

MEMOIRE

DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES

de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu le 30 septembre 2020

par M JOSTE Valentin

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de :

THESE

POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

***Plasmodium ovale wallikeri et Plasmodium ovale curtisi* : du développement
d'une méthode de différenciation à l'analyse rétrospective des cas du Centre
National de Référence du Paludisme, période 2013-2018**

JURY

Président : Pr Sandrine Houzé

**Membres : Pr Olivier Bouchaud
Dr Jérôme Clain
Dr Didier Ménard
Dr Marc Thellier**

Remerciements

Je tiens tout particulièrement à remercier le Pr Sandrine Houzé qui m'a encadré dans la conception et la réalisation de ce projet et qui m'a guidé tout au long de mon internat.

Je souhaite également remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

Je n'oublie évidemment pas les différentes personnes du Centre National de Référence du Paludisme avec qui j'ai travaillé ces dernières années : Nicolas Argy, Justine Bailly, Liliane Cicéron, Sandrine Cojean, Véronique Hubert, Claire Kamaliddin, Eric Kendjo, Bruno Pradines Marc Thellier et Rizwana Zaffaroullah.

Enfin, un grand merci à ma famille et mes amis.

Sommaire

I. Rappels bibliographiques.....	- 5 -
1. Le paludisme, du parasite à la pathologie.....	- 5 -
a. Un parasite complexe	- 5 -
b. Le paludisme, une maladie grave, fréquente et mondiale.....	- 12 -
2. Prévention, diagnostic et prise en charge d'un accès palustre	- 18 -
a. Prophylaxie de l'accès palustre	- 18 -
b. Méthodes du diagnostic parasitologique du paludisme	- 19 -
c. Prise en charge thérapeutique d'un accès palustre	- 24 -
3. <i>Plasmodium ovale</i> spp, un parasite à ne pas négliger	- 25 -
a. Généralités.....	- 25 -
b. Une espèce négligée	- 26 -
c. Rationnel de la division de <i>Plasmodium ovale</i> spp	- 26 -
d. Comment différencier les deux espèces ?.....	- 28 -
4. Que sait-on des différences entre <i>Plasmodium ovale curtisi</i> et <i>walikeri</i> ?	- 31 -
a. Répartition géographique	- 31 -
b. Paramètres biologiques et cliniques	- 32 -
c. Et sur les reviviscences ?.....	- 33 -
5. Le Centre National de Référence du Paludisme	- 35 -
II. Travail personnel : étude des accès importés à <i>P. ovale</i> spp entre 2013 et 2018 .	- 36 -
1. Problématique.....	- 36 -
2. Matériels et méthodes	- 37 -
a. Mise au point de la qPCR-HRM	- 37 -
b. Analyse rétrospective des cas de <i>Plasmodium ovale</i> spp du CNRP	- 42 -
c. Séquençage et analyse du gène <i>potra</i>	- 45 -
d. Analyses statistiques	- 46 -
3. Résultats.....	- 46 -
a. Validation de la qPCR-HRM	- 47 -
b. Rationnel utilisé dans l'étude	- 52 -
c. Analyse des accès palustres à <i>Plasmodium ovale walikeri</i> et <i>curtisi</i>	- 54 -
d. Séquençage du gène <i>potra</i>	- 65 -
4. Discussion	- 66 -
Bibliographie	- 80 -
Publications	- 91 -
Article n°1 :	- 91 -
Article n°2	- 99 -

Index des figures

Figure 1 – Structure des <i>Apicomplexa</i>	- 5 -
Figure 2 – Illustrations des formes infectieuses responsables du paludisme faites par le Dr Laveran.....	- 7 -
Figure 3 – Cycle parasitaire de <i>Plasmodium</i> spp chez le moustique (hôte définitif) et l’homme (hôte intermédiaire).....	- 8 -
Figure 4 – Développement intra-érythrocytaire de <i>Plasmodium ovale</i> spp.....	- 9 -
Figure 5 – Représentation schématique d’un accès de reviviscence.	- 10 -
Figure 6 – Arbre phylogénétique de 17 espèces de <i>Plasmodium</i>	- 11 -
Figure 7 – Mécanismes responsables de la fièvre lors d’un accès palustre.	- 12 -
Figure 8 – Distribution du déficit en G6PD dans les pays situés en zone d’endémie palustre.....	- 14 -
Figure 9 – Incidence du paludisme dans les pays ayant une transmission autochtone, toutes espèces confondues.....	- 15 -
Figure 10 – Évolution du nombre de cas de paludisme estimés et observés en France métropolitaine de 1996 à 2016.....	- 16 -
Figure 11 – Évolution du profil épidémiologique des patients infectés entre 1996 et 2016.	- 17 -
Figure 12 – Pourcentage de formes graves de paludisme dans le paludisme d’importation en France entre 1996 et 2016.	- 18 -
Figure 13 – Artéfacts de la goutte épaisse.	- 19 -
Figure 14 – Artéfacts du frottis sanguin mince.....	- 20 -
Figure 15 – Principe d’un test immunochromatographique.	- 21 -
Figure 16 – Exemple d’interprétation des TDRs dans la détection des infections à <i>Plasmodium falciparum</i> et non <i>falciparum</i>	- 22 -
Figure 17 – Logigramme du diagnostic biologique du paludisme selon les recommandations 2017 éditées par la SPILF.....	- 24 -
Figure 18 – Mécanisme d’action de la primaquine.....	- 25 -
Figure 19 – Spéciation allopatrique.	- 28 -
Figure 20 – Alignements de séquences du gène de l’ARNr 18S.....	- 30 -
Figure 21 – Alignement des séquences du gène <i>pgs377</i> chez différentes espèces de <i>Plasmodium</i>	- 32 -
Figure 22 – Courbe de Kaplan-Meier représentant, en semaines, la probabilité de reviviscence pour <i>Plasmodium ovale curtisi</i>	- 34 -
Figure 23 – Alignement des séquences du gène <i>potra</i> chez <i>Plasmodium ovale curtisi</i> et <i>Plasmodium ovale wallikeri</i>	- 35 -
Figure 24 – Principe de la mesure du Tm.	- 37 -
Figure 25 – Exemple d’analyse de courbes de fusion.....	- 38 -
Figure 26 – Tailles des bandes attendues pour la PCR amplifiant le gène <i>potra</i> pour <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> et <i>Plasmodium ovale curtisi</i>	- 45 -
Figure 27 – Alignements des séquences du gène de l’ARNr 18S du chromosome 2 de <i>Plasmodium ovale curtisi</i> et du chromosome 10 de <i>Plasmodium ovale wallikeri</i>	- 47 -
Figure 28 – Alignement des séquences du gène de l’ARNr 18S du chromosome 5 de <i>Plasmodium ovale curtisi</i> et <i>Plasmodium ovale wallikeri</i>	- 48 -
Figure 29 – Prédiction in silico des Tm des séquence de l’ARNr 18S du chromosome 10 de <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> et du chromosome 2 de <i>Plasmodium ovale curtisi</i>	- 48 -
Figure 30 – Profil de <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> (en orange) et <i>Plasmodium ovale curtisi</i> (en bleu) en analyse de courbe de fusion.	- 50 -
Figure 31 – Distribution de la valeur des Tm pour <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> et <i>Plasmodium ovale curtisi</i>	- 51 -
Figure 32 – Représentation du $\Delta(Tm_2-Tm_1)$ pour <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> et <i>Plasmodium ovale curtisi</i>	- 52 -
Figure 33 – Représentation de la distribution des Tm.	- 53 -

Figure 34 – Représentation schématique du rationnel utilisé pour différencier <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> et <i>Plasmodium ovale curtisi</i>	- 53 -
Figure 35 – Résumé de l’inclusion des infections à <i>Plasmodium ovale</i> spp.	- 54 -
Figure 36 – Répartition des cas de <i>Plasmodium ovale curtisi</i> et <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> selon l’année (A) ou le mois cumulé d’inclusion (B).	- 54 -
Figure 37 – Répartition des cas de <i>Plasmodium ovale</i> spp en France métropolitaine selon le centre hospitalier déclarant.....	- 55 -
Figure 38 – Pyramide des âges de la cohorte.....	- 56 -
Figure 39 – Lieux de contamination des accès palustres à <i>Plasmodium ovale</i> spp importés en France métropolitaine durant la période 2013-2018.....	- 57 -
Figure 40 – Comparaison des densités parasitaires des infections avec TDR positif ou négatif.....	- 59 -
Figure 41 – Comparaison des densités parasitaires des TDRs positifs et négatifs Vikia® et Binax Now®....	- 59 -
Figure 42 – Concentration sanguine en hémoglobine chez l’homme (à gauche) ou la femme (à droite) de plus de 15 ans.....	- 61 -
Figure 43 – Délai de latence selon la saison.	- 62 -
Figure 44 – Impact des nouvelles recommandations de la SPILF éditées en 2017 sur la prise en charge thérapeutique des infections à <i>Plasmodium ovale</i> spp.....	- 63 -
Figure 45 – Situation des centres hospitaliers ayant hospitalisé des patients infectés par <i>Plasmodium ovale</i> spp en USI/USC.....	- 64 -
Figure 46 – Analyse de l’ « effet-centre »	- 64 -
Figure 47 – Alignement des séquences d’acides aminés de la protéine potra.	- 66 -
Figure 48 – Comparaison de la mortalité attribuée au paludisme par l’OMS (en bleu) et celle des auteurs de l’étude (en rouge).....	- 66 -
Figure 49 – Principe du protocole MAAB.....	- 69 -
Figure 50 – Principe de la cold-PCR.	- 70 -
Figure 51 – Répartition géographique des cas de <i>Plasmodium ovale</i> spp en Afrique.....	- 72 -
Figure 52 – Récapitulatif des données expliquant la prédominance du traitement par CTA chez <i>Plasmodium ovale wallikeri</i>	- 74 -
Figure 53 – Alignement d’une séquence de pLDH de chaque espèce.....	- 76 -
Figure 54 – Méthodologie envisagée pour le développement de la méthode de typage par analyse de microsatellites.	- 78 -
Figure 55 – Principe du multiple displacement amplification.	- 79 -

Index des tableaux

Tableau 1 – Répartition géographique de l’origine des cas recensés de <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> et <i>Plasmodium ovale curtisi</i> dans la littérature.....	- 31 -
Tableau 2 – Valeur des Tm obtenus en qPCR-HRM.	- 49 -
Tableau 3 – Comparaison des résultats obtenus en qPCR-HRM et qPCR-Taqman.	- 50 -
Tableau 4 – Caractéristiques démographiques et épidémiologiques des patients infectés par <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> et <i>Plasmodium ovale curtisi</i>	- 56 -
Tableau 5 – Comparaison de l’efficacité des TDR détectant l’aldolase ou la pLDH dans le diagnostic de <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> et <i>Plasmodium ovale curtisi</i>	- 58 -
Tableau 6 – Caractéristiques biologiques et cliniques des accès palustres à <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> et <i>Plasmodium ovale curtisi</i>	- 60 -
Tableau 7 – Génotypes obtenus pour le gène <i>potra</i> de <i>Plasmodium ovale wallikeri</i> et <i>Plasmodium ovale curtisi</i>	- 65 -

Liste des abbréviations

Ac = Anticorps
ADN = Acide DésoxyriboNucléique
APHP = Assistance Publique des Hôpitaux de Paris
ARN = Acide RiboNucléique
CNRP = Centre National de Référence du Paludisme
CTA = Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine
DES = Diplôme d'Etudes Spécialisées
EDTA = Ethylènediaminetétraaétique
ELISA = Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
G6PD = Glucose-6 Phosphate Déshydrogénase
GB = Globule Blanc
HRM = High Resolution Melting
HRP2 = Histidin-Rich Protein 2
JC = Jésus-Christ
LAMP = *Loop-mediated isothermal amplification*
LDH = Lactate DesHydrogénase
MAAB = Mutant Allele Amplification Bias
NA = Non Attribué
NCBI = National Center for Biotechnology Information
NFS = Numération Formule Sanguine
OMS = Organisation Mondiale de la Santé
p/μL = parasites/μL
PCR = Polymerase Chain Reaction
Poc = *Plasmodium ovale curtisi*
porbp2 = *Plasmodium ovale* reticulocyte binding protein 2
potra = *Plasmodium ovale* tryptophan-rich antigen
Pow = *Plasmodium ovale wallikeri*
QBC = Quantitative Buffy Coat
qPCR = Quantitative Polymerase Chain Reaction
SNP = Small Nucleotide Polymorphism
SPILF = Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française
TDR = Test de Diagnostic Rapide
Tm = Température de fusion
USC = Unité de Soins Continus
USI = Unité de Soins Intensifs
VPN = Valeur Prédictive Négative

Ce mémoire de diplôme d'études spécialisées (DES) en biologie médicale est divisé en deux parties principales.

La première partie, bibliographique, débute par des généralités sur le paludisme et expose les moyens de prophylaxie ainsi que les différentes méthodes de diagnostic et les traitements utilisés. Les rappels bibliographiques se focalisent ensuite sur *Plasmodium ovale* spp.

La seconde partie de ce mémoire présente les différents travaux réalisés. Elle commence par le développement de la méthode permettant la différenciation de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*. Ensuite, l'analyse des caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques de 677 accès palustres à *Plasmodium ovale* spp est présentée. Enfin, elle se termine par la description et l'analyse du séquençage du gène *potra* et son intérêt dans le typage génétique des isolats de *Plasmodium ovale* spp.

I. Rappels bibliographiques

1. Le paludisme, du parasite à la pathologie

a. Un parasite complexe

i. Aspects phylogénétiques et historiques

Le paludisme est une maladie parasitaire vectorielle. Elle est causée par un parasite du genre *Plasmodium*, organisme eucaryote du taxon *Apicomplexa* (figure 1).

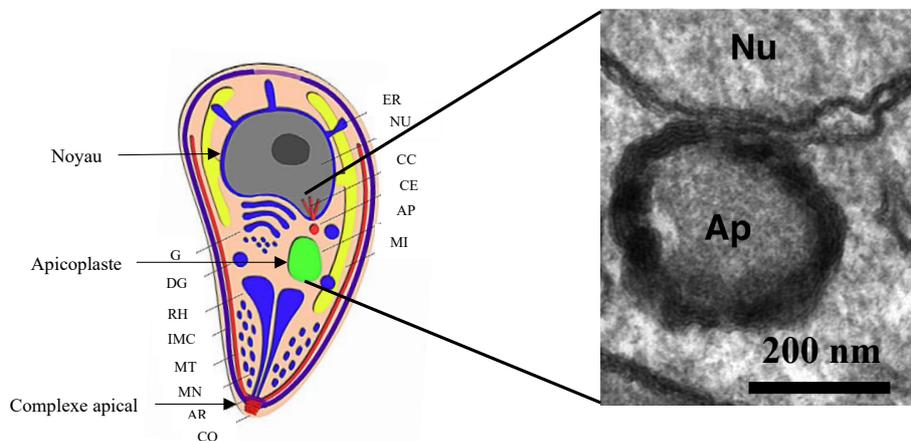


Figure 1 – Structure des Apicomplexa.

A gauche : schéma de la structure générale des Apicomplexa. Est indiqué en vert l'apicoplaste, organelle spécifique de cet embranchement. Issu de Striepen *et al*, Plos Pathogens 2007 (1). A droite : Coupe transversale en microscopie électronique à transmission de l'apicoplaste de *Plasmodium* dans un globule rouge. La barre latérale indique 200 nm. Ap : Apicoplaste ; Nu : nucleus. Issu de McFadden I *et al*, International Journal of Parasitology 2016 (2).

Cette famille regroupe des organismes unicellulaires, qui ont pour caractéristique commune d'être des parasites intracellulaires obligatoires. D'un point de vue morphologique, ils sont caractérisés par la présence d'un complexe apical, nécessaire pour l'invasion de la cellule hôte.

En plus de *Plasmodium*, on compte 5 membres de ce taxon responsables de pathologies chez l'humain : *Babesia*, responsable de la babésiose ; *Cryptosporidium parvum*, responsable de la cryptosporidiose ; *Cyclospora cayetanensis*, responsable de la cyclospore ; *Toxoplasma gondii*, responsable de la toxoplasmose et *Cytoisospora belli*, responsable de l'isosporose.

Certains apicomplexes, dont *Plasmodium*, sont pourvus d'un organite unique appelé apicoplaste. Cet organite intracellulaire possède 4 membranes superposées et abrite des réactions métaboliques importantes telles que la synthèse d'acides gras ou une partie de la dégradation de l'hème (3). Au total, plus de 500 espèces de *Plasmodium* sont décrites. Ils peuvent notamment infecter les mammifères, dont l'homme, et les oiseaux (4,5).

Les références au paludisme, autrefois appelé « fièvre des marais » sont anciennes. En effet, des manuscrits chinois datant de 2700 avant Jésus-Christ (JC) font référence à des symptômes semblables à ceux de la maladie (6). L'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) de *Plasmodium falciparum*, retrouvé dans la momie de Toutânkhamon (décédé en 1327 avant JC), constitue la preuve matérielle la plus ancienne (7). Des références à la maladie sont également retrouvées dans les écrits d'Homère (780 avant JC), de Platon (428 à 347 avant JC) ou d'Aristote (384 à 322 avant JC). Il est estimé que le paludisme est arrivé à Rome durant le 1^{er} siècle après JC et son implantation en Europe a ensuite duré plus de 2000 ans (8). En France, la Camargue et la Corse constituaient les derniers foyers de paludisme en France, définitivement éteints après la 2nde Guerre mondiale (9). La dernière épidémie française date de 1943 en Camargue, avec environ 200 cas d'infections à *Plasmodium vivax* (10). De très rares cas de transmissions autochtones existent encore en Europe, en témoigne la réintroduction du parasite par des travailleurs migrants et une épidémie locale à *Plasmodium vivax* en Grèce (11,12).

C'est en 1880 que Charles Louis Alphonse Laveran, médecin militaire en poste à Constantine, met en évidence l'agent pathogène au microscope (figure 2). A cette époque, le paludisme décime les armées françaises en Algérie. Entre 1830 et 1841, plus de 90% des décès recensés dans les rangs de l'armée lui sont attribués. Ce n'est que 20 ans plus tard, entre 1898 et 1900 que le moustique est identifié comme étant le vecteur de l'agent infectieux (13). Le Dr Laveran reçoit le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1907 pour cette découverte (14).

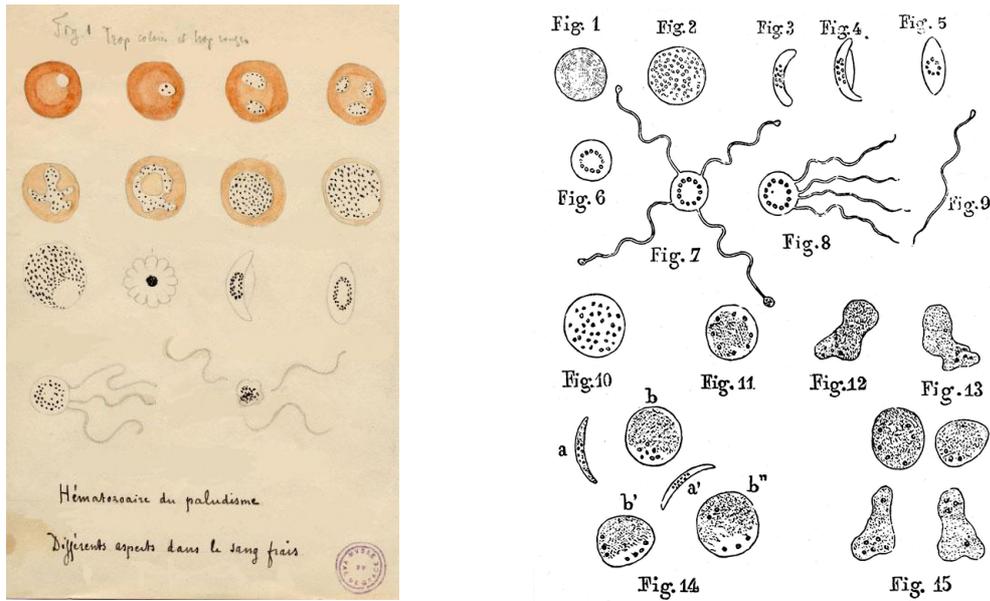


Figure 2 – Illustrations des formes infectieuses responsables du paludisme faites par le Dr Laveran.

Publiées dans le bulletin de la société médicale des hôpitaux de Paris en 1881. Observations faites au microscope. Issu de <https://www.cdc.gov/malaria/about/history/laveran.html>.

