

**Rapport annuel  
d'activité**

**2021**

**Centre de national de  
référence du  
Paludisme**

**Années  
d'exercice  
2019-2020**

## Préambule

Ce rapport présente les activités du CNR du Paludisme pour les années 2019 et 2020, et les principaux faits marquants. Considérant l'organisation du CNR en 2 pôles épidémiologiques, le pôle « zones non endémiques » qui regroupent le laboratoire coordonnateur, et deux laboratoires associés, et le pôle « zones endémiques » avec le laboratoire de l'Institut Pasteur de Cayenne, les données de chaque pôle seront présentées alternativement pour chaque partie du rapport.

## Résumé analytique des activités 2019-2020

### Pôle Zones non endémiques

#### Epidémiologie

##### Le paludisme dans le monde

Le rapport 2020 de l'OMS, sur les données 2019 confirme que le paludisme dans le monde ne recule plus. En effet, depuis 2015, le nombre de cas déclaré reste stable, aux alentours de 230 millions de cas estimés chaque année (229 millions [211-250] en 2019) pour environ 410 000 décès (OMS, 2020). La maladie est endémique dans 87 pays dans le monde mais la transmission est la plus intense en Afrique. Vingt-neuf pays représentent plus de 95% des cas dans le monde. Tous sauf un (Inde 4%) sont situés en Afrique sub-Saharienne.

En 2020, la Covid-19 est apparue comme un défi supplémentaire et redoutable pour la lutte contre le paludisme dans le monde. En effet, la pandémie virale a mis à mal les programmes de lutte contre le paludisme en limitant la mobilité des professionnels de santé et l'accès au traitement, en perturbant la distribution de moustiquaires imprégnées ou la chimio prévention du paludisme saisonnier. A titre indicatif, des projections réalisées par l'OMS estiment que des perturbations de 25 % à 50 % de l'efficacité des systèmes de santé dans la région Afrique pourraient provoquer 46 000 à 90 000 décès supplémentaires. Inévitablement, un défaut de prévention et de prise en charge thérapeutique des cas de paludisme dans les zones endémiques aboutirait à une majoration du risque de transmission pour les résidents et pour les voyageurs.

##### Données pour la France

Pour l'année 2020, un total de 1006 cas de paludisme a été déclaré au Centre national de référence (CNR) du Paludisme par les correspondants du réseau métropolitain, dont trois cas considérés autochtones. Par comparaison, 2 816 cas de paludisme avait été déclaré au CNR dont cinq cas autochtones (3 cas accidentels, 1 cas sans aucune autre indication et 1 cryptique). Cette diminution drastique des cas en 2020 par rapport à 2019 (-64%) est en lien avec la diminution des voyages en zones d'endémie en 2020 du fait des restrictions imposées par la gestion de la Covid-19 (moins 56% de voyageurs vers l'Afrique en 2020 par rapport à 2019).

En 2020, les pays à l'origine des contaminations sont toujours majoritairement situés en Afrique subsaharienne (99,3%). Les patients infectés sont majoritairement d'origine africaine (75,6%), en nette baisse par rapport à 2019 (84,4%). *Plasmodium falciparum* est responsable dans 85,1%, en baisse par rapport à 2019 (87,8%). Un accès à *Plasmodium knowlesi* a été diagnostiqué en 2019, aucun cas en 2020.

On note en 2020 une augmentation significative des cas de paludisme d'importation chez les militaires (64 cas en 2020 versus 31 cas en 2019) alors que le nombre de militaires exposés au risque palustre est resté globalement stable. Une augmentation de la transmission est suspectée.

La proportion des formes graves en 2020, 185/964 (19,2%), est en augmentation par rapport à l'année 2019 (441/2747, 16,1%). Un total de 6 décès a été déclaré, soit une létalité de 0,6% sur l'ensemble des cas et de 3,3% sur les formes graves, là encore en augmentation en proportion par rapport à 2019 (0,33% et 2,1% respectivement). Ces évolutions inquiétantes de l'épidémiologie du paludisme d'importation pourraient être liées à des retards diagnostiques, du fait de perturbations de

la prise en charge des patients suspects de paludisme que l'épidémie de la Covid-19 a engendré (retard pour consulter, errance diagnostique, limitation de l'accès aux soins et retard pour obtenir les résultats d'analyses du paludisme). En effet, le paludisme et la Covid-19 ont des tableaux cliniques similaires (fièvre, frissons, fatigue, arthro-myalgies, signes digestifs, signes respiratoires...) et la clinique seule ne permet pas de distinguer formellement ces deux diagnostics d'autant que des coïnfections ont été documentées.

La levée programmée des restrictions sur les voyages internationaux et l'intensification de la transmission du paludisme dans les pays endémiques sont susceptibles de générer davantage de cas de paludisme d'importation pour la fin de l'année 2021 et l'année 2022. Aussi, il apparaît essentiel de renforcer la prévention du voyageur vis-à-vis du paludisme au départ en zone d'endémie tout en limitant les retards diagnostiques et le risque d'accès graves qui en résulterait au retour en :

- Rappelant aux professionnels de santé l'importance d'évoquer systématiquement un paludisme en cas de fièvre survenant dans les 2 mois suivant le retour de zone endémique.
- Rappelant aux professionnels de santé de rechercher systématiquement un paludisme chez un patient de retour de zone d'endémie même en cas de Covid-19 confirmée (co-infection).
- Rappelant aux professionnels de santé exerçant hors d'une structure de soin hospitalière (médecins du secteur privé) de référer au plus vite au Service d'Accueil des Urgences des hôpitaux les voyageurs avec une fièvre au retour de zone d'endémie palustre (+++ si moins de deux mois) pour une prise en charge diagnostique et thérapeutique rapide et adaptée.
- Rappelant aux biologistes de rechercher systématiquement un paludisme en cas de thrombopénie sans étiologie connue.
- Recommandant aux voyageurs de consulter au Service d'Accueil des Urgences d'hôpitaux en cas de fièvre au retour de zone d'endémie palustre (+++ si moins de deux mois).

Les données sur l'évolution des chimiorésistances aux antipaludiques sont sans particularité par rapport aux années antérieures justifiant les recommandations de chimioprophylaxie du paludisme, en adéquation avec les recommandations internationales. Les sensibilités *in vitro* à la luméfántrine, à la pipéraqúine et à la dihydroartémisinine restent élevées. La sensibilité moyenne des isolats à la chloroquine continue de s'élever du fait de la baisse des pressions sélectives sur les parasites en Afrique. Il n'a pas été mis en évidence de mutations associées à la résistance à l'artémisinine dans les isolats de paludisme d'importation analysés. Le non-respect des recommandations de prévention reste à l'origine de la plupart des cas de paludisme d'importation étudiés.

**Sur le plan de la prise en charge** du paludisme importé, l'association arténimol-pipéraqúine est devenue la première ligne thérapeutique suivie par l'artémether–luméfántrine pour la prise en charge des accès simples suivant les recommandations nationales de 2017.

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

**Sur le plan de l'efficacité et de la tolérance des traitements** du paludisme importé, le nombre d'échecs thérapeutiques aux différentes associations antipaludiques en traitement curatif (arténimol-pipéraqúine, artémether-luméfántrine, atovaquone-proguanil) reste limité mais justifie cependant la recommandation des contrôles post-thérapeutiques tardifs (J28) pour ces médicaments à longue demi-vie d'élimination. Dans aucun cas, parmi les prélèvements expertisés par le CNR, un échec thérapeutique n'a été associé à une résistance avérée aux traitements antipaludiques.

## Pôle Zones endémiques

Pour une vision globale des activités conduites en 2019 et 2020, se référer aux encarts figurant au fil de ce document et aux bulletins de rétro-information figurant en annexe 9 et 10 de ce rapport. En 2019-2020, l'exhaustivité du CNR paludisme pour les isolats de Guyane s'est maintenue à un niveau élevé malgré la pandémie COVID. Le nombre de cas observés en 2019 et 2020 a continué de diminuer avec respectivement 210 et 154 cas déclarés durant ces deux années. Nous nous sommes

dotée d'une méthode complète de diagnostic d'espèce par PCR en temps réel, accréditée, détectant les cinq espèces, *P. knowlesi* inclus, et ce à partir de sang veineux ou sang capillaire recueilli sur papier buvard.

Le niveau de sensibilité *in vitro* aux antipaludiques a été déterminé par deux méthodes dont l'une a permis d'identifier un haut niveau de résistance à la pipéraquline en Guyane, 39,7% IC<sub>95</sub> [31,3 – 48,1] (n=131) sur la période analysée. En ce basant sur les résultats de génotypage, nous en avons déduit que près de 75% des isolats sont résistants à cette molécule ces dernières années et que cette résistance a commencé à être sélectionnée en 2002.

Les programmes de recherche opérationnelle ont été nombreux et ont largement participé au recul de l'endémie. PALUSTOP réalisé sur la commune de St Georges de l'Oyapock a permis de tester et de prendre en charge en cas de positivité 1250 patients qui ont été suivis pendant une année. Ainsi la prévalence du paludisme dans cette zone est passée de 6,7% IC<sub>95</sub> [5,4 - 7,0] en 2017 à 2,9% IC<sub>95</sub> [1,9 - 3,9] en 2018 (p<0,001). Aux côtés de Palustop, MALAKIT a permis de distribuer des kits d'auto-diagnostic et d'autotraitement auprès de 3471 orpailleurs. La prévalence observée du paludisme chez les orpailleurs en 2015 de 22,3% [18,3-26,3] est passée à 5,3% [3,0-7,5] en 2018. Ces résultats sont cependant à analyser avec précaution puisque sur la même période, la transmission du paludisme a globalement diminué partout. Une analyse est en cours pour évaluer l'impact direct de cette approche sur la transmission du paludisme en forêt. La proportion de *P. vivax* parmi les positifs a augmentée entre les deux études (42% vs 75%), ce qui est le signe d'une meilleure prise en charge puisque *P. falciparum* a reculé.

Au-delà de la Guyane, nous avons confirmé la circulation de parasites résistants aux artémisinines au Guyana, 8,8% de mutant *pfK13* C580Y en Région 1 et montré que la présence de cette mutation est synonyme de résistance aux artémisinines *in vitro*. Une étude d'efficacité thérapeutique sera conduite en 2022 pour évaluer son impact sur l'efficacité de l'artéméther/luméfantrine. A l'échelle régionale nous avons aussi évalué le risque de dispersion dans la région. Deux poches de mouvements humains en zone d'endémie ont été observées, une entre le Guyana, le Venezuela et le nord Brésil et une autre en Guyane, Suriname et nord-est brésilien. L'analyse des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* ne montre pas de signe de délétion des parasites dans notre zone amazonienne est.

## Summary

### Pôle Zones non endémiques

#### Epidemiology

##### Malaria in the world

The WHO 2020 report, on 2019 data confirms that malaria in the world is no longer declining. Indeed, since 2015, the number of reported cases has remained stable at around 230 million estimated cases each year (229 million [211-250] in 2019) for about 410,000 deaths (WHO, 2020). The disease is endemic in 87 countries worldwide, but transmission is most intense in Africa. Twenty-nine countries account for more than 95% of cases worldwide, all but one (India 4%) located in sub-Saharan Africa.

In 2020, Covid-19 has emerged as an additional and formidable challenge to the fight against malaria worldwide. The viral pandemic has undermined malaria control programs by limiting the mobility of health professionals, access to treatment, and disrupting the distribution of impregnated bed nets or chemoprevention of seasonal malaria. WHO projections estimate that disruptions of 25% to 50% in the effectiveness of health systems in the African region could result in 46,000 to 90,000 additional deaths. Inevitably, a failure to prevent and treat malaria in endemic areas would lead to an increased risk of transmission for residents and travelers.

## Data for France:

For the year 2020, a total of 1006 malaria cases were reported to the National Reference Center (CNR) for Malaria by the correspondents of the metropolitan network, including four presumed indigenous cases (airport). This corresponds to a drastic decrease in cases, -64% compared to 2019 (2816 reported cases), in connection with the decrease in travel to endemic areas in 2020 due to restrictions imposed by the management of Covid-19 (56% fewer travelers to Africa in 2020 than in 2019).

The countries of origin of infections are still predominantly located in sub-Saharan Africa (99.3%). Most infected patients are of African origin (75.6%), down significantly from 2019 (84.4%). *Plasmodium falciparum* is responsible in 85.1%, down from 2019 (87.8%). No *Plasmodium knowlesi* malaria case was diagnosed in 2020 but one case in 2019.

This year, there was a significant increase in imported malaria cases among military personnel (64 cases in 2020 versus 31 cases in 2019), while the number of military personnel exposed to malaria risk remained stable overall. An increase in transmission is likely.

The proportion of severe forms, 185/964 (19.2%), is up from 2019 (441/2747, 16.1%). A total of 6 deaths were reported, representing a case fatality of 0.6% overall and 3.3% for severe cases, again increasing in proportion compared to 2019 (0.33% and 2.1% respectively). These worrying trends in the epidemiology of imported malaria could be linked to diagnostic delays, due to disruptions in the management of suspected malaria patients caused by the Covid-19 epidemic (delay in consulting a doctor, diagnostic wandering, limitation of access to care and delay in obtaining malaria test results). Indeed, malaria and Covid-19 have similar clinical pictures (fever, chills, fatigue, arthro-myalgia, digestive signs, respiratory signs...) and the clinic alone does not allow to formally distinguish these two diagnoses, especially since co-infections have been documented.

The planned lifting of restrictions on international travel and the intensification of malaria transmission in endemic countries are likely to generate more cases of imported malaria by the end of 2021 and 2022. Therefore, it appears essential to strengthen malaria prevention for travelers to endemic areas while limiting diagnostic delays and the risk of severe malaria attacks upon return to the country:

- Reminding health professionals of the importance of systematically evoking malaria in case of fever occurring within 2 months after return from an endemic area
- Reminding health professionals to look for malaria in a patient returning from an endemic area even in case of confirmed Covid-19 (co-infection).
- Reminding health professionals working outside of a hospital (private physicians) to refer travelers with fever to the hospital Emergency Department as soon as possible upon return from a malaria endemic area for rapid and appropriate diagnostic and therapeutic management.
- Reminding biologists to systematically search for malaria in case of thrombocytopenia without known etiology.
- Recommending to travelers to consult the Hospital Emergency Department in case of fever upon return from a malaria endemic area

The data on the evolution of antimalarial resistance are without particularity compared to the previous year's justifying the recommendations of chemoprophylaxis for malaria, in adequacy with the international recommendations. *In vitro* sensitivities to lumefantrine, piperaquine and dihydroartemisinin remain high. The average susceptibility of isolates to chloroquine continues to rise due to the decline in selective pressures in Africa. There was no evidence of mutations associated with artemisinin resistance in the imported malaria isolates tested. Non-compliance with prevention recommendations remains at the root of most of the imported malaria cases studied.

In terms of the management of imported malaria, the dihydroartemisinin-piperaquine combination has become the first line of therapy followed by artemether-lumefantrine for the management of simple malaria access.

The post-therapeutic surveillance recommended by the 2018 update of the 2007 revision of the 1999 consensus conference for the management of *Plasmodium falciparum* malaria remains incomplete.

In terms of the efficacy and safety of imported malaria treatments, the few therapeutic failures of dihydroartemisinin-piperaquine, artemether-lumefantrine and atovaquone-proguanil, in curative treatment prompt the recommendation of late post-treatment controls (D28) for these drugs with a long elimination half-life.

## Pôle Zones endémiques

For an overview of our 2019-2020 activities, refer to the inserts appearing throughout this document and the feedback bulletins in appendix 7 and... of this report. In 2019-2020, the completeness of the NRC for French Guianese isolates remained high despite the COVID19 pandemic. The number of cases observed in French Guiana in 2019 and 2020 continued to decrease with 210 and 154 cases respectively. We have adopted a complete method of species diagnosis by real-time PCR, accredited, detecting all five species, *P. knowlesi* included, from venous or capillary blood collected or not on dry blood spots.

The level of *in vitro* sensitivity to antimalarials was determined by two methods and the survival method identified a high level of resistance to piperaquine in French Guiana, 39.7% IC<sub>95</sub> [31.3 - 48.1] (n = 131). Based on the genotyping results, we deduced that nearly 75% of isolates were resistant to piperaquine in the recent years and that this resistance began to be selected in 2002.

Operational research programs have been numerous and have largely contributed to reducing the endemic burden. PALUSTOP, carried out in the town of St Georges de Oyapock, allowed 1,250 patients to be tested and treated in the event of positivity. They were followed for one year. Thus, the prevalence of malaria in this zone went from 6.7% IC<sub>95</sub> [5.4 - 7.0] in 2017 to 2.9% IC<sub>95</sub> [1.9 - 3.9] in 2018 (p <0.001). Along with Palustop, MALAKIT distributes self-diagnosis and self-treatment kits to 3,471 gold miners working in French Guiana. The observed prevalence of malaria among miners decreased from 22.3% [18.3-26.3] in 2015 to 5.3% [3.0-7.5] in 2018. However, these results are to be analyzed with caution since over the same period, the transmission of malaria has generally decreased everywhere. An analysis is underway to assess the direct impact of this approach on the transmission of malaria in forests. The proportion of *P. vivax* among the positive cases increased between the two studies (42% vs 75%), which is a sign of better care since *P. falciparum* has declined.

Beyond French Guiana, we confirmed the circulation of 8.8% of parasites carrying the *pfK13* C580Y mutant in Region 1 in Guyana in 2016/2017. This presence is synonymous of resistance to artemisinins *in vitro*. A therapeutic efficacy study will be conducted in 2022 to assess its impact on the treatment efficacy of artemether / lumefantrine. At the regional level, we also assessed the risk of spread of these resistant mutants in the region. Two pockets of human movement in endemic areas were observed, one between Guyana, Venezuela and Northern Brazil and another between in French Guiana, Suriname and Northeast Brazil. Analysis of the *pfhrp2* and *pfhrp3* genes does not show any sign of deletion of the parasites in our East Amazonia region.

## TABLE DES MATIERES

---

<b>Table des matières</b>	<b>7</b>
<b>Table des figures</b>	<b>10</b>
<b>Table des tableaux</b>	<b>12</b>
<b>1 Missions et organisation du CNR</b>	<b>13</b>
1.1 Pôle Zones non endémiques .....	13
1.2 Pôle Zones endémiques.....	13
<b>2 Activités d'expertise</b>	<b>13</b>
2.1 Evolutions des techniques .....	14
Pôle Zones non endémiques .....	14
Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane.....	16
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et troussees .....	16
Pole Zones non endémiques .....	16
Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane.....	17
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires .....	17
Pôle Zones non Endémiques .....	17
Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane.....	17
2.4 Collection de matériel biologique .....	17
Pôle Zones non Endémiques .....	17
Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane.....	17
2.5 Activités d'expertise .....	18
Pôle Zones non Endémiques .....	18
Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane.....	19
2.6 Activités de séquençage .....	20
Pôle Zones non Endémiques .....	20
Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane.....	20
<b>3 Activités de surveillance</b>	<b>22</b>
3.1 Réseau de partenaires .....	23
Pôle Zones non Endémiques .....	23
3.1.2 Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane.....	24

3.2	Surveillance de l'évolution et des caractéristiques du paludisme .....	28
	Pôle Zones non Endémiques .....	28
	Distribution des cas de paludismes aux Antilles.....	36
	Distribution des cas de paludisme à Mayotte .....	36
	Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane.....	36
3.3	Surveillance de la résistance de <i>P. falciparum</i> aux antipaludiques.....	38
	3.3.1 Surveillance des résistances de <i>P. falciparum</i> aux antipaludiques en zones non endémiques .....	38
	3.3.2 Surveillance des résistances de <i>P. falciparum</i> aux antipaludiques en Guyane .....	41
3.4	Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux.....	43
	Contribution à la surveillance du paludisme autochtone .....	43
	Contribution à la surveillance du paludisme d'importation.....	43
	Contribution à la surveillance du paludisme endémique.....	43
	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 .....	44
3.5	Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance .....	44
	<i>P. ovale wallikeri</i> et <i>P. ovale curtisi</i> : du développement d'une méthode de différenciation à l'analyse rétrospective des cas du CNRP, période 2013-2018. ....	44
	Evaluation des performances analytiques du réactif Ampliquick® Malaria.....	45
	Evaluation des performances analytiques du réactif Ampliquick® Malaria.....	45
	Phylogénie des isolats de paludisme autochtone pour déterminer l'origine géographique de la transmission.....	45
	Mise en place d'un laboratoire de chimiosensibilité <i>in vitro</i> à l'Hôpital Principal de Dakar (Sénégal) et évaluation du niveau de résistance aux antipaludiques au Sénégal.....	46
	Evaluation du paludisme en Mauritanie .....	47
	ELIMALAR.....	47
	Prévalence des délétions des gènes <i>pfhrp2</i> et <i>pfhrp3</i> chez <i>Plasmodium falciparum</i> sur le plateau des Guyanes. ....	52
<b>4</b>	<b>Alerte</b> .....	<b>52</b>
4.1	Pole Zones non Endémiques .....	52
4.2	Phénomènes ayant fait l'objet d'un signalement ou d'une alerte.....	53
4.3	Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane.....	53
<b>5</b>	<b>Activités d'information, de formation et de conseil</b> .....	<b>53</b>



5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé .....	53
Pôle Zones non endémiques .....	53
5.1.2 Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane.....	54
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires.....	54
Pôle Zones non Endémiques .....	54
5.2.2 Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane.....	55
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public...).....	55
Pôle Métropole .....	55
5.3.2 Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane.....	56
<b>6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR</b>	<b>56</b>
6.1 Activités de recherche en lien direct avec les activités et missions de CNR .....	56
6.1.1 Pole Zones non Endémiques.....	56
6.1.2 Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane.....	58
6.2 Liste des publications et communications en lien direct avec les activités et missions de CNR....	59
<b>7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux</b>	<b>63</b>
<b>8 Programme d'activité 2021 et 2022</b>	<b>63</b>
<b>9 Références bibliographiques</b>	<b>64</b>

## TABLE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Nombre d'isolats reçus au Pôle Zones endémiques en provenance du plateau des Guyanes, entre 2012 et 2020.....	14
<b>Figure 2.</b> Recrutement et exhaustivité atteints entre 2010 et 2020 par le Pôle Zones endémiques.....	22
<b>Figure 3.</b> Taux de survie de <i>P. falciparum</i> après .....	23
<b>Figure 4.</b> Réseau de partenaires guyanais.....	24
<b>Figure 5.</b> Carte du risque de paludisme en Guyane, octobre 2019. ....	27
<b>Figure 6.</b> Carte de l'île de Mayotte.....	28
<b>Figure 7 :</b> 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 2019, N=2218. ....	29
<b>Figure 8 :</b> 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 2020, N=829. ....	29
<b>Figure 9 :</b> Evolution du paludisme d'importation, cas déclarés, cas estimés, France métropolitaine 1986 à 2020.....	30
<b>Figure 10.</b> 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 2020, n = 1005.....	30
<b>Figure 11 :</b> Panel A. Evolution du nombre de voyageurs vers les zones d'endémies pour le paludisme, totaux et par continents, France métropolitaine 1985 à 2020. Panel B. Variation du nombre de voyageurs vers les zones impaludées par région, France métropolitaine, 2019-2020. (Source Direction Générale de l'Aviation Civile).....	31
<b>Figure 12 :</b> Proportion par espèce identifiée en 2019 et en 2020, France métropolitaine. ....	31
<b>Figure 13 .</b> Evolution annuelle des proportions de paludisme d'importation des sujets d'origine africaine (en rouge) et caucasienne (en bleu) entre 1996 et 2020.....	33
<b>Figure 14.</b> Evolution des cas graves de paludisme d'importation, France métropolitaine, 1996-2020.....	34
<b>Figure 15.</b> Evolution de la létalité globale et de la létalité spécifique chez les patients avec un accès grave, France métropolitaine, 1996-2020.....	35
<b>Figure 16.</b> Evolution du nombre de paludisme en Guyane entre 2008 et 2020.....	37
<b>Figure 17.</b> Evolution du nombre de cas grave et hospitalisés liés au paludisme en Guyane entre 2011 et 2017. ....	37
<b>Figure 18 :</b> Répartition croisée des CI <sub>50</sub> de la DHA et de la pipéraquline.....	39
<b>Figure 19</b> Répartition croisée des CI <sub>50</sub> de la DHA et de l'amodiaquine.....	39
<b>Figure 20.</b> Phénotypage des isolats vis-à-vis de onze antipaludiques, 2018-2020. ....	42

<b>Figure 21.</b> Sensibilité de <i>P. falciparum</i> à la pipéraquline en Guyane. A) génotype associé et B) évolution observée dans le temps de la mutation pfcrt C350R (mutants en rouge, sauvage en bleu). .....	43
<b>Figure 22 :</b> Phylogénie des isolats autochtones (avec astérisques) de <i>P. falciparum</i> comparée aux données du Malariagen .....	46
<b>Figure 23.</b> Quartiers ciblés par les campagnes de dépistage actif (en jaune), PALUSTOP, Saint Georges de l'Oyapock, 2017 et 2018. ....	48
<b>Figure 24.</b> Prévalence par PCR de <i>Plasmodium</i> spp., Saint Georges de l'Oyapock, 2017 et 2018. ....	48
<b>Figure 25.</b> Pratiques vis-à-vis du paludisme, Saint Georges de l'Oyapock, 2017.....	49
<b>Figure 26.</b> Langue maternelle des habitants de l'étude PALUSTOP, Saint Georges de l'Oyapock, 2017.....	49
<b>Figure 27.</b> Mouvement des cas de paludisme à <i>Plasmodium falciparum</i> , entre le lieu potentiel de contamination et le lieu de diagnostic au Guyana (A) et en Amazonie (B), 2015-2018.....	51
<b>Figure 28.</b> Distribution des mutations pfk13 en Amazonie entre 1983 et 2019.....	51

## TABLE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1.</b> Seuil de détection de la PCR en temps réel accréditée NF EN ISO 15189 permettant de diagnostiquer les différentes espèces plasmodiales en parasites/microlitre de sang total.....	16
<b>Tableau 2</b> Synthèse des échantillons adressés par les correspondants du CNR ou les services cliniques extérieurs pour le diagnostic et la prévention de l'anémie différée post artésunate (PADH).....	19
<b>Tableau 3.</b> Activités d'expertise réalisées en 2019-2020 en lien avec le nombre d'isolats reçus. ....	19
<b>Tableau 4 :</b> Cas déclarés et cas estimés de paludisme en France métropolitaine, tendances évolutives 2013 -2019 .....	23
<b>Tableau 5.</b> Partenaires actifs du Pôle Zones endémiques en Guyane: localisation, fréquence des liaisons avec Cayenne et niveau de participation à la surveillance biologique du paludisme en 2019-2020.....	26
<b>Tableau 6</b> Régions de contamination des cas déclarés en 2020 comparés à 2019 .....	32
<b>Tableau 7.</b> Traitement curatif en première intention des accès palustres simples, France métropolitaine, 2019-2020. ....	33
<b>Tableau 8.</b> Traitement curatif en première intention des accès palustres graves, France métropolitaine, 2019-2020. ....	34
<b>Tableau 9 :</b> Seuils de chimiosensibilité et répartition des isolats testés en fonction de leur CI50 aux antipaludiques .....	38

# 1 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

---

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 les années 2019 et 2020 par rapport à l'année précédente.

## 1.1 POLE ZONES NON ENDEMIQUES

Les annexes ont été mises à jour concernant les équipes, les locaux et les collections.

La démarche d'accréditation des laboratoires du CNR Paludisme se poursuit : tous les laboratoires sont accrédités pour le diagnostic du paludisme. Le laboratoire coordonnateur a déposé une demande d'extension pour l'antipaludogramme.

