

Infection plasmodiale en milieux urbain, semi-urbain et rural

Charlene Lady Kouna

▶ **To cite this version:**

Charlene Lady Kouna. Infection plasmodiale en milieux urbain, semi-urbain et rural : Distribution et interaction des espèces infectant l'Homme en fonction de la symptomatologie clinique dans le Sud-Est et le Nord-Est du Gabon. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. hal-03540791

HAL Id: hal-03540791
https://ephe.hal.science/hal-03540791

Submitted on 24 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la vie et de la terre

Mémoire

Présenté par

KOUNA Epse MOUGUENGUI Lady Charlène

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Etudes-PSL

TITRE : Infection plasmodiale en milieux urbain, semi-urbain et rural : Distribution et interaction des espèces infectant l'Homme en fonction de la symptomatologie clinique dans le Sud-Est et le Nord-Est du Gabon.

Soutenu le : 13 janvier 2022 **devant le jury suivant :**

Pr. CANQUE Bruno – **Président**

Pr. LEKANA DOUKI Jean Bernard– **Tuteur scientifique**

Pr. WIRTH Thierry – **Tuteur pédagogique**

Pr. CLAIN Jérôme – **Rapporteur**

Pr. BERRY Antoine- **Examinateur**

Mémoire préparé sous la direction de :

Pr. LEKANA DOUKI Jean Bernard

Intitulé de la structure d'accueil : Centre Interdisciplinaire de Recherches Médicales de Franceville.

Directeur : LEKANA DOUKI Jean Bernard

Et de
Pr. WIRTH Thierry
Intitulé de la structure d'accueil EPHE - PSL : (EPHE - PSL, Paris) EPHE - PSL (Sciences de la Vie et de la Terre)
Groupe de Recherche et d'Enseignement Thématiques de l'EPHE - PSL : **Laboratoire EPHE de Biologie Intégrative des Populations**

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

A

Ma mère Essali Alice, pour son amour, son affection, l'éducation et les moyens qu'elle a mis à ma disposition pour ma réussite.

Mes enfants Grace, Emmanuel, Penielle, et mon époux Cédrick, vous êtes ma raison de vivre et vous avoir auprès de moi est la meilleure chose qui me soit arrivée. Votre amour, votre affection et vos câlins incessants sont des stimuli qui me donnent le courage d'avancer.

Toute ma famille, car vous avez toujours été là pour moi. Votre soutien moral, physique, sentimental et financier m'a été d'une grande utilité.

REMERCIEMENTS

" Après la bienfaisance, le plus grand des plaisirs est la reconnaissance"

Pierre Laurent de Belloy

Je remercie les anciens Directeurs Généraux du CIRMF **Docteur Eric Leroy** et **Dr. Jean sylvain Koumba**, de m'avoir permis de faire cette formation et de réaliser mon stage au sein de la structure dont ils avaient la charge.

Je remercie tout particulièrement, le **Professeur Jean Bernard Lekana Douki**, actuel Directeur Général du CIRMF également mon tuteur scientifique, qui a toujours cru en moi, ses encouragements, sa rigueur dans le travail, sa disponibilité durant ce stage ont été d'un grand soutien pour moi. Je lui serai toujours reconnaissante.

Mes remerciements vont également à l'endroit du Président de l'EPHE, **Jean Michel Verdier**, merci de m'avoir accordé la possibilité de m'inscrire dans votre école.

Je remercie sincèrement mon Tuteur Pédagogique **Thierry Wirth**, de m'avoir encadré au sein de l'EPHE. Merci pour ses efforts, ses conseils et ses encouragements qui m'ont permis de réaliser sereinement ma formation.

Mes remerciements vont à l'endroit de tous les enseignants de l'EPHE, pour la qualité de leurs enseignements, vous m'avez beaucoup apporté tout au long de ma formation.

Mes remerciements à ma grande sœur **Docteur Oyégué Lydie Sandrine**, tu es un modèle pour moi, avoir fait des missions, des analyses statistiques et bien d'autres choses auprès de toi, fut pour moi durant ces quatre années d'apprentissage un réel plaisir. Je te porte dans mon cœur, merci pour sa disponibilité et ses conseils.

Merci au **Docteur Voumbo Matoumona Dominique Fatima**, que j'appelle affectueusement ma fille, pour son aide et son soutien sur tous les plans tout au long de ma formation. Merci du fond du cœur ; Je remercie l'équipe de Virologie notamment **Docteur Lekana Sonia et Mme Mvé Octavie** pour leur aide, leurs encouragements et leur disponibilité.

Je remercie tous les membres de la **dream teem UNEEREP** : Docteur Karl, Nancy, Kerry, Nathalie, Kennedy, Alain prince, Meredith, merci pour votre soutien moral physique, intellectuel.

Je dis enfin merci à tous ceux qui de près ou de loin ont participé à la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIÈRES

Dédicaces i
REMERCIEMENTS ii
LISTE DES ABREVIATIONS vi
LISTE DES TABLEAUX vii
LISTE DES FIGURES viii
INTRODUCTION 1
PARTIE 1 : Généralités sur le paludisme 4
I. Définition et épidémiologie 5
II. Espèces plasmodiales infectant l'Homme 6
A. *Plasmodium falciparum* 6
B. *Plasmodium vivax* 7
C. *Plasmodium ovale* 7
D. Plasmodium malariae *8*
E. Plasmodium knowlesi *8*
III. Phylogénie des espèces plasmodiales. 10
A. Parasites Non Laverania 10
B. Parasites Laverania 11
IV. Cycle évolutif du *Plasmodium* 12
A. Cycle chez l'anophèle : phase sexuée 13
B. Cycle chez l'homme : phase asexuée 13
V. Physiopathologie du paludisme 14
A. Paludisme simple 14
B. Paludisme grave 16
C. Infection Asymptomatique 17
VI. Marqueurs de virulence de *Plasmodium spp.* 18
A. Merozoïte Surface Protein 1 18
B. Merozoïte Surface Protein 2 19
C. Apical Membrane Antigen 1 20
D. Autres marqueurs 21
PARTIE 2 : Paludisme au Gabon 23
I. Epidémiologie 24
II. Marqueurs de virulence au Gabon 25

PARTIE 3 : Objectifs 26
I. Objectif général 27
II. Objectifs spécifiques 27
PARTIE 4 : Matériel et Méthodes 28
I. Caractéristiques de l'étude 29
A. Type, sites et période de l'étude 29
B. Population concernée par l'étude 30
C. Critères d'inclusion et de non inclusion 30
II. Analyses biologiques 30
A. Diagnostic de l'infection 30
B. Amplification et séquençage des gènes de virulence 34
C. Numération formule sanguine 36
D. Analyses de données 36
PARTIE 5 : Résultats 38
I. Caractéristiques démographiques, hématologiques et prévalence de l'infection palustre dans la population générale 39
A. Description de la population d'étude, des paramètres démographiques et hématologiques 39
B. Prévalence de l'infection palustre et identification des espèces plasmodiales 40
II. Caractéristiques démographiques, hématologiques et prévalences de l'infection plasmodiale en fonction de la symptomatologie et des localités 40
A. Caractéristiques démographiques et hématologiques par localités 40
B. Prévalence de l'infection Plasmodiale par localités 41
C. Distribution des espèces plasmodiales par localités 43
III. Comparaison des prévalences, paramètres hématologiques et démographiques des enfants infectés chez les symptomatiques entre les 3 localités. 44
A. Comparaisons entre les 3 localités 44
B. Comparaison entre Franceville et Makokou 45
C. Comparaison entre Franceville et Lastoursville 45
D. Comparaison entre Makokou et Lastoursville 46
IV. Comparaison des prévalences, paramètres hématologiques et démographiques des enfants infectés asymptomatiques entre localités. 47
A. Comparaisons entre les 3 localités 47
B. Comparaison entre Franceville et Makokou 48
C. Comparaison entre Franceville et Lastoursville 49
D. Comparaison entre Makokou et Lastoursville 49
V. Caractérisation de la virulence 50

A. Génotypage des gènes msp-1 et msp-2 : Fréquences des familles alléliques des gènes msp-1-2 en fonction de la localité du statut clinique. 50
B. Infections polyclonale des gènes msp-1 et msp-2 en fonction du statut clinique et de la localité 51
C. Diversité allélique et polymorphisme de longueur de taille de fragments 53
D. MESURE DE GENETIQUE DES POPULATIONS : MOI, INDICE DE DIVERSITE(He), Différenciation génétique (Fst) 56
E. Diversité génétique du gène AMA1 58
F. Séquençage des différents allèles du gène msp1 et type d'infection. 58
PARTIE 6 : Discussion 62
Conclusion et Perspectives 74
..... 74
References 77
ANNEXES 88

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMA1 : Antigène de la membrane apicale 1

CSP : Protéine circumsporozoïte

dNTP : dinucléotide triphosphate

ddNTP : didéxocyribonucléotide triphosphate

MgCl2 : Chlorure de Magnésium

Msp (1, 2, 3) : Protéine de surface du Merozoïte (1, 2, 3)

GE : Goutte épaisse

P. : Plasmodium

PfEMP1 : Protéine de la membrane érythrocytaire de Plasmodium falciparum 1

TAE : Tris Acétate EDTA

TDR : Test de diagnostic rapide

FCV : Franceville

LTV : Lastoursville

MKK : Makokou

PCR : Réaction de polymérisation en chaine.

µL : Microlitre

OMS : Organisation mondiale de la santé

% : Pourcentage

HE : Hétérozygotie attendue

Fst : Indice de différenciation génétique

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Critère cliniques de gravité du *paludisme à P. falciparum* (OMS, 2013). 17
Tableau 2: Séquences des amorces utilisées pour le diagnostic moléculaires et tailles des bandes attendues. 33
Tableau 3: Programmes PCR utilisés 33
Tableau 4: Séquences des amorces et conditions de PCR pour l'amplification des gènes de virulence. 35
Tableau 5: Paramètres démographiques et hématologiques des enfants inclus dans le Sud-Est du Gabon. ... 39
Tableau 6: Comparaison des paramètres démographiques et Hématologiques entre les enfants symptomatiques et asymptomatiques par localité. 41
Tableau 7: Prévalence de l'infection plasmodiale en fonction du site et du statut clinique 42
Tableau 8: Moyennes des paramètres hématologiques, démographiques chez les enfants infectés symptomatiques au sein des trois localités. 44
Tableau 9: Prévalence de l'infection plasmodiale dans les 3 localités chez les symptomatiques 45
Tableau 10: Moyennes des paramètres hématologiques, démographiques chez les enfants infectés asymptomatiques dans les 3 localités. 47
Tableau 11: Prévalence de l'infection plasmodiale dans les 3 localités. 48
Tableau 12: Comparaison de fréquences des familles alléliques de msp1 et 2 entre sites et statuts cliniques 51
Tableau 13: Nombre de clones (MOI) détectés avec msp1, msp2 et msp1+2 selon les sites et le statut clinique. 56
Tableau 14: diversité génétique (He) en fonction des sites et du statut clinique 57

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Répartition du paludisme dans le monde en 2018. (Source: WHO, 2019). 6
Figure 2: Morphologie microscopique des 5 espèces plasmodiales infectant l'Homme. [34]..... 9
Figure 3:Parasites non-Laverania, groupes *Plasmodium vivax, P. ovale et P. malariae* (modifié d'après Liu et al., 2010). 11
Figure 4: L'arbre de relation du primate Plasmodium avec les catégories d'hôtes actuellement connues [40] 12
Figure 5: *Cycle évolutif du Plasmodium Spp. [43]* 14
Figure 6: Représentation Schématique du gène *msp-1 de P. falciparum* montrant les 17 domaines **[72]** 19
Figure 7: Diagramme Schématique du gène *msp-2* illustrant les bloc 1 à 5 [90] 20
Figure 8: Carte du Gabon (source : http://www.afrique-planete.com/images/carte/carte_gabon.gif)..... 24
Figure 9: Différents sites de récolte des échantillons 29
Figure 10: Représentation schématique de la réalisation d'un TDR (kit-OPTIMAL-IT). 31
Figure 11: Distribution d'infections polyclonale du gène msp-1 par localité et par statut clinique 52
Figure 12: Distibution d'infection polyclonale du gène *msp-2* par sites et par statut clinique. 52
Figure 13: Diversité allélique des différents allèles des gènes msp-1 et 2 dans l'ensemble de la population. 53
Figure 14: Comparaison des fréquences alléliques des gènes *msp1* et 2 par localités. 55
Figure 15: Fréquence alléliques du gène *msp1et 2* dans les isolats symptomatiques et asymptomatiques dans l'ensemble de la population. 56
Figure 16: répartition géographique et différenciation génétique des populations parasitaires. 58
Figure 17: Minimum spanning Tree des séquences de l'allèle K1 du gène *par statut clinique et site.* 59
Figure 18: Minimum spanning Tree des séquences de l'allèle Mad20 du gène par statut clinique et site. 60
Figure 19: Minimum spanning Tree des séquences de l'allèle RO33 du gène *par statut clinique et site*..... 61



École Pratique
des Hautes Études

PSL

INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire due à un parasite hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'Homme par la piqure infectante d'un moustique appelé anophèle femelle. Malgré une baisse significative de l'impact du paludisme dans certaines régions de transmission saisonnière ou continue, cette parasitose demeure encore un véritable problème de santé publique dans les régions intertropicales et en Afrique subsaharienne. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 229 millions de cas dont 409000 décès ont été enregistré en 2019 contre 238 millions de cas dont 738000 décès en 2000 [1]. Le renforcement de mesures de prévention et de lutte ont néanmoins conduit à une baisse de plus de 60% à l'échelle mondiale, du taux de mortalité due au paludisme depuis l'an 2000 [1, 2]. Cependant, malgré l'intensification des efforts de lutte l'Afrique subsaharienne continue de supporter une part disproportionnée de la charge mondiale du paludisme avec plus de 92 % des cas et plus de 91 % des décès entre 2015 et 2018 [2, 3]**.**

Parmi une centaine d'espèces de *Plasmodium* décrites, seules cinq d'entre elles sont capables d'infecter l'homme : *Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malariae, Plasmodium knowlesi et Plasmodium falciparum. P. falciparum* est à l'origine de 99,7% des cas dont 94 % des décès enregistrés dans la région Afrique selon l'OMS [2]. L'infection à Plasmodium se présente sous deux formes : la forme symptomatique et le portage asymptomatique. La forme symptomatique est constituée du paludisme simple et du paludisme grave. Les pathologies liées au paludisme grave à *P. falciparum* sont caractérisées par une anémie sévère, une atteinte cérébrale associées à des complications au niveau des organes profonds selon des critères standardisés par l'OMS [3, 4]. *Plasmodium vivax* est à l'origine d'environ 53% des cas en Asie du Sud-Est et de 75% de cas dans la région Amérique de l'OMS. Les érythrocytes du groupe sanguin Duffy négatif (observé chez la majorité des sujets originaires d'Afrique de l'Ouest) ne possèdent pas le récepteur membranaire nécessaire à l'infection par *P. vivax*. Cependant, des infections à *P. vivax* ont été détectées chez des patients Duffy négatifs vivant en Afrique [5]. *C'*est la 2ème espèce la plus répandue elle est à l'origine de formes essentiellement bénignes, parfois mortelles de la maladie, accompagnées de fièvre tierce de même que *Plasmodium ovale* mais qui est moins répandue. *Plasmodium malariae* a une distribution mondiale très inégale. Cette espèce est à l'origine d'une forme bénigne de la maladie caractérisée par une fièvre quarte sans incidence meurtrière. Les infections de paludisme à *P. vivax et P. ovale* peuvent présenter des rechutes quelques semaines, des mois, voire des années après la première infection, même si le patient a quitté la zone à risque. Ces nouveaux épisodes sont dus à des formes hépatiques « dormantes ».

Depuis 2004 une cinquième espèce d'origine simienne, *Plasmodium knowlesi*, est responsable de forme rare mais grave de paludisme chez l'homme notamment en Asie du sud-est. Elle est à l'origine de fièvres quotidiennes sans récurrence de l'infection [4, 6, 7]. En dehors des cas d'infections

à *Plasmodium* simples et graves, il existe également le portage asymptomatique [8]. Ce portage asymptomatique est beaucoup plus décrit chez les enfants de plus de 5 ans et les adultes. La majorité des stratégies mises en place pour l'élimination de cette pandémie ne ciblent que les cas symptomatiques, cependant la persistance de la parasitémie asymptomatique pourrait constituer un réservoir et une menace à l'atteinte de l'élimination du paludisme [8].

Plusieurs facteurs de virulence associés au *P. falciparum* permettent d'expliquer actuellement l'évolution de la maladie notamment les antigènes Erythrocyte Membrane Protein1 (EMP1) qui sont impliqués dans la cytoadhérence et la séquestration plasmodiale ; donc liés à l'accès palustre grave et au paludisme gestationnel. D'autres antigènes tels qu'Apical Membrane Antigen 1 (AMA1) et Merozoïte Surface Protein (MSP) sont aussi impliqués dans l'invasion érythrocytaire du cycle de développement du parasite. Cependant, afin de réussir l'élimination du paludisme, une connaissance de la variation du génome des parasites dans différentes zones géographiques et une meilleure compréhension des facteurs qui déterminent les flux des gènes entre différents milieux est nécessaire. Depuis la publication du génome complet du clone de référence 3D7 de *Plasmodium falciparum* [9], et le séquençage d'autres isolats plasmodiaux, quelques variations génétiques responsables de phénotypes tels que la chimiorésistance et la virulence du parasites ont été détectés [10].

Le climat chaud et humide du Gabon est favorable au développement de l'anophèle vecteur du *Plasmodium*. C'est une zone où la transmission est encore hyper-endémique. Dans cette zone, les espèces présentes sont principalement *P. falciparum, P. malariae* et *P. ovale*. En milieu urbain, l'espèce majoritaire et la plus virulente est *P. falciparum*, alors que la prévalence des autres espèces demeure très faible, malgré l'intensification de la lutte antipaludique, principalement dirigée contre *P. falciparum* [11-14]. Ces données proviennent des patients développant un accès palustre. Une étude récente a montré que chez les patients asymptomatiques des villages isolés, la prévalence des autres espèces plasmodiales est élevée, elle est de l'ordre de 47,6% pour *P. malariae*, et de 9,9% pour *P. ovale [15]*. La prévalence du paludisme dans le sud-est du Gabon, notamment à Franceville, était de près de 18% en ne ciblant que les infections à *P. falciparum* chez les enfants [12]. Cependant, peu de données sont disponibles sur la relation existante entre l'état clinique et les facteurs de virulences des différentes espèces plasmodiales circulant au Gabon. Nous émettons l'hypothèse suivante : les populations de *P. falciparum* trouvées chez les sujets asymptomatiques présentent des génotypes différents de ceux trouvés chez les sujets symptomatiques. Par conséquent, il serait intéressant de décrire et de comparer le génotype de ces souches par rapport au profil présent à la fois chez les patients symptomatiques et chez les porteurs asymptomatiques vivant en milieux urbain, semi-urbain et rural dans le Sud-Est et le Nord-Est du Gabon.

PARTIE 1 : Généralités sur le paludisme

I. Définition et épidémiologie

Le paludisme (du latin *paludis* c'est-à-dire marais) encore appelé malaria (de l'italien mal'aria c'est-à-dire mauvais air) est une érythrocytopathie parasitaire très répandue dans le monde, notamment en Afrique sub-saharienne où le risque de transmission est le plus élevé. Avec une incidence annuelle de 229 millions de cas, et une mortalité annuelle de 409000 décès en 2019 [1] contre 238 millions de cas et 738000 décès en 2000, le paludisme demeure un problème majeur de santé publique. Les données OMS 2020 montrent une diminution du poids du paludisme depuis l'an 2000 [1]. Cependant, 90% de décès dus au paludisme concernent les enfants de moins de cinq ans, vivant en Afrique sub-saharienne où la maladie est endémique [2] (Figure 1). La femme enceinte et le fœtus sont aussi vulnérables face au paludisme. Cette vulnérabilité découle de la baisse de l'immunité maternelle, de la séquestration placentaire qui est à l'origine de la réduction du poids du nouveau-né (surtout pour les primipares). La morbidité maternelle est surtout due à l'anémie. La mort in-utero du fœtus, des avortements et des accouchements prématurés sont également des conséquences fréquentes du paludisme gestationnel [16-18]. Malgré les efforts considérables dans la lutte contre cette endémie, elle constitue une lourde charge pour les pays en voie de développement, car la prise en charge et la prévention de celle-ci demandent un gros investissement de la part des pouvoirs publics et même du patient. Cette maladie parasitaire est causée par un protozoaire du genre *Plasmodium*. Ce protozoaire est transmis à l'homme par la piqure infectante d'un vecteur, moustique hématophage du genre *Anopheles* (anophèle femelle). Parmi les espèces de *Plasmodium* existantes cinq espèces parasitent l'homme : *P. ovale, P. vivax, P. malariae, P. Knowlesi, P. falciparum*. Cette dernière est la plus dangereuse car elle est à l'origine des formes graves du paludisme et de la quasi-totalité de la mortalité due à cette maladie [19]. En 2018, environ 91 pays étaient endémiques pour le paludisme. En raison des facteurs influençant l'épidémiologie (distribution des anophèles, capacité vectorielle, caractéristiques biologiques des différentes espèces de Plasmodium …), la répartition géographique varie d'un continent à l'autre, d'un pays à l'autre, mais aussi d'une région à une autre, d'un village à un autre et même parfois au sein d'un même village. Actuellement, encore près de la moitié de la population mondiale est à risque pour le paludisme dû à *P. falciparum*. La carte ci-après montre la répartition du paludisme dans le monde en 2018.

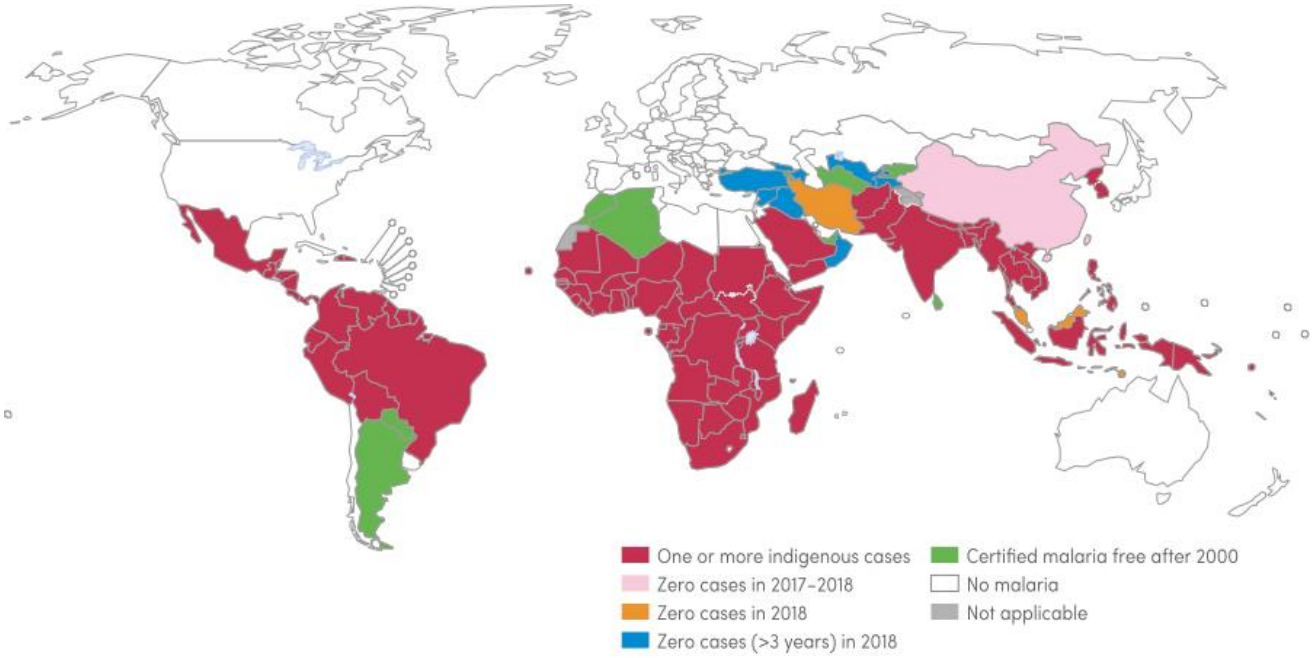


Figure 1: Répartition du paludisme dans le monde en 2018. (Source: WHO, 2019).

II. Espèces plasmodiales infectant l'Homme

Les agents responsables du paludisme sont des protistes de la classe des sporozoaires du genre *Plasmodium*. Ces organismes unicellulaires ont un cycle qui débute toujours par un germe vermiforme et mobile, appelé sporozoïte. Ils appartiennent à l'ordre des *Haemospororida* qui est caractérisé par des micro et macro-gamétocytes se développant indépendamment. Ils sont regroupés dans le sous-ordre *Haemosporidae*. Ce sous-ordre est subdivisé en trois familles à savoir *Plasmodiidae, Haemoproteidae,* et *Leucocytozoonidae*. Toutes ces familles présentent des sporogonies qui chez les vertébrés sont transmises par des insectes hématophages. Nous, nous intéressons plus particulièrement à la famille des Plasmodiidae qui sont transmis par des *Anophelinae* et les *Culicinae*. Cette famille infecte plusieurs groupes d'hôtes qui vont des mammifères aux oiseaux et reptiles. Au sein de cette famille, le genre *Plasmodium* qui est transmis par un vecteur à large distribution géographique compte 200 espèces [20, 21]. Sur les 200 espèces que compte la famille *des Plasmodiidae,* cinq espèces sont connues pour infecter l'Homme et être responsables du paludisme chez ce dernier. Ces espèces sont : *P. falciparum, P. vivax, P. ovale, P. malariae, P. knowlesi.*

A. Plasmodium falciparum

P. falciparum est responsable de la fièvre tierce maligne, il s'agit de l'espèce la plus fréquente en Afrique sub-saharienne où plus de 90% des cas de décès dus aux formes graves du paludisme lui sont associés [3]. Dans les régions équatoriales, il est transmis toute l'année avec cependant des

recrudescences saisonnières. Dans les régions subtropicales par contre, il n'est transmis qu'en période chaude et humide. Sa transmission s'interrompt lorsque la température tombe en dessous 18°C. Des études récentes montrent que bien qu'étant parasite de l'Homme, il est également capable d'infecter les grands singes africains [22, 23].

Publié pour la première fois en 2002, le génome complet de *P. falciparum* a une taille de 23 mégabases, il est composé de 14 chromosomes qui codent pour environ 5300 gènes, riches en adénines et en thymines (environ 80%) [9, 24].

L'aspect morphologique de *P. falciparum* varie en fonction du stade évolutif. Le trophozoïte jeune est de petite taille (1/4 de la taille de l'hématie parasitée). Il est souvent accolé à la paroi de l'hématie et a la forme de bracelet arabe (noyau bilobé et cytoplasme fin). On n'observe aucun pigment malarique. Le trophozoïte âgé quant à lui est plus volumineux et plus irrégulier (forme de raquette, filet à papillons). Les schizontes et la rosace ne sont généralement pas rencontrés dans le sang périphérique. Le gamétocyte, quant à lui, a une forme caractéristique en banane qui déforme l'hématie (Figure 2).

B. Plasmodium vivax

P. vivax est responsable de fièvres tierces bénignes. Il est aussi très répondu dans le monde et évolue avec des rechutes à long terme. Longtemps absent en Afrique noire, il a récemment été retrouvé dans certains pays d'Afrique au sein des populations ayant l'antigène Duffy négatif. Il est plus fréquent en Asie, Amérique du Sud et Centrale [25]. Il a été démontré que les grands singes africains sont des réservoirs potentiels de *P. vivax* [26, 27]. L'aspect morphologique a été décrit par Martet et Peyron en 2000. Le trophozoïte jeune occupe le tiers de l'hématie. Le cytoplasme est plus épais que celui de *P. falciparum.* Il n'y a pas de pigment malarique. Le trophozoïte âgé est caractéristique (corps amoeboïde). Le cytoplasme est étiré en tous sens, déformé, très polymorphe. La vacuole parasitophore est mal délimitée et le pigment malarique est fin. Le schizonte comporte des noyaux irréguliers. La rosace est volumineuse : elle occupe toute l'hématie et comporte 12 à 18 mérozoïtes irrégulièrement répartis. Les gamétocytes sont arrondis ou ovalaires et occupent la quasi-totalité de l'hématie. Le noyau est excentré et le pigment très abondant (Figure 2)

C. Plasmodium ovale

P. ovale est aussi l'agent d'une fièvre tierce bénigne. Il est très proche *de P. vivax* avec lequel il a été très longtemps confondu [28]. Il est très rare et se rencontre presque exclusivement en Afrique de l'Ouest et en Asie. Considéré comme peu pathogène, son évolution est bénigne, mais on peut

observer comme avec *P. vivax* des rechutes tardives. Généralement on dit que *P. ovale* remplace *P. vivax* là où cette dernière espèce est absente [29].

Des études sur la morphologie de *P. ovale* et le changement de forme de l'hématie parasitée sont très limitées [30]. Ce changement serait semblable à celui des autres espèces plasmodiales notamment *Plasmodium vivax*. Le trophozoïte jeune est structurellement semblable à celui de *P. vivax* mais il possède souvent un fin grain de pigment malarique. Le trophozoïte âgé possède du pigment palustre, le volume du parasite augmente et il se déforme. A ce stade, le cytoplasme peut posséder une partie filamenteuse mais il ne forme jamais de corps amoeboïde. Le schizonte mûr quant à lui possède 8 à 9 mérozoïtes, répartis plus ou moins régulièrement et se différencie du trophozoïte âgé que par la division du noyau. Contrairement à *P. malariae* son pigment est dense mais plus fin. Il présente également des similitudes avec *P. vivax* au niveau des gamétocytes, lesquels n'occupent pas la totalité de l'hématie (Figure2).

D. Plasmodium malariae

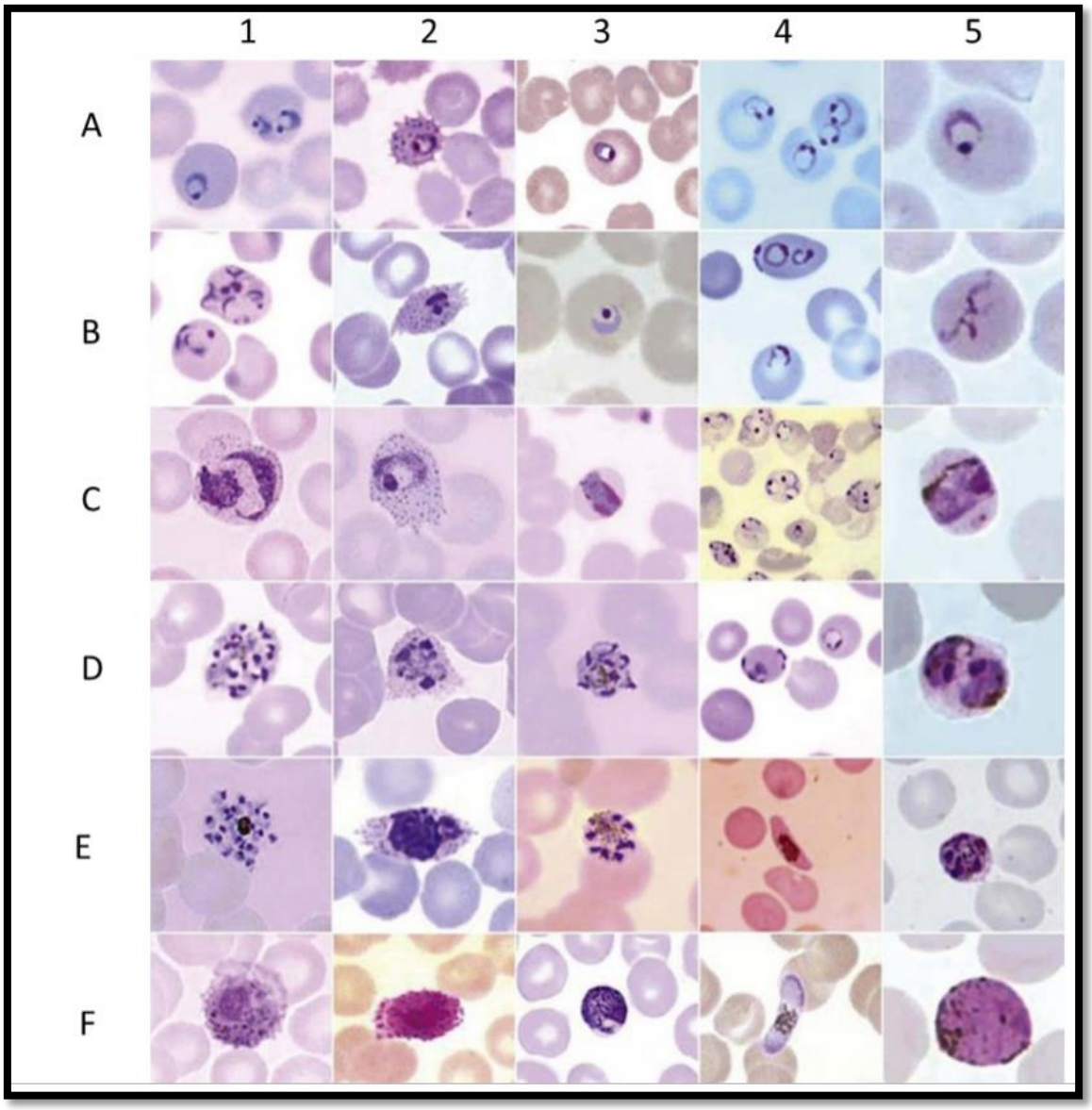
P. malariae sévissant dans toutes les régions ou le paludisme est endémique, avec une distribution géographique plus fréquente en Amérique du Sud (tribus amérindiennes) est responsable d'une fièvre quarte et représente environ 1% des cas de paludisme [31].

Certains auteurs ont montré que l'aspect morphologique de *P. malariae* est similaire à celui de certaines espèces de plasmodies chez les primates [32]. Le trophozoïte jeune est comparable à celui de *P. vivax*, mais à ce stade il possède un grain de pigment. Le trophozoïte âgé est plus volumineux avec un pigment très abondant. On retrouve deux aspects classiques : la bande équatoriale, forme rigide et transversale du parasite dans l'hématie, et la forme hémogrégariniforme où le parasite se replie en vermicule, avec un pigment abondant. La division du noyau permet de différencier le schizonte du trophozoïte âgé. La rosace est caractérisée par son aspect régulier, avec au centre un pigment malarique très abondant et en périphérique 8 à 12 mérozoïtes régulièrement répartis. Le gamétocyte est globuleux, possède un abondant pigment palustre et occupe la presque totalité de l'hématie (Figure2).

E. Plasmodium knowlesi

P. knowlesi était longtemps considéré comme une espèce simienne spécifique des macaques d'Asie du Sud-Est, l'infection chez l'homme a été récemment décrite faisant de cette dernière la cinquième espèce plasmodiale humaine. Elle est génétiquement proche de *P. vivax*, et morphologiquement proche de *P. malariae*. *P. knowlesi* a été récemment découvert chez l'Homme

en Malaisie (mais il était connu chez les singes). Sa répartition géographique est étroitement liée à celle des singes macaques, ainsi qu' à celle de son vecteur [7, 33]. Il est clair aujourd'hui que la déforestation accompagnée de contacts fréquents entre Homme et primates a fortement contribué à l'émergence de ce parasite dans les populations d'*Homo sapiens*.



