



# HORIBA

Explore the future





# Projet Collaboratif « **InnoMaD** »

## « **D**iagnostics et **T**raitements **I**nnovants de la **M**alaria »

Philippe NERIN, PhD  
Directeur Recherche Horiba Medical

**Sanofi-aventis / CNRS / HORIBA Medical / IMTSSA**



*Médicament  
Anti infectieux*

*Diagnostic*



# Contexte

- 400 à 900 millions de cas, entre 1 et 3 millions de morts par an (80 % des cas en Afrique subsaharienne)  
=> un enfant meurt du paludisme toutes les 30 secondes
- 40% de la population mondiale exposée
- Les moyens de lutte :
  - Médicaments antipaludiques
  - Lutte contre les moustiques vecteurs du parasite Plasmodium.
    - résistances des parasites aux médicaments
    - résistances des moustiques aux insecticides
  - Aucun vaccin aujourd'hui disponible

## Cinq espèces de Plasmodium

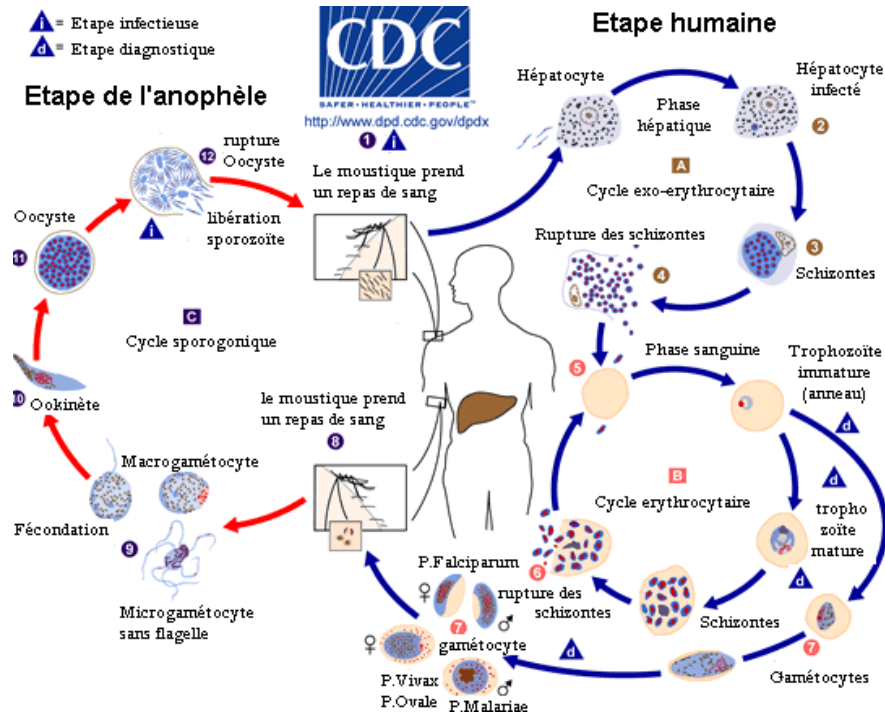
Plasmodium falciparum (80% des cas et 90% des décès)

Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae et Plasmodium knowlesi

=> formes de paludisme « bénignes »

Source : OMS – Institut Pasteur

# Contexte — le cycle de Plasmodium



- 1 - Injection du parasite à l'homme sous forme de "**sporozoïte**".
- 2 - Migration, *via* la circulation sanguine, vers le **foie**.
- 3 - Divisions : dizaines de milliers de "**mérozoïtes**".
- 4 - Eclatement de la cellule du foie : parasites dans le sang.
- 5 - Pénétration et multiplication dans les **globules rouges (GR)**.
- 6 - Eclatement des GR mérozoïtes libérés, infection de nouveaux GR (**cycle érythrocytaire**).
- 7 - Formations de **parasites sexués** mâles et femelles (gamétocytes) dans les GR.
- 8 - Lorsqu'un **moustique** pique une personne infectée, il ingère ces gamétocytes, qui se transforment en **gamètes**...

Un nouveau cycle peut alors commencer.

Source : Institut Pasteur – OMS



# InnoMaD

## Développement d'un test de Diagnostic

**HORIBA Medical**



# Intérêt du diagnostic

Nécessité d'un diagnostic **rapide, précis, sensible, spécifique.**

Diagnostic du paludisme basé sur :

Diagnostic clinique (symptomatique)

Diagnostic parasitologique (optique et RDT *Rapid Diagnostic Tests*)

- ✓ Réduction du recours aux antipaludiques.
- ✓ Amélioration du diagnostic différentiel d'une maladie fébrile.
- ✓ Prévention d'une exposition inutile aux antipaludiques => réduction des effets secondaires, des interactions médicamenteuses et de la **pression de sélection**
- ✓ Meilleure information sanitaire
- ✓ Confirmation des échecs thérapeutiques

Source : Institut Pasteur – OMS

# Les méthodes de diagnostic parasitologique

## ✓ L'examen au microscope optique

- 👍 peu coûteux, très sensible et très spécifique
- 👍 peut être utilisé pour la détermination de l'espèce et la quantification des hématozoaires
- 👍 peut être utilisé pour l'identification d'autres causes de la fièvre
- 👎 doit être utilisé par un personnel rompu à son usage