Actuellement, on considère que l'homme est l'hôte intermédiaire de 5 espèces de *Plasmodium* : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* spp, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi*. *Plasmodium ovale* spp a été décrit pour la première fois en 1922 chez un soldat revenant d'Afrique de l'Est (15). Ce n'est qu'à partir de 2004, après une épidémie à Bornéo, que le parasite du singe *Plasmodium knowlesi* a été considéré comme la cinquième espèce pouvant infecter l'homme (16,17). L'homme peut également être infecté de façon sporadique et accidentelle par *Plasmodium cynomolgi* (18) ou *Plasmodium simium* (19), deux *Plasmodium* de primates.

ii. Cycle parasitaire

La partie sexuée du cycle parasitaire de *Plasmodium* se déroule chez son hôte définitif, le moustique *Anopheles* femelle (20) (figure 3). La partie asexuée de son développement se déroule chez son hôte intermédiaire, l'homme en ce qui nous concerne. Après une pique nocturne par le moustique, une centaine de sporozoïtes sont injectés dans le derme à partir des glandes salivaires du moustique. Ils rejoignent le foie par la circulation sanguine et infectent les hépatocytes (21). Le parasite entre dans une phase de différenciation répllicative à multiplication asexuée intense qu'on appelle la schizogonie intra-hépatique. Des dizaines de milliers de mérozoïtes sont ensuite libérés depuis les schizontes hépatiques dans la circulation sanguine. Cette phase intra-hépatique dure 7 à 15 jours.

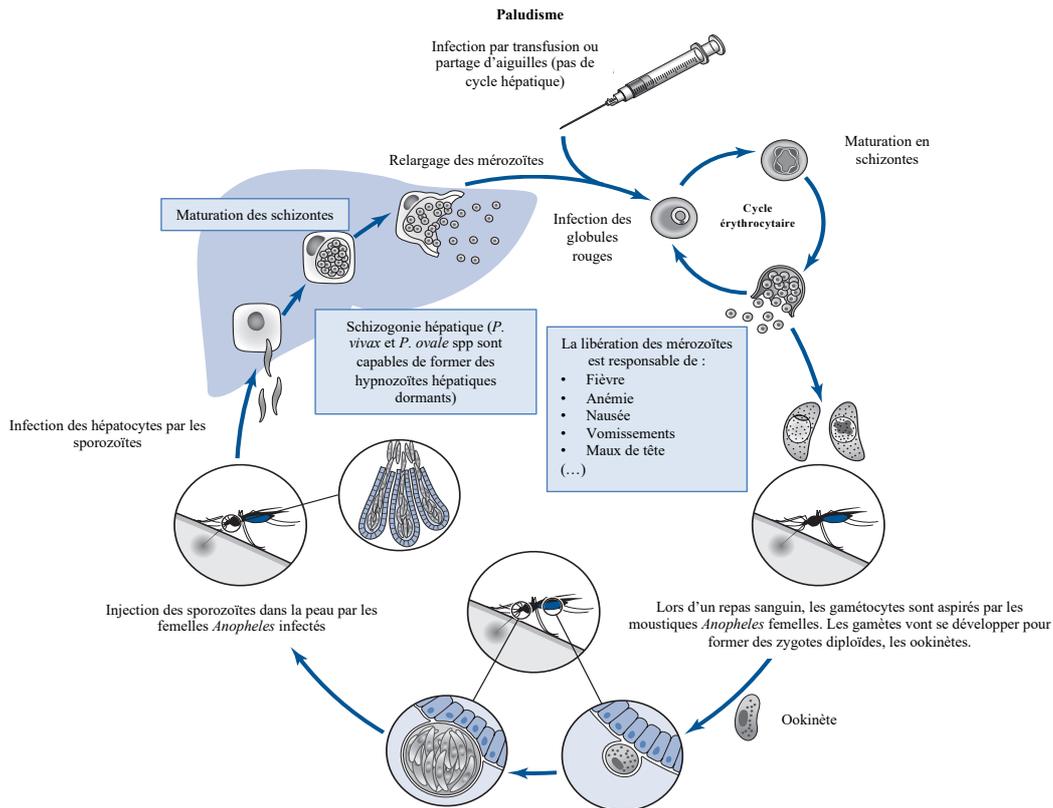


Figure 3 – Cycle parasitaire de *Plasmodium* spp chez le moustique (hôte définitif) et l'homme (hôte intermédiaire).

Adapté de Terrie Taylor and Tsiri Agbenyega, Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases, 9th edition, chapitre 96, pp 695 (22).

La phase sanguine symptomatique se déroule suite à la phase hépatique. Le mérozoïte infecte un érythrocyte et initie sa phase de maturation. Il évoluera en trophozoïte immature (ou « anneau »), puis trophozoïte jeune et enfin trophozoïte âgé. Le dernier stade évolutif, le schizonte, se rompt pour libérer de nouveaux mérozoïtes. Cette phase de maturation intra-érythrocytaire dure entre 48 et 72 heures et aboutit à la libération de 8 à 32 mérozoïtes, selon l'espèce plasmodiale. Pour *Plasmodium ovale* spp, cette phase sanguine dure 48 heures et est à l'origine de la formation de 6 à 12 nouveaux mérozoïtes (23).

Après un certain nombre de cycles intra-érythrocytaires, les gamétocytes, formes sexuées du parasite, sont formés à partir des mérozoïtes sous l'influence notamment de la protéine ap2-g, facteur essentiel dans le contrôle et le déclenchement de la gamétocyto-genèse (24). Les facteurs environnementaux responsables du déclenchement de la gamétocyto-genèse ne sont pas encore parfaitement connus, même si la lysophosphatidylcholine a récemment été décrit comme un modulateur important de la formation de gamétocytes (25). L'ingestion de ces formes par un nouveau moustique permettra au parasite d'entamer la phase sexuée de son développement, chez son hôte définitif. A la différence de *Plasmodium falciparum*, dont les formes âgées sont

séquestrées dans les capillaires sanguins, tous les stades de maturation intra-érythrocytaire de *Plasmodium ovale* spp sont visibles sur les frottis sanguins réalisés à partir du prélèvement sanguin veineux des patients infectés.

Plasmodium ovale spp présente un tropisme plus important pour les hématies jeunes dont il va changer la morphologie. Ce tropisme pour les réticulocytes est encore mal compris, dû à l'impossibilité de maintenir *Plasmodium ovale* spp en culture (26). D'un point de vue morphologique, les globules rouges infectés par *Plasmodium ovale* spp sont donc de grande taille et de forme plutôt ovalaire (figure 4). Le cytoplasme des hématies infectées par *Plasmodium ovale* spp est ponctuée de granulations, appelées granulations de Schüffner, caractéristique partagée avec *Plasmodium vivax*.

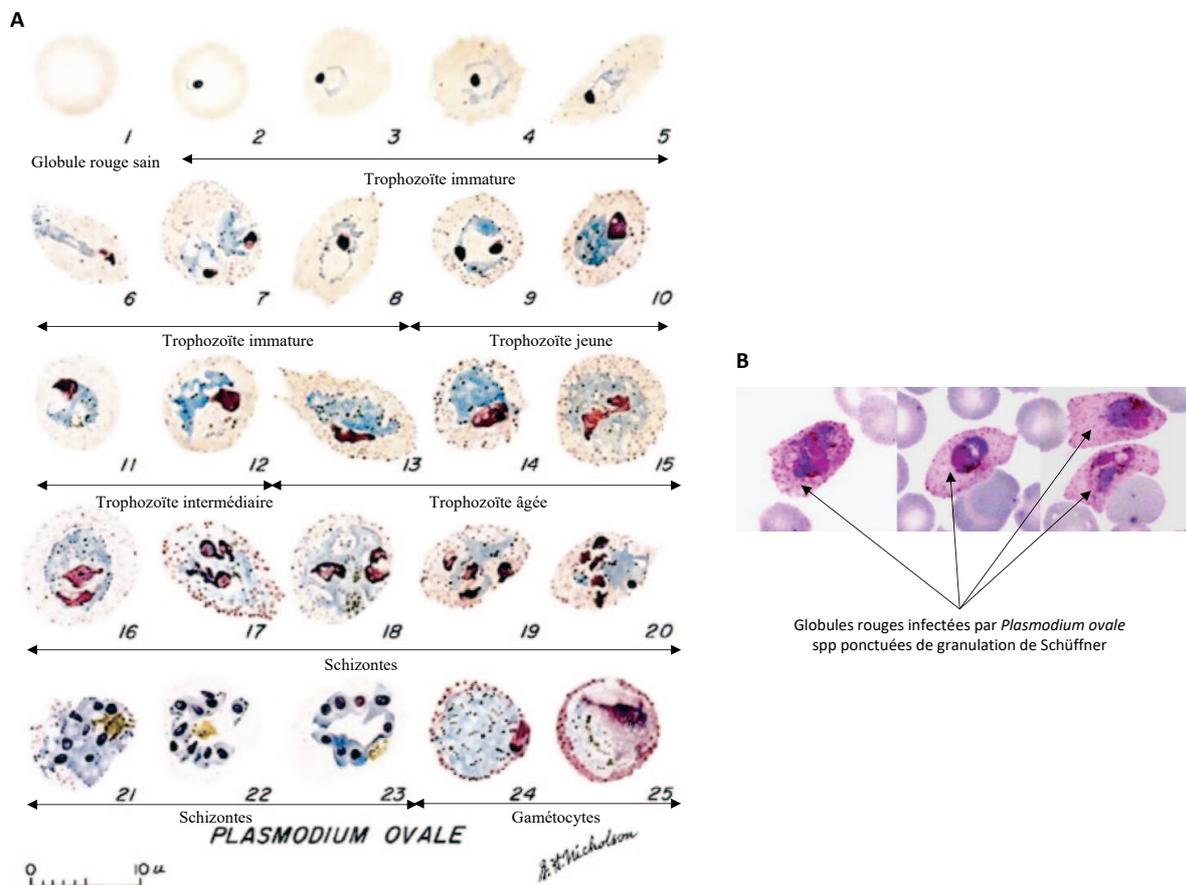


Figure 4 – Développement intra-érythrocytaire de *Plasmodium ovale* spp.

A : Représentation schématique des formes intra-érythrocytaires de *Plasmodium ovale* spp. Issu de Coatney *et al*, The Primate malarías, U.S. Government printing Office, Washington, D.C. (27). **B** : globules rouges infectés par *Plasmodium ovale* spp ponctués de granulations de Schüffner. Issu de Collins WE *et al*, Clinical microbiology reviews 2005 (28).

Une des caractéristiques de *Plasmodium ovale* spp est sa capacité d'être à l'origine d'accès de reviviscence¹ à distance de l'accès palustre initial (figure 5). Une des hypothèses principales

¹ Voir I.1.b.ii pour plus de précisions.

quant à l'origine de ces accès de reviviscence est l'existence de formes dormantes intra-hépatocytaires, les hypnozoïtes. Ces hypnozoïtes sont formées après l'infection de l'hépatocyte par le sporozoïte, en parallèle de la formation des schizontes hépatiques, et restent en latence dans les hépatocytes (29,30). Différents stimulus, comme des infections parasitaires ou bactériennes (31) par exemple, peuvent entraîner le réveil des hypnozoïtes qui vont se développer et pouvoir former de nouveaux schizontes hépatiques, à l'origine d'un nouvel accès palustre.

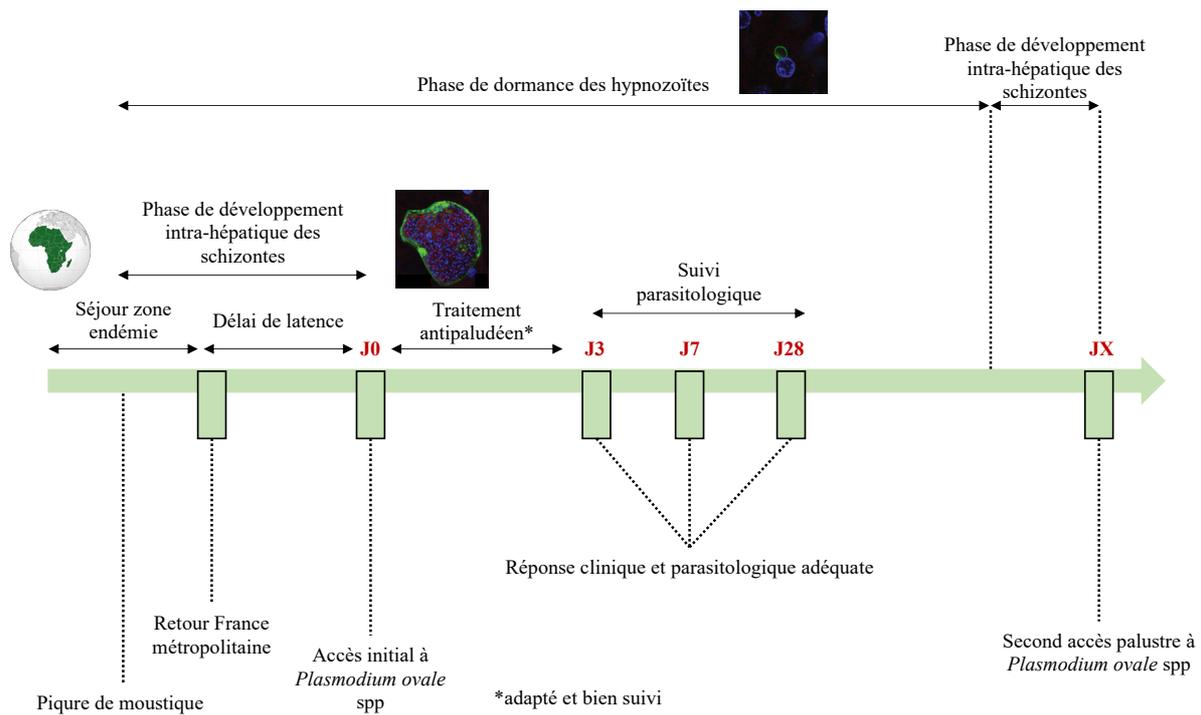


Figure 5 – Représentation schématique d'un accès de reviviscence.

Au retour d'une zone d'endémie palustre, majoritairement l'Afrique subsaharienne dans le cas de *Plasmodium ovale* spp, le patient va présenter une symptomatologie fébrile et un accès initial à *Plasmodium ovale* spp va être diagnostiqué. Le patient va être traité par un traitement antipaludique adapté et bien suivi. Il sera ensuite revu en consultation à J3, J7 et J28 pour s'assurer d'une réponse clinique et parasitologique adéquate. Il sera considéré comme guéri à J28 mais, dans un délai variable, il va présenter un second accès à *Plasmodium ovale* spp, qui définira l'accès de reviviscence en l'absence de nouvelle contamination. Images issues de Gural *et al*, Cell Host and Microbe 2018 (32).

Ces hypnozoïtes ont été mis en évidence pour la première fois chez *Plasmodium cynomolgi*, un *Plasmodium* de primates (33), proche génétiquement de *Plasmodium vivax*. Ils ont par la suite également été mis en évidence dans des hépatocytes d'un chimpanzé infecté par *Plasmodium vivax* (34). La preuve que ces hypnozoïtes sont à l'origine de la formation de schizontes hépatiques, fait suspecté depuis longtemps, a été apportée très récemment grâce à une souche de *Plasmodium cynomolgi* génétiquement modifiée (35). Grâce à cette souche exprimant du GFP à l'état basal et du mCherry lors de son activation, ils ont pu suivre le réveil des

hypnozoïtes, la formation des schizontes ainsi que l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes.

En revanche, l'existence des hypnozoïtes n'a jamais été formellement démontrée chez *Plasmodium ovale* spp et est fréquemment débattue (36). Suspectés sur la base d'une proximité supposée entre *Plasmodium ovale* spp d'une part et *Plasmodium vivax* et *Plasmodium simiovale* (un *Plasmodium* de primate capable de former des hypnozoïtes (37)) d'autre part, car morphologiquement proches, il s'est avéré ultérieurement que ces espèces n'étaient pas particulièrement proches génétiquement (38) (figure 6).

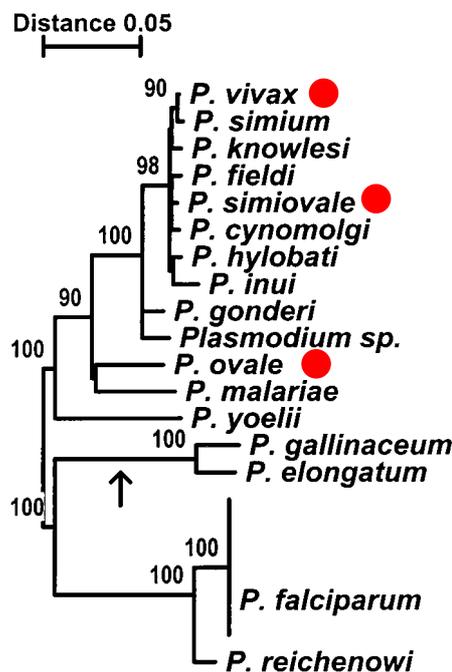


Figure 6 – Arbre phylogénétique de 17 espèces de *Plasmodium*.

Arbre phylogénétique réalisé sur la base des séquences du gène du cytochrome b. Issu de Escalante A *et al*, PNAS 1998 (38). Les espèces d'intérêt sont marquées d'un rond rouge.

La preuve indirecte de l'existence des hypnozoïtes chez *Plasmodium ovale* spp à partir de leur proximité avec *Plasmodium vivax* et *Plasmodium simiovale* est donc réfutée. Cependant, il existe des accès de reviviscence à *Plasmodium ovale* spp, qu'ils aient pour origine ou non des hypnozoïtes hépatiques. Les premières démonstrations des accès de reviviscence à *Plasmodium ovale* spp ont été faites chez des sujets sains volontairement infectés. En 1955, deux cas de reviviscences sur trois patients infectés à *Plasmodium ovale* spp ont été décrits (39). Une analyse rétrospective d'infections volontaires à *Plasmodium ovale* spp pour traiter la

neurosyphilis (appelé malariathérapie² (40)) entre 1949 et 1963 a permis d'établir que 19 des 38 volontaires étudiés ont déclenché un accès de reviviscence après un traitement par chloroquine bien suivi et efficace (41).

b. Le paludisme, une maladie grave, fréquente et mondiale

i. Présentation clinique d'un accès palustre

La phase intra-érythrocytaire du cycle parasitaire est responsable de l'ensemble des symptômes. En effet, le parasite produit des toxines lors de son développement dans le globule rouge. Elles s'accumulent et sont libérées dans la circulation sanguine lors de la lyse des globules rouges à la fin du développement intra-érythrocytaire. Elles vont être reconnues par les cellules de l'immunité, qui vont produire en réponse des pyrogènes et cytokines qui vont déréguler l'hypothalamus, à l'origine de la fièvre (figure 7) (42).

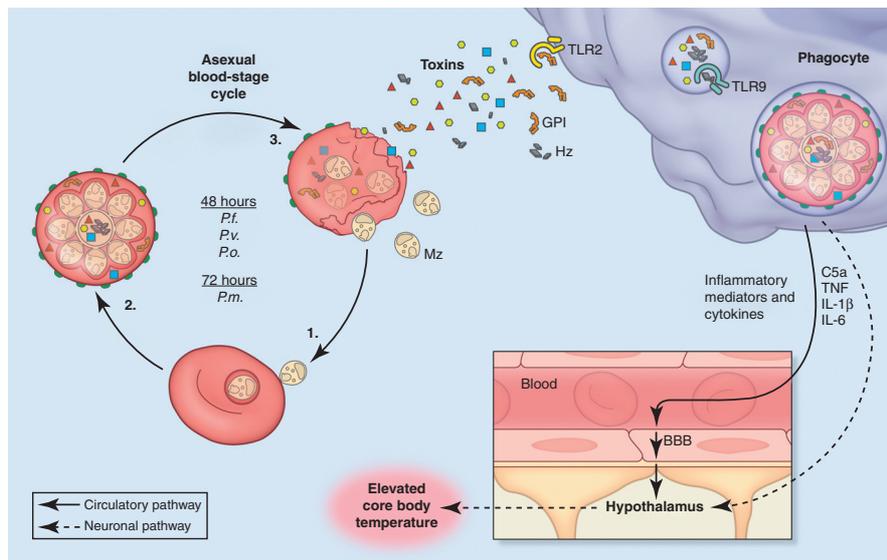


Figure 7 – Mécanismes responsables de la fièvre lors d'un accès palustre.

La lyse des globules rouges infectés est responsable de la libération de toxines qui sont reconnues par des récepteurs cellulaires sur les cellules phagocytaires et autres cellules de l'immunité, tels que les Toll-like receptors. Ces cellules produisent en réponse des pyrogènes et des cytokines qui augmentent la température corporelle par dérégulation de l'hypothalamus. Issu de Oakley MS *et al*, Trends in Parasitology 2011 (42).

La fièvre est le symptôme le plus fréquent de l'accès palustre mais il n'existe pas de signe pathognomonique de l'infection. L'accès palustre peut donc être confondu avec les infections virales telles que la grippe, notamment lors des périodes épidémiques des virus respiratoires. Il

² La malariathérapie, appelée aussi paludothérapie, était un traitement de la paralysie générale, complication de la neurosyphilis, développée par Julius Wagner-Jauregg dans les années 1920. Elle consistait à infecter des moustiques à l'aide du sang d'un patient infecté par *Plasmodium vivax* ou *Plasmodium ovale* puis de leur faire prendre un repas sanguin sur la peau des patients atteints de neurosyphilis afin de les infecter et de leur déclencher de la fièvre.

faut être vigilant et sensibiliser le personnel médical à considérer que toute fièvre au retour d'une zone d'endémie palustre est un paludisme jusqu'à preuve du contraire.

