour la Journée Mondiale du paludisme pour la gazette de l'infectiologie , <https://www.infectiologie.com/fr/journee-mondiale-de-lutte-contre-le-paludisme.html>.

Formation d'internes, de techniciens et de stagiaires au CNR du Paludisme laboratoire associé Pitié-Salpêtrière : de manière systématique pour la formation au diagnostic du paludisme : 12 à 15 internes par semestre, 1 à 2 technicien par an (laboratoire de garde avec un fort turn-over)

Master M1 Médecine – Santé, UE Santé internationale et pathologie tropicale, Sorbonne Université, en collaboration avec Paris 5, Paris 7, Paris 11, Paris 12 et Paris 13, Epidémiologie mondiale du paludisme 14/04/2022 (Marc Thellier)

Master M1 microbiologie, Sorbonne Université UE1. Module Mycologie-Parasitologie (6h) (37 participants) : « Le paludisme dans le monde. » (Marc Thellier) / « Diagnostic du paludisme, les méthodes actuelles, intérêts et limites » (avec démonstration au microscope) (Marc Thellier) / « Deep Learning, Intelligence Artificielle, Outils Informatiques vers un diagnostic automatisé du paludisme par analyse d'image ? » (Aniss Acherar, Renaud Piarroux, Marc Thellier) / « Développement d'une solution disruptive : le jumeau optique, une autre façon de voir le monde. » (Marc Thellier, Renaud Piarroux)

Diplôme d'université Médecine tropicale et humanitaire, Université de Rennes 1. « Epidémiologie, prévention et prise en charge du paludisme » 23/02/2022 (Marc Thellier)

5.4. Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Pôle Zones non Endémiques

Sandrine Houzé et Marc Thellier participent en tant que représentants du CNR Paludisme au groupe de travail sur la mise à jour annuelle des recommandations aux voyageurs sous l'égide du Haut Conseil de la Santé Publique.

Les données consolidées du CNR Paludisme sont transmises annuellement à l'ECDC.

Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

Le CNR Paludisme, Pôle Zones Endémiques participe à toutes les réunions organisées par les autorités de santé guyanaises en tant que conseiller et expert des questions de paludisme. Ce temps de conseils et d'expertise est une activité majeure du Pôle Zones Endémiques. Il y dédie un temps personnel considérable dédié au conseil, environ 20% d'ETP au minimum. Ainsi en 2022 ont eu lieu des réunions d'échanges autour :

- du programme transfrontalier de surveillance avec le Brésil (février 2022),
- les journées de veille sanitaire,
- une réunion autour du programme MALAKIT/CUREMA au Suriname.

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

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

Sensibilisation du pôle zones endémiques auprès du public scolaire des communes situées en zone d'endémie.
Public cible, plus de +8ans.

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

6.1. Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Apport de la PCR à la surveillance de l'épidémiologie du paludisme d'importation en France

Six espèces de *Plasmodium* peuvent être responsables de la majorité des infections humaines : *Plasmodium falciparum* (Pf), *Plasmodium vivax* (Pv), *Plasmodium malariae* (Pm), *Plasmodium ovale* spp (*Po* spp) qui se divise en deux espèces sympatriques mais génétiquement distinctes *Plasmodium ovale curtisi* (Poc) et *Plasmodium ovale wallikeri* (Pow), et enfin *Plasmodium knowlesi* (Pk). Un diagnostic spécifique de cette parasitose est essentiel pour permettre un traitement efficace. Notamment, il est important d'identifier les espèces *Po* et *Pv* qui requièrent un traitement radical des reviviscences par la primaquine. Les outils de diagnostic standards recommandés sont l'examen microscopique des frottis sanguins ou des gouttes épaisses colorés et les tests de diagnostic rapides (TDR) immunochromatographiques. Cependant, ces méthodes manquent de sensibilité surtout dans les cas de faibles parasitémies, d'infections non-falciparum ou des coinfections. Par conséquent, les méthodes moléculaires de PCR en temps réel (qPCR), qui ont montré une plus grande sensibilité et une meilleure spécificité, trouvent leur intérêt dans ce contexte.

Nous avons développé au laboratoire coordonateur de l'hôpital Bichat une qPCR maison TaqMan qui permet de détecter et de différencier les quatre espèces les plus fréquentes de *Plasmodium* : Pf, Pv, Pm et Po spp. Cette qPCR, adaptée de l'étude de *Schindler et al.* (Malaria Journal, 2019), a été réalisée sur tous les prélèvements reçus depuis janvier 2021 pour compléter le suivi épidémiologique moléculaire du Paludisme en France en comparaison avec les données de l'examen microscopique. Entre janvier 2021 et mi-mai 2022, nous avons analysé 2 174 échantillons sanguins pour lesquels nous avons des résultats de microscopie. Parmi ces échantillons, 2 041 étaient positifs (94%) et 133 étaient négatifs en microscopie. Après analyse par qPCR 2 144 étaient positifs (+ 4.8%) dont 1 902 (88.7%) accès à Pf, 152 (7%) accès à Po, 75 (3.5%) accès à Pm et 27 (1.2%) accès à Pv.