## ✓ Les tests de diagnostic rapide (TDR).

- 👍 servent à la détection des antigènes parasitaires
- 👍 sont généralement plus coûteux
- 👎 sensibilité et spécificité variables
- 👎 vulnérabilité aux températures et à l'humidité élevée

# Objectifs du projet

---

## **Techniques actuelles de diagnostic améliorables**

automatisation (facilité, rapidité, fiabilité)

intégration à un hémogramme (précision, sensibilité, spécificité)

## **Traitement : besoin médical urgent non satisfait**

efficace contre les formes résistantes de parasites

conduisant à des guérisons complètes sans rechute

produit à faible coût

# Objectifs du projet

## Développement d'un test de diagnostic de la malaria et son intégration dans un analyseur d'hématologie

- **détection et quantification des plasmodies**
- **caractérisation des autres inclusions intra érythrocytaires.**
- **diagnostic de l'infection parasitaire**
- **suivi thérapeutique/analyse de la viabilité parasitaire**

### Acteurs Principaux :

**IMTSSA – UR3P (Marseille)**

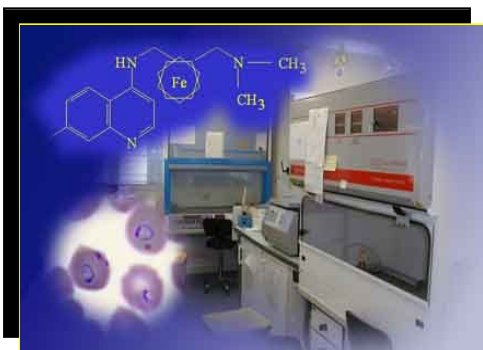
**HORIBA Medical (Montpellier)**

# IMTSSA – UR3P

**Unité de Recherche en Pharmacologie et  
Physiopathologie Parasitaire  
Laboratoire associé au CNRP**



**Tests *in vitro*** (Culture parasitaire,  
Laboratoires P2 + P3)



**Techniques moléculaires**  
Diagnostic  
Plateforme génomique

**Dosage des antipaludiques**  
HPLC-SM



# Horiba Medical

## **HORIBA** Medical filiale française du groupe HORIBA

Siège social : **Montpellier** - France

**12** filiales (Europe, Etats Unis, Brésil, Japon) et **86** distributeurs.

**HORIBA** ABX, une présence internationale dans **25 000** laboratoires de plus de **110** pays. **2eme** position Européenne et **4eme** position sur le marché mondial de l'hématologie.

**HORIBA** ABX regroupe plus de 900 salariés. La production de machines s'élève à **7 000** unités par an et le seuil annuel des **6 000** tonnes de réactifs est maintenant dépassé.

**HORIBA** ABX réalise **85%** de son chiffre d'affaire (2004 : 116 M€) à l'export.



# Méthodes de détection

## Développement de méthodes de séparation ARN-ADN par fluorescence.

- Choix de fluorochromes spécifiques des acides nucléiques (ADN et ARN), et d'une technique de détection sensible et robuste
- Différenciation
  - des éléments parasitaires intra-érythrocytaires fluorescents
  - des autres éléments fluorescents présents dans le sang et les cellules sanguines, et
  - en particulier les réticulocytes et les leucocytes
- Résultats obtenus sur cultures, échantillons de sangs parasités « reconstitués » et non reconstitués.

## Évaluation de la viabilité des parasites.

# Méthodes de détection

## Mesure de transmission optique (absorbance) différentielle en UV (<300nm) et dans le violet (~420nm)

Identification en temps réel des hématies, des acides nucléiques intra-érythrocytaires (plasmodies mais aussi autres inclusions intra-cellulaires acides nucléiques, corps de Howell-Jolly ...)

## Distinction entre ARN-ADN devant permettre la séparation entre Plasmodie (ADN+ARN), et réticulocytes (ARN)

# Intégration

## Mise au point d'un module adaptable sur un analyseur d'hématologie

- soit module,
- soit analyseur spécifiquement dédié à l'analyse des contenus intracellulaires dont une des applications serait le diagnostic et le suivi thérapeutique de la malaria.
  - ✓ Mesure de % et # GR (ADN)
  - ✓ Mesure de % et # GR
  - ✓ Mesure du contenu en Hémoglobine de chaque hématie et détermination des paramètres d'anémie (VGM, CCMH)
  - ✓ Mesure % et # PLT (70 % des infections à Faciparum se caractérisent par une thrombopénie)

# Conclusion – suite du Projet

- **Sensibilité actuelle** (1 an) obtenue  $\sim 0,01\%$
- Mise au point d'un **nouveau dispositif électro-optique** adapté spécifiquement
  - ✓ Mesure volumétrique par impédance et
  - ✓ Extinction optique
    - ⇒ **Sensibilité visée**  $\sim 0,002\%$



Mission de 8 semaines au Vietnam  
À partir de dimanche !





Merci