## 1.2 POLE ZONES ENDEMIQUES

Les annexes ont été mises à jour concernant l'équipe et la taille des collections.

# 2 ACTIVITES D'EXPERTISE

---

## **Pôle Zones non Endémiques – Eléments clés**

Entre 2019 et 2020, il a été déclaré sur la base sécurisée Internet <https://ssl.voozanoo.net/palu> du CNR du Paludisme :

- 4093 fiches déclarées par les correspondants du CNR Paludisme

- 3439 isolats associés aux déclarations transmis aux laboratoires du CNR du paludisme dont 2619 au laboratoire coordonnateur et 820 au laboratoire associé de l'IRBA, pour l'étude de la chimiosensibilité aux antipaludiques et la confirmation du diagnostic d'espèce, et 824 au laboratoire associé de la Pitié-Salpêtrière pour l'expertise des accès graves, par les hôpitaux correspondants du CNR qui participent à l'expertise biologique des isolats des *Plasmodium sp.*

De plus, en 2019-20, le laboratoire coordonnateur de Bichat a reçu 212 prélèvements sanguins, non associés à une déclaration épidémiologique d'un cas de paludisme dont 5 prélèvements transmis par l'Etablissement Français du Sang dans le contexte de la prévention du paludisme transfusionnel (PCR négatives pour qualifier un donneur à risque).

L'analyse avec en corollaire, l'étude des marqueurs moléculaires associés à la résistance aux antipaludiques actuels est réalisée dans les laboratoires du CNR Paludisme, et particulièrement dans le cas des échecs thérapeutiques aux CTA (combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine. Dans aucun cas d'échec thérapeutique tardif, celui-ci a été expliqué par une résistance moléculaire.

Sur les prélèvements transmis, les laboratoires de Bichat et de l'IRBA ont réalisé 1484 génotypages pour l'étude des résistances aux antipaludiques et 515 phénotypages pour l'étude de la sensibilité aux antipaludiques. Le laboratoire de la Pitié a réalisé, sur 825 échantillons de 301 patients, le contrôle des parasitémiés et la mesure des érythrocytes pitéés pour le dépistage de l'anémie retardée après traitement par l'artésunate intraveineux.

Neuf cas (5 en 2019 et 4 en 2020) de paludisme autochtone ont fait l'objet d'une déclaration obligatoire (DO) en France métropolitaine. Ils ont été explorés en relation avec l'agence de Santé Publique France.

## Pôle Zones Endémiques – Éléments clés

L'endémie palustre en Guyane en 2019-2020 a continué à baisser avec 210 cas déclarés à la CIRE Guyane en 2019 et 154 en 2020 (**Figure 1**). Côté recherche opérationnel, des analyses de diagnostics d'espèces ont été effectuées dans le cadre du projet Malakit en 2019 mais les actions de terrain ont été limitées en 2020 du fait de la pandémie COVID.

En 2019/2020, les activités internationales se sont poursuivies pour suivre les mutations en lien avec la résistance aux artémisinines et les délétions des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* au Guyana et au Venezuela.

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

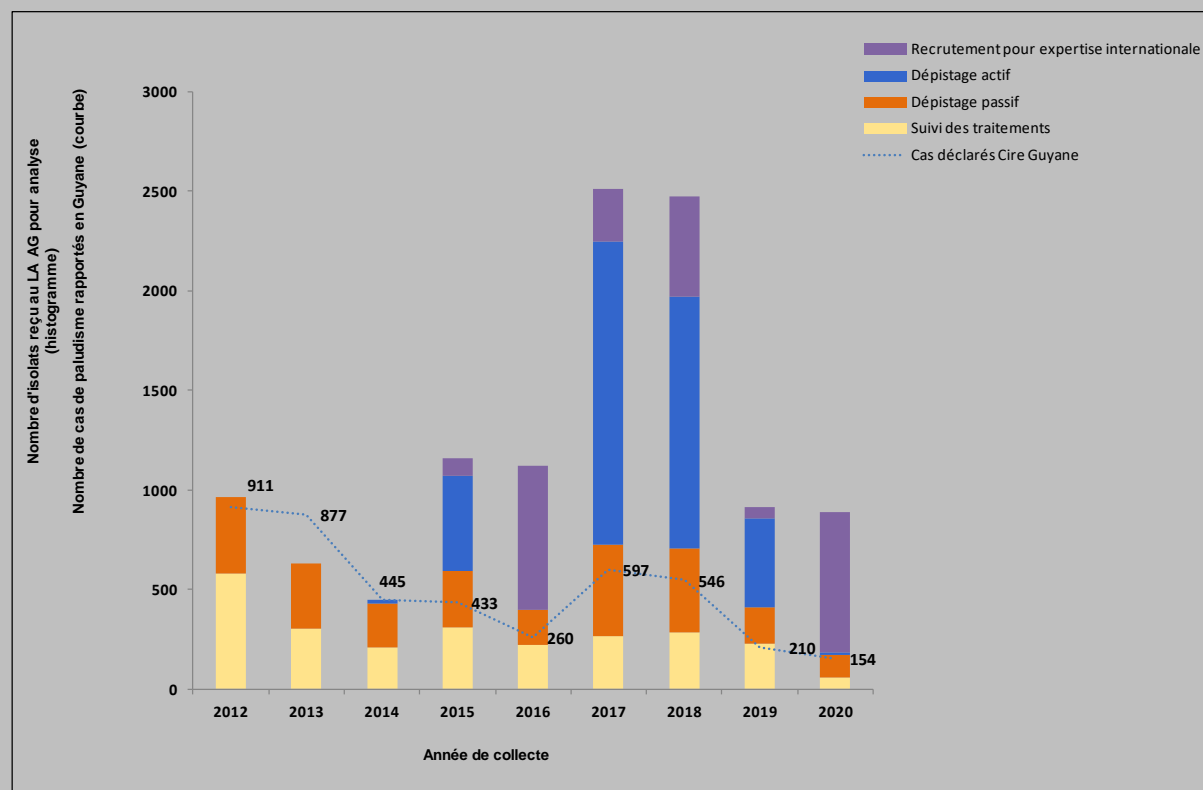


Figure 1. Nombre d'isolats reçus au Pôle Zones endémiques en provenance du plateau des Guyanes, entre 2012 et 2020.

Courbes : nombre de cas déclarés à la CIRE Guyane. Histogrammes : nombre d'isolats reçus et dans quel cadre.

## 2.1 ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES

### Pôle Zones non endémiques

Le laboratoire coordonnateur de Bichat a développé le NGS après amplification de l'ADN plasmodial.

Le laboratoire associé de la Pitié-Salpêtrière, développe un projet de diagnostic automatique du paludisme de nouvelle génération « en microscopie augmentée » :

#### *Optical Twin for Diagnosis (OT4D)*

Les applications de l'IA en diagnostic et sont nombreuses, mais restent limitées dans le domaine des maladies du sang, en particulier pour l'intégration des données cytologiques. **L'apprentissage automatique et la représentation des connaissances en microscopie interviennent pour, d'une part, la reconstruction d'une image mieux résolue et, d'autre part, la détection et la**

**classification des cellules et inclusions.** Ces approches ont déjà fait leurs preuves dans d'autres domaines<sup>1</sup> et sont transférables dans le contexte des maladies du sang.

OT4D est un laboratoire commun (financement ANR) entre l'équipe « Développement hématopoïétique et leucémique » du Centre de Recherche Saint-Antoine (Pr François Delhommeau)-CRSA de Sorbonne Université et l'entreprise TRIBVN<sup>2</sup>, auquel le CNR du Paludisme site Pitié-Salpêtrière est associé pour le diagnostic du paludisme. Il est dédié au **développement de nouvelles approches en microscopie optique couplées à l'intelligence artificielle pour le diagnostic, la stratification pronostique et le suivi des maladies du sang**. Le programme d'OT4D consiste à développer un outil de microscopie de nouvelle génération introduisant deux innovations :

**(1) Production d'un "jumeau optique"** par holographie de synthèse<sup>3</sup> permettant une représentation 3D multimodale en intensité et en phase des éléments du sang et de la moelle osseuse avec une très grande résolution.

**(2) L'exploitation d'outils d'intelligence artificielle** afin d'exploiter les données produites, en pré, per, et post-analytique<sup>4</sup>.

L'approche du LabCom repose sur l'exploitation d'un dispositif de microscopie à super-résolution incluant un système d'excitation des spécimens à base de matrices de diodes et un système d'acquisition rapide déjà existant. Ce système a déjà été breveté par TRIBVN<sup>5</sup> et servira de point de départ technologique à ce programme. L'objectif de ce LabCom consiste à mettre à profit le jumeau optique généré avec cette technologie pour développer des méthodes prédictives appliquées aux LAM.

Les méthodes d'apprentissage automatique par entraînement des réseaux de neurones profonds sont applicables à différentes étapes de l'imagerie du jumeau optique :

1. Focalisation individuelle des objets cibles ;
2. Constitution d'images en couleurs à partir des couleurs de base rouge, vert, bleu ;
3. Repérage de cibles, cellules, compartiments cellulaires, inclusions.

Le projet prévoit pour la Parasitologie le développement de modèles d'apprentissage sur frottis colorés et sur frottis non colorés à plusieurs niveaux :

- Détection et identification des hématies, des plaquettes des leucocytes et des GR normaux.
- Détection de GR infectés par un *Plasmodium* et identification des différents stades parasitaires.
- Reconnaissances des espèces parasitaires.
- Mesure automatique de la parasitémie.

**Le système développé permettra de déployer dans les laboratoires de biologie médicale des microscopes OT4D capables de produire, à partir de frottis de sang et/ou de moelle osseuse, des diagnostics rapides, précis, et prédictifs.**

Personnels impliqués pour le CNR du Paludisme à la Pitié-Salpêtrière :

Aniss Acherar (Etudiant en thèse de science IA et diagnostic du Paludisme sous la direction du Pr Renaud Piarroux), Jean-Yves Brossas (Ingénieur), Sylvestre Biligui (Technicien), Renaud Piarroux (PU-PH), Ilhame Tantaoui (PA) et Marc Thellier (MCU-PH).

---

<sup>1</sup> Yair Rivenson, et al., "Deep learning microscopy," *Optica* 4, 1437-1443 (2017)

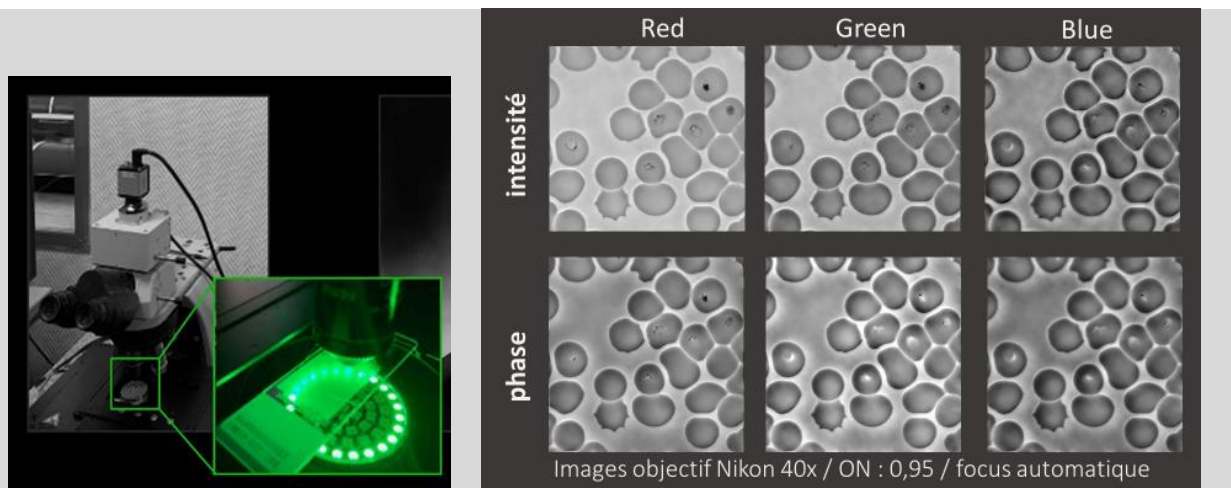
<sup>2</sup> TRIBVN <https://www.tribvn-hc.com/fr/>

<sup>3</sup> Procédé d'enregistrement de la phase et de l'amplitude de l'onde diffractée permettant de restituer une image 3D de l'objet.

<sup>4</sup> Traitement des objets numériques, détection d'événements rares, identification et quantification des éléments, établissement d'un diagnostic et prédiction de caractéristiques biologiques, génomiques et pronostiques.

<sup>5</sup> Entre TRIBVN, l'Université de Reims et Mines Paris Cf INPI sous les références FR2983963, FR2877102 et EP1599050.

## Qu'est-ce qu'un jumeau optique ?



Un jumeau optique, ou *Optical Twin*, est une représentation numérique du spécimen biologique obtenue par : (1) l'acquisition d'images issues de l'échantillon après son interaction avec une sonde optique, (2) l'exploitation d'un modèle physique du couple échantillon-microscope et (3) la visualisation de l'échantillon sous des conditions paramétrables à partir des images acquises grâce à un module de simulation. Dans le cadre de l'équipement prévu dans ce projet, l'éclairage successif avec des sources multiples permet de reconstruire son modèle électromagnétique et de calculer des représentations spécifiques (intensité, phase, imagerie fond-clair/sombre, multi-z, etc ...). Ceci, afin de rendre perceptibles des détails morphologiques antérieurement inaccessibles par l'œil humain ou par l'intelligence artificielle.

Le laboratoire associé de Marseille a développé nouvelles techniques pour identifier et valider de nouveaux marqueurs moléculaires potentiellement impliqués dans la résistance aux antipaludiques (gènes *pfcr1*, *pfmdr5*, *pfmdr6*, RING E3 ubiquitin protein ligase, *pfact*, *pfugt*, *pfcarl*, *pfcoronine*, *pfplasmepsine 2* ...).

**Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane**

En 2019/2020, le pôle zone endémique a amélioré la PCR diagnostique d'espèce en temps réel et étendue cette dernière à l'identification de *P. knowlesi* et à la matrice sang capillaire recueilli sur papier buvard. Les sensibilités de détections sont spécifiées dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1.** Seuil de détection de la PCR en temps réel accréditée NF EN ISO 15189 permettant de diagnostiquer les différentes espèces plasmodiales en parasites/microlitre de sang total

	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. knowlesi</i>
Sang veineux	1	0,5	5	1	1
Sang capillaire	20	5	125	20	5

Le laboratoire a également :

- affiné sa méthode de détermination du nombre de copies des gènes codant la plasmepsine 2 et 3 en multiplexant l'analyse,
- mis au point une méthode de génotypage complet du gène codant pour la G6PD humaine.

## 2.2 TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES

**Pole Zones non endémiques**

Le laboratoire coordonnateur de Bichat a finalisé l'évaluation d'un test de PCR rapide, Ampliquick® Malaria, distribué par Biosynex, qui détecte l'ADN plasmodial spécifique de *P. falciparum* et celui de toutes les espèces, à partir d'une extraction conventionnelle d'ADN ou à partir d'une extraction rapide.



#### 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* prédomine de plus en plus notamment par le fait que les accès sont probablement essentiellement à des reviviscences davantage qu'à des réinfections. Le traitement inclut 3 jours de chloroquine associés dans un second temps à 14 jours primaquine contre les hypnozoïtes. La primaquine pouvant générer des anémies hémolytiques chez les patients souffrant d'un déficit en G6PD, un dosage de cette enzyme avant prescription est obligatoire.

A l'heure actuelle, l'obtention d'un dosage en G6PD en Guyane est longue puisqu'il est réalisé en France hexagonale et les conditions pré-analytiques sont exigeantes. De ce fait, la couverture en primaquine est limitée notamment dans les zones reculées le long de l'Oyapock. Ainsi, les patients font généralement un accès de reviviscence avant de se voir prescrire de la primaquine.

Pour tenter d'améliorer la prise en charge et poursuivre notre chemin vers l'élimination, le projet G6PD facile a été monté en 2019 et 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. Un co-financement ARS a été obtenu pour le mener à bien et les autorisations administratives et éthiques obtenues en 2020. 2021 sera l'année des inclusions. L'enjeu est d'inclure suffisamment de patients déficitaires (n=50) compte tenu de la faible proportion de patients déficitaires sévères en Guyane. Ce projet s'effectue en collaboration avec le laboratoire de parasitologie-mycologie de l'Hôpital de Cayenne et avec le laboratoire du globule rouge du laboratoire universitaire de l'Hôpital Henri Mondor.

### 2.3 TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES

#### Pôle Zones non Endémiques

Aucune technique n'a été transférée.

#### Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

En 2019-2020, la méthode de PCR multiplex a été partagée avec le pôle zone non-endémiques à Bichat pour test et éventuellement mise en place.

### 2.4 COLLECTION DE MATERIEL 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 suffisants, 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.

Au laboratoire associé de la Pitié-Salpêtrière, le sang total et les plasmas des prélèvements sanguins reçus sont conservés à -20°C. L'ADN parasitaire est lui aussi le plus souvent extrait et conservé à -20°C.

#### Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

Les isolats de *P. falciparum* sont systématiquement mis en culture afin de développer une 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%. Ce succès intervient parfois jusqu'à 7 jours après le prélèvement des parasites. Le plus tôt étant bien évidemment le mieux. Ainsi en 2019-2020, 14 isolats de *P. falciparum*

ont été adaptés à la multiplication *in vitro*. L'état précis de la collection en lien avec les activités du CNR figurent en annexe 1.

En 2019-2020, du matériel a été partagé avec :

- Avec l'équipe de N. Taudon de l'IRBA à Brétigny sur Orge de manière à caractériser les échecs thérapeutiques à la dihydroartémisinine/pipéraquline,
- Avec l'équipe de Dan Neafsey de l'Université d'Harvard (sang capillaire collecté sur papier buvard collectés au Guyana en 2016-2017) pour mieux comprendre l'émergence de la résistance à l'artémisinine en Amérique du Sud,
- Avec l'équipe de Françoise benoit-Vical pour l'étude de la résistance à l'atovaquone *in vitro*,
- Avec le laboratoire de biologie médicale de l'Institut Pasteur de la Guyane comme témoin négatif de techniques,
- Avec le laboratoire de biologie médicale d'Eurofins de Rémire-Montjoly comme témoin positif de techniques.

## 2.5 ACTIVITES D'EXPERTISE

### Pôle Zones non Endémiques

En 2019-20, le Pôle Zones non endémiques a reçu 3439 isolats de patients impaludés transmis par les correspondants hospitaliers. Parmi ces isolats, on a confirmé 2977 infectés par *P. falciparum* seul ou associé à une autre espèce, 41 par *P. vivax*, 235 par *P. ovale*, 81 par *P. malariae*, 1 par *P. knowlesi*.

En 2019-20, 215 tests *in vitro* de chimiosensibilité ont permis d'évaluer la sensibilité des isolats de *P. falciparum* aux antipaludiques : chloroquine, amodiaquine, pipéraquline, méfloquine, quinine, dihydroartémisinine, pyronaridine, doxycycline.

Les études de génotypage ont portées sur 1484 isolats pour lesquels au moins un marqueur moléculaire de résistance a été analysé en 2019-2020:

l'étude du gène *pfcytb*, impliqué dans la résistance à l'atovaquone-proguanil, qui a été réalisée pour 84 isolats de *P. falciparum*,

l'étude du gène *pfprt*, impliqué dans la résistance à la chloroquine, qui a été réalisée pour 1047 isolats de *P. falciparum*,

l'étude du gène *pfdhfr*, impliqué dans la résistance au proguanil, qui a été réalisée pour 1013 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 1381 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 162 isolats de *P. falciparum*,

l'étude du gène *pfK13*, impliqué dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine, qui a été réalisée pour 1409 isolats de *P. falciparum*.

Excepté les PCR diagnostiques d'espèce dont les résultats sont communiqués aux prescripteurs dans un délai maximum de sept jours, les autres analyses font l'objet d'analyses groupées au cours de l'année dans l'objectif d'un suivi épidémiologique des tendances. Des analyses par dossier peuvent se faire en cas d'échec thérapeutique mais pas à visée de prise en charge compte-tenu des délais d'obtention des résultats, sauf en cas de sollicitation du clinicien et si les résultats sont disponibles. Les résultats sont accessibles aux correspondants via le serveur sécurisé Voozanoo.

Pour l'expertise des accès graves, le laboratoire du site de la Pitié Salpêtrière a reçu des échantillons sang de patients avec un accès grave pour le contrôle de la parasitémie (J0), le contrôle de l'efficacité thérapeutique (J des suivis), l'exclusion d'une co-infection (PCR) et la prédiction et le suivi du risque de PADH (J3, J7 et >) (**Tableau 2**). Les résultats validés biologiquement sont rendus aux correspondants via le SGL du laboratoire (Glims) avec un commentaire et des conseils de prise en charge/surveillance.

**Tableau 2** Synthèse des échantillons adressés par les correspondants du CNR ou les services cliniques extérieurs pour le diagnostic et la prévention de l'anémie différée post artésunate (PADH)

Année	Echantillons (N)	Patients (N)	Parasitémie (N)	Espèce (PCR) (N)	TDR-HRP2 1/500 (J3-J7) (N)
2019	535	176	174	145	302
2020	289	125	125	117	142

#### Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

En 2019-2020, le Pôle Zones endémiques a reçu 281 isolats de patients impaludés en provenance de 10 partenaires (**Tableau 3**). Parmi ces isolats, on en dénombrait 18 infectés par *P. falciparum*, 263 par *P. vivax*, deux cas par *P. malariae* et un cas à *P. ovale* importé du Guinée. Ont également été reçus, 18 isolats négatifs. Ainsi notre très bon niveau d'exhaustivité se maintient à 77,2% (n=281/364).

Au-delà de ces isolats « J0 » reçus dans le cadre du dépistage passif, le laboratoire a également reçu 284 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.

Vingt demandes d'expertise diagnostique par PCR en temps dans le cadre du dépistage passif ont été demandées pour des dossiers compliqués.

**Tableau 3.** Activités d'expertise réalisées en 2019-2020 en lien avec le nombre d'isolats reçus.

Activité d'expertise	Provenance	2019-2020	Activités et analyses conduites sur les échantillons
Dépistage passif	Partenaires guyanais (cf	20 <i>Pf</i>	Phénotypage (isotopique, RSA/PSA)
		0 <i>Pf/Pv</i>	Génotypage ( <i>pfcytb</i> , <i>pfK13</i> , <i>pfhrp</i> )
		281 <i>ND</i>	PCR diagnostic de confirmation au sein de la collection
Demande d'expertise diagnostique	CNR Paludisme	20 <i>ND</i>	PCR diagnostique pour des dossiers compliqués
	Projet Malakit	77 <i>ND</i>	Analyse discordances diagnostique par PCR
Suivi efficacité thérapeutique		284 <i>Pf</i> et/ou <i>Pv</i>	Variable en fonction des dossiers (génotypage, dosage plasmatique, phénotypage)
Dépistage actif	Malakit/ORPAL	380 <i>ND</i>	Dépistage actif par PCR
Expertise internationale	Guyana	757 <i>Pf</i>	Génotypage <i>pfK13</i> et <i>pfhrp</i>
Phénotypage d'isolats d'années antérieures	Guyane	82 <i>Pf</i>	RSA/PSA essentiellement

ND : Non Déterminé ; PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne (Polymerase Chain Reaction) ; *Pf* : *Plasmodium falciparum* ; *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 2019-2020, la chimiosensibilité à onze molécules de 10 isolats de *P. falciparum* collectés en 2019-2020 dans le cadre du dépistage passif a pu être déterminée.

Les études de génotypage ont porté sur :

l'étude du gène *pfcytb*, impliqué dans la résistance à l'atovaquone-proguanil, qui a été réalisée pour 20 isolats de *P. falciparum* dont 3 isolats issus du projet ORPAL. Aucun mutant 268 n'a été observé, deux étaient non interprétables,

l'étude du gène *pfK13*, impliqué dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine a fait l'objet de la même analyse ainsi que chez 54 isolats en provenance du Guyana. Tous étaient sauvages pour la partie propeller en lien avec la résistance et 26/54 mutés K189T.

Excepté la PCR diagnostique multiplex qui est rendu au prescripteur dans les cinq jours, 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.

Des analyses par dossier peuvent se faire en cas d'échec thérapeutique en dehors de la prise en charge du patient. En cas de sollicitation du clinicien dans le cadre de la prise en charge, nous pouvons mettre à disposition les résultats de phénotypage.

## 2.6 ACTIVITES DE SEQUENÇAGE

### Pôle Zones non Endémiques

Pour la surveillance des résistances aux antipaludiques, les recherches des mutations au sein des gènes *pf dhfr*, *pf cyt b*, *pf mdr1* et *K13* 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. Dans un premier temps, l'expertise bioinformatique a été réalisée par notre collaborateur, R Coppée travaillant à l'Université de Paris. 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). Cependant. Un certain nombre d'échantillons ont été externalisés auprès d'une plateforme commerciale (Biofidal, Lyon) en 2019 et 2020. En 2019-2020, aucun génome total n'a été séquencé. En 2019-2020, 1055 isolats de *P. falciparum* (678 dans le cadre du paludisme d'importation, 72 de Mayotte, 126 non CNR, 179 du Sénégal) ont été séquencés pour les gènes *pf crt*, *pf dhfr*, *pf dhps*, *pf mdr1*, *pf k13* pour la recherche de résistance dans la cadre de la surveillance et plus de 700 isolats pour l'identification-validation à des fins de recherche de gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux antipaludiques (*pf crt* (nouvelles mutations), *pf mdr5*, *pf mdr6*, *pf coronine*).

### 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 leur 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. Le CNR s'est ainsi équipé en matériel de stockage de séquence et est en cours de mise en place d'outils d'analyse simples des séquences générées et tout particulièrement des fichiers « fastq ». Dans un premier temps, l'expertise bioinformatique est réalisée par notre collaborateur, D. Neafsey travaillant à l'Université d'Harvard. Les séquençages réalisés jusqu'alors ont été faits par le biais de ce collaborateur et par la plateforme à laquelle il a accès, plateforme du Broad

Institute, moyennant finances. Les outils d'analyse utilisés sont des outils « maison » développés par le partenaire du fait de son expertise des génomes plasmodiaux. Une partie des fichiers « fasq » sont disponibles au sein du CNR. L'autre partie est encore chez notre partenaire. Ces fichiers sont pour partie rendus publique pour ceux qui ont servis à étudier le retour de sensibilité à la chloroquine. Pour le reste, ils sont encore privés partagés par le CNR et son partenaire.

Ce séquençage mis en place vise à répondre *in fine* à des questions de recherche en santé publique avec pour philosophie, que les activités de recherche et de santé publique s'éclairent l'une l'autre. Sont ainsi abordé grâce à ces analyses de génome entier :

- La recherche d'un marqueur de résistance à la pipéraquline,
- L'analyse de l'évolution de la diversité génétique de *P. falciparum* en Guyane en fonction des pressions médicamenteuses et de l'intensité de transmission (investigation de l'endémie guyanaise),
- L'analyse du fond génétique « Plateau des Guyanes » actuellement présent pour voir si les marqueurs génétiques en lien avec l'émergence de la résistance aux artémisinines en Asie du Sud Est sont les mêmes dans notre zone
- L'analyse d'isolats mutés en *pfk13* afin de déterminer le nombre de points d'émergence et la dynamique de dispersion de la résistance.

Dans le temps ce séquençage entier souhaiterait être généralisé de manière à gagner du temps et surtout disposer des parasites en collection, de leur génome et de leur phénotype.

