AIX-MARSEILLE UNIVERSITE
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
FACULTE DE MEDECINE-LA TIMONE
URMITE-CIRMF

THESE

présentée pour obtenir le grade universitaire de Docteur

Discipline : Pathologie Humaine | *Spécialité* : Maladies Infectieuses

Berthe Amélie IROUNGOU épouse ANGOUE

Syndrome fébrile non bactérien en milieu pédiatrique à Franceville au Gabon

Soutenue le 16 Septembre 2014

devant le jury :

Ogobara K DOUMBO	MRTC	Rapporteur
Jean-Bernard LEKANA-DOUKI	USS	Rapporteur
Saadou ISSIFOU	UAC	Examinateur
Jean-Louis MEGE	IHU	Directeur de Thèse
Fousseyni S TOURE NDOUO	CIRMF	Directeur de Thèse

AVANT-PROPOS

Le format de présentation de cette thèse correspond à une recommandation de la spécialité Maladies Infectieuses et Microbiologie, à l'intérieur du Master des Sciences de la Vie et de la Santé qui dépend de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie de Marseille.

Le candidat est amené à respecter des règles qui lui sont imposées et qui comportent un format de thèse utilisé dans le Nord de l'Europe et qui permet un meilleur rangement que les thèses traditionnelles. Par ailleurs, la partie introduction et bibliographie est remplacée par une revue envoyée dans un journal afin de permettre une évaluation extérieure de la qualité de la revue et de permettre à l'étudiant de commencer le plus tôt possible une bibliographie exhaustive sur le domaine de cette thèse. Par ailleurs, la thèse est présentée sur article publié, accepté ou soumis associé d'un bref commentaire donnant le sens général du travail. Cette forme de présentation a paru plus en adéquation avec les exigences de la compétition internationale et permet de se concentrer sur des travaux qui bénéficieront d'une diffusion internationale.

Professeur Didier RAOULT

Remerciements

Je remercie particulièrement le **Professeur Jean-Louis Mege** de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir donné la possibilité d'apprendre et de me perfectionner sur des techniques qui me serviront tout au long de ma carrière.

Je remercie le **Professeur Fousseyni Touré Ndouo** d'avoir accepté de m'accompagner dans la réalisation de ce travail. Merci Professeur pour vos précieux conseils.

Mes sincères remerciements au **Docteur Eric Leroy**, Directeur du Centre International de Recherche de Franceville pour m'avoir ouvert les portes de ce temple du savoir.

Mes sincères remerciements au **Docteur Eric Ghigo** de m'avoir tendu la main à chaque fois que j'en avais besoin.

Je remercie le **Professeur Ogobara K Doumbo** pour avoir accepté de rapporter ce travail. Merci pour vos précieux conseils.

Mes sincères remerciements au **Professeur Jean-Bernard Lekana-Douki** pour avoir accepter de rapporteur ce travail.

Mes sincères remerciements au **Docteur Saadou Issifou** pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements au **Docteur Dieudonné Nkoghé** sans qui je n'aurai pas pu finaliser ce travail, merci de tout cœur Bobo.

Mes sincères remerciements au **Docteur Souleymane Brah** pour son soutien et son aide pendant cette formation, merci grand.

Mes remerciements au **Médecin Lt Colonel Mbongo Nkama** pour m'avoir permis de faire ce stage, merci de tout cœur chef.

Mes remerciements au Colonel Directeur des Personnels des Services de Santé des Armées **Jules Mickala** pour m'avoir soutenue durant ces trois longues années.

Mes remerciements au **Médecin Général Inspecteur Directeur Général des Services de Santé Militaire Raymond Nzenze** pour m'avoir donné la chance de me perfectionner davantage afin de répondre aux besoins de mon pays.

Je tiens à remercier tout particulièrement le **Professeur Raoult** pour m'avoir ouvert les portes de l'URMITE. Je ne pourrai jamais assez vous remercier pour l'opportunité que vous m'avez donné de recevoir cette formation dans votre prestigieuse unité.

Je remercie tout particulièrement les équipes de l'**URMITE** avec lesquelles j'ai travaillé, pour votre disponibilité et pour avoir permis mon intégration.
Je tiens à remercier **Catherine, Amira** au 4ème étage aile Rouge, **Jérôme et Muriel** au P2 et **Anne-Marie, Jean-Michel, François** à l'Insectarium.

Mes remerciements aux équipes du **CIRMF** avec lesquelles j'ai travaillé en particulier **André Délicat**, **Faustin Lenkoulou**, **Charlène Kouna et Gaël Darren Maganga**.

Je remercie enfin les membres de ma famille pour m'avoir soutenue durant ces trois longues années, en particulier **la famille Iroungou, M. et Mme Mbanza, Mesdames Irène et Christiane Pambou**.

Un merci particulier pour mon époux, **M. Angoué Joël Armand**, pour tous ses encouragements.

Je vous aime.

SOMMAIRE

Avant-propos i

Remerciements iii

Résumé 2

Summary 4

Introduction 6

Objectifs 11

PREMIÈRE PARTIE : Prévalence du paludisme dans la population générale 13

Chapitre I : Review 15
Infection submicroscopique à *Plasmodium falciparum* en zone d'endémie palustre : analyse et revue de littérature.

Chapitre II : Article 1 41
Submicroscopic infection from uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria of Franceville, southeastern Gabon

DEUXIÈME PARTIE : Les agents impliqués dans la survenue de la fièvre chez l'enfant 53

Chapitre III : Article 2 55
Submicroscopic plasmodial infection may lead to severe malaria in children

Chapitre IV : Article 3 71
Molecular characterization of Mumps virus in symptomatic individuals of Gabon, Central Africa

Conclusions Générales et Perspectives 97

Annexe 103

Références 115

Résumé

Le syndrome fébrile, une des principales causes de consultation dans les services de pédiatrie en Afrique Subsaharienne, reste dans la majorité des cas liée à une maladie infectieuse (parasitaire, virale, bactérienne). Dans cette thèse, nous avons identifié les agents infectieux non bactériens responsables de la survenue des fièvres chez l'enfant afin de développer des outils moléculaires permettant l'amélioration de la surveillance épidémiologique. Pour ce faire, ce travail est divisé en 2 parties essentielles.

Dans la première partie une étude transversale a été réalisée de 2011 à 2012 à l'Hôpital de l'Amitié Sino-gabonaise (HASG) et au Centre Hospitalier Régional Amissa Bongo (CHRAB) de Franceville pour analyser l'infection plasmodiale dans une population d'adultes et d'enfants fébriles par microscopie et PCR. Au total sur 595 patients enrôlés, la prévalence de l'infection plasmodiale patente était de 23 % en moyenne. A l'opposé, les infections submicroscopiques à *P. falciparum* (ISM) se rencontraient dans 9% des cas, avec une prévalence élevée au début et à la fin des saisons de pluies.

Dans la deuxième partie une autre enquête transversale a été conduite de janvier à mars 2013 à l'HASG pour déterminer les principales causes étiologiques des fièvres non bactériennes chez l'enfant. Sur 203 enfants recrutés, 111 ont été diagnostiqués positifs à *P. falciparum*, 73 (35,9 %) par microscopie et 38 (18,71 %) par PCR (ISM) avec une prévalence globale de 54,68 %. Selon les critères de l'OMS, 35 enfants (31,53 %) ont montré un tableau clinique de paludisme sévère (27 infections patentes et 8 ISM). Cliniquement, ces cas de paludisme sévère étaient principalement composés de 85,71 % de patients anémiques (30 / 35), 71,14 % de personnes prostrées (25 / 35) et 57,14 % d'enfants atteints d'ictère clinique (20 / 35). Toutefois, seuls

2 cas d'anémie sévère ont été observés, les autres cas restants étaient modérés (10) ou légers (18). Plus intéressant, 8 ISM (22,85 %) ont été trouvés avec des manifestations neurologiques (prostration) accompagnées d'une thrombopénie. Concomitamment, 15 et 12 cas cliniques d'oreillons et de rougeole ont été observés respectivement sur les 203 enfants fébriles. L'ARN du virus *Mumps* de l'oreillon a été détecté par hnRT-PCR dans le sérum et le crachat des patients 14 et 15 respectivement. Le génome complet de la souche isolée du patient 15 a été séquencé et compte 15263 nucléotides. Ainsi, des amorces spécifiques ont été dessinées pour amplifier le gène codant pour la nucléocapside (N) par RT-PCR et utilisé comme outil de typage. Au total, le gène N a été détecté chez 4 patients (2 sérums, patient 11 et 14 et 2 crachats, patient 10 et 15). L'analyse phylogénique de ces souches, basée sur les gènes N et SH (small hydrophobic), a montré qu'il s'agit en fait d'une seule et même souche virale MuV Gabon appartenant au génotype G et présentant une très grande homologie avec les souches responsables des épidémies aux Etats Unis et en Europe suggérant une possible importation. Enfin, le virus responsable de la rougeole (*Measles* virus) a été détecté par PCR chez 1 patient sur 12. Le génotypage a révélé que cette souche était identique à celle qui était à l'origine de l'épidémie de Libreville en mars de la même année.

En conclusion, le syndrome fébrile chez l'enfant à Franceville est essentiellement dû aux infections à *P. falciparum* et *Paramyxovirus*. Ces résultats montrent que les infections submicroscopiques à *P. falciparum* peuvent non seulement servir de réservoir mais aussi initier une symptomatologie sévère chez l'enfant. Ils suggèrent également l'intérêt des typages moléculaires des souches virales dans la prise en charge et / ou le développement des stratégies de contrôle des *Paramyxovirus*.

Summary

Febrile syndrome, the main cause of consultation in pediatric wards from Sub-Saharan Africa remains in great majority associated with infectious diseases (parasites, viruses, bacteria). In this thesis, we identified the infectious agents associated with childhood fever in order to develop suitable molecular tools allowing the epidemiological surveillance. This work is divided into two main parts.

Firstly, we analyzed the prevalence of *Plasmodium* infection in febrile patients (children and adults) of Franceville by combined microscopy and PCR to determine the rate of *P. falciparum* submicroscopic infection (SMI). Indeed, a cross-sectional study was conducted from 2011 to 2012 in "Hopital de l'Amitié Sinogabonaise" (HASG) and the "Centre Hospitalier Régional Amissa Bongo (CHRAB) of Franceville, southeastern Gabon. Five hundred ninety five (595) patients were enrolled. Overall, the prevalence of *Plasmodium* infection detected by microcopy was 23% on average. In contrast, 9% of SMI cases were observed with a high prevalence at the beginning and the end of the rainy seasons.

Secondly, another cross-sectional survey was conducted at pediatric ward of HASG in which the main etiological causes of febrile illness in children were investigated. Of 203 children recruited, 111 were diagnosed positive for *P. falciparum*, 73 (35.9%) by microscopy and 38 (18.71%) by PCR (SMI) with an overall prevalence of 54.68%. According to WHO criteria, 35 (31.53%) children showed a clinical picture of severe malaria (27 ME+ and 8 SMI). Clinically, these cases of severe malaria were mainly composed of 85.71% of patients with anaemia (30/35), 71.14% of prostrated individuals (25/35) and 57.14% of children with clinical jaundice (20/35). However, only two cases of severe anaemia were observed, the other remaining cases were moderate (10) or mild (18). More

interestingly, 8 SMI (22,85%) were found with neurological manifestations (prostration) and all had thrombocytopenia. These results show that SMI, if not detected and treated, can be a reservoir and/or initiate severe malaria in childhood. Concomitantly, 15 and 12 clinical cases of *Mumps* and *Measles* viruses were diagnosed respectively. Mumps virus RNA has been detected by hnRT-PCR in serum and oral swab of patient 14 and 15 respectively. The whole genome of mump strain isolated from oral swab of the patient 15 has been sequenced and composed of 15,263 nucleotides. Indeed, specific primers have been designed to amplify the nucleocapsid (N) gene by RT-PCR and used for genotype determination. Overall, the N gene has been successful detected in 4 patients (2 sera, patient 11 and 14 and 2 oral swabs, patient 10 and 15). Phylogenetic analysis using N and small hydrophobic (SH) genes showed that these strains are the same (MuV/Gabon) and clustered with genotype G strains. Moreover, this MuV/Gabon shows a highly amino acid identity (99%) with the mumps strains which have been associated with several epidemic outbreaks from USA and Europe suggesting a possible importation. Finally, Measles virus has been diagnosed by PCR in 1 patient out of 12. Genetic analysis revealed 100% identity with the strain associated with the outbreak of Libreville in March of the same year.

In conclusion, febrile syndrome in childhood at Franceville is essentially caused by *P. falciparum* and *Paramyxovirus* infections. These results show that submicroscopic infection of *P. falciparum* can serve as a reservoir and also able to initiate a severe symptomatology in children. They also suggest the usefulness of circulating viruses' genotyping tools in the management and/or the development of *Paramyxoviruses* control strategies.

Introduction

L'un des motifs de consultation les plus fréquemment rencontrés en pédiatrie est la fièvre. Elle reste dans la majorité des cas liée à une maladie infectieuse (1). L'âge est un facteur primordial à considérer dans la prise en charge des enfants fébriles. En effet, les décès pour les maladies fébriles seraient de l'ordre de 60% en Afrique Centrale chez les enfants de moins de cinq ans (2). La fièvre peut avoir plusieurs origines : bactériennes, virales, parasitaires, néoplasiques.

Outre les bactéries et les causes tumorales dont nous ne parlerons pas ici, le paludisme à *Plasmodium falciparum* reste un problème sanitaire majeur à l'échelle mondiale avec plus de 40% de la population exposée à un risque variable dans les pays où la transmission est endémique. La rapidité du diagnostic et du traitement est cruciale pour prévenir la morbi-mortalité, notamment dans les populations à risque à savoir les enfants et les femmes enceintes (3). Au Gabon comme partout ailleurs en Afrique subsaharienne, la fièvre est souvent assimilée au paludisme, une situation qui s'explique par le fait que cette affection était considérée pendant longtemps comme la première cause de fièvre (4,5). Depuis l'introduction par l'OMS de nouvelles directives (Roll Back Malaria 2000) visant à réduire le poids du paludisme dans les affections fébriles, d'autres affections

(infections respiratoires virales) se positionnent à côté de la malaria parmi les premières étiologies de fièvre dans de nombreux pays subsahariens (6).

Les virus constituent également des agents associés à des affections fébriles notamment les pneumopathies. De nombreuses études réalisées auprès des services de pédiatrie en Afrique rapportent que ces affections respiratoires occupent la première où la seconde cause d'affections fébriles (7,5).

Ces pneumopathies sont dues entre autre à des virus de la famille des paramyxovirus (*Measles virus* et *Mumps virus*). Le virus des oreillons (*Mumps virus*) est un virus à ARN responsable d'accès fébrile. Le diagnostic et le contrôle de l'infection sont basés sur la clinique et une grande couverture vaccinale (R.O.R). La clinique seule est insuffisante pour le diagnostic car la confirmation biologique est importante (8). Le virus de la rougeole (*Measles virus*) est aussi un virus à ARN dont l'homme et les primates constituent des réservoirs. Plusieurs tests diagnostiques existent mais dans les zones à faible transmission, le virus est difficile à mettre en évidence. Ce virus est habituellement diagnostiqué cliniquement en zone endémique ou durant les épidémies. Le diagnostic clinique est le principal outil de diagnostic, toutefois le diagnostic biologique lorsqu'il est réalisé est basé sur le dosage des anticorps notamment les IgM (9,10). Le taux de mortalité est de 5 à 10% en Afrique (11,12).

Au Gabon, la survenue d'une infection virale est un réel problème pour les personnels de santé qui ne sont pas suffisamment outillés pour un diagnostic biologique et une prise en charge. En effet, en dehors du diagnostic clinique qui est évident pour certains cas (Parotidite pour les oreillons, catarrhe oculo-nasal et signes de Koplik pour la rougeole), il existe peu de moyens de diagnostic et de traitement. La seule arme dont on dispose est la prévention par la vaccination qui voit malheureusement sa couverture réduite à causes d'idées péjoratives reçues et véhiculées au sein de la population.

En somme, il apparait que la formation et le perfectionnement des agents de santé et l'équipement des services pour un diagnostic et une prise en charge des maladies virales et des formes atypiques de paludisme (infection submicroscopique à *Plasmodium falciparum)* soient des problématiques à prendre en compte actuellement dans nos pays.

Dans cette thèse, nous avons abordé l'infection submicroscopique à *Plasmodium falciparum* dans une revue de littérature, suivi de quatre articles originaux dont deux publiés et deux en préparation. Enfin, une brève conclusion synthétise le travail effectué et les perspectives qui en découlent.

Objectifs

Ce travail avait pour objectif principal d'identifier les différents agents étiologiques du syndrome fébrile non bactérien chez l'enfant, afin d'approfondir nos connaissances sur ce type de maladie et de développer des outils moléculaires permettant d'améliorer la surveillance épidémiologique. Les objectifs spécifiques sont :

1. Déterminer la prévalence du paludisme à *P. falciparum* y compris les infections submicroscopiques.
2. Discriminer les groupes cliniques selon les critères de classification de l'OMS.
3. Etablir une corrélation entre l'infection submicroscopique à *P. falciparum* et l'état clinique des patients.
4. Mettre en évidence et caractériser les agents infectieux viraux impliqués dans la survenue de la fièvre chez l'enfant.
5. Développer des outils de typage moléculaire.

PREMIÈRE PARTIE : Prévalence du paludisme dans la population générale

Chapitre I

Review

Infection submicroscopique *à Plasmodium falciparum* en zone d'endémie palustre : analyse et revue de littérature.

Iroungou BA, Bitéghé Bi Essone JC, Mege JL, Touré Ndouo FS.

Submitted to Cahier de Santé

CHAPITRE I - AVANT-PROPOS

Le diagnostic du paludisme est basé sur la détection de plasmodies dans le sang. La technique de référence ou gold standard reste l'examen microscopique du frottis sanguin et de la goutte épaisse (GE). Cependant, cette technique ne permet pas de détecter les faibles parasitémies (<100 parasites par μl de sang) et elle nécessite l'expertise de microscopistes expérimentés. Les tests de diagnostic rapide (TDR) ont également été développés pour permettre le diagnostic du paludisme dans les zones où la GE ne peut être réalisé. Bien que plus sensible que la GE (50 parasites par μl de sang), ces TDR ne permettent pas de détecter tous les cas d'infection palustre et des résultats discordant par rapport au gold standard ont été rapportés. L'introduction de la Réaction de Polymérase en Chaîne (PCR) a été d'un apport considérable dans le diagnostic du paludisme car permettant de détecter les parasitémies de l'ordre de 0,01parasite/μL. Ces faibles parasitémies sont désignées sous l'appellation d'infections submicroscopiques (ISM). En zone endémique, les ISM chez les symptomatiques et asymptomatiques pourraient constituer de potentiels réservoirs entretenant la transmission du parasite. Toute fois, on dispose de très peu de données sur les ISM notamment chez les personnes fébriles au Gabon, zone de transmission pérenne. L'objectif de cette revue de littérature était de faire une analyse de la situation actuelle des ISM et discuter leurs intérêts dans le développement des stratégies de lutte visant à éliminer le paludisme.

Infection submicroscopique à *Plasmodium falciparum* en zone d'endémie palustre : Analyse et Revue de littérature

Berthe Amélie Iroungou[1,2], Jean-Claude Bitéghé Bi Essone[1], Jean-Louis Mege[2], Fousseyni S Touré Ndouo[1]

1. Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), BP 769 Franceville, Gabon.

2. URMITE-IRD198, CNRS UMR7278, INSERM U1095 Faculté de Médecine, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France.

Résumé

Souvent rapportée comme asymptomatique, l'infection submicroscopique (ISM) à *Plasmodium falciparum* peut de manière imprévisible donner des accès palustres simple et sévère chez l'adulte et l'enfant. La rupture temporaire de la transmission du paludisme pour des raisons thérapeutiques (traitement préventif) ou climatique (sécheresse) est la raison la plus souvent évoquée pour expliquer la survenue de ces ISM. Cependant, des études réalisées en milieu de transmission pérenne montrent une persistance des ISM tout au long de l'année avec des pics en début et fin de saison de pluies. D'où la nécessité d'améliorer et/ou développer les outils diagnostiques adaptés à la détection des ISM autre que la PCR pour une prise en charge globale et efficace du paludisme. Dans cette revue nous discutons, à la lumière des travaux antérieurs, l'intérêt des infections submicroscopiques à *P. falciparum* dans le développement des stratégies de lutte visant à éliminer le paludisme.