Au début de l'infection, les parasites ne sont pas tous au même stade de développement intra-érythrocytaire parasitaire et l'infection est dite asynchrone. Tous les globules rouges infectés ne sont donc pas lysés au même moment. La lyse des globules rouges est alors continue et la fièvre est ininterrompue. En revanche, lors d'une infection plus avancée et non traitée, toutes les formes parasitaires sont au même stade de développement intra-érythrocytaire et l'infection est dite synchrone. La fièvre est alors rythmée, toutes les 48 à 72 heures en fonction de l'espèce parasitaire et de la durée de son cycle de développement intra-érythrocytaire (48 heures pour *Plasmodium ovale* spp). Hormis la fièvre, les patients présentent également fréquemment des céphalées, des arthralgies/myalgies et une altération de l'état général. La symptomatologie digestive, moins fréquente, associe souvent des nausées et des vomissements à des diarrhées ainsi qu'à une anorexie et des douleurs abdominales. On parle d'embarras gastrique fébrile. L'ensemble de ces symptômes définit l'accès palustre simple, qui représente environ 85% des accès palustres en France (43). Une splénomégalie et une hépatomégalie peuvent être également observées, principalement lors d'accès palustres à *Plasmodium falciparum*.

Certains patients peuvent cependant présenter une symptomatologie plus grave, nécessitant une prise en charge en unités de soins intensifs (USI) ou en unités de soins continus (USC). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini un ensemble de critères clinico-biologiques permettant de définir l'accès palustre grave (44), adaptés par la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF) (45). La majorité des accès palustres graves sont associés à *Plasmodium falciparum*, notamment grâce à sa capacité de cytoadhérence (*i.e* capacité des globules rouges infectés à adhérer aux endothéliums vasculaires) et de séquestration dans les organes profonds, médiée par les Variant Surface Antigen (46,47). Mais, *Plasmodium vivax* est également un agent important du paludisme grave (48–50). Plus d'une vingtaine de cas de paludisme grave à *Plasmodium ovale* spp ont par ailleurs été décrits dans la littérature (51–55).

ii. Accès de reviviscence

La capacité de donner des accès de reviviscence est une caractéristique partagée par *Plasmodium ovale* spp et *Plasmodium vivax*³. La reviviscence est définie par la réapparition de formes asexuées de *Plasmodium* ayant pour origine les hypnozoïtes hépatiques, en l'absence

³ Voir I.1.a.ii

de nouvelle transmission par le vecteur (figure 5). On peut alors observer un nouvel accès palustre clinique malgré la prise d'un traitement antipaludique efficace et bien suivi (29). La comparaison génétique (ou caractérisation moléculaire) entre l'isolat responsable de l'accès palustre initial et l'isolat responsable de l'accès de reviviscence a été développée pour *Plasmodium vivax*. Différentes techniques de biologie moléculaire sont utilisées : analyse par restriction fragment length polymorphism (56), séquençage de zones polymorphiques (57) ou encore analyse de microsatellites (58). En revanche, il n'existe pas de méthode publiée permettant la caractérisation moléculaire des accès de reviviscence à *Plasmodium ovale* spp et ce travail reste à réaliser.

Les hypnozoïtes sont un réservoir pour le parasite et constituent une problématique importante dans la lutte contre le paludisme. Les traitements antipaludiques conventionnels sont inefficaces contre ces formes et une prise en charge thérapeutique spécifique par la primaquine durant 14 jours est nécessaire (59). Cependant avant l'instauration du traitement, le dosage de l'enzyme glucose-6 phosphate déshydrogénase (G6PD) doit être réalisé⁴. En effet, les patients déficitaires sont à risque de déclencher une anémie hémolytique potentiellement mortelle et l'administration de primaquine est alors contre-indiquée. Cependant, une diminution de la posologie à 0,75 mg/kg/semaine pendant 8 semaines pour l'éradication des hypnozoïtes ou à 0,25 mg/kg en une prise pour l'effet gamétocyte permettrait de limiter les risques d'anémie hémolytique tout en conservant une efficacité satisfaisante (60). Cela reste un réel frein à l'utilisation de la primaquine puisqu'on estime qu'environ 400 millions de personnes dans le monde présentent un déficit en G6PD (61) (figure 8), notamment en zone d'endémie palustre (62).

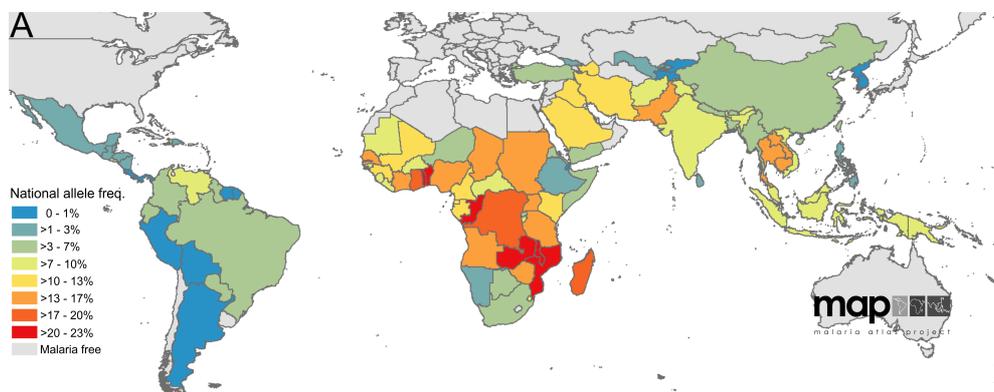


Figure 8 – Distribution du déficit en G6PD dans les pays situés en zone d'endémie palustre.
Issu de Malaria Atlas Project (<https://malariaatlas.org/>).

⁴ L'enzyme G6PD est une enzyme cytoplasmique qui joue un rôle essentiel dans la réduction des agents oxydants. Elle permet la synthèse du NADPH et est essentielle au globule rouge, qui n'en a pas d'autres sources.

iii. Épidémiologie du paludisme dans le monde et en France

Selon les estimations de l’OMS, il y a eu 228 millions de cas et 405000 décès attribués au paludisme dans le monde en 2018. Les décès touchent majoritairement les enfants de moins de 5 ans (67%) en Afrique sub-saharienne (63).

Le paludisme et l’homme ont une longue histoire commune. Cette parasitose était historiquement endémique dans la plupart des pays du monde, excepté quelques îles du Pacifique ou certaines zones géographiques aux conditions extrêmes (64). C’est actuellement une maladie mondiale intertropicale (figure 9). Une transmission autochtone de paludisme est présente dans 89 pays. Depuis le début des années 2000, le paludisme a été éradiqué de 16 pays. Cette éradication est définie par l’absence de cas de paludisme autochtone pendant au moins trois années consécutives (65).

Le paludisme est endémique toute l’année en Afrique avec des pics saisonniers lors des périodes chaudes et humides. Il n’y a pas de transmission lorsque les températures extérieures sont inférieures à 16°C (66). *Plasmodium ovale* spp présente une répartition géographique moins vaste que *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*. Il est fréquemment responsable d’accès palustres en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud-Est et dans de rares îles du Pacifique (67). Mais, comme on le verra ultérieurement dans ce manuscrit, la répartition précise et le poids de cette espèce dans le paludisme à l’échelle mondiale sont mal connus, notamment en raison de son diagnostic difficile.

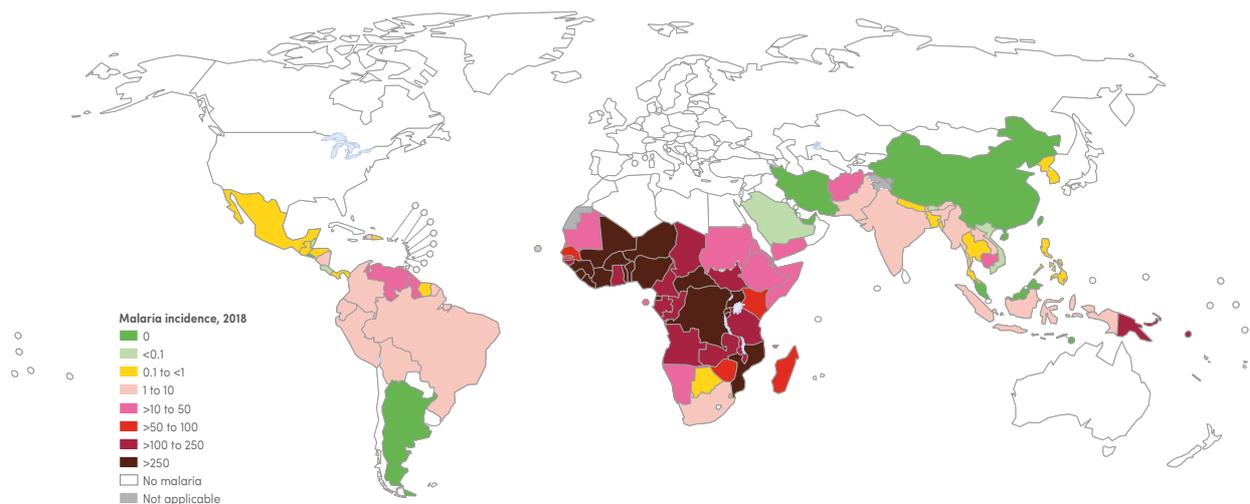


Figure 9 – Incidence du paludisme dans les pays ayant une transmission autochtone, toutes espèces confondues.

Source : rapport OMS 2019 (63).

L’Afrique est le continent le plus touché par le paludisme avec 93% du nombre total de cas dans le monde, sous réserve de l’exhaustivité du recueil des cas par l’OMS. Le Nigéria représente à lui seul 25% des cas mondiaux. A l’échelle mondiale, le nombre d’accès palustres recensé a diminué de 71 à 58 cas/1000 habitants entre 2010 et 2018. Cependant, il y a un ralentissement inquiétant de cette baisse depuis 2014. On note également une diminution importante de la mortalité attribuable au paludisme à partir des années 2000, notamment chez les enfants de moins de 5 ans.

En France métropolitaine, le paludisme à *Plasmodium vivax* était endémique dans toutes les zones humides. Son éradication date d’après la Seconde Guerre mondiale, avec une régression à partir du milieu du XIX^e siècle⁵. Cependant, en raison de ses liens historiques et économiques avec l’Afrique, la France métropolitaine est le pays qui présente le plus de cas de paludisme pour un pays situé hors zone d’endémie (68). En 2018, le nombre de cas importés a été estimé à 5500, en augmentation de 6,3% par rapport à 2017 (69). *Plasmodium falciparum* était l’espèce majoritaire et représentait 86,3% des cas. *Plasmodium ovale* spp était à l’origine de 6% des accès palustres en 2018. L’Afrique était le continent de contamination dans 97,9% des cas. Les 4 principaux pays à l’origine des cas étaient la Côte d’Ivoire, le Cameroun, la Guinée et le Mali. Ils représentaient plus de 60% des infections. Le nombre de cas de paludisme importés en France métropolitaine par année suit la tendance mondiale avec une nette diminution de 2000 à 2012 puis une réaugmentation progressive du nombre de cas au moins jusqu’en 2016 (figure 10).

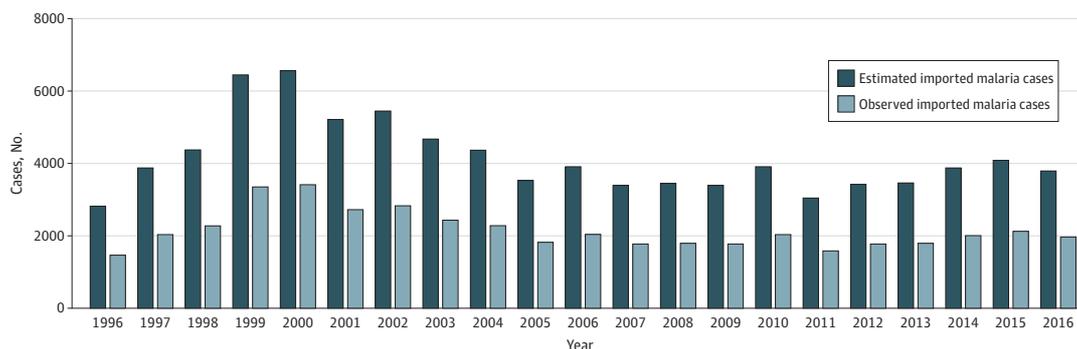


Figure 10 – Évolution du nombre de cas de paludisme estimés et observés en France métropolitaine de 1996 à 2016.

Les cas déclarés au Centre National de Référence du Paludisme sont indiqués en vert clair. Les cas estimés sur la base de la représentativité des correspondants hospitaliers sont indiqués en vert foncé. Issu de Kendjo *et al*, JAMA Network Open 2019 (43).

⁵ Voir I.1.a.i

Le profil des patients infectés a changé durant les 20 dernières années (figure 11) (43). Avant les années 2000, les patients caucasiens représentaient la majorité des patients infectés. Ces patients, qui voyageaient en Afrique de l'Ouest majoritairement pour des raisons de tourisme, ont peu à peu délaissé l'Afrique de l'Ouest en raison de la multiplication des conflits armés depuis le début des années 2000 pour réorienter leurs séjours en Asie du Sud-Est. Un meilleur suivi des recommandations de chimioprophylaxie chez les caucasiens est également une hypothèse envisageable à cette modification du profil des patients.

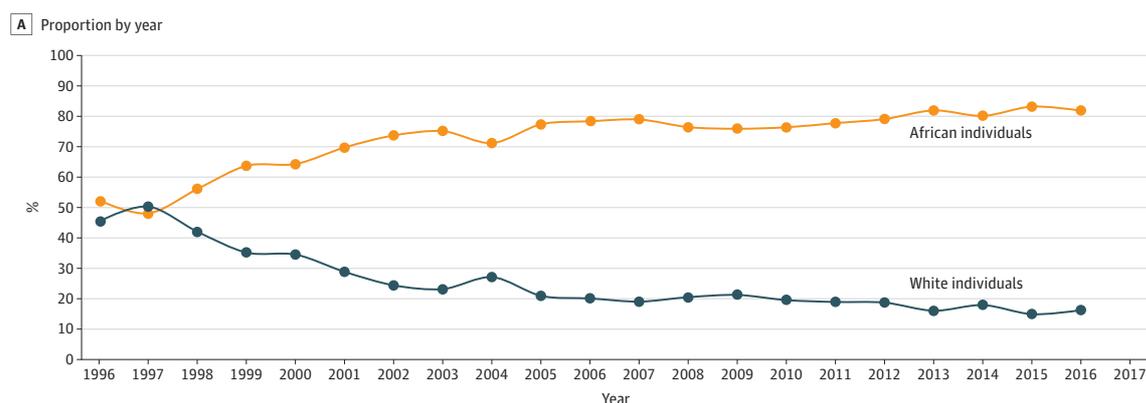


Figure 11 – Évolution du profil épidémiologique des patients infectés entre 1996 et 2016.

La courbe orange représente les patients d'origine africaine, la courbe vert foncé les patients caucasiens. Issu de Kendjo *et al*, JAMA Network Open 2019 (43).

Actuellement, les patients d'origine africaine représentent donc une large majorité des patients infectés. Ils se protègent moins contre le paludisme que les patients caucasiens, en partie à cause de difficultés financières plus importantes mais également en raison d'une perception de la maladie différente des patients caucasiens. Nés eux-mêmes ou leurs ascendants directs en Afrique, ils se pensent protégés du paludisme, de la même manière que le sont les adultes résidents en zone d'endémie.

Sur 20 ans de surveillance au Centre National Référence du Paludisme (CNRP), il est observé :

- L'augmentation de l'âge médian des voyageurs présentant un accès palustre à leur retour de zone d'endémie (de 29 à 39 ans pour les patients africains ; de 33 à 40 ans pour les patients caucasiens).
- L'augmentation du pourcentage de cas graves d'un facteur 2 depuis 1996 (figure 12) (43). L'amélioration de la prise en charge en service de réanimation mais également l'utilisation d'artésunate par voie intraveineuse a permis de stabiliser le nombre de patients décédés par an malgré cette augmentation de cas (70).

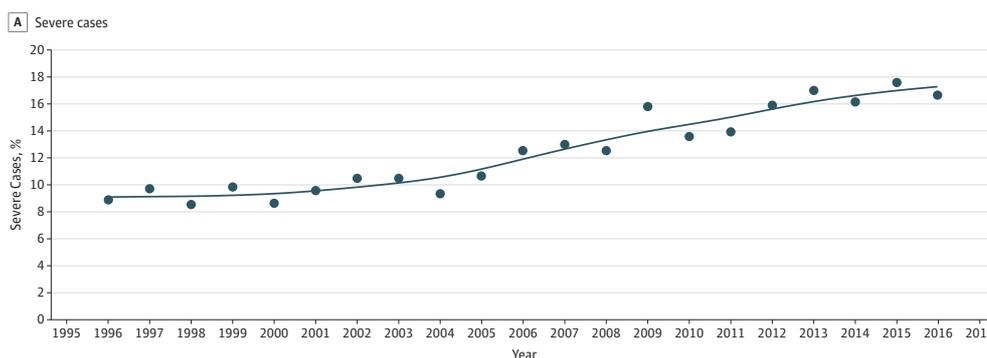


Figure 12 – Pourcentage de formes graves de paludisme dans le paludisme d'importation en France entre 1996 et 2016.

Issu de Kendjo *et al*, JAMA Network Open 2019 (43).

2. Prévention, diagnostic et prise en charge d'un accès palustre

a. Prophylaxie de l'accès palustre

La prévention du paludisme repose d'une part sur la protection personnelle anti-vectorielle, c'est-à-dire l'utilisation de répulsifs et de moustiquaires, et d'autre part sur la chimioprophylaxie, qui consiste en une prise préventive de médicament anti-palustre pour empêcher la survenue de la maladie. Lors de voyages dans les pays à risque modéré ou élevé⁶ de transmission du paludisme (principalement l'Afrique sub-saharienne et la Papouasie-Nouvelle-Guinée), l'association de ces deux types de protection est recommandée. Les différents médicaments recommandés aux voyageurs français pour la chimioprophylaxie anti-palustre sont les suivants : atovaquone-proguanil, chloroquine, chloroquine-proguanil, doxycycline et la méfloquine (71). En pratique, seuls l'atovaquone-proguanil, la méfloquine et la doxycycline sont prescrits dans la prophylaxie anti-palustre en Afrique, en raison de la forte proportions d'isolats de *Plasmodium falciparum* résistants à la chloroquine (72).

Ces différents traitements prophylactiques ne sont pas actifs contre les hypnozoïtes de *Plasmodium ovale* spp et de *Plasmodium vivax*. Si la chimioprophylaxie prévient l'accès initial, elle ne protège pas contre les accès de reviviscences à ces deux espèces. Il n'est pas rare de voir des accès palustres à *Plasmodium ovale* spp ou à *Plasmodium vivax* à distance de l'arrêt de la chimioprophylaxie chez des patients ayant bien suivi leur traitement. L'utilisation de la primaquine, en prophylaxie anti-reviviscence au retour d'une zone d'endémie à *Plasmodium ovale* spp ou *Plasmodium vivax*, a été recommandée en 2006 par les experts du Center for Disease Contrôle (CDC) à la dose de 15 à 30 mg/jour pendant 14 jours (73). Les recommandations françaises ne suivent pas pour le moment les recommandations du CDC.

⁶ Classification basée sur les zones de fortes ou faibles transmissions telles que définies par l'OMS.

b. Méthodes du diagnostic parasitologique du paludisme
i. Méthodes microscopiques

Durant son stade de développement intra-érythrocytaire, *Plasmodium* mesure de 1 à 2 µm sous sa forme trophozoïte immature et de 5 à 6 µm sous sa forme schizonte. Trois techniques microscopiques sont employées dans les laboratoires pour faire le diagnostic microscopique de paludisme : la goutte épaisse, le frottis sanguin mince et plus rarement le Quantitative Buffy Coat (QBC).

▪ La goutte épaisse

Elle a été mise au point par Ross en 1903 (74). Elle repose sur le principe de la lyse et la déshémoglobination des globules rouges. La lyse classique à l'eau sur une goutte de sang de 10 µL ou la lyse dite « rapide » par utilisation de la saponine sur une goutte de sang de 2 µL ont été proposées. La lecture se fait après coloration par le Giemsa. L'OMS recommande de lire la goutte épaisse jusqu'à un compte de 500 formes parasitaires asexuées ou de 1000 globules blancs (GB). La goutte épaisse permet de calculer une densité parasitaire (DP) qui est exprimée en parasites/µL (p/µL) de sang. La formule utilisée est la suivante :

$$DP = \text{Formes parasitaires asexuées comptées pour Y champs} \times \frac{\text{Nombre de GB/mm}^3}{\text{GB comptés pour Y champs}}$$

avec Nombre de GB/mm³ la concentration sanguine en globules blancs déterminée par la numération formule sanguine (NFS) du patient.