### 3 ACTIVITES DE SURVEILLANCE

#### Pôle Zones non Endémiques – Eléments clés

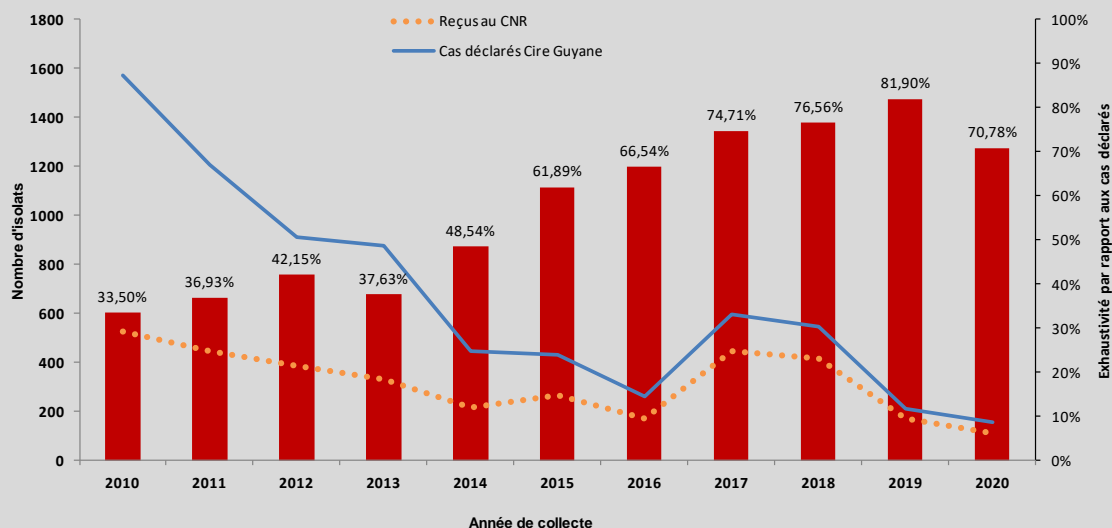
Pour le paludisme d'importation en France métropolitaine on note en 2020, pour l'épidémiologie :

- Une chute de 64% du nombre de cas de paludisme importé par rapport à 2019 ou aux années antérieures
- Cette baisse du nombre de cas ne concerne pas les militaires (en augmentation par rapport à 2019).
- Cette baisse est essentiellement liée aux restrictions imposées sur les voyages internationaux dans le cadre de la lutte contre la Covid-19 (diminution de 57% du nombre de voyageurs vers l'Afrique).
- Une diminution de la proportion des accès à *P. falciparum* avec en parallèle une augmentation des accès à *P. ovale* et *P. vivax* du fait des accès de reviviscence observés chez des patients qui n'avaient pas récemment voyagé.
- Une forte progression des cas en provenance de Djibouti probablement liée à une augmentation de l'intensité de la transmission comme en témoigne la proportion importante des cas chez les militaires.
- Une augmentation importante de la proportion des sujets d'origine caucasienne parmi les cas, multipliée presque par 2 par rapport à 2019.
- Une augmentation en proportion des cas des accès graves et des décès.

Le niveau de sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux antipaludiques reste stable et les thérapeutiques recommandées par la mise à jour 2017 de la conférence de consensus de 2009 sont adaptées. Des échecs thérapeutiques tardifs aux ACT sont observés sans être associés à une résistance des parasites à l'artémisinine. L'absence de respect des recommandations prophylactiques reste le facteur de risque principal de développer un accès palustre.

#### Pôle Zones Endémiques – Eléments clés

L'ensemble des activités de surveillance concernant la Guyane sont résumées dans les bulletins de rétro-information de l'année 2019 et 2020 figurant en annexe 9 et 10. Le niveau d'exhaustivité du Pôle Zones Endémiques par rapport au nombre de cas déclarés en Guyane reste bon même s'il a subi une légère baisse en 2020 du fait de la pandémie COVID19.



**Figure 2.** Recrutement et exhaustivité atteints entre 2010 et 2020 par le Pôle Zones endémiques.  
 Courbe pleine : nombre de cas déclarés à la Cire Guyane, pointillée : nombre d'isolats reçus.  
 Histogrammes : proportions d'isolats collectés en fonction du nombre de cas déclarés à la Cire Guyane.

Le niveau de sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux antipaludiques a été déterminé par la méthode isotopique pour onze molécules (**Figure 20**). Aucun profil particulier n'a été observé. Les tests de survie ont été mis en place pour évaluer le niveau de sensibilité aux artémisinines et à la pipéraquline.

Cette méthode est en effet plus efficace pour identifier les isolats résistants.

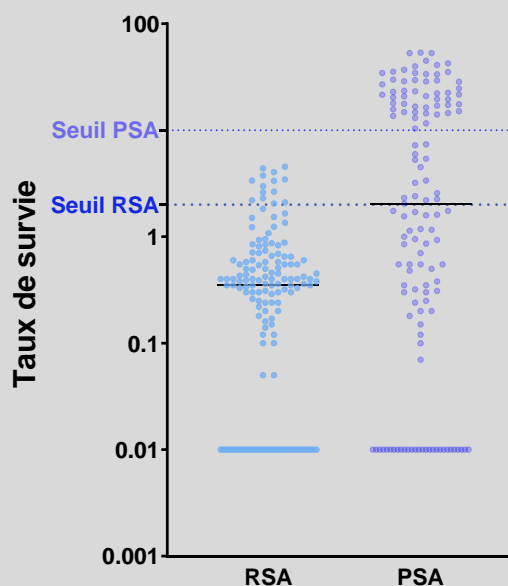
Sur 155 isolats testés vis-à-vis de la dihydro-artémisinine, 8,3% IC<sub>95</sub> [4,0 – 12,8] étaient résistants avec un seuil fixé à 2% de survie (**Figure 3**). Aucune mutation *pfK13* n'était associée à ce phénotype globalement bas (<5%) alors que les isolats résistants d'Asie du Sud Est ont généralement une sensibilité au-delà de 15% lorsqu'ils sont résistants.

Phénotype à suivre.

Sur 131 isolats testés, 39,7% IC<sub>95</sub> [31,3 – 48,1] se sont avérés résistants à la pipéraquline.

Les isolats résistants étant responsables de cas d'échec thérapeutique, un signalement a été fait auprès des autorités sanitaires de manière à envisager de revoir les recommandations thérapeutiques.

En effet, il ne semble pas pertinent de continuer à recommander l'Eurartesim pour le traitement des accès simples à *P. falciparum* dans ces conditions.



**Figure 3.** Taux de survie de *P. falciparum* après exposition à la dihydroartémisinine et la pipéraquline.

### 3.1 RESEAU DE PARTENAIRES

#### Pôle Zones non Endémiques

Les correspondants du Pôle Zones non Endémiques (ZNE) sont des correspondants hospitaliers métropolitains ou des départements régions d'outre-mer (DROM) : 86 correspondants réguliers notifient les cas de paludisme sur la base sécurisée Voozadoo : <https://cnr-palu.voozadoo.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, comme à l'habitude, décrit le profil épidémiologique global des cas déclarés.

**Tableau 4 :** Cas déclarés et cas estimés de paludisme en France métropolitaine, tendances évolutives 2013 -2019

	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
Nb de cas déclarés	2171	2299	2504	2450	2721	2840	2812	1005
Variation / année antérieure en %	17,0	5,9	8,9	-2,2	11,1	4,4	-1,0	-64,3
Hors CESPAs	2129	2246	2438	2436	2709	2823	2805	966
Hors CESPAs, variation / année antérieure en %	16,1	5,5	8,5	-0,1	11,2	4,2	-0,6	-65,6
Hors CESPAs, proportion de cas capturés par le réseau	51,1	51,4	51,4	51,6	52,0	51,0	50,7	
Hors CESPAs à correspondants constants	2025	2197	2403	2362	2541	2723	2669	
Hors CESPAs à correspondants constants variation / année antérieure	14,3	8,5	9,4	-1,7	7,6	7,2	-2,0	
Nombre total de cas estimés	4208	4420	4810	4735	5220	5550	5540	
Nombre total de cas estimés variation / année antérieure	17,5	5,1	8,7	-1,5	10,3	6,3	-0,2	
Cas observés corrigés (enquête exhaustive de 2014 sur les données 2013)	4208							
Cas observés corrigés variation / total cas estimés en %	1,9							

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

En 2019, le nombre de cas de paludisme d'importation a été estimé à environ 5 540 cas pour l'ensemble de la France métropolitaine, stable par rapport à 2018 (-0,6%). La proportion de cas capturé par le réseau du CNR est de 50,7 % en 2019, stable par rapport à 2018 (51,0 %). En 2020, le nombre de cas a diminué de 64% par rapport à 2019. L'évolution par rapport aux années antérieures montre une chute drastique du nombre de cas, indubitablement en lien avec la restriction des voyages internationaux pour lutter contre la propagation de l'épidémie à COVID-19 (**Figure**). Du fait de la situation exceptionnelle et de ses conséquences non mesurables sur la typologie des voyages et des voyageurs, le nombre de cas de paludisme d'importation n'a pas été estimé pour l'ensemble de la France métropolitaine pour l'année 2020 (**Tableau 4**).

### 3.1.2 Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

#### 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 4**). 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 voir fluviale ou aérienne.



**Figure 4.** Réseau de partenaires guyanais.

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'orpillage étendue, agricole...).



Les zones d'endémie permanente du paludisme sont essentiellement localisées dans ces zones difficiles d'accès (**Figure 4**) 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 Saint et Papaïchton sont situés jusqu'à quatre heures de pirogue de la première structure de soin (**Figure 4**).

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, neuf laboratoires de biologie médicale existent : six sur l'île de Cayenne, deux à Kourou, un à Mana et un à St Laurent du Maroni. Ils réalisent le diagnostic par microscopie associé au TDR ou par 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. Le Tableau 5 liste les partenaires du CNR ayant diagnostiqués plus de 20 cas sur la période 2019-2020. Ils deviennent alors des partenaires dits « actifs » vis à vis desquels nous portons une attention particulière de manière à les resensibiliser si besoin. L'envoi des échantillons vers le Pôle Zones endémiques repose en effet 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 la CIRE Guyane 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 la CIRE 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.

Compte tenu de la bonne exhaustivité que nous avons atteint depuis plusieurs années, nous avons cherché sur les données de 2020 à croiser nos données nominatives avec celles de CIRE Guyane pour voir si d'un côté ou de l'autre nous avons une sur ou une sous déclaration. Mis à part une dizaine de cas discordante, les données étaient cohérentes. Nous avons ainsi identifié qu'il était nécessaire de resensibiliser les CDPS de Régina, Talhuen et St Georges de l'Oyapock.

**Tableau 5.** Partenaires actifs du Pôle Zones endémiques en Guyane: localisation, fréquence des liaisons avec Cayenne et niveau de participation à la surveillance biologique du paludisme en 2019-2020.

Partenaires	Commune	Liaison (fréquences)	Nombre d'accès déclarés (Cire)	Isolats transmis au PZE	
				Nb	%
Poste de santé	Talhuen	Pirogue + avion (occasionnelle)	22	14	64%
CH	Cayenne	Routière (quotidienne)	70	78	+100%*
LBM de Kourou	Kourou	Routière (sur demande)	59	84	+100%*
Centre de santé	Régina	Routière (hebdomadaire)	72	38	53%
Centres de santé	St Georges de l'Oyapock	Routière (bi-hebdomadaire)	73	55	75%
<b>Total</b>			<b>296</b>	<b>269</b>	<b>91%</b>

CH : Centre Hospitalier, LBM : Laboratoire de Biologie Médicale, Cire : Cellule InterRégionale d'Epidémiologie de Guyane. \*Certains pourcentages sont supérieurs à 100%. Ceux ci concernent essentiellement des patients diagnostiqués deux fois et pour lesquels le lieu de diagnostic (pris en compte une seule fois) a été comptabilisé différemment par la CIRE et par le CNR. Les autres cas concernent les militaires qui sont rarement étiquetés comme service de santé des armées par le CNR mais plutôt systématiquement par le laboratoire qui envoie les prélèvements, le plus souvent le LBM de Kourou et le CH Cayenne.

## Carte de risque du paludisme en Guyane- 2019 (évalué sur les données épidémiologiques 2018)

Document destiné aux professionnels de santé: pour toute question n'hésitez pas à vous rapprocher de votre médecin traitant ou d'un spécialiste en médecine des voyages.

Type de zone	Pas de transmission du paludisme au cours de l'année précédente	Risque faible Existence de cas mais pas de transmission dans les bourgs	Risque fort Transmission du paludisme dans la zone
Port de vêtements couvrants	Recommandé	Recommandé	Impératif
Utilisation de produits répulsifs	Recommandée	Recommandée	Impérative
Utilisation de moustiquaires non imprégnées	Recommandée	Sans objet	Sans objet
Utilisation de moustiquaires imprégnées	Recommandée	Impérative	Impérative
Traitement chimio-prophylactique (touristes et séjours courts)	Sans objet	A voir au cas par cas	Impératif sauf si contre-indication médicale

Sources : Direction de la démoustication et des affaires sanitaires de la Collectivité Territoriale de Guyane, ARS Guyane, Santé publique France - Cellule Guyane, CNR paludisme Pôle Zones Endémiques, Forces Armées de Guyane, Pôle des Centres délocalisés de prévention et de soins du Centre hospitalier Andrée Rosemon, Laboratoires de biologie médicale de ville et des Centres hospitaliers.

Validation : Comité des maladies infectieuses et émergentes le 22/10/2019.

Réalisation : ARS Guyane et Santé publique France - Cellule Guyane



Figure 5. Carte du risque de paludisme en Guyane, octobre 2019.

## A Mayotte

Pour cette mandature, le Pôle Zones non endémiques développe des liens avec les autorités sanitaires locales, notamment avec l'ARS Mayotte nouvellement créée pour proposer son soutien et son expertise techniques (**Figure 6**). Actuellement, seuls les marqueurs de résistance sont étudiés sur les isolats des cas de paludisme diagnostiqués à Mayotte.

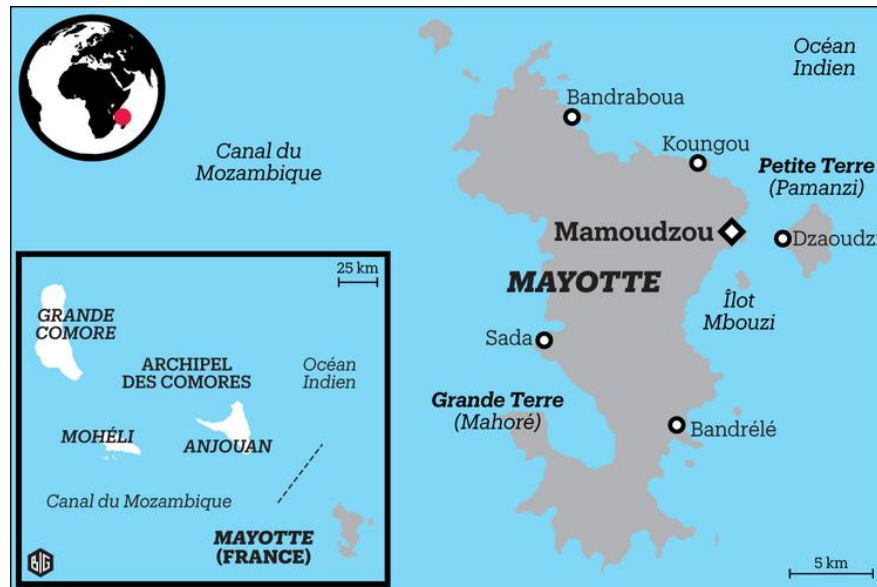


Figure 6. Carte de l'île de Mayotte.

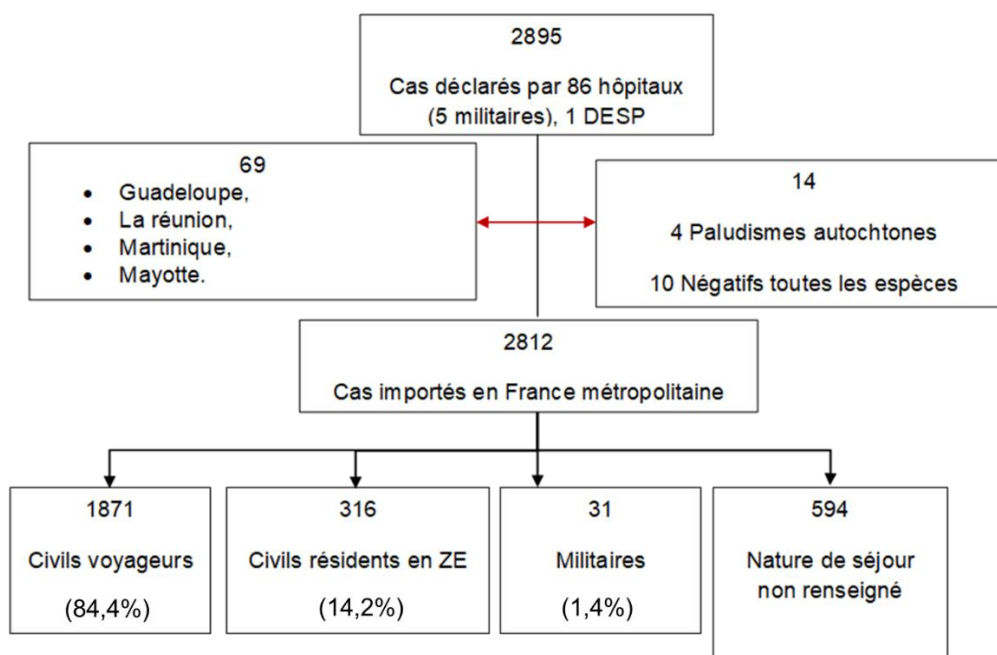
## 3.2 SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTÉRISTIQUES DU PALUDISME

### Pôle Zones non Endémiques

#### *Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections*

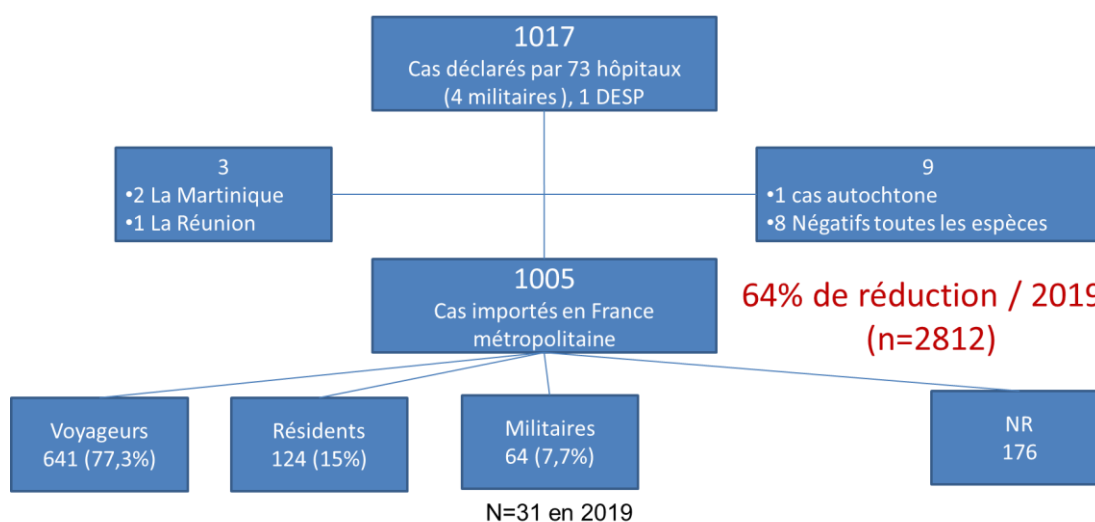
##### Distribution des cas

Pour l'année 2019, un total de 2 895 cas de paludisme a été déclaré au Centre national de référence (CNR) du Paludisme par les correspondants du réseau. Après exclusion des cas non confirmés (n=10) et des cas déclarés par les correspondants hors métropole (n=69), 2 816 cas de paludisme ont été déclarés par les correspondants du réseau métropolitain. Quatre cas concernent des cas présumés autochtones confirmés par l'enquête menée par Santé Publique France (2 probablement aéroportuaires, 2 cryptiques). Ainsi 2812 cas correspondent à des cas importés en France métropolitaine (Figure 7)



**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 2019, N=2218.

Pour l'année 2020, un total de 1 017 cas de paludisme a été déclaré au CNR du Paludisme par les correspondants du réseau. Après exclusion des cas non confirmés (n=8) et des cas déclarés par les correspondants hors métropole (n=3), 1 006 cas de paludisme ont été déclarés au CNR par les correspondants du réseau métropolitain. Un cas est présumé autochtone confirmé par l'enquête menée par Santé Publique France (probablement aéroportuaire). Ainsi 1 005 cas correspondent à des cas importés en France métropolitaine (Figure 8).



**Figure 8 :** 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 2020, N=829.

#### Evolution annuelle des cas

On notera entre les années 2019 et 2020, une diminution de la proportion des civils voyageurs et une augmentation marquée en nombre et en proportion des militaires qui n'ont pas été soumis de la même manière aux restrictions concernant les voyages internationaux (Figure 9, Figure 10, Figure 11).

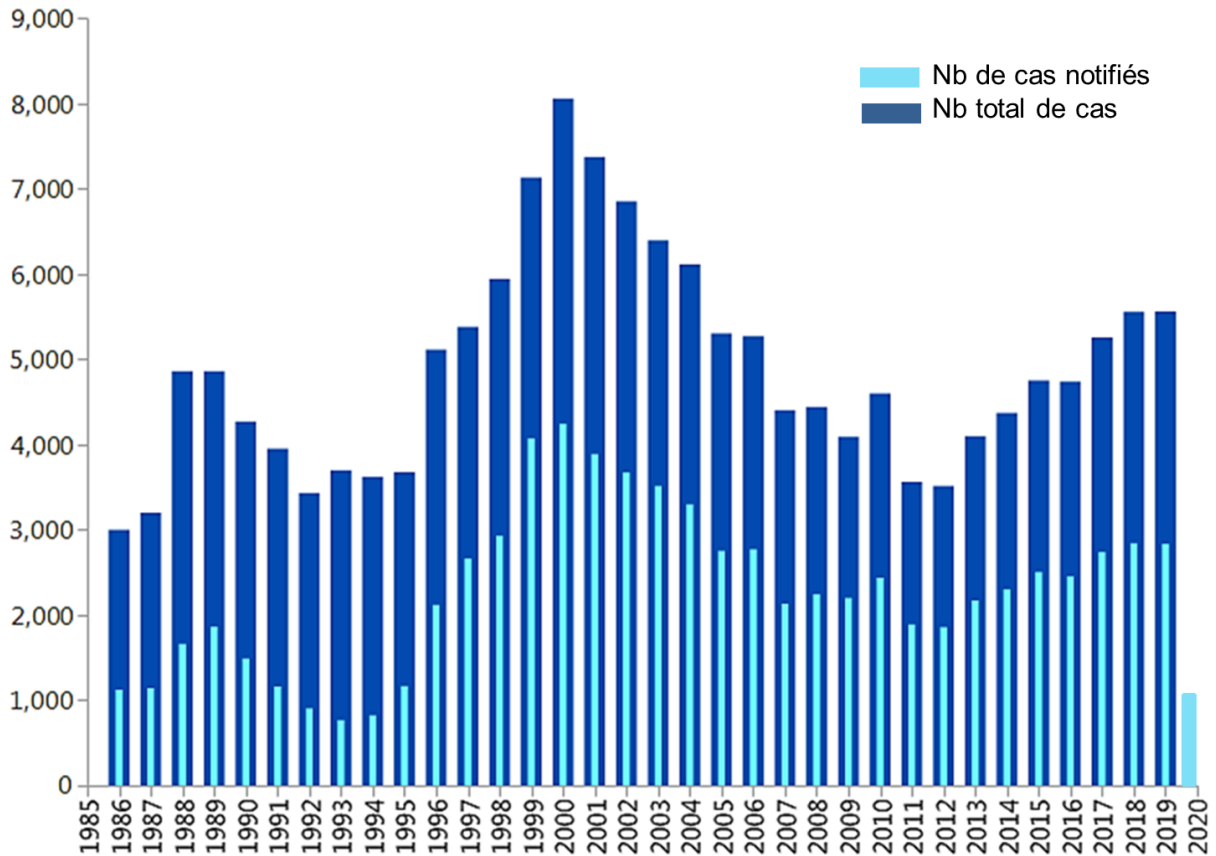


Figure 9 : Evolution du paludisme d'importation, cas déclarés, cas estimés, France métropolitaine 1986 à 2020.

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

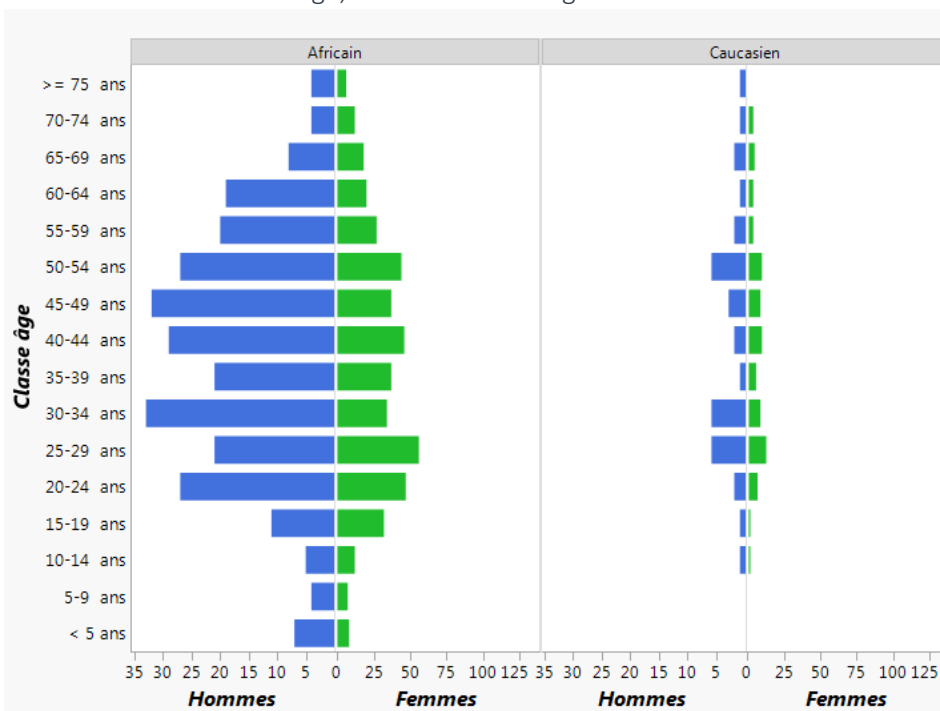


Figure 10. Répartition des cas de paludisme importés par âge et par sexe en fonction de l'origine africaine ou caucasienne, CNR du paludisme, France métropolitaine, année 2020, n = 1005.