Summary

Often reported as asymptomatic, the *Plasmodium falciparum* submicroscopic infection (SMI) can specifically trigger the uncomplicated as well as severe malaria in both adult and childhood. In endemic areas of malaria, the occurrence of SMI is influencing mainly by climate notably the dry season and the intermittent preventive treatment. Several studies, carried out in the perennial transmission settings, have shown the persistence of SMI throughout the year with peaks at the beginning and the end of the rainy seasons. Indeed, the improvement or development of reliable and adapted diagnostic tool for SMI instead of PCR is essential for disease accurate management. In this review we discuss, in the light of previous works, the interest of *P. falciparum* submicroscopic infections in the development of control strategies with regard to the malaria elimination policy.

Mots-clés: *Plasmodium falciparum*, malaria, infection submicroscopique, PCR, transmission pérenne.

Introduction

P. falciparum donne essentiellement une symptomatologie fébrile parfois mortelle surtout chez l'enfant, les femmes enceintes et les sujets non immuns qui arrivent en zone d'endémie. La grande létalité associée à certaines formes comme l'anémie sévère et le neuropaludisme amène à envisager devant tout patient avec fièvre un diagnostic de paludisme quelque soit les signes qui accompagnent cette fièvre surtout si le patient vit en zone endémique. L'infection peut être patente c'est-à-dire détectable par microscopie standard ou sub-patente (submicroscopique) diagnostiquée par TDR et/ou PCR.

Malgré les moyens de lutte mis en œuvre et la baisse significative de la prévalence du paludisme à *P. falciparum* en zones endémiques, la maladie reste toujours un problème majeur de santé publique notamment dans les pays en développement. La stratégie globale de lutte contre cette maladie repose essentiellement sur la détection précoce et le traitement approprié (1). Le diagnostic du paludisme constitue ainsi une urgence pour la prise en charge rapide du malade. Néanmoins, dans les pays en développement, la prise en charge des malades reste encore mal assurée et les moyens de prévention sont rudimentaires et insuffisants.

D'où l'importance de l'initiative mondiale ***« Faire Reculer le Paludisme »*** (FRP), lancée le 23 juillet 1998 par l'OMS et ses partenaires qui a permis un recul du taux de morbidité et de

mortalité du au paludisme (2). Cependant, afin de maintenir de façon soutenue la baisse de la prévalence du paludisme jusqu'à l'éradication, il est important de soutenir les programmes nationaux de lutte contre cette maladie par le renforcement de leur capacité. C'est à ce prix que nous pourrons avoir la maîtrise et le développement des outils épidémiologiques performants (prévention, diagnostic et traitement) susceptibles de mesurer correctement les indicateurs d'impact de programme dans nos pays en développement. Ceci reste indispensable pour le développement et la mise en place des programmes de lutte ainsi que l'évaluation de leur suivi (3).

Dans cette revue nous discutons, à la lumière des travaux antérieurs, l'intérêt des infections submicroscopiques à *P. falciparum* (ISM) dans le développement des stratégies de lutte.

Diagnostic:

Microscopie : Le diagnostic microscopique (ME) est le gold standard, non seulement pour détecter les plasmodies mais aussi pour faire de la surveillance épidémiologique et mesurer l'impact des programmes de lutte. Cependant, la ME doit -être réalisée par un personnel bien expérimenté, le seuil de détection étant fonction de la densité parasitaire. La méthode est d'autant plus sensible que la densité parasitaire augmente et diminue avec de très faible parasitémie, de l'ordre de 100 parasites par microlitre de sang (4). Ces faibles parasitémies ne peuvent parfois être détectées par ME

conventionnelle et posent le problème de l'estimation de la prévalence réelle de la maladie.

PCR : Ainsi la prévalence réelle du paludisme est sous estimée parce que la ME n'est pas adaptée pour détecter les infections submicroscopiques (ISM). Par conséquent, le développement d'autres méthodes diagnostiques plus sensibles que la microscopie et spécifiques permettant de compléter les insuffisances du diagnostic microscopique ont été développées notamment la PCR à partir des années 90 (3 ; 5 ; 6). Le seuil de détection de la PCR est estimé à environ 0,01 parasite par microlitre de sang total (4 ; 7). Dans le diagnostic de *P. falciparum,* des études ont montré que la méthode PCR basée sur l'amplification du gène STEVOR a une sensibilité de 100%, contre 83% pour SSrRNA et 72% seulement pour MSA-2 (8). A titre d'information, le gène STEVOR est présent en quarante copies chez *P. falciparum* et absent chez les autres espèces de *Plasmodium*. Ce gène situé dans la région sub-télomérique de tous les chromosomes et présente à la fois des régions hypervariables et conservées (5).

ISM chez les sujets asymptomatiques :

Plusieurs études ont été menées dans le but de mettre en évidence le portage asymptomatique de plasmodies en zone d'endémie. En effet, en 1996 une étude réalisée dans deux localités du Sénégal (Pikine, Dielmo), zone holoendémique avait relié le portage sain de parasites à l'introduction de

nouvelles espèces de moustiques après une rupture de transmission constatée au Sénégal durant cette période. Pour la première fois, une étude faisait le lien entre le portage sain de parasites et la discontinuité de la transmission doublée de l'introduction de nouvelles espèces infectantes confirmé par le changement de génotype parasitaire lorsque la transmission est discontinue (9).

Une autre étude réalisée à Dielmo trois ans plus tard mettait l'accent sur le fait que l'immunité antiparasitaire jouerait un rôle avec l'augmentation de l'âge et que les manifestations cliniques ne pouvaient pas être prédictives du niveau d'immunité protectrice (10). A la lumière de ces travaux, il apparait clairement que si l'immunité parasitaire était fonction de la clairance parasitaire, les enfants seraient les mieux protégés car ayant une clairance parasitaire beaucoup plus longue que celle des adolescents et les adultes. De ces travaux nous pouvons conclure que l'immunité anti palustre se met en place de façon progressive. En 2006, une étude faite à Dienga, dans le Sud-est du Gabon zone hyper endémique à transmission pérenne avait rapporté que le taux d'infection submicroscopique à *P. falciparum* diminuait avec la prise de l'association thérapeutique Sulfadoxine-Pyriméthamine et Artésunate et par la même occasion avait confirmée un changement de génotype parasitaire après chaque traitement antipaludéen suppressif en zone endémique (11).

Ces résultats confirment ceux obtenus au Sénégal et ont permis de comprendre qu'une rupture de la transmission qu'elle soit

chimique (prise de traitement) ou naturelle (due à la sécheresse) entraîne nécessairement un changement de génotype parasitaire confirmant l'introduction de nouvelles espèces.

En 2009, Okell LC (7) et al ont réalisé une revue systématique sur les précédents travaux en revenant sur l'importance de l'utilisation de la PCR comme technique de détection de parasite. Il ressort de cette revue et méta analyse qu'environ deux tiers des sujets infectés par *Plasmodium* ne sont pas détectés par microcopie notamment dans les zones endémiques à faible niveau de transmission. Dans ces zones la prévalence des ISM est plus élevée comparée à celle des zones de forte transmission. Le seuil de détection de la microscopie est de 5 parasites / μl et celui de la PCR 0,01 parasite / μl. Si le lien est fait entre niveau de transmission et la survenue des ISM, les facteurs qui déterminent cette survenue ne sont pas bien connus. Une des hypothèses serait la diminution de la prévalence du paludisme liée certainement à l'amélioration des mesures préventives et de prise en charge, les zones de forte transmission devenant progressivement celles à transmission modérée voire faible.

ISM chez les sujets symptomatiques :

Les femmes enceintes comme les enfants ont toujours été des populations à risque pour le paludisme. Face à la gravité de la maladie chez ces personnes de nombreuses équipes ont menées des études visant à comprendre les causes de la gravité pour mieux protéger la mère et l'enfant. Ainsi, la mise en évidence

de la séquestration des parasites par le placenta reste une grande avancée pour la compréhension de la sévérité du paludisme chez la femme enceinte (12). Aussi plusieurs équipes ont développé la PCR et le TDR afin de détecter les parasites au niveau placentaire et du cordon ombilical après la délivrance (4; 13 ; 14 ; 15). Ces auteurs ont montré une association entre les ISM et le faible poids à la naissance.

Récemment, des études menées au Sud-est du Gabon à Franceville ont montré que la prévalence des ISM chez les sujets symptomatiques oscille entre 9 % et 18 % selon les périodes de l'année (16 ; 17). Ces résultats suggèrent la nécessité de développer des outils diagnostiques adaptés permettant de détecter ces ISM notamment chez les symptomatiques, en prélude à une prise en charge.

ISM et Prémunition

Un ensemble d'études réalisées en zones endémiques et contenues dans une revue ont montré l'implication des ISM dans le développement de l'immunité antiparasitaire des sujets non immuns ou partiellement immunisés. En effet, une étude réalisée sur des sujets non immuns ou naïfs n'ayant reçu aucun traitement antipaludéen a montré que le taux de parasites visibles par microscopie pouvait disparaitre au bout de 200 jours, ce qui permet de suggérer que l'ISM impulse le développement d'une réponse immunitaire. De même, d'autres travaux soulignent que la densité parasitaire diminue avec l'âge

ce qui pourrait expliquer le nombre plus important d'ISM observées chez les adultes par rapport aux enfants (19).

Une analyse en régression linéaire réalisée par Okell et al a montré que le taux d'infection plasmodiale détectable par microscopie diminue avec l'âge et que cela pourrait être due à l'exposition fréquente des individus conduisant au développement d'une immunité beaucoup plus prononcée chez l'adulte par rapport à l'enfant. Il n'est pas clairement établi que l'ISM varie avec l'âge en zone de haute transmission suggérant ainsi qu'il existe des facteurs n'ayant aucun lien avec l'immunité des populations qui favorisent la détection de la forte proportion d'infection microscopique dans ces zones (19).

Une étude menée en Uganda a mis en évidence le fait que la prévalence et les titres d'anticorps restaient stables chez enfants qui étaient continuellement infectés et chutaient chez ceux qui n'étaient plus parasités. Ces résultats montrent une fois de plus que l'immunité est entretenue par les ISM dans les zones de haute transmission (20).

D'autres travaux réalisés essentiellement sur les ISM à gamétocytes du *Plasmodium falciparum* ont révélé que l'immunité acquise est essentielle et importante pour la lutte contre les gamétocytes car elle agit sur la gamétogenèse, influence la concentration des gamétocytes et joue sur le pouvoir infectieux des gamétocytes. De plus, l'augmentation du taux d'anticorps entraîne la diminution de la transmission en bloquant l'activité de transmission du paludisme exercée par les gamétocytes (21).

ISM et Symptomatologie

Très souvent attribuées à la présence d'autres agents infectieux chez les enfants, les ISM sont soit asymptomatiques dans la majorité des cas ou symptomatiques surtout chez les femmes enceintes. En effet, la femme enceinte représente une des fractions les plus vulnérables face au paludisme et particulièrement à cause de l'ISM. Un lien a été établi entre l'ISM et l'anémie maternelle, une étude a rapportée une association significative entre la parasitémie submicroscopique et la baisse de l'hémoglobine. L'ISM chez la femme enceinte est presque toujours symptomatique accompagnée de fièvre et de nombreuses études ont rapporté que celle-ci sont à l'origine du faible poids de naissance des nouveau-nés (23).

Chez l'enfant, l'ISM se présente sous deux formes : asymptomatique et symptomatique. Des études menées en Afrique Subsaharienne font état du fait que lorsque l'ISM est asymptomatique, le porteur asymptomatique constitue un réservoir d'infection. Lorsque celle-ci est symptomatique, elle peut évoluer de la forme simple à la forme cérébrale (17 ; 18). Pour ce qui est de la forme simple, nous avons enfants consultant pour des épisodes de fièvre récurrente avec ou sans ictère, l'examen directe du médecin ne laisse aucun doute sur un accès palustre mais la goutte épaisse est négative, une anémie modérée et une thrombopénie sont souvent observées. Les autres examens biologiques ne révèlent pas la présence d'autres agents infectieux et la PCR effectuée révèle quand à elle la présence de plasmodies.

Pour ce qui est de la forme sévère, l'anémie est souvent modérée à sévère avec une thrombopénie sévère (plaquette<50.000/mm^3), myalgie et asthénie et détresse respiratoire. L'atteinte cérébrale est souvent confirmée par la prostration, et la convulsion. Malgré tous ces signes cliniques, la goutte épaisse demeure négative, seule la PCR permet de confirmer le diagnostic malheureusement cette technique n'est pas accessible à tous les centres hospitaliers. Faute de confirmation de diagnostic par la microscopie la prise en charge des enfants n'est pas efficiente.

ISM et niveau de transmission

Des études moléculaires ont montré que plusieurs personnes qui étaient porteuses de la forme asexuée des parasites étaient également porteuses de gamétocytes très rarement détectables par microscopie car ils sont en très faible densité. L'ISM est un important contributeur dans la transmission en zone de faible et très faible intensité de transmission (environ 0,5 %) et pourrait être important lorsque la prévalence de la goutte épaisse va jusqu'à 24% mais contribue de façon moins considérable dans la transmission en zone de très haute intensité de transmission (19). Une autre étude réalisée au Bénin zone de faible transmission, faisait état d'une prévalence de 44% d'enfant porteur asymptomatique et suggérait que ces enfants constituaient un réservoir d'infection confirmant ainsi le caractère de réservoir des ISM dans les zones à faibles transmissions (28).

ISM et prise en charge

La prise en charge globale du paludisme repose sur le diagnostic et le traitement. Celle-ci est relativement facile pour les sujets présentant une GE+ et/ou TDR+. Le traitement des autres patients négatifs aux deux méthodes diagnostiques (ISM) dépend des signes cliniques et de l'appréciation du médecin. Dans les zones de co-morbidité les signes cliniques sont souvent confondus. Certains patients souffrant de paludisme notamment les ISM (diagnostic microscopique et TDR inadapté) sont pris pour d'autres types de pathologie, situation particulièrement complexe lors des épidémies de Dengue et de Chikungunya. D'autre part, la thrombocytopénie est l'une des complications hématologiques les plus fréquentes liées au paludisme (22 ; 17). A ce propos, Eduardo Samo Gudo 2013 suggérait que cette thrombocytopénie puisse être pour les cliniciens un guide diagnostique des ISM (24).

Ces ISM peuvent être parfois présentes chez plus de 10 % des personnes fébriles dans certains endroits (11). Malgré le fait qu'elles puissent être associées au paludisme sévère, elles ne sont pas prises en charge par manque d'outil de détection mieux adapté. La détection des ISM est principalement basée sur la PCR. Au Gabon, les ISM sont plus fréquemment rencontrées que les infections patentes chez les patients, ce phénomène est probablement dû à l'amélioration de la prise en charge et des mesures préventives (14). Néanmoins, si ces ISM ne sont pas détectés et traités (chez les sujets asymptomatiques et symptomatiques), elles constitueront un réservoir potentiel

infectant les moustiques et contribuant ainsi à pérenniser la transmission du paludisme (25). Le traitement préventif intermittent (TPI) des enfants et des femmes enceintes demeure une prometteuse stratégie de lutte contre le paludisme. Mais elle est basée sur le traitement avant le diagnostic. Il serait peut être mieux de développer d'autres outils comme celle qui pourrait être basée sur l'identification du réservoir avant tout traitement, la PCR servant d'outil de discrimination (Touré Ndouo donnée non publiée).

Le traitement de toutes les infections, y compris les ISM permettra la réduction de la charge parasitaire au niveau individuel comme au niveau communautaire. Cela avait été démontré lors du TPI développé par Liljander A et al. 2010 (26). Cette réduction, à court et à long terme, aura un impact sur la santé publique puisque l'intensité de la transmission sera réduite voire interrompue. Actuellement, les stratégies de lutte contre le paludisme doivent tenir compte des ISM. Dans les zones endémiques, le taux de prévalence des ISM pourrait être un indicateur épidémiologique.

Après le traitement aux ACT, il existerait une parasitémie submicroscopique résiduelle qui serait associée à une haute transmission potentielle. La parasitémie résiduelle peut aussi avoir des conséquences sur le patient parce que c'est un haut risque de parasitémie récurrente (27). L'utilisation de combinaison thérapeutique diminue le taux d'ISM, mais après chaque traitement on observe l'apparition de nouveau génotype

parasitaire chez les ISM provenant soit de parasites séquestrés ou d'une nouvelle infection (11).

Conclusion

Les ISM (asymptomatiques et symptomatiques), sont des porteurs occultes de parasites servant non seulement de réservoir mais aussi pouvant initier une symptomatologie sévère chez l'homme. Le défi auquel nous sommes actuellement confrontés reste la nécessité de développer de nouveaux outils diagnostiques adaptés aussi sensibles que la PCR pour améliorer davantage les stratégies de lutte contre le paludisme.

Références

1. World Health Organization: World malaria report 1993. Who/htm/gmp/1993.

2. World Health Organization: World malaria report 201. Who/htm/gmp/2011.

3. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol, 61, 315-320.

4. Mockenhaupt FP, Ulmen U, von Gaertner C, Bedu-Addo G, Bienzle U. Diagnosis of placental malaria. J Clin Microbiol. 2002 Jan; 40(1):306-8.

5. Cheng Q, Lawrence G, Reed C, Stowers A, Ranford-Cartwright L, Creasey A, Carter R, Saul A. 1997. Measurement of *Plasmodium falciparum* growth rates in vivo: a test of malaria vaccines. Am J Trop Med Hyg, 57, 495-500.

6. Filisetti D, Bombard S, N'Guiri C, Dahan R, Molet B, Abou-Bacar A, Hansmann Y, Christmann D, Candolfi E. Prospective assessment of a new polymerase chain reaction target (STEVOR) for imported Plasmodium falciparum malaria. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002 Sep; 21(9):679-81. Epub 2002 Sep 6.

7. Okell L C, Ghani A C, Lyons E, Drakeley C J. 2009. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. J Infect Dis, 15, 1509-17.

8. Oyedeji SI, Awobode HO, Monday GC, Kendjo E, Kremsner PG, Kun JF. Comparison of PCR-based detection of Plasmodium falciparum infections based on single and multicopy genes.Malar J. 2007 Aug 16; 6:112.

9. Daubersies P, Sallenave-Sales S, Magne S, Trape JF, Contamin H, Fandeur T, Rogier C, Mercereau-Puijalon O, Druilhe P. Rapid turnover of Plasmodium falciparum populations in asymptomatic individuals living in a high transmission area. Am J Trop Med Hyg.1996 Jan; 54(1):18-26.

10. Rogier C, Commenges D, Trape JF. 1996. Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic populations. Am J Trop Med Hyg, 54, 613-9.

11. Toure FS, Mezui-Me-Ndong J, Ouwe-Missi-Oukem-Boyer O, Ollomo B, Mazier D, Bisser, S. 2006. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections before and after sulfadoxine-pyrimethamine and artesunate association treatment in Dienga, Southeastern Gabon. Clin Med Res, 4, 175-9.

12. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. Nature 2002 Feb 7; 415(6872):673-9. Review.

13. Mayengue PI, Rieth H, Khattab A, Issifou S, Kremsner PG, Klinkert MQ, Ntoumi F. Submicroscopic Plasmodium falciparum infections and multiplicity of infection in matched peripheral, placental and umbilical cord blood samples from Gabonese women. Trop Med Int Health. 2004 Sep; 9(9):949-58.

14. Bouyou-Akotet MK, Nzenze-Afene S, Ngoungou EB, Kendjo E, Owono-Medang M, Lekana-Douki JB, Obono-Obiang G, Mounanga, M Kombila M. 2010. Burden of malaria during pregnancy at the time of IPTp/SP implementation in Gabon. Am J Trop Med Hyg, 82(2), 202-9.

15. Mohammed AH, Salih MM, Elhassan EM, Mohmmed AA, Elzaki SE, El-Sayed BB, Adam I. Submicroscopic Plasmodium falciparum malaria and low birth weight in

an area of unstable malaria transmission in Central Sudan. Malar J. 2013 May 28; 12(1):172.

16. Jean-Claude Bitéghé Bi Essone, Berthe Amélie Iroungou, Jean Bernard Lékana-Douki Fousseyni S Touré Ndouo, Richard Onanga and Benjamin Ollomo. Submicroscopic infection from uncomplicated Plasmodium falciparum malaria of Franceville, southeastern Gabon. International Journal of Advanced Research (2014), Volume 2, Issue 1, 117-123.