En outre, grâce à cette qPCR nous avons pu mettre en évidence 33 (1.5%) coinfections Pf/Po, 10 (0.5%) Pf/Pm, 5 (0.2%) Po/Pm et 1 (0.04%) Pf/Pv. Parmi ces infections mixtes, une association submicroscopique avec Pf a été identifiée dans 7 cas (0.3%) et à Po dans 32 cas (1.5%) ce qui présente 17% de l'ensemble des infections à Po. Bien que la détection d'ADN de Pf ne permette pas de différencier les formes asexuées des formes sexuées, la prescription d'un traitement efficace contre cette espèce doit être vérifiée ; et en cas de détection d'ADN de Po, la prescription de primaquine.

Cette démarche a mis en évidence un nombre conséquent d'infections mixtes non diagnostiquées par microscopie, permettant un traitement et un suivi adéquats.

Détection d'ADN plasmodial au cours du suivi des accès palustres à *Plasmodium falciparum* : influence des gamétocytes.

Parmi les six espèces de *Plasmodium* connues pour causer la majorité des infections humaines, *Plasmodium falciparum* est la plus virulente et est responsable de la plupart des décès dus au paludisme en particulier en Afrique subsaharienne. Au cours de chaque cycle de multiplication, une proportion de parasites asexués évoluera en gamétocytes, stades sexués mâles et femelles, qui poursuivront leur développement chez le moustique vecteur pour assurer la transmission. Chez l'homme, en cas d'infection par *P. falciparum*, ces gamétocytes intraérythrocytaires peuvent persister dans la circulation sanguine pendant au moins 1 à 2 mois. La production de gamétocytes est

influencée par plusieurs facteurs dont le traitement antipaludique reçu par le patient. A l'exception de la primaquine, la plupart des antipaludiques actuellement disponibles ciblent les parasites au stade asexué et ont un effet limité sur les gamétocytes : des études ont montré que les gamétocytes de *P. falciparum* peuvent persister à des niveaux submicroscopiques même après un traitement à base d'artémisinine (CTA) et permettre la transmission dans les zones endémiques. Au cours des suivis des accès palustres, des résultats positifs avec les méthodes très sensibles de biologie moléculaire tels que les LAMP et les PCR en temps réel (qPCR) sont obtenus jusqu'à 28 jours après traitement en l'absence d'échec thérapeutique clinique. Dans ce contexte, est-ce que cette positivité est due à la présence de gamétocytes dans le sang des patients traités, les techniques de détection de l'ADN ne distinguant pas l'ADN des formes asexuées de celui des formes sexuées ?

Pour mettre en évidence la présence spécifique de formes sexuées au cours du suivi des accès à *P. falciparum*, nous avons réalisé des qPCR ciblant les gènes CCp4 (marqueur de gamétocytes femelles) et PfmGET (marqueur de gamétocytes males). Entre mars 2020 et mars 2022, les prélèvements de 76 patients pris en charge à l'hôpital Bichat, pour lesquels au moins 3 prélèvements de suivi étaient disponibles (276 échantillons) ont été inclus dans cette étude. Aucun échec thérapeutique n'a été confirmé pour ces patients. Sur ces échantillons, une LAMP PCR et une qPCR PfvarATS ont été réalisées pour la détection de l'ADN plasmodial de *P. falciparum* : 150 (54,3%) d'entre eux étaient positifs dont 67 J précoces (<J5), 40 J intermédiaires (J5-J14) et 43 J tardifs (>J15). Sur ces échantillons positifs en PCR, l'ARN a été extrait et rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) par transcriptase inverse (RT-PCR) sur lequel la qPCR CCp4/PfmGET a été réalisée. Les qPCR gamétocytes sur l'ADNc étaient positives sur 46 prélèvements (30,7%) dont 24 prélèvements (35,8%) de J précoces, 14 prélèvements (35,9%) de J intermédiaires et 8 prélèvements (18,2%) de J tardifs. La relation entre les traitements reçus par les patients et ces résultats a été étudiée.

Ce travail a permis de confirmer la présence de gamétocytes dans le sang des patients après traitement pour un accès palustre associée à une persistance de positivité par PCR dans environ 31% des prélèvements inclus. Pour les autres cas, plusieurs facteurs pourraient être discutés notamment la sensibilité des méthodes mises en oeuvre ou des cibles utilisées, nécessitant la poursuite de cette étude.

Ce travail se poursuit avec la thèse de doctorat d'Azza Bouzayene.

Analyse moléculaire des isolats de *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*

La problématique centrale de ce travail a été de développer des outils permettant de caractériser génétiquement les isolats de *P. ovale spp*, afin de mieux décrire les différences entre *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* par des analyses de génétique des populations et d'analyser les reviviscences selon 2 approches parallèles et complémentaires.

1°) Le développement d'une méthode de selective Whole Genome Amplification (sWGA), a permis de séquencer de façon rétrospective des isolats de *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*. Grâce au sWGA, des mutations dans les gènes dhfr de *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* ont été mises en évidence sur les premiers séquençages. Un travail d'épidémiologie moléculaire a été engagé afin d'évaluer la prévalence de ces mutations en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale.