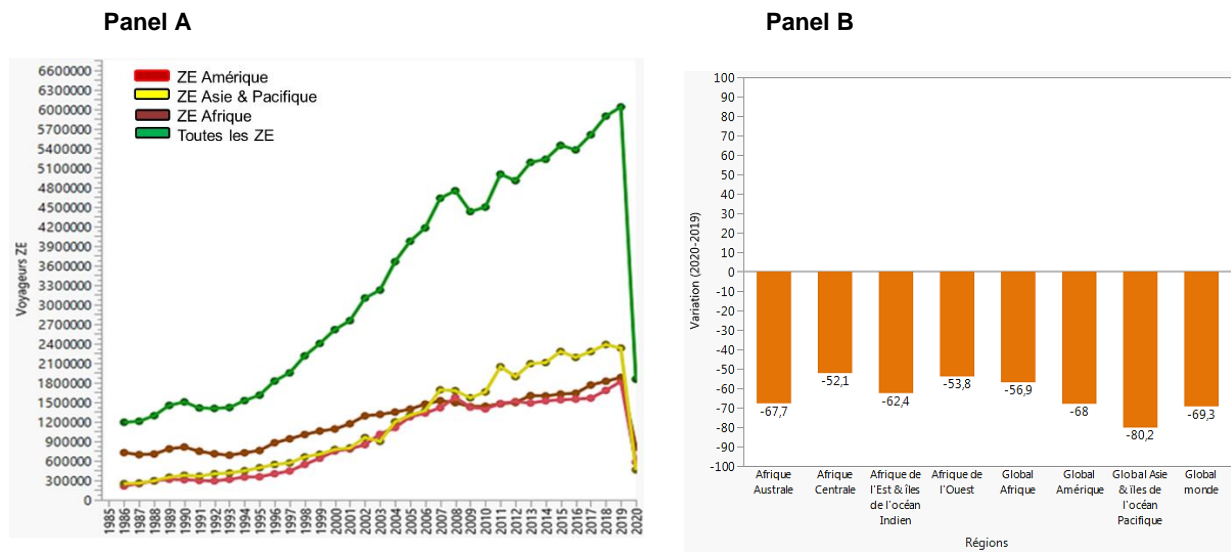


Figure 11 : Panel A. Evolution du nombre de voyageurs vers les zones d'endémies pour le paludisme, totaux et par continents, France métropolitaine 1985 à 2020. Panel B. Variation du nombre de voyageurs vers les zones impaludées par région, France métropolitaine, 2019-2020. (Source Direction Générale de l'Aviation Civile<sup>6</sup>)

#### Distribution des cas et des espèces

En 2019, les cas ont survécu principalement chez des sujets d'origine africaine (84,4%), résidant en France ou arrivant d'Afrique, stable par rapport à 2018 et ils sont dus en majorité à l'espèce *Plasmodium falciparum* (88,7%), stable par rapport à 2018. En 2020, la proportion des cas chez les sujets d'origine africaine perd 9,6% (74,8%). La proportion de sujets d'origine caucasienne progresse en miroir (Figure 10). Concernant les espèces plasmodiales, 85,4% des cas étaient dus à *Plasmodium falciparum*, 7,8% à *Plasmodium ovale*, 3,5% à *Plasmodium malariae*, 1,9% à *Plasmodium vivax* (Figure 12). Alors que la proportion par espèce variait peu entre les années, avec une augmentation lente et régulière de la proportion de l'espèce *P. falciparum*, on note pour 2020 une baisse de -3,7% par rapport à 2019, ceci au profit des autres espèces qui progressent de +38,5% pour *P. vivax*, +23,7% pour *P. ovale*, +14,8% pour *P. malariae*. Un accès à *Plasmodium knowlesi*, confirmé par PCR au CNR, acquis aux Philippines a été diagnostiqué en 2019, aucun cas n'est reporté pour cette espèce en 2020.

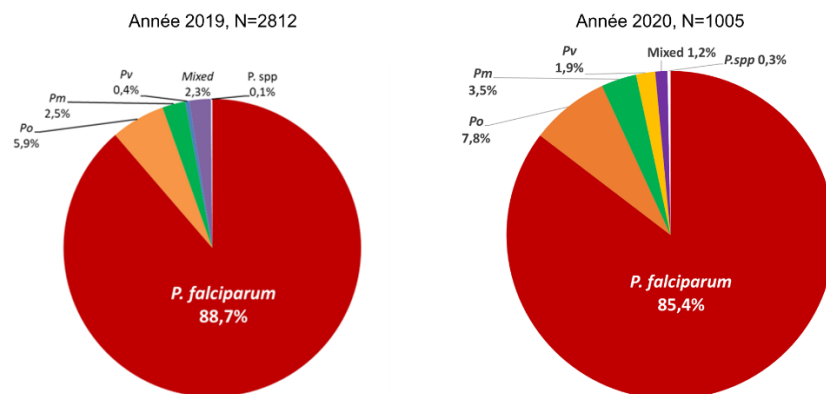


Figure 12 : Proportion par espèce identifiée en 2019 et en 2020, France métropolitaine.

<sup>6</sup> <https://www.ecologie.gouv.fr/statistiques-du-traffic-aerien>

## Pays de contamination

Comme pour les dernières années, les pays de contamination sont toujours majoritairement situés en Afrique subsaharienne (98,8% en 2019 et 98,7% en 2020) (Tableau 6).

**Tableau 6** Régions de contamination des cas déclarés en 2020 comparés à 2019

Région d'endémie	2019		2020	
	N	%	N	%
Afrique au Sud du Sahara	2659	98,7%	938	99,3%
Asie	23	0,9%	4	0,4%
Amérique Latine & Caraïbes	5	0,2%	2	0,2%
Afrique du Nord	4	0,1%	1	0,1%
Îles de l'océan Pacifique	1	0,0%	0	0,0%
Europe de l'Ouest	1	0,0%	0	0,0%
<b>Total</b>	<b>2693</b>	<b>100,0%</b>	<b>945</b>	<b>100,0%</b>

En 2019, les 4 principaux pays à l'origine des cas (environ 60 % des cas à eux quatre) étaient, comme en 2018, la Côte d'Ivoire (n=687, -12,4 %), le Cameroun (n=576, +2 %), la Guinée (n=209, +12,4 %) et le Mali (n=116, -31,8 %). En 2020, les 4 principaux pays à l'origine des cas sont la Côte d'Ivoire (n=228, 24,1% des cas), le Cameroun (n=178, 18,8%), le Congo (n=74, 7,8%) et le Mali (n=66, 7%). La Guinée, dans le trio de tête en 2019 a régressé au 6<sup>ème</sup> rang (n=52, 5,5%).

Après une augmentation importante des cas en provenance des Comores en 2019 (n=69, +23,2 %) par rapport à 2018 (n=56), il y a eu seulement 5 cas (0,5% des cas) en 2020. Aucun cas importé de Mayotte n'a été signalé par notre réseau ces dernières années.

En 2020, les cas en provenance de Djibouti ont fortement progressé en dépit des restrictions sur les voyages : 17 cas déclarés en 2020 (1,8% des cas totaux) contre seulement 7 en 2019 (0,3%). Parmi les 14 cas avec une nature du séjour déclarée, 6 sont des militaires et 5 des résidents de Djibouti en séjour en France. Les cas chez les militaires (n=64, 7,7% des cas) sont en forte hausse (31 cas en 2019, 1,4% des cas) alors que le nombre de militaires sur le terrain a peu varié : l'explication résiderait dans une augmentation de la transmission ou un défaut de prophylaxie. Par ailleurs, l'augmentation de la transmission à Djibouti est avérée et elle est probablement en cause dans d'autres régions Africaines.

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

On notera que la proportion entre les sujets d'origine Africaine et celle des sujets d'origine caucasienne subit une modification notable avec une augmentation marquée de la proportion des sujets d'origine caucasienne (multipliée par 2 par rapport à 2019 (22%), proportionnellement moins impactée par les restrictions concernant les déplacements vers les zones endémiques (professionnels, militaires) (Figure 13).



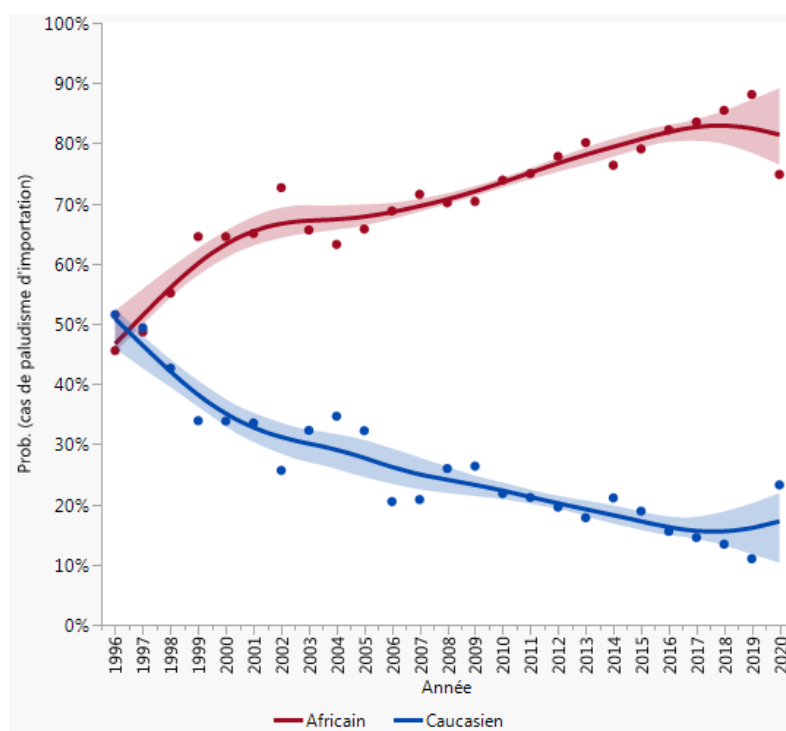


Figure 13 . Evolution annuelle des proportions de paludisme d'importation des sujets d'origine africaine (en rouge) et caucasienne (en bleu) entre 1996 et 2020.

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-pipéraquline est en première place, probablement en raison de modalités de prise plus faciles que l'artémether-luméfantine (Tableau 7).

Le traitement des accès graves est majoritairement l'artésunate (Tableau 8)

Tableau 7. Traitement curatif en première intention des accès palustres simples, France métropolitaine, 2019-2020.

	Année							
	2019				2020			
	≥ 15 ans		< 15 ans		≥ 15 ans		< 15 ans	
Médicament première intention	N	%	N	%	N	%	N	%
Arténimol + pipéraquline (Eurartésim®)	1126	64%	107	47%	407	61%	19	53%
Artemether + Lumefantrine (Coartem®, Riamet®)	245	14%	72	32%	109	16%	11	31%
Atovaquone + Proguanil (Malarone®)	189	11%	27	12%	59	9%	1	3%
Chloroquine (Nivaquine®)	66	4%	10	4%	35	5%	1	3%
Artésunate IV (Malacef®)	56	3%	6	3%	25	4%	1	3%
Quinine IV (Quinimax®, Surquina®?)	51	3%	1	0%	17	3%	1	3%
Autre	34	2%	4	2%	12	2%	2	6%
<b>Total</b>	<b>1767</b>	<b>100%</b>	<b>227</b>	<b>100%</b>	<b>664</b>	<b>100%</b>	<b>36</b>	<b>100%</b>

## Accès graves

Tableau 8. Traitement curatif en première intention des accès palustres graves, France métropolitaine, 2019-2020.

	Année							
	2019				2020			
	>= 15 ans		< 15 ans		>= 15 ans		< 15 ans	
Médicament première intention	N	%	N	%	N	%	N	%
Artésunate IV (Malacef®)	277	81%	23	77%	128	87%	3	60%
Artémimol + pipéraquline (Eurartésim®)	46	13%	6	20%	13	9%	1	20%
Artemether + Lumefantrine (Coartem®, Riamet®)	9	3%	1	3%	1	1%	0	0%
Atovaquone + Proguanil (Malarone®)	5	1%	0	0%	2	1%	1	20%
Quinine IV (Quinimax®, Surquina®?)	2	1%	0	0%	3	2%	0	0%
Autre	4	1%	0	0%	0	0%	0	0%
<b>Total</b>	<b>343</b>	<b>100%</b>	<b>30</b>	<b>100%</b>	<b>147</b>	<b>100%</b>	<b>5</b>	<b>100%</b>

## Accès graves, évolution

En 2019, le nombre et la proportion des formes graves, 396 (14,8%), est resté élevé, du même ordre qu'en 2017 et en augmentation par rapport à l'année 2018 (347, 12,9%). En 2020, le type de l'accès est renseigné chez 937 patients dont 160 (17,1%) sont des accès graves au moment du diagnostic : ces chiffres sont encore une fois en hausse par rapport aux années précédentes (Figure 14).

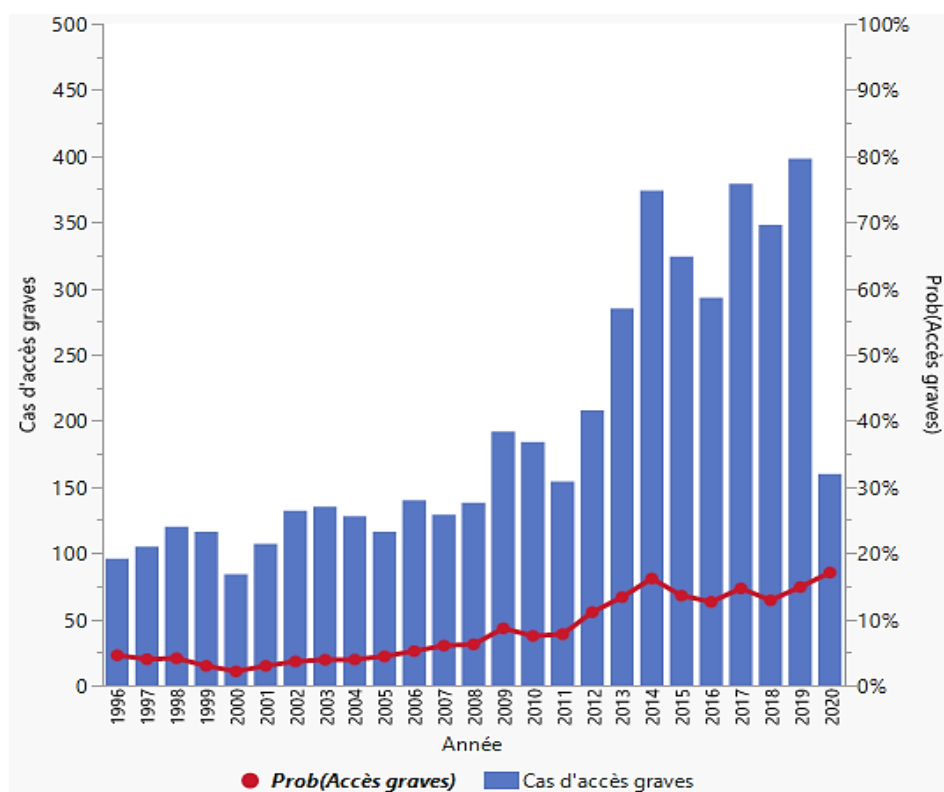


Figure 14. Evolution des cas graves de paludisme d'importation, France métropolitaine, 1996-2020

## Décès

En 2019, un total de 10 décès a été déclaré, soit une létalité de 0,35% sur l'ensemble des cas et de 2,5% (10/406) sur les formes graves ; ces chiffres sont stables par rapport à ceux de 2018 (respectivement 0,38% et 3,2%). En 2020, on recense 6 décès soit une létalité de 0,6% sur l'ensemble des cas et de 3,75% sur les accès graves, en hausse marquée par rapport aux années précédentes. En 2020, l'âge médian des sujets décédés était de 49 ans (25e percentile : 46 ; 75e percentile : 66,3). Cinq étaient âgés de 50 ans et plus. Aucun décès infantile n'est à déplorer en 2020 (Figure 15).

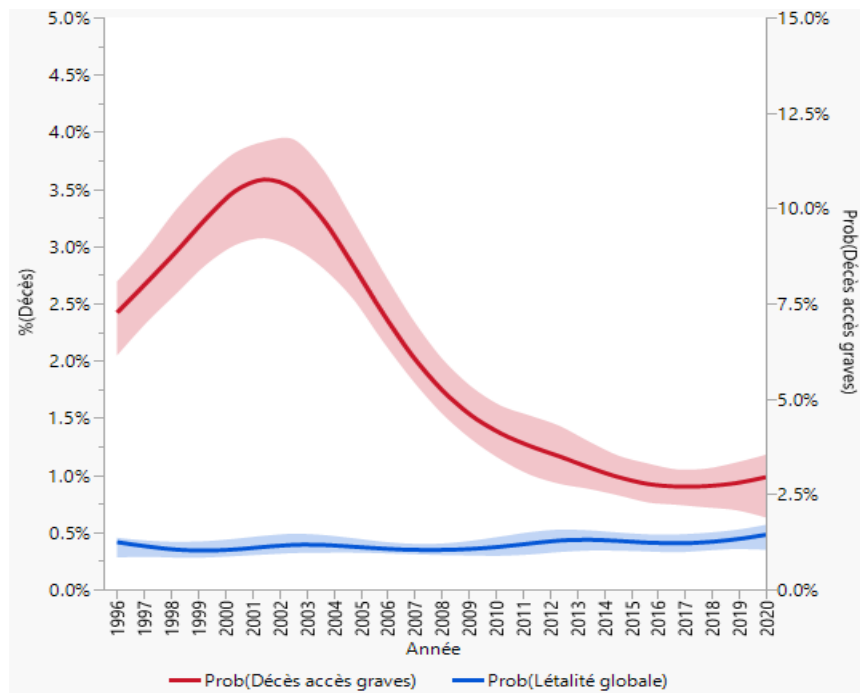


Figure 15. Evolution de la létalité globale et de la létalité spécifique chez les patients avec un accès grave, France métropolitaine, 1996-2020.

### Efficacité thérapeutique

Seuls les cas de paludisme à *P. falciparum* sont considérés pour le suivi de l'efficacité thérapeutique, les cas itératifs dus aux espèces *P. ovale* et *P. vivax* pouvant être associés à un échec thérapeutique ou à des épisodes de reviviscence : les outils sont actuellement peu performants pour distinguer ces deux situations.

Entre 2019 et 2020, le CNR du paludisme a expertisé 16 cas d'échecs thérapeutiques tardifs, définis comme étant une parasitémie périphérique de formes asexuées au-delà de J15 chez des patients n'étant pas retournés en zone d'endémie. Les accès palustres liés à l'échec thérapeutique étaient observés en moyenne à J28 (+/- 8j) du traitement de l'accès initial.

Le traitement initial était l'artéméther-luméfantrine dans 5 cas, l'arténimol-pipéraquline dans 5 cas, l'artésunate seul dans 2 cas, l'artésunate relayé par l'arténimol-pipéraquline dans 1 cas, l'atovaquone-proguanil dans 1 cas. Dans 2 cas, les traitements reçus par les patients n'ont pas été précisés.

Dans tous les cas où l'analyse a été possible, la comparaison des isolats du diagnostic initial et du diagnostic de l'échec thérapeutique par l'étude des microsatellites a confirmé qu'il s'agissait du même clone.

Pour les échecs après traitement par une CTA (artéméther-luméfantrine ou arténimol-pipéraquline ou artésunate), l'analyse des marqueurs moléculaires n'a pas mis en évidence de mutations associées à une diminution de sensibilité de l'isolat. Compte-tenu du délai de transmission des isolats, il n'a pas été possible de réaliser l'étude phénotypique des souches par le test du RSA (Ring Survival Assay).

Pour l'échec thérapeutique observé après traitement par l'atovaquone-proguanil, l'isolat de l'échec qui était le même clone que l'isolat initial avait acquis une mutation sur le gène *pficytb* qui confère la résistance à l'atovaquone.

En résumé, le nombre d'échecs thérapeutiques après traitement d'un accès palustre à *P. falciparum* est limité mais il justifie la nécessité de surveiller l'efficacité de ces traitements. En ce qui concerne les CTA, une « résistance » moléculaire n'a jamais été retrouvée à ce jour : les facteurs favorisant ces échecs restent à déterminer.

#### Distribution des cas de paludismes aux Antilles

Les cas de paludisme déclarés et diagnostiqués aux Antilles en 2019-20 sont tous des cas importés contractés en Afrique sub-saharienne.

En Martinique, en 2019-20, 7 cas de paludisme d'importation ont été diagnostiqués au CHU de Fort de France : 2 contractés en Centrafrique, 2 en Côte d'Ivoire, 1 au Bénin, 1 au Gabon, et 1 au Cameroun. L'espèce *P. falciparum* était retrouvée dans 5 cas, 1 cas était dus à *P. ovale* et 1 à *P. malariae*. Tous les cas ont été déclarés en 2019-20, et 6 isolats ont été transmis au laboratoire coordonnateur. Compte-tenu des délais, seules les analyses moléculaires sont réalisables sur ces échantillons.

En Guadeloupe, en 2019, deux cas de paludisme ont été diagnostiqués au CHR de Pointe à Pitre : 1 en provenance du Nigéria, et 1 en provenance de Guinée dont l'isolat lié à un échec thérapeutique a été transmis au laboratoire coordonnateur. Aucun cas n'a été déclaré en 2020.

A la Réunion, douze cas de paludisme importés d'Afrique sub-saharienne (dont les Comores) au moins ont été diagnostiqués pour lesquels, les isolats ont été transmis au laboratoire coordonnateur

#### Distribution des cas de paludisme à Mayotte

En 2019-2020, 79 cas de paludisme ont été déclarés à Santé publique France. En 2019, 50 cas de paludisme ont été adressés au CNR et 22 en 2020 dont 69 cas de *P. falciparum*, soit 91% d'échantillons transmis.

Parmi ces cas, on distingue 48 cas de paludisme d'importation (96%) en 2019 et 20 cas (90%) en 2020: ces cas proviennent essentiellement des Comores (45 cas, 66%), 9 de Tanzanie (13%), 7 de Madagascar (10%), 4 du Burundi (4%) et 1 du Congo RDC (1%).

**Cinq** cas de paludisme autochtone (7%) ont été identifiés au cours de 2019-2020: ces isolats possèdent un profil génotypique (7A11, C4M69, C4M79, Pf2689, Pf2802 et TRAP) monoclonal ou biclonal identique à ceux identifiés aux Comores, suggérant certainement des cas locaux introduits à partir des Comores.

Les données épidémiologiques de Mayotte sont publiées régulièrement par la Cire Océan Indien. Le dernier en date retraçant l'historique 1970-2016 est disponible à l'adresse suivante <http://invs.santepubliquefrance.fr/fr/Publications-et-outils/Points-epidemiologiques/Tous-les-numeros/Ocean-Indien/2018/Surveillance-du-paludisme-a-Mayotte.-Point-epidemiologique-au-29-janvier-2018> et pour les années 2019-2020 à l'adresse suivante [https://www.santepubliquefrance.fr/recherche/#search=mayotte paludisme 2019 2020](https://www.santepubliquefrance.fr/recherche/#search=mayotte%20paludisme%202019%2020).

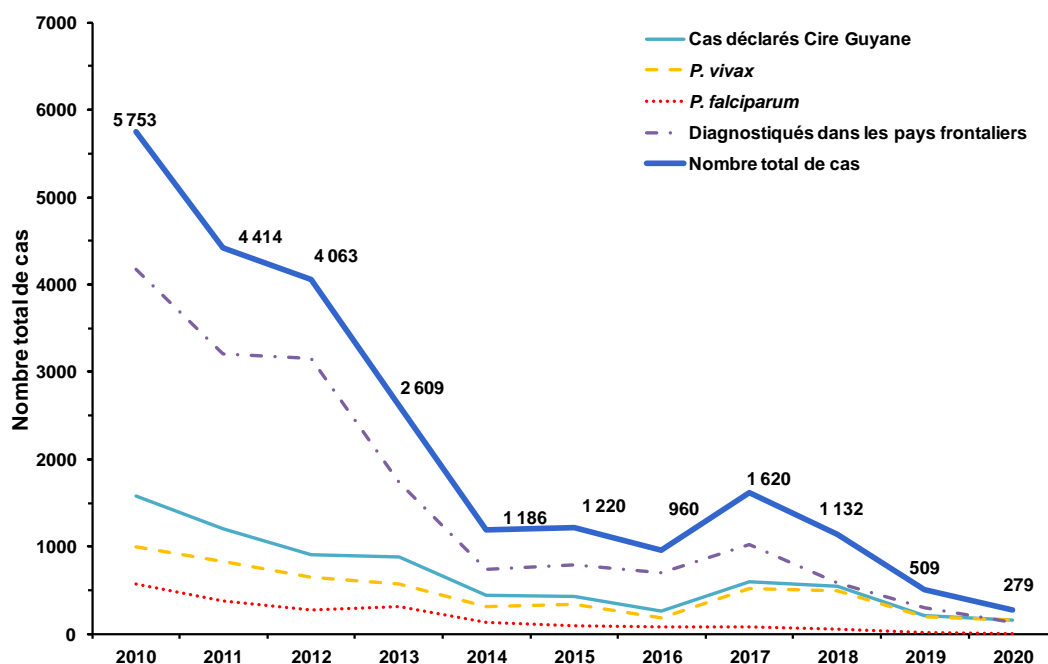
#### Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

##### **En Guyane**

Les années 2019-2020 ont été marquées par une nouvelle baisse du nombre de cas de paludisme, encore plus marquée en 2020, 154 cas recensés (**Figure 16**). Cette baisse n'est pas liée à un défaut de déclaration puisque les données du CNR et de la Cire Guyane ont été croisées. Il s'agit plutôt du bénéfice obtenu grâce aux projets de recherche opérationnel tel que PALUSTOP ou MALAKIT. Le premier a agi au niveau de la zone de forte transmission située autour de St Georges de l'Oyapock (cf §0) pendant que l'autre a ciblé les zones orpaillées (cf §6.1).

Le paludisme à *P. falciparum* est en net recul ce qui est le signe d'une bonne prise en charge. Par contre, il est toujours difficile de prendre en charge les patients par primaquine lorsqu'ils sont infectés

par *P. vivax*. Les équipes mobiles de prise en charge déployées sur place améliore cela et nous espérons pouvoir déployer après avis du HCSP une méthode de dosage rapide de l'enzyme G6PD (cf §8 projet G6PD facile).

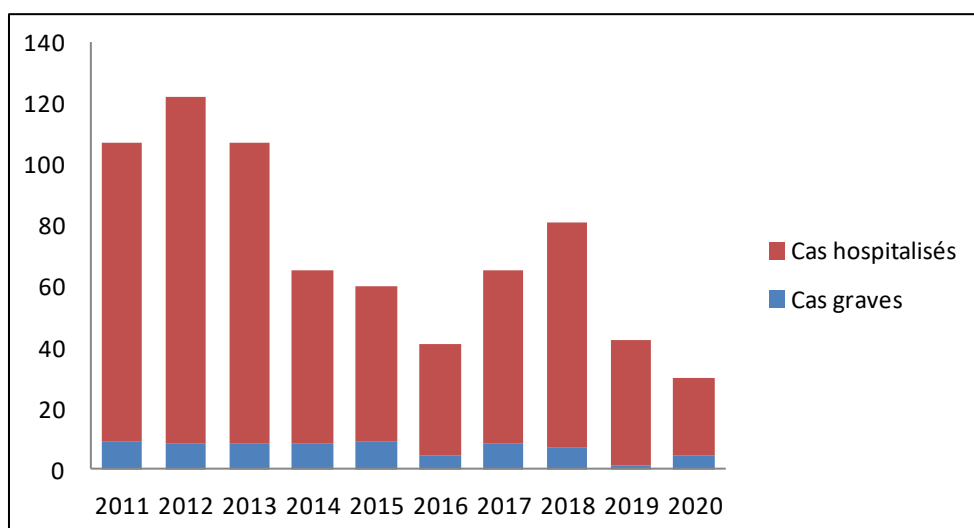


(Source Cire Guyane, Programmes Nationaux de lutte contre le paludisme, Brésil et Suriname).

Figure 16. Evolution du nombre de paludisme en Guyane entre 2008 et 2020.

En 2019-2020, 67 patients ont été hospitalisés pour paludisme (33 au CH de Cayenne, 4 au CH de St Laurent du Maroni et 30 au CH de Kourou). Six patients ont présenté des signes d'accès grave, un à *P. falciparum* et 5 à *P. vivax*. Aucun n'a nécessité un séjour en réanimation. Aucun décès n'a été recensé (Figure 17).