17. Berthe Amélie Iroungou, Jean Claude Bitéghé Bi Essone, Fabrice Kassa, Dieudonné Nkoghé, Jean-Louis Mege, Fousseyni S Touré Ndouo. Submicroscopic plasmodial infection may lead to severe malaria in children. Published by JLS. In press

18. Giha HA, A-Elbasit IE, A-Elgadir TM, Adam I, Berzins K, Elghazali G, Elbashir MI. Cerebral malaria is frequently associated with latent parasitemia among the semi-immune population of eastern Sudan. Microbes Infect. 2005 Aug-Sep; 7(11-12):1196-203.

19. Okell LC, Bousema T, Griffin JT, Ouédraogo AL, Ghani AC, Drakeley CJ. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. Nat Commun. 2012; 3:1237. doi: 10.1038/ncomms2241

20. Proietti C, Verra F, Bretscher MT, Stone W, Kanoi BN, Balikagala B, Egwang TG, Corran P, Ronca R, Arcà B, Riley EM, Crisanti A, Drakeley C, Bousema T. Influence of infection on malaria-specific antibody dynamics in a cohort exposed to intense malaria transmission in northern Uganda. Parasite Immunol. 2013 May-Jun; 35(5-6):164-73. doi: 10.1111/ pim.12031.

21. Bousema T, Drakeley C. Epidemiology and infectivity of Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax

gametocytes in relation to malaria control and elimination. Clin Microbiol Rev. 2011 Apr; 24(2):377-410. doi: 10.1128/CMR.00051-10.

22. Wickramasinghe SN, Abdalla SH. Blood and bone marrow changes in malaria. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol. 2000 Jun; 13 (2):277-99. Review.

23. Arango E, Maestre A, Carmona-Fonseca J.[Effect of submicroscopic or polyclonal Plasmodium falciparum infection on mother and gestation product: systematic review]. Rev Bras Epidemiol. 2010 Sep;13(3):373-86.[Article in Spanish]

24. Eduardo Samo Gudo, António Prista, Ilesh V Jani. Impact of asymptomatic *Plasmodium falciparum* parasitemia on the imunohematological indices among school children and adolescents in a rural area highly endemic for Malaria in southern Mozambique.BMC Infect Dis. 2013; 13: 244. Published online 2013 May 27. doi: 10.1186/1471-2334-13-244.

25. Coleman RE, Kumpitak C, Ponlawat A, Maneechai N, Phunkitchar V, Rachapaew N, Zollner G, Sattabongkot J. Infectivity of asymptomatic Plasmodium-infected human populations to Anopheles dirus mosquitoes in western Thailand. J Med Entomol. 2004 Mar; 41(2):201-8.

26. Liljander A, Chandramohan D, Kweku M, Olsson D, Montgomery SM, Greenwood B, Färnert A. Influences of intermittent preventive treatment and persistent multiclonal Plasmodium falciparum infections on clinical malaria risk. PLoS One. 2010; 5(10): e13649. Published online 2010 October 27. doi: 10.1371/journal.pone.0013649.

27. Beshir KB, Sutherland CJ, Sawa P, Drakeley CJ, Okell L, Mweresa CK, Omar SA, Shekalaghe SA, Kaur H, Ndaro A, Chilongola J, Schallig HD, Sauerwein

RW, Hallett RL, Bousema T. Residual Plasmodium falciparum parasitemia in Kenyan children after artemisinin-combination therapy is associated with increased transmission to mosquitoes and parasite recurrence. J Infect Dis. 2013 Dec 15; 208(12):2017-24. doi: 10.1093/infdis/jit431. Epub 2013 Aug 14

28. Faucher JF, Aubouy A, Béhéton T, Makoutode P, Abiou G, Doritchamou J, Houzé P, Ouendo E, Deloron P, Cot M. What would PCR assessment change in the management of fevers in a malaria endemic area? A school-based study in Benin in children with and without fever. Malar J. 2010 Aug 6; 9:224. doi: 10.1186/1475-2875-9-224.

Chapitre II

Article 1

Submicroscopic infection from uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria of Franceville, southeastern Gabon

Jean-Claude Bitéghé Bi Essone, Berthe Amélie Iroungou, Jean Bernard Lékana-Douki, Fousseyni S Touré Ndouo, Richard Onanga and Benjamin Ollomo

Published in International Journal of Advanced Research (IJAR) ISSN 2320-5407

CHAPITRE II - AVANT-PROPOS

L'infection submicroscopique (ISM) à *P falciparum* se rencontre chez les deux groupes cliniques asymptomatique et symptomatique. Les études chez les asymptomatiques montrent que les ISM sont présents dans les zones aussi bien à transmission discontinue que pérenne et que la séquestration parasitaire serait l'un des mécanismes physiopathologiques pouvant l'expliquer. Toutefois, très peu d'études ont été menées chez les personnes symptomatiques. Au Gabon, de nombreux syndromes fébriles dont les étiologies restent indéterminées sont rapportés chaque année au niveau des centres de santé. Les patients suspects d'une infection palustre sont traités en dépit d'une goutte épaisse et/ou d'un TDR négatif. Cela conduit à une mauvaise prise en charge des patients aboutissant à une gestion irrationnelle des antiplasmodiaux et un risque accru de développement des résistances médicamenteuses comme rapporté par Lekana-Douki et al. 2011. Dans cette étude, nous avons déterminé la prévalence des ISM à *P. falciparum* chez les sujets symptomatiques.

ISSN 2320-5407 International Journal of Advanced Research (2014), Volume 2, Issue 1, 117-123

ISSN NO. 2320-5407

Journal homepage: http://www.journalijar.com

INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH

RESEARCH ARTICLE

Submicroscopic infection from uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria of Franceville, southeastern Gabon

Jean Claude Bitéghé Bi Essone [1,3], Berthe Amélie Iroungou [1], Jean Bernard Lékana-Douki [1,2], Fousseyni S Touré Ndouo [1], Richard Onanga [1] and Benjamin Ollomo [1]

[1] International Center for Medical Research of Franceville (CIRMF), Franceville, BP 769, Gabon.

[2] Département de Parasitologie-Mycologie Médecine Tropicale, Faculté de Médecine, Université des Sciences de la Sante´, B.P. 4009 Libreville, Gabon

[3] Ecole Doctorale Régionale de Recherche en Infectiologie Tropicale, B.P. 876 Franceville, Gabon

Manuscript Info

Manuscript History:

Received: 15 November 2013
Final Accepted: 23 December 2013
Published Online: January 2014

Key words:
Malaria, *Plasmodium falciparum*, submicroscopic infection, Gabon

Abstract

Background: In Gabon malaria is hyperendemic with perennial transmission. PCR provides a powerful tool to detect submicroscopic infection (SMI) allowing improving disease control strategies with regard to its eradication policy. The objective was to determine the prevalence of both patent and SMI of *P. falciparum* in symptomatic patients. **Materials and methods:** Two cross-sectional studies were carried out in two local hospitals of Franceville, from May to July 2011 and from February to May 2012. A total of 595 symptomatic patients were enrolled, 250 in the first and 345 in the second study. A clinical examination and parasitological diagnosis by microscopy and PCR were carried out in all patients. **Results:** Of the 250 patients enrolled in the first study, the prevalence of *P. falciparum* was 24.00% (60/250) and 9.60% (24/250) for patent and SMI respectively with an overall prevalence of 33.60% (84/250). In the second study, a prevalence of 21.45% (74/345) for patent infections and 9.57% (33/345) for SMI was obtained with a global prevalence of 31.01% (107/345). Overall, 66.40% and 69.00% of patients were free of *P. falciparum* infection respectively for study 1 and 2. The SMI occurs in symptomatic patients of Franceville in an average of 9.00% of cases with a relative high prevalence at the beginning and the end of the rainy seasons. **Conclusion:** These results should be used not only to develop the management of the disease but also to improve control strategies such as intermittent preventive treatment across the target population.

Copy Right, IJAR, 2014,. All rights reserved.

Introduction

In developing countries malaria still remains a major public health concern. The infection by *Plasmodium falciparum*, the most virulent species can rapidly progress to the severe disease such as anemia, cerebral malaria, respiratory distress, hypoglycemia etc. which are associated with a high mortality. Indeed, the detection of *P. falciparum* infection and proper management of symptomatic cases remains essential for disease control. The Roll Back Malaria initiative was launched jointly by WHO, the World Bank, UNICEF and UNDP in 1998 has been adopted by the endemic countries. This initiative has permitted to decrease significantly malaria morbidity and mortality according to the global distribution of cases and deaths published by the world malaria report 2009 [21]. Practically in all the endemic countries, a significant decline of disease rates has been demonstrated and more probably due to the large-scale bed net program and the improvement of case management such as enhanced diagnostic tests and implementation of highly effective anti-malarial drugs. However, to keep steadily declining prevalence until disease eradication we need to strengthen and improve the National Control Programs. This

ISSN 2320-5407 International Journal of Advanced Research (2014), Volume 2, Issue 1, 117-123

necessarily requires the development and ownership of efficient diagnostic tools that allow targeted treatment of infected individuals and efficient measurement of epidemiological indicators [4, 19].
Many developing countries still experienced difficulty of obtaining timely and reliable epidemiological data and setting up monitoring and evaluation of their programs [4]. This was also the case for Gabon where the National Control Program of malaria tried since 2008 to improve data collection following the WHO's call for scaled-up control efforts [22]. In April 2008, five sentinel sites malaria surveillance were established in the country including one at Franceville to improve disease indicator surveys notably in pediatric wards.
In disease management, only patients with blood smears and/or rapid diagnostic test (RDT) *Plasmodium* positive are recommended to be treated [22, 1]. The treatment of patient negative (by microscopy and/or RDT) depends on clinical signs and appreciation of the physicians who do not always trust blood smear results [2, 14, 5]. To date, microscopy remains a gold standard technique to diagnose malaria [20, 12]. However, this method is insensitive to detect infected individuals harbouring a low parasite density (termed submicroscopic infections = SMI) [12]. It has been demonstrated that PCR provides a powerful tool to detect the SMI which are encountered in symptomatic as well as in asymptomatic individuals. It has been also documented that SMI are more frequent in endemic areas and that would have consequences on the accurate management of disease [18, 12, 3, 9].
The main objective of this study was to determine the true prevalence of *P. falciparum* infection (patent and sub-patent) in uncomplicated malaria during two periods of rainy season addressing therefore the issue of management of these infections with regard to the disease control and eradication policy.

Materials and Methods:

Study area and Subjects: The study was performed at the "Centre International de Recherches Médicales de Franceville". Patients from 1 to 75 years old were enrolled at the two local Gabonese hospitals (Centre Hospitalier Régional Amissa Bongo and Hôpital de l'Amitié Sino-Gabonaise de Franceville, Haut Ogooué Province in southeastern Gabon). *P. falciparum* malaria is highly endemic with a perennial mode of transmission and some seasonal fluctuation [7]. Informed consent was obtained from 595 individuals or from their parents. The study was submitted and approved by the Research National Ethic Committee (CNER) of Gabon. It was also approved the Governor of the Haut Ogooué Province, and performed in accordance with the guidelines for human experimentation in clinical research of the Ministry of Public Health and Population of Gabon.

Blood sample collection: A total of 595 symptomatic patients were enrolled, 250 in May to July 2011 and 345 in February to May 2012. Blood was collected by venipuncture from all febrile patients using EDTA Vacutainers® (Becton Dickinson,Meylan, France). All the patients were screened for *P. falciparum* infection.

***P. falciparum* Diagnosis:** The thick and thin blood films were stained with Giemsa and examined by two experienced microscopists. The parasite load was expressed as the number of *P. falciparum* asexual forms per microliter of blood using Lambaréné method [13].

DNA preparation: DNA Templates were extracted using DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany) and collected into a clean tube and used for PCR immediately or stored at -20°C until use.

STEVOR gene amplification: Two point five microliters of the DNA template were amplified using a Perkin Elmer thermal cycler in a 25 µl reaction containing 1x PCR buffer as supplied by the manufacturer (200 mM Tris-HCl, pH 8.7, 100 mM KCl, 100 mM $(NH_4)_2$ SO_4, 20 mM $MgSO_4$, 1% Triton-X 100, 1mg/ml of bovine serum albumin), 17µM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Invitrogen, Cergy Pantoise, France), 0.75pM of each primer P5, P18, P19 and P20, and 0.625 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Cergy Pantoise, France). The reaction mix for the nested PCR was the same as that of the PCR, however, 0.75 pM of primers P17 and P24, and 1µl of the first PCR product were added. PCR and nested PCR were performed in the following conditions: 93°C for 3 min and 35 cycles of 93°C for 30sec, 55°C for 50sec and 72°C for 30sec. After amplification, 10 µl of each nested PCR product was mixed with 5 µl of loading dye EZ-Vision THREE DNA Dye as loading Buffer 1X (ref: N313, Interchim, France), and analyzed by electrophoresis on a 1.2% agarose gel and the DNA was visualized and photographed under ultraviolet light (Quantum ST4, 1100/26M).

Statistical analysis: Data were analyzed with Statview® and EPI INFO 6 software® (Center for Diseases Control – CDC- ; Organisation Mondiale de la Santé ; version française : Epicentre et Ecole Nationale de Santé Publique). Proportions were analyzed with the $\chi 2$ test. Significance was assumed at $p < 0.05$.

Results

Description of the sample:

Study 1: Two-hundred-fifty (250) patients were enrolled in the first study period with an average age of 33 (±18) including 189 women (75.60%) and 61 men (24.40%). Children between 1-5 years old were 30 (12.00% of patients enrolled).

ISSN 2320-5407 International Journal of Advanced Research (2014), Volume 2, Issue 1, 117-123

Study 2: Three hundred forty five (345) subjects were recruited during the second period of data collection. The average age of patients enrolled was 31 (± 19) years. The number of men and women were 127 (36.80%) and 218 (63.20%) respectively. The number of children under 5 years was 47 (13.60%).

Patent infection:

Study 1: The prevalence of patent infection (*Plasmodium* microscopy positive = ME+) was 24.00% (60/250) (Figure 1).

Study 2: Seventy four (74) blood smears were *P. falciparum* positive by microscopy from the 345 samples examined with an estimated prevalence of 21.45% [$CI_{95\%}$, 17.12-25.78]. The median parasitemia was 2013 parasites/µL blood. The monthly distribution of the number of *P. falciparum* infection detected by microscopic examination is shown in the figure 2. Among these 74 ME+ individuals, twelve (12) were children under 5 years.

Submicroscopic infection:

Study 1: Twenty four samples (24) of 250 were positive by PCR assay with a prevalence of 9.60% (Figure 1).

Study 2: Of 345 blood specimen examined, 271 (78.50%) were negative by microscopy. Among these 271 blood smears, thirty three (33) submicroscopic infections were detected by PCR with a prevalence of 9.57%. The prevalence of submicroscopic infection significantly decreases from 18.18% to 8.20% in February until May, while that of patent infection increases from 15.91% to 26.23% in the same period (Figure 2).

Prevalence of *P. falciparum*: The true prevalence of *P. falciparum* infection were 33.60% (84/250) and 31.01% (107/345) for study 1 and 2 respectively. Overall, 66.40% (study 1) and 69.00% (study 2) of the samples assessed by microscopy and PCR were negative for *P. falciparum* infection.

Clinical status: Overall, 592 (99.50%) were classified as uncomplicated malaria. Only 3 children with severe malaria were observed including 2 hyperparasitemia and 1 severe anemia.

Co-infection: One co-infection *P. falciparum* and *P. malariae* and 2 cases of mono-infection by *P. malariae* were obtained.

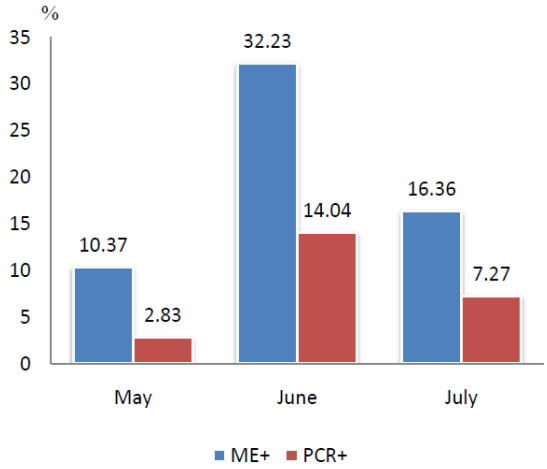


Figure 1: Study 1. Distribution of *P. falciparum* infections.

ISSN 2320-5407 International Journal of Advanced Research (2014), Volume 2, Issue 1, 117-123

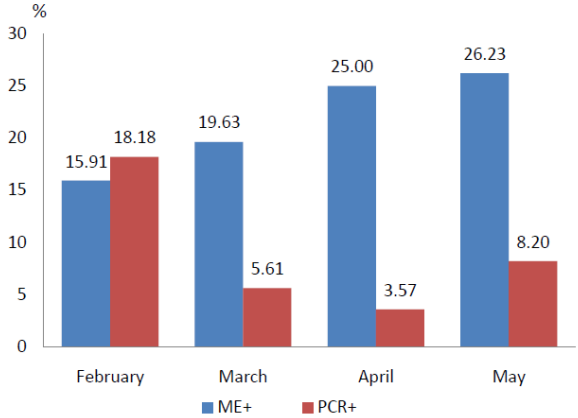


Figure 2: Study 2. Distribution of *P. falciparum* infections.

Table 1: Monthly prevalence of *P. falciparum*

		Prevalence (%)						p
		February	March	April	May	June	July	
Study 1								
	ME+	-	-	-	10.37	32.23	16.36	0.001
	PCR+	-	-	-	2.83	14.04	7.27	0.001
Study 2								
	ME+	15.91	19.63	25.00	26.23	-	-	0.30
	PCR +	18.18	5.61	3.27	8.20	-	-	0.02

Discussion

P. falciparum malaria, a leading life threatening disease, still remains a major public health concern in developing countries, especially in sub-Saharan Africa. In endemic areas, all the febrile individuals with demonstrated parasitemia should be treated. The identification of parasitemia in these febrile patients is therefore essential to progress from disease control to elimination (The malERA, 2011). However, as malaria transmission is decreasing in many endemic settings we are facing a new challenge of diagnosing parasite low densities termed submicroscopic infections (SMI). The improvement of available diagnostic tools for correct case management will be therefore essential. In attempt to this goal PCR assays have been performed and used as an alternative to microscopy in detecting the four main *Plasmodium* species [16].

In this work, *P. falciparum* infections were detected by combined microscopy and PCR from uncomplicated but symptomatic individuals. PCR assay targeting a conserved fragment of STEVOR gene was used. The assay has a sensitivity of 100% and the target gene is expressed only by *P. falciparum* [6]. Only blood smears *P. falciparum* negative by microscopy were tested by PCR.

The prevalence of patently infected individuals have been estimated to 24.00% and 21.40% respectively for the first and second study confirming therefore previous epidemiological investigation in this area [23].

The peak prevalence of both patent and SMI was observed only in June compared to May and July in the first study (Figure 1). This may be related to the abundance of rainfall and its distribution over the period. The month of June corresponds to the end of the rainy season and is consistent with the fact that malaria transmission rate increases at the end of the rainy season in this area [7].

In the second study, there is no significant difference between the prevalence of patent infection during the four months from February (at the beginning of the great rainy season) to May (Figure 2). This result could be explained by the fact that rainfall did not significantly varied between the four months and consequently the entomological

ISSN 2320-5407 International Journal of Advanced Research (2014), Volume 2, Issue 1, 117-123

inoculation rate was relatively the same. Of interest, it has been previously reported that the peak of entomological inoculation rate in Benguia (periphery of Franceville) is generally obtained in June [8]. Taking into account this previous result and considering that the great rainy season ends in June, the prevalence of patently infected individuals could further increase beyond May.

Thirty tree (33) samples of 345 (9.60%) were detected by PCR. No major difficulty was encountered during amplification steps. A specific band of 250 base pairs DNA is obtained after the electrophoretic migration in all positive samples PCR.

As shown in figure 2, the prevalence of *P. falciparum* SMI is higher in February than that of the tree other months (Mach, April and May). The peak of SMI in February corresponds to the end of the short dry season and the beginning of the great rainy season. This result may show that *P. falciparum* infection even at low level of parasitemia continues during the dry season, thus confirming therefore the perennial transmission of disease. Elissa et al. have previously demonstrated that malaria transmission in Franceville is perennial with fluctuations depending on the rainy seasons. The SMI could be associated with low transmission intensity during dry season. Thus, the introduction of PCR assay has allowed the identification of early increase of *P. falciparum* infection at the beginning of rainy season. These results could be used to develop strategies such as the choice of the best period for intermittent preventive treatment across the target population.