La goutte épaisse est la méthode microscopique la plus sensible et reste la méthode de référence dans le diagnostic du paludisme. Sa limite de détection varie de 4 à 100 parasites/µL selon les études (75–77). Cependant, sa lecture est difficile et nécessite un personnel formé et entraîné à la lecture en raison de nombreux artéfacts possibles (figure 13).

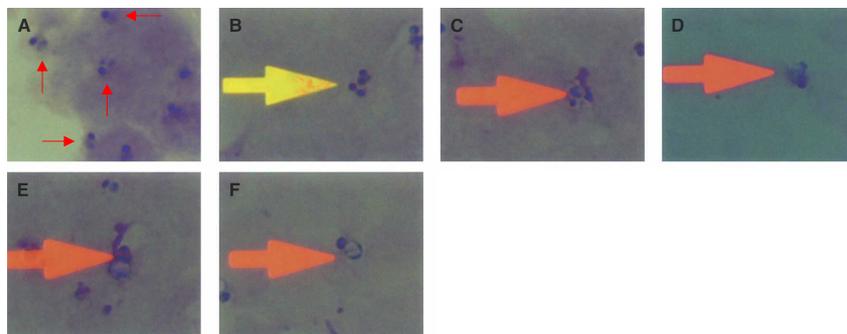


Figure 13 – Artéfacts de la goutte épaisse.

A : les flèches rouges indiquent les trophozoïtes immatures de *Plasmodium falciparum*. B : agglomérat de deux trophozoïtes immatures de *Plasmodium falciparum*. C-F : artéfacts de lecture. Images issues de Wongsrichanalai *et al*, Am J Trop Med Hyg 2007 (76).

Le diagnostic d'espèce est délicat par l'observation de la goutte épaisse. En effet, les hématies sont lysées et la forme et la taille des parasites sont modifiées. Le frottis sanguin mince est recommandé pour cette application.

- Frottis sanguin mince

Le frottis sanguin mince est coloré par des colorations panoptiques telle que le Giemsa. Sa sensibilité, de 100 à 200 parasites/ μ L, est inférieure à celle de la goutte épaisse (78). Les résultats du frottis sont exprimés en parasitémie, qui est le pourcentage d'hématies parasitées par une forme asexuée de *Plasmodium*. Le diagnostic d'espèce est plus facile à faire qu'avec la goutte épaisse. Il peut cependant poser problème, notamment lorsqu'il s'agit de différencier *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale* spp. Le frottis sanguin peut également présenter quelques artéfacts de lecture (figure 14). Ceux-ci sont observés notamment lorsque le Giemsa utilisé est de mauvaise qualité ou lorsque la coloration a été mal réalisée, bien souvent la conséquence de temps de coloration trop courts ou d'un pH du tampon inadapté.

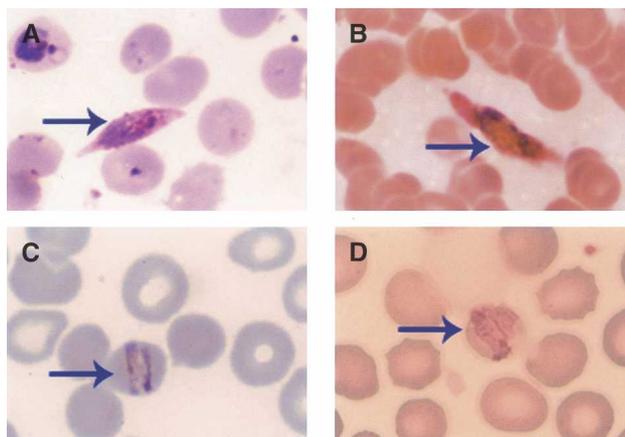


Figure 14 – Artéfacts du frottis sanguin mince.

A : gamétocyte de *Plasmodium falciparum*. B : artéfact de coloration. C : trophozoïte de *Plasmodium malariae* sous forme de bande équatoriale. D : artéfact de coloration. Images issues de Wongsrichanalai *et al*, Am J Trop Med Hyg 2007 (76).

- QBC Malaria®

Cette technique microscopique nécessite au préalable une centrifugation en tube capillaire qui sépare les globules rouges des globules blancs et un marquage des acides nucléiques à l'acridine orange. Les globules rouges contenant très peu d'acides nucléiques, ce marquage permet de marquer spécifiquement l'ADN et l'acide ribonucléique (ARN) des parasites. C'est une technique présentant une sensibilité équivalente à celle de la goutte épaisse (79,80).

ii. Recherche d'antigènes parasitaires

Pour la détection d'antigènes parasitaires, des tests immunochromatographiques ou des techniques enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ont été développés. Les tests immunochromatographiques (figure 15), ou Tests de Diagnostic Rapide (TDRs), sont des techniques simples d'utilisation qui ne nécessitent pas de compétences techniques particulières. Elles permettent la détection de protéines parasitaires à partir d'une faible quantité de sang (en général 5 à 15 μL). C'est la méthode diagnostique la plus utilisée sur le terrain en zone d'endémie palustre. Elle a représenté environ 74% de l'ensemble des moyens diagnostiques utilisés en 2016 (81). Elle est également fréquemment utilisée dans les laboratoires occidentaux d'analyse médicale afin d'aider au diagnostic. Les techniques ELISA sont plutôt utilisées à visée de recherche.

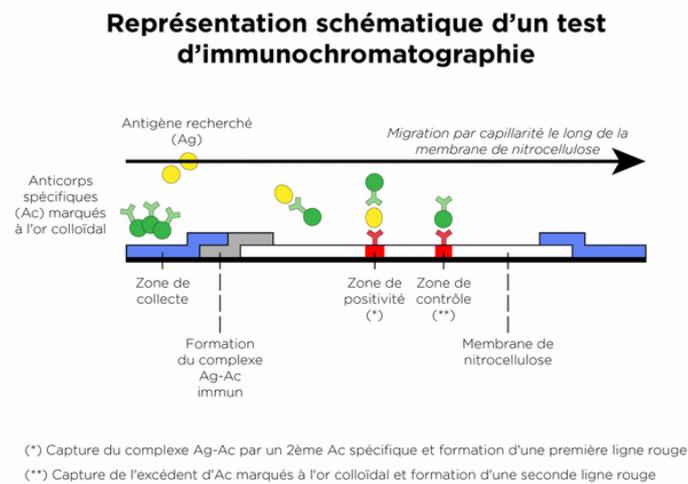


Figure 15 – Principe d'un test immunochromatographique.

Issu de <https://www.sciencesetavenir.fr>.

Dans les TDRs, des anticorps spécifiques marqués à l'or colloïdal (ou au latex) dirigés contre la protéine d'intérêt sont présents en excès dans la zone de dépôt de l'échantillon sanguin. Un complexe anticorps – antigène va se former dans la zone de dépôt et migrer par capillarité grâce à l'utilisation d'un tampon de migration. La migration du complexe anticorps – antigène sera stoppée par un second anticorps spécifique de l'Ag, fixé sur la bandelette de nitrocellulose. Une zone contrôle est également présente sur la bandelette avec des anticorps dirigés contre les anticorps marqués à l'or colloïdal présent en excès. Les résultats du test sont disponibles en 5 à 20 minutes.

De très nombreux TDRs sont disponibles et tous ne détectent pas les mêmes antigènes parasitaires. Ils ne possèdent également pas les mêmes sensibilités, ni les mêmes spécificités. La majorité des TDRs utilisés détectent la protéine histidin-rich protein 2 (HRP2), qui est une protéine spécifique de *Plasmodium falciparum*. Certains détectent également l'aldolase ou la lactate déshydrogénase (LDH), deux protéines parasitaires présentes chez toutes les espèces de *Plasmodium* infectant l'homme (figure 16). La limite de détection des TDRs se situe entre 50 et 100 parasites/ μ L selon les protéines détectées. Une trentaine d'études ont étudié la sensibilité des TDRs dans la détection de *Plasmodium ovale* spp (82). Leur sensibilité dans sa détection varie de 0 (83) à 83% (84) avec une sensibilité moyenne d'environ 30%.

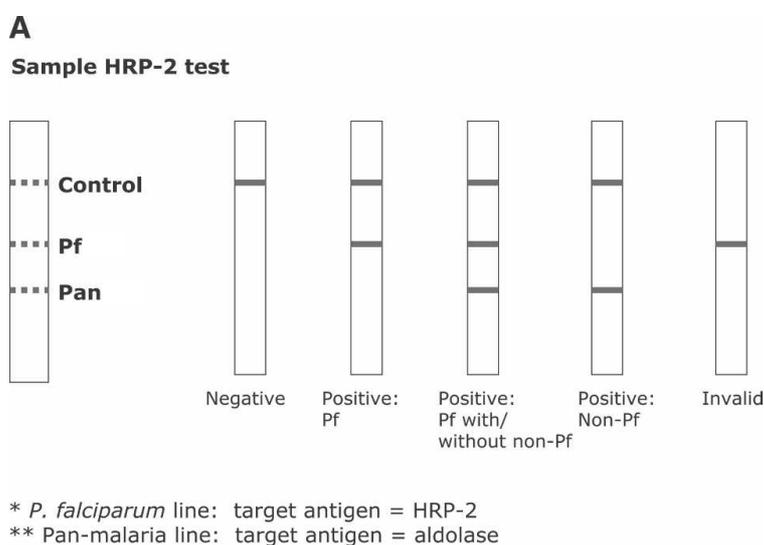


Figure 16 – Exemple d’interprétation des TDRs dans la détection des infections à *Plasmodium falciparum* et non *falciparum*.

La bande contrôle est essentielle pour pouvoir interpréter le TDR. Elle est le garant de la bonne réalisation du test. Lors d’une infection à *Plasmodium falciparum*, les TDRs sont positifs pour la protéine HRP2 et selon la densité parasitaire, positif ou négatif pour la protéine pan-plasmodiale. Lors d’une infection à *Plasmodium* non *falciparum*, les TDRs seront positifs uniquement pour la protéine pan-plasmodiale. Issu de Wongsrichanalai *et al*, Am J Trop Med Hyg 2007 (76).

En raison de la diversité des TDRs utilisés ainsi que des différentes populations cibles (zone d’endémie ou paludisme d’importation, enfant ou adultes, immun ou non-immun, ...), il est difficile de faire une méta-analyse sur l’efficacité des TDRs. Il apparaît cependant que la sensibilité globale des TDRs soit insuffisante dans la détection de *Plasmodium ovale* spp.

En comparaison, les TDRs détectant l’HRP2 ont une efficacité supérieure à 90% pour la détection de *Plasmodium falciparum*. Les TDRs pan-plasmodiaux ont une efficacité entre 80 et 90% pour la détection de *Plasmodium vivax* (pour ceux utilisant la LDH commune) et entre 50 et 60% pour la détection de *Plasmodium malariae*. Le développement de TDRs

ultrasensibles a permis d'améliorer la sensibilité de ces tests dans le diagnostic du paludisme (85,86). Ces TDRs de « nouvelle génération » sont cependant encore peu utilisés, ne détectent que la protéine HRP2, et ne peuvent donc faire le diagnostic que des infections dues *Plasmodium falciparum*.

iii. Recherche d'ADN parasitaire

Les techniques de biologie moléculaire, comme la polymerase chain reaction (PCR), se sont imposées comme les techniques les plus sensibles et les plus spécifiques dans le diagnostic du paludisme d'importation (87). La limite de détection de ces techniques varie de 0,005 à 1 parasite/ μ L. L'apport essentiel de la PCR réside dans sa valeur prédictive négative (VPN) élevée permettant d'exclure le diagnostic de paludisme en cas de PCR négative. En revanche, les délais d'exécution actuels ne permettent pas le rendu de résultat en moins de deux heures à partir de la réception au laboratoire du tube comme l'impose les recommandations françaises (88). Ceci limite fortement leur implantation en routine pour le moment

Les *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP)-PCR sont des méthodes d'amplification d'acides nucléiques à température constante qui ont récemment été développées comme outil diagnostique du paludisme (89). Elles permettent d'obtenir des résultats en une heure et peuvent être utilisées dans le cadre du dépistage d'une infection à *Plasmodium*. En effet, leur très bonne VPN les rend compatibles avec la pratique clinique (90). En revanche, elles ne permettent pas de faire le diagnostic d'espèce qui nécessitera la réalisation d'un frottis sanguin au minimum.

iv. Logigramme du diagnostic biologique du paludisme

En France, un résultat de recherche de paludisme négatif ne peut être rendu que lorsqu'une technique dite « sensible » est utilisée. Seuls le QBC, la goutte épaisse et/ou l'utilisation d'une technique de biologie moléculaire type LAMP-PCR sont valides. En raison de leur sensibilité insuffisante, le diagnostic par l'association frottis et TDRs peut ne pas être suffisant et peut nécessiter le transfert du prélèvement sanguin à un centre expert ou de référence (figure 17).

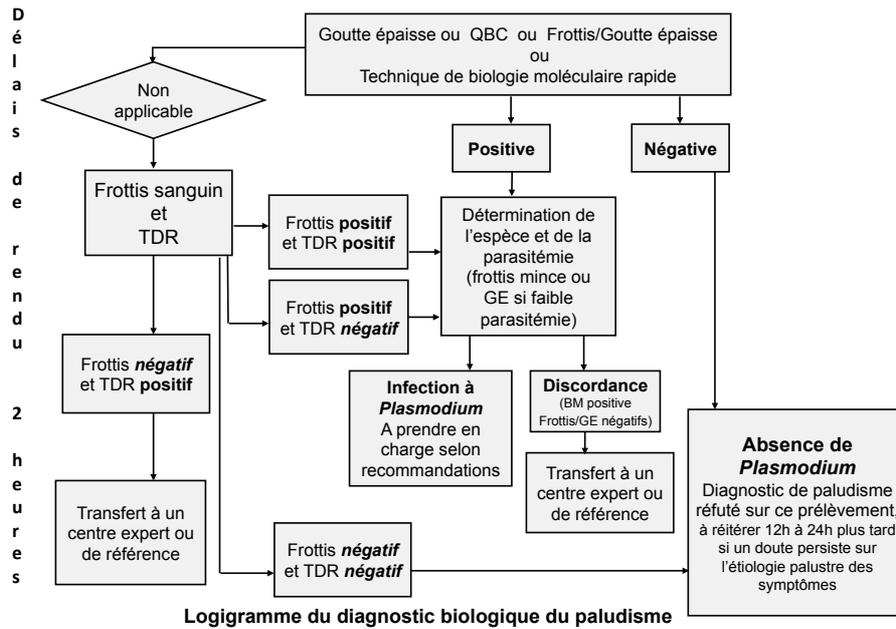


Figure 17 – Logigramme du diagnostic biologique du paludisme selon les recommandations 2017 éditées par la SPILF.

Source : recommandations de la Société de pathologie infectieuse de langue française 2017 (91).

c. Prise en charge thérapeutique d'un accès palustre

Les recommandations éditées par la SPILF ont été mises à jour en juin 2017 (45). Le traitement de 1^{ère} intention d'un accès palustre à *Plasmodium falciparum* repose sur l'utilisation d'une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (CTA). En l'absence de signes de gravités, un traitement par voie orale tels que l'artémimol-pipéraquline (Eurartesim®), 3 comprimés en 1 prise par jour pendant 3 jours ou l'artéméther-luméfantine (Riamet®), 4 comprimés à H0, H8, H24, H36, H48 et H60 peut être prescrit. Dans le cas contraire, un traitement par l'artésunate intraveineux d'au moins 3 doses et une hospitalisation en réanimation/USI/unité spécialisée sont recommandés.

Pour les autres espèces, « Le traitement du paludisme non compliqué à *Plasmodium non falciparum* (*Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium knowlesi* et *Plasmodium ovale* spp) repose sur la chloroquine ou une CTA. Cette dernière sera préférée en cas d'infection mixte ou de paludisme à *Plasmodium vivax* survenant au retour d'une zone de résistance à la chloroquine. » (45). Le principal changement dans ces nouvelles recommandations est le remplacement de l'atovaquone-proguanil par les CTA en première ligne pour le traitement de l'accès palustre non compliqué.

Le traitement des accès palustres à *Plasmodium ovale* spp inclut également la primaquine ou la tafénoquine (non autorisée en France), deux médicaments de la classe des amino-8-quinoléines

qui sont efficaces contre les hypnozoïtes. Le mécanisme d'action de ces deux molécules n'est pas complètement élucidé mais il semble qu'il s'agisse de prodrogues nécessitant une étape de métabolisation. Cette première transformation va aboutir pour la primaquine à la formation d'hydroxy-primaquine qui va spontanément s'oxyder et libérer des molécules d' H_2O_2 . Ces molécules de peroxyde d'hydrogène vont ensuite détruire les formes dormantes hépatiques (92) (figure 18).

En France, la prescription de primaquine pour 14 jours de traitement à la posologie de 0,5 mg/kg/j chez les patients non déficitaires en G6PD est recommandée dès le premier accès à *Plasmodium ovale* spp (93). La tafénoquine, dont la prise se fait en dose unique, n'est utilisée qu'à titre exceptionnel en France.

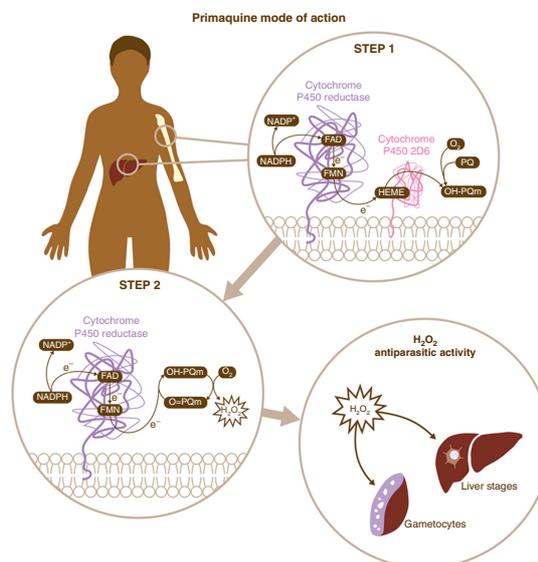


Figure 18 – Mécanisme d'action de la primaquine.

La primaquine est tout d'abord métabolisée en hydroxy-primaquine (OH-PQm) qui s'oxyde (O=PQm) pour libérer de l' H_2O_2 , active contre les gamétocytes et les formes dormantes hépatiques. Issu de Camarda *et al*, Nature communications 2019 (92).

3. *Plasmodium ovale* spp, un parasite à ne pas négliger

a. Généralités

Plasmodium ovale spp est fréquemment retrouvé en Afrique sub-saharienne, plus rarement en Papouasie-Nouvelle-Guinée et en Asie du Sud-Est. Les co-infections palustres, avec *Plasmodium falciparum* notamment, sont fréquentes. Il est difficile de connaître précisément le poids de cette espèce dans l'épidémie mondiale de paludisme car peu d'études ont évalué son incidence. Sa prévalence a par exemple été estimée à 7,5% dans une étude en Ouganda (94). Même si la majorité des accès palustres dont il est responsable sont des accès palustres simples, *Plasmodium ovale* spp est responsable d'une morbidité importante dans les communautés

situées en zone d'endémie, notamment chez les enfants entre 0 et 7 ans (95). De très rares cas de formes graves ou mortelles ont déjà été décrits (51–55). Les symptômes les plus fréquents sont ceux d'un accès palustre simple, c'est-à-dire de la fièvre supérieure à 38,5°C, des maux de têtes, des nausées, des douleurs abdominales ou de la toux non productive. Il est rarement responsable d'anémies sévères et les thrombopénies qui lui sont associées sont plus modérées que celles provoquées par *Plasmodium falciparum* (96).

Le traitement recommandé par l'OMS est la chloroquine, à la dose totale de 25 mg/kg sur 3 jours en une prise par jour. Les CTA sont efficaces et doivent être utilisées en cas de doute sur le diagnostic d'espèce ou en cas de patients présentant des signes de gravité.

b. Une espèce négligée

Plasmodium ovale spp est la dernière des 4 espèces majoritaires de *Plasmodium* découverte, en 1922, plus de 40 ans après la description par Charles Louise Alphonse Laveran de l'agent infectieux responsable du paludisme. Elle donne des accès palustres avec des parasitémies plus faibles que les autres espèces plasmodiales (97–100) et les TDRs présentent généralement des efficacités inférieures pour sa détection par rapport aux autres espèces.