Ainsi le pourcentage de cas hospitalisés était de 18,3% parmi lesquels 7,5% étaient des cas graves.



(Source ARS Guyane/UMIT)

Figure 17. Evolution du nombre de cas grave et hospitalisés liés au paludisme en Guyane entre 2011 et 2017.

### 3.3 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DE *P. FALCIPARUM* AUX ANTIPALUDIQUES

#### 3.3.1 Surveillance des résistances de *P. falciparum* aux antipaludiques en zones non endémiques

##### Chimiosensibilité *in vitro* *P. falciparum* d'importation

En 2019-2020, la chimiosensibilité *in vitro* de 519 isolats à *Plasmodium falciparum* a été déterminée vis-à-vis d'au moins un antipaludique (Chloroquine, Monodéséthylamodiaquine, Quinine, Méfloquine, Luméfantrine, 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 9 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 9** : Seuils de chimiosensibilité et répartition des isolats testés en fonction de leur  $CI_{50}$  aux antipaludiques

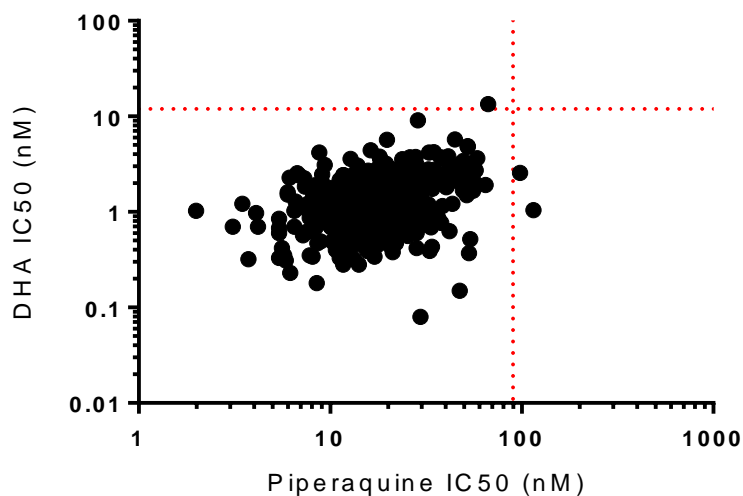
Molécule antipaludique	Nombre d'isolats *	Seuil de résistance	% d'isolats avec une $CI_{50}$ > seuil		
			2018	2019-20	Références
Chloroquine	519	100 nM	16,2%	16,6%	Dedet et al., 1988
Amodiaquine	482	60 nM	13,8%	13,5%	Ringwald et al., 1998
Quinine	475	800 nM	0,2%	1,47%	Basco & Le Bras, 1994
Méfloquine	508	40 nM	<b>16,7%</b>	<b>14,2%</b>	Brasseur et al., 1990
Luméfantrine	483	150 nM	-	-	Pradines et al., 1999
DHA	513	12 nM	0,2%	0,2%	Basco & Le Bras, 1993
Pyronaridine	221	60 nM	1,2%	0,9%	Pascual et al., 2015
Pipéraquline	505	90 nM	0,8%	0,4%	Amato et al., 2017
Doxycycline	508	35 $\mu$ M	6,5%	7,9%	Briolant et al., 2009

\* Nombre d'isolats analysés en 2019-20

Le nombre d'échantillons de sensibilité diminuée aux antipaludiques est resté stable en 2019-2020. Seul le pourcentage des échantillons de sensibilité diminuée à la méfloquine a diminué de 2,5%.

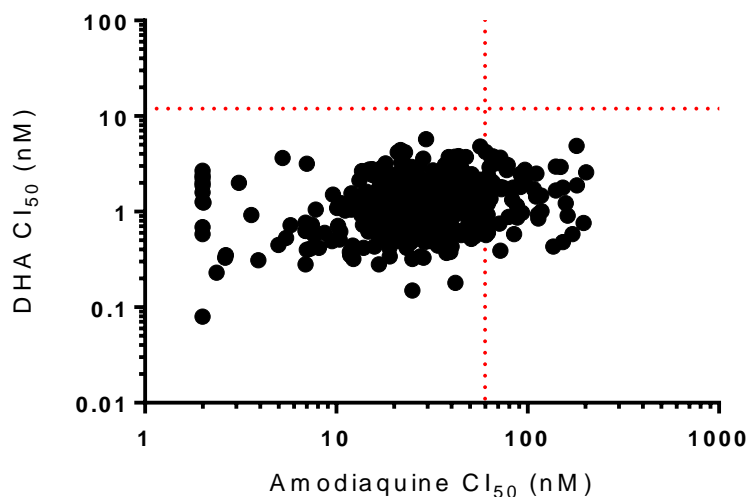
Les CTA étant utilisés en première ligne en France pour traiter les cas de paludisme non compliqués, une analyse croisée des  $CI_{50}$  à la DHA *versus* pipéraquline (Figure 18) ou *versus* amodiaquine (Figure 19) a été réalisée : aucun isolat ne présente de diminution de sensibilité croisée aux antipaludiques impliqués dans les CTA. Les valeurs des  $CI_{50}$  à la luméfantrine, ne présentant aucune valeur supérieure au seuil fixé, n'a pas été retenue pour cette étude.

## Analyse croisée



**Figure 18** : Répartition croisée des  $CI_{50}$  de la DHA et de la pipéraquline.

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).



**Figure 19** Répartition croisée des  $CI_{50}$  de la DHA et de l'amodiaquine.

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)

### Evolution des phénotypes en 2019-20

En 2019-20, les isolats importés de *P. falciparum* ont montré une sensibilité *in vitro* conservée vis à vis des molécules recommandées comme première ligne de traitement en France comme l'association artémether-luméfantrine ou l'association artémérol (DHA)-pipéraquline. La proportion de

souches résistantes à la chloroquine est stable. Parmi les molécules recommandées en prophylaxie, la proportion des souches dont les sensibilités à la doxycycline et surtout à la méfloquine sont diminuées, doit être surveillée avec attention. L'absence d'échec prophylactique vrai associé à ses souches ne permet pas de corréliser cette observation *in vitro* à une diminution d'efficacité *in vivo*, les seuils de résistance admis n'étant que des seuils épidémiologiques. On observe une stabilité du nombre de souches de sensibilité diminuée à l'amodiaquine, qui n'est pas recommandée en France, mais dont l'usage en Afrique sub-saharienne peut exposer à des échecs thérapeutiques tardifs d'accès traités en zone d'endémie, qui seront révélés en France.

### Génotypage des isolats

En 2019-2020, les études de génotypage ont portées sur 1484 isolats pour lesquels au moins un marqueur moléculaire de résistance a été analysé.

La mutation 76 du gène *pfcr1* : résistance à la chloroquine

En 2019-2020, parmi les 1047 isolats génotypés pour *pfcr1*, la proportion d'isolats sauvages *pfcr1*76 est de 78% (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 en 2019-2020 l'atteinte d'un plateau suite à la diminution de la proportion de souches résistantes à la chloroquine au cours des années précédentes (Tableau en annexe).

La proportion d'isolats sauvages et mutés pour chaque pays est présentée en annexe. Le Bénin (57%), le Congo (48%), la Guinée (56%), le Sénégal (31%) et le Tchad (35%) présentent encore de fortes proportions d'isolats mutés (Figure et Tableau en annexe)

La mutation du gène *pfcytb* : résistance à l'atovaquone

Aucun des 81 isolats génotypés prélevés à J0 n'est muté. Trois échecs thérapeutiques tardifs à l'atovaquone-proguanil déclarés en 2019-2020 présentent une mutation 268Cys de l'échantillon prélevé au jour de l'échec (Congo, Gabon, Guinée).

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

En 2019-2020, parmi les 1381 isolats génotypés pour *pfmdr1*, la proportion d'isolats sauvages *pfmdr1* est de 90% pour le codon 84, de 40,5% pour le codon 184 et de 99% pour le codon 1246.

La proportion d'haplotypes N86-184F (sélectionnés dans les cas de résistance à l'association artéméter-luméfántrine) est de 52% au total. Cet haplotype est identifié avec des taux supérieurs à 50% au Bénin (57%), au Burkina-Faso (80%), au Cameroun (59%), en Côte d'Ivoire (60%), en Guinée (56%), au Mali (70%), au Nigéria (62%), au Sénégal (66%) et au Togo (71%) (Figure et Tableau en annexe). La prévalence de cet haplotype est très faible aux Comores (7%).

La proportion d'haplotypes 86Y-Y184 (sélectionnés dans les cas de résistance à l'association dihydroartémisinine-pipéraquine) est de 3%. Cet haplotype est essentiellement identifié aux Comores (30%) et en Centrafrique (15%) (Figure et Tableau en annexe)

Les proportions d'isolats mutés *pfmdr1* N86Y et Y184F pour chaque pays et par année depuis 2014 sont présentées en annexe. Les proportions d'haplotypes N86-184F et 86Y-Y184 sont présentées en annexe pour les pays ayant plus de 20 cas de paludisme.

16 isolats (1,2%) sont mutés en position 1246 (D1246Y) et proviennent des Comores (12% de l'ensemble des isolats des Comores), du Bénin (2%), de Centrafrique (0,4%), de Guinée (1%) et du Sénégal (1%).

Le nombre de copies du gène *pfmdr1* (associé à la diminution de sensibilité à la méfloquine en Asie) a été évalué pour 730 isolats. Globalement, 68% des isolats possèdent 1 seule copie du gène *pfmdr1*, 31% deux copies et 1% plus de 2 copies. Au Mali, 28% (12 sur 43) des isolats évalués présentent 2 copies et 2% plus de deux, 20% au Sénégal (5 sur 25), 14% au Tchad (3 sur 22) et 52% au Togo (11 sur 21).

Les mutations du gène *pfdhfr* : résistance aux antifoliques

En 2019-2020, l'étude du gène *pfdhfr*, impliqué dans la résistance au proguanil, a été réalisée pour 1013 isolats de *P. falciparum*. La proportion d'isolats triple mutés *pfdhfr* S108N, N51I, C59R (IRN) est de 96% (86,6% en 2018). Les proportions d'isolats avec des triples mutations (S108N, N51L et C59R) sont relativement stables et élevés depuis 2008 (> 80%). Les isolats totalement sauvages NCS ne



représentent que 3,4% des échantillons. Les isolats des Comores qui présentaient une proportion de souches triples mutées (IRN) inférieure à 50% en 2018 (37%) présentent en 2019-2020 96% de parasites triples mutés. La plupart des pays ont un taux supérieur à 90%.

#### Nombre de copies du gène *plasmepdin 2* (*pfpm2*)

Le nombre de copies du gène *pfpm2* (associé à la diminution de sensibilité à la pipéraquline en Asie) a été évalué pour 162 isolats. Globalement, 91% des isolats évalués possèdent 1 seule copie du gène *pfpm2* et 9% 2 copies. Au Cameroun, 12% (4 sur 34) des isolats évalués présentent 2 copies, 22% au Congo (4 sur 18), 12% en Côte d'Ivoire (5 sur 40) et 8% au Mali (1 sur 13). L'unique isolat évalué au Rwanda possède 2 copies de *pfpm2*.

#### Polymorphisme du gène K13-propeller

En 2019-2020, le gène K13 impliqué dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine, a été séquencé pour 1409 isolats de *P. falciparum*. Aucun de ces isolats ne présente une mutation considérée comme associée à une diminution de sensibilité aux dérivés de l'artémisinine.

#### Evolution des génotypes en 2019-2020

Au cours de ces dernières années, la proportion d'isolats sauvages pour la mutation *pfcr76* a progressé passant de 35,4% en 2006 à 78% en 2019-2020. 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 au Bénin (57%), le Congo (48%), la Guinée (56%), le Sénégal (31%) et le Tchad (35%).

L'haplotype N86-184F sur *pfmdr1* est sélectionné dans les échecs cliniques à l'artéméther-luméfántrine. 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 un certain nombre de pays (Bénin, Burkina-Faso, Cameroun, Côte d'Ivoire, Mali, Nigéria, Sénégal et Togo) mais très rarement associée à une mutation en position 1246. Ces résultats suggèrent qu'un certain nombre de souches sont résistantes à la luméfántrine mais toujours sensibles à l'artéméther, se traduisant par l'absence de résistance à l'association artéméther-luméfántrine en Afrique. La prévalence de l'haplotype N86-184F est très faible aux Comores (7%).

L'haplotype 86Y-Y184 (sélectionné dans les cas de résistance à l'association dihydroartémisinine-pipéraquline) est identifié aux Comores (26%), au Mali (8%) et au Congo (8%) 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.

96% des isolats sont mutés sur *pfdhfr* (S108N, N51I, C59R) impliquant une résistance élevée à la pyriméthamine.

Les mutations du gène K13 impliqués dans la résistance aux dérivés de l'artémisinine en Asie du Sud-est ne sont pas détectées sur les souches africaines.

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

En 2019-2020, le profil de résistance à onze molécules de *P. falciparum* a été déterminé selon la technique du semi-microtest isotopique. Parmi les 21 prélèvements de *P. falciparum* reçu en 2019-2020 (incluant les 3 isolats issus du projet ORPAL), le LA-ZE a pu évaluer la chimiosensibilité d'une dizaine d'entre eux (**Figure 20**). Les échantillons en doublon ou isolés chez le patient peu de temps après le J0 ne sont pas présentés dans cette analyse de manière à ne pas biaiser les tendances. Une très faible parasitémie de plusieurs isolats a eu un impact sur la pousse des parasites justifiant le peu d'isolats testés avec succès sur la période. Ces analyses n'ont pas mis en évidence de modification de tendances particulières. Pour une analyse plus précise des valeurs, se reporter aux annexes de ce document. Une fiche par antipaludique présente les résultats (Annexe...)

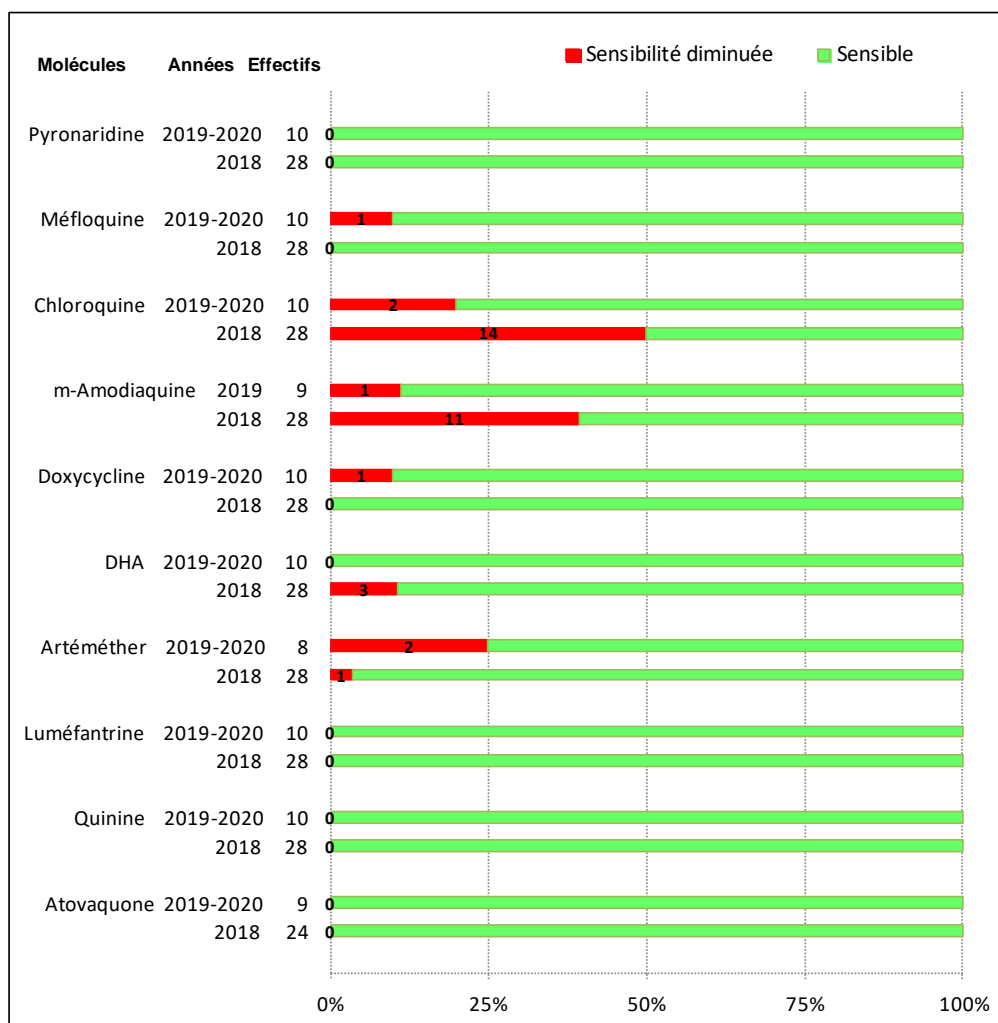


Figure 20. Phénotypage des isolats vis-à-vis de onze antipaludiques, 2018-2020.

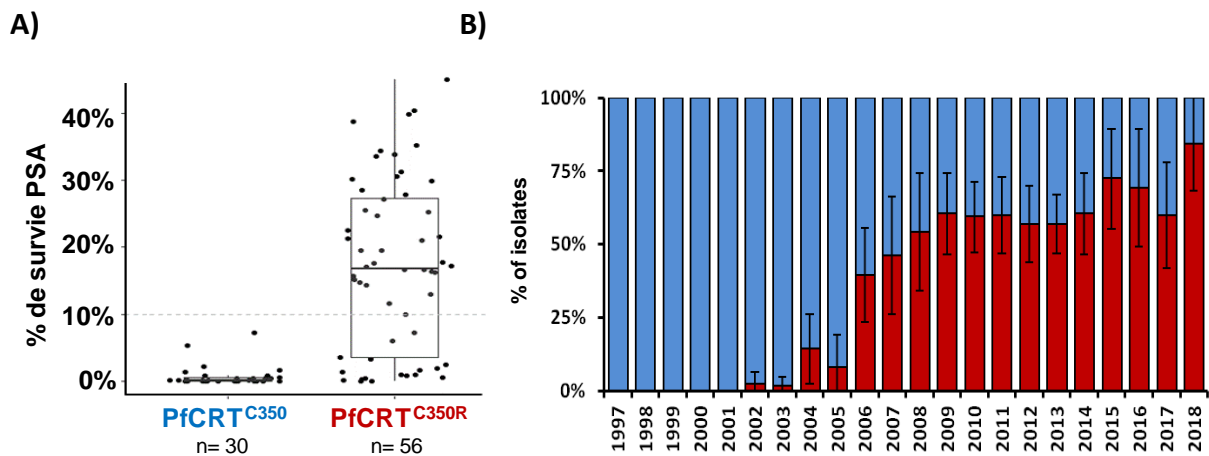
Au-delà des tests isotopiques, le laboratoire maîtrise la mise en œuvre de tests de survie permettant d'évaluer la sensibilité aux artémisinines et à la pipéraquline. C'est à ce jour l'unique méthode permettant d'évaluer la résistance à ces deux molécules. Ces tests évaluent la capacité des parasites à survivre à une exposition de 6h à 600nM de dihydro-artémisinine ou de 42h à 200nM de pipéraquline. Cette technique est très exigeante (début de la manipulation 1h du matin, lavage à 20h et fin à 15h trois jours plus tard) est mise en œuvre de façon intensive depuis 2015. Ceci nous a permis d'obtenir les résultats présentés à la **Figure 3**. Un isolat est considéré résistant quand son taux de survie est supérieur à 1%. Pour l'analyse de nos données, nous avons fixé ce seuil à 2% car les isolats mutants *pfK13* et résistants bien caractérisés en Asie du Sud Est ont généralement des taux de survie de plus de 15%. La variabilité observée de la méthode nous a également amené à ce choix. Pour la pipéraquline, le taux standardisé de 10% a été retenu.

Compte tenu de leur importance, les résultats présentés dans l'encart en début de chapitre sont redétaillés ici.

Sur 155 isolats testés vis-à-vis de la dihydro-artémisinine, 8,3% IC<sub>95</sub> [4,0 – 12,8] étaient résistants avec un seuil fixé à 2% de survie (**Figure 3**). 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.

Sur 131 isolats testés, 39,7% IC<sub>95</sub> [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 *pfCRT* C350R ( $p < 0.001$ , **Figure 21A**). 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.

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 21.** Sensibilité de *P. falciparum* à la pipéraquline en Guyane. A) génotype associé et B) évolution observée dans le temps de la mutation *pfprt* C350R (mutants en rouge, sauvage en bleu).  
 CRT : chloroquine resistant transporter, PSA : pipéraquline survival assay.

Aucune mutation sur le codon 268 du gène *pfcytb* conférant la résistance à l'atovaquone/proguanil (Malarone®) n'a été observée chez les 20 isolats étudiés pas plus que dans leur partie propeller du gène *pfK13*.

### 3.4 INTERFACES AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX

#### Contribution à la surveillance du paludisme autochtone

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), le réseau des Instituts Pasteur de surveillance des antipaludiques (Dr. D. Ménard), le réseau WWARN (Dr P. Guérin), les CDC d'Atlanta (Dr Kumar), l'OMS (Dr Pascal Ringwald, Dr Keith Carter). 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, la Cire Guyane ou plus rarement directement avec le département des maladies infectieuses. Les membres de la Cire 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 membre de la Cire AG 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, la Cire 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 2018 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. Ainsi le laboratoire a été à l'origine de la confirmation de la présence de parasites résistants aux artémisinines au Guyana et une analyse globalisée de parasites en provenance d'Amazonie (cf § **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). 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.

### 3.5 ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE

*P. ovale wallikeri* et *P. ovale curtisi* : du développement d'une méthode de différenciation à l'analyse rétrospective des cas du CNRP, période 2013-2018.

*Plasmodium ovale* spp est une des 5 espèces de *Plasmodium* pouvant infecter l'homme. Une de ses caractéristiques notables est sa capacité à donner des accès de reviviscence, qui sont définis par la réapparition de formes asexuées de *Plasmodium ovale* spp dans le sang périphérique après un traitement antipaludique adapté et bien suivi, sans nouvelle contamination. Depuis 2010, cette espèce a été séparée en *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri* sur la base de séquences génétiques distinctes. Nous avons développé une méthode de qPCR-HRM permettant de les distinguer.

Grâce à cette méthode, nous avons identifié 368 isolats de *Plasmodium ovale wallikeri* et 309 isolats de *Plasmodium ovale curtisi* reçus au CNR du Paludisme entre janvier 2013 et décembre 2018. Les données épidémiologiques, cliniques et biologiques recueillies ont permis de mettre en évidence une thrombopénie plus sévère (94 G/L [70-130] vs 111 G/L [84-145],  $p < 0,001$ ) et un délai de latence plus court (34 jours [10-95] vs 72 jours [18-208],  $p < 0,001$ ) lors des infections à *Plasmodium ovale wallikeri*. De plus, les patients infectés par *Plasmodium ovale wallikeri* ont été plus souvent traités par une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (29,2% vs 17,1%,  $p < 0,001$ ). Bien que non statistiquement significatif, les patients infectés par *Plasmodium ovale wallikeri* ont une tendance à être hospitalisés plus fréquemment en unités de soins intensifs/unités de soins continus ( $p = 0,134$ ) et à présenter une thrombopénie sévère ( $p = 0,123$ ) que les patients infectés par *Plasmodium ovale curtisi*.

Concernant les méthodes diagnostiques, les techniques immunochromatographiques détectant l'aldolase sont plus sensibles que celles détectant la pLDH (47,8% vs 10,6%,  $p < 0,001$ ).

Enfin, nous avons analysé les séquences du gène *potra* chez 90 isolats de *Plasmodium ovale* spp et mis en évidence que ce gène n'était pas suffisamment polymorphique pour être utilisé dans un objectif de typage génétique des reviviscences qui sont définies de façon clinique et épidémiologique.

*Plasmodium ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* Infections and Diagnostic Approaches to Imported Malaria, France, 2013-2018. Valentin Joste, Justine Bailly, Véronique Hubert, Cécile Pauc, Mathieu Gendrot, Emilie Guillochon, Marilyn Madamet, Marc Thellier, Eric Kendjo, Nicolas Argy, Bruno Pradines, Sandrine Houzé, French National Reference Center for Imported Malaria Study Group. Emerg Infect Dis 2021 Feb;27(2):372-384. doi: 10.3201/eid2702.202143.

#### Evaluation des performances analytiques du réactif Ampliquick® Malaria.

Dans le cadre des missions d'évaluation des réactifs pour le diagnostic du paludisme, nous avons évalué la PCR Ampliquick® Malaria produit par la société Biosynex. Ce kit peut être utilisé directement sur sang total ou sur de l'ADN extrait. Trois cibles sont amplifiées : la cible *Plasmodium falciparum*, la cible pan-plasmodiale (*Plasmodium* spp) et la cible ADN humain.

Pour évaluer ses performances, nous l'avons comparé à la LAMP Alethia® (Meridian), à la PCR *Plasmodium* typage de Bio Evolution et à une PCR Taqman maison nouvellement développée inspirée du travail de Tobias Schindler (Malaria Journal 2019, doi: 10.1186/s12936-019-2639-8.)

Avec la PCR LAMP prise comme gold-standard, la sensibilité de la PCR Ampliquick® Malaria sur sang total est de 82,7% alors qu'elle est de 97,1% sur ADN extrait. En comparaison, la PCR Bio Evolution présente une sensibilité de 95,2% et la PCR maison, 100%. Lorsque le frottis et/ou la goutte épaisse sont positifs, la sensibilité de la PCR Ampliquick® Malaria sur sang total est 96,7% alors qu'elle est de 100% pour les autres techniques. Aucun faux positif n'a été détecté.

La PCR Ampliquick® Malaria détecte l'espèce *Plasmodium falciparum* dans 76,5% des cas (13 échantillons négatifs, 6 pan+) sur sang total et dans 96,2% des cas à partir des extraits d'ADN (2 échantillons négatifs, 1 échantillon Pan+). La PCR maison permet de détecter l'ensemble des infections à *Plasmodium falciparum*.

En conclusion de ce travail, nous ne recommandons pas d'utiliser la PCR Ampliquick® sur sang total en raison de sa mauvaise sensibilité. En revanche, cette PCR réalisée sur extrait d'ADN permet d'obtenir des performances satisfaisantes, notamment en confirmation d'un frottis et/ou d'une goutte épaisse positive. Dans des cas où le frottis et la goutte épaisse sont négatifs, la PCR Ampliquick® sur ADN extrait peut cependant être faussement négative dans des cas de charge parasitaire faibles où seules la LAMP et la PCR maison sont positives

#### Evaluation des performances analytiques du réactif Ampliquick® Malaria.

Dans le cadre des missions d'évaluation des réactifs pour le diagnostic du paludisme, nous avons évalué la PCR Ampliquick® Malaria produit par la société Biosynex. Ce kit peut être utilisé directement sur sang total ou sur de l'ADN extrait. Trois cibles sont amplifiées : la cible *Plasmodium falciparum*, la cible pan-plasmodiale (*Plasmodium* spp) et la cible ADN humain.

Pour évaluer ses performances, nous l'avons comparé à la LAMP Alethia® (Meridian), à la PCR *Plasmodium* typage de Bio Evolution et à une PCR Taqman maison nouvellement développée inspirée du travail de Tobias Schindler (Malaria Journal 2019, doi: 10.1186/s12936-019-2639-8.)