Overall, our data show that around 9.00% of *P. falciparum* infected individuals namely SMI fail to be detected by conventional microscopy and this would have a negative impact on disease control programmes. A recent study in the field has shown that there is a limited clinical benefits to treat all SMI (PCR positive) namely in an immune population from area with high malaria transmission intensity [9]. Nevertheless, in endemic areas, the SMI can be associated with severe disease [15, 11, 10] and reduced birth weight in primagravidae [3]. Therefore, it is understandable that physicians do not always consider blood smears results for anti-malarial treatment. On the other hand, PCR may be a useful tool for malaria epidemiological indicators assessment. To estimate the parasite rate (PR) and the annual parasite incidence (API) malariologists always use only the rate of blood smears positive (slide positivity rate SPR among symptomatic individuals suspected as cases) the PCR is not taken into account. Unfortunately, this method of data calculation underestimates the API which plays an important role in the global malaria eradication programme.

Conclusion: Submicroscopic infection of *P. falciparum* occurs in symptomatic patients in an average of 9% of cases with a relative high prevalence at the beginning and the end of the rainy season. These results could be used not only to improve the management of disease but also to develop strategies that can prevent malaria. For example, such study could guide the choice of the period to administer anti-malarial drug in an intermittent preventive treatment across the target population.

As perspectives this work should be extended over a period of year in urban as well as in rural areas. It would be also of interest to investigate the etiologic agents associated with symptoms from individuals free of malaria.

Acknowledgments:

We would like to thank all the people who participated in this study especially children and the pediatrics staff of Centre Hospitalier Régional Amissa Bongo and Hôpital de l'Amitié Sinogabonaise in Franceville. CIRMF is funded by Total Gabon, the Gabonese government and the French Ministry of Foreign and European affairs (MAEE).

Bibliography:

1. Amexo M, Tolhurst R, Barnish G, Bates I. 2004. Malaria misdiagnosis: effects on the poor and vulnerable. Lancet, 364(9448), 1896–1898.

2. Barat L, Chipipa J, Kolczak M, Sukwa T. 1999. Does the availability of blood slide microscopy for malaria at health centers improve the management of persons with fever in Zambia? Am J Trop Med Hyg, 60, 1024–1030.

3. Bouyou-Akotet MK, Nzenze-Afene S, Ngoungou EB, Kendjo E, Owono-Medang M, Lekana-Douki JB, Obono-Obiang G, Mounanga, M Kombila M. 2010. Burden of malaria during pregnancy at the time of IPTp/SP implementation in Gabon. Am J Trop Med Hyg, 82(2), 202-9.

ISSN 2320-5407 International Journal of Advanced Research (2014), Volume 2, Issue 1, 117-123

4. Breman JG, Egan A, Keusch GT. 2001. The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers. Am J Trop Med Hyg, 64, 1-2.

5. Chandler CI, Mwangi R, Mbakilwa H, Olomi R, Whitty CJ, Reyburn H. 2008. Malaria over diagnosis: is patient pressure the problem? Health Policy Plan, 23, 170-178.

6. Cheng Q, Lawrence G, Reed C, Stowers A, Ranford-Cartwright L, Creasey A, Carter R, Saul A. 1997. Measurement of *Plasmodium falciparum* growth rates in vivo: a test of malaria vaccines. Am J Trop Med Hyg, 57, 495-500.

7. Elissa N, Karch S, Bureau P, Ollomo B, Lawoko M, Yangari P, Ebang B, Georges AJ. 1999. Malaria transmission in a region of savanna-forest mosaic, Haut-Ogooué, Gabon. J Am Mosq Control Assoc, 15, 15-23.

8. Elissa N, Migot-Nabias F, Luty A, Renaut A, Toure F, Vaillant M, Lawoko M, Yangari P, Mayombo J, Lekoulou F, Tshipamba P, Moukagni R, Millet P, Deloron P. 2003. Relationship between entomological inoculation rate, *Plasmodium falciparum* prevalence rate, and incidence of malaria attack in rural Gabon. Acta Trop, 85, 355-361.

9. Faucher JF, Aubouy A, Béhéton T, Makoutode P, Abiou G, Doritchamou J, Houzé P, Ouendo E, Deloron P, Cot M. 2010. What would PCR assessment change in the management of fevers in a malaria endemic area? A school-based study in Benin in children with and without fever. Malar J, 6, 9-224.

10. Giha H A, A Elbasit IE, A Elgadir TM, Adam I, Berzins K, Elghazali G, Elbashir, M. I. 2005. Cerebral malaria is frequently associated with latent parasitemia among the semi-immune population of eastern Sudan. Microbes Infect, 7, 1196-1203.

11. Mockenhaupt F P, Ulmen U, von Gaertner C, Bedu-Addo G, Bienzle U. 2002. Diagnosis of placental malaria. J Clin Microbiol, 40, 306-308.

12. Okell L C, Ghani A C, Lyons E, Drakeley C J. 2009. Submicroscopic infection in *Plasmodium falciparum*-endemic populations: a systematic review and meta-analysis. J Infect Dis, 15, 1509-17.

13. Planche T, Krishna S, Kombila M, Engel K, Faucher JF, Ngou-Milama E, Kremsner PG. 2001. Comparison of methods for the rapid laboratory assessment of children with malaria. Am. J. Trop. Med. Hyg, 65, 599-602.

14. Reyburn H, Mbatia R, Drakeley C, Carneiro I, Mwakasungula E, Mwerinde O, Saganda K, Shao J, Kitua A, Olomi R, Greenwood BM, Whitty CJ. 2004. Overdiagnosis of malaria in patients with severe febrile illness in Tanzania: a prospective study. Bmj, 329, 1212.

15. Rogier C, Commenges D, Trape JF. 1996. Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic populations. Am J Trop Med Hyg, 54, 613-9.

16. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol, 61, 315-320.

17. The malERA Consultative Group on Diagnoses and Diagnostics. 2011. A research agenda for malaria eradication: diagnoses and diagnostics. PLoS Med, 25, 8.

18. Toure FS, Mezui-Me-Ndong J, Ouwe-Missi-Oukem-Boyer O, Ollomo B, Mazier D, Bisser, S. 2006. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* infections before and after sulfadoxine-pyrimethamine and artesunate association treatment in Dienga, Southeastern Gabon. Clin Med Res, 4, 175-9.

ISSN 2320-5407 International Journal of Advanced Research (2014), Volume 2, Issue 1, 117-123

19. Wangai LN, Karau MG, Njiruh PN, Sabah O, Kimani FT, Magoma G, Kiambo N. 2011 Sensitivity of microscopy compared to molecular diagnosis of *P. Falciparum*: implications on malaria treatment in epidemic areas in kenya. Afr J Infect Dis, 5, 1-6.

20. Warhurst DC, Williams JE. 1996. ACP Broadsheet no 148. Laboratory diagnosis of malaria. J Clin Pathol, 49, 533-538.

21. WHO .2009. World malaria report 2009. Geneva: World health Organization.

22. World health Organization; Geneva. 2006. The role of laboratory diagnosis to support malaria disease management: Focus on the use of rapid diagnostic tests in areas of high transmission.

23. Zang-Edou ES, Bisvigou U, Taoufiq Z, Lekoulou F, Lekana-Douki JB, Traore Y, Mazier D, Toure-Ndouo FS. 2010. Inhibition of endothelial cell apoptosis by Fasudil: therapeutic implications for severe malaria: PLoS One 2010, 5, 13221.

DEUXIÈME PARTIE : Les agents impliqués dans la survenue de la fièvre chez l'enfant

Chapitre III

Article 2

Submicroscopic plasmodial infection may lead to severe malaria in children

Berthe Amélie Iroungou, Jean-Claude Bitéghé Bi Essone, Roland Fabrice Kassa, Dieudonné Nkoghé, Jean-Louis Mege, Fousseyni S Touré Ndouo.

Published in Journal of Life Science
ISSN 1934-7391, USA, February 2014, Vol 8, N° 2, pp

CHAPITRE III - AVANT-PROPOS

Au total, 9% des sujets ayant un accès fébrile simple à Franceville (au Sud-est du Gabon) font une infection submicroscopique (ISM) à *P. falciparum*. Il n'y a pas de différence significative entre la prévalence de ces ISM chez les adultes et les enfants souffrant de paludisme simple, contrairement à ce qui est observé chez les asymptomatiques. En dépit des moyens de lutte mis en place, des cas d'accès fébriles avec complication (anémie, prostration, trouble de la conscience, etc.) sont rencontrés dans les services de pédiatrie. Pour cette raison, nous avons réalisé une étude transversale sur la survenue des ISM à *P. falciparum* chez les enfants en discriminant les formes cliniques selon les critères de l'OMS. Notre hypothèse de départ était que les ISM à *P. falciparum* pourraient être associées au paludisme sévère en zone de transmission pérenne. Ainsi, nous avons montré dans cette étude qu'en plus d'accès palustre simple, les ISM sont également associée aux signes neurologiques (prostration). En effet, 21,05 % d'enfants ayant une ISM à *P. falciparum* présentaient un tableau clinique de paludisme sévère. D'autre part, nous avons détecté un cas de co-morbidité *P. falciparum* et le virus *Mumps* responsable des oreillons.

Submicroscopic plasmodial infection may lead to severe malaria in children.

Iroungou B Amélie[1,2], Bitéghé Bi Essone J Claude[1], Kassa R Fabrice[1], Nkoghé Dieudonné[1], Mege J-Louis[2], Fousseyni S Touré Ndouo [1].

[1] Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), BP 769 Franceville, Gabon. Tél : 00 241 677092.

[2] Unité de Recherche des Maladies Infectieuses Tropicales Emergentes URMITE-IRD198, CNRS UMR7278, INSERM U1095 Faculté de Médecine, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France.

Corresponding author : Fousseyni S. Touré Ndouo, PhD, Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), BP 769 Franceville, Gabon. Tél : 00 241 677092 or 00 24106615636 ; email : fousseyni@yahoo.fr

February 2014, Vol. 8, No. 2, pp.
Journal of Life Sciences, ISSN 1934-7391, USA

Submicroscopic Plasmodial Infection May Lead to Severe Malaria in Children

Berthe Amélie Iroungou[1], Jean Claude Bitéghé Bi Essone[1, 2], Fabrice Kassa[1], Dieudonné Nkoghé[1], Jean-Louis Mege[3] and Fousseyni S Touré Ndouo[1]

1. Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), BP 769 Franceville, Gabon

2. Ecole Doctorale Régionale de Recherche en Infectiologie Tropicale, BP 876 Franceville, Gabon

3. Unité de Recherche des Maladies Infectieuses Tropicales Emergentes URMITE-IRD198, CNRS UMR7278, INSERM U1095 Faculté de Médecine, 13385 Marseille Cedex 05, France

Received: October 25, 2013 / Accepted: January 07, 2014 / Published: February 28, 2014.

Abstract: Malaria is one of the leading causes of consultation in African pediatric hospitals. In Gabon, malaria transmission is perennial. *Plasmodium falciparum*, responsible for the most severe form of the disease, represents more than 95% of all species. In *P. falciparum* infection, the hyperparasitemia accounts among the main criteria of disease severity. However, in many endemic countries, a significant decrease of malaria burden accompanying with the diminution of parasite load in infected individuals has been demonstrated. The objective of the study was to analyze the occurrence of febrile syndrome in childhood and investigate whether the acute febrile illness could be associated with *P. falciparum* submicroscopic infection. A cross-sectional study was carried out during January to March 2013 in Franceville. A total of 203 acute febrile children were enrolled. A clinical examination and biomedical analysis including parasitological diagnosis by microscope were carried out in all the patients and PCR on microscope negative ones. Of 203 children recruited for febrile syndrome, 111 have been diagnosed positive for *P. falciparum* infection, 73 (35.9%) by microscope (ME) and 38 (18.71%) by PCR (submicroscopic infection = SMI) with an overall prevalence of 54.68%. Of the 111 *P. falciparum* infected individuals and according to the WHO criteria, 35 (31.53%) children showed a clinical picture of severe malaria against 76 (68.47%) others classified as uncomplicated malaria. The overall prevalence rates were therefore estimated as 17.24 (35/203) for severe cases and 37.43% (76/203) for uncomplicated ones. Clinically, these severe malaria cases (27 ME+ and 8 PCR+) were mainly composed of 85.71% of anaemic patients (30/35), 71.14% of prostrated individuals (25/35) and 57.14% of children with clinical icterus (20/35). However, only two cases of severe anaemia were observed, the remaining others cases were moderate (10) and mild anaemia (18). More interestingly, eight submicroscopic infected patients (22.85%) were found with neurological manifestations (prostration) and all were experiencing thrombocytopenia. Lastly, 1 hyperparasitemia, 6 hypoglycemia and 2 respiratory distresses were also observed among these severe malaria cases. *P. falciparum* submicroscopic infection may lead to severe malaria in perennial transmission area.

Key words: *Plasmodium falciparum, PCR, Severe Malaria*

1. Introduction

Febrile syndrome is the leading cause of consultation in African pediatric hospitals [1]. In Central Africa, about 60% of deaths among young children are due to the febrile syndromes. Malaria accounts among the major causes of febrile illness in sub-saharan Africa, where 80% of the 247 million cases were reported [2] and remains a major health and development problem. It has been considered that an efficient anti malarial program conducted locally and internationally is essential in achieving the Millennium goals for development [3]. *Plasmodium falciparum*, the most virulent species has killed as many as 655,000 people in 2010 mainly children in sub-Saharan Africa [4]. The disease remains therefore a leading cause of death and represents 10% of the total burden of

Corresponding author: Fousseyni S. Touré Ndouo, Ph.D., professor, research fields: molecular and cell biology, immunology. E-mail: fousseyni@yahoo.fr.

mortality the continent [3]. It is responsible for 40% of public health expenditure, 30%-50% of hospital admissions resulting in more than $12 billion annual loss of the Gross Domestic Product in Africa [5].

In many endemic countries such as Gabon a significant decrease of malaria morbidity and mortality has been reported [6-8]. Despite of this disease burden decline, *P. falciparum* continues to be one of the main contributing factors for acute febrile illness in children under 5 years of age, non-immune adults and pregnant women. The severity of the disease is mainly associated with anemia, cerebral malaria, respiratory distress, hypoglycemia, hyperparasitemia and acidosis.

One of the major mechanisms of severe malaria result from the sequestration of *P. falciparum* infected erythrocytes (IE) due to the capacity of parasite to obstruct host capillaries though cytoadherence, agglutination, rosetting and reduced red blood cell deformability [9, 10]. The adhesion of IE to brain and lungs endothelial cells is modulated by platelet [11, 12] and mediated by cell receptors including thrombospondin, CD36, intracellular adhesion molecule-1, vascular cellular adhesion molecule-1, CD31, integrins and hyaluronic acid [13]. The over-production of inflammatory cytokines and caspases activation are also induced by the IE adhesion [14, 15]. Finally, it has been demonstrated that platelets induce clumping of IE and serve as a bridge between IE and the endothelial cell receptors and both phenomenon are associated with severe malaria especially cerebral malaria [16]. Although, thrombocytopenia is common in *P. falciparum* infection, its correlation with fatal case remains controversial [17, 18].

Several studies have shown that *P. falciparum* SMI contribute to acute disease especially anaemia, cerebral malaria and inflammation [19-21]. However, these studies have been conducted in malaria seasonal transmission setting.

The main objective of this study was to analyze the acute febrile syndrome in children and investigate whether *P. falciparum* sub-patent infection can be associated with severe malaria in perennial transmission area.

2. Materials and Methods

2.1 Study Area

The study was conducted at the paediatric ward of the Chinese Gabonese Friendship Hospital "Hôpital de l'Amitié Sino-Gabonaise" (HASG) of Franceville, the capital of Haut Ogooué Province in southeastern Gabon where *P. falciparum* malaria is highly endemic with a perennial transmission and seasonal fluctuation [22, 23]. The climate of Gabon is equatorial with two rainy seasons (September-December and February-June). The most important malaria vector in this region is *Anopheles funestus* follwed by *Anopheles gambiae*.

All children presenting with fever between January 2013 (end of dry season) and March 2013 (rainy season) were examined by a clinician in the paediatric of HASG. After a detailed clinical examination, children whose parents or guardians had informed consent and who met the followed criteria were included in the study: age ranging from 0 to 168 months, fever or history of fever within the 24 h preceding the consultation. All children with haemoglobinopathy were excluded.

Oral consent was obtained from parents or guardians in order to complete the demographic and medical history sections on a case report form (CRF) by questioning the parents if necessary.

After clinical consultation, patients arrived in medical laboratory and physicians collect blood samples into EDTA and biochemical tubes for analysis.

2.2 Malaria Diagnosis

Malaria diagnosis has been done using microscopic examination of the thick and thin blood stained in 20% of Giemsa. These blood films were then examined by two experienced microscopists with respect of the standard quality-controlled procedures. The parasite

load has been estimated as the number of *Plasmodium* asexual forms per microliter of blood using the Lambaréné method previously developed by Planche et al. [24].

2.3 Parasite DNA Extraction and PCR

DNA Templates extraction was performed with DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany). Each template was then collected into a clean tube and used for PCR or stored at -20 °C until use.

PCR amplification of STEVOR gene [25] (Cheng Q 1997): Briefly, DNA template (2.5 microliters) was amplified using a Perkin Elmer thermal cycler in a 25 µL reaction including 1× PCR buffer provided by the manufacturer. This buffer is composed of 200 mM Tris-HCl, pH 8.7, 100 mM KCl, 100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 20 mM $MgSO_4$, 1% Triton-X 100, 1 mg/mL of bovine serum albumin), 17 µM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Invitrogen, Cergy Pantoise, France), 0.75 pM of each primer P5, P18, P19 and P20, and 0.625 unit of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Cergy Pantoise, France). The nested PCR was carried out using 0.75 pM of primers P17 and P24, and 1 µL of the first PCR product as template. PCR and nested PCR were performed in the following conditions: 93 °C for 3 min and 35 cycles of 93 °C for 30 s, 55 °C for 50 s and 72 °C for 30 s. After amplification, 10 µL of each nested PCR product was mixed with 5 µL of loading dye EZ-Vision THREE DNA Dye as loading Buffer 1X (Interchim, Montluçon, FRANCE), and analyzed by electrophoresis on a 1.2% agarose gel. After migration the DNA bands were visualized and photographed under the ultraviolet light (Quantum ST4, 1100/26M).

2.4 Haematological Measurements

Blood cells were counted by using BC 3000 counter (Mindray Medical France SARL CRETEIL CEDEX). Children with Hb concentrations less than 11 g/dL were considered as anaemic. Anaemia was classified according to the WHO classification: severe (Hb < 5 g/dL), moderate (5 < Hb < 8 g/dL), and mild (8 < Hb < 11 g/dL).

Thrombopenia was considered when children had less than 150,000/mm^3 Platelets concentrations. According WHO, we considered severe thrombopenia, when children had less than 100,000/mm^3.

2.5 Statistical Analysis

Data were analysed using the Chi-square and Fisher tests. The P values < 0.05 were considered as significant differences.

3. Results

Patients: In the study, 203 patients have been recruited presenting with fever or history of fever within the 24 h preceding the consultation. A great majority of patients (64.53%) was aged between 0 to 6 years.

3.1 Malaria

Patent infection: Among 203 children recruited, 73 have *Plasmodium falciparum* microscopy positive = ME+) with a prevalence of 35.96% (73/203).

P. falciparum submicroscopic infection: Of the remaining children with microscopy negative blood samples, 38 were PCR positive carrying therefore *P. falciparum* submicroscopic infection with a prevalence of 18.71% (38/203).

Global prevalence of *P. falciparum*: The overall prevalence of *P. falciparum* (ME+ and PCR+) was 54.68% (111/203).

Other infections: The patients free of Plasmodial infection were 92 (45.32%). One case of neonatal infection has been suspected but no bacteriological test was carried out to confirm this infection.

Co-infection: Among the clinical suspicious cases of viral infection one case has been confirmed as co-infection by the Mumps virus and *P. falciparum* submicroscopic infection. The entire genome of this Mumps virus has been sequenced and is under investigation.