2°) Le développement de marqueurs microsatellites. *P. ovale spp* était la seule espèce infectant l'homme pour laquelle ces marqueurs n'ont pas encore été développés. Ils ont permis d'analyser les génotypes des accès de reviviscence et de les comparer aux génotypes des isolats de l'accès initial. Nous avons mis en évidence une forte proportion de reviviscences homologues, à la différence de ce qui avait été précédemment décrit pour *P. vivax*.

Joste V, Guillochon E, Clain J, Coppée R, Houzé S. 2022. Development and Optimization of a Selective Whole-Genome Amplification To Study Plasmodium ovale Spp. Microbiol Spectr e0072622

Identification et validation de nouveaux marqueurs moléculaires de résistance aux antipaludiques

Nous avons évalué un certain nombre de gènes pouvant être potentiellement impliqués dans la résistance à la pipéraquline ou à la dihydroartémisinine (nouvelles mutations sur pfcr1, pfmdr5, pfmdr6, exonucléase, RING E3 ubiquitin protein ligase, pfact, pfugt, pfcarl, pfpm2, pfcoronine). Ces différents gènes ne semblent pas être impliqués dans une quelconque résistance à la pipéraquline ou à la dihydroartémisinine. Depuis 18 mois, nous avons mis en

culture une souche sensible à la pipéraquline sous pression discontinue de pipéraquline. Sa sensibilité a été diminuée d'un facteur 10. Nous allons continuer cette pression pendant plusieurs mois jusqu'à obtenir une souche très résistante qui sera comparée à la souche sensible par des méthodes de génomique, transcriptomique, protéomique et de métabolomique.

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

Evaluation in vitro de composés naturels ou de synthèse (> 100 échantillons évalués en 2022) et du bleu de méthylène (Proveblue). Le bleu de méthylène, et plus particulièrement Proveblue, un produit de synthèse exempt de métaux et de produits toxiques, est actif in vitro sur des isolats de *P. falciparum* et in vivo sur des souches murines de Plasmodium. D'autre part, des études ont montré que le bleu de méthylène pouvait augmenter l'activité in vitro des dérivés de l'artémisinine. Proveblue protège du neuropaludisme dans un modèle murin de neuropaludisme. Une souche sensible au bleu de méthylène est en culture sous pression discontinue afin d'obtenir une souche résistante.

Publications en lien avec la thématique :

Dassonville-Klimpt A, Schneider J, Damiani C, Tisnerat C, Cohen A, Azas N, Marchivie M, Guillon J, Mullié C, Agnamey P, Totet A, Dormoi J, **Taudon N, Pradines B**, Sonnet P. Design, synthesis, and characterization of novel aminoalcohol quinolines with strong in vitro antimalarial activity. **Eur J Med Chem**, 2022,228:113981.

De Souza Pereira C, Quadros HC, Aboagye SY, Fontinha D, D'Alessandro S, Byrne ME, Gendrot M, **Fonta I, Mosnier J**, Moreira DRM, Basilico N, Williams DL, Prudencio M, **Pradines B**, Navarro M. A hybrid of amodiaquine and primaquine linked by gold(I) is a multistage antimalarial agent targeting heme detoxification and thiol redox homeostasis. **Pharmaceutics**, 2022,14:1251.

Chowdhary S, Shalini, **Mosnier J, Fonta I, Pradines B**, Cele N, Seboletswe P, Singh P, Kumar V. Synthesis, anti-plasmodial activities, and mechanistic insights of 4-aminoquinoline-triazolopyrimidine hybrids. **ACS Med Chem Lett**, 2022,13:1068-1076.

Villareal W, Castro W, Gonzalez S, **Madamet M, Amalvict R, Pradines B**, Navarro M. Copper (I)-chloroquine complexes: Interactions with DNA and Ferriprotoporphyrin, inhibition of β -hematin formation and relation to antimalarial activity. **Pharmaceutics**, 2022,15:921.

Dormoi J, **Amalvict R, Gendrot M, Pradines B**. Methylene blue based combination therapy with amodiaquine prevents severe malaria in an experimental rodent model. **Pharmaceutics**, 2022,14:2031.

Jumeaux optiques pour le Diagnostic – OT4D (CNR Paludisme Pitié-Salpêtrière)

Labcom OT4D[1] (financement ANR sur 5 ans), Coordination Pr François Delhommeau

Pour la Parasitologie-Mycologie : Dr Marc Thellier et Pr Renaud Piarroux

OT4D, laboratoire commun entre l'équipe « Développement hématopoïétique et leucémique », (Centre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Université) et TRIBVN, est dédié au développement de nouvelles approches en microscopie optique de nouvelle génération de façon à mieux alimenter les outils de l'intelligence artificielle pour le diagnostic, la stratification pronostique et le suivi des maladies du sang.

OT4D développe un outil de microscopie de nouvelle génération introduisant deux innovations :

1. Production d'un "jumeau optique" (Optical Twin - OT) par holographie de synthèse permettant une représentation 3D des éléments figurés du sang et de la moelle osseuse en intensité et en phase de résolution étendue.

2. L'exploitation d'outils d'intelligence artificielle (volume important de données important), en pré, per, et post-analytique : traitement des objets numériques, détection d'événements rares, identification et quantification des éléments, établissement d'un diagnostic et prédiction de caractéristiques biologiques, génétiques et pronostiques.