<u>Figure 2</u>: Morphologie microscopique des 5 espèces plasmodiales infectant l'Homme. [34]

1: *Plasmodium vivax*. (1A) jeune trophozoïte (forme anneau) (un GR contient 2 anneau-peu commun); (1B) anneau âgé; (1C) trophozoïte âgé avec des grains de Schüffner; (1D) schizonte en formation; (1E) schizonte mature avec 18 mérozoïtes; (1F) microgametocyte. 2: *Plasmodium ovale* (2A) jeune trophozoïte (forme anneau) avec des grains de Schüffner; (2B) jeune trophozoïte ; (2C) trophozoïte âgé; (2D) schizonte en développement ; (2E) schizonte mature avec 8 mérozoïtes; (2F) microgametocyte. 3: *Plasmodium malariae* (3A) jeune trophozoïte (forme anneau); (3B) jeune trophozoïte; (3C) trophozoïte âgé; (3D) schizonte en développement; (3E) schizonte mature avec 9 mérozoïtes réarrangé en rosette; (3F) microgametocyte. 4: *Plasmodium falciparum*. (4A) jeune trophozoïte (forme anneau); (4B) jeune trophozoïte ; (4C) jeunes trophozoïtes (plusieurs anneaux par cellules); (4D) trophozoïte âgé ; (4E) gamétocyte; (4F) gamétocyte. 5: *Plasmodium knowlesi*. (5A) jeune trophozoïte (forme anneau); (5B) jeune trophozoïte; (5C) trophozoïte âgé; (5D) schizonte en développement; (5E) schizonte mature avec mérozoïtes réarrangé en rosette; (5F) microgametocyte.

III. Phylogénie des espèces plasmodiales.

Au début du vingtième siècle, trois espèces plasmodiales avaient été décrites chez les chimpanzés et les gorilles, *P. schwetzi*, *P. rodhaini* et *P. reichenowi* essentiellement sur la base de descriptions morphologiques. Seul, *P. reichenowi*, pour lequel du matériel était disponible, a pu être caractérisé moléculairement par la suite. Dans les années 90, les premières constructions phylogénétiques incluant des données moléculaires de *P. reichenowi*, ont été réalisées afin de mieux comprendre l'origine et l'histoire évolutive de *P. falciparum* [35, 36]. Ces phylogénies ont montré que *P. reichenowi* était le *Plasmodium* le plus proche phylogénétiquement de *P. falciparum*. Ces deux parasites monophylétiques ont un ancêtre commun le plus récent datant de la séparation de leur hôte respectif, le chimpanzé et l'homme, il y a 6-10 millions d'années. *P. reichenowi* et *P. falciparum* ont été classés dans le sous genre *Laverania* en raison de similarités morphologiques (formes des gamétocytes) mais aussi de leur position phylogénétique, distante des autres *Plasmodium* infectant les autres primates non humains et des trois autres espèces plasmodiales infectant l'homme. Ces autres *Plasmodium* ont été classés dans le sous genre *Plasmodium* bien que la bibliographie fait plutôt état de parasites *non Laverania* par opposition au groupe phylogénétiquement distinct constitué des deux espèces, *P. reichenowi* et *P. falciparum*. Les études récentes sur l'exploration des Plasmodiums chez les grands singes africains en utilisant les outils moléculaires comme moyen de détection ont permis la découverte d'une importante diversité moléculaire au sein de ces parasites, jusqu'alors insoupçonnée, chez les chimpanzés, gorilles et bonobos.

A. *Parasites Non Laverania*

Une diversité de *Plasmodium*, à *P. ovale* identique moléculairement (portion du gène mitochondrial cyt b) et très proche génomiquement (génome mitochondrial) de *P. vivax* chez l'homme ont été retrouvés chez les chimpanzés et gorilles vivant dans leur milieu naturel ; *P. vivax* est à présent inclus dans un groupe monophylétique composé d'espèces sœurs infectant les grands singes en Afrique.

Des *Plasmodium*, moléculairement proches (portion du cyt b) des deux types de *P. ovale*, *P. ovale curtisi* (type classique) et *P. ovale wallikeri* (type variant), ont été retrouvés chez les chimpanzés sauvages en République du Congo et en Côte d'Ivoire et des chimpanzés en sanctuaires au Cameroun et chez l'Homme. Un *Plasmodium* identique moléculairement sur une portion du cyt b a été retrouvé chez un chimpanzé captif au Cameroun [23, 26, 37, 38]. *P. ovale curtisi* et *P. ovale wallikeri* sont à présent inclus dans un groupe monophylétique de Plasmodium de chimpanzés (Figure 3). *P. malariae*, comme pour *P. vivax* et, est également à présent inclus dans un groupe monophylétique incluant des *Plasmodium* retrouvés chez les grands singes. Ainsi, des *Plasmodium malariae-like*,

c'est-à-dire proches phylogénétiquement mais divergents moléculairement de *P. malariae* chez l'homme, ont été retrouvés chez les bonobos vivant en sanctuaires en RDC, des chimpanzés sauvages en Côte d'Ivoire et au Cameroun (Fig. 3). De plus, *P. malariae* (similarité d'une portion du cyt b) a également été retrouvé chez des chimpanzés vivant en sanctuaire au Cameroun et chez les chimpanzés importés d'Afrique il y a des dizaines d'années et vivant en captivité au Japon [22, 23, 26, 36, 37]. (Figure 3)

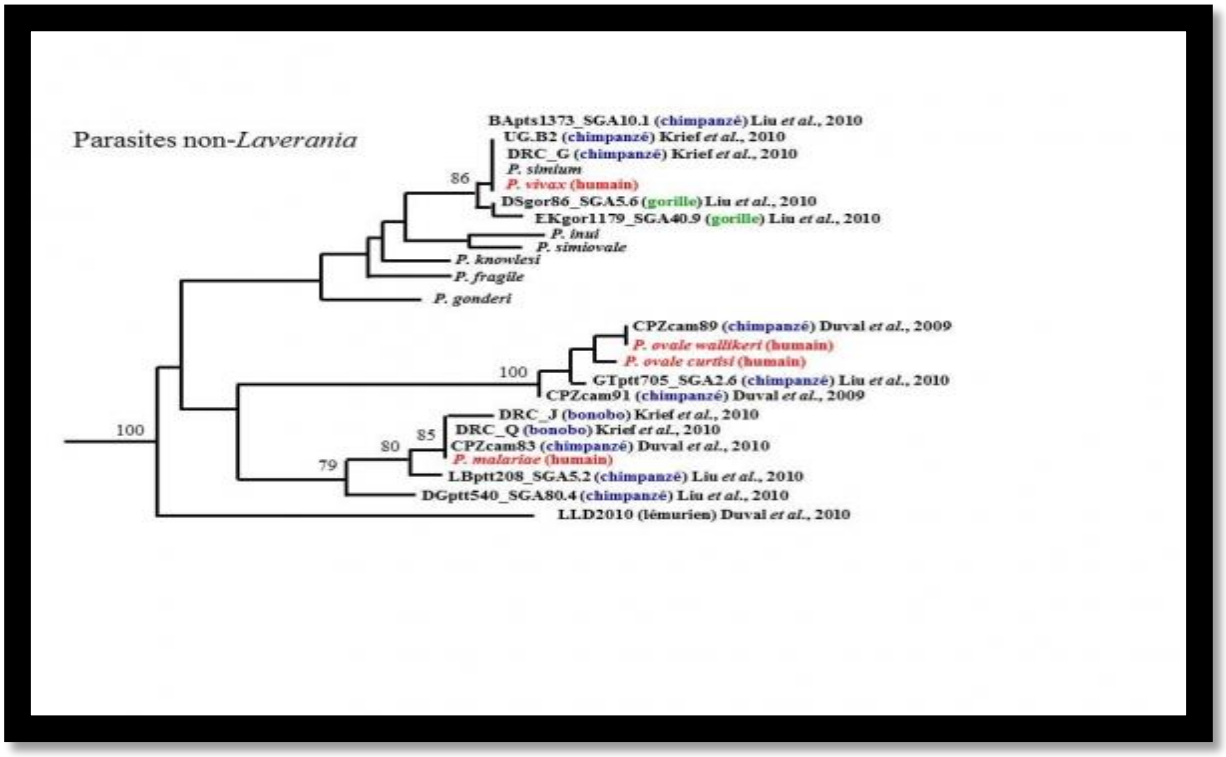


Figure 3:Parasites non-Laverania, groupes *Plasmodium vivax, P. ovale et P. malariae* (modifié d'après Liu et al., 2010).

B. *Parasites Laverania*

Le groupe des parasites du sous genre *Laverania* s'est considérablement agrandi. Une diversité moléculaire très importante des parasites *Laverania* infectant les grands singes a été mise à jour grâce aux outils moléculaires. Ce groupe qui n'était composé que de deux espèces, *P. reichenowi* et *P. falciparum* est à présent composé de 6 groupes avec une diversité intra-groupes. Ces 6 groupes sont moléculairement distincts les uns des autres, et il a été proposé qu'ils correspondraient à six espèces de *Plasmodium* ; trois seraient spécifiques des chimpanzés, *P. reichenowi*, *P. billcollinsi* et *P. gaboni* (*P. billbrayi*, nom d'espèce proposé par Krief et al., 2011, pourrait être la même espèce que *P. gaboni*, toutefois, les analyses faites jusqu'à présent ne permettent pas de conclure); trois seraient spécifiques des gorilles, *P. praefalciparum*, *P. blacklocki* et *P. alderi* [39]. Une spécificité de ces espèces de *Plasmodium* au niveau des différentes sous-espèces de chimpanzés et de gorilles n'a pas été observée

à l'heure actuelle (Fig. 4). *P. praefalciparum*, retrouvé chez les gorilles, est le groupe le plus étroitement lié au groupe de *P. falciparum*. Par conséquent, l'hypothèse de travail qui a été proposé, concernant l'origine et l'histoire évolutive de *P. falciparum*, est que celui-ci proviendrait d'un ancêtre de Plasmodium de gorilles. Toutefois, des *P. falciparum-like*, identiques (portion du cyt b) et très proches moléculairement, ont été retrouvés chez les chimpanzés et bonobos vivant en sanctuaires et chez les gorilles sauvages [22, 23, 26, 38]. S'il est maintenant prouvé que l'origine de *P. falciparum* ne se trouve ni chez les rongeurs, ni chez les oiseaux comme ce fut très longtemps l'hypothèse, l'incertitude demeure entre bonobos, chimpanzés ou gorilles. En effet, pour affirmer que les *Plasmodium falciparum* de gorilles sont à l'origine du transfert chez les Hommes, il faut démontrer que seuls les gorilles hébergent les lignées *P. praefalciparum* 1 et 2. Cette hypothèse est remise en question suite à la très récente publication montrant qu'un cercopithèque (*Cercopithecus nictitans*) était parasité par *P. praefalciparum* 2. Les gorilles ne sont donc pas les seuls ! D'autres recherches s'avèrent donc nécessaires pour démontrer l'origine de *P. falciparum* chez l'Homme et surtout pour comprendre les processus sélectifs qui ont conduit à la réussite du transfert, et qui ont façonné le génome de ce fléau parasitaire.

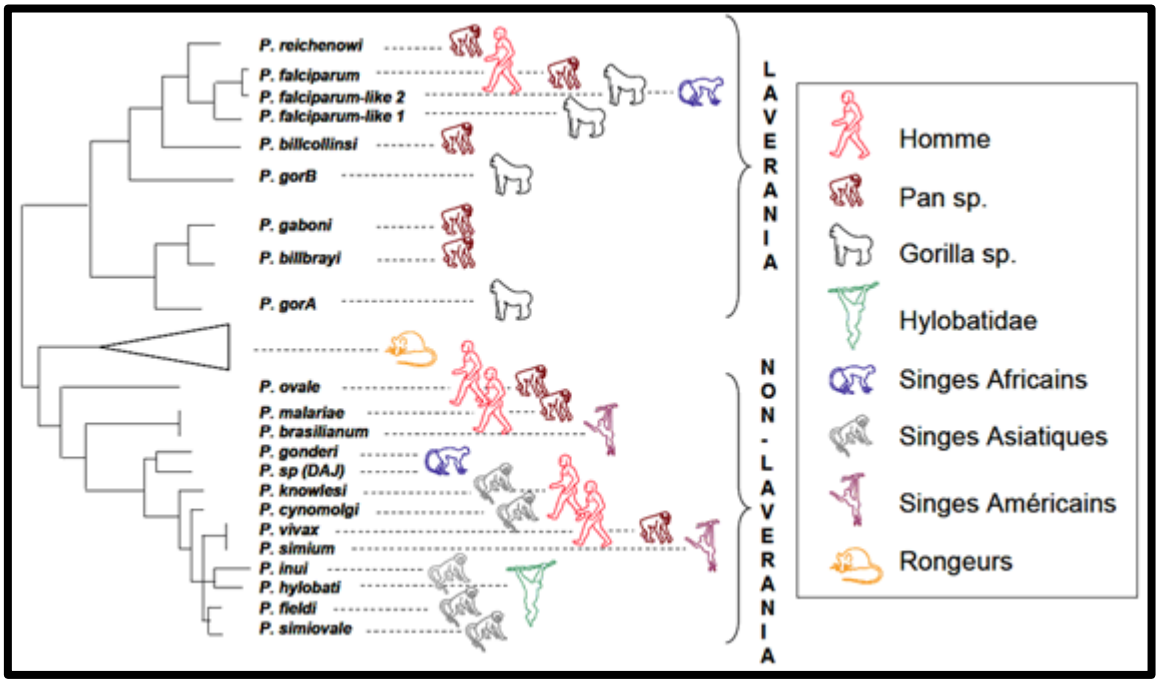


Figure 4: L'arbre de relation du primate Plasmodium avec les catégories d'hôtes actuellement connues [40]

IV. Cycle évolutif du *Plasmodium*

Le cycle évolutif du *Plasmodium* comprend deux phases ; une phase de multiplication asexuée qui se déroule chez l'homme (hôte intermédiaire), et une phase de multiplication sexuée qui se déroule chez le moustique (hôte définitif).

A. *Cycle chez l'anophèle : phase sexuée*

Au cours d'un repas sanguin chez un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des gamétocytes à potentiels sexuels. Ceux-ci vont, dans l'intestin de l'animal. Les gamétocytes mâles se différencient en microgamètes (4 à 8) rendus très mobiles par un processus d'exflagellation, tandis que les gamétocytes femelles se différencient en macro-gamètes (ovules). La rencontre entre ces gamètes produit un zygote mobile: l'ookinète [41]. Celui- ci pénètre dans la paroi intestinale où il s'implante sous la paroi stomacale en formant l'oocyste. A l'intérieur de cet oocyste (brève phase diploïde) se forment plusieurs sporoblastes, dans lesquels se développent des milliers de sporozoïtes par sporogonie. Ces sporozoïtes haploïdes et mobiles perforent la coque de l'oocyste, puis passent dans l'hémolymphe pour aboutir au niveau des glandes salivaires où ils vont acquérir leur pouvoir infectieux [42]. Chez le moustique, le cycle se déroule en une quinzaine de jours, selon la température extérieure.

B. *Cycle chez l'homme : phase asexuée*

La phase humaine du cycle de développement de *Plasmodium* est constituée de deux phases : un cycle exo-érythrocytaire et un cycle érythrocytaire.

Cycle exo-érythrocytaire:

Cette première phase du cycle chez l'Homme se déroule au niveau hépatique. Lors d'une piqure, l'anophèle femelle portant des sporozoïtes infectieux dans sa salive les injecte dans un capillaire. En moins d'une demi-heure, ces sporozoïtes migrent rapidement vers le foie via la circulation sanguine, et envahissent les hépatocytes dans lesquels se déroule la phase hépatique. Dans les hépatocytes, les sporozoïtes se développent en trophozoïtes qui subissent une multiplication immédiate (schizogonie hépatique ou exo-érythrocytaire) pour donner des schizontes renfermant des mérozoïtes. A maturité, les schizontes éclatent et libèrent plusieurs mérozoïtes dans la circulation sanguine, capables d'infecter les globules rouges. La phase exo-érythrocytaire est asymptomatique et dure 10 à 15 jours. Cependant, chez certaines espèces plasmodiales (*P. ovale, P. vivax*), on retrouve des persistances hépatiques ou hypnozoïtes qui peuvent rester cachées sans se multiplier durant plusieurs mois ou années pour reprendre le cycle plus tard: c'est le stade cryptozoïte.

Cycle érythrocytaire:

Les mérozoïtes issus de la phase hépatique, présents dans la circulation sanguine, envahissent les globules rouges. Dans ces derniers, les mérozoïtes se développent d'abord en anneau (ring) puis en trophozoïtes. Pendant ce stade, une intense activité métabolique (approvisionnement en acides aminées, synthèse nucléique et protéique) se développe ; le parasite peut dégrader jusqu'à 75% d'hémoglobine de la cellule hôte pour se nourrir et former le pigment malarique. Au bout d'une

trentaine d'heures après l'invasion, le parasite est prêt à commencer sa division nucléaire : c'est la schizogonie érythrocytaire. L'éclatement des schizontes mûrs libère dans le sang des mérozoïtes et des déchets métaboliques (pigments et débris cellulaires pyrogènes responsables des accès de fièvre). Ceci s'accompagne également d'un relargage des antigènes parasitaires dans le sang. Cette nouvelle génération de mérozoïtes réinfecte rapidement les érythrocytes. La phase érythrocytaire qui dure environ 48 heures induit un spectre de symptômes chez l'homme responsable de la morbidité et de la mortalité associés à l'infection.

Après quelques cycles érythrocytaires, des gamétocytes se différencient en gamétocytes mâles et femelles, lesquels ne pourront poursuivre leur évolution que chez le moustique. Ils restent vivants une vingtaine de jours chez l'hôte humain puis disparaissent.

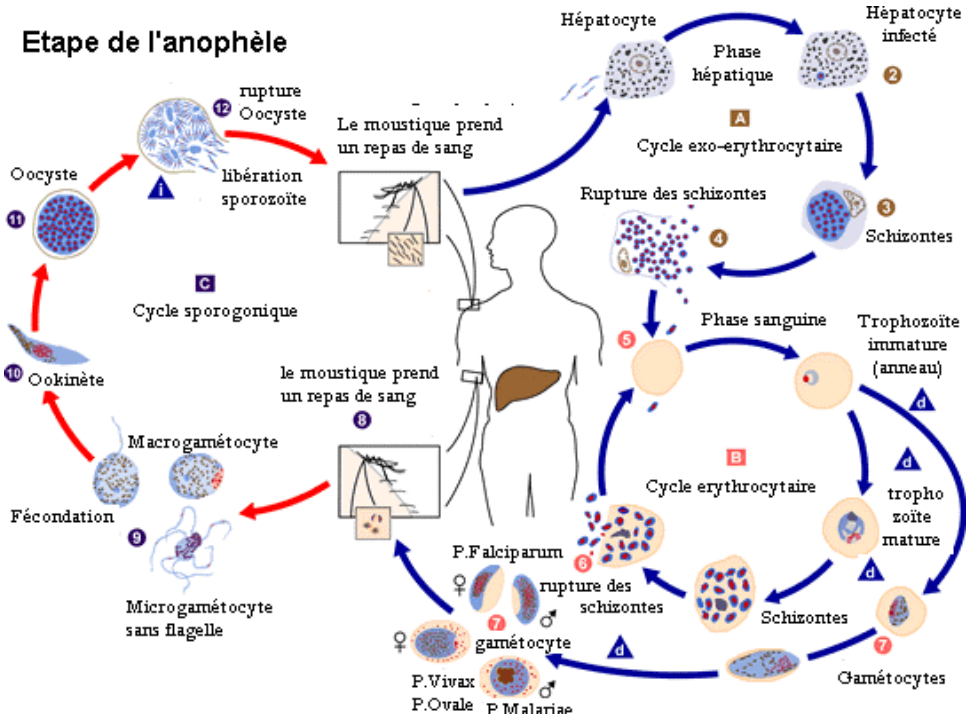


Figure 5: ***Cycle évolutif du*** *Plasmodium Spp. [43]*

V. Physiopathologie du paludisme

La symptomatologie d'une infection à *Plasmodium* est le reflet d'un ensemble des processus physiologiques influencé à la fois par le parasite et l'hôte. Elle peut être classée en deux grandes catégories : les accès palustres simples et les formes graves.

A. Paludisme simple

L'accès palustre simple se développe en trois phases : la phase d'incubation, la phase d'invasion et la phase d'état.

Les symptômes apparaissent en général entre 10 et 15 jours après la piqûre infectante du moustique : c'est la phase d'incubation. Le pigment malarique se comporte comme une substance pyrogène, responsable de la fièvre [44]. La durée de la phase d'incubation est sous l'influence de plusieurs facteurs tels que l'espèce parasitaire, le statut immunitaire de l'hôte, et probablement de la densité parasitaire. Une immunité efficace peut prolonger cette phase et réduire les taux de parasitémie et les niveaux des manifestations cliniques. D'autres facteurs peuvent également être impliqués dans ce prolongement: la résidence en zone d'endémie palustre [45, 46], la grossesse et la coinfection avec le VIH [47], l'utilisation des médicaments antipaludiques.

Les premiers symptômes du paludisme communs à toutes les espèces ne sont pas spécifiques et donnent l'aspect d'un syndrome pseudo grippal. Le signe le plus observé est la fièvre. Généralement, la fièvre est d'abord irrégulière, puis elle tend à devenir périodique au bout de quelques jours, se synchronisant à l'éclatement des globules rouges pour les espèces *P. vivax et P. ovale* [47]. Lorsque la fièvre diminue, le patient ressent une fraîcheur typique qui est caractérisée par un début soudain, avec des sensations des frissons. En raison d'un phénomène de vasoconstriction intense, la peau est sèche, pâle et cyanosée [47]. Pendant ce stade initial qui dure habituellement 10 à 30 minutes et très rarement 90 minutes, la température augmente et atteint un pic (39 à 41°C). Les frissons cessent enfin et le second stade ou phase d'invasion débute. La peau devient chaude et sèche et le patient ressent de la chaleur. La température peut atteindre de fortes valeurs. Les vomissements sont fréquents durant ce stade et parfois la diarrhée, les céphalées, des signes de déshydratation et parfois une altération de l'état de conscience. Chez les enfants une convulsion peut survenir.

La troisième phase qui est la phase d'état commence au bout de 2 à 6 heures. Elle se manifeste par des sueurs profuses soudaines. La température chute rapidement et le patient éprouve une sensation de bien-être. Le stade de sueur dure 2 à 3 heures et l'accès palustre tout entier commence fréquemment en fin d'après-midi ou en soirée et dure 6 à 10 heures.

L'examen clinique révèle une splénomégalie présente au cours de l'accès et plus généralement observée deux semaines après l'accès. Une hépatomégalie peut également être présente, d'autres signes non spécifiques peuvent aussi être présents (hypotension, tachycardie, ictère). Dans les infections à *P. malariae*, l'œdème et l'ascite peuvent se voir accompagnés d'une protéinurie massive pouvant occasionner un syndrome néphrotique. Pour *P. knowlesi*, les manifestations cliniques sont presque identiques à celles de *P. falciparum* et *P. vivax* [48].

Les analyses para cliniques peuvent montrer une légère anémie normocytaire, normochrome chez des individus antérieurement sains.

Le taux de réticulocytes est normal ou bas malgré l'hémolyse. L'haptoglobine sérique peut être présente et le degré d'anémie peut varier. Le taux de globule blanc est souvent normal mais une leucopénie peut être observée. La thrombopénie est souvent fréquente et peut être corrélée avec la

gravité. Les transaminases sériques et la lactate déshydrogénase (LDH) sont modérément élevées, ainsi que le taux de bilirubine qu'elle soit conjuguée ou pas. Le temps de prothrombine peut être allongé de même que les taux de fibrinogène.

La protéine C-réactive (CRP) ainsi que le taux de prolactine sont généralement élevés aussi bien dans le paludisme grave que dans le paludisme simple, et leurs valeurs sont en corrélation avec la parasitémie et le pronostic [49]

Pour *P. falciparum*, l'examen des frottis sanguin révèle surtout la présence de trophozoïtes jeunes, souvent nombreux, avec des infections multiples d'un même globule rouge. Les trophozoïtes âgés et les schizontes sont rarement observés, leur présence est un indicateur de très grosses infections et de mauvais pronostic. La présence de gamétocytes est généralement observée au début de la deuxième semaine après l'infection et peut persister quelques semaines après traitement. Pour *P. vivax* et *P. ovale* toutes les formes peuvent se voir à l'examen des frottis sanguin.

B. Paludisme grave

Les formes graves du paludisme à *P. falciparum* relèvent d'un ensemble de symptômes cliniques et biologiques affectant de nombreux organes, témoins des bouleversements fonctionnels systémiques qui résultent de l'infection hôte-parasite. L'OMS a défini des critères cliniques et biologiques de gravité (OMS, 2013). Les principaux syndromes associés à la mortalité due au paludisme sont l'anémie sévère palustre, et les atteintes neurologiques (Tableau1) [50]. Une Hyperlactatémie et une hypoglycémie associées à la présence de *P. falciparum* sont souvent observées [50].

Chez l'adulte, on observe souvent des insuffisances rénales, des manifestations respiratoires ou polyviscérales [51].

Le diagnostic et le traitement tardifs du paludisme à *P. falciparum* sont souvent les principales causes du paludisme grave.

Les infections à *P. vivax* et *P. ovale* bien qu'étant rarement compliquées, il a cependant été mis en évidence des complications sérieuses et fatales avec *P. vivax* [52, 53].

Tableau 1: Critère cliniques de gravité du *paludisme à P. falciparum* (OMS, 2013).

Clinique du paludisme grave
o Troubles de la conscience (score de Glasgow <15 et >9) o Prostration (incapacité à s'asseoir, de se tenir debout ou de marcher sans assistance) o Convulsions répétées (plus de deux épisodes en 24 h) o Œdème pulmonaire aigu et syndrome de détresse respiratoire aigu o Collapsus circulatoire ou choc (TAS <80 mm Hg chez l'adulte et <50 mm Hg chez l'enfant) o Lésion rénale aiguë o Anomalies hémorragiques
Résultats de laboratoire et autres observations
o Hypoglycémie (< 2,2 mmol/l ou < 40 mg/dl) o Acidose métabolique (bicarbonate plasmatique < 15 mmol/l) o Anémie normocytaire grave (Hb < 5 g/dl, Ht < 15% chez l'enfant ; Hb < 7g/dl, Ht < 20% chez l'adulte) o Hémoglobinurie o Insuffisance rénale (adulte : diurèse < 400 ml/24h. ou créatinine sérique > 265 µmol/l) o Hyperlactatémie (lactate > 5 mmol/l)

C. Infection Asymptomatique

Il est admis que les personnes vivant en zone d'endémie palustre sont porteuses asymptomatiques du *Plasmodium*. Le portage asymptomatique est l'absence de symptômes cliniques apparents malgré la circulation de parasites dans le sang. Le contact antérieur de l'individu avec le parasite influence ce silence physiopathologique. Toutes les études montrent qu'il est variable selon le niveau de transmission de la région et est le plus souvent observé chez les adultes [54-56]. La charge parasitaire varie d'un individu à l'autre. L'infection asymptomatique à *Plasmodium falciparum* est souvent interprétée comme le reflet de l'état de prémunition [57]. En effet après plusieurs années d'infections répétées, l'hôte du *Plasmodium* peut acquérir une prémunition [58]. La réponse à l'infection palustre est très variable entre des individus vivants dans les mêmes zones endémiques. Dans les régions à forte transmission, la proportion d'enfants porteurs de parasites à *Plasmodium falciparum* sans aucun symptôme est souvent élevée [59]: on parle d'immunité clinique, se caractérisant soit par l'absence de manifestations des effets délétères du parasite sur la physiopathologie de la personne infectée ou soit par une immunité antiparasitaire caractérisée par l'adaptation du système immunitaire des personnes porteuses au parasite et qui maintient la parasitémie à un niveau bas.

VI. Marqueurs de virulence de *Plasmodium spp.*

La virulence peut être définie comme étant la capacité d'un germe infectieux à se développer dans un organisme et d'y provoquer une pathologie. Dans notre cas, c'est donc la capacité du *Plasmodium spp* à infecter l'Homme et à induire ensuite une pathologie. La présentation clinique de l'infection plasmodiale causée par *Plasmodium spp.* va de l'infection asymptomatique à l'infection fébrile aiguë modérée à l'infection grave et compliquée avec insuffisance organique. Bien que les facteurs contribuant à ce large spectre de symptômes n'aient pas encore été bien caractérisés, certains auteurs pensent que la virulence parasitaire est un facteur contributeur important [60, 61]. De ce fait, il serait donc nécessaire de déterminer les souches de *Plasmodium* responsables ou pas de la symptomatologie clinique. Pour ainsi mettre en évidence ces différentes souches et en déterminer le lien avec la virulence du parasite, plusieurs études ont été menées sur certains gènes tels que : *msp1, msp2, ama1, Pfmp1* etc. Or, un lien clair entre ces gènes et la symptomatologie clinique n'a pas encore été établi. C'est dans cette optique que nous nous sommes proposé d'étudier le rôle des gènes *msp1, msp2 et ama1* dans la virulence de différentes espèces plasmodiales.

A. Merozoïte Surface Protein 1

La protéine de surface du Mérozoïte de *Plasmodium* est présente chez toutes les espèces plasmodiales.

Parmi les antigènes du stade érythrocytaire de *Plasmodium* étudiés, MSP1 est l'un des candidats vaccins antipaludique les mieux caractérisés. C'est un antigène très abondant et très polymorphe, qui a fait l'objet de nombreuses études [62-64].

Le gène *Merozoïte surface protein-1 (msp-1)* situé sur le chromosome 9 de *P. falciparum* [65] peut être divisée en 17 blocs plus ou moins conservés entre les souches de *P. falciparum* [66]. Le bloc 2 constitue une exception au dimorphisme car en plus des familles alléliques K1 et Mad20, est fréquemment trouvée dans ce bloc une troisième famille d'allèles nommée RO33 (Figure 4). Les tailles de fragments des familles alléliques retrouvées dans le bloc2 du gène *msp-1* varient considérablement, laissant paraitre un important polymorphe de longueur de taille de fragment[67]. Ce gène code pour la synthèse d'une protéine mérozoïtique de surface de grande taille (185-200 KDa) fortement impliquée dans l'invasion de l'érythrocyte. Le *gène Merozoïte Surface Protein 1 (msp1)* est l'un des marqueurs les plus couramment utilisé dans les études liées à la diversité génétique de *P. falciparum* en raison de son polymorphisme élevé. Certaines études ont montré qu'il existerait des génotypes plus ou moins virulents, en raison de leur prédominance dans les cas de paludisme grave ou asymptomatiques [68, 69]. Amodu et al. ont montré que la présence des variants alléliques des familles K1 et Mad20 était associée à un risque moins élevé de développer un paludisme chez les

patients asymptomatiques [70]. Une autre étude a également montré que le nombre d'allèle de *msp1* augmenterait avec la gravité de la maladie, suggérant une association entre la diversité génétique du *Plasmodium* et la sévérité du paludisme [71]. Mais malgré toutes ces études, un lien clair entre la diversité génétique de *msp-1* et la virulence du parasite n'a pas encore été fermement établi. D'où la nécessité de caractériser la virulence de *Plasmodium* en utilisant ce marqueur.

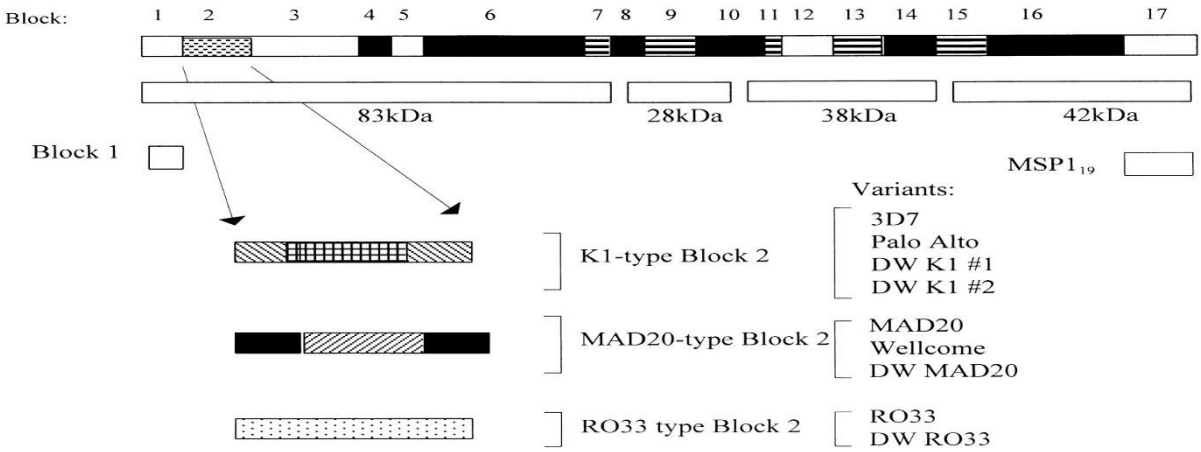


Figure 6: Représentation Schématique du gène *msp-1 de P. falciparum* montrant les 17 domaines **[72]**

B. Merozoïte Surface Protein 2

Le gène *Merozoïte surface Protein-2 (Msp-2)* s'est avéré être un marqueur utile pour la différenciation des souches de *Plasmodium* [73, 74]. *Msp-2* est impliqué dans l'invasion des globules rouges, car il a été démontré que les anticorps anti-msp2 inhibent l'invasion par les mérozoïtes et la croissance des parasites [75, 76]. Les peptides synthétiques de msp2 se lient avec une grande affinité aux globules rouges et peuvent également inhiber l'invasion érythrocytaire par le parasite. De même MSP2 a été identifié en tant que cible de l'immunité clinique acquise naturellement, et utilisé comme antigène candidat vaccin contre le paludisme [76-79]. Le gène *msp-2* est exceptionnellement intéressant en tant que marqueur de virulence parasitaire, étant donné son pouvoir pathogène, sa diversité génétique, et son degré élevé de polymorphisme de longueur de taille et de séquence. En effet, le gène *Merozoïte surface Protein 2* (*msp-2*), présent sur le chromosome 2, a été isolé et séquencé à partir de plusieurs souches de *P. falcipar*um [80-82]. Ce gène, très polymorphe, code pour la synthèse d'une protéine du même nom située à la surface du mérozoïtes [83]. Il présente une structure en 5 blocs de séquences (figure 8) comportant 345 résidus acides aminés [84]. Les blocs 1, 2, 4 et 5 du gène possèdent une structure stable tandis que le bloc 3 comporte une région variable dimorphique pouvant être classée entre deux familles alléliques sur la base des séquences qui sont :

la famille Indochina 1 IC1 (ou 3D7) caractérisée par une courte séquence (glycine-serine-alanine) répétée de 4 à 8 résidus acides aminés.

La famille FC27 pauvre en glycine-serine-alanine contient une ou plusieurs copies répétées d'une séquence de 32 acides aminés [84]. Jusqu'en 2018, la plupart des études réalisées avec *msp-2* n'ont utilisé que le dimorphisme allélique de ce gène et la variation de taille comme marqueurs pour génotyper la virulence du parasite sur la base de la PCR, suivie d'une électrophorèse sur gel classique ou d'une électrophorèse capillaire à haute résolution pour analyser la taille des fragments. Ces études n'ont établi aucune relation concluante avec la virulence. Certaines de ces études ont montré des résultats mitigés avec les familles FC27 et 3D7, décrites de manière différente comme des souches virulentes et le lien entre la virulence et une famille allélique particulière variait également d'une région à une autre [85, 86]. Par ailleurs, plusieurs études n'ont pas permis de mettre en évidence l'association entre des allèles particuliers et la gravité de la maladie [87-89]. Mais une étude récente basée sur le séquençage des blocs 2, 3 et 4 du gène *msp2* chez des enfants ayant un paludisme grave, modéré et cérébrale a montré qu'il pourrait y avoir un lien entre la virulence et certains allèles du gène *msp-2*. En effet cette étude a identifié deux allèles *msp2-FC27-bloc 2-8N* et *3D7-bloc 4-17K* qui semblent être des marqueurs de virulence du parasite et vraisemblablement utile pour déterminer la probabilité d'un paludisme grave et cérébral. Mais leurs interactions avec des facteurs hôtes restent à explorer [61].