Clinical status: According to the WHO criteria, malaria patients were classified as uncomplicated and severe (WHO 2000). The patient who presented all of these criteria or only one was considered as severe malaria case. Indeed, of 111 *P. falciparum* infected individuals 76 (68.47%) and 35 (31.53%) were respectively classified as uncomplicated and severe malaria. The overall prevalence rates were therefore estimated as 37.43% (76/203) for uncomplicated malaria and 17.24 (35/203) for severe cases. These 35 severe cases were composed of 27 ME+ and 8 PCR+. Therefore 8/35 (22.85%) of severe cases were associated with *P. falciparum* submicroscopic infection (SMI). Among 35 patients with severe malaria, 19 (54.28%) were between 0 to 6 years old, 7 (20%) between 7 to 10 years and 9 (25.71%) between 11 to 16 years and no statistical difference was observed between 0-5 years and 6-16 years. Clinically, these severe malaria cases were composed of 30/35 (85.71%) of anaemic patients, 25/35 (71.14%) of prostrated individuals and 20/35 (57.14%) of children with clinical icterus. However, only two cases of severe anaemia were observed, the remaining others were classified from moderate (10 cases) to mild anaemia (18 cases). Also, 1 hyper parasitaemia, 6 hypoglycemia and 2 respiratory distresses were also observed among severe cases. Lastly, thrombocytopenia was detected in average of 65% (72/111) of *P. falciparum* infected children and 80% (28/35) of patients with severe malaria including the 8 SMI (see table 4). Thrombocytopenia in uncomplicated malaria cases account for 50%. This shows that thrombocytopenia is associated with severe malaria ($P < 0.05$).

Table 1 Gender and age distribution of patients

Sex	[0-6]	[7-10]	[11-16]	Total
Male	75	21	23	119 (58.6%)
Female	56	14	14	86 (41.4%)
Total	131	35	37	203 (100%)

Table 2 Clinical status, gender and age distribution of severe malaria cases.

		0-6	7-10	11-16
Prostration	Male	8	2	4
	Female	6	2	3
Respiratory distress	Male	1	1	0
	Female	0	0	0
Clinical icterus	Male	7	3	2
	Female	6	1	1
Hypoglycemia	Male	0	0	3
	Female	2	1	0
Anaemia	Male	9	4	3
	Female	6	5	3

Table 3 Representative severe malaria cases with *P. falciparum* patent infection classified according to the WHO recommendations 2000.

Patients	Age year	Pf/µL of blood	Prostration	Anemia	Respiratory distress	Jaundice	Thrombocytopenia
1	11	7,500	yes	mild	no	yes	Yes
2	6	21,000	yes	mild	no	no	Yes
3	9	23,500	yes	mild	no	yes	Yes
4	3	34,000	yes	no	no	yes	No
5	2	9,000	no	moderate	no	yes	Yes
6	2	16,000	yes	moderate	no	yes	No
7*	6	102,000	yes	mild	no	no	Yes
8	7	8,250	yes	mild	yes	no	No
9	7	35,000	no	severe	no	yes	Yes
10	16	6,000	yes	mild	no	no	Yes
11	4	4,500	yes	mild	no	no	No

Pf = *Plasmodium falciparum*; * A case of hyperparasitemia.

Table 4 Severe malaria cases of patients with *P. falciparum* submicroscopic infection.

SMI* patients	Age year	Prostration	Anemia	Jaundice	Thrombocytopenia
SMI1	10	yes	no	no	yes
SMI2	6	yes	mild	no	yes
SMI3	10	yes	mild	no	yes
SMI4	2	yes	no	no	yes
SMI5	4	yes	mild	yes	yes
SMI6	3	yes	severe	no	yes
SMI7	11	yes	moderate	no	yes
SMI8	2	yes	no	no	yes

*SMI = *P. falciparum* submicroscopic infected patients.

4. Discussion

This study aimed to analyze the occurrence of febrile syndrome in childhood and investigate whether severe malaria could be associated with *P. falciparum* submicroscopic infection (SMI) in setting of perennial transmission. Of 111 children detected with *P. falciparum* infection, 35 have shown a clinical picture of severe malaria including 8 SMI infected individuals. Perhaps, the major finding of the present study is that SMI may contribute to severe disease in children. These 8 SMI children of the 38 SMI cases observed (21.05%) were found with prostration (neurological manifestation) therefore classified as severe malaria. The prostrated patient is specifically characterized by a state of extreme weakness and fatigue following by the collapse of muscle function and patient's immobility. It is not clearly known how these SMI can specifically trigger severe clinical manifestation such as prostration. One possible explanation would be the sequestration of the malaria parasite which binds to endothelial cells hence to escape the immune system by promoting its own survival [26, 27].

Indeed, the adhesion of SMI parasite to endothelial cells receptors can block mechanically host micro vessels from heart, lungs, brain, liver, kidney and subcutaneous tissues. This phenomenon could be exacerbated by the over-production of inflammatory cytokines and endothelial cell damage as commonly observed in *falciparum* infection [12, 14, 15, 28, 29]. SMI is widely characterized by the low parasite load from peripheral blood, the parasitemia levels below the threshold of microscopy detection; however, no data exists on what is happening in the deep capillaries from these SMI individuals. Only the post-mortem parasite counts can help to unravel whether the parasite load is important in the capillaries of SMI patient especially in

severe cases. We can only hypothesize that those SMI parasites inducing severe disease may have a good cyto-adherence phenotype and perhaps expressing a particular variant surface antigen (VSA). Of interest, it has been demonstrated that severe malaria is associated with expression of some parasite VSA belonging to group A and B [30-33] and *Plasmodium* apoptosis–linked pathogenicity factors, PALPF [29, 34, 35].

Thrombocytopenia was found in 65% of *P. falciparum* infected and 80% of severe malaria cases. All the SMI patients with severe disease were found concomitantly with prostration and thrombocytopenia. These data show that thrombocytopenia is one of the most frequent malaria-associated haematological complications in the study area as demonstrated also elsewhere [36]. The platelets serve as a bridge between PRBC and endothelial cells, enhancing therefore the cytoadhesion phenomenon and parasite sequestration leading to the cerebral pathology [37, 38]. Although, detected in the great majority of severe cases including the eight SMI, the thrombocytopenia does not prevent severe settling but could reduce perhaps the extent of the disease severity. Probably, this could be a host protective mechanism as suggested by Wassmer et al 2008 [16].

In our study, as many as 85% of severe malaria cases presented anaemia. Only two severe cases were observed (1 patently infected individuals and 1 SMI). Nevertheless, our results confirmed the fact that in hyperendemic areas such Gabon anaemia is the most frequent feature of disease severity [39]. Interestingly, two thirds of SMI patients with severe malaria had anaemia. This may seem surprising since the peripheral parasite load from SMI is generally low. It has been documented that a high level of parasitaemia is needed in severe malaria anaemia [40], but host response against infection remains essential for disease development. Indeed, the parasite load is not harmless during anaemia; in fact, parasite remains the first stimulus of the host response that promotes disease. Obviously, both SMI and hyper parasitaemia are inducing intracellular parasite proliferation leading to RBC destruction and anemia although; SMI is neither commonly diagnosed nor considered as criteria of disease severity.

Overall, our data show that 18.71% of febrile children were SMI confirming thus the current increase of SMI in Gabon as demonstrated by Bouyou-Akotet et al. [41]. In the management of malaria, only patients with blood smears and/or rapid diagnostic test positive are treated. The treatment of patient negative by both tests depends of clinical signs and physician's appreciation. SMI sometime may represent a large proportion of infected individuals and are therefore omitted. Currently malaria control strategies should take into account the SMI contribute to the development of severe malaria [19, 21, 42, 43].

A few suspected cases of bacterial infection were not confirmed by culture, because it has been previously shown that infection represents less than 5% of febrile cases in this area [44]. This failure added to the weakness of our sample size is undoubtedly the limitations of the study. However, we are facing a new challenge, the increase of submicroscopic *P. falciparum* infections and especially their association with the severe disease.

5. Conclusions

In conclusion, severe malaria can be associated with *P. falciparum* submicroscopic infection which occurs in an average of 18.7% of acute febrile illness in childhood of Franceville. These results should be taken into account in the management of febrile syndrome.

Acknowledgments

The authors are grateful to the children and their parents or guardians for participating in the study and to the staff of the pediatric wards at Hôpital de l'Amitié Sinogabonaise in Franceville. Financial support: CIRMF is funded by Total Gabon, the Gabonese government and Ministère Français des Affaires

Etrangères.

References

[1] P. Talani, G. Samba, G. Moyen, Management of child fever in the battle against malaria in Brazzaville, Bull Soc Pathol Exot 95 (2) (2002) 115-6.

[2] WHO, World malaria report 2008, who/htm/gmp/2008.1.

[3] O. Abdou Raouf, R.K. Tchoua, J.P. Ndinga, J.R. Guikoumbi, A. Josseaume, R. Tchoua, Pediatric emergencies in a teaching hospital of Libreville, Médecine d'Afrique noire 49 (11) (2002) 475-480.

[4] World Health Organization, World malaria report 2011, who/htm/gmp/, 2011.

[5] L.M. Barat, N. Palmer, S. Basu, E. Worrall, K. Hanson, A. Mills, Do malaria control interventions reach the poor? A view through the equity lens, Am J Trop Med Hyg 71 (2 Suppl) (2004) 174-178.

[6] WHO, World malaria report 2009, who/htm/gmp/2009.

[7] M.K. Bouyou-Akotet, D.P. Mawili Mboumba, E. Kendjo, M. Mabika-Mamfoumbi, E.B. Ngoungou, A. Dzeing-Ella, et al., Evidence of decline of malaria in the general hospital of Libreville, Gabon from 2000 to 2008, Malar J 8(300) (2009). doi: 10. 1186/1475-2875-8-300.

[8] J.B. Lekana-Douki, J. Pontarollo, R. Zatra, F.S. Toure-Ndouo, Malaria in Gabon: Results of bioclinical study at the Chinese Gabonese Friendship Hospital of Franceville, Sante 21(4) (2011)193-8.

[9] E. Pongponratn, G.D. Turner, N.P. Day, N.H. Phu, J.A. Simpson, K. Stepniewska, et al., An ultrastructural study of the brain in fatal *Plasmodium falciparum* malaria, Am J Trop Med Hyg 69 (4) (2003) 345-359.

[10] A.M. Dondorp, P.N. Newton, M. Mayxay, W. Van Damme, F.M. Smithuis, S. Yeung, et al., Fake antimalarials in Southeast Asia are a major impediment to malaria control: Multinational cross-sectional survey on the prevalence of fake antimalarials, Trop Med Int Health 9 (12) (2004) 1241-1246.

[11] S.C. Wassmer, N. Coltel, V. Combes, G.E. Grau, Pathogenesis of cerebral malaria: Facts and hypotheses, Med Trop 63 (3) (2003) 254-257. (in French)

[12] N.H. Hunt, G.E. Grau, Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria, Trends Immunol 24 (9) (2003) 491-499.

[13] A. Craig, A. Scherf, Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion, Mol Biochem Parasitol 115 (2) (2001) 129-143.

[14] D. Mazier, J. Nitcheu, M. Idrissa-Boubou, Cerebral malaria and immunogenetics, Parasite Immunol 22 (12) (2000) 613-623.

[15] P. Pino, I. Vouldoukis, N. Dugas, G. Hassani-Loppion, B. Dugas, D. Mazier, Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, Ann N Y Acad Sci 1010 (2003) 582-586.

[16] S.C. Wassmer, T. Taylor, C.A. Maclennan, M. Kanjala, M. Mukaka, M.E. Molyneux, et al., Platelet-induced clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from Malawian patients with cerebral malaria-possible modulation *in vivo* by thrombocytopenia, J Infect Dis 197 (1) (2008) 72-78.

[17] P. Gérardin, C. Rogier, A.S. Ka, P. Jouvencel, V. Brousse, P. Imbert, Prognostic value of thrombocytopenia in African children with falciparum malaria, Am J Trop Med Hyg 66 (6) (2002) 686-691.

[18] S. Ladhani, B. Lowe, A.O. Cole, K. Kowuondo, C.R. Newton, Changes in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: Relationship to disease outcome, Br J Haematol 119 (3) (2002) 839-847.

[19] C. Rogier, D. Commenges, J.F. Trape, Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic populations, Am J Trop Med Hyg 54 (6) (1996) 613-619.

[20] F.P. Mockenhaupt, U. Ulmen, C. von Gaertner, G. Bedu-Addo, U. Bienzle, Diagnosis of placental malaria, J Clin Microbiol 40 (1) (2002) 306-308.

[21] H.A. Giha, I.E. A-Elbasit, T.M. A-Elgadir, I. Adam, K. Berzins, G. Elghazali, et al., Cerebral malaria is frequently associated with latent parasitemia among the semi-immune population of eastern Sudan, Microbes Infect 7 (11-12) (2005) 1196-1203.

[22] P. Deloron, P. Ringwald, A.J. Luty, A. Renaut, T.N. Minh, J.R. Mbessy, et al., Relationships_between malaria prevalence and malaria-related morbidity in school children from two villages in central Africa, Am J Trop Med Hyg 61 (1) (1999) 99-102.

[23] N. Elissa, F. Migot-Nabias, A. Luty, A. Renaut, F. Touré, M. Vaillant, et al., Relationship between entomological inoculation rate, *Plasmodium falciparum* prevalence rate, and incidence of malaria attack in rural Gabon, Acta Trop 85 (3) (2003) 355-361.

[24] T. Planche, S. Krishna, M. Kombila, K. Engel, J.F. Faucher, E. Ngou-Milama, et al., Comparison of methods for the rapid laboratory assessment of children with malaria, Am J Trop Med Hyg 65 (5) (2001) 599-602.

[25] Q. Cheng, N. Cloonan, K. Fischer, J. Thompson, G. Waine, M. Lanzer, et al., Stevor and rif are *Plasmodium falciparum* multicopy gene families which potentially encode variant antigens, Mol Biochem Parasitol 97 (1-2) (1998) 161-176.

[26] C.F. Ockenhouse, M. Ho, N.N. Tandon, G.A. Van Seventer, S. Shaw, N.J. White, et al., Molecular basis of sequestration in severe and uncomplicated *Plasmodium*

falciparum malaria: Differential adhesion of infected erythrocytes to CD36 and ICAM-1, J Infect Dis 164 (1) (1991) 163-169.

[27] P. Ringwald, F. Peyron, J.P. Lepers, P. Rabarison, C. Rakotomalala, M. Razanamparany, et al., Parasite virulence factors during falciparum malaria: Rosetting, cytoadherence, and modulation of cytoadherence by cytokines, Infect Immun 61 (12) (1993) 5198-5204.

[28] F.S. Touré, O. Ouwe-Missi-Oukem-Boyer, J. Mezui-Me-Ndong, G.R. Ndong-Atome, U. Bisvigou, D. Mazier, et al., Cytoadherence and genotype of *Plasmodium falciparum* strains from symptomatic children in Franceville, southeastern Gabon, Clin Med Res 5 (2) (2007) 106-113.

[29] E.S. Zang-Edou, U. Bisvigou, Z. Taoufiq, F. Lékoulou, J.B. Lékana-Douki, Y. Traoré, et al., Inhibition of *Plasmodium falciparum* field isolates-mediated endothelial cell apoptosis by Fasudil: Therapeutic implications for severe malaria, PLoS One 5 (10) (2010) e13221.

[30] P.C. Bull, A. Pain, F.M. Ndungu, S.M. Kinyanjui, D.J. Roberts, C.I. Newbold, et al., *Plasmodium falciparum* antigenic variation: Relationships between in vivo selection, acquired antibody response, and disease severity, J Infect Dis 192 (6) (2005) 1119-1126.

[31] M.A. Nielsen, T. Staalsoe, J.A. Kurtzhals, B.Q. Goka, D. Dodoo, M. Alifrangis, et al., *Plasmodium falciparum* variant surface antigen expression varies between isolates causing severe and nonsevere malaria and is modified by acquired immunity, J Immunol 168 (7) (2002) 3444-3450.

[32] A.T. Jensen, P. Magistrado, S. Sharp, L. Joergensen, T. Lavstsen, A. Chiucchiuini, et al., *Plasmodium falciparum* associated with severe childhood malaria preferentially expresses PfEMP1 encoded by group A var genes, J Exp Med 199 (9) (2004) 1179-1190.

[33] M. Kaestli, I.A. Cockburn, A. Cortés, K. Baea, J.A. Rowe, H.P. Beck, Virulence of malaria is associated with differential expression of *Plasmodium falciparum* var gene subgroups in a case-control study, J Infect Dis 193 (11) (2006) 1567-1574.

[34] A. Siau, F.S. Toure, O. Ouwe-Missi-Oukem-Boyer, L. Ciceron, N. Mahmoudi, C. Vaquero, et al., Whole-transcriptome analysis of *Plasmodium falciparum* field isolates: Identification of new pathogenicity factors, J Infect Dis 196 (11) (2007) 1603-1612.

[35] F.S. Touré, O. Ouwe-Missi-Oukem-Boyer, U. Bisvigou, O. Moussa, C. Rogier, P. Pino, et al., Apoptosis: A potential triggering mechanism of neurological manifestation in *Plasmodium falciparum* malaria, Parasite Immunol 30 (1) (2008) 47-51.

[36] S.N. Wickramasinghe, S.H. Abdalla, Blood and bone marrow changes in malaria, Baillieres Best Pract Res Clin Haematol 13 (2) (2000) 277-299.

[37] G.E. Grau, C.D. Mackenzie, R.A. Carr, M. Redard, G. Pizzolato, C. Allasia, et al., Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria, J Infect Dis 187 (3) (2003) 461-466.

[38] S.C. Wassmer, C. Lépolard, B. Traoré, B. Pouvelle, J. Gysin, G.E. Grau, Platelets reorient *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte cytoadhesion to activated endothelial cells, J Infect Dis 189 (2) (2004) 180-189.

[39] A. Dzeing-Ella, P.C. Nze Obiang, R. Tchoua, T. Planche, B. Mboza, M. Mbounja, et al., Severe falciparum malaria in Gabonese children: Clinical and laboratory features, Malar J 4 (1) (2005) 4 (1)

[40] A.Y. Kitua, T.A. Smith, P.L. Alonso, H. Urassa, H. Masanja, J. Kimario, et al., The role of low level *Plasmodium falciparum* parasitaemia in anaemia among infants living in an area of intense and perennial transmission, Trop Med Int Health 2 (4) (1997) 325-333.

[41] M.K. Bouyou-Akotet, M. Ramharter, E.B. Ngoungou, M.M. Mamfoumbi, M.P. Mihindou, M.A. Missinou, et al., Efficacy and safety of a new pediatric artesunate-mefloquine drug formulation for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Gabon, Wien Klin Wochenschr 122 (5-6) (2010) 173-178.

[42] C. Menendez, Malaria during pregnancy: A priority area of malaria research and control, Parasitol Today 11 (5) (1995) 178-183.

[43] F.P. Mockenhaupt, B. Rong, M. Günther, S. Beck, H. Till, E. Kohne, et al., Anaemia in pregnant Ghanaian women: Importance of malaria, iron deficiency and haemoglobinopathies, Trans R Soc Trop Med Hyg 94 (5) (2000) 477-483.

[44] M.K. Bouyou-Akotet, D.P. Mawili-Mboumba, E. Kendjo, A. Eyang Ekouma, O. Abdou Raouf, E. Engohang Allogho, et al., Complicated malaria and other severe febrile illness in a pediatric ward in Libreville, Gabon, BMC Infect Dis 12 (216) (2012).doi: 10.1186/1471-2334-12-216.

CHAPITRE IV - AVANT-PROPOS

Nous avons rapporté dans l'étude précédente un cas avéré de coinfection paludisme- oreillons. Les oreillons sont causés par le virus Mumps ou ourlien qui est un virus de la famille des paramyxovirus et du genre *Rubulavirus* responsable d'affection respiratoire se développant au niveau des voies respiratoires supérieures. C'est un virus à ARN monocaténaire non segmenté. Il se réplique dans le rhino-pharynx d'où il peut disséminer par voie hématogène. L'homme est le seul hôte naturel connu du virus ourlien qui se propage par contact direct ou par voie aérienne, par les gouttelettes provenant des voies respiratoires des sujets infectés. La contagiosité est d'une dizaine de jours, le virus étant trouvé dans la salive 6 jours avant le début de la maladie et disparaissant 5 jours environ après les premiers symptômes. Si les manifestations cliniques ne souffrent d'aucune ambigüité, la mise en évidence du virus par des techniques de biologie moléculaire demeure quelque fois problématique. Dans cette étude, nous décrivons la caractérisation moléculaire d'une souche de virus *Mumps* diagnostiquée par RT-PCR à partir du crachat et du sérum d'enfants malades que nous avons séquencé et dont le génome complet a été enregistré dans la Genbank sous le numéro KJ810514 (annexe).