A l'issue du projet, ces nouveaux outils permettront d'obtenir des diagnostics rapides et précis en hématologie et parasitologie pour être commercialisés auprès des laboratoires d'analyse biologique dans les hôpitaux et en ville.

Pour le paludisme : Objectif principal le diagnostic complet, automatique du paludisme sur un frottis ;

Objectifs secondaires : diagnostic sur frottis non colorés, diagnostic sur frottis colorisé (Figure 20).

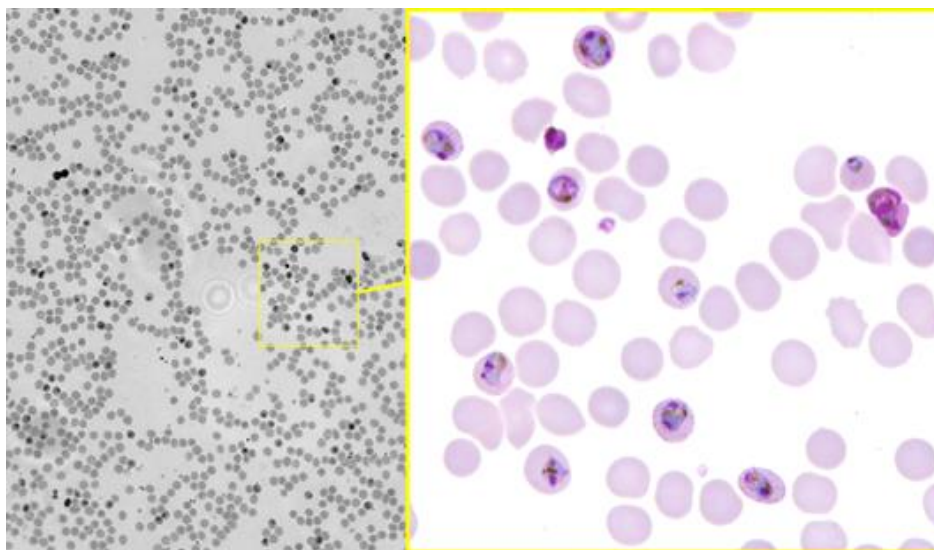


Figure 20. Frottis coloré intensité OT4D objectif 20X immersion.

Ref : Bouchama L, Dorizzi B, Thellier M, Klossa J, Gottesman Y. FPM image enhancement with bi-modal deep learning, 2023, Optica.

https://preprints.opticaopen.org/articles/preprint/FPM_image_enhancement_with_bi-modal_deep_learning/22285693

[1] <https://anr.fr/Projet-ANR-21-LCV1-000>

Projet Smart-malaria

(Pr Renaud Piarroux, Dr Marc Thellier)

Le projet Smart-malaria est un projet mené conjointement avec MyC (<https://www.myc.doctor/>) une entreprise innovante avec laquelle une convention est en cours de finalisation.

L'objectif de cette recherche est de mettre au point un système d'aide au diagnostic de paludisme basé sur la reconnaissance d'images à l'aide de réseaux de neurones profonds puis d'intégrer les modèles et les algorithmes ainsi élaborés dans une application en ligne. Dans l'idéal, cette application devra être en mesure de :

- recevoir et stocker les images produites par le microscopiste ;
- extraire de ces images, les éléments d'intérêt (parasites du genre Plasmodium, globules rouges parasités par un Plasmodium, globules blancs avec du pigment malarique) ;
- classer les stades de développement des parasites en trophozoïtes, schizontes, gamétocytes, et les dénombrer ;
- identifier parmi ces éléments ceux présentent des caractéristiques utiles au diagnostic d'espèce ;

- envoyer les résultats d'analyse sous la forme de données quantitatives (parasitémie) et qualitatives (espèce en cause, stades parasitaires, images agrandies montrant les éléments d'intérêt pris en compte dans l'analyse).

Ces analyses pourront, selon le contexte, être envoyées à des experts chargés de valider le diagnostic du microscopiste (supervision du diagnostic) ou être retournée au microscopiste afin de l'aider dans sa démarche diagnostique (aide au diagnostic basée sur la caractérisation des éléments repérés par le microscopiste). L'ensemble de ces données devra permettre, une fois l'application déployée à large échelle, de centraliser les images et les résultats de leur analyse dans une base de données sécurisée et d'extraire de cette base de données les informations utiles à la supervision des activités de diagnostic microscopique à l'échelle d'un établissement, d'une localité ou d'un pays ainsi qu'à l'organisation de plans de formation/recyclage des microscopistes et à l'établissement de rapports épidémiologiques décrivant les tendances spatiales et temporelles du diagnostic de paludisme sur un territoire donné. Il est envisagé, dans un deuxième temps, d'associer des éléments cliniques et éventuellement des données biologiques standard aux images de microscopes afin d'améliorer encore la pertinence des diagnostics posés avec l'aide de l'application.