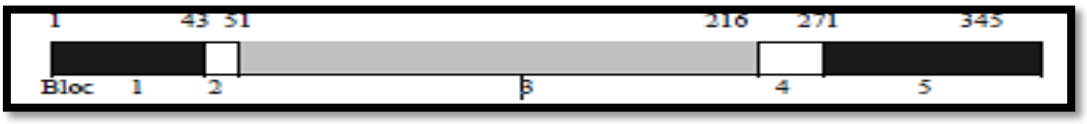


Figure 7: Diagramme Schématique du gène *msp-2* illustrant les bloc 1 à 5 [90]

C. Apical Membrane Antigen 1

La protéine AMA1 (Apical membrane Antigen) est une protéine membranaire présente dans toutes les espèces de *Plasmodium,* elle est probablement commune à tous les parasites de la famille des *Apicomplexa.* AMA1 a une structure conservée de type I variant entre 556 à 563 acides aminés dans la plupart des espèces de *Plasmodium.* La protéine PfAMA1 (*Plasmodium falciparum* apical membrane Antigen 1) est synthétisée sous forme d'un précurseur de 83KDa (PfAMA183) qui est converti en PfAMA1 66 dans les micronèmes avant d'être relocalisé à la surface du mérozoïte [91]. L'expression de PfAMA1 est maximale au stade schizonte mature. L'ectodomaine exposé de PfAMA1 contient 16 résidus de cystéines qui sont conservés dans toutes les séquences connues d'AMA1. La protéine se subdivise en trois domaines (DI, DII, DIII) sur la base des ponts disulfures

[92] et de sa structure cristalline. La protéine AMA1 de *Plasmodium falciparum* présente de nombreux polymorphismes dans ses trois domaines [93].

Des études récentes de knock-down [94] et de knock-out [95] sur AMA1 chez *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium berghei* ont révélé qu'AMA1 jouerait un rôle essentiel dans le processus d'invasion. Cependant, AMA1 de *Plasmodium falciparum* ne peut être supprimé par knockout [96, 97] par contre des études de knockdown et autres sur des tests d'inhibition de l'invasion chez PfAMA1 suggèrent fortement que PfAMA1 serait essentielle dans le processus d'invasion. Étant donné que cette protéine est impliquée dans l'invasion des érythrocytes, il serait donc pertinent d'étudier le rôle du gène codant pour celle-ci dans la virulence du parasite.

D. Autres marqueurs

D'autres marqueurs tels que ; PfEMP1, MSP3, Eba 175 pourraient jouer un rôle important dans la virulence et le polymorphisme de *Plasmodium spp.*

***Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1)** est une des protéines majoritaires des VSA, considérée comme le facteur de virulence majeur de *Plasmodium falciparum*, insérée dans les protubérances des knobs (modification de la surface du globule rouge à l'origine de protubérances de 100µm après invasion) à la surface du globule rouge parasité [98, 99]. Cette famille de polypeptides présente un intérêt majeur dans la physiopathologie de l'accès grave puisqu'elle est directement impliquée dans les phénomènes de séquestration parasitaire par interaction avec des récepteurs de l'hôte à la surface des cellules endothéliales [100].

PfEMP1 est un polypeptide parasitaire de haut poids moléculaire (200 à 400 kDa), sensible à la digestion trypsique, qui est inséré dans la membrane du globule rouge parasité. Sa structure typique est composée de 4 parties distinctes: un segment N terminal extracellulaire variable (NTS), une région de domaines protéiques variables qui interagit avec les récepteurs cellulaires, un domaine transmembranaire (TM) et un segment C terminal intracellulaire conservé (ATS) qui interagit avec la protéine KAHRP intra cytoplasmique [100]

La région variable de PfEMP1 est composée d'une succession de domaines Duffy Binding-Like (DBL) entre lesquels sont intercalés des domaines Cysteine-Rich Interdomain Regions (CIDR) et d'un domaine C2.

***MSP-3** (Merozoïte Surface Protein-3)* : la MSP3 est une protéine de 48KDa exprimée chez le schizonte mature. Elle est localisée au niveau de la vacuole parasitophore et à la surface du mérozoïte. Sa fonction n'est pas connue. La portion N-terminale est polymorphique et contient une répétition d'heptades, indiquant une structure en spirale. La portion C- terminale est acide, riche en leucine et se présente sous forme de dimères. La MSP3 a été identifiée suite aux études de l'immunité

naturellement acquise par le transfert d'IgG. Ces IgG agissent par l'intermédiaire de monocytes, réalisant le mécanisme de l'ADCI (Antibody Dependent Cell Immunity). La recherche de la cible de l'ADCI a permis d'identifier une protéine bien conservée, la MSP3[101].

EBA175 est une protéine de *P. falciparum* de 175 kDa, située dans le micronème à l'extrémité apicale des mérozoïtes, qui se lie aux résidus d'acide sialique sur la glycophorine A pour négocier l'entrée dans l'érythrocyte [102]. Le domaine de liaison aux récepteurs de l'EBA175 a été localisé à l'extrémité N-terminale, un domaine riche en cystéine, la région RII ; hautement conservée elle serait un candidat vaccinal [103-105]. Elle se compose de deux régions : F1 et F2, riches en cystéine. F1 et F2 sont homologues à la protéine de liaison Duffy de *P. vivax* et sont donc appelés les domaines Duffy binding-like (DBL) [106]. Les domaines DBL (F1 et F2) sont propres aux *Plasmodium* et constituent donc une bonne cible thérapeutique [107]. La région F2 est plus particulièrement concernée par la liaison aux récepteurs glycophorine A [103]. La présence d'un ou deux domaines DBL dans la région C-terminale riche en cystéine (régionVI) et un domaine transmembranaire-like de type I définissent EBA-175 en tant que membre de la super famille EBL (erythrocyte binding-like) [106].

PARTIE 2 : Paludisme au Gabon

I. Epidémiologie

Le Gabon est un pays d'Afrique Centrale situé en zone équatoriale, sa population est estimée à 2119000 habitants, il est limité à l'ouest par l'Océan Atlantique, à l'est, au sud-est et au sud par la République du Congo, au nord-ouest par la Guinée équatoriale et au nord par le Cameroun.



Figure 8: Carte du Gabon (source : http://www.afrique-planete.com/images/carte/carte_gabon.gif)

Le climat chaud et humide du Gabon est favorable au développement de l'anophèle. C'est une zone où la transmission est encore hyper-endémique [108]. En effet le rapport OMS, 2020 estime à 797 278, le nombre de cas de paludisme pour tout âge recensé au Gabon en 2019 et à 591 le nombre de décès liés au paludisme au Gabon [1]. *P. falciparum* est l'espèce parasitaire prédominante au Gabon, suivie de *Plasmodium malariae [15]*. Les mesures de lutte contre le paludisme mises en place depuis ces dernières années par le programme national de lutte contre le paludisme (PNLP) ont entrainé une baisse du paludisme et un recul de l'âge moyen chez l'enfant fébrile en milieu urbain [109]. A Franceville chef-lieu de province du Haut- Ogooué (zone urbaine) la prévalence de l'infection plasmodiale a été estimée à 21,2% [11] en ne ciblant que des patients symptomatiques. A Lastoursville, zone rurale, la prévalence de l'infection plasmodiale a été estimée à 77,3% chez les enfants fébriles [110]. Une étude rétrospective réalisée à Makokou, zone semi-urbaine située dans la province de l'Ogooué-Ivindo, montre que la prévalence du paludisme chez les enfants fébriles consultant en pédiatrie était haute contrairement à ce que l'on observe en milieu urbain [111].

Cependant, l'infection plasmodiale chez les enfants asymptomatiques au Gabon reste très faible en milieu urbain avec des prévalences de moins de 10%. En milieu rural, la prévalence de l'infection à *Plasmodium falciparum* demeure élevée [15].

II. Marqueurs de virulence au Gabon

Le lien entre la virulence de *Plasmodium* et les marqueurs de virulence étudiés au Gabon n'est pas clairement établi. Cependant, des études sur le polymorphisme génétique de *P. falciparum* ont permis de décrire la diversité génétique de ce parasite dans différentes régions au Gabon, aussi bien chez les patients présentant un paludisme simple à sévère que chez les enfants asymptomatiques [71, 112, 113].

Ces études basées sur l'amplification des gènes *msp-1* et *msp-2* avaient pour objectif de caractériser le profil génétique des isolats de *Plasmodium* dans le but ultime d'une possible élimination du paludisme. L'étude de *msp-1* montre une grande diversité allélique de ce gène, qui serait compatible avec le niveau élevé de transmission du paludisme au niveau de Libreville [71]. Cette diversité génétique de *P. falciparum* est très variable d'une région à une autre, car à Franceville, une faible diversité a été décrite en comparaison avec Libreville [71, 113]. De plus une prédominance de l'allèle K1 a été signalée au niveau du Gabon [112, 113]. Certaines études montrent que RO33 était faiblement polymorphe au niveau du Gabon, mais une étude menée par William et al décrit10 allèles différents de RO33 [71, 112, 114]. Certains auteurs ont suggéré que la diversité allélique de Mad20 augmenterait avec la sévérité de la maladie [71]. Quant à la diversité allélique de *msp-2*, la famille allélique prédominante est la 3D7 [112].

Plusieurs études ont également montré que les infections multi clonales pouvaient varier en fonction de l'état clinique de l'individu (symptomatique ou asymptomatique) [71, 115]. Cependant, ces études ont été pour la plupart réalisées sur *P. falciparum* en utilisant comme outils la PCR et les analyses immunologiques. D'où la nécessité de réaliser une étude prenant en compte les espèces plasmodiales prédominantes chez les patients symptomatiques et asymptomatiques, en milieu urbain et rurale ; tout en séquençant les différents gènes impliqués dans l'invasion des globules rouges par *Plasmodium spp.* Une telle approche pourrait aider à mieux expliquer la variation génétique présente chez les différentes souches de *Plasmodium* au Gabon, plus précisément dans le Sud-Est, et aussi à établir un lien entre la virulence et la souche ou l'espèce plasmodiale en cause.

PARTIE 3 : Objectifs

I. Objectif général

L'objectif principal de cette étude était de déterminer l'espèce ou la lignée plasmodiale la plus apte à induire la symptomatologie palustre en fonction du contexte socio-économique dans le sud-est et le Nord-Est du Gabon.

II. Objectifs spécifiques

Les objectifs secondaires de ce travail étaient les suivants :

- Déterminer la prévalence en infection plasmodiale microscopique chez les asymptomatiques et les symptomatiques entre les différents sites : urbain, semi urbain et rural;
- Déterminer la prévalence des différentes espèces plasmodiales en diagnostic moléculaire chez les asymptomatiques et les symptomatiques entre les différents sites
- Déterminer la prévalence des coinfections plasmodiales chez les asymptomatiques et les symptomatiques entre les différents sites
- Comparer les facteurs de virulence *msp (1et 2)* et AMA1 des différentes espèces plasmodiales en fonction de la symptomatologie et de la localité.
- Etudier la diversité génétique et la différenciation génétiques des populations parasitaires en fonction des localités et du statut clinique

PARTIE 4 : Matériel et Méthodes

I. Caractéristiques de l'étude

A. Type, sites et période de l'étude

Il s'agit d'une étude épidémiologique transversale descriptive dont la période d'étude s'est étendue du 01 octobre 2016 au 25 juillet 2021

Les prélèvements sanguins pour les patients symptomatiques ont été réalisés sur des enfants reçus en consultation dans les centres de santé de 3 localités situées au Sud-est du Gabon : Franceville (HASG) représentant la zone urbaine, Makokou (Centre hospitalier régional Omar Bongo Ondimba de Makokou) pour la zone semi-urbaine, Lastoursville (Centre Médical) pour la zone rurale. Quant aux enfants asymptomatiques, leurs prélèvements ont été réalisés dans les écoles d'Ombélé pour Franceville, Notre Dame De Victoire A pour Makokou et au sein des différents villages inclus dans l'étude (Lastoursville).

Le diagnostic microscopique et immunochromatographique (TDR) de l'infection plasmodiale a été réalisé sur les sites de récoltes d'échantillons tandis que les analyses moléculaires ont été réalisées au Centre Interdisciplinaire de Recherches Médicales de Franceville. La carte ci-dessous présente la localisation des différents sites de récolte des échantillons.

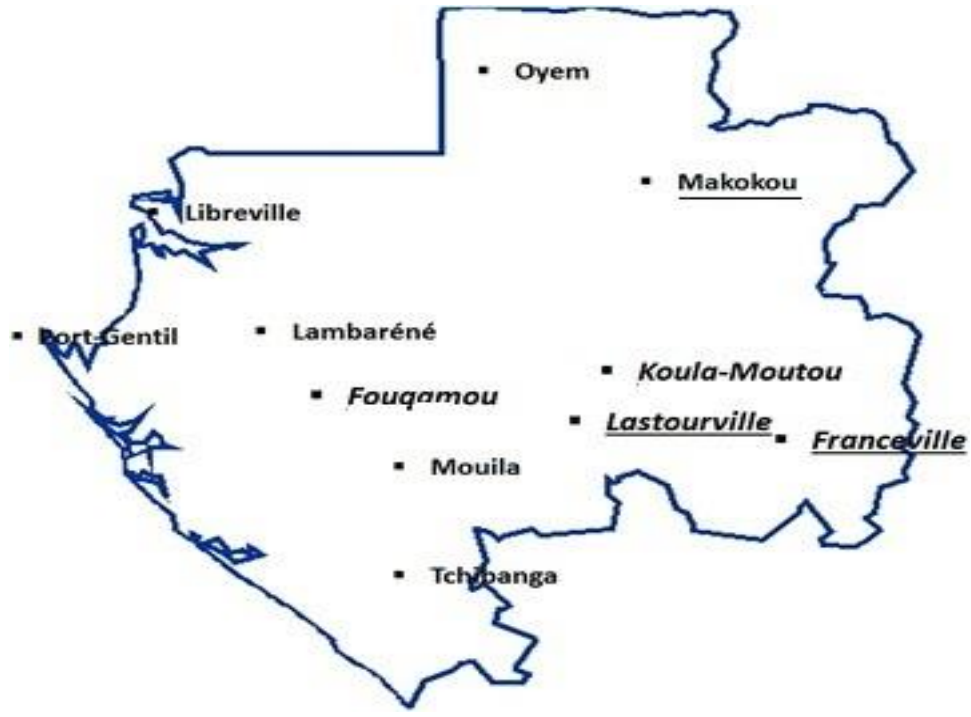


Figure 9: Différents sites de récolte des échantillons

B. Population concernée par l'étude

Les sujets inclus dans cette étude étaient des enfants âgés de 6 mois à 15 ans, présentant un syndrome fébrile ou non, recrutés dans les sites mentionnés ci-dessus.

C. Critères d'inclusion et de non inclusion

L'étude a porté sur des patients développant des symptômes liés au paludisme, ainsi que des enfants asymptomatiques. Pour les patients fébriles, les critères d'inclusion étaient les suivants :

- Consulter au service de pédiatrie externe pendant la période de l'étude ;
- Avoir une température corporelle supérieure ou égale à 37,5°C ou une histoire de fièvre durant les 24 heures précédents ;
- Être âgé de 6 à 180 mois ;
- Avoir un test diagnostique rapide (TDR) positif, et présenter au moins un critère spécifique au paludisme selon les recommandations de l'OMS (notamment la fièvre).

Pour les asymptomatiques, les individus ne devaient présenter aucun signe de fièvre durant les 7 jours précédant le prélèvement. Pour les mineurs le consentement éclairé a été signé par un tuteur. Les enfants dont les tuteurs n'ont pas donné leur consentement n'ont pas été inclus dans l'étude.

II. Analyses biologiques

A. Diagnostic de l'infection

a. Prélèvements sanguins

Le prélèvement sanguin a été réalisé au pli du coude dans un tube contenant de l'EDTA ou par piqure franche au bout du doigt (pulpe du doigt). Après réalisation des différents tests de diagnostics du paludisme, les prélèvements ont été séparés par centrifugation à 1500 tours/ minutes afin d'obtenir le culot globulaire et le plasma. Les culots globulaires ont été transférés dans des tubes Eppendorff puis conservés à -20°C, pour l'extraction de d'ADN. Les plasmas quant à eux ont été transférés dans des cryotubes, puis conservés à -80°C pour des analyses bactériologiques et immunologiques ultérieures.

Le diagnostic du paludisme a été réalisé par la technique de la Goutte épaisse, le test de diagnostic rapide du paludisme (TDR, kit optimal-It), et par analyse moléculaire des différentes espèces plasmodiales.

b. Immunochromatographie : TDR

Le test de diagnostic rapide du paludisme (TDR), est un test immuno-chromatographique qui utilise des anticorps monoclonaux dirigés contre la lactate déshydrogénase spécifique à *P. falciparum* (pfLDH) et une LDH commune aux espèces de *Plasmodium* (pan-LDH) [116, 117]. Ce test contient un dispositif prêt à l'emploi, constitué d'une cassette (contenant deux puits, puits lavage et puis conjugué) et d'une bandelette. La réalisation de celui-ci consiste à mettre une goutte de tampon dans le premier puits (puits conjugué), 4 gouttes dans le deuxième puits (puits lavage), qu'on laisse reposer 1 minute. Le sang (10 µl) du tube de prélèvement est ensuite prélevé à l'aide de la pipette et est déposé dans le premier puits, après homogénéisation, le produit a été laissé au repos pendant 1 minute, puis, le support de la bandelette a été retiré et l'extrémité de la bandelette été mise dans le puits conjugué. Après 10 minutes d'incubation, la bandelette a ensuite été transférée dans le puits-lavage, et a été à nouveau incubée pendant 10 minutes. Une fois le lavage terminé, la bandelette est mise dans la pièce plastique transparente pour effectuer la lecture. Le test est validé lorsque la bande contrôle apparait et l'interprétation est fonction du nombre de bande qui apparait sur la bandelette (voir Figure 10).

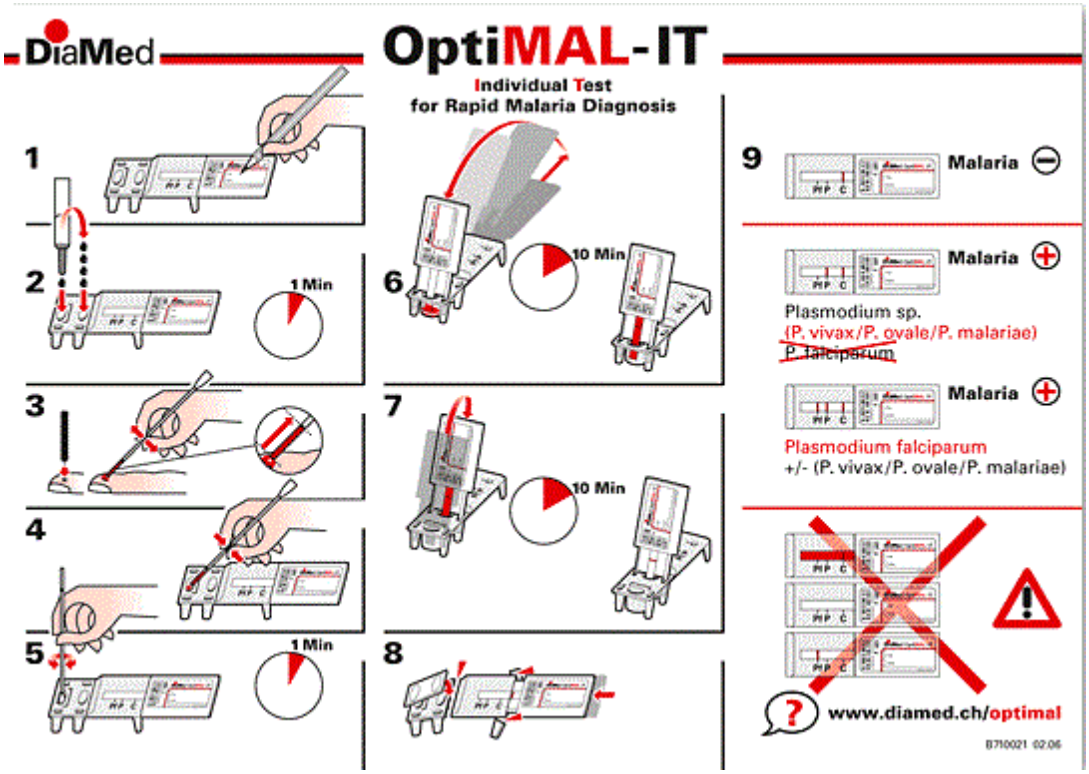


Figure 10: Représentation schématique de la réalisation d'un TDR (kit-OPTIMAL-IT).

(1) -identification de bandelette, (2) - remplissage des puits avec le tampon de lyse, (3) -prélèvement sanguin à la pulpe du doigt, (4) - dépôt du sang dans le tampon, (5) -homogénéisation et lyse, (6) - migration chromatographique (10 minutes) (7) - lavage 10 minutes, (8) mise de la bandelette dans la pièce plastique, (9) - interprétation des résultats.

c. Microscopie : goutte épaisse

La goutte épaisse permet la mise en évidence des parasites dans le sang mais aussi leur quantification. Elle a été réalisée selon la méthode de Lambaréné [118] qui consiste à étaler sur une lame porte-objet propre et dégraissée 10µl de sang sur une surface de 18×10 mm. Après étalement, la lame est séchée puis colorée pendant 25 minutes au Giemsa à 20%. La lame est ensuite lue au microscope optique à l'objectif ×100 en utilisant de l'huile à immersion. La parasitémie a été déterminée en nombre de formes asexuées de *Plasmodium* et calculée en utilisant la formule suivante : Parasitémie = X × 500 parasites / µl de sang.

X= moyenne de parasites obtenus à partir de 10 champs microscopiques, 500 = facteur correcteur (varie en fonction du microscope).

d. ANALYSES MOLECULAIRES

➢ Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN par le kit Blood DNA E.Z.N.A® est basée sur la chromatographie d'affinité, elle consiste à mélanger, 250µL du culot globulaire, 25µL d'OB protéase (20mg/ml), 250µL de tampon de lyse (BL) dans un tube Eppendorff. Le mélange est incubé à 65°C pendant 10 minutes au minimum (on homogénéise toutes les 3 minutes). A la fin de l'incubation, 260µL d'éthanol absolu sont ajoutés, puis le mélange est homogénéisé. Une colonne d'extraction est ensuite équilibrée avec 100µL de tampon d'équilibration pendant 4 minutes à température ambiante et centrifugée brièvement pendant 20 secondes. Le lysat est transféré dans la colonne puis centrifugé pendant une minute à 10000g. La colonne est transférée dans un nouveau tube collecteur et 500µL de tampon HB sont ajoutés puis centrifugée pendant 1 minute à 10000g. Après centrifugation, la colonne est à nouveau transférée sur un tube collecteur et lavée deux fois avec 700µL de DNA Wash buffer reconstitué avec de l'éthanol à 70%. Elle est ensuite centrifugée pendant une minute à 10000g, puis séchée par centrifugation pendant 2 minutes à 13000g. La colonne est ensuite placée dans un tube Eppendorff stérile de 1,5ml. Pour l'élution de l'ADN, 90µL d'eau distillé préchauffée à 65°C, ont été déposé sur la colonne, que l'on laisse reposer 5 minutes à température ambiante. La colonne est ensuite centrifugée pendant une minute à10000g, pour l'élution de l'ADN, l'élution est répétée une seconde fois. L'ADN recueilli dans le tube Eppendorff est conservé à -20°C.

➢ Amplification pour le diagnostic moléculaire d'espèces

C'est une technique de réplication *in vitro* qui permet à l'aide d'amorces spécifiques d'amplifier un fragment d'ADN extrait. Pour le diagnostic moléculaire, nous avons utilisé la méthode

de Snounou [119, 120]. Les différentes étapes de la PCR, ainsi que les différents couples d'amorces sont consignées dans les tableaux 2 et 3 ci-dessous **:**

Tableau 2: Séquences des amorces utilisées pour le diagnostic moléculaires et tailles des bandes attendues.

Espèces	Amorces	Séquences des amorces (5'-3')	Tailles attendues (pb)
Plasmodium spp.	rPLU5	CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC	1100
	rPLU6	TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG	
P. falciparum	rFAL1	TTAAACTGGTTTGGGAAAACC AAATATATT	205
	rFAL2	ACACAATGAACTCAATCATGA CTACCCGTC	
P. vivax	rVIV1	CGCTTCTAGCTTAATCCACAT AACTGATAC	120
	rVIV2	ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGA AAGTCCTTA	
P. ovale	rOVA1	ATCTCTTTTGCTATTTTTTAG TATTGGAGA	800
	rOVA	GGAAAAGGACACATTAATTGT ATCCTAGTG	
P. malariae	rMAL1	ATAACATAGTTGTACGTTAAG AATAACCGC	144
	rMAL2	AAAATTCCCATGCATAAAAAA TTATACAAA	

Tableau 3: Programmes PCR utilisés

Réaction	Conditions de PCR
PCR1 (*P. falciparum*, *P. vivax*, et *P. malariae*)	Dénaturation : 95°C pendant 5minutes, et 94°C pendant1 min, hybridation à 60°C pendant 2 min, et extension à 72°C pendant 2 min (30 cycles)
PCR1 (*P. ovale*)	Dénaturation : 95°C pendant 5minutes et 94°C pendant 30 s, hybridation à 45°C pendant 30 s, et extension à 72°C pendant 1 min 30 s (30 cycles)
Nested -PCR (*P. falciparum*, *P. vivax*, et *P. malariae*)	Dénaturation : 95°C pendant 5minutes et 94°C pendant 1 min, hybridation à 55°C pendant 2 min, et extension à 72°C pendant 2 min (30 cycles)
Nested- PCR (*P. ovale*)	Dénaturation : 95°C pendant 5minutes et 94°C pendant 30 s, hybridation à 45°C pendant 30 s, et extension à 72°C pendant 1 min 30 s (45 cycles)

Le milieu réactionnel contient : 0,024U de Taq polymérase, du tampon 10X (composition en annexe), 1,5mM de Mgcl2, 0,2mM de dNTPs 0,8mM d'amorce direct et 0,8mM d'amorce reverse. Cinq microlitres (5µL) d'ADN extrait ont été rajouté au milieu réactionnel pour la PCR1. Pour la deuxième PCR, le même milieu réactionnel est utilisé, mais l'on rajoute 2µl d'amplicons de la première PCR. La réaction est effectuée dans un thermocycler Bio Rad® (Mercure de coanette, France). Les fragments d'ADN amplifiés sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

- **Electrophorèse**

C'est une méthode qui permet de séparer différents fragments d'ADN en fonction de leurs poids moléculaires. Du gel d'agarose à 2 % a été préparé dans un volume de 100mL de TAE 1X (voir annexe) puis chauffé dans un four à micro-onde, pendant 5 minutes. Le GelRed (15µL) y est ajouté comme colorant nucléaire. Ce mélange est mis dans la cuve à électrophorèse avec un peigne et laissé à polymériser environ 20 minutes à température ambiante. Après polymérisation le gel est déposé dans l'appareil à électrophorèse, les échantillons y sont ensuite déposés en présence de bleu de charge et la migration se fait dans du tampon TAE 1X pendant 45 minutes à 100V. La révélation est faite sur une table à UV (560nM)

B. Amplification et séquençage des gènes de virulence

Les régions polymorphiques répétitives du bloc 2 du *Merozoïte surface protein-1* (*msp-1*), du bloc 3 de *Merozoïte surface protein-2 (msp-2),* ainsi que le gène *AMA1* ont été amplifiées par PCR pour étudier les traits de virulence chez *P. falciparum,* en utilisant les protocoles définis par différents auteurs [121-124]. Le fragment 2 du gène *Msp1* identifié comme étant le plus polymorphe, ainsi que le gène *AMA1* ont également été amplifié par PCR pour étudier la virulence chez *Plasmodium malariae*, en utilisant les protocoles décrits par Lilian et collaborateurs, et Suttipat et collaborateurs [125, 126]. Pour toutes ces analyses, une première PCR a été réalisée, suivie d'une Nested PCR, en utilisant des amorces spécifiques pour chaque famille allélique. Les amorces utilisées ainsi que les différents programmes de PCR sont consignés dans le tableau 4.

Les produits PCR obtenus après amplification ont été séquencés par la technique de Sanger [127] après purification sur gel des bandes. La méthode de Sanger permet de déterminer l'ordre des quatre nucléotides dans un brin d'ADN.

Tableau 4: Séquences des amorces et conditions de PCR pour l'amplification des gènes de virulence.

	Amorces (5'-3')	Conditions de PCR
PCR1	*Pf.msp2* *TGAAGGTAATTAAAACATTGTCTATTAT (F)* *ATATGGCAAAAGATAAAACAAGTGTTGCTG (R)*	D (95° for 5min, 94°C for1mi), A (62°C for 1min 30s), Ex (72°C for 2min), FEX (58°C for 10 min), 30 cycles
PCR2	FC27 *AATACTAAGAGTGTAGGTGCARATGCTCCA(F)* *TTTTATTTGGTGCATTGCCAGAACTTGAAC (R)*	D (95° for 5min, 94°C for1mi), A (57°C for 1min 30s), Ex (72°C for 2min), FEX (68°C for 10 min), 30 cycles
	3D7/IC *GCAGAAAGTAAGCCTTCTACTGGTGCT(F)* *GATTGTAATTCGGGGGATTCAGTTTGTTCG(R)*	D (95° for 5min, 94°C for1mi), A (57°C for 1min 30s), Ex (72°C for 2min), FEX (68°C for 10 min), 30 cycles
PCR1	*Pmmsp1* *CCATACTATTTAATTGCACTAAAG (F)* *ACACACATAAGCAGTTTTCAAAAAG (R)*	D (94°C for 6 min), A (58°C for 2 min), Ex (72°C for 2 min), FEX (72°C for 5 min), 30 cycles
PCR2	*AGGGAAATTGATAAATTAAATATTTC (F)* *-CTTTTCAAGATATTGCAATTTGGA (R)*	D (94°C for 6 min), A (58°Cfor 2 min), Ex (72°C for 2 min), FEX (72°C for 5 min), 25cycles
PCR1	*Pfama1* CCGGATCCCCTTTGAGTTTACATATATG*(F)* AAATTCTTTCTAGGGCAAAC*(R)*	D (95° for 2min30s), A (51°C for 30s), Ex (68°C for 45s), FEX (68°C for 5min), 30 cycles
PCR2	*Pfama1* GGAACTCAATATAGACTTCC *(F)* AAATTCTTTCTAGGGCAAAC*(R)*	D (95° for 2min30s), A (51°C for 30s), Ex (68°C for 5min), FEX (68°C for 5min), 35 cycles
PCR1	*Pfmsp1* CTAGAAGCTTTAGAAGATGCAGTATTG *(F)* **C**TTAAATAGTATTCTAATTCAAGTGGATCA*(R)*	D (95° for 5min, 94°C for 1min), A (57°C for 1min 30s), Ex (72°C for 2min), FEX (68°C for 10 min), 30 cycles
PCR2	*K1* **G**CTTGCATCAGCTGGAGGGCTTGCACCAGA(F) **A**AATGAAGAAGAAATTACTACAAAAGGTGC(R)	D (95° for 5 min, 94°C for 1 min), A (62°C for 1min 30s), Ex (72°C for 2 min), FEX (68°C for 10 min), 30 cycles
	RO33 TAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGTTG*(F)* **CAAGTAATTTTGAACTCTATGTTTTAAATCAGCGTA***(R)*	D (95° for 5min, 94°C for1 min), A (62°Cfor 1min 30s), Ex (72°C for 2 min), FEX (68°C for 10min), 30 cycles
	Mad20 AAATGAAGGAACAAGTGGAACAGCTGTTAC*(F)* ATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATTACC*(R)*	D (95° for 5min, 94°C for 1min), A (68°C for 1min 30s), Ex (72°C for 2 min), FEX (68°C for 10 min), 30 cycles
PCR1	*Pmama1* TTACTTTTGAGCACTCAATATT (F) TCCATCAAAACGGGGGTAG (R)	D (95° for 2min30s), A (56°C for 30s), Ex (72°C for 1 min), FEX (72°C for 5 min), 35 cycles
PCR2	*Pmama1* TGCTCTTATTAAAATTAGCATTA(F) TGTGAAGAAATTCCATCTGTTA(R)	D (95° for 2min30s), A (56°C for 30s), Ex (72°C for 1 min), FEX (72°C for 5 min), 35 cycles

C. Numération formule sanguine

L'hémogramme ou Numération formule sanguine (NFS) est un examen sanguin qui permet une évaluation quantitative et qualitative des éléments figurés du sang (érythrocytes, leucocytes, thrombocytes). La NFS a été réalisée en utilisant un automate hématologique de marque COBAS ABX (ROCHE), qui détermine le nombre de globules rouges, de globules blancs, de plaquettes, l'hématocrite, le taux d'hémoglobine, ainsi que la formule leucocytaire. Sont également inclus le calcul du VGM (volume globulaire moyen) et du CCMH (concentration corpusculaire moyenne des hématies).

D. Analyses de données

Les données ont été analysées à l'aide des logiciels SPSS 2017 et R version RX64 3.5.0. Les statistiques descriptives usuelles : proportions, moyennes et écart-type ont été utilisées dans les tableaux de présentation des résultats. Le test χ^2, l'analyse de variance (Anova) pour les variables ayant une distribution normale ont été appliqués et les tests de Mann-Whitney et K-Wallis ont été utilisés pour les comparaisons non paramétriques. Pour les variables ayant un nombre inférieur à 5, le test exact de Fischer a été appliqué. La normalité des variables dépendantes a été vérifiée par méthodes graphiques (graph box, histogramme). La valeur de *P* value a été considérée pour significative lorsque $P < 0,05$.

Les isolats présentant plus d'un allèle ont été considérés comme multiclonaux. La multiplicité d'infection (MOI) a été calculée en divisant le nombre total d'allèles détectés pour chaque gène par le nombre total d'échantillons pour lesquels il y a eu amplification pour chacun des gènes. Et la MOI moyenne a été calculée en divisant le nombre d'isolat présentant plus d'un allèle pour les deux gènes par le nombre d'isolat positifs aux deux gènes.

La diversité génétique a été évaluée en calculant l'indice de diversité exprimé par l'hétérozygotie attendue non biaisée de Nei (He) à partir de donnée haploïdes comme suit : He= : $H_e = [n/(n-1)]\ [(1 - pi)]$ (où, n= nombre d'isolats échantillonnés, pi= la fréquence des allèles). La différenciation génétique de la population parasitaire a été évaluée avec le F statistique de Wright. Le paramètres de génétiques des populations ont été analysés avec les logiciels FSTAT v2.9.4 [128] et Genetix v.4.02 [129]

Pour l'analyse des séquences, toutes les séquences ont été traitée avec le logiciel Bioedit, puis un blastn a été réalisé afin de déterminer des séquences homologues existants dans Genbank. Un

alignement multiple (MSA), en utilisant la méthode par clustalW a été réalisé avec le logiciel MEGA.X [130]. Une matrice d'identité a été générée, puis les séquences aligées ont été importés dans le logiciel phyloviz version oneline afin d'inférer des minimum spanning tree.

PARTIE 5 : Résultats

I. Caractéristiques démographiques, hématologiques et prévalence de l'infection palustre dans la population générale

A. Description de la population d'étude, des paramètres démographiques et hématologiques

Au total 2381 enfants ont été inclus dans cette étude. La répartition par localité était la suivante : 880 à Franceville (milieu urbain), 625 à Makokou (milieu semi-urbain), 876 à Lastoursville (milieu rural). L'âge moyen des enfants non infectés (67 ± 1,32 mois) était significativement supérieur à celui des enfants infectés (60 ± 1,51 mois), $P = 0{,}00005$. En revanche aucune différence significative de sexe ratio n'a été observée entre les enfants infectés et non infectés inclus dans l'étude. Le taux moyen des globules blancs était significativement plus élevé chez les enfants infectés (9,31 ± 0,21 $10^3/mm^3$) par comparaison aux enfants non infectés (8,48 ± 0,18 $10^3/mm^3$), $P = 0{,}00005$. Les autres paramètres hématologiques étaient significativement plus faibles chez les enfants infectés (globules rouges : 3,46 ± 0,03 $10^6/mm^3$; hémoglobine : 7,9 ± 0,08 g/dL ; plaquettes : 218,83 ±7 $10^3/mm^3$) comparé aux enfants non infectés (globules rouges : 4,16 ± 0,02 $10^6/mm^3$; hémoglobine : 9,6 ± 0,1 g/dL ; plaquettes : 301,01 ± 4,59 $10^3/mm^3$), $P = 0{,}003$; et <0,0001 respectivement (Tableau 5).