#### Phylogénie des isolats de paludisme autochtone pour déterminer l'origine géographique de la transmission

L'observation concomitante de trois cas de paludisme autochtone aéroportuaires dus à *Plasmodium falciparum* au cours du mois de juillet 2020 nous a incité à étudier le génome parasite et à comparer les données obtenues avec les génomes publiés d'isolats parasites d'origine géographique connue.

A partir des prélèvements sanguins contemporains du diagnostic de paludisme, l'ADN total (humain et parasite) a été extrait. A partir de ces extraits d'ADN, nous avons amplifié spécifiquement le génome parasite à l'aide d'un jeu de primers ciblant préférentiellement le génome de *Plasmodium falciparum* (Oyola et al. 2016). Ces échantillons ont par la suite été séquencés (Illumina).

En parallèle de ces isolats, nous avons récupéré les données de séquençage de plusieurs dizaines d'échantillons issus du consortium Malariagen, couvrant un grand nombre de régions d'endémie palustre.

Les séquences des isolats liés aux cas de paludisme autochtone et celles issues de malariagen ont été soumises à un pipeline bioinformatique afin de dégager pour chaque isolat l'ensemble de la variation

génétique en excluant les régions subtélomériques, etc. L'ensemble des SNPs par échantillon, soumis à différentes étapes de filtration (profondeur, qualité, etc.) a ensuite été combiné pour obtenir un fichier qui contient l'ensemble de la variation génétique au sein de l'échantillonnage. Ces SNPs à travers la population étudiée ont été utilisés pour générer la phylogénie. La phylogénie permet de bien séparer les différentes régions du monde. Par ailleurs, nous pouvons ainsi savoir, phylogénétiquement, où sont embranchés les cas autochtones (dont on ignore initialement l'origine géographique de l'isolat).

Il est ainsi possible de déterminer qu'un isolat est rattaché à l'Afrique de l'Ouest, tandis que les deux autres isolats, très proches génétiquement, sont clairement regroupés avec les isolats d'Afrique Centrale, suggérant l'importation de deux anophèles distincts liés à la transmission.

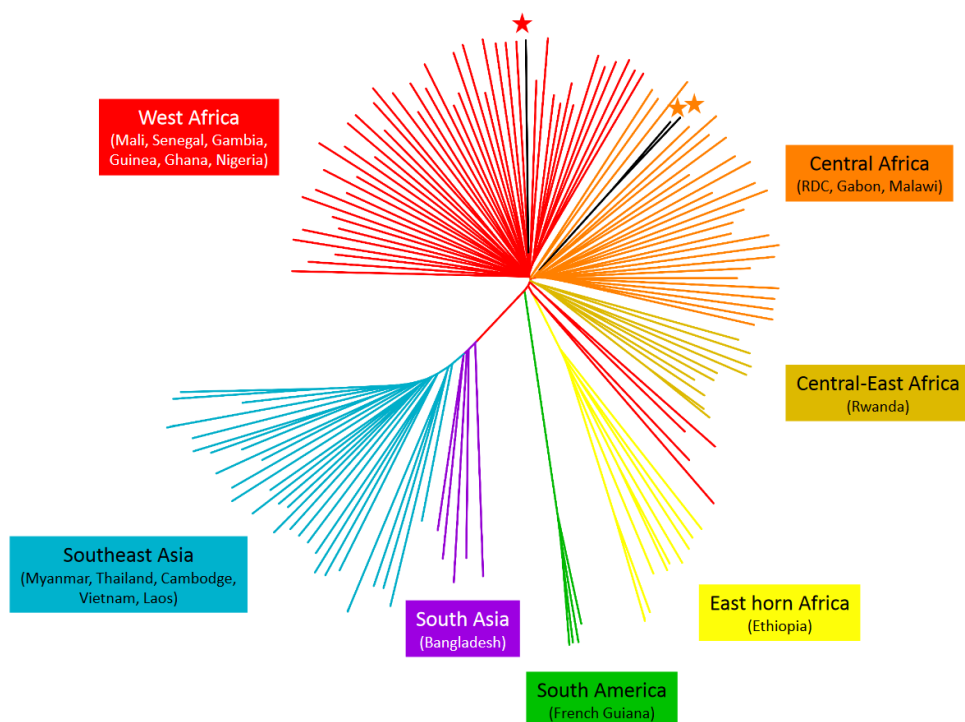


Figure 22 : Phylogénie des isolats autochtones (avec astérisques) de *P. falciparum* comparée aux données du Malariagen

Ce travail sera appliqué à l'ensemble des cas autochtones dont l'origine de la contamination est inconnue. A noter qu'il n'est pas possible de remonter à l'échelle du pays, étant donné le brassage chromosomique trop important.

Ce travail a été réalisé en collaboration entre le CNR du Paludisme et l'unité MERIT IRD 261 (R. Coppée, J. Clain).

#### Mise en place d'un laboratoire de chimiosensibilité *in vitro* à l'Hôpital Principal de Dakar (Sénégal) et évaluation du niveau de résistance aux antipaludiques au Sénégal

L'état-major des Armées en le Service de Santé des Armées Françaises a financé en 2008 la création et le développement d'un laboratoire d'étude de la chimiosensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux antipaludiques à l'hôpital militaire Sénégalais de Dakar, Sénégal (HPD). Une étude d'évaluation de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux antipaludiques est réalisée chaque année depuis 2009 à Dakar ainsi qu'une évaluation des marqueurs moléculaires de résistance. En 2018-2019, nous avons identifié 42,5% de souches ayant un haplotype CVIET sur *pfcr1* (positions 72-76) associé à la résistance à la chloroquine, 83,3% d'isolats ayant un haplotype IRNI sur *pfdhfr* (position 108, 51, 59, 164) associé à la résistance à la pyriméthamine, 90,9% de souches ayant un haplotype NF sur *pfmdr1* (position 86 et 184) associé à une diminution de sensibilité à la luméfantine, 0% ayant un haplotype YY sur *pfmdr1* (position 86 et 184) associé à une diminution de sensibilité à la pipéraquine, et 0% de mutation sur le gène *pfk13* associé à la résistance à l'artémisinine et à ses dérivés.



Gendrot M, Wague Gueye M, Tsombeng Foguim F, **Madamet M**, Wade KA, Bou Kounta M, Fall M, Diawara S, **Benoit N**, Lo G, Bercion R, **Amalvict R**, **Mosnier J**, Fall B, **Briolant S**, Diatta B, **Pradines B**. Modulation of in vitro antimalarial responses by polymorphisms in *Plasmodium falciparum* ABC transporters (*pfmdr1* and *pfmdr5*). *Acta Trop*, 2019, 196 :126-134.  
Robert MG, Foguim Tsombeng F, Gendrot M, Diawara S, Madamet M, Kounta MB, Wade KA, Fall M, Gueye MW, **Benoit N**, Nakoulima A, Bercion R, **Amalvict R**, Fall B, Wade B, Diatta B, **Pradines B**. Baseline *ex vivo* and molecular responses of *Plasmodium falciparum* isolates to piperazine before implementation of dihydroartemisinin-piperazine in Senegal. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019,63 :e02445-18.

### Evaluation du paludisme en Mauritanie

Depuis fin 2010, nous évaluons la prévalence et la morbidité dues au paludisme à *P. falciparum* et à *P. vivax* en Mauritanie associées à une évaluation entomologique des vecteurs et à une évaluation du niveau de résistance aux antipaludiques.

## ELIMALAR

### *PALUSTOP : Prévalence du paludisme à St Georges de l'Oyapock (Axe 1 du projet Elimalar)*

Coordinatrice ELIMALAR : L. Musset

Coordinatrice PALUSTOP : E. Mosnier, Centres Délocalisés de Prévention et de Soins, Hôpital de Cayenne

Participants au projet : O. Moriceau, Y. Lazrek, E. Roux, M. Gaillet, C. Michaud

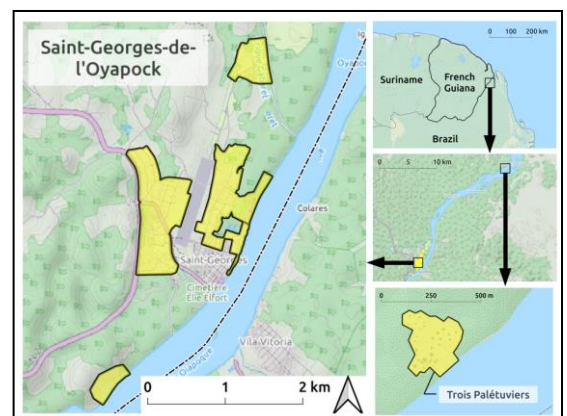
Collaborations : Association DAAC, IRD Espace-dev

#### Description succincte de l'étude

Au sein du projet ELIMALAR, nous avons développé un axe dédié au dépistage actif du paludisme suivi d'un traitement ciblé de l'ensemble des porteurs de parasites. PALUSTOP, nom donné à ce projet avait pour objectif de caractériser le réservoir parasite présent à Saint Georges de l'Oyapock en conduisant une enquête transversale avant-après entre octobre et décembre 2017 et 2018 auprès de 36% (n=1549/4355) des habitants de la commune. Les quartiers de St Georges présentant la plus forte incidence dans les deux ans auparavant ont été ciblés (Lorsqu'une personne positive était identifiée, un traitement incluant de la primaquine à distance pour les porteuses de *P. vivax* était administré par un infectiologue. Le dosage en G6PD a été effectué pour l'ensemble de la population. Les résultats ont ensuite été renseignés dans les dossiers patients du centre de santé afin de gagner du temps dans l'administration de primaquine lors d'un prochain accès palustre, même hors projet PALUSTOP. Les maisons ont également été géoréférencées. La démographie, les antécédents médicaux enregistrés et analysés par grappes géographiques (SaTScan). La prévalence de *Plasmodium spp.* a été mesurée par TDR et PCR et une analyse multivariée des facteurs de risque conduite.

Figure 23). Des tandems infirmier/médiateur en santé issus des communautés avaient pour mission de sensibiliser la population, de réaliser les enquêtes connaissances/attitudes/pratiques (CAP), soit environ 120 questions posées aux habitants, et les prélèvements.

Lorsqu'une personne positive était identifiée, un traitement incluant de la primaquine à distance pour les porteuses de *P. vivax* était administré par un infectiologue. Le dosage en G6PD a été effectué pour l'ensemble de la population. Les résultats ont ensuite été renseignés dans les dossiers patients du centre de santé afin de gagner du temps dans l'administration de primaquine lors d'un prochain accès palustre, même hors projet PALUSTOP. Les maisons ont également été géoréférencées. La démographie, les antécédents médicaux enregistrés et analysés par grappes géographiques (SaTScan). La prévalence de *Plasmodium spp.* a été mesurée par TDR et PCR et une analyse multivariée des facteurs de risque conduite.



**Figure 23.** Quartiers ciblés par les campagnes de dépistage actif (en jaune), PALUSTOP, Saint Georges de l'Oyapock, 2017 et 2018.

### Prévalence observée dans les différents quartiers

La PCR a montré que 100 des 1 501 participants prélevés étaient porteurs de *Plasmodium spp.*, 90% de *P. vivax* et 10% de *P. falciparum*. La prévalence globale était de 6,7% IC<sub>95</sub> [5,4 - 7,0]. Cette prévalence s'est avérée très variable en fonction des quartiers, entre 0,0 et 29,5% (Figure 24). Trois quarts, 74% IC<sub>95</sub> [66,5 – 83,5], des infections étaient asymptomatiques et seulement 13 cas ont été diagnostiqués par TDR.

Prévalence	2017	2018	Diff	Exhaustivité
<b>Blondin</b>	<b>29,5 (15,9-43,2)</b>	<b>2,3 (0,0-6,8)</b>	<b>-92%</b>	91,7%
<b>Trois-Palétuviers</b>	<b>26,1 (19,6-32,5)</b>	<b>7,2 (3,4-11,0)</b>	<b>-72%</b>	98,9%
Adimo	7,5 (2,4-12,6)	6,4 (1,8-11,0)	-15%	41,7%
Philogène	6,5 (0,9-12,0)	0,0 (0,0-3,9)	-100%	90,6%
<b>Village Martin</b>	<b>5,7 (2,0-13,5)</b>	<b>12,0 (0,0-24,7)</b>	<b>+110%</b>	42,3%
Esperance	1,9 (0,0-3,9)	1,6 (0,0-3,5)	-16%	55,8%
Crique Onozo	3,0 (0,8-5,3)	1,5 (0,0-3,3)	-50%	53,5%

**Figure 24.** Prévalence par PCR de *Plasmodium spp.*, Saint Georges de l'Oyapock, 2017 et 2018.

### Facteurs de risque associés au portage de plasmodies en 2017

L'analyse multivariée a mis en évidence qu'un âge supérieur à 15 ans (et plus particulièrement la tranche 15-24 ans), vivre dans des quartiers reculés, l'anémie ou encore la thrombopénie étaient indépendamment associés à une probabilité accrue de portage de *Plasmodium spp.* Ainsi, le risque de portage était significativement plus élevé dans trois quartiers (Trois Palétuviers: RR = 7,16, p <0,01 ; Blondin: RR = 5,15, p = 0,002 et Adimo: RR = 12,43, p = 0,046). Ces quartiers sont situés près de la forêt et éloignés du centre de santé.

### Evaluation de l'impact de l'intervention de 2017

En 2018, les mêmes personnes ont été contactées et prélevées à nouveau. La prévalence générale du portage de plasmodies avait alors diminuée de 54% pour atteindre 2,9% IC<sub>95</sub> [1,9 - 3,9] (p<0,001). La proportion de *P. falciparum* était légèrement plus importante (17%). Pendant la période écoulée entre la première intervention et la deuxième, le nombre de cas symptomatiques a également significativement diminué passant de 6,1% à 2,7% (p<0,05). Il est donc difficile de dissocier l'impact de l'intervention des variations épidémiques observées mais il semblerait que cette approche ait eu un impact sur la transmission puisque cette diminution est moins élevée chez les personnes des mêmes quartiers n'ayant pas participé à l'étude. L'impact est très certainement majoritairement lié au traitement systématique par primaquine des patients atteints par *P. vivax* ce qui est peu effectué en temps normal faute de temps, d'accès au diagnostic G6PD et du fait de l'éloignement des patients de la structure de soin qui rend leurs rendez-vous multiples difficiles. Le déploiement d'une méthode de dosage de la G6PD rapide et performante au centre de santé de Saint Georges devrait améliorer en partie la situation (cf §8).

### Connaissances et pratiques de la population, mieux les connaître afin de les améliorer

Au cours de la campagne de dépistage actif « PALUSTOP » de 2017, une enquête attitudes et pratiques a également été conduite. Les résultats de cette enquête ont montré des connaissances sur le paludisme limitées (Figure 25).



Questions posées	Réponse « Non »	N (%)
Concernant les moyens de prévention		
« les traitements peuvent-ils prévenir le paludisme ? »	791 (93,7%)	
Concernant les recours thérapeutiques		
« les médicaments peuvent-ils guérir le paludisme ? »	221 (26,2%)	
Concernant les modes de transmission		
« Les moustiques transmettent ils le paludisme ? »	227 (26,9%)	
Concernant les symptômes du paludisme		
« la fièvre est-elle un symptôme du paludisme ? »	451 (53,4%)	

Figure 25. Pratiques vis-à-vis du paludisme, Saint Georges de l'Oyapock, 2017.

Ce niveau de connaissances était d'autant plus limité que les personnes interrogées étaient jeunes (moins de 25 ans,  $p = 0,013$ ), qu'elles vivaient dans un quartier amérindien éloigné ( $p < 0,001$ ) ou que leur activité était agriculteur, retraité ou sans emploi ( $p < 0,001$ ). Le bon niveau de connaissances était lui associé au fait de parler brésilien ( $p < 0,001$ ) ou d'avoir accès à différentes sources d'information ( $p < 0,001$ ).

L'étude de la langue maternelle des individus a permis de recenser 35% de lusophones, 34% de personnes parlant une langue amérindienne, 24% de créolophones (incluant une grande partie de personnes d'origine amérindienne) et 7% de francophones (Figure 26). Ainsi, les messages en langue française ou de concept occidental avaient peu de chance d'atteindre leur cible.

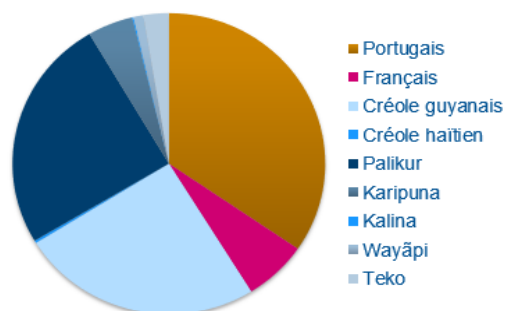


Figure 26. Langue maternelle des habitants de l'étude PALUSTOP, Saint Georges de l'Oyapock, 2017.

Nous nous sommes par exemple rendu compte que la fièvre est difficilement identifiable telle qu'on la décrit le plus souvent pour les populations de ces quartiers. De ce fait, difficile de comprendre les messages d'éducation qui disent d'aller consulter au moindre signe de fièvre.

Au cours de cette étude, nous avons aussi testé différents outils d'éducation au paludisme tel que le théâtre forum, qui consiste à faire jouer aux participants une situation de la vie réelle en lien avec le paludisme, ou encore le photo langage, pratique qui consiste à montrer aux apprenants plusieurs images sur le thème du paludisme dans le contexte local afin de susciter la discussion et la recherche de solution collectivement. Des images animées à transmettre via les réseaux sociaux ont également été conçues et testées. Toutes les approches n'ont pas fonctionné de la même manière en fonction de l'origine culturelle ou de l'âge des participants.

**Articles publiés 2020.** Mosnier et al., Am J Trop Med Hyg, Mosnier et al., BMC Infect Dis, 2021 Scully et al., Int J Environ Res Public Health. Et nombreuses présentations (cf §6.2).

### REAGIR : Résistance aux artémisinines en Amazonie (Axe 2 du projet Elimalar)

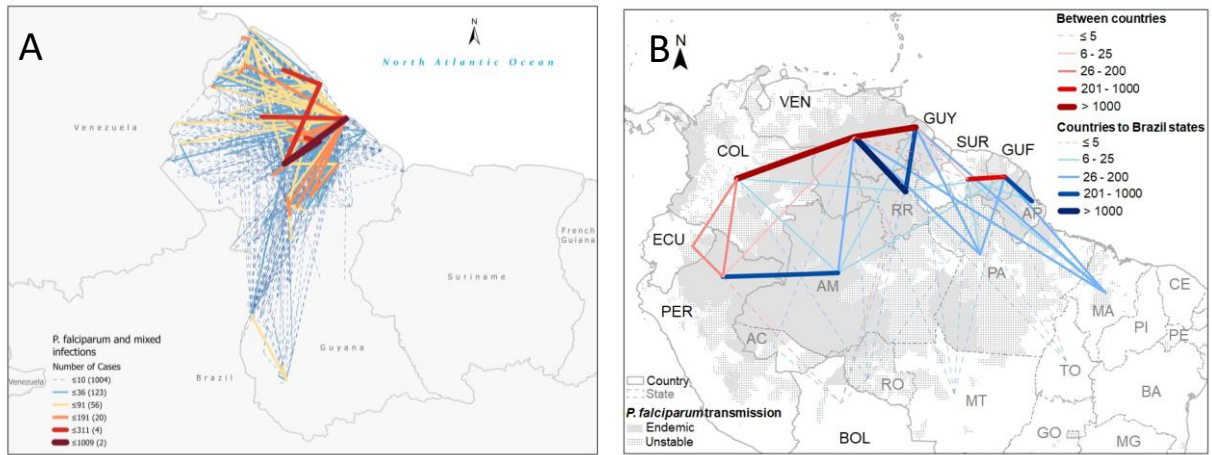
Collaborations: Dr Horace Cox - Ministère de la santé publique du Guyana  
WHO/GMP - P. Ringwald  
D. Fidock - Columbia University  
D. Neafsey - Harvard University  
Y. Kumar - CDC Atlanta

PALUSTOP représente le volet 1 du projet de recherche opérationnelle ELIMALAR, le volet 2, REAGIR vise à déterminer si les associations d'antipaludiques à base de dérivés de l'artémisinine (ACT) associés à une molécule partenaire (luméfantrine ou pipéraquline) aujourd'hui recommandées dans le monde entier et utilisée en Guyane pour traiter les patients sont toujours efficaces et si oui, pour combien de temps. Les résultats obtenus au sujet de l'artémisinine sont présentés au §3.3 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** et ceux relatifs à la pipéraquline au §3.3.

Au cours de la dernière décennie en Asie du Sud-Est, les artémisinines, la composante essentielle des traitements antipaludiques de première ligne contre *P. falciparum* ont sélectionnés des parasites partiellement résistants qui présentaient une mutation au niveau du gène *pfk13*. En 2019-2020, nous avons confirmé la présence de 1,6% (14/854) de parasites mutants au Guyana en 2016-2017. Cette mutation a émergé indépendamment de l'Asie du Sud-Est puisque le fond génétique des parasites mutants étaient sud américain. Par ailleurs, grâce à l'introduction de la mutation *pfk13* C580Y ou R539T par modification génétique dans des parasites guyanais a conféré des niveaux élevés de résistance à l'artémisinine *in vitro*. Les tests de compétition de croissance *in vitro* ont aussi révélé un impact négatif sur la multiplication des parasites lorsqu'ils étaient porteurs de ces variations. Cet impact pourrait expliquer pourquoi ces allèles de résistance n'ont pas augmenté plus rapidement en fréquence dans notre région. Le niveau d'efficacité de la luméfantrine peut également expliquer ces résultats. Ces données mettent en péril les efforts locaux de lutte contre le paludisme dans le plateau des Guyanes.

En plus du Guyana, cette étude de l'épidémiologie moléculaire du gène *pfk13* a été étendue à la partie est-amazonienne du continent. Aucune mutation particulière n'a été identifiée si ce n'est la mutation A481V chez un isolat de Manaus et A504D chez un isolat colombien. A481V a précédemment été décrite en Asie du Sud Est comme liée à la résistance. Une perspective de travail pourrait être de transférer cette mutation pour évaluer son impact.

Par ailleurs, une analyse du risque de dispersion des mutants à partir de la Région 1 du Guyana a été effectuée sur la base des mouvements de populations humaines estimés à l'aide du nombre de cas importés entre les différentes régions d'Amazonie. Ainsi, le risque de dispersion à partir du foyer actuellement identifié du Guyana se situerait essentiellement à l'intérieur du Guyana lui-même dans un premier temps (Figure 27A). Dans un second temps, cette mutation se disperserait aux états du Roraima au Brésil et de Bolivar au Venezuela voisins (Figure 27B). Un lien très étroit existe également entre les états du Maranhão, Pará et Amapá au Brésil et les pays du plateau des Guyanes car les orpailleurs brésiliens qui y travaillent sont très souvent originaires de ces états. Ainsi, la mutation pourrait également se disperser dans ces zones, Amapá et Pará essentiellement, puisque le Maranhão n'est pas une zone de transmission du paludisme.



Sources Paho, Ministère de la santé publique du Guyana.

Figure 27. Mouvement des cas de paludisme à Plasmodium falciparum, entre le lieu potentiel de contamination et le lieu de diagnostic au Guyana (A) et en Amazonie (B), 2015-2018.

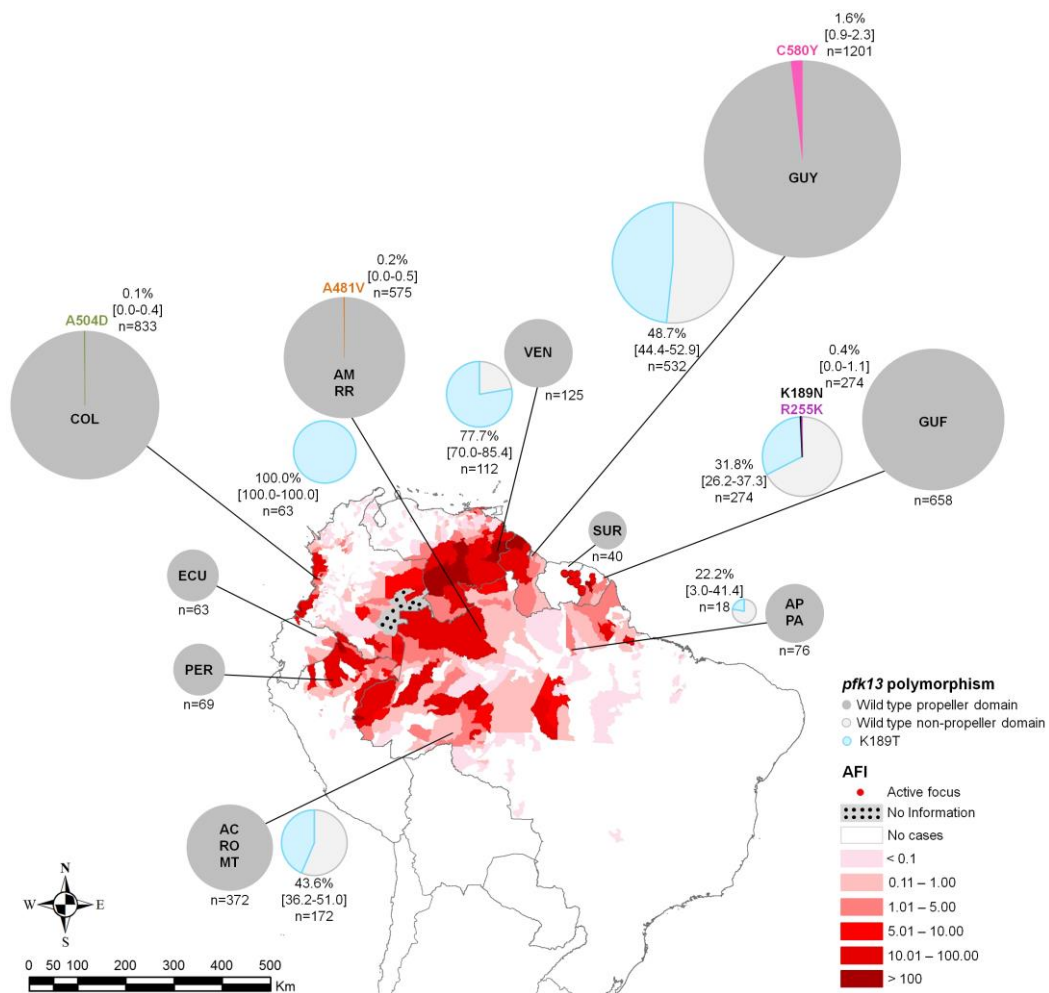


Figure 28. Distribution des mutations pfk13 en Amazonie entre 1983 et 2019.

Les diagrammes représentent les prévalences des allèles par pays. Le nombre total d'échantillons figure en dessous. La carte représente l'incidence annuelle de P. falciparum dans la région des Amériques en 2017 (source PAHO). Pour la Brésil, les résultats sont regroupés par état proches. Il est à noter que les isolats colombiens et équatoriens ont été essentiellement collectés sur la Côte (99,8% et 93,7%). Etats brésiliens: AC (Acre), AM (Amazonas), AP (Amapá), MT (Mato Grosso), PA (Pará), RO (Rondônia), RR (Roraima). Pays: COL (Colombie), ECU (Equateur), GUF (Guyane), GUY (Guyana), PER (Pérou), SUR (Suriname), VEN (Venezuela).

**Articles publiés 2020.** Mathieu et al., eLife. **2021.** Mathieu et al., JAC. Communication ASTMH et ECCMID pour les résultats pipéraqine (cf §6.2).

## Prévalence des délétions des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* chez *Plasmodium falciparum* sur le plateau des Guyanes.