L'intérêt de cette application est de fiabiliser le diagnostic rendu au malade, en particulier lorsque le microscopiste n'est pas très expérimenté. Elle peut être implémentée en Afrique avec des photos prises à l'aide de smartphones ou en Europe avec des images issues d'un jumeau optique (voir projet jumeaux numériques, OT4D).

L'application Smart-malarIA servira en outre dans la mise en oeuvre d'un projet, en cours de préparation, visant à appuyer l'Institut de Recherche Biomédicale (INRB) de Kinshasa dans une démarche d'amélioration diagnostique en microbiologie par la spectrométrie de masse et la reconnaissance d'image microscopique en intelligence artificielle. La rédaction de ce projet a été sollicitée suite à la visite du Président Macron à Kinshasa en mars 2023 par l'Agence Française de Développement. Les partenaires pressentis, outre l'INRB, sont la fondation Mérieux, l'APHP et Sorbonne Université (participation de Renaud Piarroux au pilotage du projet).

Projet Amazomics

En collaboration avec l'université d'Harvard et financé par le labex CEBA, le pôle zones endémiques a exploré les effets d'une forte diminution de la population de parasites sur la génétique de *Plasmodium falciparum* en analysant les génomes de 250 isolats collectés en 1998 et 2015. Les résultats montrent comment la pression sélective exercée conduit les parasites à investir dans l'engagement sexuel avec la sélective de région du génome codant pour des facteurs de transcription impliqués dans le passage au stade gamétocytes pour une transmission plus efficace et plus rapide.

Early et al., 2022, PNAS: <https://doi.org/10.1073/pnas.2122165119>

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

Publications internationales

Acherar A, Tantaoui I, Thellier M, Lampros A, Piarroux R, Tannier X. Real-life evaluation of deep learning models trained on two datasets for *Plasmodium falciparum* detection with thin blood smear images at 500x magnification, **Informatics in Medicine Unlocked**, Volume 35, 2022, 101132.

Alexpandi R, Gendrot M, Abirami G, Delandre O, Fonta I, Mosnier J, Mariadasse R, Jeyakanthan J, Pandian SK, Pradines B, Ravi AV. Repurposing of doxycycline to hinder the viral replication of SARS-CoV-2: from in silico to in vitro validation. **Front Microbiol**, 2022,13:757418.

Bouzayene A, Zaffaroullah R, Bailly J, Ciceron L, Sarrasin V, Cojean S, Argy N, **Houzé S**, Joste V; French National Malaria Reference Centre study group. Evaluation of two commercial kits and two laboratory-developed qPCR assays compared to LAMP for molecular diagnosis of **malaria**. *Malar J*. 2022 Jun 27;21(1):204. doi: 10.1186/s12936-022-04219-1.

Chambrion C, Depond M, Angella L, Mouri O, Kendjo E, Fricot-Monsinjon A, Roussel C, Biligui S, Tantaoui I, Taieb A, Argy N, Houzé S, Piarroux R, Siriez JY, Jaureguiberry S, Larréché S, Théllier M, Cenac N, Buffet P, Ndour PA. Altered Subpopulations of Red Blood Cells and Post-treatment Anemia in Malaria. *Front Physiol*. 2022 Apr 5;13:875189.

Chowdhary S, Shalini, Mosnier J, Fonta I, Pradines B, Cele N, Seboletswe P, Singh P, Kumar V. Synthesis, anti-plasmodial activities, and mechanistic insights of 4-aminoquinoline-trizolopyrimidine hybrids. *ACS Med Chem Lett*, 2022,13:1068-1076.

Coppée R, Bailly J, Sarrasin V, Vianou B, Zinsou BE, Mazars E, Georges H, Hamane S, Lavergne RA, Dannaoui E, Balikagala B, Fukuda N, Odongo-Aginya EI, Mita T, **Houzé S**, Clain J. Circulation of an Artemisinin-Resistant **Malaria** Lineage in a Traveler Returning from East Africa to France. *Clin Infect Dis*. 2022 Sep 30;75(7):1242-1244. doi: 10.1093/cid/ciac162.

Coppée R, Mama A, Sarrasin V, Kamaliddin C, Adoux L, Palazzo L, Ndam NT, Letourneur F, Arieu F, **Houzé S**, Clain J. 5WBF: a low-cost and straightforward whole blood filtration method suitable for whole-genome sequencing of *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Malar J*. 2022 Feb 16;21(1):51. doi: 10.1186/s12936-022-04073-1.

Coppée R, Sarrasin V, Zaffaroullah R, Bouzayene A, Thellier M, Noël H, Clain J, Houzé S; Investigation Study Group. Nosocomial Malaria Transmissions Resolved by Genomic Analyses-A Retrospective Case Report Study in France: 2007-2021. *Clin Infect Dis*. 2023 Feb 18;76(4):631-639. doi: 10.1093/cid/ciac813.

Costa MM, Martin H, Estellon B, Dupé FX, Saby F, Benoit N, Tissot-Dupont H, Million M, Pradines B, Granjeaud S, Almeras L. Exoratory study on application of MALDI-TOF-MS to detect SARS-CoV-2 infection in human saliva. *J Clin Med*, 2022,11:295.