C'est une espèce peu étudiée et mal connue. Une recherche bibliographique sur le site internet PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) avec les mots clés « *Plasmodium* X [title] » retrouve respectivement 16000 et 3000 publications pour *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* contre seulement 240 pour *Plasmodium ovale* spp. Ceci reflète le gouffre de connaissances qui sépare *Plasmodium ovale* spp de *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*. Bien qu'au regard de l'épidémiologie du paludisme un tel écart soit compréhensible, un travail important sur *Plasmodium ovale* spp est nécessaire. En effet, il est essentiel de mieux comprendre la biologie de cette espèce afin de confirmer par exemple l'existence, encore débattue, des hypnozoïtes (36). De plus, la découverte en 2010 des deux espèces de *Plasmodium ovale* spp, *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* (101) a renforcé le flou sur cette espèce.

c. Rationnel de la division de *Plasmodium ovale* spp

i. Historique de la problématique

En biologie moléculaire, *Plasmodium ovale* spp était historiquement différencié des autres espèces plasmodiales par l'amplification du gène de la *small subunit ribosomal RNA* (*ssRNA*)

encore appelé *ARNr 18S*⁷ (102,103). Efficace dans l'amplification de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* ou *Plasmodium malariae*, elle présentait des résultats insuffisants dans l'amplification de *Plasmodium ovale* spp. De nombreux isolats de *Plasmodium ovale* spp identifiés par microscopie ne pouvaient pas être confirmés par cette PCR (104). Les deux types de *Plasmodium ovale* spp ont alors été appelés *Plasmodium ovale* – "classiques" (donc amplifiés par les PCR historiques) et *Plasmodium ovale* – "variants" (donc non amplifiés par les PCR historiques). Cette difficulté dans l'amplification de certains variants de *Plasmodium ovale* spp a initialement été expliquée par l'existence de spécificités géographiques de séquence, la plupart des *Plasmodium ovale* – "variants" ayant été identifiés en Asie.

ii. De l'hypothèse aux preuves

A la fin des années 2000, l'équipe menée par Sutherland (London School of Hygiene and Tropical Medicine, Malaria Centre) a émis l'hypothèse que ce dimorphisme serait dû à l'existence de deux espèces distinctes. Deux études ont été conduites. La première en Thaïlande et la seconde à Londres, dans les locaux de l'agence de référence du paludisme au Royaume-Uni. La variabilité des gènes de l'*ARNr 18S*, *cytochrome b*, *pog3p*, *porbp2*, *potra* et *podhfr* a été analysée entre les *Plasmodium ovale* spp dits de "type classique" et les *Plasmodium ovale* spp dits de "type variant". Une ségrégation parfaite a été mise en évidence. Aucun marqueur de recombinaison inter- ou intra-génique n'a été détecté, confirmant l'hypothèse initiale que ces deux sous-espèces sont en fait deux espèces distinctes. Différentes preuves leurs ont permis de séparer ces deux espèces :

- Il existe une ségrégation parfaite sur les 5 loci étudiés sur 55 isolats de *Plasmodium ovale* spp, notamment sur le gène du *cytochrome b*, considéré comme un gène de référence dans la distinction des espèces de *Plasmodium*.
- Les deux espèces sont sympatriques⁸ en Afrique et en Asie il ne semble pas y avoir de marqueurs de recombinaison intra ou inter-génique entre elles.

La preuve définitive serait apportée par des tests de reproduction *in vitro* entre les deux espèces. Ceci est malheureusement impossible car *Plasmodium ovale* spp n'est pas cultivable. Les preuves moléculaires sont donc les meilleures preuves dont les scientifiques disposent pour prouver l'existence de ces deux espèces.

⁷ Analogue du gène de l'*ARN ribosomique 16S* des procaryotes. La séquence de ces gènes est très utilisée en analyse de phylogénie ou pour le diagnostic d'espèce.

⁸ La sympatrie désigne l'existence de deux espèces phylogénétiquement proches, vivant sur un même territoire, mais ne s'hybridant pas. Elle s'oppose à l'allopatrie, où les aires géographiques de deux espèces génétiquement proches sont séparées.

Ces deux espèces ont été nommées *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri* en référence à Christopher F. Curtis (1939-2008) et David Walliker (1940-2007), deux chercheurs de l'agence de référence du paludisme britannique. L'appellation *ovale* est conservée pour permettre la continuité dans les travaux concernant cette espèce et faciliter la compréhension.

La date de survenue de la séparation entre *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* est estimée il y a 1 à 5 millions d'années (101). Deux hypothèses principales expliquant cette séparation sont actuellement débattues (105). La première est que deux événements distincts ont conduit l'ancêtre commun aux deux espèces, que l'on peut appeler *Plasmodium ovale ovale*, à infecter deux espèces du genre *Homo*. Ne pouvant pas se retrouver dans le même repas sanguin du moustique lors de la pique, l'hybridation entre les deux espèces est impossible. Le second mécanisme envisagé pouvant expliquer cette séparation est la spéciation allopatrique⁹ (figure 19). Après l'adaptation de *Plasmodium ovale ovale* au genre *Homo* (ou à l'ancêtre du genre *Homo*), cette population de primate a pu se séparer en deux populations distinctes par l'introduction d'une barrière géographique empêchant tout contact.

Dans les deux hypothèses, les deux lignées de *Plasmodium ovale ovale* ont évolué de façon séparée dans leurs hôtes respectifs pour finalement former deux espèces différentes ne pouvant pas recombiner, même lorsqu'elles ont eu l'homme pour hôte commun.

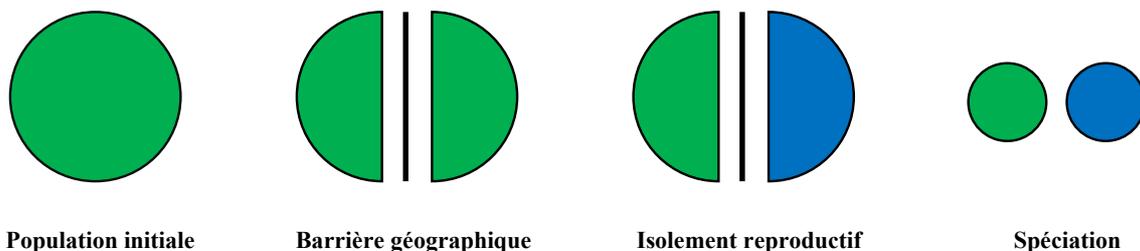


Figure 19 – Spéciation allopatrique.

L'établissement d'une barrière géographique établissant une séparation dans une population initiale (en vert) va avoir pour conséquence l'absence d'échange d'informations entre les deux groupes formés et conduire à un isolement reproductif. Par la suite, si les deux populations (vertes et bleues) se rencontrent à nouveau, les mutations engendrées durant l'isolement reproductif les auront rendues incapables de se reproduire.

d. Comment différencier les deux espèces ?

Plasmodium ovale spp est une espèce difficile à diagnostiquer par microscopie. En 2016, Phuong *et al* (106) ont décrit une absence de granulations de Schüffner plus fréquente chez *Plasmodium ovale wallikeri* que chez *Plasmodium ovale curtisi*. Sur les 45 isolats de

⁹ Mode de spéciation qui se produit lorsque deux populations biologiques de la même espèce sont isolées les unes des autres au point que cela interfère ou empêche le flux de gène.

Plasmodium ovale spp, 8 ne possédaient pas de granulations de Schüffner. Ces 8 isolats étaient tous des isolats de *Plasmodium ovale wallikeri* (sur 27 isolats de cette espèce). Cependant, cette caractéristique n'est ni assez fréquente, ni suffisamment facile à mettre en évidence pour permettre de l'utiliser pour différencier avec certitude les deux espèces.

De plus, aucun TDR ne cible de protéines spécifiques de l'une ou l'autre des deux espèces. L'utilisation de la biologie moléculaire est donc indispensable pour pouvoir les différencier avec certitude.

i. Historique de la biologie moléculaire

La PCR de référence pour l'amplification des *Plasmodium* est une PCR nichée¹⁰ développée en 1993 par Georges Snounou ciblant le gène de l'*ARNr 18S* (102). Pour amplifier *Plasmodium ovale* spp, elle utilisait les amorces rPLU1 et rPLU5 lors la première PCR (réaction pan-plasmodiale) et les amorces rOva1/rOva2 lors de la 2nde PCR (réaction spécifique d'espèce) (figure 20).

Très efficace pour amplifier *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae*, il est très vite apparu que cette PCR nichée ne permettait pas d'amplifier tous les isolats de *Plasmodium ovale* spp¹¹. Des variations de séquence entre les deux types de *Plasmodium ovale* spp sur le gène de l'*ARNr 18S* (107,108), notamment dans les zones ciblées par les amorces rOva1 et rOva2 expliquent cette inefficacité. Afin d'améliorer la sensibilité sur *Plasmodium ovale* spp, les amorces de PCR ont été modifiées en 2002 (rOva1/rPLU2) par la même équipe (109).

Cette modification a permis une légère amélioration mais certains isolats de *Plasmodium ovale* spp ne pouvait toujours pas être amplifiés (110).

Ce n'est qu'en 2007 que l'équipe de Calderaro *et al* a développé une PCR nichée permettant de différencier ces deux variants de façon satisfaisante. Pour cela, les amorces rOVA1/rOVA2 ont été conservées pour les *Plasmodium ovale* – "classique" et les amorces rOVA1v/rOVA2v ont été utilisées pour amplifier les *Plasmodium ovale* spp – "variants" (104). Cependant, ce protocole qui nécessite l'utilisation d'un couple d'amorces spécifiques de chaque espèce et est long. De plus, comme pour tout protocole de PCR nichée, le risque de contamination croisée

¹⁰ Ou réaction en chaîne par polymérase emboîtée. Méthode durant laquelle deux programmes de PCR avec deux couples d'amorces différents sont enchaînés. Elle permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité en comparaison des PCR conventionnelles.

¹¹ Voir I.3.c.i

entre échantillons est important. Des méthodes de PCR quantitative (qPCR)¹² ont donc été développées pour pallier ces différents problèmes.

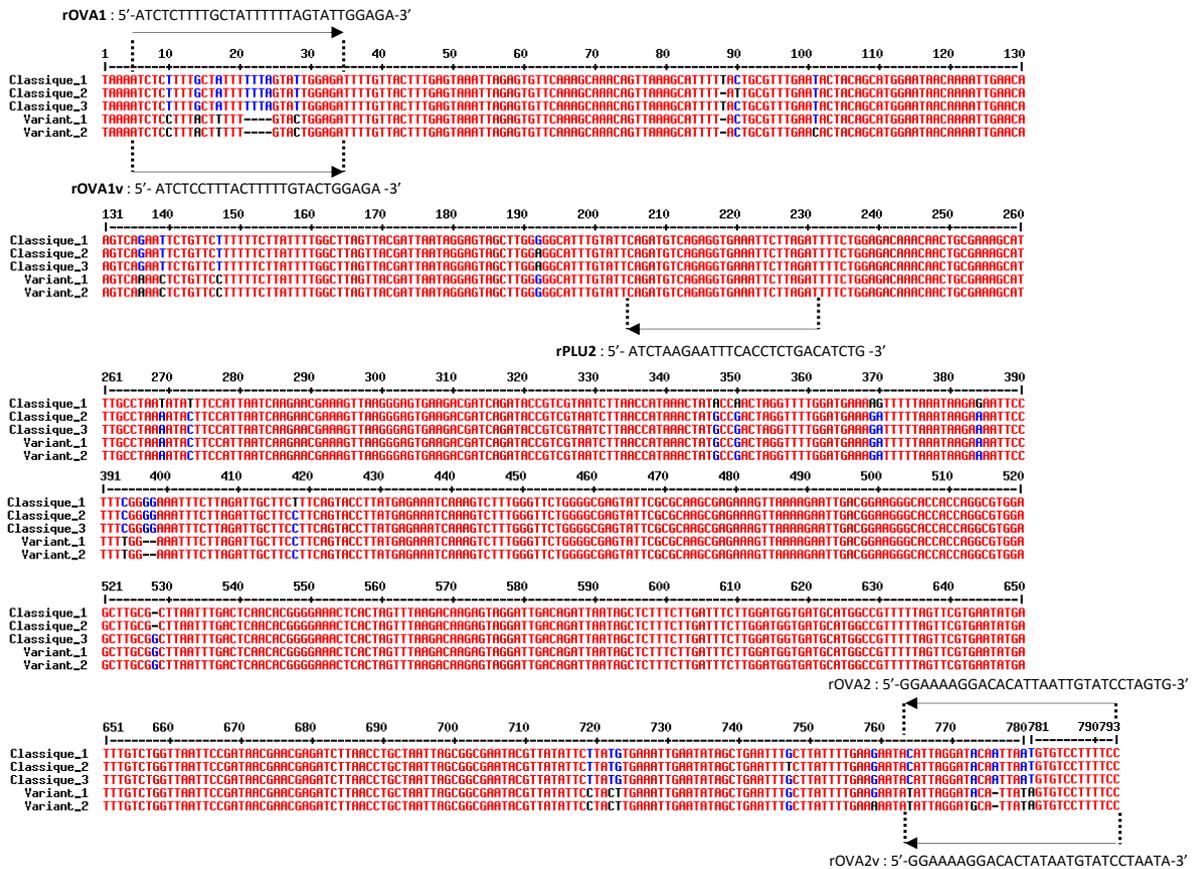


Figure 20 – Alignements de séquences du gène de l'ARNr 18S

Sont représentées des séquences de l'ARNr 18S de *Plasmodium ovale* spp "classiques" (ou *Plasmodium ovale curtisi*) et de *Plasmodium ovale* spp – "variants" (ou *Plasmodium ovale wallikeri*). La position des amorces rOval1, rOval2, rOVA1v, rOVA2v et rPLU2 est indiquée sur la figure. Les amorces rOval1 et rOval2 sont situées sur des zones variables entre les deux espèces, et ne sont parfaitement complémentaires que des *Plasmodium ovale* spp classiques. Ceci explique l'inefficacité de la PCR nichée originale pour amplifier les *Plasmodium ovale* spp "variants". En revanche, l'amorce rPLU2 est située sur une zone conservée entre les deux espèces et permet une amplification de deux espèces. Les amorces rOVA1v et rOVA2v sont complémentaires du gène de l'ARNr 18S des *Plasmodium ovale* spp "variants" et permettent son amplification.

ii. Développement des techniques de qPCR

La première qPCR permettant de différencier *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* a été développée en 2011 (111). Elle utilisait le SYBR Green I comme fluorophore et elle ciblait le gène *reticulocyte binding protein 2 (rbp2)*. De nombreuses qPCR ont été développées, notamment des qPCR-Taqman¹³ ciblant le gène *ssrRNA* (112,113), le gène de la *ldh* (114) ou le gène *rbp2* (115).

¹² Méthode développée à partir de 1992 permettant de suivre en continu la formation du produit de PCR. A présent largement utilisée, elle a remplacé les PCR conventionnelles en permettant une diminution de temps technique et une amélioration de la sensibilité.

¹³ Méthode de qPCR utilisant des sondes d'hydrolyse pour accroître la spécificité des réactions. Elle présente l'inconvénient d'être plus onéreuse que les qPCR conventionnelles.

4. Que sait-on des différences entre *Plasmodium ovale curtisi* et *wallerikeri* ?

a. Répartition géographique

i. Données de la littérature

Plasmodium ovale wallikeri et *Plasmodium ovale curtisi* sont sympatriques et cohabitent dans les mêmes zones géographiques (tableau 1).

Tableau 1 – Répartition géographique de l'origine des cas recensés de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* dans la littérature.

Source : pubmed. Les pays d'origine des cas importés de *Plasmodium ovale* spp du CNRP ne sont pas recensés dans ce tableau. GB = Guinée-Bissau ; GE = Guinée-équatoriale PNG = Papouasie-Nouvelle-Guinée ; RDC = République Démocratique du Congo. Les pays sont classés par ordre décroissant du nombre de cas, de façon séparée pour l'Afrique, l'Asie et l'Océanie.

Pays de contamination	Zone géographique	Poc (%)	Pow (%)	Total	Références bibliographiques
Nigéria	Afrique de l'Ouest	85 (59)	60 (41)	145	(101,106,112,116–122)
GE	Afrique Centrale	64 (56)	50 (44)	114	(111,116–118,121–124)
Ouganda	Afrique de l'Est	31 (49)	32 (51)	63	(101,111,118,119,121,122,124)
Ghana	Afrique de l'Ouest	29 (53)	26 (47)	55	(82,88,94,99,100,102,103,105,106,108,109)
Cameroun	Afrique Centrale	16 (30)	38 (70)	54	(101,106,112,114,116,118,119,121,122,124)
Côte d'Ivoire	Afrique de l'Ouest	32 (62)	20 (38)	52	(101,106,112,114,116–119,121–123)
Angola	Afrique Centrale	19 (43)	25 (57)	44	(116–118,122–124)
Congo	Afrique Centrale	11 (30)	26 (70)	37	(101,106,111,112,116,118,119,122,123)
Sierra-Léone	Afrique de l'Ouest	10 (38)	16 (62)	26	(101,106,116,118,119,121–123,126)
Libéria	Afrique de l'Ouest	11 (46)	13 (54)	24	(106,116,118,121–123,127)
Comores	Afrique de l'Est	7 (39)	11 (61)	18	(114,117)
Mozambique	Afrique de l'Est	6 (25)	10 (75)	16	(101,112,116–119,122,123)
GB	Afrique de l'Ouest	9 (60)	6 (40)	15	(101,117,118,126)
Ethiopie	Afrique de l'Est	3 (30)	7 (70)	10	(117,128)
Guinée	Afrique de l'Ouest	6 (67)	3 (33)	10	(112,116–119,121–123)
RDC	Afrique Centrale	7 (70)	3 (30)	10	(116,118,123)
Tanzanie	Afrique de l'Est	5 (56)	4 (44)	9	(101,106,112,118,119,121,122)
Malawi	Afrique de l'Est	4 (57)	3 (43)	7	(116,119,121)
Tchad	Afrique Centrale	3 (43)	4 (57)	7	(114,116,118,122)
Bénin	Afrique de l'Ouest	2 (33)	4 (67)	6	(101,114,121,122)
Gabon	Afrique Centrale	2 (33)	4 (67)	6	(116,121)
Zambie	Afrique de l'Est	2 (33)	4 (67)	6	(119,121,122,124)
Burkina-Faso	Afrique de l'Ouest	3 (75)	1 (25)	4	(112)
Soudan	Afrique de l'Est	1 (25)	3 (75)	4	(106,118,121,122)
Kenya	Afrique de l'Est	2 (67)	1 (33)	3	(119,121)
Sao-Tome	Afrique Centrale	2 (67)	1 (33)	3	(101)
Senegal	Afrique de l'Ouest	4 (33)	5 (67)	3	(112,129,130)
Togo	Afrique de l'Ouest	1 (33)	2 (67)	3	(118,121)
Burundi	Afrique de l'Est	1 (50)	1 (50)	2	(118,119)
Madagascar	Afrique de l'Est	0 (0)	2 (100)	2	(118,119)
Afrique du Sud	Afrique Australe	1 (100)	0 (0)	1	(116)
Algérie	Afrique du Nord	1 (100)	0 (0)	1	(122)
Lybie	Afrique du Nord	1 (100)	0 (0)	1	(122)
Mali	Afrique de l'Ouest	0 (0)	1 (100)	1	(118)
Niger	Afrique de l'Ouest	1 (100)	0 (0)	1	(116)
Somalie	Afrique de l'Est	1 (100)	0 (0)	1	(121)
Bangladesh	Asie du Sud	16 (48)	17 (52)	33	(110,114)
Thaïlande	Asie	2 (8)	22 (92)	24	(101,126)
Sri-Lanka	Asie du Sud	1 (100)	0 (0)	1	(114)
Vietnam	Asie	1 (100)	0 (0)	1	(101)
PNG	Océanie	0 (0)	2 (100)	2	(101,121)
Total		400 (50)	404 (50)	804	

Environ 400 cas d'infections dues à chaque espèce sont décrits dans la littérature. Les deux espèces sont présentes dans presque tous les pays d'Afrique. Plus de 90% des infections recensées ont été contractées en Afrique, principalement en Afrique de l'Ouest et en Afrique Centrale. Le Nigéria est le pays où le plus de cas de *Plasmodium ovale* spp a été décrit.

ii. Pourquoi les deux espèces ne recombinent-elles pas ?

Malgré leur répartition géographique commune, *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* ne recombinent pas, même lors de co-infections (110,131). L'hypothèse principale permettant le maintien de la barrière d'espèce repose sur l'isolement reproductif¹⁴(105). Afin de confirmer cette hypothèse, Sutherland *et al* ont étudié chez *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* des protéines impliquées dans la reproduction sexuée, notamment la protéine pgs377 (132) (figure 21).



Figure 21 – Alignement des séquences du gène pgs377 chez différentes espèces de Plasmodium. Les différences entre *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* sont entourées en rouge. Pf = *Plasmodium falciparum*, Poc = *Plasmodium ovale curtisi*, Pow = *Plasmodium ovale wallikeri*, Pk = *Plasmodium knowlesi*, Py = *Plasmodium yoelli*, Pb = *Plasmodium berghei* et Pch = *Plasmodium chabaudi*. Issu de Oguike *et al*, International Journal of Parasitology 2015 (132).