Chapitre IV

Article 3

Molecular characterization of Mumps virus in symptomatic individuals of Gabon, Central Africa

In preparation

Molecular characterization of Mumps virus in symptomatic individuals of Gabon, Central Africa

Gael D. Maganga[1#*], Berthe A. Iroungou[2,3#],
Christine Bole-Feysot[4], Eric M. Leroy[1,5]
Fousseyni S Touré Ndouo[2] and Nicolas Berthet[1,6]

Gael D. Maganga[1]
*Corresponding author: E-mail: gael_maganga@yahoo.fr
Tel: +241 07 11 76 25
Berthe A. Iroungou[2,3] E-mail:ia_berthe@yahoo.fr
Tel: +241 07 44 85 85
Christine Bole-Feysot[4] E-mail:
Eric M. Leroy[1,5] E-mail: eric.leroy@ird.fr
Fousseyni S Touré Ndouo[2] E-mail : fousseyni@yahoo.fr
Nicolas Berthet[1,6] E-mail :

[1] Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Département Zoonose et Maladies Emergentes, Franceville, Gabon ;
[2] Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Unité de Recherche et d'Analyse Médicale, Franceville, Gabon ;
[3] Aix Marseille University, URMITE unit, Marseille ;
[4] Imagine, Institut des maladies génétiques - Plateforme Génomique, Hôpital Necker - Enfants Malades, 149 rue de Sèvres - 75743 PARIS cedex 15 ;
[5] Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR 224 (MIVEGEC (Laboratoire Maladies Infectieuses et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle), IRD/CNRS/UM1/UM2, Montpellier, France ;
[6] Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 3569, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, France

#: equal contribution to this work

Abstract

Background: Mumps is a common contagious viral disease and remains endemic in many countries even if vaccination could prevent this disease. The World Health Organization (WHO) recognizes 12 distinct genotypes (A to L) of MuV. In Gabon, contrary to measles, mumps is not a notified disease. Here, we describe several mumps clinical cases in Franceville, south-eastern Gabon and report the molecular characterization of mumps virus strain involved in these cases.

Findings: Epidemiological investigations report that the age of children with clinical symptoms of mumps infection ranged from 9 months to 13 years with a male-to-female ratio of 1.5. Genetic analysis of the strains of the mumps virus detected in oral swabs and sera demonstrated that a single genotype G was circulating in this outbreak and was closely related to the strains circulating in American and European countries.

Conclusions: These findings suggest a possible importation the Gabonese MuV from American or Europeans countries and emphasize the need to include mumps in the list of diseases to be monitored in Gabon.

Keywords: Mumps virus, Gabon, genotype G

Introduction

Mumps is a common children contagious disease which mainly associated with parotitis. This infection is benign and usually not fatal, but it can cause some complications like meningitis, orchitis, pancreatitis, encephalitis, epididymitis and deafness [1].

The mumps virus (MuV) is a species belonging to the order *Mononegavirales* of the family *Paramyxoviridae* of the genus *Rubulavirus*. The MuV genome consists of a single-stranded, negative-sense, nonsegmented RNA of 15,384 nucleotides with seven transcription units that encode open reading frames in the following order: for the nucleocapsid (N), phospho (P), matrix (M), fusion (F), small hydrophobic (SH), hemagglutinin-neuraminidase (HN), and large (L) proteins. While there is one distinct serotype of mumps virus, sequential analysis of the gene encoding the variable small hydrophobic protein (SH gene) allows differentiation of several genotypes. Therefore, 13 genotypes (A to M) had been proposed [2]. However, the World Health Organization (WHO) has recognized 12 distinct genotypes (A to L) of MuV [3].

Through vaccination, the disease had almost entirely disappeared. However, it has been clearly demonstrated that MuV epidemics as well as small outbreaks can occur in highly vaccinated populations, as reported in many states of the

United States of America (USA) [4]. Indeed, mumps occurs worldwide with cases reported throughout the year and epidemics occurring every two to five years. Mumps remains endemic in many countries, and vaccines are used in only 59% of WHO member states.

In Gabon, until 2010, the MMR (measles-mumps-combination rubella) was non-Expanded Program on Immunization (EPI) for children 12 to 59 months old [5]. To date no information is available on the inclusion or exclusion of MMR in EPI in health structures in the public sector (hospitals, centers for maternal and child health). However, the MMR vaccine is part of the vaccination protocols in the private sector structures (clinics) that incorporate EPI vaccines and those not covered by the EPI. The expanded national vaccination program launched in 1978 and effective a decade after [5] improved vaccine coverage across the Gabonese territory particularly in Libreville, the capital.

In Gabon, contrary to measles, mumps is not a notified disease. Indeed, in 2000 and 2010, 934 cases of measles and only one case of mumps have been reported respectively [6]. This present study describes the epidemiological situation of a MuV outbreak in south-eastern Gabon in Franceville with the genotype description of the strain involved.

Materials and Methods

This study has been examined and approved by the National Ethic Committee of Research (NECR) (PROT n°0018-2013/SG/CNE). Between January 2013 and March 2013, 15 suspected cases of mumps have been recruited among young children in a pediatric ward of the Chinese Gabonese Friendship Hospital "*Hôpital de l'Amitié Sino-Gabonaise*" (HASG) of Franceville, capital of the Haut- Ogooué Province, in south-eastern of Gabon. Data on socio demographic characteristics (sex, age, address), clinical symptoms, vaccination status and epidemiological information (sampling day after symptoms onset, place of contamination) were collected (Table 1).
Clinical samples including, sera, oral and nasal swabs, were collected from patients exhibiting symptoms of mumps infection (Table 1) one or 2 days after clinical symptoms onset and shipped to the *Centre International de Recherches Médicales de Franceville* (CIRMF) for virological investigations.

Oral and nasal swabs were previously suspended in 500 µl of 0.9% saline solution. Total viral RNA was extracted from these clinical samples on a BioRobot EZ1 automat (Qiagen) using the EZ1 Virus Mini Kit version 2.0 according to the manufacturer's instructions.

For *Rubulavirus* genus detection, samples were firstly tested with an hemi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction (hnRT-PCR) using generic primers targeting gene encoding the MuV polymerase [7] and secondly with a house-made PCR assay targeting the Nucleocapsid (N) gene as described in the Additional file 1. Next-generation sequencing was then directly performed on the extracted nucleic acid from an oral swab of patient 15, in order to obtain the complete viral genome sequence (Additional file 2). Partial sequences of Small Hydrophobic (SH) and N genes were aligned using ClustalW algorithm of the MEGA 5 software package. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 [8].

Results

On the basis of clinical symptoms mumps infection was diagnosed in 15 children aged from 9 months to 13 years old. Among these cases, 9 (60%) were male and 6 (40%) were female (male-to-female ratio of 1.5) (Table 1). Clinically, all patients had fever (39.5 - 40°C), bilateral parotitis, except for three of them, who had unilateral parotitis, and also a high rate of lymphocytes (evidence of viral infection). Vaccination status was known for all children, 11

(73%) had received two doses of MMR vaccine and 4 (27%) of them were unvaccinated. For about haft of the cases, contamination seems to have occurred by a direct contact with another case in house, and the remaining at school.

MuV RNA was only detected by hnRT-PCR in serum and oral swabs of patients 14 and 15, and were designated as MuV/Gabon/13/1 and MuV/Gabon/13/2, respectively. Moreover, a DNA fragment of 478 bp corresponding to the N gene has been successfully amplified in 2 sera of patients 11 and 14 and in 2 oral swabs of patients 10 and 15 (see Table 1). However, viral RNA was never detected in all the nasal swab samples tested.

In order to determine the genotype of the Gabonese MuV strains, the phylogenetic analyses based on the two sequences of 478 nucleotides and sequence of 316-nucleotides of the MuV N and SH genes, respectively, were performed by

comparison to the sequences available in the GenBank databases (Figure 1a and 1b respectively). The two MuV partial N gene sequences (MuV/Gabon/13/1 and MuV/Gabon/13/2) had 99% sequence similarity between them and clustered with genotype G strains (Figure 1a). Futhermore, it showed the highest amino acid similarity (99%) with the strains circulating in the USA specifically in Iowa in 2006 (GenBank accession numbers JN012242 and JX287385) and New York in 2009 and 2010 (GenBank accession numbers EU370207; JX287391; JX287390; JX287389; JX287385). As before, the phylogenetic analysis based on the 316 nucleotides of the SH gene showed that the sequence of MuV/Gabon/13/2 had 97% amino acid similarity with the MuV reference G genotype (strain GBR05-1720540; accession number EU606261) which had circulated in the United Kingdom in 2005. Altogether, these results strongly suggest that our Gabonese MuV strains could be classified as belonging to genotype G.

Discussion

Although many cases of mumps were reported to WHO in several African countries including Ghana, Morocco, Zambia, Guinea and Eritrea over the past 10 years [6], the circulating genotypes in these countries were rarely known. We described here a small mumps outbreak in young patients in south-eastern Gabon with the identification of the genotype of the involved mumps viral strains.

Epidemiological investigations revealed that young males were predominantly affected as documented in some previous mumps outbreak in the United States and Europe [9, 10]. Complication of mumps infection was not observed either in men or women, contrary to outbreaks in some European countries [11, 12]. The vaccinated children were the most affected during the mumps outbreak of Franceville confirming therefore the data published in the United States, the United Kingdom and the Netherlands [13, 14]. Furthermore, the mumps virus was mainly detected in children who had received two doses of MMR vaccine. These findings might suggest an inadequate effectiveness of the vaccine or a secondary vaccine failure [15], or a genotype different to that of the vaccine [16].

The phylogenetic analyses showed that the strains involved in the outbreak in Franceville were genetically close to strains causing outbreaks in the United Kingdom and the USA and belonged to the genotype G which is also distributed in Asian countries. The introduction of MuV genotype G in Gabon is probably due to a decrease in immunization coverage in

children under one year old based on data available for the measles vaccine. Indeed, the value of coverage decreased from 76% to 55% between 1990 and 2010 [17].

Failure to detect the mumps virus' RNA in the samples from patients with clinically compatible mumps symptoms does not rule out mumps as a diagnosis. Successful detection of the mumps virus RNA mainly depends on the timing of the sample collection and viral load Vaccinated individuals may dispose of the virus in a shorter period and might eliminate smaller amounts of the virus, thus degradation of the sample has greater consequences for successful detection of virus. In outbreaks among two-dose vaccine recipients, the mumps virus' RNA was detected in samples from 30% – 35% of case-patients if the samples were collected within the first 3 days following an onset of parotitis; IgM was detected in 13% – 15% of these cases [18,19]. For a large majority, the samples in our study were collected one or two days after the onset of parotitis.

In conclusion, this study reports the first molecular characterization and the complete genomic sequence of a mumps viral strain circulating in a sub-Saharan African country, in Gabon in 2013. These Gabonese MuV strains belonged to genotype G and were genetically closely related to the strains circulating in American and European countries, suggesting a possible importation from these countries. These findings highlight the importance of genetic information from

circulating mumps viruses in order to track the transmission pathways of the virus. Moreover, it emphasizes the need to include mumps in the list of diseases to be monitored in Gabon, given that there is a probable underestimation of the number of cases.

List of abbreviations

MuV: Mumps virus; USA: United States of America; WHO: World Health Organization; MMR: Measles-Mumps combination Rubella; CNER: National Ethic Committee of Research; hnRT-PCR: hemi-nested reverse transcription polymerase chain reaction.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GDM and BAI conducted sample collection, PCR experiments, sequence and phylogenetic analysis. CBF performed next-generation sequencing. NB designed PCR primers and performed bioinformatic analysis. FNT and EML designed the study and organized sample collection. GDM, BAI, and FNT wrote the manuscript. NB and EML revised the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

Gael Darren Maganga and Nicolas Berthet belong to Department of zoonoses and emerging viral diseases, and Berthe Amélie Iroungou and Fousseyni Toure Ndouo belong to Unit of
analysis and medical research, at CIRMF.

Acknowledgments

CIRMF is supported by the Government of Gabon, Total-Fina-Elf Gabon, and the French *Ministère des affaires Etrangères et Européennes*. The funders had no role in study design, data analysis or preparation of the manuscript

1. Overview of clinical specimens used in this study (Table 1)

* Unilateral parotitis

Patient number	Age (years)	Sex	Specimens	hnRT-PCR *Rubulavirus* (L gene)	RT-PCR (N gene)	Vaccination status	Symptoms	Epidemiological information (sampling day after symptoms onset – place of contamination)
1	5	F	Serum	-	-	Vaccinated	Fever, Parotitis	One day - House
2	5	M	Serum	-	-	Vaccinated	Fever, Parotitis	One day - school
3	4	F	Oral swab	-	-	Vaccinated	Fever, Parotitis	One day - school
4	13	M	Serum, oral swab	-	-	Vaccinated	Fever, Parotitis	One day - House
5	10	M	Serum, oral swab	-	-	Vaccinated	Fever, Parotitis	Two day - House
6	5	M	Oral swab	-	-	Vaccinated	Fever, Parotitis	One day - school
7	3	F	Oral swab	-	-	Vaccinated	Fever, Parotitis	One day - school
8	7	M	Oral swab	-	-	Vaccinated	Fever, Parotitis	One day - school
9	< 1	F	Serum, oral swab	-	-	Unvaccinated	Fever, Parotitis*	One day - House
10	1	F	Oral swab, nasal swab, serum	-	+	Unvaccinated	Fever, Parotitis*	One day - House
11	3	M	Serum	-	+	Unvaccinated	Fever, Parotitis*	One day - House
12	8	F	Oral swab, serum	-	-	Vaccinated	Fever, Parotitis	One day - school
13	2	M	Serum, nasal swab	-	-	Unvaccinated	Fever, Parotitis	One day - House
14	6	M	Serum	+	+	Vaccinated	Fever, Parotitis	One day - school
15	6	M	Oral swab	+	+	Vaccinated	Fever, Parotitis	One day - school

Figure legend

Figure 1 Phylogenetic relationship between MuV sequences detected in Gabon and MuV sequences retrieved from GenBank. Phylogenetic trees based on a 478 and 316 base pair fragment of the nucleoprotein gene (a) and the small hydrophobic gene (b) of mumps virus. (▲): Sequences generated in this study. Bootstrap values are shown; values > 0.65 are shown. The references viruses are designated by their Genbank accession numbers.

Figure 1a

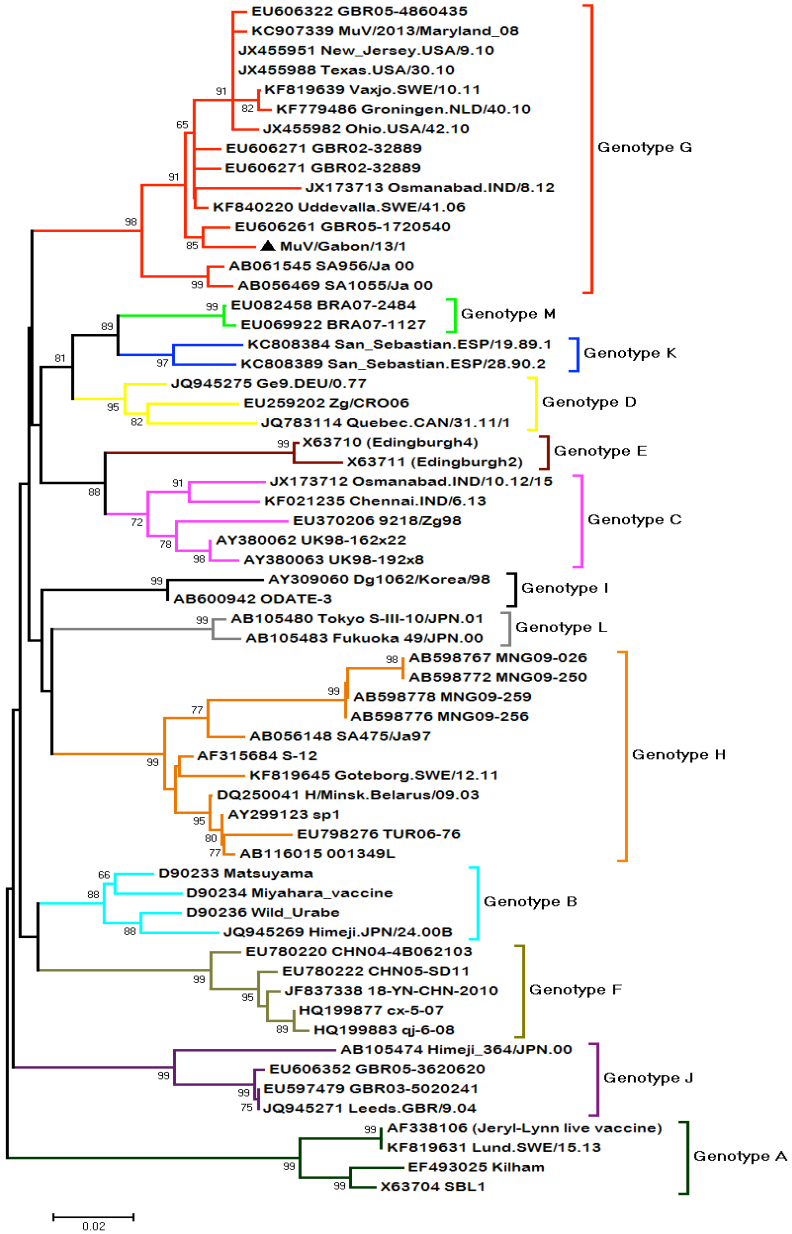
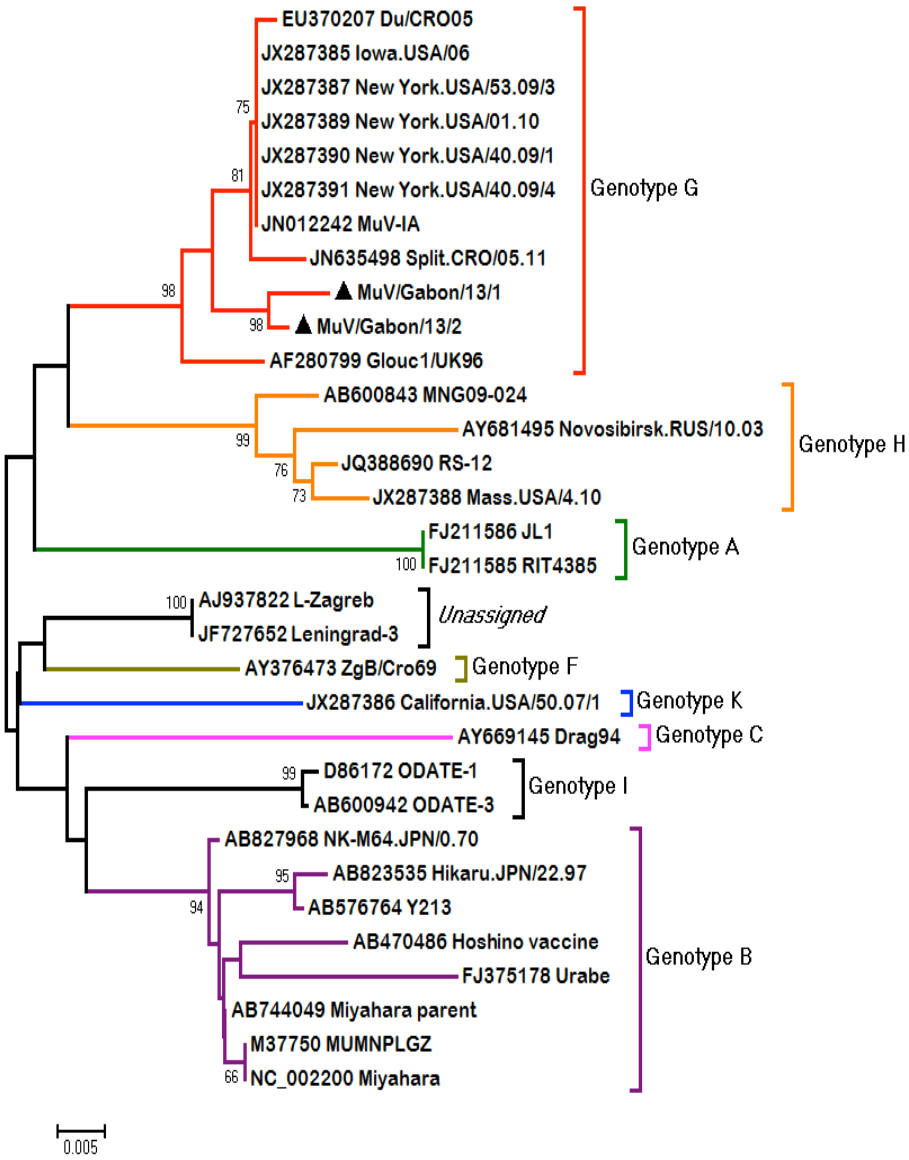