Dassonville-Klimpt A, Schneider J, Damiani C, Tisnerat C, Cohen A, Azas N, Marchivie M, Guillon J, Mullié C, Agnamey P, Totet A, Dormoi J, Taudon N, Pradines B, Sonnet P. Design, synthesis, and characterization of novel aminoalcohol quinolines with strong in vitro antimalarial activity. *Eur J Med Chem*, 2022,228:113981.Gendrot M,

De Souza Pereira C, Quadros HC, Aboagye SY, Fontinha D, D'Alessandro S, Byrne ME, Gendrot M, Fonta I, Mosnier J, Moreira DRM, Basílico N, Williams DL, Prudencio M, Pradines B. Navarro M. A hybrid of amodiaquine and primaquine linked by gold(I) is a multistage antimalarial agent targeting heme detoxification and thiol redox homeostasis. *Pharmaceutics*, 2022,14:1251.

Delandre O, Gendrot M, Jardot P, Le Bideau M, Boxberger M, Boschi C, Fonta I, Mosnier J, Hutter S, Levasseur A, La Scola B, Pradines B. Antiviral activity of repurposing ivermectin against a panel of 30 clinical SARS-CoV-2 strains belonging to 14 variants. *Pharmaceutics*, 2022,15:445.

Dormoi J, Amalvict R, Gendrot M, Pradines B. Methylene blue based combination therapy with amodiaquine prevents severe malaria in an experimental rodent model. *Pharmaceutics*, 2022,14:2031.

Duron O, Koual R, Musset L, Buysse M, Lambert Y, Jaulhac B, Blanchet D, Alsibai KD, Lazrek Y, Epelboin L, Deshuillers P, Michaud C, Douine M. Novel Chronic Anaplasmosis in Splenectomized Patient, Amazon Rainforest. *Emerg Infect Dis*, 2022, 28:1673-1676.

Early AM, Camponovo F, Pelleau S, Cerqueira GC, Lazrek Y, Volney B, Carrasquilla M, de Thoisy B, Buckee CO, Childs LM*, Neafsey DE*, Musset L*. Declines in prevalence alter the optimal level of sexual investment for the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119: e2122165119.

Joste V, Guillochon E, Clain J, Coppée R, **Houzé S**. Development and Optimization of a Selective Whole-Genome Amplification To Study *Plasmodium ovale* Spp. *Microbiol Spectr*. 2022 Oct 26;10(5):e0072622. doi: 10.1128/spectrum.00726-22. Epub 2022 Sep 13.

Madamet M, Fonta I, Benoit N, Amalvict R, Mosnier J, French National Reference Centre for Imported Malaria Study Group, Pradines B. Comparative assessment of the sensitivity of ten commercial rapid diagnostic kits for the detection of *Plasmodium*. **Diagnosics**, 2022,12:2240.

Madamet M, Amalvict R, Benoit N, French National Reference Centre for Imported Malaria Study Group, Pradines B. Assessment of a commercial real-time PCR (Vitassay qPCR Malaria 5 test) to detect human malaria infection in travelers returning to France. **Diagnosics**, 2022,12:2747.

Papa Mze N, Beye M, Kacel I, Tola R, Basco L, Bogreau H, Colson P, Fournier PE. Simultaneous SARS-CoV-2 genome sequencing of 384 samples on an illumina MiSeq Instrument through protocol optimization. **Genes**, 2022,13:1648.

Theillier M, Houzé S, Pradine B, Piarroux R, Musset L, Kendjo E. Assessment of electronic surveillance and knowledge, attitudes, and practice (KAP) survey toward imported malaria surveillance system acceptance in France. **JAMIA Open**, 2022,5:1-10.

Villareal W, Castro W, Gonzalez S, Madamet M, Amalvict R, Pradines B, Navarro M. Copper (I)-chloroquine complexes: Interactions with DNA and Ferriprotoporphyrin, inhibition of β -hematin formation and relation to antimalarial activity. **Pharmaceuticals**, 2022,15:921.

Vezenegho SB, Issaly J, Carinci R, Gaborit P, Girod R, Dusfour I, Briolant S. Discrimination of 15 Amazonian anopheline mosquito species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **J Med Entomol**, 2022,59(3):1060-1064.

Communications nationales

Bouzayene A, Candau T, Zaffaroullah R, Traore S, Sarrasin V, Joste V, Houzé S. Détection d'ADN plasmodial au cours du suivi des accès palustres à *Plasmodium falciparum* : influence des gamétocytes. Société Française de Parasitologie, 21-24 juin 2022, Rouen (France)

Bouzayene A, Joste V, Zaffaroullah R, Sarrasin V, Houzé S. Apport de la PCR à la surveillance de l'épidémiologie du paludisme d'importation en France. Société Française de Parasitologie, 21-24 juin 2022, Rouen (France)

Florimond C, de Laval F, Monteiro WM, Magris M, Viana GMR, Herrera S, Ferreira MU, Cox H, Ade MP, Musset L. 2022. Paludisme: émergence et expansion de la résistance à la pipéraquline sur le plateau des Guyanes. **23^{ème} Journées Nationales d'Infectiologie**, 15-17 Juin, Bordeaux (France).