Porteurs du projet: L. Musset – L. Berthelot

Participants : L. Berthelot, P. Wüebbenhorst

Financement : PAHO, Santé publique France

Collaborations: Ministère de la santé du Guyana

Ministère de la santé du Venezuela

Organisation Panaméricaine de la santé

Depuis 2009, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) recommande de confirmer rapidement toute suspicion de cas de paludisme avant de délivrer un traitement antipaludique adapté en procédant à un diagnostic de certitude basé sur la recherche des plasmodies par microscopie ou test de diagnostic rapide (TDR) avant d'administrer un traitement antipaludique adapté. Cette recommandation a conduit à un essor des TDR qui sont devenus des outils diagnostiques de choix dans les zones reculées aux infrastructures limitées. Ces TDR permettent entre autres la détection de *Plasmodium falciparum* par la recherche de la protéine riche en histidine (Pf-HRP2). Des parasites délétés pour le gène *pfhrp2*, qui code cette protéine, ont cependant été décrits en Amazonie. Le risque est alors d'étiqueter à tort un accès à *P. falciparum* comme un accès à *P. vivax* et de le traiter par chloroquine alors que sur le plateau des Guyanes, 20 à 30% des parasites sont chloroquino-résistants. En raison des flux migratoires et de la place des TDR dans cette région, une surveillance accrue de ces délétions est nécessaire. Ainsi, des isolats collectés entre 2015 et 2017 en Guyane, au Guyana et au Venezuela ont été étudiés selon les recommandations de l'OMS afin d'estimer la prévalence des délétions au niveau des gènes *pfhrp2/3*. Huit PCR analysant les deux parties, jonction exon 1-2 et exon 2, des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* et leurs gènes adjacents ont ainsi été utilisées. Le protocole d'étude comprenait également une PCR en temps réel comme méthode semi-quantitative permettant d'évaluer la quantité et la qualité de l'ADN des isolats étudiés afin de sélectionner les échantillons analysables. Un total de 690 isolats a été étudié. Au Venezuela, 39% (IC95 [28,1 – 49,9]) des parasites présentaient une délétion au niveau du gène *pfhrp3* et 2,6% (IC95 [0 – 6,8]) au niveau de *pfhrp2*. Au Guyana (n=265) et en Guyane (n=230), aucun parasite délété pour le gène *pfhrp2* n'a été mis en évidence et respectivement 3,0% IC95 [0,9% - 5,1%] et 0,5% IC95 [0 – 1,5] pour le gène *pfhrp3*. Les délétions *pfhrp2* sont inclus généralement une délétion du gène en aval MAL7P1.230. Les délétions *pfhrp3* sont elles plus larges et inclus a minima les deux gènes situés en amont et en aval de *pfhrp3*. Ces données robustes mettent pour la première fois en évidence des isolats délétés pour le gène *pfhrp2* au Venezuela et confirme leur absence en Guyane et au Guyana. Par conséquent, la surveillance reste de mise au Venezuela mais les TDR basés sur Pf-HRP2 restent des outils diagnostiques adaptés dans ces pays.

## 4 ALERTE

---

### 4.1 POLE ZONES NON ENDEMIQUES

Au CNR Pôle métropole, lorsqu'un membre du laboratoire décèle une déclaration de cas anormal ou un dossier d'intérêt (échec thérapeutique, interférence diagnostique,...), il le signale au responsable du laboratoire qui évalue l'information et la suite à donner. Si cet élément peut avoir des conséquences de santé publique, les autorités sanitaires sont informées.

Le CNR est en relation avec le Département des Maladies Infectieuses de l'InVS.

## 4.2 PHENOMENES AYANT FAIT L'OBJET D'UN SIGNALEMENT OU D'UNE ALERTE.

### En métropole

Neuf cas suspects de paludisme autochtones ont été signalés à l'ARS en 2019-20 et/ou notifiés au CNR par ses correspondants et pour lesquels des échantillons sanguins ont été transmis pour expertise.

Parmi ces cas, cinq cas ont été considérés comme étant associés à une transmission via un anophèle importé par des aéronefs, et un cas par une transmission via un anophèle importé dans un bagage. Deux cas ont été considérés comme cryptiques (l'origine de la contamination n'a pas été déterminée) et un cas est lié à une contamination nosocomiale.

Huit cas étaient liés à une infection par *Plasmodium falciparum*, et un cas était lié à une infection par *Plasmodium vivax* (ayant conduit au décès du patient).

Les investigations menées autour de ces cas n'ont pas mis en évidence de foyer de transmission locale.

Des cas suspects peuvent également être l'occasion d'échanges entre le CNR, l'ARS et l'InVS : des voyages non signalés sont fréquemment l'élément épidémiologique qui permet d'écartier un cas autochtone.

## 4.3 POLE ZONES ENDEMIQUES : LABORATOIRE ASSOCIE INSTITUT PASTEUR DE LA GUYANE

### Phénomènes anormaux en Guyane

La procédure de signalement propre au Pôle Zones Endémiques est détaillée dans l'annexe 1 du présent rapport. Début 2021 nous avons signalé la problématique de la résistance à la pipéraquline en Guyane aux autorités sanitaires. Ce signalement est en cours de traitement.

# 5 ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

---

## 5.1 CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE

### Pôle Zones non endémiques

Participation de S Houzé à l'enseignement en parasitologie du 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> cycles des études pharmaceutiques, Paris Descartes, à l'enseignement des formations de Master 1 santé Paris 5, Master 2 microbiologie Paris Sud ; Master 2 Pharmacologie clinique et préclinique, Paris Descartes, DIU Médecine du voyage et santé des voyageurs.

Participation de M Thellier à l'enseignement en parasitologie du 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> cycles des études médicales de Sorbonne Université UPMC, à l'enseignement des formations de Master 1 santé et Master 2 Parcours Microbiologie de Sorbonne Université, au DIU Médecine des voyages - santé des voyageurs des Universités Paris VI et Paris VII, au DU de médecine tropicale et humanitaire de l'Université de Rennes, à la Capacité inter Universitaire de Médecine Tropicale des Universités Paris V, VI et VII.

Participation de S. Houzé et de M. Thellier, au DES de biologie médicale, module parasitologie, université Paris Diderot et Paris Descartes ;

Participation de S. Houzé, M. Thellier, Bruno Pradines, Lise Musset, et les membres du COPIL du CNR aux journées nationales du CNR du Paludisme en 2019 et 2021 (sous format webinaire)

Participation de B Pradines aux cours de Master 2<sup>ème</sup> année – Maladies transmissibles – Pathologies tropicales, module : Emergence et ré-émergence des maladies infectieuses, entomologie médicale – Faculté de Médecine de Marseille - Aix-Marseille II, *Génétique de Plasmodium et résistance aux antipaludiques*.

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

Accueil au CNR du Paludisme d'Ibrahima ISSA ARZIKA, assistant de recherche au CERMES (Centre de recherche médicale et sanitaire) à Niamey au Niger pour un stage de 4 mois de formation aux techniques d'étude de la sensibilité *in vitro* de *P. falciparum* aux antipaludiques. Une collaboration a été ainsi initiée avec ce partenaire pour la poursuite de travaux communs.

### 5.1.2 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 2020 (cf. Annexe 9 et 10). Il est très largement diffusé par voie électronique à l'ensemble de nos partenaires (CDPS, Organisation Panaméricaine de la Santé, OMS, Cire-Guyane, ARS, SPF, DGS, médecins de ville...).

## 5.2 CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES

### Pôle Zones non Endémiques

Le CNR Paludisme a participé :

- aux réunions téléphoniques impliquant les ARS, la DGS, SPF sur les mesures à mettre en place suite aux signalements de cas de paludisme autochtone

- à l'élaboration des avis du Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) relatifs aux recommandations pour les voyageurs (Sandrine Houzé et Marc Thellier)

Par ailleurs, Marc Thellier a des missions d'expert :

- Direction Générale de la Santé, Membre du comité de sélection des LBMR, du 05/07/2019 à aujourd'hui
- Haut Conseil de la Santé Publique GTP Secproch, expert, du 17/06/2019 à aujourd'hui

### 5.2.2 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 gyanaises 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 hors période COVID un temps personnel considérable, environ 20% d'ETP au minimum. Ainsi en 2019 et 2020 ont eu lieu des réunions d'échanges autour :

- de la refonte de la carte de risque de paludisme en Guyane,
- du suivi du plan paludisme,
- des projets de recherche opérationnels conduits par le laboratoire, notamment ELIMALAR,
- du projet de recherche opérationnel MALAKIT conduit par le CIC-EC de l'Hôpital de Cayenne.

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 des 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. Dans ce cadre, un certains nombres d'isolats étrangers sont analysés et le laboratoire participe aux côtés de l'OMS/PAHO à un certains nombre de 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.

Dans ce cadre, en 2019, le laboratoire a :

- audité l'étude d'efficacité thérapeutique de l'artéméther-luméfantrine pour traiter les patients atteints de *P. falciparum* au Guyana, deux sites d'inclusions, Georgetown et Port Kaituma. L'étude était coordonnée par le CDC (Avril 2019).
- présenté ses travaux du suivi des résistances à la réunion autour de l'élimination du paludisme en Amérique du Sud organisée par la PAHO à Manaus (Août 2019).
- Participé aux discussions autour de la problématique des populations mobiles à Paramaribo au Suriname (Octobre 2019).

En 2020 compte tenue de la pandémie COVID, les déplacements ont été limités et les expertises OMS autour de la question du paludisme également aussi.

## 5.3 CONSEIL ET EXPERTISE POUR D'AUTRES CIBLES (MEDIAS, GRAND PUBLIC...)

### Pôle Métropole

Un nouveau site web accessible à tout public a été créé en 2020 : <https://cnr-paludisme.fr/>

Les principales rubriques sont :

- La présentation du CNR avec son organisation, ses missions, les liens et documents utiles, les adresses des
- Les activités d'expertise assurées par le CNR du Paludisme
- Des informations à l'intention des voyageurs sur les recommandations de prévention du paludisme
- Le diagnostic du paludisme et les recommandations thérapeutiques en cours
- Les travaux du CNR en termes de protocoles de recherche et de production scientifique
- Les modalités de déclaration et de surveillance en fonction de l'endémicité locale
- Une possibilité de contact via un envoi de mail.





Par ailleurs, Marc Thellier a participé à une émission sur RFI magazine « Priorité Santé » le jeudi 22 avril 2021 à l'occasion de la journée mondiale de lutte contre le paludisme.

<https://www.rfi.fr/fr/podcasts/appels-sur-l-actualit%C3%A9/20210428-vos-questions-d-actualit%C3%A9>

### 5.3.2 Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

**Fête de la science, écoles**, en novembre 2019 s'est tenue la 3<sup>ème</sup> journée dédiée à la fête de la science à Maripa Soula. Le CNR paludisme y a participé. Le public cible était des enfants de plusieurs écoles et niveaux scolaires. Ceci a permis d'aborder les questions de paludisme à travers des observations de frottis au microscope et de diaporama et de rappeler aux enfants les messages de prévention du paludisme.

**En 2019 et 2020, des supports de communication ont été réalisés dans le but d'expliquer l'étude G6PD facile à venir et d'expliquer également le favisme et les risques associés.**

## 6 TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR

### 6.1 ACTIVITES DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC LES ACTIVITES ET MISSIONS DE CNR

#### 6.1.1 Pole Zones non Endémiques

##### *Identification et validation de nouveaux marqueurs moléculaires de résistance au 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 *pfcr*, *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 6 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 3. 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.

Foguim FT, Robert MG, Gueye MW, Gendrot M, Diawara S, **Mosnier J, Amalvict R, Benoit N**, Bercion R, Fall B, **Madamet M, Pradines B**. Low polymorphisms in *pfact*, *pfugt* et *pfcarl* genes in African *Plasmodium falciparum* isolates and absence of association with susceptibility to common anti-malarial drugs. Malar J, 2019, 18 :293.



Foguim Tsombeng F, Gendrot M, Robert MG, **Madamet M, Pradines B**. Are k13 and plasmepsin II genes, involved in *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin derivatives and piperazine in Southeast Asia, reliable to monitor resistance surveillance in Africa. *Malar J*, 2019, 18 :285.

Gendrot M, Wague Gueye M, Tsombeng Foguim F, **Madamet M**, Wade KA, Bou Kounta M, Fall M, Diawara S, **Benoit N**, Lo G, Bercion R, **Amalvict R, Mosnier J**, Fall B, **Briolant S**, Diatta B, **Pradines B**. Modulation of in vitro antimalarial responses by polymorphisms in *Plasmodium falciparum* ABC transporters (*pfmdr1* and *pfmdr5*). *Acta Trop*, 2019, 196 :126-134.

Robert MG, Foguim Tsombeng F, Gendrot M, Diawara S, **Madamet M**, Kounta MB, Wade KA, Fall M, Gueye MW, **Benoit N**, Nakoulima A, Bercion R, **Amalvict R**, Fall B, Wade B, Diatta B, **Pradines B**. Baseline *ex vivo* and molecular responses of *Plasmodium falciparum* isolates to piperazine before implementation of dihydroartemisinin-piperazine in Senegal. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019,63 :e02445-18.

Delandre O, Daffe SM, Gendrot M, Diallo MN, **Madamet M**, Kounta MB, Diop MN, Bercion R, Sow A, Ngom PM, Lo G, **Benoit N, Amalvict R, Fonta I, Mosnier J**, Diawara S, Wade KA, Fall M, Fall KB, Fall B, **Pradines B**. Absence of association between polymorphisms in the *pfcoronin* and *pfk13* genes and the presence of *Plasmodium falciparum* parasites after treatment with artemisinin derivatives in Senegal. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 56, 106190.

Foguim FT, Bogreau H, Gendrot M, **Mosnier, Fonta I, Benoit N, Amalvict R, Madamet M**, Wein S, **Pradines B**. Prevalence of mutations in the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter, PfCRT, and association with *ex vivo* susceptibility to common anti-malarial drugs against African *Plasmodium falciparum* isolates. *Malar J*, 2020, 19 :201.

### *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 (> 200 échantillons évalués en 2019-2020) 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. En 2019-2020, nous avons analysé la sensibilité de plus de 500 isolats de *P. falciparum* à Proveblue afin de définir la distribution bayésienne des réponses *in vitro* (concentration inhibitrice 50%) et d'identifier des souches de sensibilité diminuée. Nous avons évalué l'association de marqueurs de résistance standards (*pfcr*, *pfmdr1*, *pfk13*, *pfpm2*) et de gènes pouvant être potentiellement impliqués dans la résistance aux antipaludiques (*pfmdr5*, *pfmdr6*, exonucléase, RING E3 ubiquitin protein ligase, *pfact*, *pfugt*, *pfcarl*, *pfpm2*, *pfcoronine*), sans en montrer une quelconque implication. Une souche sensible au bleu de méthylène est en culture sous pression discontinue afin d'obtenir une souche résistante.

Kowouvi K, Alies B, Gendrot M, Guabert A, Vacher G, Gaudin K, **Mosnier J, Pradines B**, Barthelemy P, Grislain L, Millet P. Nucleoside-lipid-based nanocarriers for methylene blue delivery : potential application as anti-malaria drug. *RCS Adv*, 2019,9 :18844-18852.

Knockleby J, **Pradines B**, Gendrot M, **Mosnier J**, Nguyen TT, Trinh TT, Lee H, Le PM. Cytotoxic and anti-plasmodial activities of *Stephania dielsiana* Y.C. Wu extracts and the isolated compounds. *Molecules*, 2020, 25 :3755.

Gendrot M, **Madamet M, Mosnier J, Fonta I, Amalvict R, Benoit N**, Briolant S, **Pradines B**. Baseline and multinormal distribution of *ex vivo* susceptibilities of *Plasmodium falciparum* to methylene blue in Africa, 2013-18. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75 :2141-2148.

Shalini, Kumar S, Gendrot M, **Fonta I, Mosnier J**, Cele N, Awolade P, Singh P, **Pradines B**, Kumar V. Amide tethered 4-aminoquinoline-naphthalimide hybrids: A new class of possible dual function antiplasmodials. *ACS Med Chem Lett*, 2020,11:2544-2552.

### *Evaluation de l'activité in vitro anti-virale des antipaludiques vis-à-vis de souches de SARS-CoV-2*

La majorité des antipaludiques ont montré une activité *in vitro* anti-SARS-CoV-2 comprise entre 1 et 10 µM.

Gendrot M, Andreani J, Jardot P, Hutter S, Delandre O, Boxberger M, **Mosnier J**, Le Bideau M, Duflot I, **Fonta I**, Rolland C, Bogreau H, La Scola B, **Pradines B**. In vitro antiviral activity of doxycycline against SARS-CoV-2. *Molecules*, 2020, 25. 5064.

Gendrot M, Andreani J, Duflot I, Boxberger M, Le Bideau M, **Mosnier J**, Jardot P, **Fonta I**, Rolland C, Bogreau H, Hutter S, La Scola B, **Pradines B**. Methylene blue inhibits the replication of SARS-CoV-2 *in vitro*. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 56, 106202.

Gendrot M, Andreani J, Boxberger M, Jardot P, **Fonta I**, Le Bideau M, Duflot I, **Mosnier J**, Rolland C, Bogreau H, Hutter S, La Scola B, **Pradines B**. Antimalarial drugs inhibit the replication of SARS-CoV-2 : An *in vitro* evaluation. *Travel Med Infect Dis*, 202, 37 :101873.

Gendrot M, Duflot I, Boxberger M, Delandre O, Jardot P, Le Bideau M, Andreani J, **Fonta I, Mosnier J**, Rolland C, Hutter S, La Scola B, **Pradines B**. Antimalarial artemisinin-based combination therapies (ACT) and COVID-19 in Africa : *In vitro* inhibition of SARS-CoV-2 replication by mefloquine-artesunate. *Int J Infect Dis*, 2020, 99 :437-440.

Gendrot M, Javelle E, Clerc A, Savini H, **Pradines B**. Chloroquine as a prophylactic agent against COVID-19? *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 55 :105980.

Laloui R, Bakour S, Raoult D, Verger P, Sokhna C, Devaux C, **Pradines B**, Rolain JM. What could explain the late emergence of COVID-19 in Africa? *New Microbes New Infect*, 2020, 38 :100760.

## 6.1.2 Pôle Zones Endémiques : Laboratoire associé Institut Pasteur de la Guyane

### Transmission en zones orpaillées : ORPAL complété par MALAKIT

Porteur de projet :	M. Douine, CIC Guyane
Collaborations :	L. Musset, Laboratoire de parasitologie Ministères de la santé du Brésil, du Suriname, de France ARS Guyane Associations DPAC et SWOS Fiocruz
Financements :	Interreg, ARS Guyane, Fond Mondial...

En 2015 en zone orpaillées, la prévalence moyenne de *Plasmodium spp* était de 22,3%. L'automédication y semblait très courante, mais ses modalités et les facteurs associés étaient peu connus. A la suite de ces constatations, le programme pilote de recherche opérationnelle MALAKIT a été mis en place. Il visait à distribuer des kits d'autodiagnostic et d'auto-traitement aux personnes vivant dans ces zones reculées et de les former à la réalisation de ces tests et la prise du traitement complet, en cas de positivité uniquement. La finalité de ce projet était double : i) limiter les traitements présomptifs et la prise aléatoire et non contrôlée d'antipaludiques et, ii) si la distribution atteint une couverture suffisante, diminuer le niveau de transmission dans ces zones. Ainsi, d'avril 2018 à mars 2020, 3869 kits ont été distribués. L'âge médian des participants était de 38 ans (66% d'hommes et 98% venant du Brésil). 71% ont utilisé correctement le test et 73% ont pris correctement leur traitement. 658 visites de retour ont eu lieu de manière à compléter le kit et vérifier si les consignes d'utilisation étaient toujours assimilées. Le concept de Malakit a été bien accepté et les distributions présentaient une meilleure efficacité de contact avec le médiateur lorsqu'elles étaient actives, et que ces derniers allaient vers les personnes cibles. Il a été montré que le recours aux antipaludiques issus du marché noir a été diminué par 2 (OR=0,6, IC<sub>95%</sub> [0,3-0,9]) suite à la distribution Malakit. Le recours aux traitements « officiels » (centres de soins ou Malakit) a augmenté d'autant (OR=1,8, IC<sub>95%</sub> [1,1-3,0]). Cependant, pour un certain nombre, cela a aussi diminué le recours au système de soins au profit de Malakit. La réalisation de TDR a été analysée et 91% des personnes formées le réalisaient correctement et l'ont effectué avant de prendre un traitement. L'observance n'était pas différente avant et après la distribution mais toujours meilleure lorsque le traitement était délivré par un centre de soins (92%) ou *via* Malakit (82%). Ainsi, 72,4% des personnes ont pris un traitement correct après un test TDR positif IC<sub>95%</sub> [66,9-77,9]. En revanche, 25,5% IC<sub>95%</sub> [19,4-31,7] des personnes ont tout de même pris un traitement malgré un TDR négatif. Le niveau de connaissance sur le paludisme a peu varié avant et après Malakit mais les personnes ont bien intégré qu'il faut faire le test avant de prendre le traitement (91,5% IC<sub>95%</sub> [88,1-94,9]). Cependant, les informations relatives à la posologie et à la durée du traitement ont été plus faiblement assimilées, 61,6% IC<sub>95%</sub> [55,7-67,6].

En 2015, ORPAL rapportait une prévalence moyenne du paludisme de 22,3% IC<sub>95%</sub> [18,3-26,3] contre 5,3% IC<sub>95%</sub> [3,0-7,5] observée fin 2019 au cours d'ORPAL post distribution qui incluait 380 orpailleurs sur le Maroni et 199 côté Oyapock. Ces résultats sont cependant à analyser avec précaution puisque sur la même période, la transmission du paludisme a globalement diminué partout. Une analyse est en cours pour évaluer l'impact direct de cette approche sur la transmission du paludisme en forêt. La proportion de *P. vivax* a augmentée entre les deux études (42% vs 75%), ce qui est le signe d'une meilleure prise en charge puisque *P. falciparum* a reculé. Les reviviscences à *P. vivax* sont probablement à l'origine de cette inversion puisque les traitements fournis dans le kit n'incluaient pas de primaquine à visée anti-hypnozoitaire. Cette approche a cependant quelques limites : 34% des kits ont été donnés ou vendus après inclusion mais à la suite de cela, 66,7% IC<sub>95%</sub> [53,7-79,6] des personnes les ont tout de même correctement utilisés. Globalement, 64% des orpailleurs interrogés en fin de distribution avaient entendu parler de Malakit, y compris dans les sites les plus reculés, et 77% voyaient un intérêt à cette approche. Sur la base de ce résultat, le nombre global d'orpailleurs a été estimé à 11 600 personnes.

## 6.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC LES ACTIVITES ET MISSIONS DE CNR

### *Publications nationales*

**Pradines B, Thellier M, Kendjo E, Houze S.** Épidémiologie du paludisme d'importation en France. Rev Prat. 2019 Feb;69(2):150-152.

**Pradines B, Robert MG.** Situation du paludisme dans le monde. Rev Prat, 2019, 69 :146-149.

Bouchaud O, Bruneel F, Caumes E, **Houze S**, Imbert P, **Pradines B**, Rapp C, Strady C. Management and prevention of imported malaria. 2018 update of the 2007 french clinical guidelines. Med Mal Infect 2020, 50 :161-193.

**Thellier M**, Simard F, **Musset L**, Cot M, Velut G, **Kendjo E, Pradines B.** Evolution épidémiologique du paludisme au niveau mondial et national, 2000-2015. Med Mal Infect, 2020, 50 :99-112.

### *Publications internationales*

Delandre O, Daffe SM, Gendrot M, Diallo MN, **Madamet M**, Kounta MB, Diop MN, Bercion R, Sow A, Ngom PM, Lo G, **Benoit N, Amalvict R, Fonta I, Mosnier J**, Diawara S, Wade KA, Fall M, Fall KB, Fall B, **Pradines B.** Absence of association between polymorphisms in the pfcoronin and pfk13 genes and the presence of *Plasmodium falciparum* parasites after treatment with artemisinin derivatives in Senegal. Int J Antimicrob Agents, 2020, 56, 106190.

Douine M, Lambert Y, **Musset L**, Hiwat H, Reis Blume L, Marchesini P, Moresco GG, Cox H, Sanchez JF, Villegas L, Pommier de Santi V, Sanna A, Vreden S, Suarez-Murthis M. Malaria in gold miners in the Guianas and the Amazon: Current knowledge and challenges. *Curr Trop Med Reports*, 2020;7(2):37-47. doi: 10.1007/s40475-020-00202-5. IF n-2: 0.92.

El Ket N, **Kendjo E, Thellier M**, Assoumou L, Potard V, Taieb A, **Tantaoui I**, Caumes E, Piarroux R, Roussel C, **Buffet P**, Costagliola D, Jauréguiberry S. Propensity Score Analysis of Artesunate Versus Quinine for Severe Imported Plasmodium falciparum Malaria in France. Clin Infect Dis. 2020 Jan 2;70(2):280-287.

Foguim FT, Bogreau H, Gendrot M, **Mosnier, Fonta I, Benoit N, Amalvict R, Madamet M**, Wein S, **Pradines B.** Prevalence of mutations in the *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transporter, PfCRT, and association with ex vivo susceptibility to common anti-malarial drugs against African Plasmodium falciparum isolates. Malar J, 2020, 19 :201.

Foguim FT, Robert MG, Gueye MW, Gendrot M, Diawara S, **Mosnier J, Amalvict R, Benoit N**, Bercion R, Fall B, **Madamet M, Pradines B.** Low polymorphisms in *pfact*, *pfugt* et *pfcarl* genes in African *Plasmodium falciparum* isolates and absence of association with susceptibility to common anti-malarial drugs. Malar J, 2019, 18 :293.

Foguim Tsombeng F, Gendrot M, Robert MG, **Madamet M, Pradines B.** Are k13 and plasmepsin II genes, involved in *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin derivatives and piperazine in Southeast Asia, reliable to monitor resistance surveillance in Africa. Malar J, 2019, 18 :285.

Gendrot M, Andreani J, Boxberger M, Jardot P, **Fonta I**, Le Bideau M, Dufлот I, **Mosnier J**, Rolland C, Bogreau H, Hutter S, La Scola B, **Pradines B.** Antimalarial drugs inhibit the replication of SARS-CoV-2 : An in vitro evaluation. Travel Med Infect Dis, 202, 37 :101873.

Gendrot M, Andreani J, Dufлот I, Boxberger M, Le Bideau M, **Mosnier J**, Jardot P, **Fonta I**, Rolland C, Bogreau H, Hutter S, La Scola B, **Pradines B.** Methylene blue inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. Int J Antimicrob Agents, 2020, 56, 106202.

Gendrot M, Andreani J, Jardot P, Hutter S, Delandre O, Boxberger M, **Mosnier J**, Le Bideau M, Dufлот I, **Fonta I**, Rolland C, Bogreau H, La Scola B, **Pradines B.** In vitro antiviral activity of doxycycline against SARS-CoV-2. Molecules, 2020, 25. 5064.

Gendrot M, Dufлот I, Boxberger M, Delandre O, Jardot P, Le Bideau M, Andreani J, **Fonta I, Mosnier J, Rolland C, Hutter S, La Scola B, Pradines B.** Antimalarial artemisinin-based combination therapies (ACT) and COVID-19 in Africa : In vitro inhibition of SARS-CoV-2 replication by mefloquine-artesunate. *Int J Infect Dis*, 2020, 99 :437-440.

Gendrot M, Fawaz R, Dormoi J, **Madamet M, Pradines B.** Genetic diversity and deletion of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 and 3: a threat to diagnosis of *P. falciparum* malaria. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25 :580-585.

Gendrot M, Javelle E, Clerc A, Savini H, **Pradines B.** Chloroquine as a prophylactic agent against COVID-19? *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 55 :105980.