Tableau 5: Paramètres démographiques et hématologiques des enfants inclus dans le Sud-Est du Gabon.

Paramètres	Infectés (n=751)	Non Infectés (n=1155)	*P*
Age (Mois)	60±1,51	67±1,32	0,00005
Sexe ratio	0,9	1	0,9
Globules Rouges ($10^6/mm^3$)	3,46±0,03	4,16±0,02	0,003
Globules blancs ($10^3/mm^3$)	9,31±0,21	8,48±0,18	<0,0001
Hémoglobine (g/dL)	7,9±0,08	9,6±0,1	<0,0001
Plaquettes ($10^3/mm^3$)	218,83±7	301,01±4,59	<0,0001

B. Prévalence de l'infection palustre et identification des espèces plasmodiales

Parmi les enfants inclus, 952 étaient infectés par *Plasmodium spp*, soit une prévalence globale de l'infection plasmodiale de 40% dans le Sud-Est et le Nord-Est du Gabon avec une charge parasitaire moyenne de 24120 ± 2099 parasites / µL de sang. Des 952 échantillons infectés 782 échantillons ont fait l'objet d'un diagnostic moléculaire d'espèces par PCR. Parmi les espèces diagnostiquées, *Plasmodium falciparum* était responsable de 651 infections soit une prévalence de 91,4%. *Plasmodium malariae* quant à lui était à l'origine de 20 infections, soit une prévalence de 2,8%. Des coinfections ont également été observées entre *P. falciparum* et *P. malariae (*6,1%, n = 48) ; *P. malariae*, *P. falciparum* et *P. ovale* (0,1%, n = 1). *Plasmodium ovale* n'a pas été identifié en mono infection.

II. Caractéristiques démographiques, hématologiques et prévalences de l'infection plasmodiale en fonction de la symptomatologie et des localités

A. Caractéristiques démographiques et hématologiques par localités

A Franceville (milieu urbain), parmi les 880 enfants inclus, 143 étaient asymptomatiques et 737 étaient symptomatiques. L'âge moyen était de 75,18 ± 3,6 mois chez les enfants infectés symptomatiques et de 107,5 ± 5,1 mois chez les asymptomatiques, avec une différence statistiquement significative (*P* = 0,001). Aucune du sexe ratio (symptomatique : SR= 1,2, asymptomatiques : SR= 1) n'a été observée entre les enfants infectés symptomatiques et asymptomatiques (*P* > 0,05). L'ensemble des paramètres hématologiques n'a montré aucune différence significative entre les deux groupes (P > 0,05) (Tableau 6).

A Makokou (milieu semi-urbain), l'analyse des paramètres démographiques révèle une moyenne d'âge élevée chez les enfants infectés asymptomatiques (113 ± 8 mois) par rapport aux enfants infectés symptomatiques (44 ± 2 mois ; *P* < 0,0001). Par contre aucune différence significative du sexe ratio (symptomatiques = 1, asymptomatiques = 1,5, *P* = 0,3) n'a été observée entre les deux groupes cliniques.

Le taux moyen des plaquettes était significativement plus élevé chez les enfants infectés asymptomatiques (303 ± 18,6 10^3/mm^3) par rapport aux enfants infectés symptomatiques (213 ± 7

10^3/mm^3, $P < 0,05$). Le taux moyen des globules rouges (symptomatiques=3,34 ± 0,06 10^6/mm^3, asymptomatiques=4,4 ± 0,2 10^6/mm^3 ; P =0,00004) et d'hémoglobine était significativement plus bas chez les symptomatiques que chez les asymptomatiques. Par contre les taux moyens des globules blancs était significativement plus élevé dans les isolats symptomatiques (10,7 ± 0,4 10^3/mm^{3}comparés aux asymptomatiques (8,05 ± 0,6 10^3/mm^3 (*P =0,004*). (Tableau 6)

A Lastoursville (milieu rural), 876 enfants ont été inclus, la moyenne d'âge des enfants infectés asymptomatiques était plus élevée (59 ± 2 mois) par rapport à celle des enfants infectés symptomatiques (34,01 ± 2 mois) (P = 0,03). Par ailleurs aucune différence significative au niveau du sexe ratio n'a été observée entre les infectés symptomatiques et les asymptomatiques (P = 0,3). (Tableau 6)

Tableau 6: Comparaison des paramètres démographiques et Hématologiques entre les enfants symptomatiques et asymptomatiques par localité.

Paramètres	LOCALITES								
	FCV (n=190)			LTV (n=449)			MKK (n=316)		
	Asympto (n=23)	Sympto (n=167)	*P*	Asympto (n=201)	Sympto (n=248)	*P**	Asympto (n=22)	Sympto (n=294)	*P***
Age (Mois ±ES)	107,5±5,1	75,18±3,6	0,001	59±2	34,01±2	0,03	113±8	44±2	0,0001
Parasitémie (Parasite/µL de sang ±ES)	4363,86±1494	6690,94±815,83	0,3	9190±2128	NA	NA	16963±8218	43944±4259	0,006
GR (10^6/mm^3 ±ES)	4,2±0,1	3,99±0,05	0,1	NA	3,1±0,07	NA	4,4±0,2	3,34±0,06	0,00002
GB (10^3/mm^3 ±ES)	6,6±0,4	6,3±0,3	0,3	NA	9,8±0 ,4	NA	8,05±0,6	10,7±0,4	0,004
Hb (g/dl ±ES)	9,3±0,2	9,74±0,3	0,3	NA	7,2±0,1	NA	10,2±0,4	7,4±0,12	0,00003
Plaquette (10^3/mm^3 ±ES)	234±10	290±16	0,3	NA	168,1±9,4	NA	303±18,6	213±7	0,0002
Sexe Ratio	1	1,2	0,6	0,7	1	0,03	1,5	1	0,3

Sympto=symptomatiques, Asympto=Asymptomatiques, *P=P. valu*e Sympto/Asympto FCV, *P*=P. valu*e Sympto/Asympto LTV, *P***=P. valu*e Sympto/Asympto MKK

B. Prévalence de l'infection Plasmodiale par localités

Les différentes prévalences de l'infection plasmodiale ont été déterminées dans chaque localité en fonction de la symptomatologie.

A Franceville, la prévalence globale de l'infection plasmodiale était de 21,6% (n =190/880). Bien qu'aucune différence significative de prévalence et de charge parasitaire n'a été observée entre

les deux groupes cliniques, la prévalence de l'infection plasmodiale symptomatique était de 22,7% (n =167/737) et celle de l'infection asymptomatique était de 16,1% (n = 23/143 *P=0,08*) (Figure 12), avec des charges parasitaires moyennes de 6691 ± 816 et 4364 ± 1494 parasites/µl, respectivement (Tableau 6, *P=0,3*).

A Makokou, la prévalence globale de l'infection plasmodiale était de 50,6% (n = 316). Parmi les 625 enfants inclus dans cette localité, 496 étaient symptomatiques et 129 représentaient quant à eux des cas asymptomatiques. La prévalence de l'infection plasmodiale était significativement plus élevée chez les enfants symptomatiques (59,3%, n=294) par rapport aux enfants asymptomatiques dont la prévalence était de 17% (n = 22 ; $P < 0,05$). De même, la charge parasitaire était significativement plus élevée dans les isolats symptomatiques comparés au asymptomatiques (symptomatiques : 43944 ± 4259 parasites/µL, asymptomatiques : 16963 ± 8218 parasites/µL, $P = 0,006$). (tableau7)

A Lastoursville, la prévalence globale de l'infection plasmodiale était de 51,2% (n = 449). De tous les enfants inclus, 401 étaient considérés comme symptomatiques et 475 étaient asymptomatiques. Dans cette localité, la prévalence de l'infection asymptomatique était de 42,3% (n = 201) et celle de l'infection symptomatique était de 61,9% (n = 248). Ces résultats ont montré que la prévalence de l'infection plasmodiale était significativement plus élevée chez les enfants symptomatiques comparés aux asymptomatiques ($P = 0,002$). (Tableau 7)

Tableau 7: Prévalence de l'infection plasmodiale en fonction du site et du statut clinique

Sites d'étude	**Lastoursville**			**Makokou**			**Franceville**		
Statut clinique	**ASYMP (N=475)**	**SYMP (N=401)**	***P****	**ASYMP (N=129)**	**SYMP (N=496)**	***P****	**ASYMP (N=143)**	**SYMP (N=737)**	*P*
Prévalence de l'infection %	42.3% (201)	61.9% (248)	*0.002*	22(17%)	294(59.3%)	<0.05	23(16.1%)	167(22.7%)	>0.05
P. falciparum	151 (75.12%)	119(99.1%)	*0.1*	17(85%)	231(97.3%)	*0.7*	20(86.9%)	133(97.09%)	*0.7*
P. malariae	10(6.02%)	0	*0.01*	3(15%)	3(1.3%)	*0.009*	0	0	
Co-infection (P. falparum/ P. malariae)	40(24.09%)	1(0.8%)	<0.05	0	2(0.8%)	*1*	2(8.7%)	4(2.9%)	*0.2*
Co-infection (P. falciparum/ P. malariae/P. ovale)	0	0		0	0		0	1(4.35%)	*0.1*

Sympto=symptomatiques, Asympto=Asymptomatiques, *P=P. valu*e Sympto/Asympto FCV, *P*=P. valu*e Sympto/Asympto LTV, *P**=P. valu*e Sympto/Asympto MKK

C. Distribution des espèces plasmodiales par localités

Pour déterminer la distribution des espèces plasmodiales à Franceville, 137 échantillons des enfants symptomatiques et 23 asymptomatiques ont été analysés par PCR classique. Parmi les symptomatiques, 97,08% (n = 133) des échantillons étaient mono-infectés par *P. falciparum* et 2,9% (n= 4) des échantillons étaient coinfectés par *P. falciparum et P. malariae*. Chez les asymptomatiques, la prévalence des monoinfections par *P. falciparum* était de 86,9% (n =20) et celle des coinfections était de 8,7% (n = 2 ; *P. falciparum* et *P. malariae*) et 4,34% (n = 1, *P. falciparum*, *P. malariae* et *P. ovale*). Aucune différence significative dans la distribution des espèces plasmodiales entre les symptomatiques et les asymptomatiques n'a été observé ($P > 0,05$) (Tableau7).

La détermination de la prévalence des différentes espèces plasmodiales a également été réalisée à Makokou sur un total de 256 enfants dont 20 étaient asymptomatiques et 236 symptomatiques. La prévalence de *P. falciparum* était de 97,9% (n = 231) chez les symptomatiques et de 85% (n = 17) chez les asymptomatiques. Cette prévalence était significativement plus élevée chez les symptomatiques ($P < 0,05$). Les symptomatiques avaient une prévalence de *P. malariae* significativement moins élevée (1,3% ; n = 3) par comparaison aux asymptomatiques (15% ; n = 3 ; $P < 0,05$). La prévalence des coinfections à *P. falciparum et P. malariae* était de 0,8% (n = 2) chez les symptomatiques. La figure 13 ci-après montre la distribution des différentes espèces en fonction de la symptomatologie à Makokou. (Tableau7).

Le diagnostic moléculaire à Lastoursville, a montré que *P. falciparum* était l'espèce plasmodiale majoritaire dans cette localité avec des prévalences de 99,1% (n = 119) et de 75,12% (n = 151) chez les symptomatiques et asymptomatiques, respectivement. Cette prévalence était significativement plus élevée chez les symptomatiques ($P = 0,002$). Pour ce qui est de *P. malariae* les cas de monoinfections ont été identifié chez les asymptomatiques, avec une prévalence de 6,02% (n = 10), suggérant une prévalence de *Plasmodium malariae* élevée chez les asymptomatiques en milieu rural. Seules des coinfections à *P. falciparum* et *P. malariae* ont été mises en évidence avec une prévalence de 0,8% (n = 1) chez les symptomatiques et de 24% (n= 40) chez les asymptomatiques. Cette prévalence était plus élevée chez les asymptomatiques ($P < 0,05$). (Tableau7).

III. Comparaison des prévalences, paramètres hématologiques et démographiques des enfants infectés chez les symptomatiques entre les 3 localités.

A. Comparaisons entre les 3 localités

La comparaison des paramètres démographiques des enfants infectés symptomatiques entre Makokou, Franceville et Lastoursville a montré que l'âge moyen était plus élevé à Franceville (75,18 ± 3,6 mois) par rapport à Makokou (44 ± 2 mois) et Lastoursville (34,01 ± 2 mois) ($P < 0,05$). Il n'y avait pas de différence significative au niveau du sexe ratio entre les trois localités (FCV = 1,3, MKK = 1, LTV = 1,2, $P = 0,7$). Pour ce qui est des paramètres hématologiques, le taux moyen des globules rouges (FCV = 3,99 ± 0,05$10^6$/mm^3, MKK = 3,34 ± 0,06 10^6/mm^3, LTV = 3,1 ± 0,07 10^6/mm^3) d'hémoglobine (FCV = 9,74 ± 0,3g/dl, MKK = 7,4 ± 0,12g/dl, LTV = 7,2 ± 0,1 g/dl), et des plaquettes (FCV = 290 ± 16 10^3/mm^3, MKK = 213 ± 7 10^3/mm^3, LTV = 168 ± 9 10^3/mm^3) étaient significativement plus élevées à Franceville comparé aux deux autres localités ($P < 0,0001$)). Par ailleurs, le taux moyen des globules blancs était plus bas à Franceville (6,3 ± 0,3$10^3$/mm^3) par rapport à Makokou (10,7 ± 0,4 10^3/mm^3) et Lastoursville (9,8 ± 0,7 10^3/mm^3, $P < 0,05$), (Tableau 8).

Tableau 8: Moyennes des paramètres hématologiques, démographiques chez les enfants infectés symptomatiques au sein des trois localités.

	LOCALITES						
	FCV	**LTV**	**MKK**	**P**	**P***	**P****	**P*****
Age (Mois ±ES)	75,18±3,6	34,01±2	44±2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,03
GR (10^6/mm^3±ES)	3,99±0,05	3,1±0,07	3,34±0,06	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
GB (10^3/mm^3±ES)	6,3±0,3	9,8±0 ,4	10,7±0,4	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,6
Hb (g/dl ±ES)	9,74±0,3	7,2±0,1	7,4±0,12	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Plaquette (10^3/mm^3±ES)	290±16	168,1±9,4	213±7	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Sexe Ratio	1,2	1	1	0,7	0,7	1	1

(P=*P* value des 3 localités ensemble, P*= p. value MKK/FCV, p=P. value FCV/LTV, p***=P. Value LTV/MKK, symptomatiques)**

La comparaison des prévalences entre l'ensemble des trois localités, montre que l'infection plasmodiale était significativement plus faible en milieu urbain (22,7%) par rapport aux milieux semi-urbain (59,3%) et rural (61,9%) ($P < 0,05$) (tableau 9).

Tableau 9: Prévalence de l'infection plasmodiale dans les 3 localités chez les symptomatiques

		LOCALITES						
		Franceville	Makokou	Lastoursville	P	P*	P**	P***
	Prévalence%	22,70%	59,30%	61,90%	<0001	<0001	<0001	0,7
TDR	*P. falciparum* (Prévalence%)	97,08%	97,90%	99,10%	0,9	0,9	0,9	0,9
Diagnostic moléculaire	*P. malariae* (Prévalence%)	0	1,3%	0	0,2	0,6		0,6
	P. ovale (Prévalence%)	0	0	0%				
	Coinfection P. fal + P. mal (Prévalence%)	2,90%	0,80%	0,80%	0,2	0,2	1	1
	coinfection *P. fal + P. mal* +*P. ova* (Prévalence %)	0	0%	0%				
GE	Charges parasitaires (Parasite/µL de sang ± ES)	6691± 816	43944 ± 4259		<0,0001	<0,0001		

(*P=P* Value des 3 localités ensemble, *P*= p. Value* MKK/FCV, *P=P. Value* FCV/LTV *P***=P. Value* LTV/MKK symptomatiques)**

B. Comparaison entre Franceville et Makokou

La comparaison des paramètres démographiques et hématologiques chez les enfants symptomatiques entre Makokou et Franceville, montre que l'âge moyen était significativement plus bas à Makokou (44±2 mois) comparé à Franceville (75,18±3,6 mois), $P < 0,5$. Les taux moyens de globules rouges, des plaquettes et d'hémoglobine étaient plus élevés à Franceville (GR= 3,99±0,05 10^6/mm^3; PLT = 290±16 10^3/mm^3; HB = 9,74±0,3g/dl) qu'à Makokou (3,34±0,06 10^6/mm^3; PLT= 290±16 10^3/mm^3 et 213±7 10^3/ mm^3; HB = 9,74±0,3g/dl et 7,4±0,12g/dl) $P < 0,05$. Par contre, le taux moyen de globules blancs (FCV= 6,3±0,3 10^3/mm^3 et MKK = 10,7±0,4 10^3/mm^3 y était significativement plus bas ($P < 0,05$) (Tableau 8).

En comparant la prévalence de l'infection plasmodiale entre milieu urbain (Franceville) et milieu semi-urbain (Makokou), il en ressort que la prévalence de l'infection plasmodiale symptomatique (FCV=22,7%, MKK=59,3%, $P < 0,05$) ainsi que la charge parasitaire moyenne (FCV = 6690,94±815,83 parasites/µl de sang, MKK = 43944±4259 parasites/µl de sang, $P < 0,05$) étaient significativement plus élevées en milieu semi-urbain qu'en milieu urbain. Pour ce qui est des espèces plasmodiales, aucune différence significative de prévalence n'a été observée que ce soit en mono infection ou en confection entre les deux localités (tableau 9).

C. Comparaison entre Franceville et Lastoursville

La comparaison cette fois-ci entre le milieu urbain et le milieu rural (Lastoursville), montre que, l'âge moyen des enfants symptomatiques étaient significativement bas en milieu rural (34,01±2 mois) comparé au milieu urbain (75,18±3,5 mois) (P < 0001). Bien qu'aucune différence n'ait été

observée entre les deux localités, le sexe ratio était de 1,2 à Franceville et de 1,3 à Lastoursville (*P* = 1).

La moyenne de globules rouges (FCV = 3,99±0,05 10^6/mm^3 et LTV = 3,1±0,07 10^6/mm^3), du taux d'hémoglobines (FCV = 9,74±0,3g/dl et LTV = 7,2±0,1 g/dl) et de plaquettes (290±16 10^3/mm^3 et 168,1±9,4 10^3/mm^3) était significativement plus élevée à Franceville qu'à Lastoursville (*P* < 0,05). Par contre le taux de globules blancs était bas à Franceville (6,3±0,310^3/mm^3) par rapport à Lastoursville (9,8±0,4 10^3/mm^3) (*P* < 0,05).

La prévalence de l'infection plasmodiale était significativement plus haute en milieu rural (61,9%) qu'en milieu urbain (22,7%) (*P* < 0001).

Aucune différence significative de prévalence des différentes espèces plasmodiales n'a été relevée que ce soit en monoinfection (FCV = 97,08%, LTV = 86,9%) ou en coinfections à *P. falciparum* et *P. malariae* (FCV = 2,9%, LTV =0,8%). (Tableaux 8 et 9).

D. Comparaison entre Makokou et Lastoursville

L'analyse des paramètres hématologiques et démographiques chez les enfants symptomatiques, entre le milieu semi-urbain et le milieu rural, montre que : l'âge moyen était significativement différent entre les deux localités (MKK = 44±2 mois, LTV = 34,01±2 mois) *P* = 0,03. Par contre aucune différence significative de sexe ratio n'a été observée entre Lastoursville (1,3) et Makokou (1) chez les symptomatiques *P* = 1. La moyenne du taux de globules blancs n'était pas significativement différente entre les deux localités (MKK = 10,7±0,4 10^3/mm^3, LTV = 9,8±0,4 10^3/mm^3 9,8±0,4 10^3/mm^3, *P* = 0,6), tandis que les moyennes des globules rouges, des plaquettes et de taux d'hémoglobine étaient significativement plus élevés en zone semi-urbain (HB = 7,4±0,12g/dl, GR = 3,34±0,06 10^6/mm^3, Pqt = 213±7 10^3/ mm^3) qu'en zone rurale (HB = 7,2±0,1 g/dl, GR = 3,1±0,07 10^6/mm^3, Pqt = 168,1±9,4 10^3/mm^3), P < 0,05.

La prévalence de l'infection plasmodiale symptomatique n'était pas significativement différente entre les deux localités (MKK = 59,3%, LTV = 61,9%), *P* = 0,7.

La prévalence de *P. falciparum* était de 99,1% à Lastoursville et de 97,9% à Makokou. Celle de *P. malariae* était de 0% à Lastoursville et de 1,3% à Makokou. Les prévalences des coinfections à *P. falciparum et Plasmodium malariae* quant à elle était de 0,8% dans les deux localités. Aucune différence significative de prévalence d'espèces plasmodiales n'a été observée entre les deux localités que ce soit en termes de mono ou de coinfections. (Voir tableaux 8 et 9).

IV. Comparaison des prévalences, paramètres hématologiques et démographiques des enfants infectés asymptomatiques entre localités.

A. Comparaisons entre les 3 localités

L'analyse des paramètres démographiques et hématologiques des enfants infectés asymptomatiques a montré que, l'âge moyen était de 113±8 mois à Makokou, 107±5 mois à Franceville et 59±2 mois à Lastoursville. Cette moyenne d'âge était statistiquement plus haute à Makokou que dans les deux autres localités. Le sexe ratio (FCV = 1,0 MKK = 1,5, LTV = 0,7) n'était pas significativement différents entre les 3 localités, $P > 0,05$.

Tableau 10: Moyennes des paramètres hématologiques, démographiques chez les enfants infectés asymptomatiques dans les 3 localités.

	LOCALITES						
	FCV	**LTV**	**MKK**	***P***	***P****	***P****	***P******
Age (Mois ±ES)	107,5±5,1	59±2	113±8	0,006	0,002	0,01	0,01
GR (10^6/mm^3±ES)	4,2±0,1	NA	4,4±0,2	0,4	0,5	NA	NA
GB (10^3/mm^3±ES)	6,6±0,4	NA	8,05±0,6	0,06	0,07	NA	NA
Hb (g/dl)	9,3±0,2	NA	10,2±0,4	0,06	1	NA	NA
Plaquettes (10^3/mm^3±ES)	234±10	NA	303±18,6	0,003	0,01	NA	NA
Sexe Ratio	1	0,7	1,5	0,4	0,8	0,9	0,7

(*P* = *P* Value des 3 localités ensemble, *P = *P* value MKK/FCV, *P*** = *P* value FCV/LTV, *P**** = *P* value LTV/MKK asymptomatiques**

La prévalence de l'infection plasmodiale était de 16,1 % à Franceville, 42,31% à Lastoursville et de 17% à Makokou. Elle était significativement plus élevée en milieu rural comparativement aux milieux urbains et semi-urbains ($P < 0,05$). La moyenne des charges parasitaires était de 4363±1494 à Franceville, de 9190±2128 à Lastoursville, de 16963± 8218 à Makokou chez les asymptomatiques. Ces moyennes des charges parasitaires n'étaient pas statistiquement différentes entre les trois localités, $P = 0,3$.

Les prévalences de *P. malariae* (FCV = 0%, MKK = 15%, LTV = 6,02%) et de *P. falciparum* (FCV = 86,9%, MKK = 85%, LTV = 75%) n'étaient significativement différentes entre les trois localités. Mais une différence significative en termes de prévalences de coinfections a été observée entre les trois localités ($P = 0,03$ pour *P. falciparum* + *P. malariae* et $P = 0,02$ pour *P. falciparum* + *P. malariae* + *P. ovale*) (Voir tableaux 10 et 11).

Tableau 11: Prévalence de l'infection plasmodiale dans les 3 localités.

		Franceville	Makokou	Lastoursville	*P*	*P**	*P***	*P****
TDR	Prévalence%	16,10%	17%	42,31%	<0001	0,8	0,0005	0,0001
	P.falciparum (Prévalence%)	86,90%	85%	75,12%	0,7	0,9	0,5	0,6
Diagnostic moléculaire	*P.malariae* (Prévalence%)	0	15%	6,02%	0,1	0,07	0,6	0,2
	P.ovale (Prévalence%)	0%	0%	0%				
	Coinfect fal+mal (Prévalence%)	8,70%	0%	24,09%	0,03	0,2	0,3	0,03
	Coinfect fal+mal+Ova(Prévalence %)	4,35%	0%	0%	0,02	0,3	0,01	
GE	charges Parasitaires (Parasite/µL de sang ±ES)	4363,86±1494	9190±2128	16963±8218	0, 3	0,2	0,2	0,2

(*P* = *P* Value des 3 localités ensemble, *P = *P* value MKK/FCV, *P*** = *P* value FCV/LTV, *P**** = *P* value LTV/MKK asymptomatiques**

B. Comparaison entre Franceville et Makokou

Nous avons comparé les paramètres démographiques et hématologiques des enfants entre le milieu urbain et semi urbain. L'âge moyen (113±8 mois à Makokou, 107±5 mois à Franceville et 59±2 mois) était significativement plus élevé en milieu semi urbain qu'en milieu urbain, *P* = 0,002. En revanche, aucune différence significative du sexe ratio n'a été observée entre Franceville (1) et Makokou (1,5), *P* = 0,8.

Le taux moyen de plaquettes était significativement plus élevé à Makokou (303±18,6) qu'à Franceville (234±10), *P* = 0,003. Aucune différence significative du taux moyen des autres paramètres hématologiques n'a été observée entre les deux localités (tableau 9).

Nous avons remarqué que la prévalence de l'infection plasmodiale (FCV= 16,1%, MKK=17%, *P* = 0,8), ainsi que la charge parasitaire moyenne (FCV = 4363,86±1494 parasites/µl de sang MKK = 9190±2128 parasites/µl de sang, *P* = 0,2) n'étaient pas significativement différentes entre le milieu urbain et le milieu semi-urbain. La prévalence de *P. falciparum* (FCV = 86,9%, MKK = 85%, *P* = 0,9), celle de *P. malariae* (FCV = 0%, MKK =15%, *P* = 0,07 et des coinfections à *P. malariae* et *P. falciparum* (FCV = 4, 34%, MKK = 0%, *P* = 0,2) n'était pas significativement différente entre les deux localités. (Voir tableau 10 et 11)

C. Comparaison entre Franceville et Lastoursville

La détermination des paramètres démographiques entre milieu urbain et milieu rural chez les enfants infectés asymptomatiques révèle que l'âge moyen (FCV = 107,5±5 mois, LTV = 59±2 mois, *P* = 0,01) était significativement plus élevé en milieu urbain qu'en milieu rural. Le sexe ratio (FCV = 1, LTV = 0,8) n'était pas significativement différent entre les deux localités, *P* = 0,9.

La prévalence de l'infection plasmodiale était significativement plus élevée en milieu rural (42,31%) comparée au milieu urbain (16%), *P* = 0,0005. La charge parasitaire moyenne n'était pas significativement différente entre le milieu urbain (4363,86±1494parasites/µl de sang) et le milieu rural (16963±8218), *P* = 0,2.

La prévalence de *Plasmodium falciparum* (FCV = 86,9%, LTV = 75%, *P* = 0,5), celle de *Plasmodium malariae* (FCV = 0%, LTV = 6,02%, *P* = 0,6) et des coinfections à *P. malariae* et *P. falciparum* (FCV = 4, 34%, LTV = 24,09%, *P* = 0,3) n'étaient pas significativement différentes entre les deux localités. (Tableaux 10 et 11).

D. Comparaison entre Makokou et Lastoursville

L'analyse des paramètres démographique entre le milieu semi urbain et rural montre que l'âge moyen (LTV=59±2 mois, MKK=113±8 mois, *P* = 0,01) des enfants infectés asymptomatiques, était significativement bas à Lastoursville comparé à Makokou. Le sexe ratio (LTV = 0,7, MKK = 1,5) n'était pas significativement différent entre les 2 localités, *P* = 0,7.

La prévalence de l'infection plasmodiale asymptomatique était significativement haute en milieu rural (42,31%) qu'en milieu semi-rural (17%,) *P* = 0,0001. La moyenne des charges parasitaires n'était pas significativement différente entre le milieu rural (16963±8218 parasite /µl de sang) et le milieu semi rural (9190±2128parasite/µl de sang), *P* = 0,2. Aucune différence significative de prévalence de *P. falciparum* (LTV = 75,12%, MKK = 85%, *P* = 0,9) et de *P. malariae* (LTV = 6,02%, MKK = 15%, *P* = 0,6) n'a été observée entre le milieu rural et le milieu semi urbain. Mais une haute prévalence de coinfections à *P. malariae* et *P. falciparum* (MKK = 0%, LTV =2 4,09%, *P*=0,03) a été observée à Lastoursville (Voir tableaux 10 et 11).

V. Caractérisation de la virulence

A. Génotypage des gènes msp-1 et msp-2 : Fréquences des familles alléliques des gènes msp-1-2 en fonction de la localité du statut clinique.

Cent deux (102) échantillons ont été génotypés pour les gènes *msp-1* et *msp-2* ; 91,2% (93/102) des amplifications ont réussi pour le gène *msp-1* et 65,7% (67/102) pour le gène *msp-2*.

Les fréquences globales des familles alléliques du gène *msp-1* étaient de 72,02% (67/93), 36,6% (34/93) et de 49,5% (46/93) pour K1, Mad20 et RO33 respectivement. La fréquence de la famille allélique K1 était significativement plus élevée que celle de Mad20 et RO33(*P<0,05*). Les fréquences des familles alléliques ont été déterminées en fonction de la localité et de la symptomatologie clinique. La fréquence de la famille allélique K1 était de 31,3%(21/67), 35,8% (24/67) et de 32,8% (22/67) à Franceville, Lastoursville et Makokou respectivement, mais sans aucune différence significaticve entre les trois localités (*P=0,*8). De même, aucune différence significative de fréquence n'a été observée entre les trois localités pour Mad20 (FCV=41,7%(14/34), LTV=23,5%(8/34), MKK=35,3%(12/34), *P=0,4*. Par ailleurs, la famille allélique RO33 était significativement plus fréquente à Makokou (52,2% (24/46)) et Lastoursville (32,6% (15/46)) qu'à Franceville (15,2% (7/46)), *P=0,008*. De plus, les familles alléliques Mad20 et K1 étaient plus fréquentes à Franceville par rapport à RO33, *P=0,02*. Aucune différence significattive n'a été observée entre les trois familles alléliques à Lastoursville, *P=0,6* et Makokou, *P=0,1* (Figur 15 b). Cependant, la famille allélique Mad20 s'est avérée plus fréquente dans les isolats symptomatiques (61,8%; 21/34) comparés aux asymptomatiques (38,2% ; 13/34), *P=0,05*. Mais il n'y avait aucune différence significative de fréquence pour les familles alléliques K1 (*P=0,1*) et RO33 (*P=0,4*) entre symptomatiques (K1=43,3%(29/67), RO33=45,7% (21/46)) et asymptomatiques (K1=56,7%(38/67), RO33=54,3% (25/46). (Tableau 12).

Tableau 12: Comparaison de fréquences des familles alléliques de msp1 et 2 entre sites et statuts cliniques

	Familles alléliques	Localités				Statut clinique		
		FCV	LTV	MKK	P	Sympto	Asympto	P*
msp1	K1 %(n/T)	31,1% (21/67)	35,8% (22/67)	32,8% (22/67)	0,8	43,3% (29/67)	56,7% (38/67)	0,1
	Mad20 %(n/T)	35,8% (12/34)	23,5% (8/34)	41,7% (14/34)	0,4	61,8% (21/34)	38,2% (13/34)	0,05
	Ro33 %(n/T)	52,2% (24/46)	32,6% (15/46)	15,2% (7/46)	0,008	45,7% (21/46)	54,3% (25/46)	0,4
msp2	3D7 %(n/T)	20,6% (7/34)	26,5% (9/34)	52,8% (18/34)	0,01	58,8% (20/34	41,2% (14/34	P>0,05
	FC27%(n/T)	32% (16/50)	44% (22/50)	24% (12/50)	0,1	46% (23/50	54% (27/50)	P>0,05

Pour le gène *msp-2* la fréquence globale de la famille allélique FC27 (74,6% (50/67) était significativement supérieure à celle de 3D7 (50,7% (34/67), *P=0,004*. La fréquence de la famille allélique 3D7 était de 20,6% (7/34) à Franceville, 26,5% (9/34) à Lastoursville et de 52,8% à Makokou (18/ 34). La fréquence de la famille allélique 3D7 était significativement plus élevée à Makokou qu'à Franceville et Lastoursville, *P=0,01*. Mais pour la famille allélique FC27, il n'yavait aucune différenece significative de fréquences entre les trois localités, *P=0,1*. De meme aucune différence significative pour les deux familles alléliques n'a été observée entre symptomatiques (3D7=58,8% (20/34) ; FC27= 46% (23/50)) et asymptomatiques (3D7=41,2% (14/34) ; FC27= 54% (27/50)), *P>0,05*. Cependant, la famille allélique 3D7 a été plus fréquente que FC27 à Makokou, *P=0,006*. Pour Franceville et Lastoursville, aucune différence significative de fréquence n'a été observée entre les deux familles allélique, *P>0,05*.(Tableau 12)

B. Infections polyclonale des gènes msp-1 et msp-2 en fonction du statut clinique et de la localité

Des combinaisons des familles alléliques K1, Mad20 et RO33 ont été détecté dans 49,5% (46/93) d'échantillons. Dans l'ensemble, l'association K1_RO33 était la plus fréquente avec une fréquence de 50% (23/46), suivie de K1_MAD20 avec une fréquence de 21,7% (10/46), les deux autres combinaisons de familles alléliques(RO33-Mad20 et K1_Mad20_Ro33) avaient des fréquences inférieures à 20%.