Communications internationales

Florimond C, de Laval F, Early AM, Sauthier S, Lazrek Y, Pelleau S, Monteiro WM, Agranier M, Taudon N, Morin F, Magris M, Lacerda MVG, Viana GMR, Herrera S, Adhin MR, Ferreira MU, Woodrow CJ, Awab GR, Cox H, Ade M-P, Mosnier E, Djossou F, Neafsey DE, Ringwald P, Musset L. Identification of piperaquine resistance in South America highlighting an evolution of molecular markers contrasting with the Southeast Asian situation. **ASTMH 2022 Annual Meeting**, October, 30th - November, 3rd, Seattle (USA). Communication orale.

Florimond C, de Laval F, Early AM, Sauthier S, Lazrek Y, Pelleau S, Monteiro WM, Agranier M, Taudon N, Morin F, Magris M, Lacerda MVG, Viana GMR, Herrera S, Adhin MR, Ferreira MU, Woodrow CJ, Awab GR, Cox H, Ade M-P, Mosnier E, Djossou F, Neafsey DE, Ringwald P, Musset L. Emergence and expansion of piperaquine resistant malaria parasites in the Guiana Shield. **Labex Ceba Annual Meeting 2022**, October, 4-5th, Cayenne (Guyane). Communication orale.

Conférence sur invitation

Musset L. Transmission and drug resistance capacities of *P. falciparum* in the Guiana Shield. **New antimalarials: from drug discovery to clinical trials**, 19-20th December, São Paulo (Brazil).

Pradines B. Epidémiologie du paludisme en 2022 : la remontada ? Revisiter les luttes contre VIH, paludisme et tuberculose à l'heure de la COVID. 16èmes rencontres Nord-Sud IMEA/IRD, Paris, France, 23 novembre 2022.

Theulier M. Intelligence artificielle et microscopie dans le diagnostic parasitaire. Société Française de Parasitologie, 21-24 juin 2022, Rouen (France)

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

Sur notre thématique, aucune coopération n'existe avec les LNR.

En Guyane, nous sommes parfois amenées à réaliser un diagnostic de paludisme chez des singes présentant des signes cliniques compatibles avec le paludisme. Certains se sont avérés positifs à *P. vivax*.

8. Programme d'activité pour les années suivantes

Le programme d'activité de la mandature 2023-2027 a déjà été présenté dans le dossier de renouvellement et les laboratoires du CNR Paludisme vont s'attacher à le mettre en place.

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

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

- en ce qui concerne l'épidémiologie, poursuivre la confirmation systématique des espèces infectantes par PCR ce qui permet de détecter des associations d'espèces non identifiées par la microscopie, et d'enrichir nos connaissances sur l'épidémiologie du paludisme d'importation.
- confirmer les prélèvements isolément "LAMP PCR positifs" par les PCR ultrasensibles développées dans les laboratoires du CNR, et identifier les espèces plasmodiales en cause. L'obtention de données cliniques et épidémiologiques associées à ces prélèvements est indispensable. Celles-ci permettront de mieux caractériser ses patients porteurs de parasites submicroscopiques, et dans de nombreux cas, asymptomatiques.
- identifier l'origine géographique des paludismes autochtones : le séquençage génome entier des isolats responsables d'accès de paludisme autochtone (d'aéroport et de bagages) sera réalisé afin d'identifier l'origine géographique des souches (et des moustiques introduits). Ces résultats permettront de confirmer le lien avec le bagage quand il est suspecté (pays du séjour connu en général) ou d'identifier les liaisons aériennes les plus à risque d'introduction de moustiques infectés.
- surveiller la délétion des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* dans les isolats reçus par la mise en œuvre de PCR temps réel. Ces délétions non létales pour le parasite obère la sensibilité des TDR dans la détection des parasites *P. falciparum*
- poursuivre la différenciation des espèces *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*, analyser par NGS les isolats reçus particulièrement en cas de reviviscence afin de mieux caractériser les accès à *P. ovale*
- identifier le profil d'évolution clinique des patients adultes présentant une hyperparasitémie isolée à *Plasmodium falciparum* > 4%, afin de discuter la valeur pronostique au seuil de 4% en France, au regard de l'évolution du profil épidémiologique et clinique actuel du paludisme d'importation, ainsi que des progrès thérapeutiques que représentent notamment les dérivés de l'artémisinine, et identifier des facteurs de risques cliniques et biologiques d'évolution défavorable chez les patients présentant une hyperparasitémie > 4% à partir de l'étude de cohorte multicentrique rétrospective de 2014 à 2022, portant sur l'ensemble des patients adultes admis aux soins des services d'urgence, de médecine, et de réanimation de France pour une paludisme sévère sur le seul critère de l'hyperparasitémie isolée. L'ensemble des patients identifiés par le centre national de référence (CNR) en île de France seront potentiellement incluables. Les données cliniques des services d'urgence, de médecine et de réanimation seront recueillies dans les dossiers médicaux des patients par les médecins investigateurs des services concernés. (Projet Phasmes)
- poursuivre les travaux sur la résistance aux antipaludiques et plus particulièrement vis-à-vis de la pipéraquline, l'artémisinine et de la doxycycline de même que l'identification et le développement de nouveaux marqueurs moléculaires de résistance par la mise en œuvre de nouveaux outils tel que le séquençage de génome complet. Pour cela, le CNR souhaite recentrer son activité sur l'expertise et l'exploitation des isolats associés à des dossiers cliniques et épidémiologiques bien documentés, éléments indispensables pour valider de nouveaux marqueurs potentiels de résistance. L'analyse systématique des génotypes de toutes les souches reçues sera réalisée dans le cadre de projets éventuels de cartographie d'un marqueur donné dont l'évolution est préoccupante