Les variations de séquence dans cette protéine, exprimée uniquement par le gamétocyte femelle, pourraient expliquer l'absence de recombinaison naturelle entre *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*.

b. Paramètres biologiques et cliniques

i. Des études incomplètes

Cinq études ont comparé les accès palustres à *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*. Quatre études rétrospectives, incluant respectivement 134, 35, 126 et 77 accès palustres,

¹⁴ On appelle isolement reproductif tout mécanisme empêchant, ou limitant fortement, l'hybridation de deux espèces, même lorsqu'elles sont étroitement apparentées. Cet isolement peut être la conséquence de mécanismes qui font barrière à l'accouplement (comme une barrière géographique), à la fécondation ou qui réduisent la viabilité des œufs ou des individus hybrides qui en sont issus (105).

ont été publiées : l'étude de Nolder *et al* publiée en 2013 (119), l'étude de Rojo-Marcos *et al* publiée en 2014 (117), l'étude de Zhou *et al* publiée en 2018 (122) et l'étude de Frickmann *et al* en 2019 (121). Une étude prospective incluant 79 patients a été publiée en 2018 par Rojo-Marcos *et al* (118). Les cinq études citées ci-dessus ne sont pas toutes exhaustives et les données récoltées sont variables. Les études de Nolder *et al* et Zhou *et al* ont recueilli principalement des données sur l'épidémiologie et sur la durée de latence des infections. L'étude de Frickmann *et al* ne reporte que la parasitémie et la concentration plaquettaire sanguine, sans autres informations cliniques ou biologiques. Les deux études de Rojo-Marcos *et al* sont les plus complètes avec une description précise de la biologie et de la clinique des accès palustres. Enfin, la majorité des travaux reportés dans le tableau 1 n'ont pas collecté de données cliniques et biologiques associées aux accès palustres.

Les études comparatives sur les accès palustres à *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri* sont donc rares dans la littérature. Elles sont généralement axées sur le recueil des données épidémiologiques plutôt que des données cliniques et biologiques. De plus, le nombre de patients inclus est relativement faible et il n'existe qu'une seule étude prospective.

ii. Des études aux résultats discordants

Les deux études de Rojo-Marcos *et al* mettent en évidence une thrombopénie plus importante lors des accès palustres à *Plasmodium ovale wallikeri* (117,118), résultat que ne confirme pas l'étude de Frickmann *et al* (121). Le délai entre la date de retour de la zone d'endémie et le délai des symptômes, appelé délai de latence, est plus court pour *Plasmodium ovale wallikeri* dans l'étude de Nolder *et al* et Zhou *et al* (119,122), ce que ne retrouvent pas les autres études (117,118,121). Les deux études de Rojo-Marcos *et al* ne retrouvent aucune différence de symptomatologie, ni de prise en charge entre *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* (117,118).

c. Et sur les reviviscences ?

i. Données de la littérature

Même si les reviviscences observées avec *Plasmodium ovale* spp sont connues depuis longtemps¹⁵, on ne compte que 18 cas décrits dans la littérature entre 1922 et 2015 (55), hors patients inclus dans des protocoles de malariathérapie. La description des cas est partielle et le diagnostic microscopique, sans aucune preuve moléculaire de la similarité entre l'isolat initial

¹⁵ Voir I.1.a.ii

et l'isolat de la reviviscence. La littérature est, comme pour le reste des caractéristiques de *Plasmodium ovale* spp, très disparate et incomplète sur ce sujet.

L'étude la plus complète a été publiée récemment, en 2019, par Gröger *et al* (133). 26 patients présentant une infection par *Plasmodium ovale* spp ont été inclus, avec un temps de suivi médian de 35 semaines. L'événement de reviviscence a été défini comme la réapparition, confirmée par qPCR, de formes asexuées de *Plasmodium ovale* spp à la suite d'un traitement par artéméther-luméfantrine bien suivi. Un séquençage identique d'au moins deux gènes différents entre l'isolat initial et l'isolat de reviviscence était nécessaire pour confirmer l'accès de reviviscence. C'est la première et unique étude prospective sur la caractérisation des reviviscences à *Plasmodium ovale* spp. De façon intéressante, ils ne mettent en évidence des reviviscences que pour *Plasmodium ovale curtisi*, dans un intervalle de 32 semaines maximum entre l'accès initial et l'accès de reviviscence (figure 22). Aucune reviviscence à *Plasmodium ovale wallikeri* n'est décrite dans cet article, à la différence de précédentes publications (117,119,134).

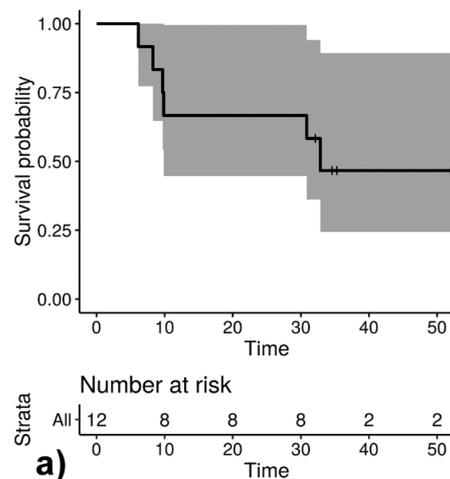


Figure 22 – Courbe de Kaplan-Meier représentant, en semaines, la probabilité de reviviscence pour *Plasmodium ovale curtisi*.

Issu de Gröger *et al*, Clinical infectious disease 2019 (133).

ii. Comment confirmer une reviviscence ?

Il existe donc des discordances dans la littérature sur la capacité des deux espèces à donner des accès de reviviscence. Ceci est étroitement lié à l'absence de méthode permettant de confirmer génétiquement un accès de reviviscence.

En effet, les accès de reviviscence de *Plasmodium ovale* spp sont définis cliniquement. Il manque donc la confirmation génétique que les isolats initiaux et de la reviviscence sont identiques génétiquement. Le séquençage des gènes *Plasmodium ovale tryptophan-rich antigen*

(*potra*) et *Plasmodium ovale reticulocyte binding protein 2 (porbp2)* a été utilisé récemment dans cet optique (133,134). Ces deux gènes font partie du panel utilisé par Sutherland *et al* pour initialement séparer *Plasmodium ovale* spp en *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* (101). Mais, leur utilisation dans le typage des accès reviviscences n'a jamais été validée.

Le polymorphisme du gène *potra* a été étudié par différents auteurs, notamment par Zhou *et al* qui ont inclus une centaine d'isolats de *Plasmodium ovale* spp (111,135,136) (figure 23).

Le gène *potra* y est décrit comme polymorphique dans les deux espèces avec 4 tailles de fragments différents chez *Plasmodium ovale curtisi* et 5 chez *Plasmodium ovale wallikeri*. Cependant, chaque espèce présente de manière majoritaire un des polymorphismes décrits. Nous pouvons alors nous interroger sur l'utilisation du séquençage du gène *potra* pour typer les reviviscences au regard de son relativement faible polymorphisme. Concernant le gène *porbp2*, il n'est pas décrit comme polymorphique en intra-espèce par Sutherland *et al* (101).

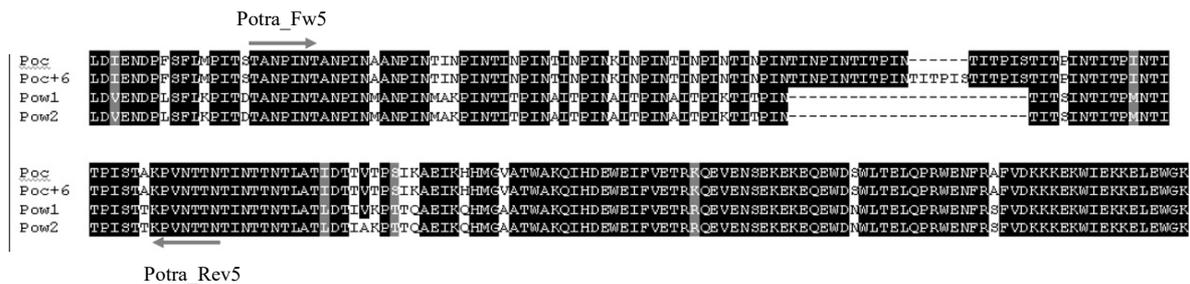


Figure 23 – Alignement des séquences du gène *potra* chez *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri*.

Les deux flèches indiquent le positionnement des amorces utilisées dans la PCR et le séquençage. Issu de Oguike *et al*, International Journal for Parasitology 2011 (111).

5. Le Centre National de Référence du Paludisme

Les Centre Nationaux de Référence pour la lutte contre les maladies transmissibles ont une mission d'expertise, de conseil scientifique, de contribution à la surveillance épidémiologique et d'alerte s'ils constatent un danger de nature à présenter un risque ou une menace sur l'état de santé de la population.

Le CNRP est organisé en 4 laboratoires, un laboratoire coordonnateur (Service de Parasitologie, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP), hôpital Bichat, Paris) et 3 laboratoires associés (Laboratoire de Parasitologie, Institut Pasteur, Cayenne ; Service de Parasitologie, APHP, hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris ; Unité de Parasitologie et Entomologie, Institut de Recherche Biologique des Armées, Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection, Marseille).

Quatre-vingt-cinq Centre Hospitalo-Universitaires (CHU) ou Centres Hospitaliers (CH) étaient correspondants du CNRP en 2019. Ils assurent la saisie en temps réels des données épidémiologiques, cliniques et biologiques de chaque cas en remplissant une fiche électronique (https://ssl.voozanoo.net/palu/scripts/authentify.php?test_cookie=1). La représentativité du réseau en France métropolitaine est stable entre 52% et 53% des cas de paludisme diagnostiqués en France métropolitaine depuis 2006.

II. Travail personnel : étude des accès importés à *P. ovale* spp entre 2013 et 2018

1. Problématique

La capacité de *Plasmodium ovale* spp de donner des infections pauci-parasitémiques et des accès de reviviscence à distance de l'accès initial sont autant de difficultés pour diagnostiquer et traiter cette infection. Il est donc important de mieux connaître les spécificités de *Plasmodium ovale* spp si l'on veut être capable d'éradiquer le paludisme.

Dans la 1^{ère} partie de ce mémoire de DES, les connaissances actuelles sur *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* ont été décrites. Les données sont rares, collectées sur un nombre limité de patients et discordantes entre les études, tant d'un point de vue épidémiologique que clinique et biologique.

De nombreuses questions restent en suspens, notamment sur les caractéristiques des accès palustres associés à ces deux espèces. A l'heure actuelle, il est impossible de conclure formellement sur l'intérêt de différencier *Plasmodium ovale wallikeri* de *Plasmodium ovale* pour une prise en charge optimale des patients infectés.

Différents objectifs ont accompagné ce travail de DES. Tout d'abord, nous avons développé une méthode permettant de différencier *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri*, plus rapide que les PCR nichées et moins chères que les qPCR-Taqman existantes. Grâce à cette méthode, nous avons caractérisé 677 cas de *Plasmodium ovale* spp reçus au CNRP de janvier 2013 à décembre 2018 et analysé les données épidémiologiques, cliniques et biologiques de ces accès palustres. Enfin, ce travail a été complété par l'évaluation de l'efficacité des méthodes diagnostiques standards (notamment les TDRs) et de l'intérêt du séquençage du gène *potra* pour typer génétiquement les reviviscences.

L'ensemble de ce travail a été réalisé au CNRP, à l'hôpital Bichat-Claude Bernard.

2. Matériels et méthodes

Ce paragraphe sera divisé en 2 parties principales ; la 1^{ère} traitera du développement et de la validation de la qPCR permettant de différencier *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* ; la 2nde s'intéressera à l'analyse rétrospective des accès palustres à *Plasmodium ovale* spp reçus au CNRP durant la période allant de janvier 2013 à décembre 2018.

a. Mise au point de la qPCR-HRM

L'objectif était de développer une méthode de différenciation de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*, qui soit :

- Plus rapide qu'une PCR nichée
- Moins coûteuse qu'une qPCR-Taqman

Nous avons choisi de développer une qPCR-High Resolution Melting (HRM). Cette technique présente un mode de révélation innovant jamais utilisé dans cette application et un coût faible.

i. La qPCR-HRM

La qPCR-HRM fait partie des qPCR couplées à une analyse de courbe de fusion qui repose sur deux principes. La première est que ces techniques utilisent des fluorophores qui ont la particularité de ne libérer leur fluorescence, et donc de pouvoir générer un signal mesurable, que lorsqu'ils sont intégrés dans l'ADN double-brin. La seconde est que la molécule d'ADN, lorsqu'elle est soumise à de fortes températures, va être déstabilisée et passer d'un état double brin à un état simple brin (figure 24).

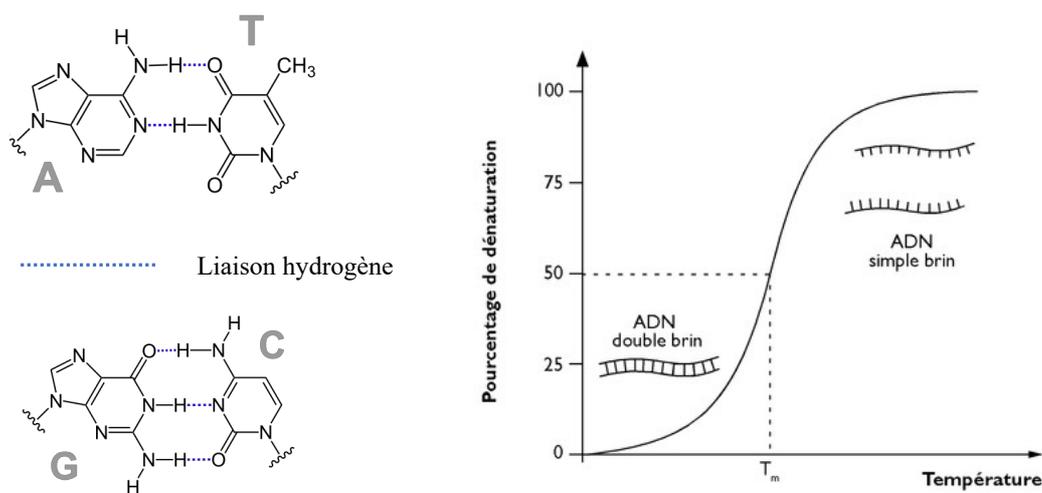


Figure 24 – Principe de la mesure du T_m.

A gauche : représentation de la liaison entre l'adénine (A) et la thymine (T) d'une part et entre la guanine (G) et la cytosine (C) d'autre part. A droite : le T_m correspond à la température à laquelle 50% de l'ADN est sous forme simple brin. Issu de <https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=55559>.

Ces qPCR commencent de façon conventionnelle par 30 à 40 cycles d'amplification au cours desquels le signal de fluorescence va progressivement augmenter à mesure que l'ADN est amplifié. Ces cycles d'amplification sont suivis par une augmentation progressive de la température qui entraîne une rupture des liaisons hydrogènes et sépare les deux brins d'ADN, le faisant passer d'un état double à un état simple brin. Le fluorophore qui s'était intégré lors de la synthèse d'ADN va alors progressivement être libéré et le signal de fluorescence va diminuer. Il sera possible de mesurer une température caractéristique d'une séquence d'ADN donnée, que l'on appelle la température de fusion ou T_m . Ce T_m va notamment être dépendant du pourcentage de guanine (G) et cytosine (C), ces deux bases étant reliées par trois liaisons hydrogènes au lieu de deux pour la liaison entre l'adénine et la thymine, rendant donc leur séparation plus difficile (figure 24).

Ce T_m est également dépendant de la taille de l'amplicon (L) et de la concentration en sel ($[SALT]$), notamment du KCl ¹⁶ et du $MgCl_2$ ¹⁷ (137):

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log \left[\frac{[SALT]}{1.0 + 0.7[SALT]} \right] + 0.41(\%G + C) - \frac{500}{L}$$

L'analyse des courbes de fusion permet de faire la différence entre différents amplicons obtenus par les mêmes amorces de PCR et présentant des différences dans leur séquences d'acides nucléiques (figure 25).

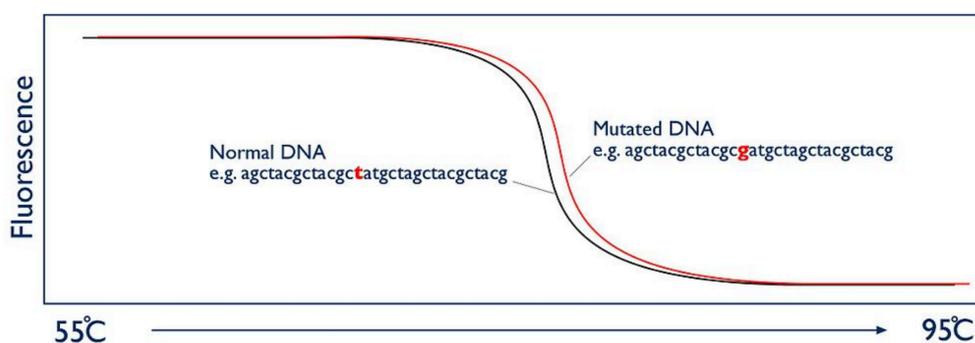


Figure 25 – Exemple d'analyse de courbes de fusion.

Les deux séquences représentées dans l'exemple sont différenciables en analyse de courbes de fusion grâce à leur base différente. Dans cet exemple, le remplacement d'une thymine par une guanine augmente la température de fusion de l'amplicon. Issu de https://fr.wikipedia.org/wiki/High_Resolution_Melt.

¹⁶ Sel permettant de faciliter l'élongation du dimère amorce-ADN. Le K^+ , en se fixant à l'ADN chargée négativement permet de diminuer la répulsion entre l'amorce et l'ADN, chargées négativement.

¹⁷ Cofacteur essentiel de la Taq polymérase, permettant de démarrer la réaction catalytique de l'enzyme.

La première utilisation de PCR en temps réel couplée à une analyse de courbe de fusion date de 1997 avec l'utilisation du LightCycler®, le premier automate de qPCR (138). Le fluorophore utilisé était le SYBR® Green I et ces analyses permettaient de faire la différence entre des séquences différant de plusieurs bases (délétion/insertion notamment) mais pas entre deux séquences qui variaient d'un seul Small Nucleotide Polymorphism (SNP), c'est-à-dire d'une seule base. L'HRM a été développée quelques années plus tard et a permis une analyse plus fine des courbes de fusion (139), notamment grâce à une phase d'augmentation de la température plus lente (0,025°C/s) et plus précise et à l'utilisation d'autres fluorophores, notamment le SYTO9® ou le LCRGreen®.

Les applications de la qPCR-HRM se sont multipliées dans les années 2008-2009, notamment dans l'analyse de l'hétérozygotie du facteur V Leiden ou du gène Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (140,141). L'utilisation de la qPCR-HRM dans la mise en évidence d'agents infectieux est plus rare. On peut citer, à la date du développement de notre méthode, différents travaux notamment sur la différenciation de différents types de *Streptococcus pyogenes* (142) ou plus tardivement une qPCR-HRM permettant de différencier les 4 espèces majoritaires de *Plasmodium* (143).

ii. Collection des échantillons

Des prélèvements sanguins, collectés sur tube Ethylènediaminetétraaétique (EDTA), de patients infectés par l'une des espèces de *Plasmodium* pathogène de l'homme, reçus dans le cadre de l'activité du CNRP entre janvier et août 2015 ont été inclus de façon prospective pour mettre au point la qPCR-HRM. Des contrôles négatifs ainsi que 2 isolats de *Plasmodium knowlesi* ont également été testés.

iii. Extraction de l'ADN

200 µL de sang total ont été extraits à l'aide de l'automate MagNA Pure System (Diagnostics Roche, Bale, Suisse) et élués dans 100 µL de tampon en suivant les recommandations du fabricant. Les ADN extraits ont été conservés à -20°C avant analyse.

iv. Confirmation de l'espèce

Pour chaque échantillon inclus, l'identification de l'espèce plasmodiale a été réalisée par microscopie et qPCR-Taqman (FTD Malaria, Fast-track diagnostics, Launch diagnostics®).

La qPCR-Taqman a été considérée comme la méthode de référence dans le diagnostic de *Plasmodium ovale* spp.

v. Différenciation de *Plasmodium ovale wallikeri* et *curtisi*

Pour différencier les deux espèces sur les isolats de *Plasmodium ovale* spp en qPCR-Taqman, nous avons utilisé une PCR nichée avec des amorces préalablement publiées dans la littérature. La première PCR utilisait les amorces rPLU1 (5'-TCA-AAG-ATT-AAG-CCA-TGC-AAG-TGA-3') et rPLU5 (5'-CCT-GTT-GTT-GCC-TTA-AAC-TTC-3') et permettait d'amplifier les 4 espèces majoritaires de *Plasmodium* (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium ovale*) (109). La seconde PCR utilisait les amorces rOVA1 (5'-ATC-TCT-TTT-GCT-ATT-TTT-TAG-TAT-TGG-AGA-3') et rPLU2 (5'-ATC-TAA-GAA-TTT-CAC-CTC-TGA-CAT-CTG-3') pour amplifier *Plasmodium ovale curtisi* (109) et les amorces rOVA1v (5'-ATC-TCC-TTT-ACT-TTT-TGT-ACT-GGA-GA-3') et rOVA2v (5'-GGA-AAA-GGA-CACTAT-AAT-GTA-TCC-TAA-TA-3') pour *Plasmodium ovale wallikeri* (104)¹⁸. Les mélanges réactionnels de PCR étaient les suivants : 2,2 µL de MgCL₂ à 25 mM, 2 µL de tampon, 0,5 µL de Taq polymerase Gold (Life technologies®), 0,5 µL de dNTPs 10 mM (Roche®), 0,5 µL de chaque amorce et de l'eau pour compléter à 25 µL de volume final.