La proportion d'infections polyclonales était plus élevée à MAKOKOU (milieu semi-urbain, 45,7%(21/46)) et Lastoursville (32,6% (10/46) milieu rural) qu'à Franceville (milieu urbain, 21,7% (10/46), *P=0,05*. A Franceville, les associations K1_Mad20 (40%, 4/10) et K1_RO33 (30%, 3/10) étaient plus fréquemment rencontrées. A Lastoursville et Makokou l'association K1_Ro33 (MKK=

47,6%, 10/21 ; LTV=67%, 10/15 a été plus fréquemment observée. La proportion d'infection polyclonale n'était pas significativement différente entre symptomatiques(22/46 soit 47,8%) et asymptomatiques (24/46 soit 52,2%), *P=0,7*. (Figure11)

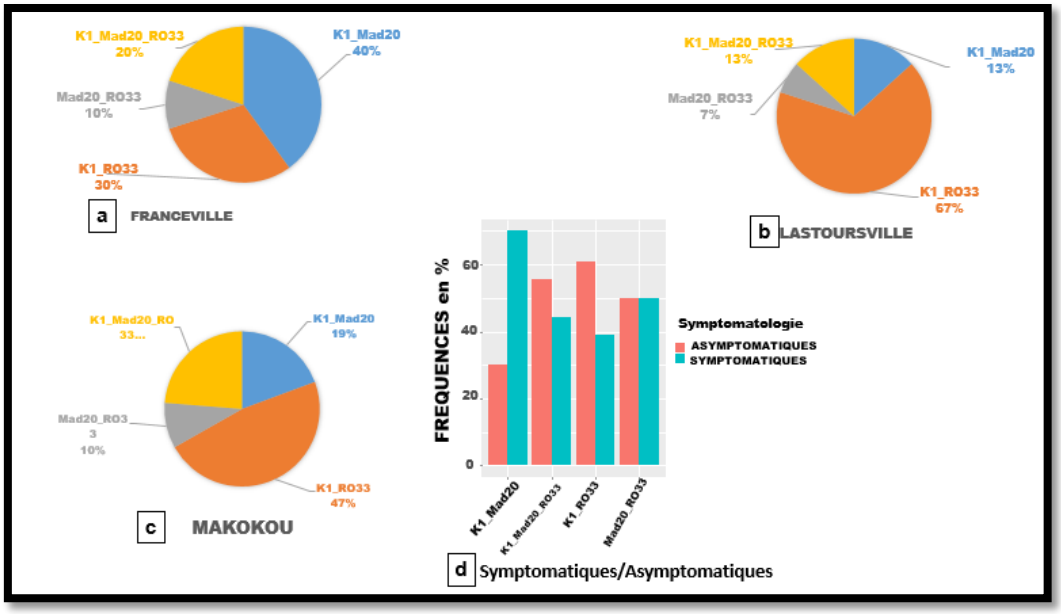


Figure 11: Distribution d'infections polyclonale du gène msp-1 par localité et par statut clinique

Pour le gène *msp2*, une combinaison des familles alléliques 3D7/FC27 a été détectée dans 25,7% (17/67) des échantillons. L'association 3D7_FC27 n'était pas significativement différente entre Franceville, Lastoursville et MAKOKOU, *P=0,2*. Mais elle était significativement plus importante dans les isolats symptomatiques (70,6% ; 12/17) comparés aux asymptomatiques 29,4%), *P=0,02*. (Figure 12)

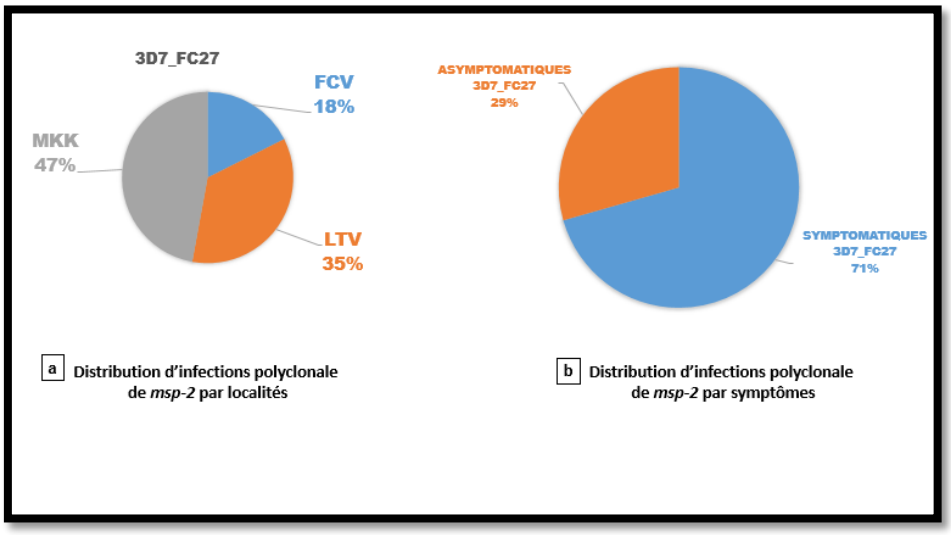


Figure 12: Distibution d'infection polyclonale du gène *msp-2* par sites et par statut clinique.

C. Diversité allélique et polymorphisme de longueur de taille de fragments

La distribution des allèles des gène *msp-1* et *msp-2*, variait largement selon les sites. Les allèles identifiés ont été classé selon leurs tailles en paires de bases. Un total de 91 allèles individuels des deux gènes ont été identifiés dans les trois sites et chez l'ensemble de sujets. Quarante sept (47) allèles différents du gène *msp-1* ont été observés (23 pour K1 et Mad20, un pour RO33) avec des tailles de bandes de 195 à 400 Paires de bases. De plus 44 allèles *msp-2* différents avec des tailles de fragments allant de 394 à 600 paires de bases ont été trouvés, dont 19 appartenant à la famille allélique 3D7 (plage de fragments de 400-600 pb) et 25 appartenant à la famille allélique FC27 (plage de fragments de 394-556 pb). Le nombre d'allèles détectés pour *msp-2* n'était pas significativement différent de *msp-1*, *P=0,7*. La famille allélique RO33 s'est avérée monomorphe (avec une taille de fragment amplifiée de 270 Pb) et représentait 2,1% (1/47) de tous les génotypes *msp-1*. Les allèles de types K1 et Mad20 prédominaient avec des fréquences de 48,9% (23/47) chacun, P<0,05. Parmi les 23 allèles de K1, les allèles K1_327, K1_273 et K1_343, étaient les plus fréquents avec de fréquences respectives de 14%, 12% et 10%. Les autres allèles avaient des fréquences inférieures à 10%. Pour les allèles de type Mad20, Mad20_360 (14%) et Mad20_267 (13%) étaient les plus fréquents. Dans les familles alléliques du gène *msp-2*, FC27_429 (11,8%), 3D7_480 (16%) et 3D7_560 (14%) étaient les plus fréquemment rencontrés, la fréquence des autres allèles était inférieure à 10%. (Figure 13)

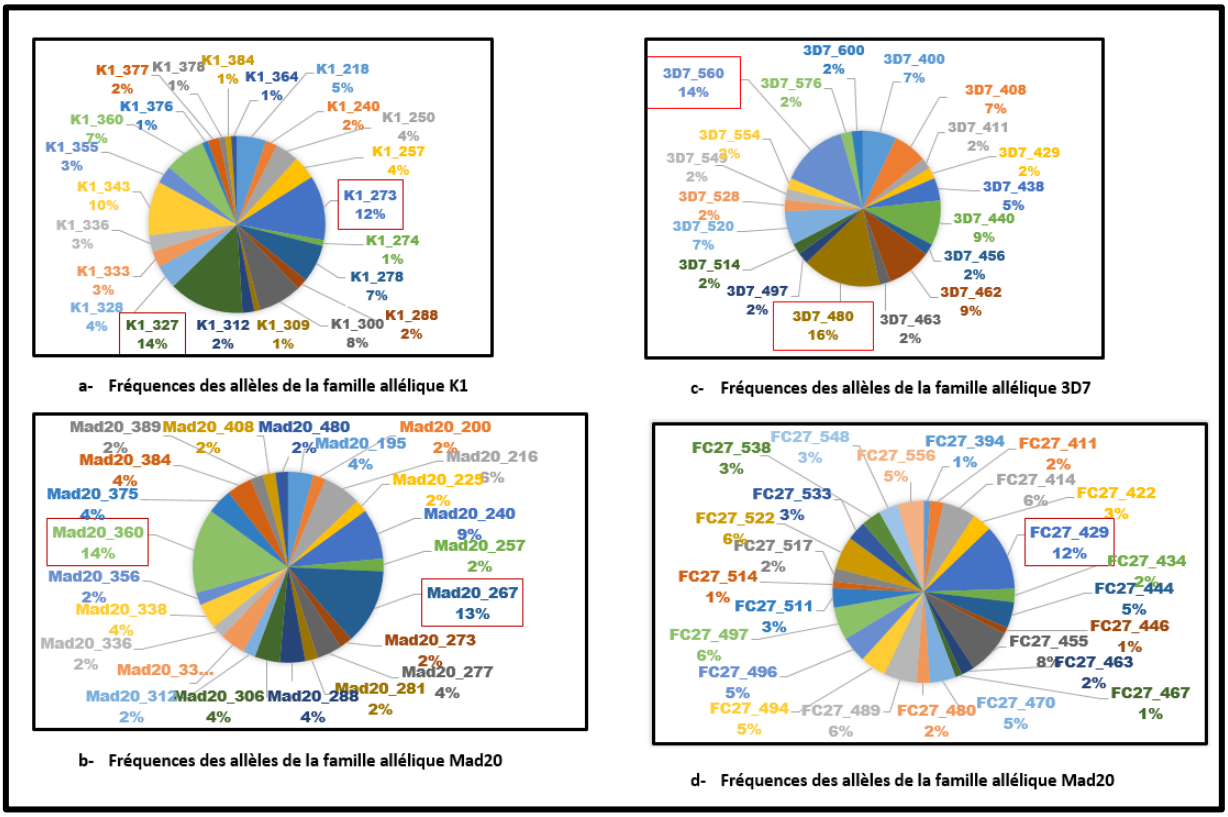


Figure 13: Diversité allélique des différents allèles des gènes msp-1 et 2 dans l'ensemble de la population.

Les différents allèles ont été classés par sites, pour le gène *msp-2*, 16 allèles différents ont été rencontrés à Franceville (11 de type FC27 et 5 de type 3D7), les allèles FC27_455, 3D7_438, 3D7_462 étaient les plus fréquents avec des fréquences respectives de 23,3% , 25% et 37,5%. A Lastoursvilles, 20 allèles différente ont été identifiés (13 de type FC27 et 7 de type 3D7), les allèles FC27_429 et 3D7_560 étaient les plus fréquemment rencontrés avec des fréquences respectives de 35,7% et 23,7% . A Makokou un total de 18 allèles différents a été mis en évidence dont 7 de type FC27 et 11 de type 3D7), les allèles les plus fréquents étaient FC27_489 (23,7%) et 3D7_480 (22,7%). Tous les autres allèles des deux familles alléliques avaient des fréquences inférieures à 20% dans les trois sites. Des allèles communs ont été mis en évidence entre les sites, 6 allèles de types FC27 et 2 allèles 3D7 ont été identifiés à la fois à Franceville et Lastoursville, l'allèle 3D7_462 était plus fréquent à Franceville (37,5%, 3/8) qu'à Lastoursville (7,7%, 1/13), mais sans aucune différence significative, *P=0,2*. Trois allèles 3D7 ont été à la fois identifiés à Lastoursville et à Makokou, mais aucun allèle commun n'a été mis en évidence entre Makokou et Franceville.

Pour le gène *msp-1*, 27 allèles différents ont été identifiés à Franceville (12 de type Mad20, 14 de type K1 et 1 de type RO33), les allèle Mad20_360 (23,8%), K1_300 (22,9%) étaient les plus fréquents. A Makokou, 17 allèles différents ont été identifiés (7 de type Mad20, 10 de type K1 et 1 de type RO33) et les allèles Mad20_260 (42,9%) et K1_327 (35,7%) étaient les plus fréquents (42,9%). Vingt-deux (22) allèles différents du gène *msp-1* ont été identifiés à Lastoursville (9 de type Mad20 et 12 de type K1 et 1 de type RO33), l'allèle K1_343 était le plud fréquent 21,9%). Mais la fréquence des autres allèles identifiés était inférieur à 20%. Cependant 5 profiles alléliques (Mad20_240, K1_273, K_327, K1_328, K1_355) communs aux trois sites ont été mis en évidence. Et bien que la fréquence de K1_273 était plus élevée à Lastoursville (21,9%, 7/32) qu'à Franceville (8,6%, 3/35) et Makookou (7,1%, 2/28), aucune différence significative de fréquence de cet allèle n'a été observée entre les trois localités *P=0,3*. Par ailleurs, K1_327 était significativement plus fréquent à Makokou qu'à Franceville et Lastoursville, *P=0,006*. Hors, Franceville et Lastousville avaient 5 profiles alléliques en commun (3 de type Mad20 et 2 de types K1), Makokou et Lastoursville avaient 2 profiles allèliques en communs tous de type K1. Hormis les profils alléliques communs aux trois localités, aucun profil commun à Franceville et Makokou n'a été mis en évidence. (Figure 14)

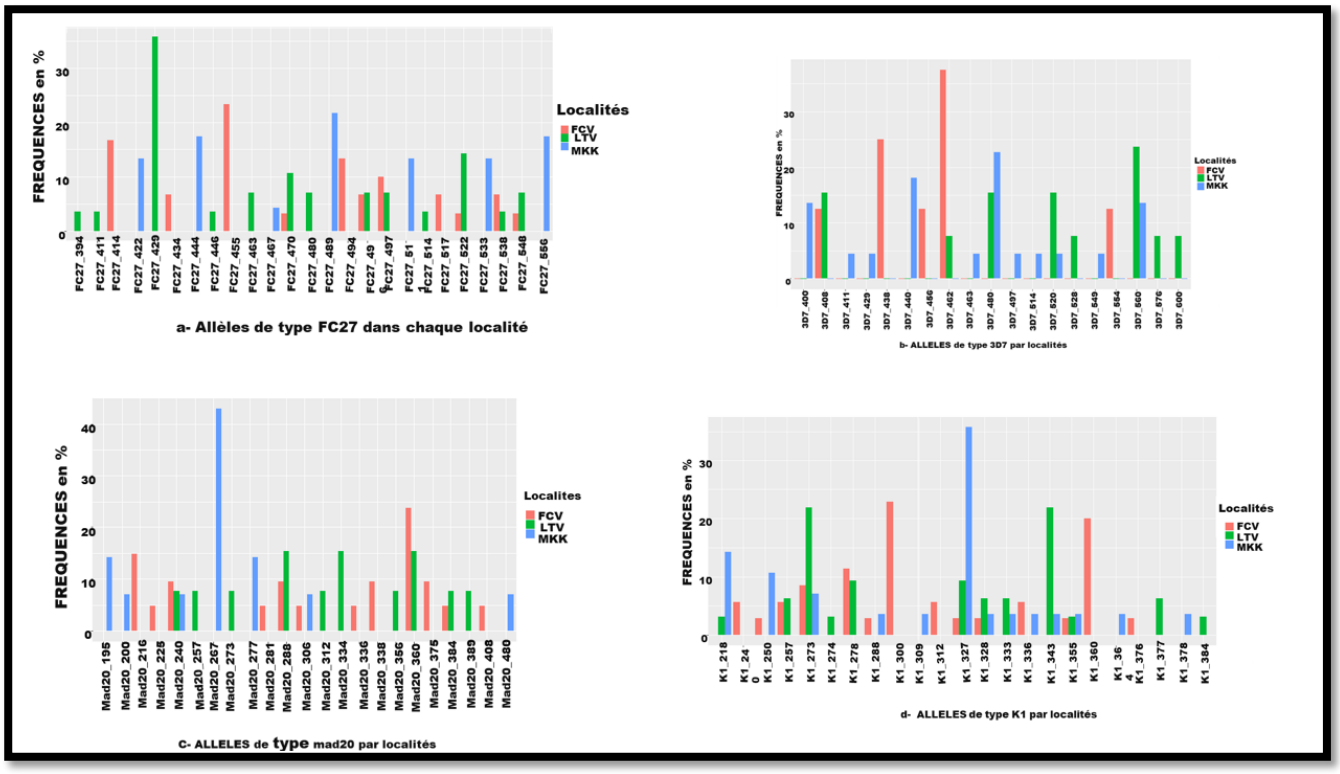


Figure 14: Comparaison des fréquences alléliques des gènes *msp1* et 2 par localités.

Les différents profils alléliques variaient en fonction de la symptomatologie clinique. Pour le gène *msp-2*, 31 allèles différents ont été repéré dans les isolats d'enfants asymptomatiques (13 de type 3D7 et 18 de type FC27) et 28 allèles ont été mis en évidence dans les isolats symptomatiques (17 de type FC27 et 11 de type 3D7). Huit (8) allèles de types 3D7 (3D7_411, 3D7_429, 3D7_463, 3D7_497, 3D7_514, 3D7_549, 3D7_554, 3D7_600) et 8 allèles de type FC27 (FC27_ 394, FC27_434, FC27_ 446, FC27_497, FC27_ 467, FC27_ 514, FC27_517, FC27_ 538) ont uniquement été observés dans les isolat d'enfants asymptomatiques. De même, 7 allèles de type FC27 (FC27_422, FC27_470, FC27_480, FC27_496, FC27_522, FC27_548, FC27_556) et 5 allèles de type 3D7 (3D7_400, 3D7_408, 3D7_438, 3D7_528, 3D7_576 ont été uniquement identifiés dans les isolats symptomatiques. Ces différents allèles avaient des fréquences inférieurs à 20%. Cependant, pour les allèles identifiés à la fois dans les isolats symptomatiques et asymptomatiques aucune différence significative de fréquences n'a été observée P>0,05.

En ce qui concerne le gène *msp-1*, 29 allèles différents ont été mis en évidence dans les isolats asymptomatiques (10 de type Mad20 et 19 de type K1) et 36 allèles différents ont été observés dans les isolats symptomatiques (K1=17, Mad20=19). Les allèles Mad20_195, Mad20_200, Mad20_389, K1_309, K1_ 336, K1_ 376, K1_ 377 ont été uniquement observés dans les isolats asymptomatiques. De même les allèles K1_257, K1_ 274, K1_ 312, K1_ 378, Mad20_216, Mad20_257, Mad20_273, Mad20_288, Mad20_312, Mad20_336, Mad20_338, Mad20_356, Mad20_360, Mad20_375, Mad20_384, Mad20_408, Mad20_480 ont uniquement été identifié dans les isolats symptomatiques

avec des fréquences inférieures à 20%. Certains allèles étaient communs aux deux groupes sans aucune différence significative de fréquence, P>0,05. (Figure 15)

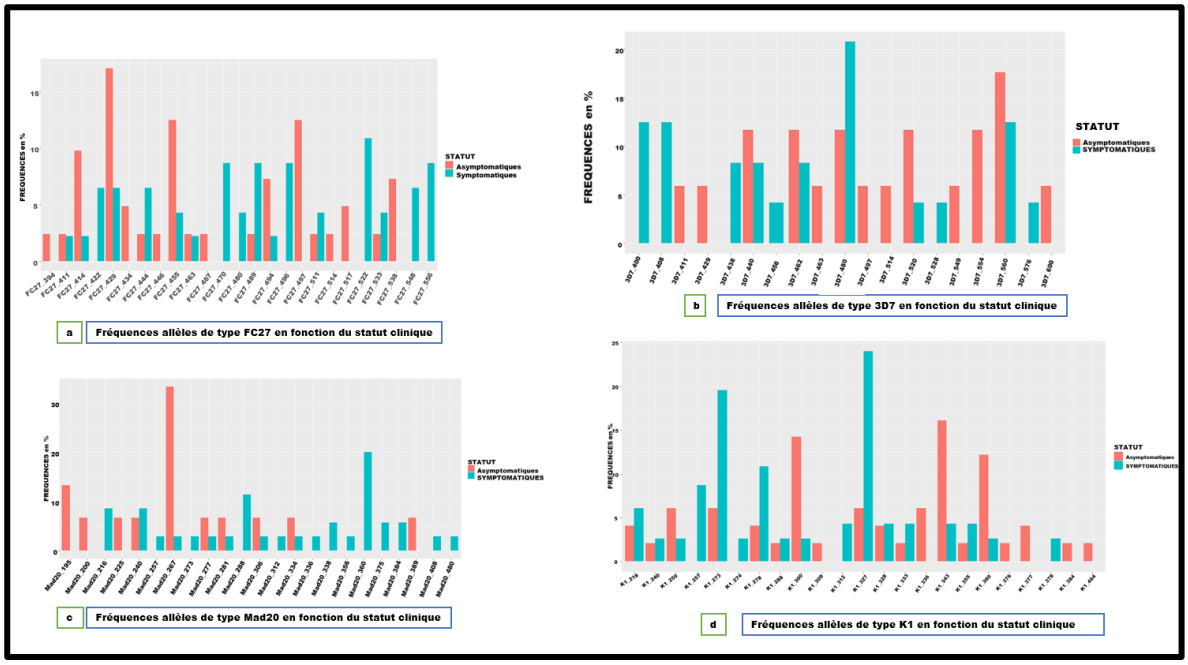


Figure 15: Fréquence alléliques du gène *msp1et 2* dans les isolats symptomatiques et asymptomatiques dans l'ensemble de la population.

D. MESURE DE GENETIQUE DES POPULATIONS : MOI, INDICE DE DIVERSITE(He), Différenciation génétique (Fst)

La MOI estimée dans les trois sites et en fonction du statut clinique est résumée dans le tableau 11. Le nombre global de génotypes *msp-1* et *msp-2* par isolat variait de 1 à 5 et de 1 à 4 respectivement. A Lastousville le nombre de génotypes *msp-1* par isolat variait de 1 à 4, par contre pour Franceville et makokou ainsi que pour les deux statuts cliniques, le nombre génotypes par isolat variait de 1 à 5. Le nombre de génotypes *msp-2* variait de 1à 4 dans chaque site et en fonction du statut clinique. La MOI globale était de 2,06±1,07, 2,13±1,07 et 2,57±0,99 pour *msp-1*, *msp-2* et *msp-1+msp-2* respectiment. La MOI moyenne pour les génotypes *msp-1* et *msp-2*, ou *msp-1+msp-2* n'était pas significatitvement différente entre les trois sites. De même aucune différence significative de MOI n'a été détectée entre les isolats symptomatiques et asymptomatiques.(Tableau 13).

Tableau 13: Nombre de clones (MOI) détectés avec msp1, msp2 et msp1+2 selon les sites et le statut clinique.

Variable		No. of isolates		No. of genotype		MOI (SD)					
		msp1	*msp2*	*msp1*	*msp2*	*msp1*	*P-value*	*msp2*	*P-value*	*msp1+2*	*P-value*
Overall		93	67	1-5	1-4	2,06 (1,07)	-	2,13 (1,07)	-	2,57 (0,99)	-
By site	Franceville	29	20	1-5	1-4	2 (1,16)	NS	2,25 (1,06)	NS	2,55 (1,24)	NS
	Lastoursville	31	25	1-4	1-4	1,96 (0,98)		2 (0,95)		2,54 (0,85)	
	Makokou	33	22	1-5	1-4	2,21 (1,08)		2,18 (1,22)		2,62 (0,92)	
By clinical status	Asymptomatic	46	31	1-5	1-4	1,91 (1,05)	NS	2,03 (0,91)	NS	2,32 (0,81)	NS
	Symptomatic	47	36	1-5	1-4	2,21 (1,08)		2,22 (1,19)		2,78 (1,08)	

La diversité génétique (He) a été estimée en fonction des sites et du statut clinique. Pour le gène *msp-1* la diversité génétique était de 0,59893±0,5183 ; 0.596±0.5174 ; 0.5036 ±0.4371 à Franceville, Lastoursville et Makokou respectivement. Pour *msp-2* la diversité génétique était de 0.9005±0.0277 ; 0.9115±0.0354 et 0.8584 ±0.0653 à Franceville, Lastoursville et Makokou respectivement. La diversité génétique des gènes *msp-1* et *msp-2* était quasiment la même dans les trois sites. Par contre, la diversité génétique était plus importante pour le marqueur *msp-2* par rapport au marqueur *msp-1*. Par ailleurs, la diversité génétique de *msp-1*, *msp-2* et msp-1+msp-2 était quasiment identique entre symptomatiques (msp1=0.7265±0.3381, msp2=0.9267±0.0117 et msp1+msp2=0.802±0.2612 et asymptomatiques (msp10.6746±0.3706, msp2= 0.9232±0.0545 et msp1+msp2=0.7764±0.2968) (Tableau 14)

Tableau 14: diversité génétique (He) en fonction des sites et du statut clinique

Site	***He (SD)***		
	msp-1	*msp-2*	*msp-1+2*
Franceville	0.5983 (0.5183)	0.9005 (0.0277)	0.8137 (0.1322)
Lastoursville	0.596 (0.5174)	0.9115 (0.0354)	0.7652 (0.2736)
Makokou	0.5036 (0.4371)	0.8584 (0.0653)	0.6850 (0.3089)
STATUT CLINIQUE	***He (SD)***		
	msp-1	*msp-2*	*msp-1+2*
Asymptomatique	0.6746 (0.3706)	0.9232 (0.0545)	0.7764 (0.2968)
Symptomatique	0.7265 (0.3381)	0.9267 (0.0117)	0.802 (0.2612)

La diversité génétique des deux marqueurs combinés suit plus ou moins un gradient du Sud au Nord : la diversité était premièrement plus importante à Franceville puis à Lastoursville et enfin à Makokou.

L'indice de fixation estimée (Fst) mesurant la différenciation, de la population parasitaire due à la structure génétique à chaque site était de 0.08202, 0.10413 et de 0.13634 entre Franceville et Lastoursville, puis entre Lastoursville et Makokou enfin entre Franceville et Makokou respectivement. Dans l'ensemble le Fst entre les populations des différentes localités était modéré. Une plus grande proximité des populations entre Franceville et Lastoursville puis entre Lastoursville et Makokou a été observée. Mais une différence plus importante de différenciation génétique a été observée entre Franceville et Makokou (Figure 22). Ce résultat est cohérent avec la proportion de génotypes communs aux divers sites. La plus grande proportion de partage d'allèles a été observée entre Franceville et Lastoursville, puis entre Lastoursville et Makokou (Voir figure 16). L'étude du flux des populations parasitaires entre symptomatiques et asymptomatiques a permis d'observer une grande proximité des populations entre symptomatiques et asymptomatiques (Fst= 0.03134)



Figure 16: répartition géographique et différenciation génétique des populations parasitaires.

E. Diversité génétique du gène AMA1

Des amplifications ont été faites pour le gène AMA1. Aucun isolat positif à *P. falciparum* n'a été amplifié pour ce gène. Seuls les isolats de *P. malariae* avaient ce gène et sur les 48 isolats amplifiés seuls 8 étaient positifs pour ce dernier. Tous étaient mono infectés et provenaient des échantillons asymptomatiques de Lastoursville. Les analyses moléculaires n'ont pas été satisfaisantes pour ce gène, dans les échantillons de Makokou et Lastoursville, soit à cause des conditions d'amplification ou de la qualité des amorces.

F. Séquençage des différents allèles du gène msp1 et type d'infection.

Les fragments d'ADN du bloc 2 du gène *msp1* de *P. falciparum*, provenant des produits PCR ayant des tailles similaires ou différentes ont été séquencés dans le but d'estimer d'avantage la diversité génétique de la population parasitaire, et de fragments de PCR ont été analysés pour les trois familles alléliques, soit un total de 93 séquences sens et anti-sens. Un total de 38 séquences a été génotypé avec succès dont 18 séquences pour l'allèle K1, 10 séquences pour l'allèle mad20 et 10 séquences pour l'allèle RO33.

Dans l'ensemble,les données de séquences de l'allèle K1 ont révélé un pourcentage d'identité allant de 61 à 99,07% des isolats étudiés entre eux, et de 55 à 98% d'identité avec l'isolat KT158691.1 [131] isolé en Malaisie et en Thailand à quelques exceptions près. Une similitude a été observée entre certains groupes d'isolats en fonction du statut clinique. Pour les séquences des isolats

asymptomatiques les isolats MM049, LTVA156, OBL52(B), OBL12(A) et MKKA084 ont présenté des similitudes supérieurs à 88% , de même que pour les isolats symptomatiques, les séquences des isolats MKKCHR171(A), MKKCHR171(B), MKKCHR011(A), HASG147 et MKKCHR178 avaient des poucentages d'identités supérieurs à 88%. Pour les autres séquences bien que similaires, leur identité ne dépendait pas du statut clinique. Cependant, certains isolats appartenant à la même localité se sont révélé fortement similaires avec des pourcentages d'identité allant de 85 à 99%.

Un arbre couvrant le minimum de vraisemblance (minimum spanning tree) reflétant une rélation généalogique de séquences (niveau 1LV) a été construit pour chaque allèle séquencé afin de déterminer les liens géographiques et cliniques entre les différents types de séquences. Chaque type de séquences est représentée par un cercle, la couleur du cercle représente la localité d'origine du type de séquence et les cas d'infections symptomatiques ou asymptomatiques. De ce fait il a été observé que l'arbre généré avec les 19 séquences de l'allèle K1 n'a pas révélé de modèle géographique claire. Cependant, une certaine diversification locale peut etre observée par exemple, des séquences qui se rapportent d'autres séquences locales. Il serait important de noter que certains génotypes issus de patients symptomatiques ou asymptomatiques se repgroupent entre eux, mais un paratge d'allèles entre symptomatiques et asymptomatiques a également été observé. (Figure 17)

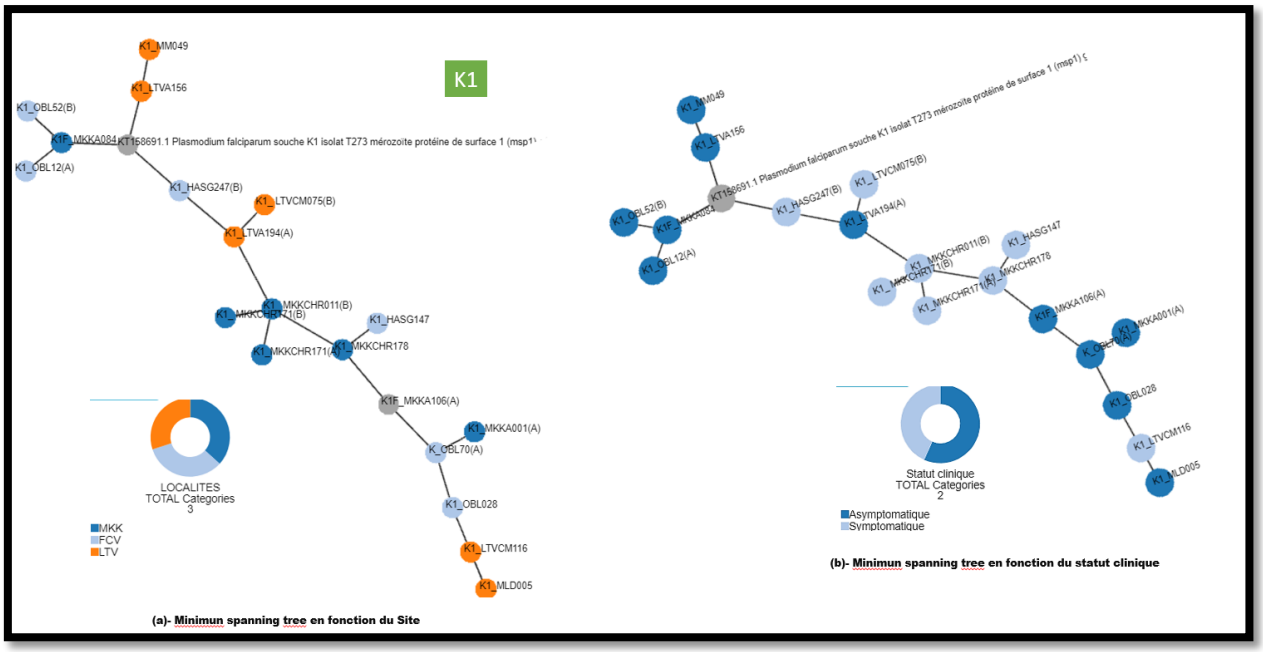


Figure 17: Minimum spanning Tree des séquences de l'allèle K1 du gène *par statut clinique et site.*

(Légende : HASG=symptomatique Franceville, OBL=asymptomatiques Franceville, LTVA et MLD= asymptomatiques Lastoursville, LTVCM= symptomatiques Lastoursville, MKKCHR= symptomatiques Makokou, MKKA= asymptomatiques Makokou)

Pour les séquences de la famille allélique Mad20 61 à 92% d'identité ont été observé entre l'ensemble des séquences analysées entre elles et un pourcentage de plus de 85% a été observé avec les isolats MG004517.1 et MG004515.1 de Papouasie nouvelle Guinée [132], KT158695.1 de

Malaisie et Thaïlande , AY947642.1 du Myanmar et AB502529.1 de Centre Afrique [131, 133, 134]. Bien qu'une similitude soit observée entre les séquences étudiées ici, les séquences de l'allèle Mad20 n'ont pas montré une similitude en fonction de la symptomatologie ou de la localité.

La figure 18 présente l'arbre généré avec les 10 séquences de l'allèle Mad20. Dans ce cas, il a été observé que les génotypes de Mad20 retrouvés à Franceville ont tendance à se regrouper en un complexe clonal, mais une distribution régionale claire n'a pas été établie. Aussi aucune distribution claire des allèles n'a été mise en évidence entre les isolats symptomatiques et asymptomatiques.

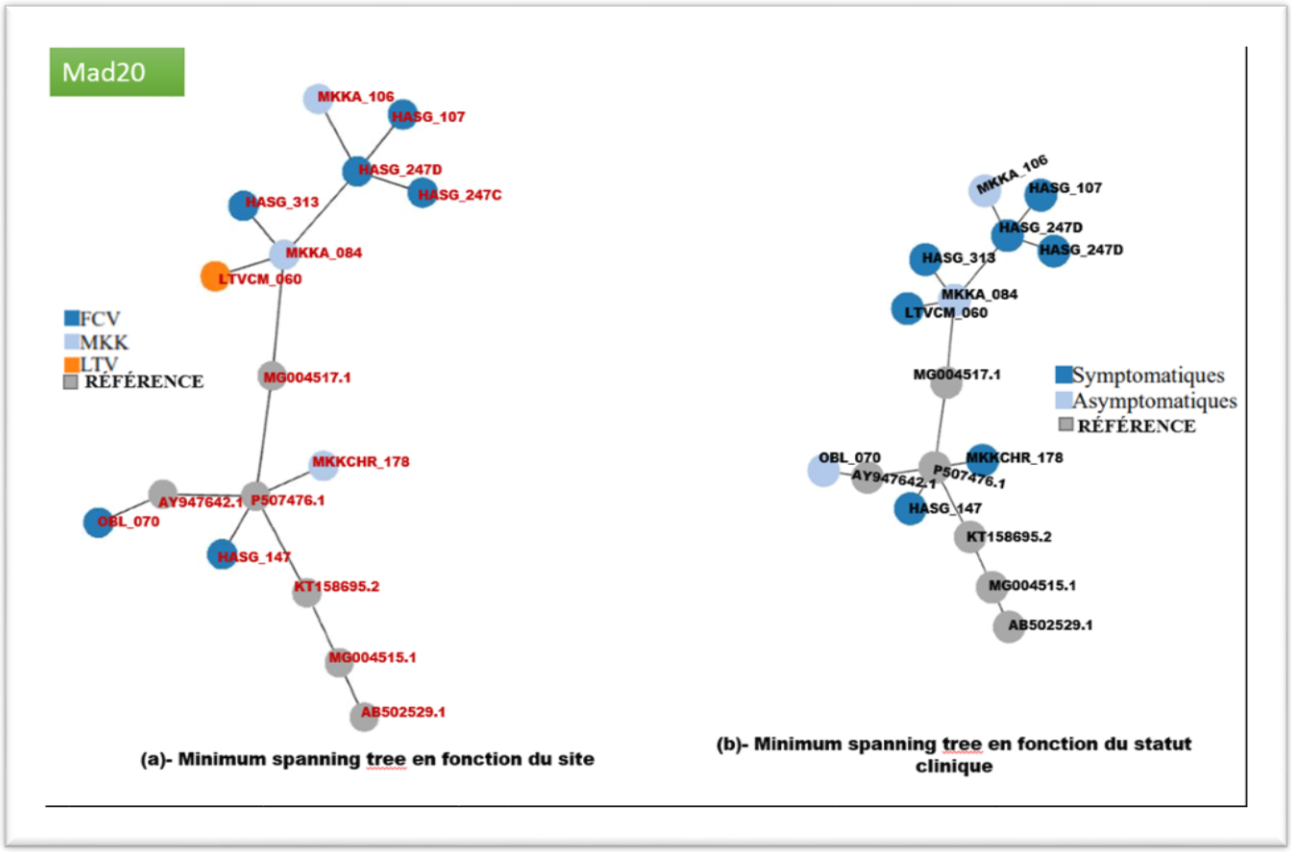


Figure 18: Minimum spanning Tree des séquences de l'allèle Mad20 du gène par statut clinique et site.

(Légende : HASG=symptomatique Franceville, OBL=asymptomatiques Franceville, LTVA et MLD= asymptomatiques Lastoursville, LTVCM= symptomatiques Lastoursville, MKKCHR= symptomatiques Makokou, MKKA= asymptomatiques Makokou)

L'allèle RO33 bien qu'étant monomorphe en PCR, les séquences de cet allèle ont montré une similitude allant de 91 à 97% entre elles. Et un pourcentage d'identité de plus de 94% a été observé avec les isolats d'autres pays tel que la séquence MH982068.1 du Myanmar [135]. Cependant les séquences des isolats asymptomatiques OBL052, OBL028, MLD005, MM049, et LTVA194 étaient similaires avec des pourcentages d'identité supérieurs à 94%. Les autres échantillons bien qu'ayant des pourcentages d'identité remarquables présentent un mélange entre les isolats symptomatiques et asymptomatiques. Bien qu'ayant des fortes similitudes, ces différents isolats ne présentent pas de séquences spécifiquement similaires par localités.