Gendrot M, **Madamet M, Mosnier J, Fonta I, Amalvict R, Benoit N, Briolant S, Pradines B.** Baseline and multinormal distribution of ex vivo susceptibilities of *Plasmodium falciparum* to methylene blue in Africa, 2013-18. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75 :2141-2148

Gendrot M, Wague Gueye M, Tsombeng Foguim F, **Madamet M, Wade KA, Bou Kounta M, Fall M, Diawara S, Benoit N, Lo G, Bercion R, Amalvict R, Mosnier J, Fall B, Briolant S, Diatta B, Pradines B.** Modulation of in vitro antimalarial responses by polymorphisms in *Plasmodium falciparum* ABC transporters (*pfmdr1* and *pfmdr5*). *Acta Trop*, 2019, 196 :126-134.

**Kendjo E, Houzé S, Mouri O, Taieb A, Gay F, Jauréguiberry S, Tantaoui I, Ndour PA, Buffet P, Piarroux M, Thellier M, Piarroux R** for the French Imported Malaria Study Group. Epidemiologic trends in malaria incidence among travelers returning to metropolitan France, 1996-2016. *JAMA Network Open*, 2019; 2(4): e191691. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.1691. PubMed PMID: 30951158; PMCID: PMC6523451.

**Kendjo E, Thellier M, Noël H, Jauréguiberry S, Septfonds A, Mouri O, Gay F, Tantaoui I, Caumes E, Houzé S, Piarroux R,** pour le compte du groupe d'étude français sur le paludisme importé. Mortality from malaria in France, 2005 to 2014. *Euro Surveill*, 2020;25(36):1900579. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.361900579. PubMed PMID: 32914747; PMCID: PMC7502900. *IF n: 6.45*

Knockleby J, **Pradines B, Gendrot M, Mosnier J, Nguyen TT, Trinh TT, Lee H, Le PM.** Cytotoxic and anti-plasmodial activities of *Stephania dielsiana* Y.C. Wu extracts and the isolated compounds. *Molecules*, 2020, 25 :3755.

Kowouvi K, Alies B, Gendrot M, Guabert A, Vacher G, Gaudin K, **Mosnier J, Pradines B, Barthelemy P, Grislain L, Millet P.** Nucleoside-lipid-based nanocarriers for methylene blue delivery : potential application as anti-malaria drug. *RCS Adv*, 2019,9 :18844-18852.

Laloui R, Bakour S, Raoult D, Verger P, Sokhna C, Devaux C, **Pradines B, Rolain JM.** What could explain the late emergence of COVID-19 in Africa? *New Microbes New Infect*, 2020, 38 :100760.

Leblanc C, Vasse C, Minodier P, Mornand P, Naudin J, Quinet B, Siriez JY, Sorge F, de Suremain N, **Thellier M, Kendjo E, Faye A, Imbert P.** Management and prevention of imported malaria in children. Update of the French guidelines. *Med Mal Infect*. 2020 Mar;50(2):127-140. Erratum in: *Med Mal Infect*. 2020 Aug;50(5):396.

Lebut J, Mourvillier B, **Argy N, Dupuis C, Vinclair C, Radjou A, de Montmollin E, Sinnah F, Patrier J, Le Bihan C, Magalahas E, Smonig R, Kendjo E, Thellier M, Ruckly S, Bouadma L, Wolff M, Sonnevile R, Houze S, Timsit JF.** Changes in the clinical presentation and outcomes of patients treated for severe malaria in a referral French university intensive care unit from 2004 to 2017. *Ann Intensive Care*. 2020 Feb 12;10(1):21. Erratum in: *Ann Intensive Care*. 2020 Mar 3;10(1):29.

Massamba L, **Madamet M, Benoit N, Chevalier A, Fonta I, Mondain V, Jeandel PY, Amalvict R, Delaunay P, Mosnier J, Marty P, Pomares C, Pradines B.** Late clinical failure associated with cytochrome b codon 268 mutation during treatment of falciparum malaria with atovaquone-proguanil in traveller returning from Congo. *Malar J*, 2020, 19 :37.

**Mathieu LC, Cox H, Early AM, Mok S, Lazrek Y, Paquet JC, Ade MP, Lucchi NW, Grant Q, Udhayakumar V, Alexandre JSF, Demar M, Ringwald P, Neafsey DE, Fidock DA, Musset L.** Local emergence and clonal propagation in eastern Amazonia of *Plasmodium falciparum* k13 C580Y

mutants associated with *in vitro* artemisinin resistance. *Elife*, **2020**;9:e51015. doi: 10.7554/eLife.51015. PubMed PMID: 32394893; PMCID: PMC7217694. *IF n*: 7.08.

Mosnier E, Dusfour I, Lacour G, Saldanha R, Guidez A, Gomes MS, Sanna A, Epelboin Y, Restrepo J, Davy D, Demar M, Djossou F, Douine M, Ardillon V, Nacher M, **Musset L**, Roux E. Resurgence risk for malaria, characterization of a recent outbreak in a Amazonian border area French Guiana/Brazil. *BMC Infect dis*, **2020**;20(1):373. doi: 0.1186/s12879-020-05086-4. PubMed PMID: 32456698; PMCID: PMC7249302. *IF n-1*: 2.69

**Mosnier E**, Garancher L, Galindo M, Djossou, FM, Moriceau O, Hureau-Mutricy L, Silva Barbosa R, Lambert Y, **Lazrek Y**, **Musset L**, Douine M. Paludisme en Guyane : des projets de recherche opérationnelle originaux s'appuyant sur la santé communautaire. *La lettre de l'infectiologue*, **2020**;35(2): 50-7. Accessible en ligne.

Mosnier E, Roux E, Cropet C, **Lazrek Y**, **Moriceau O**, Gaillet M, **Mathieu L**, Nacher M, Demar M, Odonne G, Douine M, Michaud C, **Pelleau S**, Djossou F, **Musset L**. Prevalence of *Plasmodium spp.* in the Amazonian border context (French Guiana-Brazil): Associated factors and spatial distribution. *Am J Trop Med Hyg*, **2020**;102(1):130-41. doi: 10.4269/ajtmh.19-0378. PubMed PMID: 31769403; PMCID: PMC6947805. *IF n-1*: 2.13.

**Musset L\***, **Heugas C\***, Naldjinar R, Blanchet D, Houze P, Abboud P, **Volney B**, Walter G, **Lazrek Y**, Epelboin L, **Pelleau S**, Ringwald P, **Legrand E**, Demar M, Djossou F. Emergence of *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother*, **2019**;63(11):e02116-18. doi: 10.1128/AAC.02116-18. PubMed PMID: 31481442; PMCID: PMC6811453. *IF n*: 4.90.

Robert MG, Foguim Tsombeng F, Gendrot M, Diawara S, **Madamet M**, Kounta MB, Wade KA, Fall M, Gueye MW, **Benoit N**, Nakoulima A, Bercion R, **Amalvict R**, Fall B, Wade B, Diatta B, **Pradines B**. Baseline *ex vivo* and molecular responses of *Plasmodium falciparum* isolates to piperazine before implementation of dihydroartemisinin-piperazine in Senegal. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019,63 :e02445-18.

Rougeron V, Elguero E, Arnathau C, Acuña Hidalgo B, Durand P, Houze S, Berry A, Zakeri S, Haque R, Shafiul Alam M, Nosten F, Severini C, Gebru Woldearegai T, Mordmüller B, Kreamsner PG, González-Cerón L, Fontecha G, Gamboa D, **Musset L**, **Legrand E**, Noya O, Pumpaibool T, Harnyuttanakorn P, Lekweiry KM, Mohamad Albsheer M, Mahdi Abdel Hamid M, Boukary AOMS, Trape JF, Renaud F, Prugnolle F. Human *Plasmodium vivax* diversity, population structure and evolutionary origin. *PLoS Negl Trop Dis*, **2020**;14(3):e0008072. doi: 10.1371/journal.pntd.0008072. PubMed PMID: 32150544; PMCID: PMC7082039. *IF n-2*: 4.49.

Roussel C, Ndour PA, **Kendjo E**, Larréché S, **Taieb A**, Henry B, Lebrun-Vignes B, Chambrion C, **Argy N**, **Houze S**, **Mouri O**, Courtin D, Angoulvant A, Delacour H, Gay F, Siriez JY, Danis M, Bruneel F, Bouchaud O, Caumes E, **Piarroux R**, **Thellier M**, Jauréguiberry S, **Buffet P**. Intravenous artesunate for the treatment of severe imported malaria: implementation, efficacy and safety in 1391 patients. *Clin Infect Dis*. 2021 Feb 13:ciab133.

Saldanha R, **Mosnier E**, Barcellos C, Carbanar A, Charron C, Desconnets JC, Guarmit B, Do Socorro Mendonça Gomes M, Mandon T, Martins Mendes A, Peiter PC, **Musset L**, Sanna A, Van Gastel B, Roux E. Contributing to elimination of cross-border malaria through a standardized solution for case surveillance, data sharing, and data interpretation: development of a cross-border monitoring system. *JMIR Public Health Surveill*, **2020**;6(3):e15409. doi: 10.2196/15409. PubMed PMID: 32663141.

Shalini, Kumar S, Gendrot M, **Fonta I**, **Mosnier J**, Cele N, Awolade P, Singh P, **Pradines B**, Kumar V. Amide tethered 4-aminoquinoline-naphthalimide hybrids: A new class of possible dual function antiplasmodials. *ACS Med Chem Lett*, 2020,11:2544-2552.

**Thellier M**, Simard F, **Musset L**, Cot M, Velut G, **Kendjo E**, **Pradines B**. Changes in malaria epidemiology in France and worldwide, 2000-2015. *Med Mal Infect*, **2020**;50:99-112. doi: 10.1016/j.medmal.2019.06.002. PubMed PMID: 31257063. *IF n-2*: 0.38.

Wojnarski M, **Mouri O**, Chambrion C, Roussel C, Chartrel N, Smith B, Smith P, **Thellier M**, **Buffet P**, Ndour PA. *Plasmodium falciparum* Clearance Is Pitting-Dependent With Artemisinin-Based Drugs but Pitting-Independent With Atovaquone-Proguanil or Mefloquine. *J Infect Dis*. 2019 Jul 2;220(3):535-

539.

#### Communications internationales

- Mosnier E, Djossou F, Priam R, Demar M, Epelboin L, Douine M, Nacher M, Carbanar A, Gaillet M, Landlier J, Lazrek Y, **Musset L**. 2020. Mass PCR testing and targeted treatment for malaria in a low transmission area in Amazonia, French Guiana. *30<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18-24<sup>th</sup> April, Paris (France). Communication orale.
- Mosnier E, Dusfour I, Lacour G, Restrep J, Guidez A, Epelboin Y, Sanna A, Michaud C, Djossou F, Ardillon V, Davy D, Douine M, **Musset L**, Roux E. 2019. Resurgence risk for malaria: characterization of a recent outbreak of *Plasmodium vivax* in a border area French Guiana-Brazil, 2017. *7<sup>th</sup> International Conference of Plasmodium vivax research*, 26-28<sup>th</sup> June, Paris (France). Communication orale.
- Galindo M, Lambert Y, Suarez-Mutis MC, Mutricy L, Hiwat H, **Musset L**, Peterka C, Sanna A, Adenis A, Nacher M, Vreden S, Douine M. 2019. Experience from the field: how to implement a complex intervention study to control malaria in remote areas of the Amazon forest, within a cross-border context? Abst n°412. *68<sup>th</sup> Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, November 20<sup>th</sup> to 24<sup>th</sup>, National Harbor (USA). Communication affichée.
- Early AM, Ramirez PC, Carrasquilla M, Cox H, Mathieu LC, Taylor AR, Buckee CO, Knudson A, **Musset L**, Herrera S, Rayner JC, Neafsey DE, Corredor V. 2019. Demographic and evolutionary insights from recent large-scale whole-genome sequencing efforts of *Plasmodium falciparum* in South America. Abst n°1628. *68<sup>th</sup> Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, November 20<sup>th</sup> to 24<sup>th</sup>, National Harbor (USA). Communication affichée.
- Mok S, Ross L, Dhingra S, Yeo T, Shears M, Tripathi AK, **Musset L**, Sinnis P, Fidock DA. 2019. Examining the Epistatic Interaction Between Plasmeprin II and PfCRT in *P. falciparum* Piperaquine Resistance. Abst n°1553. *68<sup>th</sup> Annual meeting of the American society of tropical medicine and hygiene*, November 20<sup>th</sup> to 24<sup>th</sup>, National Harbor (USA). Communication affichée.
- Salmier A, Bogreau H, Baniecki M, Ha Nguyen KY, Briolant S, Legrand E, Neafsey D, de Thoisy B, **Musset L**, Roux E. 2019. Input from microsatellites and SNPs: a highly polymorphic and outbreak-driven *Plasmodium vivax* population in French Guiana. *7<sup>th</sup> International Conference of Plasmodium vivax research*, 26-28<sup>th</sup> June, Paris (France). Communication affichée.
- Gaillet M, **Musset L**, Cropet C, Mallard A, Moriceau O, Djossou F, Nacher M, Mosnier E. 2019. Identification of social groups by their level of knowledge about malaria to support education programs in an Amazonian, multicultural and transborder context. Abst n°00456. *29<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, April 13-16<sup>th</sup>, Amsterdam (Netherlands). Communication affichée.

#### Communications nationales

- Gendrot M, Kowouvi K, Millet P, **Pradines B**. Molécule miracle dans le traitement du paludisme : le bleu de méthylène. XXV<sup>es</sup> Actualités du Pharo 2019, Marseille, France, 2-4 octobre 2019.
- Nguyen KYH, Basco L, **Pradines B**, Bogreau H. Etude moléculaire des échecs thérapeutiques après traitement d'accès palustres simples à *Plasmodium falciparum* par artésunate-amodiaquine. XXV<sup>es</sup> Actualités du Pharo 2019, Marseille, France, 2-4 octobre 2019.
- **Musset L**. 2020. Elimalar : REAGIR pour que la PALUSTOP. *1<sup>ères</sup> Journées Guyanaises d'Infectiologie*, 11-14 février, Cayenne (France). Communication orale.
  - Manca MF, Jolivet A, Kezza C, Carles G, Misslin-Tritsch C, Barrelet A, Clouzeau J, Miller J, Boukhari R, Boex P, **Musset L**, Carod JF. 2020. Endemic malaria in Western French Guiana : a 7-year retrospective study. *1<sup>ères</sup> Journées Guyanaises d'Infectiologie*, 11-14 février, Cayenne (France). Communication orale.
  - Mosnier E, Djossou F, Priam R, Demar M, Epelboin L, Carbanar A, Douine M, Gaillet M, **Lazrek Y**, **Musset L**. 2020. Stratégie de dépistage du paludisme par PCR et traitement ciblé en population

générale, en zone de transmission, en Guyane. 21<sup>ème</sup> Journées Nationales d'Infectiologie, 9-11 Septembre, Poitiers (France). Communication affichée.

· **Mosnier E**, Djossou F, Priam R, Carbanar A, Demar M, Landier J, Roux E, Gaudart J, **Lazrek Y**, **Musset L**. 2020. Profil épidémiologique des infections à *Plasmodium vivax* dans une région endémique en Guyane, étude de cohorte, 2007-2018. 21<sup>ème</sup> Journées Nationales d'Infectiologie, 9-11 Septembre, Poitiers (France). Communication affichée.

· **Berthelot L**, **Lazrek Y**, **Volney B**, **Musset L**. 2020. Prévalence des délétions des gènes pfhrp2 et pfhrp3 chez les *Plasmodium falciparum* sur le plateau des Guyanes. 1<sup>ères</sup> Journées Guyanaises d'Infectiologie, 11-14 février, Cayenne (France). Communication affichée.

· **Mosnier E**, Dusfour I, Lacour G, Restrepo J, Sanna A, **Musset L**, Michaud C, Ardillon V, Djossou F, Roux E. 2019. Foyer épidémique de paludisme autochtone à *P. vivax* en Guyane à la frontière avec le Brésil, 2017. 20<sup>ème</sup> Journées Nationales d'Infectiologie, 5-7 Juin, Lyon (France). Communication affichée.

· **Mosnier E**, Roux E, Cropet C, Lazrek Y, Gaillet M, Mathieu M, Moriceau O, Pelleau S, Djossou F, **Musset L**. 2019. Répartition spatiale et facteurs de risque de portage de paludisme à la frontière entre la Guyane et le Brésil. 20<sup>ème</sup> Journées Nationales d'Infectiologie, 5-7 Juin, Lyon (France). Communication affichée.

· **Gaillet M**, **Musset L**, Cropet C, Maillard A, Moriceau O, Djossou F, Michaud C, Nacher M, Mosnier E. 2019. Identifier les groupes sociaux à faible niveau de connaissances du paludisme afin de mieux cibler les programmes d'éducation dans un contexte amazonien, multiculturel et transfrontalier. 20<sup>ème</sup> Journées Nationales d'Infectiologie, 5-7 Juin, Lyon (France). Communication affichée.

## 7 COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX

---

En Guyane, zone d'endémie du paludisme, des échanges ont lieu régulièrement entre le Pôle Zones Endémiques et le service de démoustication de la collectivité territoriale de Guyane (partage d'information, d'expérience etc...) ainsi que le secteur santé et environnement de l'ARS Guyane qui est en charge de la communication, de la distribution de moustiquaires et de l'éducation à la santé (ex : organisation conjointe de journée de sensibilisation aux paludisme chez les scolaires etc...).

## 8 PROGRAMME D'ACTIVITE 2021 ET 2022

---

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, les CIRE régionales et les ARS.

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

- les travaux sur la résistance aux antipaludiques et plus particulièrement vis-à-vis de la pipéraquline, l'artémisinine et de la doxycycline qui seront poursuivis de même que l'identification et le développement de nouveaux marqueurs moléculaires de résistance. 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
- le séquençage « whole génome » d'isolats d'intérêt clinique spécifique (résistance aux ACT)

- d'un point de vue des outils diagnostiques, la surveillance des isolats délétés au niveau des gènes *pfhrp2* et *pfhrp3* sera poursuivie et réalisée en temps réel
- la différenciation des espèces *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri*,
- des travaux pour mieux caractériser les accès à *P. ovale*

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).

En Guyane, le dynamisme des équipes en place et des projets qu'elles ont développées ont permis de diminuer encore davantage la transmission du paludisme. Nous sommes maintenant à des niveaux qui laissent espérer une élimination. Pour ce faire, nous continuerons à sensibiliser les autorités sanitaires sur l'importance de ne pas relâcher la pression et de déployer des moyens de dépistage actif de manière à éliminer les derniers foyers. Enfin, nous mènerons à bien le projet G6PD facile afin nous l'espérons de déployer cet appareil de dosage rapide de l'activité enzymatique pour *in fine* augmenter la couverture de primaquine pour les patients atteints de *P. vivax*. Les derniers parasites seront probablement les résistants, ainsi une vigilance toute particulière à la résistance aux molécules recommandées sera accordée. Les deux méthodes de phénotypages continuerons à être mise en œuvre (isotopique et tests de survie) et les connaissances autour de la résistance à la luméfantine approfondies. Enfin, un axe de travail sera déployé autour de l'efficacité thérapeutique de l'artéméter luméfantine, en Guyane, mais aussi au Guyana.

Nous poursuivrons également nos activités de surveillance et d'expertise, tant au niveau national qu'international. Ces deux prochaines années seront les années des renouvellements, en tant que CNR on l'espère et de CC OMS. Nous maintiendrons également la sensibilisation des partenaires afin de maintenir notre niveau d'exhaustivité et ceci en dépit du plus faible niveau de transmission.

## 9 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Baker, J., J. McCarthy, M. Gatton, D. E. Kyle, V. Belizario, J. Luchavez, D. Bell & Q. Cheng, (2005) Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 (PfHRP2) and its effect on the performance of PfHRP2-based rapid diagnostic tests. *J Infect Dis* **192**: 870-877.

Basco, L. K. & J. Le Bras, (1992) *In vitro* activity of pyronaridine against African strains of *Plasmodium falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol* **86**: 447-454.

Basco, L. K. & J. Le Bras, (1993) *In vitro* activity of artemisinin derivatives against African isolates and clones of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* **49**: 301-307.

Basco, L. K. & J. Le Bras, (1994) *In vitro* susceptibility of Cambodian isolates of *Plasmodium falciparum* to halofantrine, pyronaridine and artemisinin derivatives. *Ann Trop Med Parasitol* **88**: 137-144.

Basco, L. K. & P. Ringwald, (2003) *In vitro* activities of piperazine and other 4-aminoquinolines against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in Cameroon. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1391-1394.

Brasseur, P., J. Kouamouo, R. S. Moyou & P. Druilhe, (1990) Emergence of mefloquine-resistant malaria in Africa without drug pressure. *Lancet* **336**: 59.

Briolant, S., M. Baragatti, P. Parola, F. Simon, A. Tall, C. Sokhna, P. Hovette, M. M. Mamfoumbi, J. L. Koeck, J. Delmont, A. Spiegel, J. Castello, J. P. Gardair, J. F. Trape, M. Kombila, P. Minodier, T. Fusai, C. Rogier & B. Pradines, (2009) Multinomial *in vitro* distribution model suitable for the distribution of *Plasmodium falciparum* chemosusceptibility to doxycycline. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 688-695.

Briolant S, Wurtz N, Zettor A, Rogier C, **Pradines B**, (2010). Susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates to doxycycline is associated with *pfketQ* sequence polymorphisms and *pfketQ* and *pfmdt* copy numbers. *J Infect Dis*. **201**: 153-159.



- Cojean, S., V. Hubert, J. Le Bras, R. Durand, (2006) Resistance to dihydroartemisinin. *Emerg Infect Dis* **12**:1798-1799.
- Dedet, J. P., P. Germanetto, G. Cordoliani, O. Bonnevie & J. Le Bras, (1988) [In vitro activity of various antimalarials (chloroquine, amodiaquine, quinine and mefloquine) against 32 isolates of *Plasmodium falciparum* in French Guiana]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **81**: 88-93.
- Duru, V., N. Khim, R. Leang, S. Kim, A. Domergue, N. Kloeung, S. Ke, S. Chy, R. Eam, C. Khean, K. Loch, M. Ken, D. Lek, J. Beghain, F. Arie, P. J. Guerin, R. Huy, O. Mercereau-Puijalon, B. Witkowski, and D. Menard. 2015. *Plasmodium falciparum* dihydroartemisinin-piperazine failures in Cambodia are associated with mutant K13 parasites presenting high survival rates in novel piperazine in vitro assays: retrospective and prospective investigations. *BMC medicine* **13**:305.
- Jambou, R., E. Legrand, M. Niang, N. Khim, P. Lim, B. Volney, M. T. Ekala, C. Bouchier, P. Esterre, T. Fandeur & O. Mercereau-Puijalon, (2005) Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* **366**: 1960-1963.
- Kaddouri, H., S. Nakache, S. Houzé , F. Mentré & J. Le Bras, (2006) Drug Susceptibility of *Plasmodium falciparum* Clinical Isolates from Africa using Plasmodium Lactate Dehydrogenase Immunodetection Assay and inhibitory Emax model for precise IC50 measurement. *Antimicrob Agents Chemother*. **50**: 3343-3349.
- Kaddouri, H., S. Nakache, S. Houzé, F. Mentré & J. Le Bras, (2006) Assessment of the drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from africa by using a Plasmodium lactate dehydrogenase immunodetection assay and an inhibitory maximum effect model for precise measurement of the 50-percent inhibitory concentration. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3343-3349.
- Le Bras, J., P. Deloron, J. F. Hartmann, P. Coulanges, H. V. Dourado & B. Larouze, (1984) Application of an in vitro semi-microtest to the study of drug sensitivity of 66 *Plasmodium falciparum* isolates from 15 countries. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **78**: 485-488.
- Legrand, E., M. Demar, B. Volney, M. T. Ekala, M. Quininternet, C. Bouchier, T. Fandeur, C. Rogier, B. Carme, O. M. Puijalon & P. Esterre, (2007) First case of emergence of atovaquone resistance in *Plasmodium falciparum* during second-line atovaquone-proguanil treatment in South America. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 2280-2281.
- Legrand E., J. Yrines, M.T. Ekala, J. Péneau, B. Volney, F. Berger, C. Bouchier, S. Bertani, L. Musset, J.B. Meynard & O. Mercereau-Puijalon, (2012) Discordant temporal evolution of *Pfcr* and *Pfmdr1* genotypes and *Plasmodium falciparum* in vitro drug susceptibility to 4-aminoquinolines after drug policy change in French Guiana. *Antimicrob Agents Chemother.*; **56** :1382-1389.
- Musset, L., J. Le Bras & J. Clain, (2007) Parallel evolution of adaptive mutations in *Plasmodium falciparum* mitochondrial DNA during atovaquone-proguanil treatment. *Mol Biol Evol* **24**: 1582-1585.
- Musset, L., B. Pradines, D. Parzy, R. Durand, P. Bigot & J. Le Bras, (2006b) Apparent absence of atovaquone/proguanil resistance in 477 *Plasmodium falciparum* isolates from untreated French travellers. *Publi perso 1* **57**: 110-115.
- Noedl, H., J. Bronnert, K. Yingyuen, B. Attlmayr, H. Kollaritsch & M. Fukuda, (2005) Simple histidine-rich protein 2 double-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for use in malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3575-3577.
- Ntoumi, F., H. Contamin, C. Rogier, S. Bonnefoy, J. F. Trape & O. Mercereau-Puijalon, (1995) Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg* **52**: 81-88.
- Pradines, B., A. Tall, T. Fusai, A. Spiegel, R. Hienne, C. Rogier, J. F. Trape, J. Le Bras & D. Parzy, (1999) In vitro activities of benflumetol against 158 Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum* in comparison with those of standard antimalarial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 418-420.

- Price, R. N., A. C. Uhlemann, A. Brockman, R. McGready, E. Ashley, L. Phaipun, R. Patel, K. Laing, S. Looareesuwan, N. J. White, F. Nosten & S. Krishna, (2004) Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet* **364**: 438-447.
- Ringwald, P., J. Bickii & L. K. Basco, (1998) Amodiaquine as the first-line treatment of malaria in Yaounde, Cameroon: presumptive evidence from activity in vitro and cross-resistance patterns. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **92**: 212-213.
- Robert, F., F. Ntoumi, G. Angel, D. Candito, C. Rogier, T. Fandeur, J. L. Sarthou & O. Mercereau-Pujalon, (1996) Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **90**: 704-711.
- Savini, H., H. Bogreau, L. Bertaux, H. Bouchiba, P. Kraemer, D. Parzy, E. Garnotel, C. Rogier, F. Simon & B. Pradines, (2008) First case of emergence of atovaquone-proguanil resistance in *Plasmodium falciparum* during treatment in a traveler in Comoros. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 2283-2284.
- Snounou, G., S. Viriyakosol, X. P. Zhu, W. Jarra, L. Pinheiro, V. E. do Rosario, S. Thaithong & K. N. Brown, (1993) High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* **61**: 315-320.
- Veron, V., S. Simon, B. Carne, (2009) Multiplex real-time PCR detection of *P. falciparum*, *P. vivax* and *P. malariae* in human blood samples. *Exp Parasitol* **121**: 346-351.
- WHO, (2003) Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria. In. W. a. H. Organization (ed). Geneva: World and Health Organization, pp.
- WHO, (2009) World malaria report. In. W. a. H. Organization (ed). Geneva: World and Health Organization, pp.
- Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, Lim P, Mao S, Sopha C, Sam B, Anderson JM, Duong S, Chuor CM, Taylor WR, Suon S, Mercereau-Pujalon O, Fairhurst RM, Menard D 2013. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infect Dis*, 13, 1043-1049.