Les cycles de PCR utilisés étaient les suivants :

	PCR 1	PCR 2	
<i>Dénaturation initiale</i>	7 minutes à 94°C	7 minutes à 94°C	
<i>Dénaturation</i>	40 secondes à 94°C	40 secondes à 94°C	} 40 cycles
<i>Hybridation</i>	2 minutes à 58°C	2 minutes à 58°C	
<i>Élongation</i>	2 minutes à 72°C	2 minutes à 72°C	
<i>Élongation finale</i>	7 minutes à 72°C	7 minutes à 72°C	
	puis 2 minutes à 20°C		

Les produits de PCR ont été visualisés sur un gel d'agarose à 2% avec du Gelred® (10000X, Biotium inc).

Cette PCR a été considérée comme notre méthode de référence pour la différenciation de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*.

¹⁸ Voir figure 20 pour visualiser la position des amorces sur le gène de l'ARNr 18S

vi. Développement de la qPCR-HRM

▪ Gène ciblée et amorces utilisées

Les amorces Plasmo1_F (5'-GTT-AAG-GGA-GTG-AAG-ACG-ATC-AGA-3') et Plasmo2_R (5'-AAC-CCA-AAG-ACT-TTG-ATT-TCT-CAT-AA-3') ont été utilisées pour cibler le gène de l'*ARNr 18S* (144,145). Ce gène est présent en plusieurs copies dans le génome ce qui assure une sensibilité satisfaisante de la PCR. Il présente également des zones variables entre les différentes espèces de *Plasmodium* dans sa séquence. Ces deux caractéristiques en font un candidat intéressant pour le diagnostic d'espèce.

▪ Réaction de PCR

Toutes les qPCR-HRM ont été réalisées sur l'automate Viiia 7 Real-Time PCR system (Applied Biosystems®). Le mélange réactionnel de PCR était composé de 0,3 µM de chaque amorce, de 12,5 µL de MeltDoctor® HRM Master Mix (Life Technologies®, Carlsbad, Etats-Unis), 5 µL d'ADN et de l'eau pour compléter le mélange à 20 µL. Le programme de PCR était le suivant :

<i>Dénaturation initiale</i>	10 minutes à 95°C	
<i>Dénaturation</i>	10 secondes à 95°C	} 40 cycles
<i>Élongation</i>	1 minute à 60°C	
<i>Phase HRM</i>	Augmentation de température de 0,025°C/s	

vii. Évaluation des performances de la qPCR-HRM

La limite de détection, la sensibilité, la spécificité, la répétabilité et la reproductibilité ont été déterminées afin d'évaluer la qPCR-HRM.

Une gamme de dilution de 1 à 40000 parasites/µL réalisée pour chaque espèce a été utilisée pour estimer la limite de détection de la qPCR.

La sensibilité de la PCR a été évaluée à l'aide la formule suivante :

$$\text{Sensibilité} = \left(1 - \frac{\text{Faux négatifs}}{\text{Total}} \right) \times 100$$

Les faux négatifs ont été définis comme les échantillons positifs avec la méthode de référence (qPCR-Taqman) et négatifs avec la qPCR-HRM.

Les échantillons négatifs ont été définis de deux manières :

- Une qPCR-HRM négative avec un Cycle limite¹⁹ (Ct) ≥ 40
- Une qPCR-HRM positive avec un Ct < 40 mais une valeur de Tm non spécifique d'une des cinq espèces majoritaires de *Plasmodium*

La spécificité a été évaluée de deux façons :

- Par la capacité de la qPCR-HRM de différencier *Plasmodium ovale* spp de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi*

$$\text{Spécificité} = \left(1 - \frac{\text{Faux positifs}}{\text{Total}} \right) \times 100$$

Les faux positifs ont été définis comme les échantillons positifs pour une espèce en qPCR-HRM et négatifs pour cette même espèce avec la méthode de référence.

- Par la capacité de la qPCR-HRM de différencier *Plasmodium ovale* spp de *Toxoplasma gondii*, *Leishmania infantum*, *Loa loa*, *Onchocerca volvulus*, *Wuchereria bancrofti* et *Babesia divergens*

La **répétabilité** de la qPCR a été évaluée en utilisant un même échantillon pour chaque espèce 32 fois dans la même série de PCR pour 3 densités parasitaires différentes (3200 p/μL, 640 p/μL et 64 p/μL). Nous avons calculé l'écart-type du Ct comme recommandé dans les MIQE guidelines (146).

La **reproductibilité** de la qPCR a été évaluée comme la concordance dans la valeur des Tm entre différentes séries de PCR pour les mêmes échantillons.

b. Analyse rétrospective des cas de *Plasmodium ovale* spp du CNRP

i. Sélection des échantillons

Sur l'ensemble des échantillons reçus durant la période janvier 2013-décembre 2018, nous avons rétrospectivement inclus :

- Les cas de *Plasmodium ovale* spp déclarés par les correspondants hospitaliers et confirmés par le CNRP

¹⁹ Cycle de PCR à partir duquel la quantité d'ADN amplifiée est mesurable

- Les cas de *Plasmodium non ovale* déclarés par les correspondants hospitaliers diagnostiqués ultérieurement *Plasmodium ovale* spp par le CNRP

Les co-infections entre *Plasmodium ovale* spp et une autre espèce plasmodiale, les accès de reviviscence et les isolats pour lesquels nous n'avions pas l'extrait d'ADN ont été exclus de l'étude.

ii. Confirmation de l'espèce plasmodiale

Le diagnostic initial d'infection à *Plasmodium* a été fait par le laboratoire hospitalier correspondant et confirmé par le CNRP par lecture du frottis et/ou de la goutte épaisse. Une confirmation de l'identification de *Plasmodium ovale* spp par biologie moléculaire était réalisée dans le cadre de l'activité de routine du CNRP. En raison de la longue période d'étude, différentes PCRs ont été utilisées pour confirmer ces diagnostics d'espèce :

- Année 2013 : une PCR nichée utilisant les amorces rPLU1 (TCA-AAG-ATT-AAG-CCA-TGC-AAG-TGA-3') et rPLU5 (CCT-GTT-GTT-GCC-TTA-AAC-TTC-3') dans la PCR 1 et les amorces rOVA1 et rPLU2 dans la PCR 2. Cependant, comme vu précédemment, cette PCR avait une mauvaise sensibilité pour la détection de *Plasmodium ovale wallikeri*. Un séquençage du gène de la pLDH a été réalisé afin de confirmer les infections à *Plasmodium ovale* spp non détectées par la PCR nichée (147)²⁰.
- Année 2014 : une PCR nichée utilisant les amorces rPLU1 et rPLU5 dans la PCR 1 et les amorces rOVA1WC (5'-TGT-AGT-ATT-CAA-ACG-CAG-T-3') et rOVA2WC (5'-TAT-GTA-CTT-GTT-AAG-CCT-TT-3') (148) dans la PCR 2.
- Années 2015 à 2018 : qPCR-Taqman (FTD Malaria, Fast-track diagnostics, Launch diagnostics® de 2015 à 2017 et Bioevolution® en 2018).

Pour différencier *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*, nous avons utilisé la qPCR-HRM précédemment développée dans ce manuscrit.

iii. Collection des données

Lors de la déclaration d'un accès palustre à *Plasmodium ovale* spp, un prélèvement sanguin sur tube EDTA ou sur tube acide citrate dextrose du patient infecté est envoyé par le correspondant hospitalier du CNRP. Celui-ci déclare également le cas sur une base en ligne où des

²⁰ Le séquençage du gène de la LDH permettait de différencier *Plasmodium ovale curtisi*, qui a une pLDH de type O2, de *Plasmodium ovale wallikeri*, qui a une pLDH de type O3.

informations démographiques (lieu de naissance, ethnicité, âge, sexe), épidémiologiques (but du voyage, durée du voyage, pays visité, utilisation ou non de prophylaxie et de moustiquaires), biologiques (densité parasitaire, résultat des TDR, concentration sanguine en leucocytes, hémoglobine avec l'anémie définie < 130 g/L pour les hommes et < 120 g/L pour les femmes (149) et plaquettes avec la thrombopénie sévère définie par une concentration plaquettaire < 50 G/L (150)) et cliniques (date de début des symptômes, déclaration oui/non pour la fièvre, les céphalées, l'asthénie et les arthralgies/myalgies et déclaration libre pour les autres symptômes, prise en charge hospitalière ou ambulatoire du patient, durée d'hospitalisation, médicament utilisé dans le traitement de l'accès palustre). Les critères cliniques et biologiques de gravité, tels que définis par l'OMS et adaptés par la SPILF (44,45) ont également été reportés.

La définition de l'anémie a été adaptée à l'âge et au sexe des patients, selon les recommandations de l'OMS (149). La période de latence de l'infection a été définie par le délai entre le retour de la zone d'endémie palustre et le début des symptômes. Le délai entre le début des symptômes et le diagnostic biologique a également été calculé.

iv. Analyse de l'efficacité des TDRs

Afin d'analyser l'efficacité des TDRs dans la détection de *Plasmodium ovale* spp, nous avons utilisé deux sources de résultats :

- L'évaluation interne au CNRP réalisée dans le cadre de l'activité de routine avec une utilisation des TDRs Core Malaria Pan/Pv/PfTM (Core Diagnostics Ltd®) et Binax Now Pf/PanTM (Alere®) pour les années 2015 et 2016 et des TDRs Palutop+4 Pan/Pv/PfTM (Biosynex®) et Vikia Malaria Ag Pf/PanTM (Imacess®) pour les années 2017 et 2018. Les TDRs Core Malaria Pan/Pv/PfTM et Palutop+4 Pan/Pv/PfTM détectent la protéine pLDH et les TDRs Binax Now Pf/PanTM et Vikia Malaria Ag Pf/PanTM détectent la protéine aldolase comme protéine commune aux 5 espèces majoritaires du paludisme (151)
- Les résultats de la base de déclaration en ligne Voozanoo du CNRP (https://ssl.voozanoo.net/palu/scripts/authentify.php?test_cookie=1).

v. Analyse de la répartition géographique des cas

Afin de représenter la répartition des cas de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* selon le pays de contamination ou le centre hospitalier ayant réalisé le diagnostic, nous avons utilisé le module ggplot2 du logiciel R (152).

c. Séquençage et analyse du gène *potra*

Le séquençage du gène *potra* a été réalisé après amplification d'un fragment du gène par une PCR nichée.

i. Amorces utilisées

Les amorces PoTRA_fwd3 (5'-GCA-CAA-AAA-TGG-TGC-TAA-CC-3') et PoTRA_rev3 (5'-ATC-CAT-TTA-CCT-TCC-ATT-GC-3') pour la PCR n°1 et les amorces PoTRA_fwd5 (5'-ACG-GCA-AAC-CCG-ATA-AAC-AC-3') et PoTRA_rev5 (5'-GTG-TTT-GTA-GTA-TTT-ACA-GG-3') pour la PCR n°2 ont été utilisées pour amplifier le gène *potra*. La taille attendue du fragment 1 de PCR est de 787 pb et la taille du fragment 2 est comprise entre 227 et 355 selon l'espèce et le polymorphisme (figure 26).

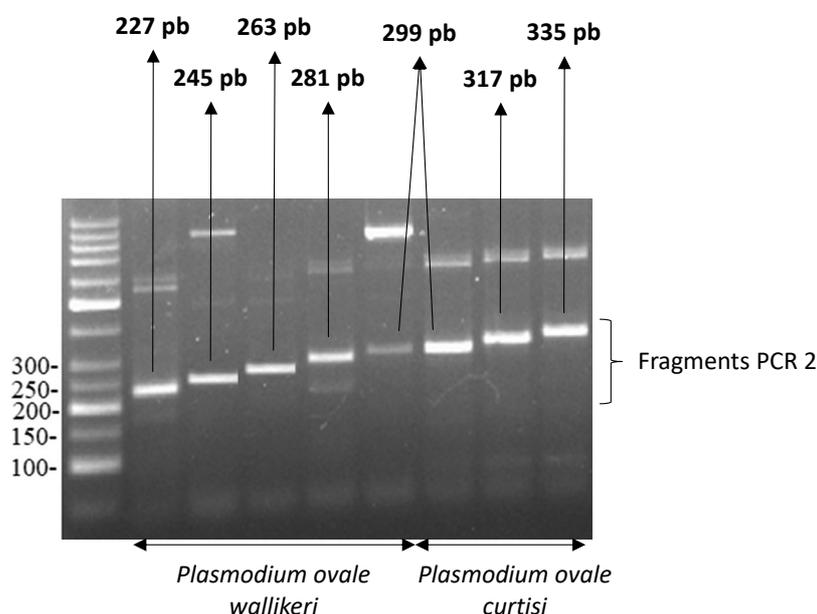


Figure 26 – Tailles des bandes attendues pour la PCR amplifiant le gène *potra* pour *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*.

Image adaptée de Zhou *et al*, Malaria Journal 2018 (136).

ii. Protocoles de PCR

2,5 µL de tampon, 2 µL de dNTPs à 2,5 mM, 3 µL de MgCl₂, 0,5 µL de chaque amorce, 0,125 µL de Taq polymérase et de l'eau pour compléter à 25 µL ont constitués les mélanges réactionnels des PCR n°1 et n°2. Les cycles de PCR étaient les suivants :

	PCR 1	PCR 2	
Dénaturation initiale	10 minutes à 95°C	10 minutes à 95°C	
Dénaturation	15 secondes à 95°C	15 secondes à 95°C	} 35 cycles
Hybridation	30 secondes à 56,9°C	30 secondes à 52,1°C	
Élongation	1 minutes à 72°C	1 minutes à 72°C	
Élongation finale	5 minutes à 72°C	5 minutes à 72°C	
	puis 2 minutes à 20°C		

iii. Séquençage

Un séquençage Sanger bidirectionnel du produit de la PCR n°2 a été réalisé à l'aide du kit BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher®).

iv. Analyse des séquences

Les séquences des amplicons ont été analysées grâce au logiciel Sequencher (Genecodes®, USA) en utilisant les séquences HM594180 et HM594183 (111), et MG588148-150 et MG588152 et MG588154 (136) comme séquences de référence. Les séquences obtenues ont été traduites en acides aminés à l'aide d'un outil bioinformatique en ligne (<https://web.expasy.org/translate/>).

d. Analyses statistiques

Les variables quantitatives ont été exprimées sous la forme médiane [25^{ème}-75^{ème} percentile]. Le test T de Student a été utilisé pour comparer les variables quantitatives si les conditions de validité du test étaient validées. Pour vérifier ces conditions, les variances ont été comparées avec le test de Levene et la normalité des distributions vérifiée avec le test de Kolmogorov-Smirnov avec la correction de Lilliefors. Si l'une de ces deux conditions de validité n'était pas présente, le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les médianes.

Les variables qualitatives ont été exprimées sous la forme nombre (pourcentage). Les pourcentages des différentes variables qualitatives ont été comparés avec le test du Chi-2 ou le test de Fisher si un des effectifs utilisés dans la comparaison était inférieur à 5.

Tous les tests statistiques ont été réalisés grâce au logiciel R (152).

3. Résultats

Dans cette partie du manuscrit, nous détaillerons dans un premier temps les résultats de la mise au point de la qPCR-HRM et nous analyserons les résultats comparatifs entre la qPCR-HRM et la PCR nichée de référence dans la différenciation entre *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*. Ensuite, nous présenterons en plusieurs parties les résultats de l'analyse rétrospective des cas de *Plasmodium ovale* reçus au CNRP entre janvier 2013 et décembre 2018 afin de faciliter la lecture. Enfin, nous finirons sur l'analyse de la diversité du gène *potra* au sein des deux espèces.

a. Validation de la qPCR-HRM

i. Analyse *in silico*

Une validation *in silico* des amorces Plasmo1_F et Plasmo2_R a été réalisée préalablement aux essais de qPCR. Afin de vérifier la complémentarité des amorces et l'existence de polymorphisme dans la zone ciblée entre les deux espèces, des séquences du gène de l'*ARNr 18S* issues d'une analyse de Whole Genome Sequencing (WGS) de *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri* (153) ont été utilisées. Ce gène a été identifié dans les chromosomes 2, 3, 5 et 10 pour les deux espèces. Seuls les gènes dans les chromosomes 2 et 5 de *Plasmodium ovale curtisi* et les chromosomes 5 et 10 de *Plasmodium ovale wallikeri* étaient complets et ont été analysés par la suite. D'autres séquences du gène de l'*ARNr 18S* téléchargées à partir de la plateforme National Center for Biotechnology Information (NCBI ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ont été ajoutées dans l'analyse. Les alignements des séquences des chromosomes 5 d'une part et des chromosomes 2 et 10 d'autre part sont présentés figure 27 et 28. Les amorces présentaient une complémentarité parfaite pour les séquences du chromosome 2 de *Plasmodium ovale curtisi* et du chromosome 10 de *Plasmodium ovale wallikeri*. En comparaison des séquences de *Plasmodium ovale curtisi*, une insertion de deux guanines est retrouvée dans l'ensemble des séquences de *Plasmodium ovale wallikeri* étudiées.

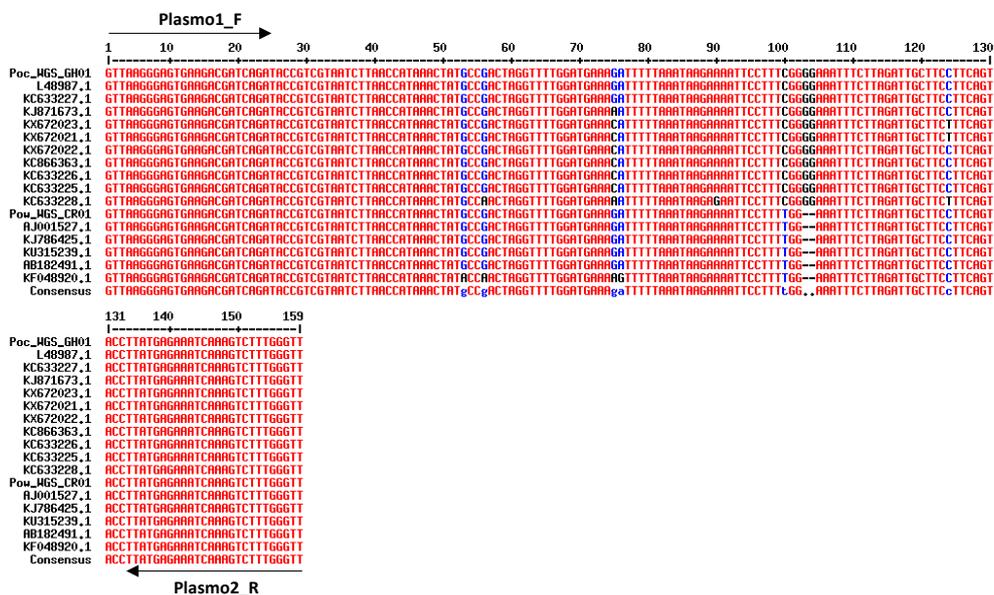


Figure 27 – Alignements des séquences du gène de l'*ARNr 18S* du chromosome 2 de *Plasmodium ovale curtisi* et du chromosome 10 de *Plasmodium ovale wallikeri*.

Séquences du chromosome 2 de *Plasmodium ovale curtisi* : L48987, KC633225-3228 ; KX672021-2023 ; KC866363. Séquences du chromosome 10 de *Plasmodium ovale wallikeri* : AJ001527 ; KJ786425 ; KU315239 ; AB182491 ; KF048920. Le SNP en position 100 et l'insertion de 2 guanines en position 103 et 104 sont deux polymorphismes stables entre les deux espèces. Les amorces Plasmo1_F et Plasmo2_R utilisées lors de la qPCR-HRM sont positionnées sur les alignements de séquence. L'alignement des séquences a été réalisé grâce au logiciel multalin (154).

En revanche, l'affinité de l'amorce Plasmo2_R pour les séquences du chromosome 5 n'était pas parfaite avec un défaut d'appariement sur une base en 3' de l'amorce. Ce mésappariement

pourrait être responsable d'une sensibilité de PCR moins importante ou même d'un défaut total d'amplification. Dans la suite des analyses *in silico*, nous n'avons de fait étudié que les séquences des chromosomes 2 et 10.