La figure 19 présente, les différents génotypes de l'allèle RO33. Bien qu'un regroupement clair en fonction de la localité n'ait été observé, il serait important de noter que certains types d'allèles provenant de la même localité étaient très proches. IL serait également important de signaler que pour l'allèle RO33, deux complexes clonaux ont été observés en fonction du statut clinique. Les allèles OBL_052, OBL_028, MLD_005, MM_049, LTVA_194 ont été trouvé dans les isolats asymptomatiques. La deuxième grappe regroupe en majorité les isolats symptomatiques et un seul isolat asymptomatique y a été observé. Cela pourrait suggérer une association particulière entre certains génotypes de RO33 et le statut clinique.

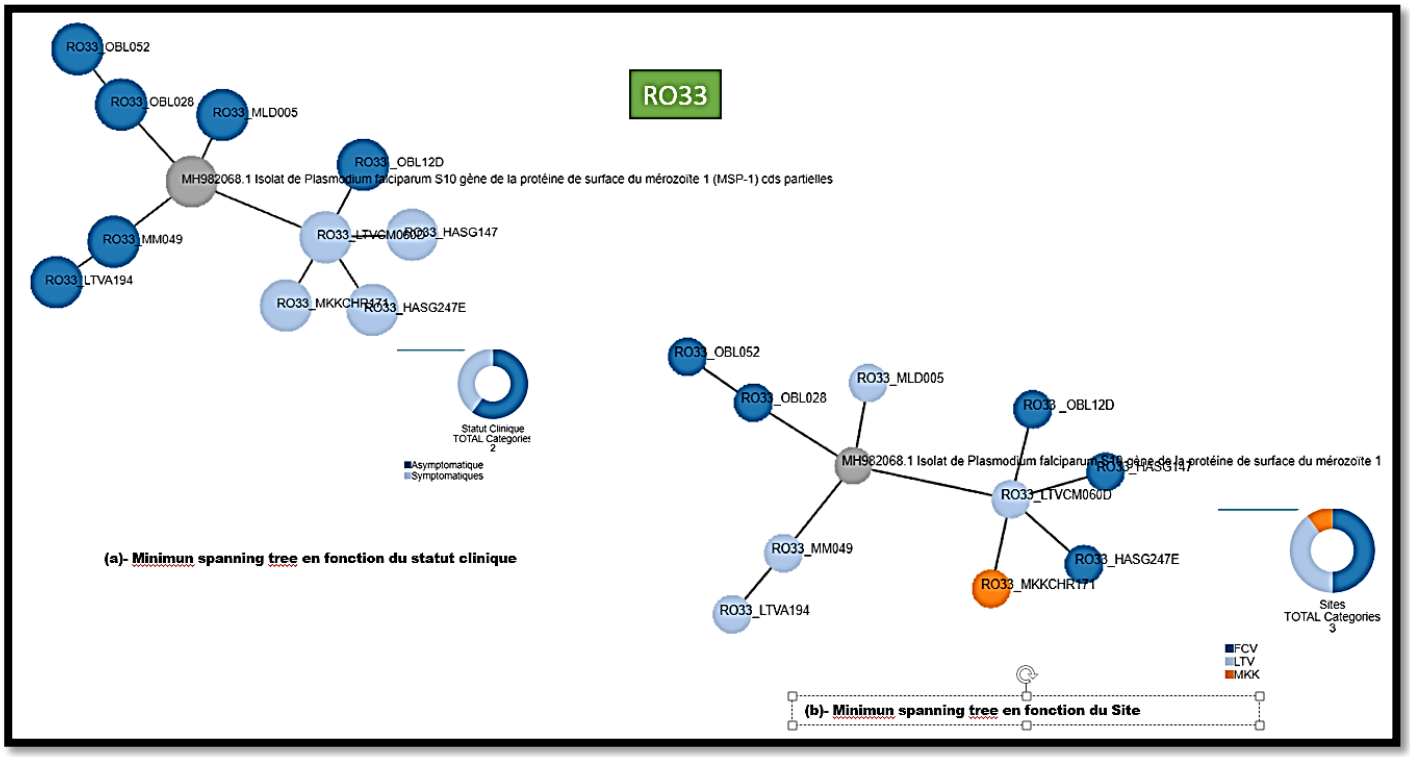
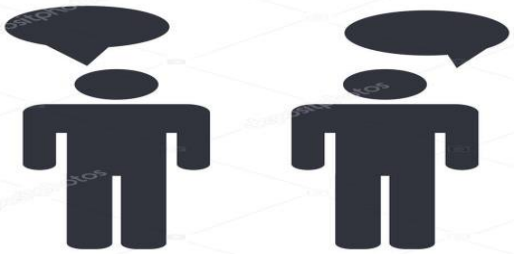


Figure 19: Minimum spanning Tree des séquences de l'allèle RO33 du gène *par statut clinique et site*

(Légende : HASG=symptomatique Franceville, OBL=asymptomatiques Franceville, LTVA et MLD= asymptomatiques Lastoursville, LTVCM= symptomatiques Lastoursville, MKKCHR= symptomatiques Makokou, MKKA= asymptomatiques Makokou)

PARTIE 6 : Discussion



Les infections à Plasmodiums restent un véritable probème de santé publique en Afrique, car malgré des efforts mondiaux pour éradiquer le paludisme, la volonté d'éliminer cette pandémie est loin d'être réaliste dans les communautés endémiques d'Afrique, dû en partie au fait que le portage parasitaire asymptomatique, qui n'est pas spécifiquement ciblé par la plupart des interventions, reste le socle qui alimente la transmission. Aussi, cette étude sur l'épidemiologie du paludisme et la virulence parasitaire chez les enfants gabonais vivants à Franceville (milieu Urbains, Lastoursville (milieu Rural) et Makoukou (milieu semi-urbain), est la première qui évalue d'une part la prévelance de l'infection plasmodiale asymptomatique et symptomatiques et d'autre part le polymorphisme génétique des gènes *msp1, msp2 et ama1*de *Plasmodium spp*. dans trois milieux différents en tenant compte du contexte géographique. Nous avons comparé la prévalence de l'infection plasmodiale entre enfants symptomatiques et asymptomatiques vivant dans trois localités située dans le Sud_Est et le Nord_Est du Gabon avec des contexte épidemiologiques differents. Et nous avons évalué la diversité génétique des souches de plasmodiums afin d'en déterminer celle qui seraient apte à induire ou pas la symptomatologie clinique.

L'âge moyen des enfants infectés dans la population générale, était significativement inférieur à celui des enfants non infectés. Ce résultat concorde avec ce qui est connu [11]. En effet l'immunité antipaludique s'acquière avec le temps. En zone de forte endémie, les enfants ayant plus de 5 ans ont rencontré un maximum de souches qui les protègent des infections plasmodiales [110].

L'âge moyen des enfants infectés symptomatiques était plus élevé à Franceville par rapport à Makokou et Lastoursville. Ces résultats corroborent ceux de 2013-2014 qui montraient que l'âge moyen des enfants infectés symptomatiques était plus élevé en milieu urbain qu'en milieu rural et semi-urbain [110]. Cela pourrait s'expliquer par le fait que, la prévalence du paludisme était plus élevée à Lastoursville et Makokou qu'à Franceville, ce qui aurait conduit à une acquisition plus rapide de l'immunité anti palustre à Lastoursville qu'à Franceville [110, 136]. Par ailleurs, l'âge moyen des enfants infectés asymptomatiques était significativement plus élevé à Makokou que dans les deux autres localités. Ce qui est contradictoire aux données d'études citées ici, mais ces données ont été obtenues à partir d'échantillons d'enfants symptomatiques [110, 136]. Par contre l'âge moyen des enfants infectés asymptomatiques était significativement plus élevé en milieu urbain qu'en milieu rural. Cela concorde avec ce qui a été démontré précédemment, la prévalence du paludisme était plus élevée à Lastoursville qu'à Franceville, ce qui aurait conduit à une acquisition plus rapide de l'immunité anti palustre à Lastoursville qu'à Franceville [110, 136]. Aussi, en milieu urbain les mesures de lutte antipaludiques principalement axées contre les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes, sont plus accessibles qu'en milieu rural, conduisant à une exposition précoce des

enfants vivant en zone rural. Ce qui pourrait donc conduire à une acquisition rapide de l'immunité chez les enfants vivant en zone rurale.

Dans cette étude, la moyenne d'age des enfants asymptomatiques était significativement plus élevée que celle des enfants symptomatiques dans les trois localités. Ces données sont cohérentes avec les résultats d'études antérieures qui ont montré que les enfants asymptomatiques étaient plus agés que les enfants symptomatiques [137, 138]. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'étude a été réalisée dans trois zones d'endémicité palustre, et l'age est considéré comme étant l'un des facteurs en corrélation avec l'immunité protectrice dans les zones d'endémie palustre. En effet les jeunes enfants sont plus vulnérables, mais les adultes et les jeunes adolescents ayant acquis une forme d'immunité après plusieurs expostion au parasite sont plus susceptibles de porter des infections asymptomatiques [137, 138]. Ils peuvent servir de réservoir de transmission car l'immunité antipalustre acquise conduit à une persistance de l'infection asymptomatique ou à des infections symptomatiques faibles qui sont souvent moins prises en charge par rapport aux infections aigues qui apparaissent chez des jeunes enfants [137].

Les paramètres hématologiques variaient considérablement en fonction de la symptomatologie et du faciès socio-géographique. Une diminution du taux d'hémoglobine a été observée chez tous les enfants infectés, induisant une anémie chez ces derniers, ceci est confirmé par le faible taux moyen de globules rouges des enfants infectés. Bien que l'étiologie de l'anémie dans les zones tropicales soit multifactorielle, nos données sont cohérentes avec plusieurs autres études montrant que l'anémie au cours du paludisme à *P. falciparum* est étroitement associée à la parasitémie du paludisme [50, 139, 140]. De plus, il a été montré que chez les enfants infectés par *P. falciparum*, une combinaison d'hémolyse de globules rouges parasités et non parasités et de dépression de l'érythropoïèse induisant une anémie est souvent observée [141]. En revanche, à Franceville (milieu urbain), le taux de globules rouges et d'hémoglobine n'était pas significativement différents entre symptomatiques et asymptomatiques ; cela peut être dû au fait que dans cette localité les densités parasitaires n'étaient pas significativement différents entre les deux groupes d'enfants, car il a été montré que la densité parasitaire aurait un impact sur la survenue de l'anémie chez un individu [141]. Par ailleurs, en zones semi-rural (Makokou), bien qu'une baisse de la moyenne du taux d'hémoglobine et du nombre de globules rouges a était observée dans les deux groupes, ces deux paramètres hématologiques étaient significativement plus bas chez les enfants symptomatiques comparés aux asymptomatiques. Cette différence pourrait être due à une destruction massive de globules rouges chez les enfants infectés symptomatiques de cette localité et aussi, la moyenne de densités parasitaire élevée observée chez les enfants symptomatiques pourrait expliquer cette différence [141]. De même, la forte prévalence de l'anémie dans les zones rurales pourrait être due à

la forte circulation de parasites intestinaux dans ces zones [142]. Bien que la thrombopénie chez les enfants infectés dans les régions d'Afrique subsaharienne soit très souvent fréquente [141], notre étude n'a pas relevé de présence de thrombopénie chez les enfants infectés. Mais une différence du taux de plaquettes a été observée entre les enfants symptomatiques et asymptomatiques à Makokou. La baisse du taux de plaquettes chez les enfants symptomatiques par rapport aux asymptomatiques serait le résultat d'une augmentation de la consommation du taux de plaquettes dans le sang périphériques chez les enfants infectés. Ce qui confirme les rapports d'études ayant montré une stimulation des cytokines en réponse aux globules rouges parasités, pouvant activer la cascade de coagulation, la consommation d'antithrombine III, la concentration accrue de produits de dégradation du fibrinogène (FDP) et l'augmentation de la clairance splénique des plaquettes entraînent une coagulopathie et une thrombocytopénie chez les patients atteints de paludisme [143]. Dans le groupe des enfants symptomatiques, seuls les globules rouges, le taux d'hémoglobines étaient significativement différents entre les 3 localités. Or dans le groupe des enfants asymptomatiques une différence du taux de globules blancs et du nombre de plaquettes a été observée. Ces résultats concordent avec les résultats d'études antérieures menées dans différentes régions du Gabon qui ont montré des profils similaires en termes de paramètres hématologiques selon la surface habitable des enfants infectés [13, 110].

La prévalence de l'infection plasmodiale a été explorée dans les échantillons d'enfants symptomatiques et asymptomatiques à Franceville (milieu urbain), Makokou (milieu semi-urbain) et Lastoursville (milieu rural). Les données présentés ici ont permis de mettre en évidence une grande différence de prévalence de l'infection plasmodiale entre les trois localités et au sein de ces trois zones. Cela permet de confirmer et comprendre la disparité des caractéristiques épidémiologiques de l'infection plasmodiale au niveau du Gabon. En effet, La prévalence de l'infection plasmodiale était plus élevée en milieu rural et semi-urbain qu'en milieu urbain, probablement en raison de la différence du niveau socio-économique des enfants résidents dans ces localités et aussi de la structuration géographique. De plus les enfants vivants en milieu urbain ont facilement accès aux soins de santé et aux traitements comparés à ceux des zones rurales et semi-urbaines. Cette disparité a également été mise en évidente par une étude ménée à Libreville, qui montrait que le niveau d'urbanisation, le type de logement et le niveau socio-économique pourraient avoir un impact sur la transmimission du parasite [144]. En milieu urbain, la prévalence globale de l'infection plasmodiale a été estimée à 21,6%. Ces résultats sont en accord avec ceux des études antérieures menées dans cette même localité et qui montraient que la prévalence de l'infection plasmodiale chez l'enfant fiévreux en milieu urbain était d'environ 20% [12]. L'absence de différence de prévalence entre asymptomatique et symptomatique confirme le faible niveau de circulation du parasite dans cette localité. Le niveau de prévalence chez les enfants asymptomatiques pourrait

expliquer la stagnation de la prévalence du paludisme depuis 2010 malgré la mise en œuvre de politiques de lutte contre les infections au Gabon [12, 13, 110]. Les prévalences globales de l'infection plasmodiale en milieux semi-urbain et rural étaient comparables à celles décrites précédemment [110, 111]. La proportion d'enfants fébriles portant une infection à *plasmodiums Spp* en milieux semi-urbain et rural était significativement plus élevée que celle des enfants non fébriles. Cette observation peut être dû au fait que dans ces deux localités, la moyenne d'âge était significativement variable entre les enfants infectés, car comme le suggèrent certaines études, les infections asymptomatiques sont plus fréquentes chez les jeunes adolescents et les personnes adultes résidents en zones d'endémie palustre. Ces jeunes adolescents et les adultes à force d'exposition au parasite ont acquis une immunité protectrice qui limiterait l'apparition de symptômes, ce qui n'est pas le cas pour les enfants de moins de cinq ans qui sont susceptibles de développer un paludisme [145]. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans une étude réalisées au Cameroun en milieu semi-urbain qui énonce une prévalence significativement élevée chez les enfants asymptomatiques (30,7%) comparés aux symptomatiques (17,8%) [146]. Les prévalences des infections asymptomatiques enregistrées dans ces 2 milieux restent non négligeables, car les personnes atteintes d'infections plasmodiales asymptomatiques sont des réservoirs silencieux du parasite et posent un sérieux défi aux efforts de lutte contre la maladie en raison de leur capacité à maintenir la transmission au sein de la population à un faible niveau.

L'infection plasmodiale symptomatique était significativement plus élevée en milieu semi-urbain et rural qu'en milieu urbain, comme le montrait une étude récente [110]. Ceci pourrait être dû au niveau de connaissance sur le paludisme des personnes vivant en zone urbaine conduisant à une utilisation plus effective des moyens de prévention, lesquels ont un impact significatif sur la circulation de *Plasmodium* et la réduction de la prévalence de l'infection plasmodiale. Ces différences pourraient être d'une part attribuée au fait qu'en milieu urbain les populations sont mieux logées que celles vivant en milieu rural et semi urbain, car il a été montré qu'un meilleur logement réduirait la transmission de l'infection plasmodiale. D'autre part, les environnements urbains sont moins favorables aux espèces vectrices, en particulier *An. gambiae,* qui a une forte préférence pour les eaux non polluées [147]. La durée de vie d'*An. gambiae* dans les zones urbaines a été mesurée à moins de la moitié de sa durée de vie dans les zones rurales (4,1 contre 11 jours) dans une étude à Kinshasa, République démocratique du Congo [148]. La dispersion des moustiques est également beaucoup plus limitée dans les zones urbaines en raison de la densité de logement plus élevée [149], ce qui rend la transmission du paludisme urbain très focalisée [150]. A Franceville, les populations sont mieux logées que dans le milieu rural et semi-urbain. Or un logement de meilleure qualité diminue le risque de paludisme car il minimise les points d'entrée des moustiques pendant la nuit. Pour illustrer cela,

une étude en Gambie a montré que les maisons avec des enfants infectés par le paludisme sont plus susceptibles

Nous avons mis en évidence dans cette étude que l'infection plasmodiale asymptomatique était élevée dans les zones rurales par rapport aux deux autres localités. Cette observation est étayée par le fait que les enfants des zones rurales ont développé une immunité antipaludique non stérilisante en raison d'une longue exposition au parasite. Ce n'est pas le cas des enfants des zones urbaines qui sont surprotégés. Et donc le fait que la prévalence des infections asymptomatiques soit élevée dans les zones rurales assure un maintien accru de la prévalence des infections plasmodiales dans cette localité. Cette étude montre que la prévalence du paludisme au Gabon diffère considérablement selon la situation économique locale, confirmant les données précédentes [111]. Cela peut s'expliquer par le fait que dans les zones rurales, les antipaludiques sont mal utilisés malgré la disponibilité des ACT. De mauvaises conditions socio-économiques et une connaissance insuffisante du paludisme pourraient contribuer à la forte prévalence du paludisme dans les zones rurales.

Nous avons réalisé des analyses moléculaires basées sur la méthode de Snounou [119] afin de déterminer l'espèce plasmodiale en cause. Notre analyse a permis de mettre en évidence trois espèces plasmodiales (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*) et d'en déterminer les prévalences en termes de mono et de coinfections. *Plasmodium falciparum* était responsable de la majorité des infections plasmodiales avec une prévalence de 91,4% dans l'ensemble, confirmant qu'il s'agit de l'espèce majoritaire au Gabon. La prévalence de l'infection à *P. falciparum* était plus élevée que celle des autres espèces aussi bien à Franceville, Makokou et Lastoursville, aussi bien dans les isolats symptomatiques qu'asymptomatiques. *P. malariae* quant à lui était la deuxième espèce la plus répandue. Cette espèce a été identifiée en monoinfection en milieu semi-urbain (symptomatique = 1,3%, asymptomatique = 15% (n =3), et en milieu rural (où les cas de monoinfections à *P. malariae* n'ont été signalées que chez les enfants asymptomatiques 6,02%). Des coinfections ont également été observées entre *P. falciparum* et *P. malariae* dans l'ensemble des échantillons analysés. *P. ovale* n'a pas été identifié en mono infection mais un cas de coinfections avec *P. malariae* et *P. falciparum* a été mis en évidence chez les asymptomatiques de Franceville. Les résultats de cette étude sont en accord avec certaines études antérieures réalisées au Gabon, qui montraient déjà que les infections à *P. falciparum* étaient les plus répandues en milieu urbain, semi-urbain et rural, que l'on soit symptomatique ou non [11, 14, 116]. Cela suggère que, malgré la réduction du poids du paludisme au Gabon, la répartition des espèces chez les enfants infectés n'a pas changé et que *P. falciparum* demeure l'espèce majoritaire en cause. En revanche, parmi les personnes asymptomatiques vivant dans les zones rurales du Gabon, il a été récemment rapporté par deux études *que P. malariae* représentait 21,9% à 47,6% des cas d'infections plasmodiales. Ces résultats sont en accord avec ceux

de notre étude qui montrent que la prévalence de cette espèce était élevée dans les isolats asymptomatiques en milieu semi urbain et rural [15, 151]. Cela pourrait suggérer une sélection de *P. falciparum* au détriment d'autres espèces en cas d'infection palustre symptomatique. Une autre explication possible est l'utilisation de différentes méthodes de diagnostic. Délicat-Loembet et al. ont utilisé le séquençage 454 pour identifier les espèces de *Plasmodium,* tandis que d'autres auteurs ont utilisé des méthodes moins sensibles (PCR-RFLP et frottis sanguins avec TDR,) [11, 15, 110]. La faible sensibilité de la PCR peut être expliquée par un rendement insuffisant et la faible sensibilité du jeu d'amorces utilisé. Malgré la non-détection de *P. ovale* en mono infection dans notre étude, cette espèce est parfois rencontrée à Franceville et nous avons diagnostiqué un cas de coinfection à *P. ovale/P. falciparum/ P. malariae* au cours de cette étude. Nous confirmons que *P. vivax* ne circule pas chez l'homme dans le Sud-Est du Gabon. Toutes ses observations pourraient s'expliquer par la sélection de certains clones parasitaires plus virulents que d'autres et susceptibles d'induire la maladie. Et aussi par le fait que *P. falciparum* serait plus apte à induire la symptomatologie que les autres espèces.

L'analyse du profil génétique de *Plasmodium Spp*., obtenu après PCR, en fonction du type d'infection, peut fournir des informations utiles sur les caractéristiques de certains clones parasitaires spécifiques afin de concevoir des stratégies d'intervention ciblant les facteurs de virulence [152]. Il a été démontré que la plupart des allèles fluctuent considérablement au fil des ans et peuvent varier d'une région endémique à une autre [153]. La présente étude est la première à évaluer les facteurs de virulence de *Plasmodium Spp* en milieu urbain, rural et semi-urbain chez des enfants asymptomatiques et symptomatiques dans le Sud-Est et le Nord-Est du Gabon.

De façon globale, les résultats de notre étude ont montré que les trois familles alléliques K1, Mad20 et Ro33 du gène *msp-1* et les deux familles alléliques 3D7 et FC27 du gène *msp-2* étaient présentes dans les trois sites d'étude. La distribution de ces familles alléliques était différente en fonction du site, les familles alléliques Mad20 et Ro33 étaient plus fréquentes en milieux urbain qu'en milieu semi urbain et rural. Et la fréquence de 3D7 était plus importante que celle de FC27 en milieu semi-rural. Cela confirme l'hypothèse selon laquelle la fréquence des familles alléliques des gènes *msp-1 et msp-2* pourrait varier entre les localités et même au sein de la même localité [123, 154, 155]. Les familles alléliques K1, Mad20 et FC27 étant les plus fréquemment rencontrées. Des études réalisées au Gabon, au Burkina Faso et en Côte d'Ivoire ont décrit une fréquence élevée des familles alléliques K1 et 3D7, mais dans cette étude la fréquence de la famille allélique FC27 y était inférieure à celle de 3D7 [154, 155]. La famille allélique Mad20 était la plus fréquente dans les isolats d'enfants symptomatiques par rapport aux asymptomatiques, dans l'ensemble des échantillons aussi bien en milieu urbain que rural. Cette famille allélique pourrait jouer un rôle important dans le paludisme

symptomatique, du moins au Gabon. Ceci est différents des données décrites dans la littérature car les familles allélique K1et 3D7 ont souvent été associées à l'infection symptomatique [154] que FC27. La fréquence des familles alléliques FC27 et 3D7 n'était pas différente entre symptomatiques et asymptomatiques, ce qui prouve qu'il n'existerait pas des variant spécifiques de *msp2 qui* pourraient être associés au statut clinique. Ces résultats sont appuyés par des études qui ont montré qu'il n'y avait pas d'association entre les familles alléliques FC27 ou 3D7 et le type d'infection [156] . A l'inverse, une autre étude a rapporté une fréquence de la famille 'allélique FC27 deux fois plus élevée dans les isolats symptomatiques par rapport aux asymptomatiques [61]. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour clarifier l'interprétation de ces résultats.

Dans l'ensemble, notre étude a rapporté une forte diversité génétique avec quarante-sept (47) génotypes pour le gène *msp-1 et 44 génotypes pour le gène msp-2 chez les parasites retrouvés dans le Sud-Est et le Nord-Est du Gabon. Ces différents génotypes étaient* répartis comme suit, 23 allèles K1et Mad20 1 allèle Ro33 (tailles de fragment 195-600pb) pour le gène *msp1*. Dans le gène *msp2*, 19 allèles pour 3D7 (plage de fragments de et 27 allèles différents pour FC27 (plage de fragments de 394-600pb) ont été mis en évidence. Cette observation est cohérente avec celle de certaines études menées dans différents pays d'endémie palustre en Afrique [85, 124, 154]. La forte diversité génétique des parasites peut être liée à la forte prévalence de l'infection plasmodiale dans la zone étudiée ou des prévalences allant de 20% à environ 70% ont été trouvée [110]. Cette grande diversité observée pourrait également être associée au risque élevé d'être infecté par plusieurs clones parasitaires de génotypes différents. De même la mise en place des méthodes de lutte et l'utilisation d'antipaludique pourraient aussi entrainer une forte diversité génétique [123]. Trente-un (31) et Vingt-huit (28) allèles différents du gène *msp-2* ont été identifiés dans les isolats d'enfants asymptomatiques et symptomatiques respectivement. La fréquence allélique de 3D7 et de FC27 n'était pas significativement différente entre les isolats d'enfants symptomatiques et asymptomatiques. Cela suggère que la diversité allélique de FC27 et 3D7 dans les deux groupes était la même et qu'il n'y a pas de lien entre l'état clinique et le polymorphisme de ces allèles. Pour le gène *msp1*, 29 génotypes différents et 36 génotypes différents ont été identifiés dans les isolats d'enfants asymptomatiques et symptomatiques respectivement. Les variants alléliques de type K1 et Mad20 avaient des fréquences similaires entres les isolats d'enfants asymptomatiques et symptomatiques. Suggérant un polymorphisme élevé de cet allèle dans les isolats asymptomatiques et symptomatiques. Ce résultat est différent de celui d'autres études qui ont mis en évidence un lien entre l'infection asymptomatique et le polymorphisme de l'allèle K1 [70, 85]. Les différents génotypes des allèles des gènes *msp-1* et *msp-2* identifiés à la fois dans les isolats symptomatiques et asymptomatiques n'avaient pas de fréquences significativement différentes. Cela suggère que le statut cliniques des enfants inclus dans l'étude n'était pas liés au polymorphisme génétique., Cela corrobore les résultats

d'une étude qui ont montrés que , certains génotypes ont été trouvés avec des fréquences élevés dans les isolats symptomatiques et asymptomatiques mais qui n'étaient pas différents entre les deux groupes [155, 157] . En effet, le polymorphisme génétique est fortement affecté par le niveau d'endémicité. Avec une forte endémicité, les infections et croisements multiclonaux sont prédominants [124]. Par ailleurs, 12 génotypes Mad20, 8 génotypes FC27, 4 génotypes K1 et 8 génotypes 3D7 ont été uniquement retrouvés dans les isolats symptomatiques. Et 4 génotypes K1, 3 génotypes Mad20, 7 génotypes FC27 et 5 génotypes 3D7 différents ont été uniquement retrouvés dans les isolats asymptomatiques. Ces résultats confortent l'idée selon laquelle, certains clones parasitaires pourraient être responsables de l'état clinique d'un individu. Cependant, le lien entre l'état clinique et un génotype quelconque de *P. falciparum* reste un sujet à controverse. Car, de nombreuses études ont montré que la présence d'épisodes palustres subséquents pourrait être due à de nouveaux parasites infectieux [126].

Un polymorphisme génétique élevé au sein des familles alléliques des gènes *msp1* et 2 a été observé dans les isolats de Franceville (27 allèles pour *msp-1*et 17 allèles pour *msp-2* identifiés), de Lastoursville (22 allèles) pour *msp-1* et 20 allèles pour *msp-2*) et de Makokou (18 allèles *msp*-2 et 17 allèles *msp-1*). Nos résultats sont inférieurs à ceux décrits à Libreville (30 allèles), à Dielmo au Sénégal (33 allèles) en 1995 et au Burkina Faso en 2009 (41 allèles) de et identique à ceux de Bakoumba près Franceville (25 allèles) en 1999 [71, 114, 124]. Cette diversité allélique pourrait être expliquée par le fait que la diversité génétique de *P. falciparum* varie d'une région à une autre et au sein d'une même population [71]. Certains génotypes étaient communs entre Lastoursville et Franceville, puis entre Makokou et Lastoursville, enfin entre les trois localités. Cette observation pourrait amener à tirer la conclusion selon laquelle certains génotypes pourraient facilement circuler entre Franceville et Lastoursville du fait de la proximité de ces deux villes. Aussi le faciès démographique de Lastoursville et de Makokou étant presqu'identique, il n'est donc pas étonnant que ces deux localités partagent un plus grand nombre de génotypes parasitaires par rapport à Franceville et Makokou. Cette différence de fréquences alléliques dans les trois localités pourrait également être due à la différence de Prévalence observée ici. En effet en milieu semi-urbain et rural la prévalence de l'infection plasmodiale était plus élevée qu'en milieu urbain.

Le nombre de génotype *msp-1* et *msp-2* par isolat variait de 1à 5 et de 1à 4 respectivement. La MOI est un indicateur du niveau de transmission du paludisme car il devait être plus élevé dans les zones à forte transmission et bas dans les zones à faible transmission [158]. Notre étude est en phase avec cette hypothèse car des MOIs élevés ont été trouvés dans toutes les localités avec des valeurs allant de 1,96 à 2,78. La MOI pourrait également être un indicateur utile de l'état immunitaire. Il a été suggéré que le MOI était associée aux symptômes des infections à *Plasmodium* [159,

160]. Cependant, bien que la MOI était élevé dans toutes les localités, aucune différence significative de MOI entre symptomatiques et asymptomatiques, chez *P. falciparum* n'a été mise en évidence dans notre étude. Cette valeur élevée de MOI pourrait s'expliquer par le fait que la transmission du paludisme pourrait être élevée dans les zones étudiées du fait de la prévalence élevée de *P. falciparum* observée dans cette étude.

De plus, une diversité génétique forte a été trouvée dans notre étude avec un indice de diversité (He) allant de 0,6 à 0,9 pour les deux gènes. La valeur d'He était plus importante pour *msp-2* comparé à *msp-1*. Par ailleurs, l'indice de diversité n'était pas significativement différent entre les sites, et entre les deux statuts cliniques pour les deux gènes. Ce manque de variabilité entre les niveaux de diversités génétiques observées à l'intérieur du pays n'est pas en conformité avec les paramètres épidémiologiques locaux du pays. Car on s'attend à ce que le niveau de diversité soit élevé dans les zones à forte transmission. De plus, La diversité génétique des deux marqueurs combinés suit plus ou moins un gradient du Sud au Nord : la diversité était premièrement plus importante à Franceville puis à Lastoursville et enfin à Makokou. Dans cette étude l'He ne reflète pas le niveau de prévalence, car ici la prévalence de l'infection plasmodiale était la plus importante à Lastoursville et Makokou par rapport à Franceville. Des résultats contraires ont été trouvés au Sénégal et au Mali ou les valeurs d'H_e augmentent avec le gradient de transmission du nord au Sud [161]. L'Hétérozygotie élevée observée dans ces localités pourrait indiquer une réduction de l'expansion clonale et une augmentation de la diversité génétique dans ces localités. Cela signifierait également que la diversité génétique de *P. falciparum* augmenterait dans les zones à forte transmission et diminuerait lorsque la transmission régresse [162].

Concernant le Fst, nous avons trouvé des différenciations génétiques modérées des populations parasitaires de *P. falciparum* entre les trois sites. Les valeurs moyennes de Fst trouvées entre les populations de *P. falciparum* montrent qu'il existerait une plus grande proximité des populations entre Franceville et Lastoursville puis entre Lastoursville et Makokou. Mais une différence plus importante de différenciation génétique a été observée entre Franceville et Makokou. Ce résultat est cohérent avec la proportion de génotypes communs aux divers sites. Ces données révèlent également un flux de gènes entre les populations parasitaires de Franceville et Lastoursville facilité par de vastes migrations humaines entre Franceville et Lastoursville et provoquant ensuite le déplacement du vecteur. De plus, la plus grande proportion de partage d'allèles a été observée entre Franceville et Lastoursville, puis entre Lastoursville et Makokou. Bien que nos résultats soient supérieurs à ceux du Sénégal, confirment qu'il pourrait exister un flux de gènes entre populations parasitaires facilité par des évènements de migration humaine entre régions endémiques et facilitant le déplacement du vecteur [163, 164]. Des études de différenciation génétique n'ont pas encore été

réalisées dans nos différentes localités, mais des études réalisées dans d'autres pays, ont signalé un manque de différenciation génétique [158, 165]. C'est le cas de notre étude car l'étude du flux des populations parasitaires entre symptomatiques et asymptomatiques a permis d'observer une grande proximité des populations entre les deux groupes cliniques (Fst = 0.03134).

Nous avons par la suite analysé le gène *ama1* chez *P. malariae et P. falciparum,* sur les 48 échantillons amplifiés seuls 8 étaient Tous étaient mono infectés et provenaient des échantillons asymptomatiques de Lastoursville. Ce gène n'a pas été amplifié dans les isolats de *P. malariae* à Makokou et à Franceville. Ce résultat nous donne une idée limitée sur la diversité allélique d'*ama1 de P. malariae.* Nous confirmons les résultats d'une étude récente qui a montré une faible variabilité du gène *Pmama1* [125] . La faible variabilité de ce gène dans les isolats de notre étude pourrait être compatible avec un faible taux de transmission et de prévalence de *P. malariae* dans les localités ou ce gène a été amplifiés. Et vu le faible nombre d'échantillons positifs il serait donc difficile d'établir un lien entre ce marqueur et la virulence de *Plasmodium Spp*.

Contrairement aux études précédentes réalisées au Gabon, un séquençage des allèles K1, Mad20 et RO33 du gène *msp-1* basé sur la méthode de Sanger [127] a été réalisé afin de mieux apprécier la diversité génétique de populations parasitaires et voir s'il existerait des clones particuliers responsables de la virulence. Dans cette étude les tailles de fragments amplifiés étaient très variables, montrant un important polymorphisme de longueur taille, comme cela a été le cas au Cameroun [166]. Cependant, le séquençage et l'alignement des séquences ont confirmé un polymorphisme d'identité. Ainsi lors de l'alignement de séquences une forte similitude a été observée entre les isolats analysés ici et ceux provenant d'autres pays notamment la Thaïlande la Malaisie [131, 166, 167], le Myanmar, la Papouasie Nouvelle Guinée, la Centre Afrique [132-135]. Les séquences des allèles K1 et RO33 ont montré une forte similitude entre certains isolats asymptomatiques d'une part et symptomatiques d'autre part. Cette observation est confirmée par l'analyse d'arbres couvrant le minimum de vraisemblance (minimum spanning tree) qui a permis de mettre en évidence certaines grappes se regroupant en fonction de la symptomatologie. Par ailleurs, bien que des groupes de séquences appartenant soit aux échantillons symptomatiques ou asymptomatiques uniquement ont été détectés dans les séquences des allèles K1 et RO33, ces observations ne nous permettent pas de dire s'il existerait des clones particuliers responsables du type d'infection. Car le fait que la majorité des séquences homologues appartenant à ces différents groupes, soient identifiées dans la même localité, pourrait tout simplement traduire une circulation accrue de ces parasites au sein de cette localité. D'autres analyses sont donc utiles afin de déterminer s'il existerait des clones parasitaires responsables de l'infection symptomatique ou asymptomatiques, car à ce stade de notre analyse aucune conclusion ne peut être tirée.