EU606322 GBR05-4860435
KC907339 MuV/2013/Maryland_08
JX455951 New_Jersey.USA/9.10
JX455988 Texas.USA/30.10
KF819639 Vaxjo.SWE/10.11
KF779486 Groningen.NLD/40.10
JX455982 Ohio.USA/42.10
EU606271 GBR02-32889
EU606271 GBR02-32889
JX173713 Osmanabad.IND/8.12
KF840220 Uddevalla.SWE/41.06
EU606261 GBR05-1720540
MuV/Gabon/13/1
AB061545 SA956/Ja 00
AB056469 SA1055/Ja 00
Genotype G
EU082458 BRA07-2484
EU069922 BRA07-1127
Genotype M
KC808384 San_Sebastian.ESP/19.89.1
KC808389 San_Sebastian.ESP/28.90.2
Genotype K
JQ945275 Ge9.DEU/0.77
EU259202 Zg/CRO06
JQ783114 Quebec.CAN/31.11/1
Genotype D
X63710 (Edingburgh4)
X63711 (Edingburgh2)
Genotype E
JX173712 Osmanabad.IND/10.12/15
KF021235 Chennai.IND/6.13
EU370206 9218/Zg98
AY380062 UK98-162x22
AY380063 UK98-192x8
Genotype C
AY309060 Dg1062/Korea/98
AB600942 ODATE-3
Genotype I
AB105480 Tokyo S-III-10/JPN.01
AB105483 Fukuoka 49/JPN.00
Genotype L
AB598767 MNG09-026
AB598772 MNG09-250
AB598778 MNG09-259
AB598776 MNG09-256
AB056148 SA475/Ja97
AF315684 S-12
KF819645 Goteborg.SWE/12.11
DQ250041 H/Minsk.Belarus/09.03
AY299123 sp1
EU798276 TUR06-76
AB116015 001349L
Genotype H
D90233 Matsuyama
D90234 Miyahara_vaccine
D90236 Wild_Urabe
JQ945269 Himeji.JPN/24.00B
Genotype B
EU780220 CHN04-4B062103
EU780222 CHN05-SD11
JF837338 18-YN-CHN-2010
HQ199877 cx-5-07
HQ199883 qj-6-08
Genotype F
AB105474 Himeji_364/JPN.00
EU606352 GBR05-3620620
EU597479 GBR03-5020241
JQ945271 Leeds.GBR/9.04
Genotype J
AF338106 (Jeryl-Lynn live vaccine)
KF819631 Lund.SWE/15.13
EF493025 Kilham
X63704 SBL1
Genotype A
0.02

Figure 1b


EU370207 Du/CRO05
JX287385 Iowa.USA/06
JX287387 New York.USA/53.09/3
JX287389 New York.USA/01.10
JX287390 New York.USA/40.09/1
JX287391 New York.USA/40.09/4
JN012242 MuV-IA
JN635498 Split.CRO/05.11
MuV/Gabon/13/1
MuV/Gabon/13/2
AF280799 Glouc1/UK96
Genotype G
AB600843 MNG09-024
AY681495 Novosibirsk.RUS/10.03
JQ388690 RS-12
JX287388 Mass.USA/4.10
Genotype H
FJ211586 JL1
FJ211585 RIT4385
Genotype A
AJ937822 L-Zagreb
JF727652 Leningrad-3
Unassigned
AY376473 ZgB/Cro69
Genotype F
JX287386 California.USA/50.07/1
Genotype K
AY669145 Drag94
Genotype C
D86172 ODATE-1
AB600942 ODATE-3
Genotype I
AB827968 NK-M64.JPN/0.70
AB823535 Hikaru.JPN/22.97
AB576764 Y213
AB470486 Hoshino vaccine
FJ375178 Urabe
AB744049 Miyahara parent
M37750 MUMNPLGZ
NC_002200 Miyahara
Genotype B
75
81
98
98
99
76
73
100
100
99
95
94
66
0.005

References

1. Leinikki P : Mumps. 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd., New-York, NY; 1995
2. Kidokoro M, Tuul R, Komase K, Nymadawa P: **Characterization of Mumps Viruses Circulating in Mongolia: Identification of a Novel Cluster of Genotype H**. *Journal of Clinical Microbiology* 2011, p. 1917–1925.
3. Dayan GH, Quinlisk MP, Parker AA, Barskey AE, Harris ML, Schwartz JM, Hunt K, Finley CG, Leschinsky DP, O'Keefe AL, Clayton J, Kightlinger LK, Dietle EG, Berg J, Kenyon CL, Goldstein ST, Stokley SK, Redd SB, Rota PA, Rota J, Bi D, Roush SW, Bridges CB, Santibanez TA, Parashar U, Bellini WJ, Seward JF: **Recent resurgence of mumps in the United States.** *N Engl J Med* 2008, **358**:1580–1589.
4. Whelan J, van Binnendijk R, Greenland K, Fanoy E, Khargi M, Yap K, *et al*: **Ongoing mumps outbreak in a student population with high vaccination coverage, Netherlands**, **2010**. *Euro Surveill* 2010, **15**(17):pii=19554. Available from: http://www. eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId= 19554
5. Ategbo S, Ngoungou EB, Koko J, Vierin Y, Eyi Nzang Ndong C, Moussavou Mouyama A : **Etude de la couverture vaccinale chez les enfants de 0 à 5 ans à Libreville (Gabon)**. *Cahiers Santé* **vol. 20**, n°4, octobre-novembre-décembre 2010.
6. WHO: **Mumps reported cases**. **WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system 2013 global summary**. Last update: 2013 (data as of 16-Oct-2013)
7. Tong S, Chern SW, Li, Pallansch MA, Anderson LJ: **Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses**. *J Clin Microbiol* 2008, **46**:2652–2658

   Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: **MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods**. *Molecular Biology and Evolution*

8. **Distance and Maximum Parsimony Methods**. *Molecular Biology and Evolution* 2011, **28**: 2731-2739.

9. Atkinson W, Wolfe S, Hamborsky J, McIntyre L, editors: **Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases**. 11th ed. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Chapter 13: Mumps. Washington, D.C.: Public Health Foundation; 2011: 205-215.

10. Hassan J, Dean J, Moss E, Carr MJ, Hall WW, Connell J: **Seroepidemiology of the recent mumps virus outbreaks in Ireland**. *J Clin Virol* 2012, **53**:320–4. http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2011.12.022

11. Otto W, Mankertz A, Santibanez S, Saygili H, Wenzel J, Jilg W, Wieland WF, Borgmann S: **Ongoing outbreak of mumps affecting adolescents and young adults in Bavaria, Germany, August to October 2010**. *Euro Surveill* 2010, **15**(50):pii=19748. Available from: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle. aspx? Article Id=19748

12. Hukic M, Ravlija J, Dedeic Ljubovic A, Moro A, Arapcic S, Muller CP, Hübschen JM: **Ongoing large mumps outbreak in the Federation of Bosnia and Herzegovina, Bosnia and Herzegovina, December 2010 to July 2011**. *Euro Surveill* 2011,**16**(35):pii=19959.

13. Calvert N, Ashton JR, Garnett E: **Mumps outbreak in private school: public health lessons for the post-Wakefield era**. *Lancet* 2013, **381**: 1625-6.

14. Sane J, Gouma S, Koopmans M, de Melker H, Swaan C, van Binnendijk R, *et al*: **Epidemic of mumps among vaccinated persons, the Netherlands, 20092012.** *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2014 Apr [***date cited***]. http://dx.doi.org/10.3201/eid2004.131681.

15. Dayan GH, Rubin S: **Mumps outbreaks in vaccinated populations: are available mumps vaccines effective enough to prevent outbreaks**? *Clin Infect Dis* 2008, 47:1458–67. http://dx.doi.org/10.1086/591196.

16. Quinlisk MP: **Mumps control today**. *J Infect Dis* 2010, **202**:655–6 http://dx.doi.org/10.1086/655395.

17. Organisation Mondiale de la Santé : **Statistiques sanitaires mondiales 2012**. *Court Consulting* 2012, p176.

18. Bitsko RH, Cortese MM, Dayan GH, Rota PA, Lowe L, Iversen SC, Bellini WJ: **Detection of RNA of mumps virus during an outbreak in a population with a high level of measles, mumps, and rubella vaccine coverage**. *J Clin Microbiol* 2008, **46**:1101–3.

19. Rota JS, Turner JC, Yost-Daljev MK, Freeman M, Toney DM, Meisel E, Williams N, Sowers SB, Lowe L, Rota PA, Nicolai LA, Peake L, Bellini WJ: **Investigation of a mumps outbreak among university students with two measles-mumps-rubella (MMR) vaccinations, Virginia, September–December 2006**. *J Med Virol* 2009, **81**:1819–25.

Additional file 1 general conditions for PCR.

RNA was retrotranscribed into cDNA using the commercial High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) and polymerase chain reaction (PCR) targeting the 478 nt of the nucleoprotein NP gene was performed using the Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) (Mumps_N_fow 5'-ATGGTTACTATTTCCAGATTGG-3' and Mumps_N_rev 5'-CTACTCATCCCAGTCACCCACT-3'). The amplification of the NP gene fragment is performed in a final volume of 25 µl, containing 1μl MgSO4 (50nM), 2.5 μl 10X PCR buffer, 1 μl deoxynucleoside triphosphates (10μM each), 2.5 μl each primer (10μM), 0.2 µl enzyme mix, (Invitrogen), 5 µl CDNA and Molecular Biology water (AccuGENE). Amplification generally involved denaturation at 95 °C for 2 min; followed by 40 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 58 °C, and 30 s at 72 °C, with a final elongation step of 2 min at 72 °C.

Additional file 2 Next-generation sequencing

RNA extracted from the serum of one *Rubulavirus*-positive samples was treated with TurboDNase (Life technologies) and then retrotranscribed into cDNA using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen Inc.) and random hexamer primers. The cDNA was amplified based on Phi29 polymerase as previously described (Berthet *et al*., 2008). An amount of 500 ng was used for High throughput Sequencing. A barcoded library was prepared using the Ion Xpress Plus gDNA and Amplicon Library Preparation kit (Life Technologies). Amplified DNA was shared with Ultrasonicator and to a size of about ~350 bp E-gel size selection followed by 8 cycles of PCR amplification. The library was clonally amplified using the Ion OneTouch 200 Template Kit v2 (Life Technologies). Sequencing was performed with Ion Torrent PGM (Life Technologies) on an Ion 316 chip using the Ion PGM 300 Sequencing Kit as recommended by the manufacturer. A total of 5,034,817 reads were obtained for this sample. All reads were filtered according to quality, and those corresponding to the human genome sequence were filtered by mapping on the Homo sapiens hg19 sequence using Bowtie 2.0 software. The viral reads corresponding to the mumps genome were selected by a similarity approach with BLASTN search tools. ABYSS and CAP3 were used for *de novo* assembly in order to obtain the full-length viral genome.

References

Berthet N, Reinhardt AK, Leclercq I, van Ooyen S, Batéjat C, Dickinson P, Stamboliyska R, Old IG, Kong KA, Dacheux L, Bourhy H, Kennedy GC, Korfhage C, Cole ST, Manuguerra JC (2008) Phi29 polymerase based random amplification of viral RNA as an alternative to random RT-PCR. BMC Mol Biol 9:77. doi: 10.1186/1471-2199-9-77.

Conclusions Générales et Perspectives

A) Paludisme

Le diagnostic de l'infection plasmodiale reste essentiel pour la prise en charge efficace du paludisme. Actuellement les ISM à *P. falciparum* prennent de l'ampleur au fur et à mesure que la charge parasitaire diminue dans les populations grâce à l'application des nouvelles stratégies de lutte contre la maladie. D'où la nécessité de développer d'autres outils diagnostiques adaptés à la détection de ces ISM autre que la PCR pour une prise en charge globale et correcte du paludisme. Notre travail a permis de déterminer dans un premier temps la prévalence réelle de l'infection à *P. falciparum* chez les personnes fébriles et d'analyser le lien entre ISM et paludisme sévère. Nos résultats montrent une prévalence moyenne de 18,71% d'ISM à *P. falciparum* chez les enfants fébriles. Nous avons également montré que 22,85% d'enfants porteurs d'ISM à *P. falciparum* présentaient des manifestations neurologiques (prostration) accompagnées d'une thrombopénie. Par ailleurs parmi les signes cliniques observés dans les cas de paludisme sévère, l'anémie venait en première position suivie de la prostration et de l'ictère. Sur un autre plan, la thrombopénie est considérée comme un critère secondaire de sévérité du paludisme d'après l'OMS. Dans notre étude cette thrombopénie est le principal état clinique relevé chez l'ensemble des enfants ayant une ISM

à *P. falciparum*. Enfin, un cas de coinfection *P. falciparum* et virus Mumps responsable des oreillons a été diagnostiqué. L'ensemble de ces résultats montre l'intérêt de diagnostiquer les infections submicroscopiques à *P. falciparum* pour une prise en charge efficiente de la maladie. Ainsi ce travail permet de développer deux types de projets de recherche.

1) Mécanismes physiopathologiques :

Les raisons pour lesquelles certains individus non immuns infectés par *P. falciparum*, développent un accès sévère et meurent tandis que d'autres ne développent que la forme simple, voire même la forme asymptomatique, reste encore mal connues (18). En dépit de nombreux travaux scientifiques et cliniques entrepris, les mécanismes physiopathologiques entraînant les formes sévères restent encore non élucidés. Plusieurs études ont démontré l'implication de la séquestration des globules rouges parasités (GRP) par *P. falciparum* dans les organes essentiels tels que le cerveau et les poumons (19). Cette séquestration est principalement caractérisée par l'adhérence ou cytoadhérence des GRP, l'agglutination et la formation de rosettes. L'adhésion des GRP au niveau des cellules endothéliales (CE) des capillaires du cerveau et des poumons peut obstruer la micro-vascularisation et aussi induire la surexpression des cytokines proinflammatoires (20, 21) et l'apoptose des CE (22, 23, 24). Cette apoptose des CE est

associée aux signes neurologiques, les isolats plasmodiaux apoptogéniques se rencontrent plus fréquemment chez les enfants avec signes neurologiques (prostration ou coma) (23).

Comment les ISM à *P. falciparum* peuvent-ils être associés au paludisme sévère? L'hypothèse la plus vraisemblable est que ces isolats ISM expriment soit des adhésines leur conférant une bonne capacité à cyto-adhérer soit des antigènes apoptogéniques induisant l'apoptose de la CE ou même des antigènes de **rhoptries** impliqués dans la destruction des hématies comme PfRAP2 (25). En faveur de cette hypothèse il est démontré que le paludisme sévère est associé à l'expression par les isolats de *P. falciparum* de certains types d'antigènes de surface (VSA) (26). D'autre part, les isolats plasmodiaux exprimant les antigènes PALPF sont capables d'induire l'apoptose de la CE à l'origine des dommages de la barrière hémato

-méningée au cours du paludisme (27, 23). Dans cette étude, les deux tiers des patients ISM atteints de paludisme sévère ont une anémie. Cela peut paraître surprenant puisque la charge parasitaire chez les ISM est généralement faible du moins au niveau périphérique. Par ailleurs si la charge parasitaire élevée est nécessaire pour le déclenchement de l'anémie sévère palustre, la réponse de l'hôte contre l'infection reste essentielle pour le développement de la maladie (28). En d'autre terme, la charge parasitaire n'est pas anodine au cours de l'anémie, en

fait, le parasite reste le premier stimulus de la réponse de l'hôte qui régule la maladie. Évidemment, les ISM et les hyper parasitémies tous deux induisent la prolifération intracellulaire du parasite conduisant à la destruction des hématies et l'anémie.

Enfin, cette hypothèse peut être vérifiée en développant des projets de recherche visant à déterminer les différents phénotypes parasitaires.

2) Surveillance et développement des outils épidémiologiques :

- Diagnostic : Notre travail montre la nécessité de développer les TDR de seconde génération ayant une sensibilité proche de celle de la PCR pour permettre le diagnostic des ISM notamment chez les personnes fébriles.

- Amélioration des stratégies de lutte contre le paludisme : Si on veut réaliser le traitement intermittent préventif, on doit tenir compte de ces résultats notamment lors du choix de la période à laquelle les traitements doivent être administrés à la population. Par exemple dans cette étude les pics de l'infection palustre (patente et ISM) ont été observés au début et à la fin des saisons de pluies.

B) Oreillons et rougeole

Les oreillons et la rougeole ont été les deux affections virales rencontrées au cours de cette étude et constituent également la deuxième cause des fièvres chez l'enfant après le paludisme. L'étude a permis la mise en évidence de quelques cas d'oreillons et d'un cas avéré de rougeole à Franceville. Nous avons par la suite identifié le virus *Mumps* (MuV/Gabon) responsable de ces oreillons et déterminé la séquence complète de son génome. C'est la première fois qu'on séquence le génome entier d'un virus *Mumps* circulant en Afrique Subsaharienne et décrit son organisation moléculaire. Nous avons aussi développé un outil de génotypage des virus *Mumps* et cela a permis de classer cette souche MuV /Gabon dans le génotype G et très proche des souches responsables des épidémies aux Etats Unis et en Europe. Enfin, nous avons montré que la souche *Measles* virus responsable du seul cas avéré de rougeole à Franceville était identique à celle qui était à l'origine de l'épidémie de Libreville et ce travail va permettre la rédaction d'un article sous le titre : *Measles outbreak in Gabon in 2013, Central Africa*. L'ensemble de ces résultats suggère que ces maladies transmissibles peuvent non seulement se répandre sur le territoire national mais aussi être importées par le flux migratoire (mouvement des populations). Ils montrent également l'intérêt des marqueurs génétiques dans la surveillance des *Paramyxovirus* et la nécessité d'introduire les

oreillons dans la liste des maladies infectieuses à surveiller au Gabon.

Au regard de ce travail, un projet de recherche sur le génotypage des *Paramyxovirus* et un autre sur les infections concomitantes *P. falciparum* et *Paramyxovirus* peuvent-être initiés afin d'améliorer davantage la surveillance épidémiologique.

Annexe

Complete genome sequence of Mumps virus genotype G from vaccinated child in Franceville, south-eastern Gabon in 2013

Gaël D. Maganga[1]☛#, Berthe A. Iroungou[2,3]☛,
Christine Bole-Feysot[4], Eric M. Leroy[1,5] Fousseyni.
S Touré Ndouo[2] and Nicolas Berthet[1,6]

[1] Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Département Zoonose et Maladies Emergentes, Franceville, Gabon ;

[2] Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Unité de Recherche et d'Analyse Médicale, Franceville, Gabon ;

[3] Aix Marseille University, URMITE unit, Marseille ;

[4] Imagine, Institut des maladies génétiques - Plateforme Génomique, Hôpital Necker - Enfants Malades, 149 rue de Sèvres - 75743 PARIS cedex 15 ;

[5] Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR 224 (MIVEGEC (Laboratoire Maladies Infectieuses et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle), IRD/CNRS/UM1/UM2, Montpellier, France ;

[6] Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 3569, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, France

☛ These authors contributed equally to this work.

Running title: Complete sequence of genotype G Mumps virus from Gabon

[#] Corresponding author: Dr Gael D. Maganga
(e-mail:gael_maganga@yahoo.fr)
Tel: +241 07 11 76 25

Revised in Genome Announcement (genome A00972-14)

Abstract

The genome of mumps virus (MuV), a member of the family *Paramyxoviridae* of the genus *Rubulavirus*, consists of a single-stranded, negative-sense, non-segmented RNA. Here, we report the first whole-genome sequence of 15,263 nucleotides of Mumps virus strain from a vaccinated young boy of 6 years old in Franceville, south-eastern Gabon.