- évaluer les risques de contracter le paludisme par les voyageurs par une enquête séroépidémiologique des voyageurs avec et sans paludisme à leur retour d'un séjour en zone d'endémie : immunité du voyageur? absence de piqûres infectantes (détection d'anticorps anti-sporozoïtes)?
- explorer les attitudes vis-à-vis de la prévention du paludisme des voyageurs originaires de zone d'endémie, par des questionnaires via les réseaux sociaux en collaboration avec les associations de la diaspora africaine : consultation médicale avant le voyage? achat de chimioprophylaxie? prise de la chimioprophylaxie? accès fébriles?

La sensibilisation des correspondants à compléter leurs déclarations sera poursuivie; pour les aider, des aménagements du site de déclaration sont prévus ainsi que la mise à leur disposition de statistiques pour suivre leur activité, ainsi que la production de rapport d'analyse sous format pdf qui pourront être inclus dans le dossier du patient.

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

Le CNR Paludisme mettra sa méthodologie et ses isolats au service de chimistes pour valider l'effet antipaludique *in vitro* et *in vivo* de molécules à visée antipaludique en privilégiant l'inhibition, de nouvelles voies (collaborations universitaires nationales et internationales).

Le laboratoire associé Pitié-Salpêtrière propose de développer son activité suivant deux axes principaux :

1/ La poursuite des travaux entamés pour le développement du diagnostic microscopique du paludisme secondé par une IA. Se référer au projet OT4D sur le jumeau optique, technologie de rupture (p45) et au projet Smart-MalarIA (p46), d'aide au diagnostic pour les microscopistes non experts à l'aide d'un smartphone et d'une application (développement conjoint avec la société MyC <https://www.myc.doctor/>).

2/ La création d'un réseau Severe Malaria Force « SeMaFor » pour la prise en charge et le suivi des accès graves. Les objectifs principaux sont i/ d'organiser la prestation de conseils pour les médecins ou les équipes médicales qui prennent en charge un patient avec un accès grave en proposant la mise en relation facilitée avec un expert du CNR (via une application, prestataire de service MyC <https://www.myc.doctor/>), ii/ d'organiser et de standardiser le suivi post traitement pour renseigner les séquelles à court, moyen ou long terme avec la création d'une cohorte qui aura pour objet d'observer et de décrire les séquelles en particulier neurologiques et leur évolution. Les principales fonctions qui seront développées par Semafor seront donc : la création d'une application pour le conseil d'experts pour la prise en charge des patients avec un accès grave à la phase aiguë ou à son décours, la création d'un serveur de résultats pour centraliser et transmettre les résultats des analyses de recours et des examens complémentaires et la création d'une base de données sur une cohorte de patients avec un accès grave. Les contacts avec MyC sont pris, une première réunion est programmée pour octobre ou novembre prochain pour constituer un groupe de travail dont les propositions seront présentées à la journée nationale du CNR du paludisme en janvier 2024.

En Guyane, le dynamisme des équipes en place et des projets qu'elles ont développés ont permis de diminuer encore davantage la transmission du paludisme et à la France de s'engager vers l'élimination du paludisme d'ici à 2025. Le CNR accompagnera les autorités dans cette démarche par l'intermédiaire d'activités de conseil lors de l'élaboration du plan d'élimination du paludisme pour la Guyane courant 2023.

Les derniers parasites seront probablement les résistants, ainsi la surveillance des résistances aux molécules recommandées sera maintenue. Les deux méthodes de phénotypage continueront à être mise en œuvre (isotopique et tests de survie) et les connaissances autour de la résistance à la luméfantine approfondies. Un axe de travail sera également déployé autour de l'efficacité thérapeutique de l'artémether luméfantine, en Guyane, mais aussi au Guyana.

Côté terrain, nous essaierons de mettre en place des campagnes de dépistage réactif des cas autour des derniers foyers de transmission en lien avec SpF en région. Nous poursuivrons également le volet dédié au déficit en G6PD de manière à déterminer la méthode de dosage la plus rapide et performante et à caractériser ce déficit dans les zones

de transmission, tant sur le plan phénotypique que génotypique. L'objectif d'augmenter la couverture de primaquine pour les patients atteints de *P. vivax* aujourd'hui les plus nombreux. Nous tenterons également de mettre au point une méthode de détection et de quantification des gamétocytes dans le sang. La sensibilisation des plus jeunes en milieu scolaire, à la question du paludisme et aux bons gestes à adopter en cas de fièvre sera renforcée. En collaboration avec l'Hôpital de Cayenne, nous poursuivons notre travail de caractérisation du paludisme en zone orpaillée à l'aide de PCR ultra-sensible pour détecter *P. vivax* et *P. falciparum*.