Conclusion et Perspectives

Cette étude est une contribution à l'épidémiologie de l'infection plasmodiale et de la distribution des espèces infectant l'Homme dans le Sud-Est du Gabon, notamment à Lastoursville, Makokou et Franceville. La particularité de ce travail est qu'il est le premier qui a permis non seulement de comparer la prévalence de l'infection plasmodiale en fonction du profil social et de la symptomatologie clinique en milieux urbain, rural et semi-rural, mais aussi d'apporter des informations nécessaires sur la distribution des espèces plasmodiales et la diversité génétique de *Plasmodium SPP*., sur le rôle des différents marqueurs de virulence dans l'apparition ou l'absence de symptômes chez les enfants infectés. La prévalence de l'infection plasmodiale variait d'un milieu à un autre selon que l'on soit asymptomatique ou pas. Elle était plus élevée en milieu rural et semi rural chez les enfants symptomatiques. Mais chez les enfants asymptomatiques une haute prévalence a été mise en évidence en milieu rural par rapport aux milieux urbain et semi-urbain. En milieu urbain, la prévalence de l'infection plasmodiale chez les symptomatiques était stable comparé aux études antérieures dans cette localité. Et cette prévalence n'était pas différente entre symptomatiques et asymptomatiques. En milieu semi urbain et rural, des hautes prévalences ont été mise en évidence. Et ces prévalences étaient plus élevées chez les enfants symptomatiques. Il serait nécessaire d'accentuer les programmes de lutte, de favoriser l'accès aux soins de santé, d'éduquer les populations sur les méthodes de luttes, en milieux rural et semi-rural. Et aussi de prendre en charge l'infection plasmodiale asymptomatique dans les trois localités. L'âge moyen des enfants infectés variait non seulement d'une région à une autre, mais aussi entre symptomatiques et asymptomatiques au sein de la même localité. Les paramètres hématologiques étaient différents entre deux localités et aussi dans la même localité entre symptomatiques et asymptomatiques. L'espèce majoritaire dans les trois localités, était *P. falciparum*, suivie de *Plasmodium malariae.* Des coinfections avec *P. malariae* et *P. ovale* ont été identifiées. *P. vivax* n'a pas été mis en évidence dans notre étude. Bien qu'une grande diversité génétique ait été observée avec les gènes *msp-1* et *msp-2* dans les trois localités chez *P. falciparum,* et certains clones parasitaires aient été détectés soit dans les isolats symptomatiques, soit dans les isolats asymptomatiques, le lien avec la virulence n'est pas clairement défini. Par ailleurs aucune variabilité génétique n'a été observée au sein des gènes *msp-1* et *ama-1* analysés chez *P. malariae,* et aucun lien avec la virulence n'a pu être établi.

Au vu de ce qui précède, nous préconisons donc :

- D'augmenter l'effectif des enfants asymptomatiques à Franceville et Makokou, pour une meilleure comparaison.
- Explorer d'autres méthodes telles que les microsatellites et le séquençage par les NGS notamment de l'Hiseq pour mieux analyser les marqueurs de virulence et si possible établir un lien entre la virulence et certains clones parasitaires.

- De réaliser le séquençage d'un plus grand nombre d'échantillons des différents blocs entiers des trois gènes amplifiés au cours de cette étude.

References

1. WHO, *World Malaria Report.* Geneva, Switzerland: WHO, 2020.
2. WHO, *World malaria report 2019.* WHO, 2019.
3. WHO, *world malaria report.Geneve: Who document production services 2015.* 2015b.
4. Wesolowski R, W.A., Mila-Kierzenkowska C, Szewczyk-Golec K *Plasmodium knowlesi as a Threat to Global Public Health.* Korean J Parasitol. 2015;53(5):575-581. doi:10.3347/kjp.2015.53.5.575, 2015.
5. Gunalan K, N.A., Thera MA, Doumbo OK, Miller LH, *Plasmodium vivax Infections of Duffy-Negative Erythrocytes: Historically Undetected or a Recent Adaptation?* Trends Parasitol . 2018; 34 (5): 420-429. doi: 10.1016 / j.pt.2018.02.006, 2018.
6. Van Hellemond JJ, R.M., Koelewijn R, et al, *Human plasmodium knowlesi infection de deteted by rapid diagnostics tests for malaria.* Emerg Infect Dis. 2009;15(9):1478-1480. doi:10.3201/eid1509.090358, 2009.
7. Cox-Singh J, D.T., Lee KS, et al., *Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening.* Clin Infect Dis. 2008;46(2):165-171. doi:10.1086/524888, 2008.
8. Mukomena SE, P.C., Désiré MK, Pascal LT, Ali MM, Oscar LN. , *Parasitémie asymptomatique chez les enfants de moins de 5 ans, enfants en âge scolaire et prise en charge des épisodes fébriles dans les ménages de Lubumbashi, République Démocratique du Congo [Asymptomatic Parasitemia in under five, school age children and households self-medication, Lubumbashi, Democratic Republic of Congo].* Pan Afr Med J. 2016;24:94. Published 2016 May 27. doi:10.11604/pamj.2016.24.94.9350, 2016.
9. Gardner MJ, H.N., Fung E, et al. , *Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum.* Nature. 2002;419(6906):498-511. doi:10.1038/nature01097, 2002.
10. Gunawardena S, K.N., *Advances in genetics and genomics: use and limitations in achieving malaria elimination goals.* Pathog Glob Health. 2015;109(3):123-141. doi:10.1179/2047773215Y.0000000015, 2015.
11. Maghendji-Nzondo S, N.H., Lemamy GJ, et al. , *Prevalence of malaria, prevention measures, and main clinical features in febrile children admitted to the Franceville Regional Hospital, Gabon. Prévalence et mesures de prévention du paludisme et principales caractéristiques cliniques chez les enfants fébriles admis au centre hospitalier régional de Franceville au Gabon.* Parasite. 2016;23:32. doi:10.1051/parasite/2016032, 2016.
12. Lekana-Douki JB, D.B.S., Zatra R, Zang Edou SE, Ekomy H, Bisvigou U, Toure-Ndouo FS, *Increased prevalence of the Plasmodium falciparum Pfmdr1 86N genotype among field isolates from Franceville, Gabon after replacement of chloroquine by artemether-lumefantrine and artesunate-mefloquine.* Infect Genet Evol. 2011 Mar;11(2):512-7. doi: 10.1016/j.meegid.2011.01.003. Epub 2011 Jan 17. PMID: 21251998, 2011a.
13. Lekana-Douki JB, P.J., Zatra R, Toure-Ndouo FS, *Paludisme au gabon: résultats d'une étude bioclinique à l'hôpital de l'amitié sino-gabonaise de Franceville [Malaria in Gabon: results of a clinical and laboratory study at the Chinese-Gabonese Friendship Hospital of Franceville].* Sante. 2011 Oct-Dec;21(4):193-8. French. doi: 10.1684/san.2011.0263. PMID: 22362010., 2011.
14. Richard-Lenoble, D., et al., *"Malaria in Gabon. 2. Evaluation of the qualitative and quantitative prevalence of parasites in the total school and preschool population of the country".* Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales 80.3 Pt 2 (1987): 532-542., 1987.
15. Délicat-Loembet L, R.V., Ollomo B, Arnathau C, Roche B, Elguero E, Moukodoum ND, Okougha AP, Mve Ondo B, Boundenga L, Houzé S, Galan M, Nkoghé D, Leroy EM, Durand P, Paupy C, Renaud F, Prugnolle F, *No evidence for ape Plasmodium infections in humans in Gabon.* PLoS One. 2015 Jun 3;10(6):e0126933. doi: 10.1371/journal.pone.0126933. PMID: 26039338; PMCID: PMC4454650, 2015.
16. Luxemburger C, R.F., Nosten F, Raimond D, Bathet S, White NJ, *The epidemiology of severe malaria in an area of low transmission in Thailand.* Trans R Soc Trop Med Hyg. 1997 May-Jun;91(3):256-62. doi: 10.1016/s0035-9203(97)90066-3. PMID: 9231189. White, N. J., 1997. **91**(3): p. 256-62.
17. Leke RF, D.R., Mbu R, Leke RJ, Fogako J, Megnekou R, Metenou S, Sama G, Zhou Y, Cadigan T, Parra M, Taylor DW, *Detection of the Plasmodium falciparum antigen histidine-rich protein 2 in blood of pregnant women: implications for diagnosing placental malaria.* J Clin Microbiol. 1999

Sep;37(9):2992-6. doi: 10.1128/JCM.37.9.2992-2996.1999. PMID: 10449488; PMCID: PMC85431., 1999. **37**(9): p. 2992-6.
18. Sullivan, E.J., *President's message on ... differences.* Reflections, 1998. **24**(2): p. 4.
19. Mendis K, S.B., Marchesini P, Carter R, *The neglected burden of Plasmodium vivax malaria.* Am J Trop Med Hyg. 2001 Jan-Feb;64(1-2 Suppl):97-106. doi: 10.4269/ajtmh.2001.64.97. PMID: 11425182., 2001. **64**.
20. Garnham, *Malaria parasites and other Haemosporidia. .* Oxford: Blackwell Scientific., 1966.
21. Duval L, A.F., *Ape Plasmodium parasites as a source of human outbreaks.* Clin Microbiol Infect. 2012 Jun;18(6):528-32. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03825.x. Epub 2012 Mar 22. PMID: 22440011, 2012.
22. Duval L, F.M., Nerrienet E, Rousset D, Sadeuh SA, Goodman SM, Andriaholinirina NV, Randrianarivelojosia M, Paul RE, Robert V, Ayala FJ, Ariey F., *African apes as reservoirs of Plasmodium falciparum and the origin and diversification of the Laverania subgenus.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jun 8;107(23):10561-6. doi: 10.1073/pnas.1005435107. Epub 2010 May 24. PMID: 20498054; PMCID: PMC2890828., 2010.
23. Krief S, E.A., Pacheco MA, Mugisha L, André C, Halbwax M, Fischer A, Krief JM, Kasenene JM, Crandfield M, Cornejo OE, Chavatte JM, Lin C, Letourneur F, Grüner AC, McCutchan TF, Rénia L, Snounou G *On the diversity of malaria parasites in African apes and the origin of Plasmodium falciparum from Bonobos. P.* LoS Pathog, 6: e1000765., 2010.
24. Hall N, P.A., Berriman M, Churcher C, et al., *Sequence of Plasmodium falciparum chromosomes 1, 3-9 and 13.* Nature. 2002 Oct 3;419(6906):527-31. doi: 10.1038/nature01095. PMID: 12368867.Sulston JE, Craig A, Newbold C, Barrell BG., 2002.
25. Guerra CA, H.R., Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, Temperley WH, Kabaria CW, Tatem AJ, Manh BH, Elyazar IR, Baird JK, Snow RW, Hay SI, *The international limits and population at risk of Plasmodium vivax transmission in 2009.* PLoS Negl Trop Dis. 2010 Aug 3;4(8):e774. doi: 10.1371/journal.pntd.0000774. PMID: 20689816; PMCID: PMC2914753., 2010.
26. Liu W, L.Y., Shaw KS, Learn GH, Plenderleith LJ, Malenke JA, Sundararaman SA, Ramirez MA, Crystal PA, Smith AG, Bibollet-Ruche F, Ayouba A, Locatelli S, Esteban A, Mouacha F, Guichet E, Butel C, Ahuka-Mundeke S, Inogwabini BI, Ndjango JB, Speede S, Sanz CM, Morgan DB, Gonder MK, Kranzusch PJ, Walsh PD, Georgiev AV, Muller MN, Piel AK, Stewart FA, Wilson ML, Pusey AE, Cui L, Wang Z, Färnert A, Sutherland CJ, Nolder D, Hart JA, Hart TB, Bertolani P, Gillis A, LeBreton M, Tafon B, Kiyang J, Djoko CF, Schneider BS, Wolfe ND, Mpoudi-Ngole E, Delaporte E, Carter R, Culleton RL, Shaw GM, Rayner JC, Peeters M, Hahn BH, Sharp PM., *African origin of the malaria parasite Plasmodium vivax.* Nat Commun. 2014;5:3346. doi: 10.1038/ncomms4346., 2014.
27. Prugnolle, F., Rougeron, V., Becquart, P., Berry, A., Makanga, B., Rahola, N., Arnathau,C., Ngoubangoye, B., Menard, S., Willaume, E., Ayala, F.J., Fontenille, D., Ollomo, B., Durand, P., Paupy, C., Renaud, F., 2013, *Diversity, host switching and evolution of Plasmodium vivax infecting African great apes.* Proc. Natl. Acad. Sci. 110, 8123–8128. https://doi.org/10.1073/pnas.1306004110, 2013.
28. Collins WE, J.G., *Plasmodium ovale: parasite and disease. Plasmodium ovale: parasite and disease.* Clin Microbiol Rev. 2005 Jul;18(3):570-81. doi: 10.1128/CMR.18.3.570-581.2005. PMID: 16020691; PMCID: PMC1195966, 2005.
29. Rosalind E. Howes , R.C.R.J., Katherine E. Battle,Joshua Longbottom,Bonnie Mappin,Dariya Ordanovich,Andrew J. Tatem,Chris Drakeley,Peter W. Gething,Peter A. Zimmerman,David L. Smith,Simon I. Hay, *Plasmodium vivax Transmission in Africa.* PLOs Neglected tropical deseases : November 20, 2015https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004222, 2015.
30. Aikawa M, H.C., Miller LH, *Ultrastructural changes of the erythrocyte membrane in ovale-type malarial parasites.* J Parasitol. 1977 Feb;63(1):152-4. PMID: 403266.. 1977.
31. Cox-Singh J, C.R., *Plasmodium knowlesi: from severe zoonosis to animal model.* Trends Parasitol. 2015 Jun;31(6):232-8. doi: 10.1016/j.pt.2015.03.003. Epub 2015 Mar 30. PMID: 25837310.Trends Parasitol. 31(6):232-8., 2015.
32. Atkinson CT, A.M., *Ultrastructure of malaria-infected erythrocytes.* Blood Cells. 1990;16(2-3):351-68. PMID: 2257318., 1990.

33. Singh B, K.S.L., Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ., *A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings.* Lancet. 2004 Mar 27;363(9414):1017-24. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15836-4. PMID: 15051281., 2004.
34. Poostchi M, S.K., Maude RJ, Jaeger S, Thoma G, *Image analysis and machine learning for detecting malaria.* Transl Res. 2018 Apr;194:36-55. doi: 10.1016/j.trsl.2017.12.004. Epub 2018 Jan 12. PMID: 29360430; PMCID: PMC5840030., 2017.
35. Escalante AA, A.F., *Phylogeny of the malarial genus Plasmodium, derived from rRNA gene sequences.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Nov 22;91(24):11373-7. doi: 10.1073/pnas.91.24.11373. PMID: 7972067; PMCID: PMC45233., 1994.
36. Escalante AA, F.D., Collins WE, Lal AA, *The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Jul 7;95(14):8124-9. doi: 10.1073/pnas.95.14.8124. PMID: 9653151; PMCID: PMC20940., 1998.
37. Kaiser M, L.A., Ulrich M, Ellerbrok H, Goffe AS, Blasse A, Zommers Z, Couacy-Hymann E, Babweteera F, Zuberbühler K, Metzger S, Geidel S, Boesch C, Gillespie TR, Leendertz FH *Wild chimpanzees infected with 5 Plasmodium species.* Wild chimpanzees infected with 5 Plasmodium species. Emerg Infect Dis. 2010 Dec;16(12):1956-9. doi: 10.3201/eid1612.100424. PMID: 21122230; PMCID: PMC3294549. , 2010.
38. Liu W, L.Y., Shaw KS, Learn GH, Plenderleith LJ, Malenke JA, Sundararaman SA, Ramirez MA, Crystal PA, Smith AG, Bibollet-Ruche F, Ayouba A, Locatelli S, Esteban A, Mouacha F, Guichet E, Butel C, Ahuka-Mundeke S, Inogwabini BI, Ndjango JB, Speede S, Sanz CM, Morgan DB, Gonder MK, Kranzusch PJ, Walsh PD, Georgiev AV, Muller MN, Piel AK, Stewart FA, Wilson ML, Pusey AE, Cui L, Wang Z, Färnert A, Sutherland CJ, Nolder D, Hart JA, Hart TB, Bertolani P, Gillis A, LeBreton M, Tafon B, Kiyang J, Djoko CF, Schneider BS, Wolfe ND, Mpoudi-Ngole E, Delaporte E, Carter R, Culleton RL, Shaw GM, Rayner JC, Peeters M, Hahn BH, Sharp PM, *Origin of the human malaria parasite Plasmodium falciparum in gorilla.* Nat Commun. 2014;5:3346. doi: 10.1038/ncomms4346. PMID: 24557500; PMCID: PMC4089193., 2010.
39. Rayner JC, L.W., Peeters M, Sharp PM, Hahn BH. , *A plethora of Plasmodium species in wild apes: a source of human infection?* Trends Parasitol. 2011 May;27(5):222-9. doi: 10.1016/j.pt.2011.01.006. Epub 2011 Feb 25. PMID: 21354860; PMCID: PMC3087880., 2011.
40. Gonzalez JP, P.F., Leroy E, *Men, primates, and germs: an ongoing affair.* Curr Top Microbiol Immunol. 2013;365:337-53. doi: 10.1007/82_2012_304. PMID: 23239237; PMCID: PMC7121697., 2013.
41. Yoeli M, U.R., *Plasmodium berghei ookinete formation in vitro.* Exp Parasitol. 1968 Feb;22(1):122-8. doi: 10.1016/0014-4894(68)90085-4. PMID: 5643354., 1968. **22**(1): p. 122-8.
42. Touray MG, W.A., Laughinghouse A, Krettli AU, Miller LH, . *Developmentally regulated infectivity of malaria sporozoites for mosquito salivary glands and the vertebrate host.* J Exp Med. 1992 Jun 1;175(6):1607-12. doi: 10.1084/jem.175.6.1607. PMID: 1588284; PMCID: PMC2119265., 1992. **175**(6): p. 1607-12.
43. Thériault, C., *Un niveau minimal d'un homologue potentiel de la phosphoinositide-phosphatase SAC1 chez "Plasmodium falciparum" semble requis pour assurer la survie durant le stade érythrocytaire asexué.* BIOLOGY.90902161, 2017.
44. Malvy D, D.F., Vatan R, Pistone T, Etienne G, Longy-Boursier M, Le Bras M, . *Experience de l'association atovaquone-proguanil en traitement du paludisme non complique a plasmodium falciparum--a propos de 112 cas [Experience with the combination atovaquone-proguanil in the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria--report of 112 cases]. .* Med Trop (Mars). 2002;62(3):229-31. French. PMID: 12244916., 2002. **62**(3): p. 229-31.
45. Krajden S, P.D., Tobe B, Yang J, Keystone JS. , *Prolonged infection with Plasmodium falciparum in a semi-immune patient.* Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991 Nov-Dec;85(6):731-2. doi: 10.1016/0035-9203(91)90434-z. PMID: 1801338., 1991.
46. Bartoloni A, Z.L., *Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria.* Mediterr J Hematol Infect Dis. 2012;4(1):e2012026. doi: 10.4084/MJHID.2012.026. Epub 2012 May 4. PMID: 22708041; PMCID: PMC3375727., 2012.

47. D'Ortenzio E, G.N., Fontanet A, Houze S, Bouchaud O, Matheron S, Le Bras J, *Prolonged Plasmodium falciparum infection in immigrants, Paris.* Emerg Infect Dis. 2008 Feb;14(2):323-6. doi: 10.3201/eid1402.061475. PMID: 18258132; PMCID: PMC2600192, 2008.
48. Daneshvar C, D.T., Cox-Singh J, Rafa'ee MZ, Zakaria SK, Divis PC, Singh B, *Clinical and laboratory features of human Plasmodium knowlesi infection.* Clin Infect Dis. 2009 Sep 15;49(6):852-60. doi: 10.1086/605439. PMID: 19635025; PMCID: PMC2843824., 2009.
49. Uzzan B, I.A., Durand R, Deniau M, Bouchaud O, Perret GY, *Serum procalcitonin in uncomplicated falciparum malaria: a preliminary study.* Travel Med Infect Dis. 2006 Mar;4(2):77-80. doi: 10.1016/j.tmaid.2005.04.003. Epub 2005 Jul 1. PMID: 16887728, 2006.
50. Dzeing-Ella A, N.O.P., Tchoua R, Planche T, Mboza B, Mbounja M, Muller-Roemer U, Jarvis J, Kendjo E, Ngou-Milama E, Kremsner PG, Krishna S, Kombila M, *Severe falciparum malaria in Gabonese children: clinical and laboratory features.* Malar J. 2005 Jan 9;4:1. doi: 10.1186/1475-2875-4-1. PMID: 15638948; PMCID: PMC546207, 2005.
51. White NJ, H.M., *The Pathophysiology of Malaria.* Adv Parasitol. 1992;31:83-173. doi: 10.1016/s0065-308x(08)60021-4. PMID: 1496930, 1992.
52. Anstey NM, R.B., Yeo TW, Price RN, *The pathophysiology of vivax malaria.* Trends Parasitol. 2009 May;25(5):220-7. doi: 10.1016/j.pt.2009.02.003. Epub 2009 Apr 6. PMID: 19349210., 2009.
53. Costa FT, L.S., Albrecht L, Ataíde R, Siqueira AM, Souza RM, Russell B, Renia L, Marinho CR, Lacerda MV;, *On the pathogenesis of Plasmodium vivax malaria: perspectives from the Brazilian field.* Int J Parasitol. 2012 Nov;42(12):1099-105. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.08.007. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23022617, 2012.
54. Rasamoel P, J.R., Ralamboranto L, Raharimalala L, Roux J(1)Arch Inst Pasteur Madagascar *Portage asymptomatique et accès palustre: un équilibre complexe.* Arch Inst Pasteur Madagascar , 64 (1 & 2) : 45-47, 1998.
55. Sabchareon A, B.T., Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, Foucault C, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P, *Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria.* Am J Trop Med Hyg. 1991 Sep;45(3):297-308. doi: 10.4269/ajtmh.1991.45.297. PMID: 1928564., 1991.
56. Waltmann A, D.A., Harris I, Koepfli C, Lodo J, Vahi V, Piziki D, Shanks GD, Barry AE, Whittaker M, Kazura JW, Mueller I, *High Rates of Asymptomatic, Sub-microscopic Plasmodium vivax Infection and Disappearing Plasmodium falciparum Malaria in an Area of Low Transmission in Solomon Islands.* PLoS Negl Trop Dis. 2015 May 21;9(5):e0003758. doi: 10.1371/journal.pntd.0003758. PMID: 25996619; PMCID: PMC4440702., 2015.
57. Roland J, S.V., Sellier C, Drapier AM, Di Santo JP, Cazenave PA, Pied S, *NK cell responses to Plasmodium infection and control of intrahepatic parasite development.* J Immunol. 2006 Jul 15;177(2):1229-39. doi: 10.4049/jimmunol.177.2.1229. PMID: 16818782., 2006.
58. Fandeur T, D.P., Gysin J, Dedet JP, da Silva LP., *In vitro and in vivo studies on protective and inhibitory antibodies against Plasmodium falciparum in the Saimiri monkey.* J Immunol;132(1):432-7., 1984.
59. Gysin J, M.P., Pereira da Silva L, Druilhe P, *Antibodies from immune African donors with a protective effect in Plasmodium falciparum human infection are also able to control asexual blood forms of the parasite in Saimiri monkeys.* Res Immunol. 1996 Jul-Aug;147(6):397-401. doi: 10.1016/0923-2494(96)82048-7. PMID: 8903106., 1996.
60. Gupta S, H.A., Kwiatkowski D, Greenwood AM, Greenwood BM, Day KP, *Parasite virulence and disease patterns in Plasmodium falciparum malaria.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr 26;91(9):3715-9. doi: 10.1073/pnas.91.9.3715. PMID: 8170975; PMCID: PMC43652., 1994.
61. Chaorattanakawee S, N.P., Hananantachai H, Tumkosit U, Saunders D, Naka I, Ohashi J, Patarapotikul J., *Sequence variation in Plasmodium falciparum merozoite surface protein-2 is associated with virulence causing severe and cerebral malaria.* PLoS One. 3(1):e0190418. doi: 10.1371/journal.pone.0190418. eCollection 2018. , 2018.
62. Lin CS, U.A., Epp C, Bujard H, Tsuboi T, Czabotar PE, Cowman AF., *Multiple Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein 1 Complexes Mediate Merozoite Binding to Human Erythrocytes.* J Biol Chem. 2016 Apr 1;291(14):7703-15. doi, 2016.

63. Gilson PR, N.T., Vukcevic D, Moritz RL, Sargeant T, Speed TP, et al., *Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. .* Mol Cell Proteomics. 2006;5:1286–1299. doi: 10.1074/mcp.M600035-MCP200., 2006.
64. Baldwin MR, L.X., Hanada T, Liu SC, Chishti AH. , *Merozoite surface protein 1 recognition of host glycophorin A mediates malaria parasite invasion of red blood cells. .* Blood. 2015;125:2704–2711. doi: 10.1182/blood-2014-11-611707. , 2015.
65. Triglia T, W.T., Kemp DJ, *Towards a high-resolution map of the Plasmodium falciparum genome. .* Parasitol Today. 1992 Jul;8(7):225-9. doi: 10.1016/0169-4758(92)90118-l. PMID: 15463622., 1992.
66. Ferreira MU, R.W., Tonon AP, Kawamoto F, Rich SM, *Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP-1) of Plasmodium falciparum.* Gene. 2003 Jan 30;304:65-75. doi: 10.1016/s0378-1119(02)01180-0. PMID: 12568716., 2003.
67. Aspeling-Jones H, C.D., *An expanded global inventory of allelic variation in the most extremely polymorphic region of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 provided by short read sequence data.* Malar J. 2018 Oct 1;17(1):345. doi: 10.1186/s12936-018-2475, 2018.
68. Ariey F, H.D., Le Scanf C, Duchemin JB, Peneau C, Hulin A, Sarthou JL, Reynes JM, Fandeur T, Mercereau-Puijalon O, *Association of severe malaria with a specific Plasmodium falciparum genotype in French Guiana.* J Infect Dis. 2001 Jul 15;184(2):237-41. doi: 10.1086/322012. Epub 2001 Jun 5. PMID: 11424024, 2001.
69. Rout R, M.B., Kar SK, Ranjit M, *Genetic complexity and transmissibility of Plasmodium falciparum parasites causing severe malaria in central-east coast India.* Trop Biomed. 2009 Aug;26(2):165-72. PMID: 19901903., 2009.
70. Amodu OK, A.A., Ayoola OO, Gbadegesin RA, Orimadegun AE, Akinsola AK, Olumese PE, Omotade OO, *Genetic diversity of the msp-1 locus and symptomatic malaria in south-west Nigeria.* Acta Trop. 2005 Sep;95(3):226-32. doi: 10.1016/j.actatropica.2005.06.017. PMID: 16023985., 2005.
71. Bouyou-Akotet MK, M.B.N., Mawili-Mboumba DP., *Genetic polymorphism of merozoite surface protein-1 in Plasmodium falciparum isolates from patients with mild to severe malaria in Libreville, Gabon.* Parasite. 22:12. doi: 10.1051/parasite/2015012. Epub 2015 Mar 17, 2015.
72. Cavanagh DR, M.J., *Antigenicity of recombinant proteins derived from Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1.* Mol Biochem Parasitol. 1997 Apr;85(2):197-211. doi: 10.1016/s0166-6851(96)02826-5. PMID: 9106193., 1997.
73. Somé AF, B.T., Zongo I, Yerbanga RS, Nikiéma F, Neya C, Taho LK, Ouédraogo JB., *Plasmodium falciparum msp1 and msp2 genetic diversity and allele frequencies in parasites isolated from symptomatic malaria patients in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.* Parasit Vectors. 11(1):323. doi: 10.1186/s13071-018-2895-4., 2018.
74. Färnert A, A.A., Babiker HA, Beck HP, Benito A, Björkman A, Bruce MC, Conway DJ, Day KP, Henning L, Mercereau-Puijalon O, Ranford-Cartwright LC, Rubio JM, Snounou G, Walliker D, Zwetyenga J, do Rosario VE, *Genotyping of Plasmodium falciparum infections by PCR: a comparative multicentre study.* Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001 Mar-Apr;95(2):225-32. doi: 10.1016/s0035-9203(01)90175-0. PMID: 11355566., 2001.
75. Epping RJ, G.S., Ingram LT, Upcroft JA, Ramasamy R, Cooper JA, Bushell GR, Geysen HM, *An epitope recognised by inhibitory monoclonal antibodies that react with a 51 kilodalton merozoite surface antigen in Plasmodium falciparum.* Mol Biochem Parasitol. 1988 Feb;28(1):1-10. doi: 10.1016/0166-6851(88)90173-9. PMID: 2453800., 1988.
76. Richards JS, B.J., *The futurfor blood stage vaccine against malaria.* Immunol Cell Biol. 2009 Jul;87(5):377-90. doi: 10.1038/icb.2009.27. Epub 2009 May 5. Review., 2009.
77. Taylor RR, A.S., Greenwood BM, Riley EM, *IgG3 antibodies to Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 (MSP2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria.* Am J Trop Med Hyg. 1998 Apr;58(4):406-13. doi: 10.4269/ajtmh.1998.58.406. PMID: 9574783., 1998.
78. Osier FH, M.L., Fegan G, Tuju J, Tetteh KK, Bull PC, Conway DJ, Marsh K., *Allele-specific antibodies to Plasmodium falciparum merozoite surface protein-2 and protection against clinical malaria.* Parasite Immunol. 2010 Mar;32(3):193-201. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01178.x., 2010.

79. McCarthy JS, M.J., Elliott S, Fahey P, Bang G, Malkin E, Tierney E, Aked-Hurditch H, Adda C, Cross N, Richards JS, Fowkes FJ, Boyle MJ, Long C, Druilhe P, Beeson JG, Anders RF., *A phase 1 trial of MSP2-C1, a blood-stage malaria vaccine containing 2 isoforms of MSP2 formulated with Montanide® ISA 720.* PLoS One. 2011;6(9):e24413. doi: 10.1371/journal.pone.0024413. Epub 2011 Sep 19., 2011.
80. Fenton B, C.J., Khan CM, Robinson JV, Walliker D, Ridley R, Scaife JG, McBride JS, *Structural and antigenic polymorphism of the 35- to 48-kilodalton merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite Plasmodium falciparum.* Mol Cell Biol. 1991 Feb;11(2):963-71. doi: 10.1128/mcb.11.2.963-971.1991. PMID: 1990294; PMCID: PMC359759, 1991.
81. Thomas AW, C.D., Carter JM, Lyon JA, *Sequence comparison of allelic forms of the Plasmodium falciparum merozoite surface antigen MSA2.* Mol Biochem Parasitol. 1990 Dec;43(2):211-20. doi: 10.1016/0166-6851(90)90146-d. PMID: 2090943, 1990.
82. Marshall VM, A.R., Bangs MJ, Purnomo, Anders RF, Coppel RL, *Allelic variants of the Plasmodium falciparum merozoite surface antigen 2 (MSA-2) in a geographically restricted area of Irian Jaya. .* Mol Biochem Parasitol. 1994 Jan;63(1):13-21. doi: 10.1016/0166-6851(94)90004-3. PMID: 8183312., 1994.
83. Abu Bakar S, *Immunological and function properties of non-repeat region in Plasmodium falciparum antigen."* Trends Parasitol. 17: 297-299., 1997.
84. Snewin V., H.M., Sanchez G., Scherf A., Langsley G et Herrera S, , *"Polymorphism of the alleles of the merozoite surface antigens MSA1 and MSA2 in Plasmodium falciparum wild isolates from Colombia.* Molecular and Biochemical Parasitology 49: 265-276., 1991.
85. Amodu OK, O.S., Ntoumi F, Orimadegun AE, Gbadegesin RA, Olumese PE, Omotade OO., *Complexity of the msp2 locus and the severity of childhood malaria, in south-western Nigeria.* Ann Trop Med Parasitol. 2008 Mar;102(2):95-102. doi: 10.1179/136485908X252340., 2008.
86. Ranjit MR, D.A., Das BP, Das BN, Dash BP, Chhotray GP. , *Distribution of Plasmodium falciparum genotypes in clinically mild and severe malaria cases in Orissa, India. .* Trans R Soc Trop Med Hyg. 2005;99(5):389–95. Epub 2005/03/23. doi: S0035-9203(04)00301-3 [pii] doi: 10.1016/j.trstmh.2004.09.010, 2005.
87. Issifou S, R.C., Adjagba-Olakpo M, Chabi-Worou N, Ntoumi F, *Complexity and genetic diversity of Plasmodium falciparum infections in young children living in urban areas of Central and West Africa. Parasitol Res.* 2003 Aug;90(5):423-8. doi: 10.1007/s00436-003-0854-1. Epub 2003 May 21. PMID: 12759745, 2003.
88. Shigidi MM, H.R., Idris MN, Mukhtar MM, Sokrab TE, *Parasite diversity in adult patients with cerebral malaria: a hospital-based, case-control study* Am J Trop Med Hyg. 2004 Dec;71(6):754-7. PMID: 15642966, 2004.
89. Mahdi Abdel Hamid M, E.A., Albsheer MM, Abdalla AA, Mahgoub NS, Mustafa SO, Muneer MS, Amin M., *Multiplicity of infection and genetic diversity of Plasmodium falciparum isolates from patients with uncomplicated and severe malaria in Gezira State, Sudan.* Parasit Vectors. 2016 Jun 27;9(1):362. doi: 10.1186/s13071-016-1641-z. PMID: 27350250; PMCID: PMC4924276, 2016.
90. Snewin VA, H.M., Sanchez G, Scherf A, Langsley G, Herrera S, *Polymorphism of the alleles of the merozoite surface antigens MSA1 and MSA2 in Plasmodium falciparum wild isolates from Colombia.* Mol Biochem Parasitol. 1991 Dec;49(2):265-75. doi: 10.1016/0166-6851(91)90070-m. PMID: 1775170., 1991.
91. Narum DL, T.A., *Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of Plasmodium falciparum merozoites.* Mol Biochem Parasitol. 1994 Sep;67(1):59-68. doi: 10.1016/0166-6851(94)90096-5. PMID: 7838184., 1994.
92. Hodder AN, C.P., Matthew ML, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Anders RF, *The disulfide bond structure of Plasmodium apical membrane antigen-1.* J Biol Chem. 1996 Nov 15;271(46):29446-52. doi: 10.1074/jbc.271.46.29446. PMID: 8910611, 1996.
93. Escalante AA, G.H., Chaiyaroj SC, Magris M, Biswas S, Nahlen BL, Lal AA, *Polymorphism in the gene encoding the apical membrane antigen-1 (AMA-1) of Plasmodium falciparum. X. Asembo Bay Cohort Project.* Mol Biochem Parasitol. 2001 Apr 6;113(2):279-87. doi: 10.1016/s0166-6851(01)00229-8. PMID: 11295182, 2001.
94. Giovannini D, S.S., Lacroix C, Perazzi A, Bargieri D, Lagal V, Lebugle C, Combe A, Thiberge S, Baldacci P, Tardieux I, Ménard R, *Independent roles of apical membrane antigen 1 and rhoptry neck proteins*

during host cell invasion by apicomplexa. Cell Host Microbe. 2011 Dec 15;10(6):591-602. doi: 10.1016/j.chom.2011.10.012. PMID: 22177563., 2011.
95. Bargieri DY, A.N., Lagal V, Thiberge S, Whitelaw JA, Tardieux I, Meissner M, Ménard R., *Apical membrane antigen 1 mediates apicomplexan parasite attachment but is dispensable for host cell invasion.* Nat Commun. 2013;4:2552. doi: 10.1038/ncomms3552., 2013.
96. Lamarque MH, R.M., Kong-Hap M, Tonkin ML, Rugarabamu G, Marq JB, Penarete-Vargas DM, Boulanger MJ, Soldati-Favre D, Lebrun M, *Plasticity and redundancy among AMA-RON pairs ensure host cell entry of Toxoplasma parasites.* Nat Commun. 2014 Jun 17;5:4098. doi: 10.1038/ncomms5098. PMID: 24934579., 2014.
97. Tonkin ML, R.M., Lamarque MH, Pugnière M, Douguet D, Crawford J, Lebrun M, Boulanger MJ, *Host cell invasion by apicomplexan parasites: insights from the co-structure of AMA1 with a RON2 peptide.* Science. 2011 Jul 22;333(6041):463-7. doi: 10.1126/science.1204988. PMID: 21778402, 2011.
98. Baruch DI, P.B., Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, Taraschi TF, , *Howard RJ. Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes.* Cell. 1995 Jul 14;82(1):77-87. doi: 10.1016/0092-8674(95)90054-3. PMID: 7541722., 1995.
99. Leech JH, B.J., Miller LH, Howard RJ, *Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.* J Exp Med. 1984 Jun 1;159(6):1567-75. doi: 10.1084/jem.159.6.1567. PMID: 6374009; PMCID: PMC2187322, 1984.
100. Chen Q, S.M., Wahlgren M, *Molecular aspects of severe malaria.* Clin Microbiol Rev. 2000 Jul;13(3):439-50. doi: 10.1128/CMR.13.3.439. PMID: 10885986; PMCID: PMC88942, 2000.
101. Druilhe P, S.F., Soesoe D, Corradin G, Mejia P, Singh S, Audran R, Bouzidi A, Oeuvray C, Roussilhon C, *A malaria vaccinethat A malaria vaccine that elicits in humans antibodies able to kill Plasmodium falciparum.* PLoS Med. 2005 Nov;2(11):e344. doi: 10.1371/journal.pmed.0020344. Epub 2005 Nov 8. PMID: 16262450; PMCID: PMC1277929, 2005.
102. Peek LJ, B.D., Jones LS, Joshi SB, Middaugh CR, *A systematic approach to stabilizing EBA-175 RII-NG for use as a malaria vaccine.* Vaccine. 2006 Jul 26;24(31-32):5839-51. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.04.067. Epub 2006 May 12. PMID: 16735084, 2006.
103. Mamillapalli A, P.P., Sharma M, Sharma SK, Tyagi PK, Joshi H, Chitnis CE, *Sequence polymorphisms in the receptor-binding domain of Plasmodium falciparum EBA-175: implications for malaria vaccine development.* Mol Biochem Parasitol. 2006 Mar;146(1):120-3. doi: 10.1016/j.molbiopara.2005.09.019. Epub 2005 Dec 1. PMID: 16359738, 2006.
104. Liang H, S.B., *Conservation of structure and function of the erythrocyte-binding domain of Plasmodium falciparum EBA-175.* Mol Biochem Parasitol. 1997 Feb;84(2):241-5. doi: 10.1016/s0166-6851(96)02791-0. PMID: 9084043., 1997.
105. Sim BK, N.D., Liang H, Fuhrmann SR, Obaldia N 3rd, Gramzinski R, Aguiar J, Haynes JD, Moch JK, Hoffman SL, *Induction of biologically active antibodies in mice, rabbits, and monkeys by Plasmodium falciparum EBA-175 region II DNA vaccine.* Mol Med. 2001 Apr;7(4):247-54. PMID: 11471569; PMCID: PMC1950033, 2001.
106. Adams JH, S.B., Dolan SA, Fang X, Kaslow DC, Miller LH, *A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Aug 1;89(15):7085-9. doi: 10.1073/pnas.89.15.7085. PMID: 1496004; PMCID: PMC49650, 1992.
107. Aravind L, I.L., Wellems TE, Miller LH, *Plasmodium biology: genomic gleanings.* Cell. 2003 Dec 26;115(7):771-85. doi: 10.1016/s0092-8674(03)01023-7. PMID: 14697197, 2003.
108. Mourou, J., Coffinet, T., Jarjaval, F. et al, *Malaria transmission and insecticide resistance of Anopheles gambiae in Libreville and Port-Gentil, Gabon.* Malar J 9, 321 (2010). https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-321, 2010. **9**: p. 321.
109. Bouyou-Akotet, M.K., Mawili-Mboumba, D.P., Kendjo, E. et al, *Evidence of decline of malaria in the general hospital of Libreville, Gabon from 2000 to 2008.* Malar J 8, 300 (2009). https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-300, 2009. **8**: p. 300.
110. Maghendji-Nzondo S, K.L., Mourembou G, Boundenga L, Imboumy-Limoukou RK, Matsiegui PB, Manego-Zoleko R, Mbatchi B, Raoult D, Toure-Ndouo F, Lekana-Douki JB., *Malaria in urban, semi-*

urban and rural areas of southern of Gabon: comparison of the Pfmdr 1 and Pfcrt genotypes from symptomatic children. Malar J. 2016 Aug 18;15(1):420. doi: 10.1186/s12936-016-1469-1 2016.