Genome Announcement

Mumps is a common and highly contagious viral disease characterized mainly by fever and parotitis. Although mumps infections are benign and usually not fatal, it can cause some complications including aseptic meningitis, orchitis, pancreatitis, encephalitis, epididymitis and deafness (1). The mumps virus (MuV) (order *Mononegavirales*, family *Paramyxoviridae*, genus *Rubulavirus*) genome encodes for seven proteins: nucleocapsid (N), phospho (P), matrix (M), fusion (F), small hydrophobic (SH), hemagglutinin-neuraminidase (HN), and large (L) proteins. Based on sequential analysis of the gene encoding the SH gene12 distinct genotypes (A to L) of MuV has recognized by the World Health Organization (WHO) (2). Through vaccination, the disease had almost entirely disappeared even if it has been observed that MuV cases can occur in highly vaccinated populations (3,4,5). In 2000 and 2010, 934 cases and one case of mumps have been reported respectively in Gabon (6). Here, we report the first whole-genome sequence of MuV strain from a young boy of 6 years old in Franceville, south-eastern Gabon, in 2013. Viral RNA was extracted from the serum on a BioRobot EZ1 automat (Qiagen) using the EZ1 Virus Mini Kit version 2.0 according to the manufacturer's instructions. RNA was retro-transcribed using SuperScript III enzyme prior an amplification using Phi29 enzyme as described previously (7).

A barcoded library was prepared from 500 ng of amplified DNA using the Ion Xpress Plus gDNA and Amplicon Library Preparation kit. Sequencing was performed on an Ion 316 chip using the Ion PGM 300 Sequencing Kit as recommended by the manufacturer. A total of 5,034,817 reads were obtained and were filtered according to quality, and those corresponding to the human genome sequence were filtered by mapping on the *homo sapiens* hg 19 sequence using Bowtie 2.0 software. The viral reads corresponding to the mumps genome were selected and assembled using ABYSS and CAP3 in order to obtain the full-length genome. Our MuV genome is constituted of 15,263 nucleotides and genomic analysis showed the classical

organization of *Paramyxoviridae*, with seven transcription units encoding seven genes and two non-encoding regions located at the 5' and 3' ends of the genome. Although many cases of mumps were reported to WHO in several African countries, the circulating genotypes were rarely known. The genotype of this Gabonese MuV strain was determined based on phylogenetic analysis of the partial sequence of 316-nucleotides of the SH gene compared to the sequences available in the databases. Our strain had 97% amino acid identity with sequences belonging to genotype G strains and showed the highest amino acid identity with strain (accession number EU606261) circulating in United Kingdom in 2005. In these cases reported in Franceville, MuV was mainly detected in children who had received two doses of measles-mumps-

rubella vaccine. Introduction of MuV genotype G in Gabon would be due to a decrease in immunization coverage in children under one year old based on data available for the measles vaccine (8).

Nucleotide sequence accession number

This Whole Genome Shotgun project has been deposited in DDBJ/ENA GenBank under the accession number KJ810514.

Acknowledgments

CIRMF is supported by the Government of Gabon, Total-Fina-Elf Gabon, and the French *Ministère des Affaires Etrangères et Européennes*. The funders had no role in study design, data analysis or preparation of the manuscript.

References

1. **Leinikki P**. 1995. Mumps. John Wiley & Sons Ltd., 3rd ed, New York, NY.

2. **Dayan GH, Quinlisk MP, Parker AA, Barskey AE, Harris ML, Schwartz JM, Hunt K, Finley CG, Leschinsky DP, O'Keefe AL, Clayton J, Kightlinger LK, Dietle EG, Berg J, Kenyon CL, Goldstein ST, Stokley SK, Redd SB, Rota PA, Rota J, Bi D, Roush SW, Bridges CB, Santibanez TA, Parashar U, Bellini WJ, Seward JF.** 2008**.** Recent resurgence of mumps in the United States. N. Engl. J. Med. **358**:1580–1589.

3. **Whelan J, van Binnendijk R, Greenland K, Fanoy E, Khargi M, Yap K, Boot H, Veltman N, Swaan C, van der Bij A, de Melker H, Hahné S**. 2010. Ongoing mumps outbreak in a student population with high vaccination coverage, Netherlands, 2010. Euro Surveill. **15(17)**: pii=19554.

4. **Dayan GH, Rubin S.** 2008. Mumps outbreaks in vaccinated populations: are available mumps vaccines effective enough to prevent outbreaks? Clin. Infect. Dis. 47:1458–67.

5. **Bitsko RH, Cortese MM, Dayan GH, Rota PA, Lowe L, Iversen SC, Bellini WJ**. 2008. Detection of RNA of mumps virus during an outbreak in a population with a high level of measles, mumps, and rubella vaccine coverage. J. Clin. Microbiol. **46**:1101–3.

6. **WHO**. 2013. **Mumps reported cases**. **WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system 2013 global summary**. Last update: 2013 (data as of 16-Oct-2013)

7. **Berthet N, Reinhardt AK, Leclercq I, van Ooyen S, Batéjat C, Dickinson P, Stamboliyska R, Old IG, Kong KA, Dacheux L, Bourhy H, Kennedy GC, Korfhage C, Cole ST, Manuguerra JC**. 2008. Phi29 polymerase based random amplification of viral RNA as an alternative to random RT-PCR. BMC Mol Biol **9**:77. doi: 10.1186/1471-2199-9-77.

8. **Organisation Mondiale de la Santé**. 2012. Statistiques sanitaires mondiales 2012. Court Consulting, p176.

Références

1. Gaudelus J. Fever in infants under the age of three months without sign of focal infection. Criteria of therapeutic decision. Presse Med. 1994 Apr 30-May 7; 23(17):785-French
2. P Talani, G Samba, G Moyen. *Bull Soc Pathol Exot* 2002.
3. WHO, 2013. Mumps reported cases. WHO vaccine-preventable diseases: monitoring system 2013 global summary. Last update: 20-Oct-2013 (data as of 16-Oct-2013)
4. Guiyedi V, Chanseaud Y, Fesel C, Snounou G, Rousselle JC, Lim P, Koko J, Namane A, Cazenave PA, Kombila M, Pied S._Self-reactivities to the non-erythroid alpha spectrin correlate with cerebral malaria in Gabonese children. PLoS One. 2007 Apr 25;2(4):e389.
5. Asse K.V , Plo K.J. , Yenan J.P. , Akaffou E , Hamien BA , Kouamé M. Pediatric mortality in 2007 and 2008 at the General Hospital of Abobo (Abidjan/ Côte d'Ivoire) mercredi 5 octobre 2011, Tome 16 numéro2 RAMUR
6. Bouyou-Akotet MK, Mawili Mboumba DP, Kendjo E, Mabika-Mamfoumbi M, Ngoungou EB, Dzeing-Ella A, Pemba-Mihindou M, et al. Evidence of decline of malaria in the general hospital of Libreville, Gabon from 2000 to 2008. Malar J. 2009 Dec 17; 8:300. doi: 10.1186/1475-2875-8-300.
7. Bouyou-Akotet MK, Mawili-Mboumba DP, Kendjo E, Eyang Ekouma A, Abdou Raouf O, Engohang Allogho E, Kombila M. Complicated malaria and other severe febrile illness in a pediatric ward in Libreville, Gabon. BMC Infect Dis. 2012 Sep 13; 12:216. doi: 10.1186/1471-2334-12-216

8. Choi KM. Reemergence of mumps.KoreanJPediatr.2010 May; 53(5):6238.doi: 10.3345/kjp.2010.53.5.623.Epub 2010 May 31.

9. Latner DR, McGrew M, Williams N, Lowe L, Werman R, Warnock E, Gallagher K, Doyle P, and al. Enzyme-linked immunospot assay detection of mumps-specific antibody-secreting B cells as an alternative method of laboratory diagnosis. Clin Vaccine Immunol. 2011 Jan; 18(1):35-42. doi: 10.1128/CVI.00284-10. Epub 2010 Nov 3.

10. Moss WJ, Strebel P. Biological feasibility of measles eradication. J Infect Dis. 2011 Jul; 204 Suppl 1:S47-53. doi: 10.1093/infdis/jir065. Review.

11. Grais RF, Dubray C, Gerstl S, Guthmann JP, Djibo A, Nargaye KD, Coker J, Alberti KP, Cochet A, Ihekweazu C, Nathan N, Payne L, Porten K, Sauvageot D, Schimmer B, Fermon F, Burny ME, Hersh BS, Guerin PJ. Unacceptably high mortality related to measles epidemics in Niger, Nigeria, and Chad. PLoS Med. 2007 Jan;4(1):e16

12. Nandy R, Handzel T, Zaneidou M, Biey J, Coddy RZ, Perry R, Strebel P, Cairns L. Case-fatality rate during a measles outbreak in eastern Niger in 2003.Clin Infect Dis. 2006 Feb 1; 42(3):322-8. Epub 2005 Dec 19

13. Sylla EH, Lell B, Kun JF, Kremsner PG. Plasmodium falciparum transmission intensity and infection rates in children in Gabon. Parasitol Res. 2001 Jul; 87(7):530-3.

14. Elissa N, Migot-Nabias F, Luty A, Renaut A, Touré F, Vaillant M, Lawoko M, et al. Relationship between entomological inoculation rate, Plasmodium falciparum prevalence rate, and incidence of malaria attack in rural Gabon. Acta Trop. 2003 Mar; 85(3):355-61.

15. Lekana-Douki JB, Pontarollo J, Zatra R, Toure-Ndouo FS. Paludisme au Gabon résultats d'une étude bioclinique à l'hôpital de l'amitié sino-gabonaise de Franceville. Sante, vol. 21, n8 4, octobre-novembre-décembre 2011.

16. Drexler JF, Corman VM, Müller MA, Maganga GD, Vallo P, Binger T, Gloza-Rausch F, and al. Bats host major mammalian paramyxoviruses. Nat Commun. 2012 Apr 24; 3:796. doi: 10.1038/ncomms1796. Erratum in: Nat Commun. 2014; 5:3032. Cottontail, Veronika M [added]; Knörnschild, Mirjam [added].

17. S Ategbo, EB Ngoungou, J Koko, Y Vierin, C Eyi Nzang Ndong and A Moussavou Mouyama. Etude de la couverture vaccinale chez les enfants de 0 à 5 ans à Libreville (Gabon). Cahiers Santé vol. 20, n°4, octobre-novembre-décembre 2010

18. Marsh K, Marsh VM, Brown J, Whittle HC, Greenwood BM. Plasmodium falciparum: the behavior of clinical isolates in an in vitro model of infected red blood cell sequestration. Exp Parasitol. 1988 Apr;65(2):202-

19. Taylor-Robinson A. In-vitro model offers insight into the pathophysiology of severe malaria. Lancet. 2004 May 22; 363(9422):1661-3. No abstract available.

20. Brown H, Rogerson S, Taylor T, Tembo M, Mwenechanya J, Molyneux M, Turner G.

    Blood-brain barrier functions in cerebral malaria in Malawian children. Am J Trop Med Hyg. 2001 Mar-Apr; 64(3-4):207-13.

21. Wassmer SC, Coltel N, Combes V, Grau GE. Pathogenesis of cerebral malaria: facts and hypotheses. Med Trop. (Mars) 2003; 63(3):254-7. Review. French.

22. Pino P, Vouldoukis I, Dugas N, Hassani-Loppion G, Dugas B, Mazier D. Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Ann N Y Acad Sci. 2003 Dec; 1010:582-6.

23. Touré FS, Ouwe-Missi-Oukem-Boyer O, Bisvigou U, Moussa O, Rogier C, Pino P, Mazier D, et al. Apoptosis: a potential triggering mechanism of neurological manifestation in Plasmodium falciparum malaria. Parasite Immunol. 2008 Jan; 30(1):47-51.

24. Zang-Edou ES, Bisvigou U, Taoufiq Z, Lékoulou F, Lékana-Douki JB, Traoré Y, Mazier D, Touré-Ndouo FS. Inhibition of Plasmodium falciparum field isolates-mediated endothelial cell apoptosis by Fasudil: therapeutic implications for severe malaria. PLoS One. 2010 Oct 7; 5(10):e13221. doi: 10.1371/journal.pone.0013221.

25. Lekana Douki JB, Traore B, Costa FT, Fusaï T, Pouvelle B, Sterkers Y, Scherf A, and Gysin J. Sequestration of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to chondroitin sulfate A, a receptor for maternal malaria: monoclonal antibodies against the native parasite ligand reveal pan-reactive epitopes in placental isolates. Blood. 2002 Aug 15; 100(4):1478-83.

26. Kaestli M, Cockburn IA, Cortés A, Baea K, Rowe JA, Beck HP. Virulence of malaria is associated with differential expression of Plasmodium falciparum var gene subgroups in a case-control study. J Infect Dis. 2006 Jun 1; 193(11):1567-74. Epub 2006 Apr 20.

27. Siau A, Toure FS, Ouwe-Missi-Oukem-Boyer O, Ciceron L, Mahmoudi N, Vaquero C, Froissard P, et al. Whole-transcriptome analysis of Plasmodium falciparum field isolates: identification of new pathogenicity factors. J Infect Dis. 2007 Dec 1; 196(11):1603-12. Epub 2007 Oct 25.

28. Kitua AY, ISMth TA, Alonso PL, Urassa H, Masanja H, Kimario J, Tanner M. The role of low level Plasmodium falciparum parasitaemia in anaemia among infants living in an area of intense and perennial transmission. Trop Med Int Health. 1997 Apr; 2(4):

RESUME

Le syndrome fébrile, une des principales causes de consultation dans les services de pédiatrie en Afrique Subsaharienne, reste dans la majorité des cas liée à une maladie infectieuse (parasitaire, virale, bactérienne). Dans cette thèse, nous avons identifié les agents infectieux non bactériens responsables de la survenue des fièvres chez l'enfant afin de développer des outils moléculaires permettant l'amélioration de la surveillance épidémiologique. Pour ce faire, ce travail est divisé en 2 parties essentielles.

Dans la première partie une étude transversale a été réalisée de 2011 à 2012 à l'Hôpital de l'Amitié Sino-gabonaise (HASG) et au Centre Hospitalier Régional Amissa Bongo (CHRAB) de Franceville pour analyser l'infection plasmodiale dans une population d'adultes et d'enfants fébriles par microscopie et PCR. Au total sur 595 patients enrôlés, la prévalence de l'infection plasmodiale patente était de 23 % en moyenne. A l'opposé, les infections submicroscopiques à *P. falciparum* (ISM) se rencontraient dans 9 % des cas, avec une prévalence élevée au début et à la fin des saisons de pluies.

Dans la deuxième partie une autre enquête transversale a été conduite de janvier à mars 2013 à l'HASG pour déterminer les principales causes étiologiques des fièvres non bactériennes chez l'enfant. Sur 203 enfants recrutés, 111 ont été diagnostiqués positifs à *P. falciparum*, 73 (35,9 %) par microscopie et 38 (18,71 %) par PCR (ISM) avec une prévalence globale de 54,68 %. Selon les critères de l'OMS, 35 enfants (31,53 %) ont montré un tableau clinique de paludisme sévère (27 infections patentes et 8 ISM). Cliniquement, ces cas de paludisme sévère étaient principalement composés de 85,71 % de patients anémiques (30 / 35), 71,14 % de personnes prostrées (25 / 35) et 57,14 % d'enfants atteints d'ictère clinique (20 / 35). Toutefois, seuls 2 cas d'anémie sévère ont été observés, les autres cas restants étaient modérés (10) ou légers (18). Plus intéressant, 8 ISM (22,85 %) ont été trouvés avec des manifestations neurologiques (prostration) accompagnées d'une thrombopénie. Concomitamment, 15 et 12 cas cliniques d'oreillons et de rougeole ont été observés respectivement sur les 203 enfants fébriles. L'ARN du virus Mumps de l'oreillon a été détecté par hnRT-PCR dans le sérum et le crachat des patients 14 et 15 respectivement. Le génome complet de la souche isolée du patient 15 a été séquencé et compte 15263 nucléotides. Ainsi, des amorces spécifiques ont été dessinées pour amplifier le gène codant pour la nucléocapside (N) par RT-PCR et utilisé comme outil de typage. Au total, le gène N a été détecté chez 4 patients (2 sérums, patient 11 et 14 et 2 crachats, patient 10 et 15). L'analyse phylogénique de ces souches, basée sur les gènes N et SH (small hydrophobic), a montré qu'il s'agit en fait d'une seule et même souche virale MuV Gabon appartenant au génotype G et présentant une très grande homologie avec les souches responsables des épidémies aux Etats Unis et en Europe suggérant une possible importation. Enfin, le virus responsable de la rougeole (Measles virus) a été détecté par PCR chez 1 patient sur 12. Le génotypage a révélé que cette souche était identique à celle qui était à l'origine de l'épidémie de Libreville en mars de la même année.

En conclusion, le syndrome fébrile chez l'enfant à Franceville est essentiellement dû aux infections à P. falciparum et Paramyxovirus. Ces résultats montrent que les infections submicroscopiques à *P. falciparum* peuvent non seulement servir de réservoir mais aussi initier une symptomatologie sévère chez l'enfant. Ils suggèrent également l'intérêt des typages moléculaires des souches virales dans la prise en charge et / ou le développement des stratégies de contrôle des Paramyxovirus.

SUMMARY

Febrile syndrome, the main cause of consultation in pediatric wards from Sub-Saharan Africa remains in great majority associated with infectious diseases (parasites, viruses, bacteria). In this thesis, we identified the infectious agents associated with childhood fever in order to develop suitable molecular tools allowing the epidemiological surveillance. This work is divided into two main parts.

Firstly, we analyzed the prevalence of Plasmodium infection in febrile patients (children and adults) of Franceville by combined microscopy and PCR to determine the rate of *P. falciparum* submicroscopic infection (SMI). Indeed, a cross-sectional study was conducted from 2011 to 2012 in "Hopital de l'Amitié Sinogabonaise" (HASG) and the "Centre Hospitalier Régional Amissa Bongo (CHRAB) of Franceville, southeastern Gabon. Five hundred ninety five (595) patients were enrolled. Overall, the prevalence of Plasmodium infection detected by microcopy was 23% on average. In contrast, 9% of SMI cases were observed with a high prevalence at the beginning and the end of the rainy seasons.

Secondly, another cross-sectional survey was conducted at pediatric ward of HASG in which the main etiological causes of febrile illness in children were investigated. Of 203 children recruited, 111 were diagnosed positive for *P. falciparum*, 73 (35.9%) by microscopy and 38 (18.71%) by PCR (SMI) with an overall prevalence of 54.68%. According to WHO criteria, 35 (31.53%) children showed a clinical picture of severe malaria (27 ME+ and 8 SMI). Clinically, these cases of severe malaria were mainly composed of 85.71% of patients with anaemia (30/35), 71.14% of prostrated individuals (25/35) and 57.14% of children with clinical jaundice (20/35). However, only two cases of severe anaemia were observed, the other remaining cases were moderate (10) or mild (18). More interestingly, 8 SMI (22,85%) were found with neurological manifestations (prostration) and all had thrombocytopenia. These results show that SMI, if not detected and treated, can be a reservoir and/or initiate severe malaria in childhood. Concomitantly, 15 and 12 clinical cases of Mumps and Measles viruses were diagnosed respectively. Mumps virus RNA has been detected by hnRT-PCR in serum and oral swab of patient 14 and 15 respectively. The whole genome of mump strain isolated from oral swab of the patient 15 has been sequenced and composed of 15,263 nucleotides. Indeed, specific primers have been designed to amplify the nucleocapsid (N) gene by RT-PCR and used for genotype determination. Overall, the N gene has been successful detected in 4 patients (2 sera, patient 11 and 14 and 2 oral swabs, patient 10 and 15). Phylogenetic analysis using N and small hydrophobic (SH) genes showed that these strains are the same (MuV/Gabon) and clustered with genotype G strains. Moreover, this MuV/Gabon shows a highly amino acid identity (99%) with the mumps strains which have been associated with several epidemic outbreaks from USA and Europe suggesting a possible importation. Finally, Measles virus has been diagnosed by PCR in 1 patient out of 12. Genetic analysis revealed 100% identity with the strain associated with the outbreak of Libreville in March of the same year.

In conclusion, febrile syndrome in childhood at Franceville is essentially caused by *P. falciparum* and Paramyxovirus infections. These results show that submicroscopic infection of P. falciparum can serve as a reservoir and also able to initiate a severe symptomatology in children. They also suggest the usefulness of circulating viruses' genotyping tools in the management and/or the development of Paramyxoviruses control strategies.