111. Assele, V., Ndoh, G.E., Nkoghe, D. et al, *No evidence of decline in malaria burden from 2006 to 2013 in a rural Province of Gabon: implications for public health policy.* BMC Public Health 15, 81 (2015). https://doi.org/10.1186/s12889-015-1456-4, 2015: p. 81.
112. Yavo W, K.A., Mawili-Mboumba DP, Kassi FK, Tshibola Mbuyi ML, Angora EK, Menan EI, Bouyou-Akotet MK, *Genetic Polymorphism of msp1 and msp2 in Plasmodium falciparum Isolates from Côte d'Ivoire versus Gabon.* J Parasitol Res. 2016;2016:3074803. doi: 10.1155/2016/3074803. Epub 2016 Mar 24. PMID: 27110390; PMCID: PMC4823507, 2016.
113. Ekala MT, J.H., Lekoulou F, Issifou S, Mercereau-Puijalon O, Ntoumi F, *Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 (MSP1): genotyping and humoral responses to allele-specific variants.* Acta Trop. 2002 Jan;81(1):33-46. doi: 10.1016/s0001-706x(01)00188-7. PMID: 11755430, 2002.
114. Aubouy A, M.-N.F., Deloron P, *Polymorphism in two merozoite surface proteins of Plasmodium falciparum isolates from Gabon.* Malar J. 2003 May 9;2:12. doi: 10.1186/1475-2875-2-12. Epub 2003 May 9. PMID: 12773207; PMCID: PMC156643, 2003.
115. Mayor A, S.F., Aponte JJ, Almeda J, Gómez-Olivé FX, Dgedge M, Alonso PL, *Plasmodium falciparum multiple infections in Mozambique, its relation to other malariological indices and to prospective risk of malaria morbidity.* Trop Med Int Health. Jan 8(1):3-11. doi: 10.1046/j.1365-3156.2003.00968.x. PMID: 12535242, 2003.
116. Mawili-Mboumba DP, B.A.M., Ngoungou EB, Kombila M, *Evaluation of rapid diagnostic tests for malaria case management in Gabon.* Diagn Microbiol Infect Dis. 2010 Feb;66(2):162-8. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.09.011. Epub 2009 Oct 28. PMID: 19846265, 2010.
117. Moody AH, C.P., *Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection.* Br J Biomed Sci. 2002;59(4):228-31. doi: 10.1080/09674845.2002.11783665. PMID: 12572958, 2002.
118. Planche T, K.S., Kombila M, Engel K, Faucher JF, Ngou-Milama E, Kremsner PG, *Comparison of methods for the rapid laboratory assessment of children with malaria.* Am J Trop Med Hyg. 2001 Nov;65(5):599-602. doi: 10.4269/ajtmh.2001.65.599. PMID: 11716121, 2001.
119. SNOUNOU, G., VIRIYAKOSOL, S., ZHU, X. P., JARRA, W., PINHEIRO, L., DO ROSARIO, V. E., THAITHONG, S. & BROWN, K. N, *High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction.* Mol Biochem Parasitol. 1993 Oct;61(2):315-20. doi: 10.1016/0166-6851(93)90077-b. PMID: 8264734, 1993.
120. SEDIGHEH ZAKARI, S., TALEBI, NAFABADI, AHMAD ZARE AND NAVID DINPARAST DJADID 2002, *Detection of malaria parasites by nested PCR in south -eastern Iran: Evidence of higly mixed infections in chahbahar district.* S Malar J., 2002.
121. Ntoumi F, C.H., Rogier C, Bonnefoy S, Trape JF, Mercereau-Puijalon O, *Age-dependent carriage of multiple Plasmodium falciparum merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections.* Am J Trop Med Hyg. 1995 Jan;52(1):81-8. doi: 10.4269/ajtmh.1995.52.81. PMID: 7856831, 1995.
122. Soulama I, S.M., Nebie I, Diarra A, Tiono AB, Konate A, Sirima SB, *Diversité génétique de Plasmodium falciparum et pathogénie de l'anémie palustre sévere chez des enfants de moins de 5 ans de la province du Boulgou, Burkina Faso [Genetic diversity of P. falciparum and pathogenesis of the severe malarial anaemia in children under 5 years old in the province of Boulgou, Burkina Faso].* Bull Soc Pathol Exot. 2006 Jul;99(3):166-70. French. PMID: 16983818., 2006.
123. Soulama I, B.J., Ndiaye M, Bougouma EC, Quagraine J, Casimiro PN, Stedman TT, Sirima SB., *Genetic Diversity of Polymorphic Vaccine Candidate Antigens (Apical Membrane Antigen-1, Merozoite Surface Protein-3, and Erythrocyte Binding Antigen-175) in Plasmodium falciparum Isolates from Western and Central Africa.* Am J Trop Med Hyg. doi: 10.4269, 2011.
124. Konaté L, Z.J., Rogier C, Bischoff E, Fontenille D, Tall A, Spiegel A, Trape JF, Mercereau-Puijalon O, *Variation of Plasmodium falciparum msp1 block 2 and msp2 allele prevalence and of infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions.* Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999 Feb;93 Suppl 1:21-8. doi: 10.1016/s0035-9203(99)90323-1. PMID: 10450422., 1999.

125. Guimarães LO, W.G., Alves JM, Bueno MG, Röhe F, Catão-Dias JL, Neves A, Malafronte RS, Curado I, Domingues W, Kirchgatter K., *Merozoite surface protein-1 genetic diversity in Plasmodium malariae and Plasmodium brasilianum from Brazil.* BMC Infect Dis. 2015 Nov 16;15:529. doi: 10.1186/s12879-015-1238-8., 2015.
126. Srisutham S, S.N., Sriprawat K, Mayxay M, Smithuis F, Nosten F, Pukrittayakamee S, Day NPJ, Dondorp AM, Imwong M., *Genetic diversity of three surface protein genes in Plasmodium malariae from three Asian countries.* SMalar J. 2018 Jan 11;17(1):24. doi: 10.1186/s12936-018-2176-x, 2018.
127. Sanger F, N.S., Coulson AR, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463-7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463. PMID: 271968; PMCID: PMC431765, 1997.
128. J., G., *Fstat (Version 2.9.4), a program to estimateand test population genetics parameters. 2003.* http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm Updated from Goudet [1995], 2003.
129. Belkhir.K, P.B., L. Chikhi, N. Raufaste, F. Bonhomme, *Genetix version 4.02, un logiciel pour l'analyse des données en génétique des populations.* Université Montpellier-2, France (2000). http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix.htm. Google Scholar, 2000.
130. Sudhir Kumar, G.S., Michael Li, Christina Knyaz, Koichiro Tamura, *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms* Molecular Biology and Evolution, Volume 35, Issue 6, June 2018, Pages 1547–1549, https://doi.org/10.1093/molbev/msy096, 2018.
131. Goh XT, C.K., Vythilingam I, Lee PC, Tan TC, Yap NJ, Chai HC, Nissapatorn V, Lim YAL, *Genetic diversity of Merozoite Surface Protein-1 gene block 2 allelic types in Plasmodium falciparum isolates from Malaysia and Thailand.* Trop Biomed. 2019 Mar 1;36(1):70-80. PMID: 33597428, 2015.
132. Zhang CL, Z.H., Liu Q, Yang YM, *Genetic polymorphism of merozoite surface proteins 1 and 2 of Plasmodium falciparum in the China-Myanmar border region.* Malar J. 2019 Nov 19;18(1):367. doi: 10.1186/s12936-019-3003-8. PMID: 31744492; PMCID: PMC6862846.
133. Tanabe K, M.T., Palacpac NM, Arisue N, Tougan T, Kawai S, Jombart T, Kobayashi F, Horii T, *Within-population genetic diversity of Plasmodium falciparum vaccine candidate antigens reveals geographic distance from a Central sub-Saharan African origin.* Vaccine. 2013 Feb 18;31(9):1334-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.12.039. Epub 2013 Jan 4. PMID: 23295064., 2012.
134. Cavanagh, D.R., McBride,J.S., Walliker,D. and Arnot,D.E., *lasmodium falciparum isolate G1 merozoite surface prrotein (MSP-1).* Institute of Immunology and Infection Research, University of Edinburgh, West Mains Road, Edinburgh EH9 3JT, UK, 2005.
135. Lê HG, K.J., Jun H, Lee J, Thái TL, Myint MK, Aye KS, Sohn WM, Shin HJ, Kim TS, Na BK, *Changing pattern of the genetic diversities of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 and merozoite surface protein-2 in Myanmar isolates.* Malar J. 2019 Jul 16;18(1):241. doi: 10.1186/s12936-019-2879-7. PMID: 31311565; PMCID: PMC6636015, 2019.
136. Voumbo-Matoumona DF, K.L., Madamet M, Maghendji-Nzondo S, Pradines B, Lekana-Douki JB, *Prevalence of Plasmodium falciparum antimalarial drug resistance genes in Southeastern Gabon from 2011 to 2014.* Infect Drug Resist. 2018 Aug 28;11:1329-1338. doi: 10.2147/IDR.S160164. eCollection 2018, 2018.
137. Laishram DD, S.P., Nanda N, Sharma VL, Sobti RC, Carlton JM, Joshi H, *The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria.* Malar J. 2012 Jan 31;11:29. doi: 10.1186/1475-2875-11-29. Review., 2012.
138. Kanwugu ON, H.G., Aryee PA, Abdul-Karim A, Anaba F, Ziblim Z, Amevi ED, *Prevalence of asymptomatic malaria in children in the metropolitan area of Tamale: how does PfHRP2 CareStart ™ RDT work against microscopy?* . J Trop Med . 21 déc.2019; 6457628. doi: 10.1155 / 2019/6457628, 2019.
139. Noland GS, G.P., Sallau A, et al, *Malaria prevalence, anemia and baseline intervention coverage prior to mass net distributions in Abia and Plateau States, Nigeria.* BMC Infect Dis. 2014;14:168. Published 2014 Mar 26. doi:10.1186/1471-2334-14-168;, 2014.
140. Mathanga DP, C.C.J., Vanden Eng J, et al, *Comparison of anaemia and parasitaemia as indicators of malaria control in household and EPI-health facility surveys in Malawi.* Malar J. 2010;9:107. Published 2010 Apr 21. doi:10.1186/1475-2875-9-107;, 2010.

141. Abdulkareem BO, A.A., Ahmed AO, Mariam AA, Samuel UU, *Malaria-induced anemia and serum micronutrients in asymptomatic patients infected with Plasmodium falciparum.* J Parasit Dis . 2017 déc; 41 (4): 1093-1097. doi: 10.1007 / s12639-017-0940-4. En ligne du 15 juil.2017, 2017.
142. M'bondoukwé NP, K.E., Mawili-Mboumba DP, Koumba Lengongo JV, Offouga Mbouoronde C, Nkoghe D, Touré F, Bouyou-Akotet MK, *Prevalence of and risk factors for malaria, filariasis, and intestinal parasites as single infections or co-infections in different settlements of Gabon, Central Africa.* Infect Dis Poverty. 2018 Jan 30;7(1):6. doi: 10.1186/s40249-017-0381-4. Erratum in: Infect Dis Poverty. 2018 Apr 20;7(1):38, 2018.
143. Al-Omar IA, E.A., Al-Ashban RM, Shah AH, *Effect of falciparum malaria infection on blood cholesterol and platelets.* J Saudi Chem Soc. 14 : 83–89. doi: 10.1016 / j.jscs.2009.12.013, 2010
144. Mawili-Mboumba DP, B.A.M., Kendjo E, Nzamba J, Medang MO, Mbina JR, Kombila M; MCORU team, *Increase in malaria prevalence and age of at risk population in different areas of Gabon.* Malar J.2;12:3. doi: 10.1186/1475-2875-12-3, 2013.
145. Eke, R.A., L. N. Chigbu, and W. Nwachukwu, *High prevalence of asymptomatic Plasmodium infection in a suburb of Aba Town, Nigeria.* Annals of African Medicine 5.1 (2006): 42-45.

, 2006.
146. Nyasa RB, Z.D., Kimbi HK, Kum KM, Ngu RC, Titanji VP., *The current status of malaria epidemiology in Bolifamba, atypical Cameroonian rainforest zone: an assessment of intervention strategies and seasonal variations.* BMC Public Health. 6;15:1105. doi: 10.1186/s12889-015-2463-1., 2015.
147. Klinkenberg E, M.P., Wilson MD, Amerasinghe FP, Donnelly MJ, *Impact of urban agriculture on malaria vectors in Accra, Ghana.* Malar J 7, 151 (2008). https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-151, 2008.
148. J, C., *Malaria in urban and rural Kinshasa: the entomological input.* Med Vet Entomol. 1993 Apr;7(2):127-37. doi: 10.1111/j.1365-2915.1993.tb00665.x. PMID: 8481529, 1993.
149. Machault, V., Gadiaga, L., Vignolles, C. et al, *Highly focused anopheline breeding sites and malaria transmission in Dakar.* Malar J 8, 138 (2009). https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-138, 2009.
150. N, B., *Urban malaria risk in sub-Saharan Africa: where is the evidence? .* Travel Med Infect Dis. 2007 Mar;5(2):135-7. doi: 10.1016/j.tmaid.2006.04.003. Epub 2006 Jun 12. PMID: 17298922, 2007.
151. Elguero E, D.-L.L., Rougeron V, Arnathau C, Roche B, Becquart P, Gonzalez JP, Nkoghe D, Sica L, Leroy EM, Durand P, Ayala FJ, Ollomo B, Renaud F, Prugnolle F, *Malaria continues to select for sickle cell trait in Central Africa.* Proc Natl Acad Sci U S A. doi: 10.1073/pnas.1505665112. Epub 2015 May 4, 2015.
152. Flück C, S.T., Beck HP, Irion A, Betuela I, Alpers MP, Anders R, Saul A, Genton B, Felger I, *Strain-specific humoral response to a polymorphic malaria vaccine.* Infect Immun. 2004 Nov;72(11):6300-5. doi: 10.1128/IAI.72.11.6300-6305.2004. PMID: 15501757; PMCID: PMC523016, 2004.
153. Yuan L, Z.H., Wu L, Li X, Parker D, Xu S, Zhao Y, Feng G, Wang Y, Yan G, Fan Q, Yang Z, Cui L., *Plasmodium falciparum populations from northeastern Myanmar display high levels of genetic diversity at multiple antigenic loci.* Acta Trop. 2013 Jan;125(1):53-9. doi: 10.1016/j.actatropica.2012.09.008. Epub 2012 Sep 20., 2013.
154. Soulama I, N.I., Ouedraogo A, Gansane A, Diarra A, Tiono AB, et al, *Plasmodium falciparum genotypes diversity in symptomatic malaria of children living in an urban and a rural setting in Burkina Faso.* Malar J. 2009;8:135. doi: 10.1186/1475-2875-8-135, 2009.
155. Yavo W, K.A., Mawili-Mboumba DP, Kassi FK, Tshibola Mbuyi ML, Angora EK, et al. , *Genetic polymorphism of msp1 and msp2 in Plasmodium falciparum isolates from Cote d'Ivoire versus Gabon. .* J Parasitol Res. 2016;2016:3074803. doi: 10.1155/2016/30748, 2016.
156. Cortés A, M.M., Benet A, Lorry K, Rare L, Reeder JC, *Plasmodium falciparum: distribution of msp2 genotypes among symptomatic and asymptomatic individuals from the Wosera region of Papua New Guinea.* Exp Parasitol. 2004 Jan-Feb;106(1-2):22-9. doi: 10.1016/j.exppara.2004.01.010. PMID: 15013785, 2004.
157. Ndong Ngomo JM, M.B.N., Yavo W, Bongho Mavoungou LC, Bouyou-Akotet MK, Mawili-Mboumba DP, *Spatial and temporal distribution of Pfmsp1 and Pfmsp2 alleles and genetic profile change of Plasmodium falciparum populations in Gabon.* Acta Trop. 2018 Feb;178:27-33. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.09.026. Epub 2017 Oct 7. PMID: 28993182, 2018.

158. Atroosh WM, A.-M.H., Mahdy MAK, Saif-Ali R, Al-Mekhlafi AM, Surin J, *Genetic diversity of Plasmodium falciparum isolates from Pahang, Malaysia based on msp1 and msp2 genes.* Parasites & Vectors. 2011;4:233. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar], 2011, 2011.
159. Mayor A, S.F., Aponte JJ, Almeda J, Gomez-Olive FX, Dgedge M, et al;, *Plasmodium falciparum multiple infections in Mozambique, its relation to other malariological indices and to prospective risk of malaria morbidity.* Trop Med Int Health. ;8:3–11. doi: 10.1046/j.1365-3156.2003.00968.x, 2003.
160. Tukwasibwe S, M.L., Mbogo GW, Nankoberanyi S, Maiteki-Sebuguzi C, Joloba ML, et al, *Differential prevalence of transporter polymorphisms in symptomatic and asymptomatic falciparum malaria infections in uganda.* J Infect Dis. 2014;210:154–157. doi: 10.1093/infdis/jiu044, 2014.
161. Daniels RF, C.H., Séne PD, Park DC, Neafsey DE, Schaffner SF, Hamilton EJ, Lukens AK, Tyne DV, Mboup S, Sabeti PC, Ndiaye D, Wirth DF, Hartl DL, Volkman SK, *Genetic surveillance detects both clonal and epidemic transmission of malaria following enhanced intervention in Senegal.* PLoS One. 2013 Apr 4;8(4):e60780. doi: 10.1371/journal.pone.0060780. PMID: 23593309; PMCID: PMC3617153, 2013.
162. Su XZ, J.H., Yi M, Mu J, Stephens RM, *Large-scale genotyping and genetic mapping in Plasmodium parasites.* Korean J Parasitol. 2009 Jun;47(2):83-91. doi: 10.3347/kjp.2009.47.2.83. Epub 2009 May 26. PMID: 19488413; PMCID: PMC2688805, 2009
163. Nabet, C., Doumbo, S., Jeddi, F. et al, *. Genetic diversity of Plasmodium falciparum in human malaria cases in Mali.* Malar J 15, 353 (2016). https://doi.org/10.1186/s12936-016-1397-0, 2016.
164. Ahouidi AD, B.A., Neafsey DE, Sarr O, Volkman S, Milner D, Cox-Singh J, Ferreira MU, Ndir O, Premji Z, Mboup S, Duraisingh MT, *T. Population genetic analysis of large sequence polymorphisms in Plasmodium falciparum blood-stage antigens.* Infect Genet Evol. 2010 Mar;10(2):200-6. doi: 10.1016/j.meegid.2009.11.008. Epub 2009 Nov 30. PMID: 19931645; PMCID: PMC2829370, 2010.
165. Nkhoma SC, N.S., Al-Saai S, Ashley E, McGready R, Phyo AP, Nosten F, Anderson TJ, *Population genetic correlates of declining transmission in a human pathogen.* Mol Ecol. 2013 Jan;22(2):273-85. doi: 10.1111/mec.12099. Epub 2012 Nov 2. PMID: 23121253; PMCID: PMC3537863.
166. Metoh TN, C.J., Fon-Gah P, Zhou X, Moyou-Somo R, Zhou XN, *Genetic diversity of Plasmodium falciparum and genetic profile in children affected by uncomplicated malaria in Cameroon.* Malar J. 2020;19(1):115. Published 2020 Mar 18. doi:10.1186/s12936-020-03161-4;, 2020.
167. Mohd Abd Razak MR, S.U., Norahmad NA, Abdul-Karim A, Muhammad A, Muniandy PK, Jelip J, Rundi C, Imwong M, Mudin RN, Abdullah NR, *Genetic Diversity of Plasmodium falciparum Populations in Malaria Declining Areas of Sabah, East Malaysia.* PLoS One. 2016 Mar 29;11(3):e0152415. doi: 10.1371/journal.pone.0152415. PMID: 27023787; PMCID: PMC4811561, 2016.

ANNEXES

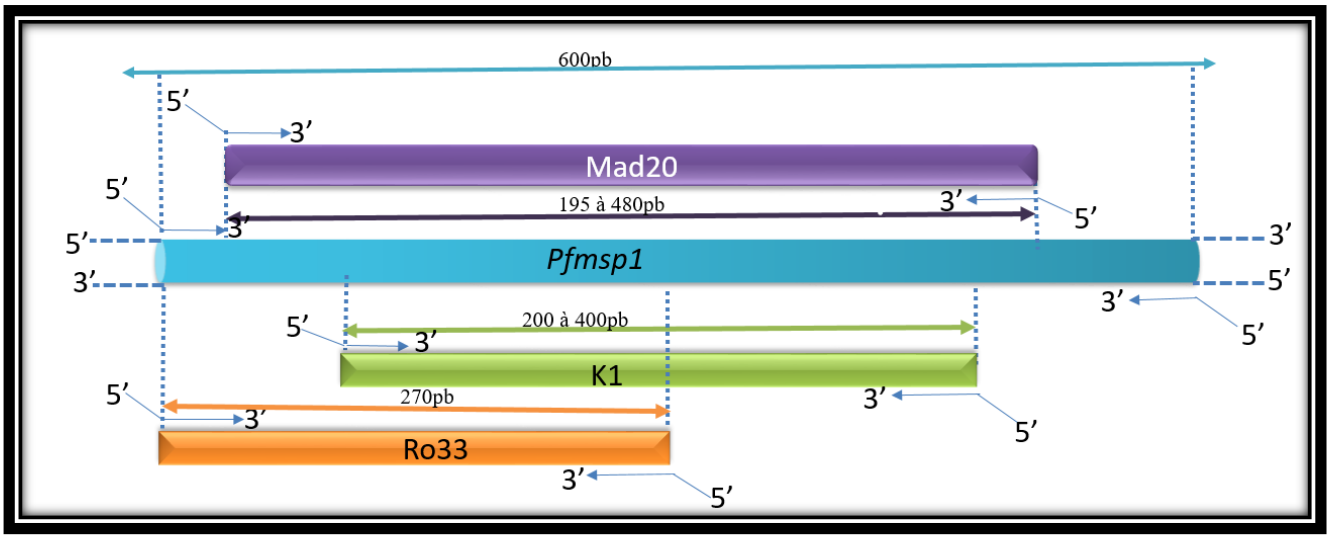
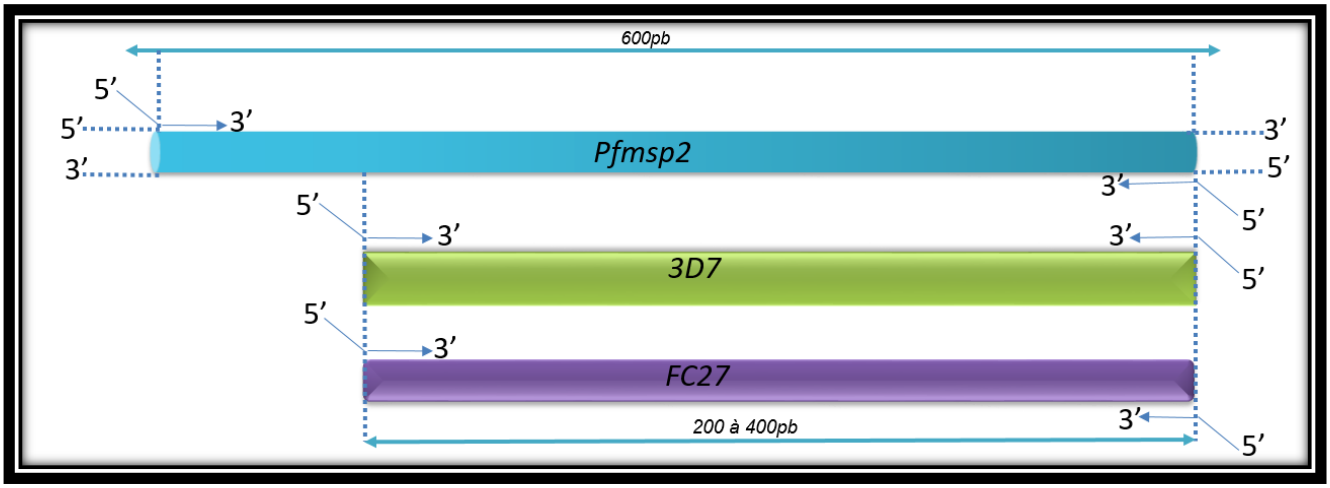


Figure complémentaire 1 : Schéma d'amplification du gène *msp-1*



Figures complémentaire 2: Schéma d'amplification du gène *msp-1*

RÉSUME

Le paludisme reste un fardeau dans diverses régions du monde. Si les infections symptomatiques sont diagnostiquées et traitées, le portage asymptomatique reste mal connu et son implication dans le maintien de la transmission est très forte. Parmi les cinq espèces de *Plasmodium* capables d'infecter l'Homme, *Plasmodium falciparum* est la plus répandue et la plus virulente, car elle est responsable de la quasi-totalité de la mortalité liée à cette endémie. Ainsi donc pour caractériser la virulence des espèces plasmodiales, plusieurs marqueurs tels que MSP (1,2), AMA 1 impliqués dans l'invasion érythrocytaire, et également considérés comme des antigènes candidats vaccins ont été étudiés. Le Gabon est une zone d'endémie palustre ou la transmission reste pérenne et l'espèce majoritaire est *Plasmodium falciparum.* Des récentes études ont mis en évidence des hautes prévalences de *Plasmodium malariae* en milieu rural chez des enfants asymptomatiques. L'objectif de cette étude était donc déterminer l'espèce plasmodiale la plus apte à induire la symptomatologie palustre en fonction du contexte socio-économique dans le sud-est du Gabon.

Au total 2381 enfant, âgé de 6 mois à 15 ans provenant de trois localités (Franceville, Makokou, Lastoursville) du Sud-Est du Gabon ont été inclus dans cette étude. Une numération formule sanguine, une goutte épaisse et/ou un TDR ont été réalisés sur les échantillons recueillis dans trois localités. Les échantillons ont ensuite été analysés par PCR classique suivie d'une PCR nichée selon la technique de Snounou pour identifier l'espèce en cause. Les gènes *msp (1,2) et ama-1* ont été amplifiés. Puis le gène *msp1* de *Plasmodium falciparum* a été génotype par la méthode de Sanger après purification sur gel des bandes d'ADN. Les analyses statistiques ont été faites en utilisant le logiciel R version 3.5.0, les séquences ont été analysées avec les logiciels Bioédit et MEGAX, puis avec Blast. Les analyses de génétique de population ont été effectuées à l'aide des logiciels FSTAT et Genetix. Puis des minimums spanning Tree ont été inféré à l'aide du logiciel Phyloviz version online.

L'âge moyen des enfants symptomatiques était plus élevé à Franceville (75,18±3,6 mois) par rapport à Makokou (44±2 mois) et Lastoursville (34,01±2 mois). L'âge moyen des enfants infectés asymptomatiques était significativement plus élevé à Makokou (113±8 mois) que dans les deux autres localités (Franceville 107,5±5,1 mois et Lastoursville (59±2 mois). Dans chaque localité, on note un âge moyen élevé chez les enfants infectés asymptomatiques comparé aux symptomatiques. Les paramètres hématologiques variaient significativement d'une région à une autre et en fonction de la symptomatologie. La prévalence globale de l'infection plasmodiale a été estimée à 40% (952/2381) dans le Sud-Est du Gabon. A Franceville (milieu Urbain) la prévalence de l'infection plasmodiale n'était pas significativement différente entre symptomatiques (22,7%) et asymptomatiques (16,1%, n = 23/143), $P>0,05$. Par contre la prévalence de l'infection plasmodiale symptomatique était plus élevée que celle des asymptomatiques en milieu semi-urbain, et rural. Une haute prévalence de l'infection plasmodiale symptomatique a été mise en évidence chez les enfants infectés en zone rurale et semi rural. Quant à l'infection asymptomatique elle n'était pas significativement différente entre les zones urbaines et semi-urbaines, mais plus haute en zone rurale. Notre analyse a permis de mettre en évidence trois espèces plasmodiales (*Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale*). *Plasmodium falciparum* était l'espèce majoritaire (91,4%, n = 651/712), et sa prévalence n'était pas significativement différente aussi bien entre symptomatiques et asymptomatiques qu'entre les trois localités. Suivie de *P. malariae (2,8%, n = 20/712)* et des coinfections. En milieux rural et semi-rural une prévalence de *Plasmodium malariae* plus ou moins haute a été mise en évidence chez les enfants asymptomatiques comparés aux symptomatiques. La caractérisation de la virulence avec les marqueurs *Msp1* et 2, a permis de mettre en évidence un important polymorphisme génétique au sein de ces deux gènes aussi bien chez les symptomatiques que chez les asymptomatiques dans les trois localités. La fréquence des la familles alléliques K1 et Mad20 FC27 était significativement plus élevée que celle de RO33 et 3D7($P<0,05$ et la famille allélique Mad20 s'est avéréee plus fréquente dans les isolats symptomatiques comparés aux asymptomatiques. De plus, les familles alléliques Mad20 et Ro33 étaient plus fréquentes en milieu urbain qu'en milieu semi urbain et rural. De plus, 12 génotypes Mad20, 8 génotypes FC27, 4 génotypes K1 et 8 génotypes 3D7 ont été uniquement retrouvés dans les isolats symptomatiques. Et 4 génotypes K1, 3 génotypes Mad20, 7 génotypes FC27 et 5 génotypes 3D7 différents ont été uniquement retrouvés dans les isolats asymptomatiques. Le nombre de génotype msp-1 et msp-2 par

isolat variait de 1à 5 et de 1à 4 respectivement et la valeur de MOI a varié de 1,95 à 2,78 mais sans aucune différence entre localités et entre les différents statuts cliniques. La diversité génétique était élevée avec un indice de diversité (He) allant de 0,6 à 0,9 pour les deux gènes. La valeur d'He était plus importante pour *msp_2* comparé à *msp-1*. Par ailleurs, l'indice de diversité n'était pas significativement différent entre les sites, et entre les deux statuts cliniques pour les deux gènes. L'indice de fixation estimée (Fst) mesurant la différenciation, de la population parasitaire due à la structure génétique à chaque site était de 0.08202, 0.10413 et de 0.13634 entre Franceville (milieu urbain) et Lastoursville (milieu rural), puis entre Lastoursville et Makokou (milieu semi-urbain) enfin entre Franceville et Makokou respectivement. Le séquençage et l'alignement des gènes ont confirmé un polymorphisme d'identité. Les séquences des allèles K1 et RO33 ont montré une forte similitude entre certains isolats asymptomatiques d'une part et symptomatiques d'autre part. Cette observation est confirmée par l'analyse d'arbres couvrant le minimum de vraisemblance (minimum spanning tree) qui a permis de mettre en évidence certaines grappes se regroupant en fonction du statut clinique et de la localité.

En conclusion, une augmentation de l'âge moyen a été mise en évidence dans cette étude. Une haute prévalence de l'infection plasmodiale a été énoncée dans les zones rurales et semi rurales chez les enfants symptomatiques. *Plasmodium falciparum* reste l'espèce parasitaire majoritaire aussi bien chez asymptomatiques que chez les symptomatiques. La prévalence de *P. malariae* était haute en milieu semi-urbain et rural chez les enfants asymptomatiques par rapport aux symptomatiques. Bien qu'un important polymorphisme des gènes MSP(1,2) ait été mis en évidence chez *Plasmodium falciparum*, aucune relation claire n'a été établie entre la symptomatologie clinique et l'espèce en cause, mais les différents allèles se sont regroupés en fonction de la localité. Il serait donc nécessaire de réaliser d'autres analyses en utilisant des méthodes telles que les microsatellites et/ou le séquençage à haut débit par les NGS.