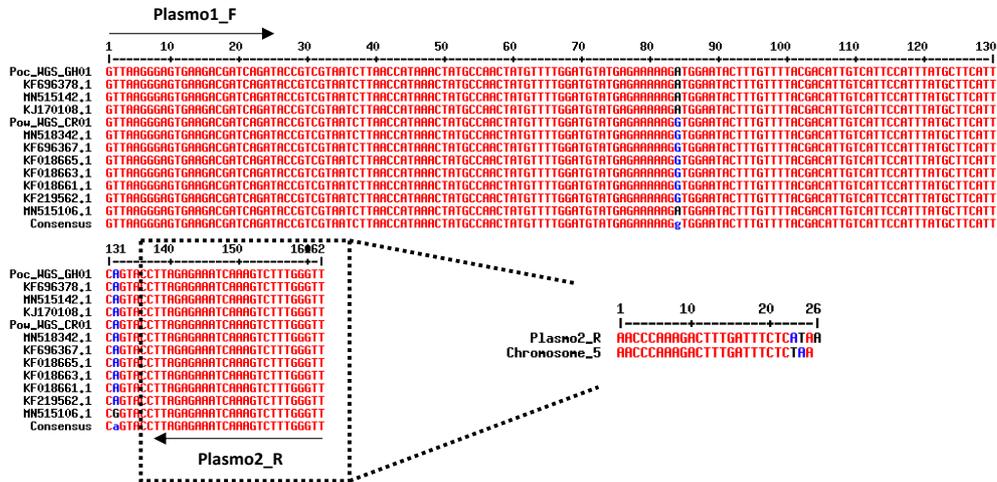


Figure 28 – Alignement des séquences du gène de l'ARNr 18S du chromosome 5 de *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri*.

Séquences du chromosome 5 de *Plasmodium ovale curtisi* : MN515106 ; KF6966378 ; MN515142 ; KJ170108. Séquences du chromosome 5 de *Plasmodium ovale wallikeri* : MN518342 ; KF696367 ; KF018665 ; KF219562.

Le SNP en position 84 est stable entre les deux espèces. Les amorces Plasm1_F et Plasm2_R utilisés lors de la qPCR-HRM sont positionnées sur les alignements de séquence. L'alignement des séquences a été réalisé grâce au logiciel multalin (154). Le mésappariement entre l'amorce Plasm2_R et les séquences du chromosome 5 est présenté.

A l'aide du logiciel uMELT (<https://dna-utah.org/umelt/umelt.html>) (155), nous avons modélisé *in silico* les Tm attendus pour les séquences de l'ARNr 18S des chromosome 2 de *Plasmodium ovale curtisi* et chromosome 10 de *Plasmodium ovale wallikeri* (figure 29).

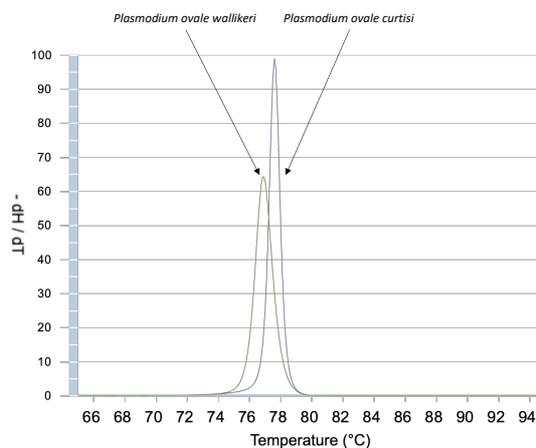


Figure 29 – Prédiction *in silico* des Tm des séquences de l'ARNr 18S du chromosome 10 de *Plasmodium ovale wallikeri* et du chromosome 2 de *Plasmodium ovale curtisi*.

La différence de température entre les deux Tm (> 0,5°C) est suffisante entre les deux Tm pour nous permettre de différencier les deux espèces en qPCR-HRM.

ii. Isolats utilisés pour la validation de la qPCR-HRM

La qPCR-HRM a été validée en deux étapes. Dans un premier temps, nous avons inclus 356 échantillons (25 échantillons négatifs, 219 échantillons positifs pour *Plasmodium falciparum*, 69 pour *Plasmodium ovale* spp, 20 pour *Plasmodium malariae* et 17 pour *Plasmodium vivax*, ainsi que 6 co-infections (4 *Plasmodium ovale* spp + *Plasmodium falciparum*, 2 *Plasmodium ovale* spp + *Plasmodium malariae*)) pour analyser l'efficacité de la qPCR-HRM dans la distinction de *Plasmodium ovale* spp des autres espèces. Dans un second temps, nous avons analysé l'efficacité de la qPCR-HRM pour différencier *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium curtisi* sur un total de 261 isolats de *Plasmodium ovale* spp (137 *Plasmodium ovale wallikeri* et 124 *Plasmodium ovale curtisi*).

iii. Profil des différentes espèces en analyse de courbe de fusion

Plasmodium vivax et *Plasmodium malariae* présentaient des profils avec un seul Tm alors que *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium ovale* spp présentaient des profils avec deux Tm (tableau 2).

Tableau 2 – Valeur des Tm obtenus en qPCR-HRM.

NA = Non Attribué

	<i>Plasmodium falciparum</i> (n=219)	<i>Plasmodium vivax</i> (n=17)	<i>Plasmodium malariae</i> (n=20)	<i>Plasmodium ovale wallikeri</i> (n=368)	<i>Plasmodium ovale curtisi</i> (n=309)
Tm₁	72,892 +/- 0,1	74,798 +/- 0,1	73,926 +/- 0,18	71,196 +/- 0,31	70,580 +/- 0,27
Tm₂	75,396 +/- 0,11	NA	NA	73,401 +/- 0,26	73,750 +/- 0,27

Pour ces derniers, la présence de plusieurs Tm en analyse de courbe de fusion est probablement la conséquence des polymorphismes entre les différentes copies du gène de l'*ARNr 18S*.

iv. Comparaison aux méthodes de référence

- Discrimination entre *Plasmodium ovale* spp et les autres espèces

Le tableau 3 présente les résultats obtenus en qPCR-HRM comparés aux résultats obtenus en qPCR-Taqman, méthode de référence dans le diagnostic d'espèce de *Plasmodium*. Les discordances entre les deux techniques sont en rouge dans le tableau 3.

La qPCR-HRM a présenté des résultats concordants dans 94% des cas avec la qPCR-Taqman. Les spécificités pour *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium ovale* spp étaient respectivement

de 98% et 99%. La sensibilité de la qPCR-HRM, calculée comme précédemment défini²¹, était de 97%.

Tableau 3 – Comparaison des résultats obtenus en qPCR-HRM et qPCR-Taqman.

Les résultats en rouge représentent les discordances entre les deux techniques. Pf = *Plasmodium falciparum* ; Pv = *Plasmodium vivax* ; Pm = *Plasmodium malariae* ; Po = *Plasmodium ovale* spp

qPCR-Taqman	qPCR-HRM							Total
	Pf	Pv	Pm	Po	Pf + Po	Pm + Po	Négatif	
Pf	209	1	0	0	0	0	9	219
Pv	1	16	0	0	0	0	0	17
Pm	0	2	16	0	0	0	2	20
Po	0	0	3	66	0	0	0	69
Pf + Po	3	0	0	0	1	0	0	4
Pm + Po	0	0	1	1	0	0	0	2
Négatif	0	0	0	0	0	0	25	25
Total	213	19	20	67	1	0	36	356
Spécificité	98%	84%	80%	99%	100%	NA	NA	NA

Les principales limites de cette qPCR-HRM étaient donc les suivantes :

- Une sensibilité inférieure à la qPCR-Taqman (11 faux négatifs)
- Des erreurs d'identification d'espèce, notamment entre *Plasmodium malariae* et *Plasmodium ovale* spp (n=3)
- L'absence de détection des co-infections (une seule détectée sur six).

▪ Différenciation entre *Plasmodium ovale wallikeri* et *curtisi*

Afin de valider notre qPCR-HRM, nous avons caractérisé 261 isolats de *Plasmodium ovale* spp avec la méthode de référence et notre méthode en parallèle²². Les profils de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* sont présentés figure 30.

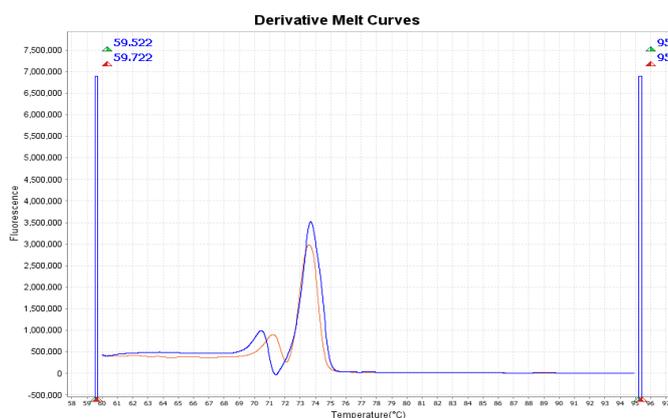


Figure 30 – Profil de *Plasmodium ovale wallikeri* (en orange) et *Plasmodium ovale curtisi* (en bleu) en analyse de courbe de fusion.

²¹ II.2.a.vii

²² Voir II.2.a.v

La distribution des Tm pour *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* est présentée figure 31. La courbe de Gauss, représentative d'une distribution normale théorique, a été calculée sur la moyenne et l'écart-type de la distribution de chacun des Tm. Elle est représentée pour chaque Tm en orange.

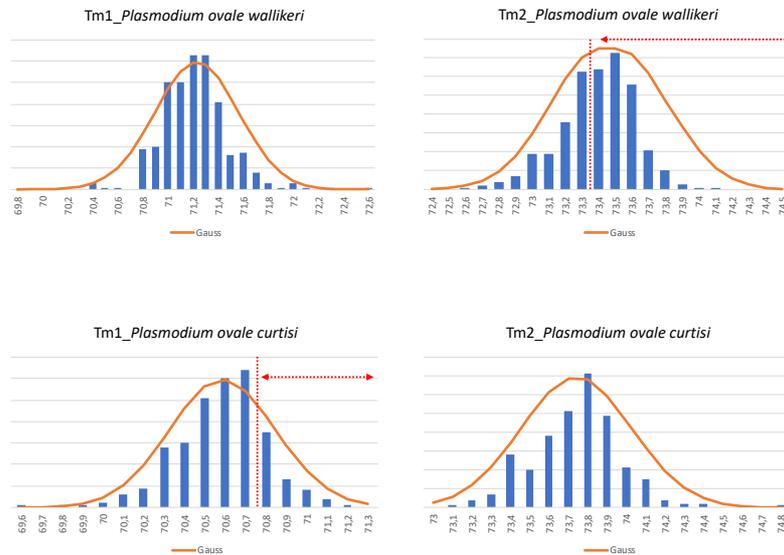


Figure 31 – Distribution de la valeur des Tm pour *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*. La loi normale est représentée par la courbe orange et la distribution de valeurs de Tm obtenus par les histogrammes bleus. Pour le Tm₂ de *Plasmodium ovale wallikeri*, la flèche en pointillée indique la zone également couverte par le Tm₂ de *Plasmodium ovale curtisi*. Pour le Tm₁ de *Plasmodium ovale curtisi*, la flèche en pointillée indique la zone également couverte par le Tm₁ de *Plasmodium ovale wallikeri*.

Les distributions observées des Tm₁ et Tm₂ des deux espèces ne suivent pas une loi normale ($p < 0,001$; test de Kolmogorov-Smirnov). La distribution observée (représentée par les histogrammes bleus) et la courbe de Gauss théorique présentent en effet un décalage sur les graphiques présentés figure 31.

Ces graphiques permettent de mettre en évidence qu'un recouvrement entre les Tm des deux espèces est possible (signalé par les flèches en pointillés rouges). Dans certains cas, l'utilisation des valeurs brutes des Tm n'est donc pas suffisante pour permettre de différencier *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*. Une interprétation du profil des courbes de fusion de façon globale est nécessaire pour caractériser les deux espèces. L'intervalle entre le Tm₁ et le Tm₂ pour chaque espèce, appelé $\Delta(Tm_2 - Tm_1)$, a été calculé.

Les deux espèces ont des valeurs de $\Delta(Tm_2 - Tm_1)$ différents. La comparaison à notre méthode de référence a permis de déterminer une valeur discriminante entre les deux espèces. L'utilisation de ce $\Delta(Tm_2 - Tm_1)$ avec une valeur $<$ à 2,70 pour *Plasmodium ovale wallikeri* et $>$

2,83 pour *Plasmodium ovale curtisi* permet d'obtenir des résultats identiques à la méthode de référence dans 100% cas sans erreur d'identification (figure 32).

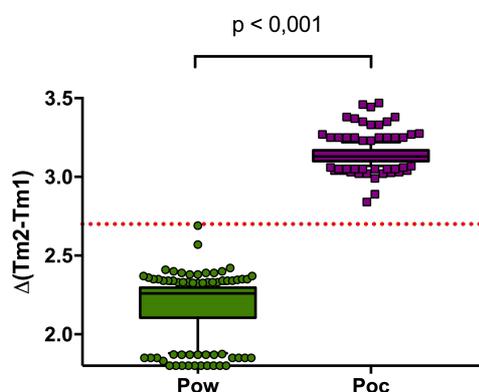


Figure 32 – Représentation du $\Delta(Tm_2-Tm_1)$ pour *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*. La distribution est représentée sous forme de « boîte à moustache ». La ligne horizontale pleine dans les « boîte à moustache » pour chaque espèce indique la médiane. La ligne rouge en pointillé représente la valeur discriminante entre les deux espèces.

v. Performances analytiques de la qPCR-HRM

La limite de détection de la qPCR-HRM a été évaluée à environ 1 parasite/ μ L, résultat similaire à d'autres types de qPCR (143).

La répétabilité pour *Plasmodium ovale curtisi* a été évaluée entre 0,38 et 0,49 écart-type de Ct selon la densité parasitaire. La répétabilité pour *Plasmodium ovale wallikeri* a été évaluée entre 0,55 et 1,26 écart-type de Ct selon la densité parasitaire.

Les recommandations éditées dans les MIQE Guidelines n'incluent pas le calcul reproductibilité de la qPCR si elle n'est pas à visée quantitative (146). La reproductibilité des Tm a été calculée en remplacement. Elle est de 0,18 à 0,25% et de 0,20 à 0,47% pour les Tm₁ de *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri* et de 0,17 à 0,54% et de 0,19 à 0,24% pour les Tm₂.

b. Rationnel utilisé dans l'étude

Malgré son intérêt dans la différenciation de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*, la qPCR-HRM présente certaines limites à prendre en compte pour son application en routine au laboratoire.

La première limite majeure de cette qPCR-HRM est le risque de faire des erreurs entre *Plasmodium ovale* spp et *Plasmodium malariae* dans le diagnostic d'espèce. Ces erreurs sont dues à une caractéristique de *Plasmodium ovale* spp qui, dans 3% des cas, présentent des profils à un seul Tm. Ce Tm résiduel est constamment le Tm₂ et présente une valeur entre 73 et 74°C

dans la majorité des cas. Cet intervalle de température est également l'intervalle de Tm de *Plasmodium malariae*. Les deux espèces ne sont alors pas différenciables (figure 33).

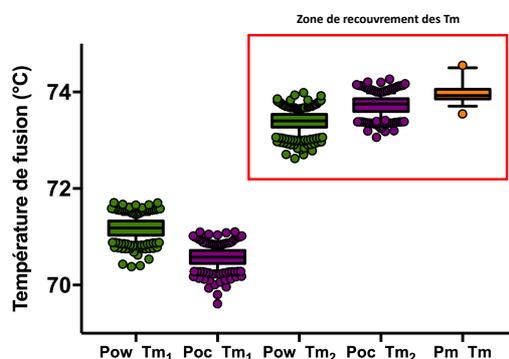


Figure 33 – Représentation de la distribution des Tm.

Plasmodium ovale wallikeri est représenté en vert, *Plasmodium ovale curtisi* en violet et *Plasmodium malariae* en orange. Les distributions sont représentées sous forme de « boîte à moustache ». La ligne horizontale dans chaque « boîte à moustache » indique la médiane. La zone de recouvrement des Tm est encadrée en rouge. Les Tm₂ des *Plasmodium ovale* spp et le Tm de *Plasmodium malariae* ont des valeurs proches qui ne permettent pas de différencier les deux espèces sur ce seul Tm.

La seconde limite est la non-détection des associations d'espèces, notamment entre *Plasmodium ovale* spp et *Plasmodium falciparum*.

Pour pallier ces deux limites, un rationnel de diagnostic a été mis en place au CNRP. Le diagnostic d'espèce est confirmé par qPCR-Taqman et l'identification spécifique de *Plasmodium ovale wallikeri* ou *Plasmodium ovale curtisi* réalisée par qPCR-HRM. Lorsque le profil en analyse de courbe de fusion ne présente qu'un seul Tm (<5% des cas) ou que l'infection est mixte, une PCR nichée est réalisée afin de différencier *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* (figure 34).

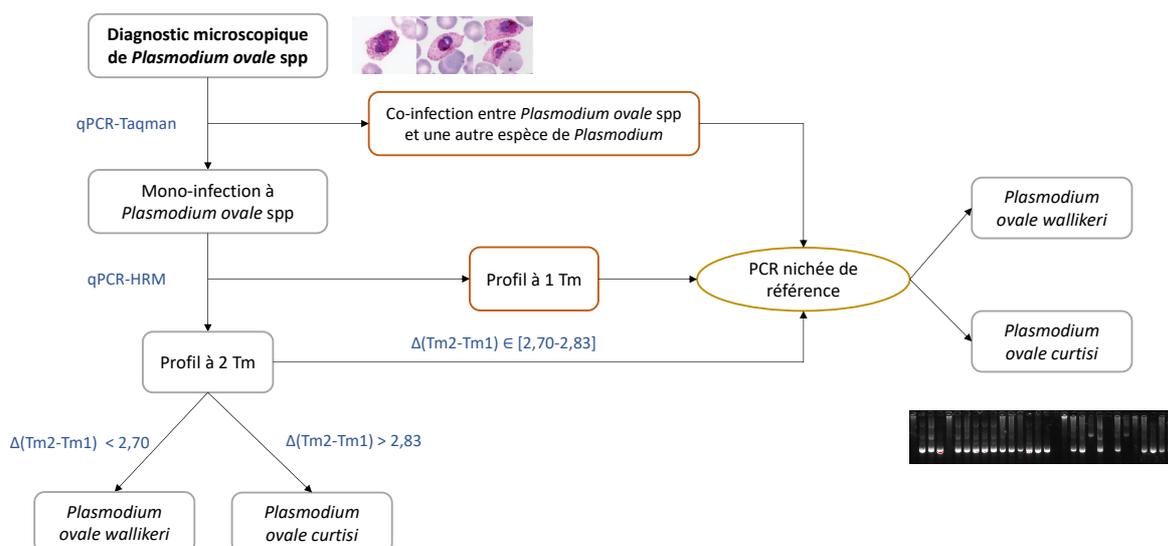


Figure 34 – Représentation schématique du rationnel utilisé pour différencier *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*.

La qPCR-HRM permet de différencier les deux espèces dans plus de 95% des cas à l'aide du calcul du $\Delta(Tm_2-Tm_1)$.

c. Analyse des accès palustres à *Plasmodium ovale wallikeri* et *curtisi*

i. Description de la cohorte rétrospective

▪ Nombre d'inclusions

De janvier 2013 à décembre 2018, 15028 infections à *Plasmodium* ont été déclarées au CNRP, dont 765 étaient des infections à *Plasmodium ovale* spp. Les co-infections (n=130) et les isolats pour lesquels nous ne disposions pas de l'ADN du parasite (n=17) ont été exclus de la suite des analyses (figure 35). 677 infections à *Plasmodium ovale* spp ont été analysées après réinclusion de 59 infections initialement mal diagnostiquées : 368 infections à *Plasmodium ovale wallikeri* et 309 infections à *Plasmodium ovale curtisi* ont été ainsi caractérisées.

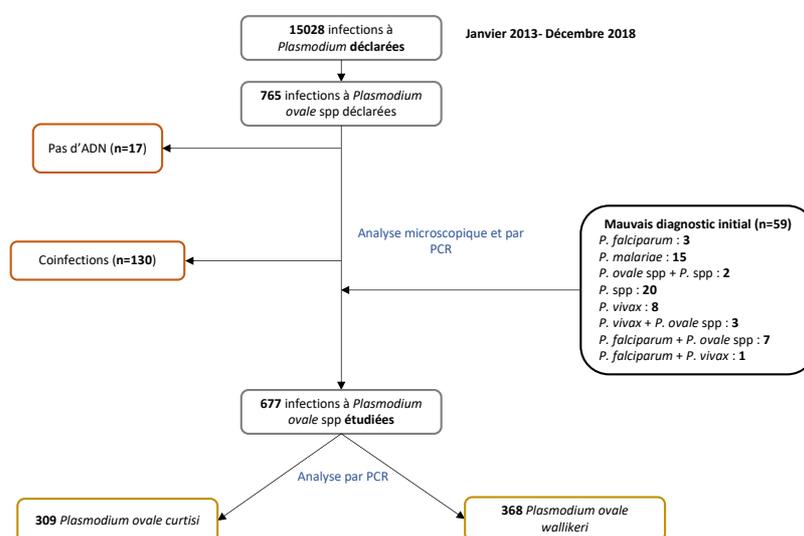


Figure 35 – Résumé de l’inclusion des infections à *Plasmodium ovale* spp.

▪ Répartition temporo-spatiale des cas

La figure 36 représente la répartition des cas selon l’année (A) ou le mois d’inclusion cumulé sur l’ensemble de la période d’étude (B).

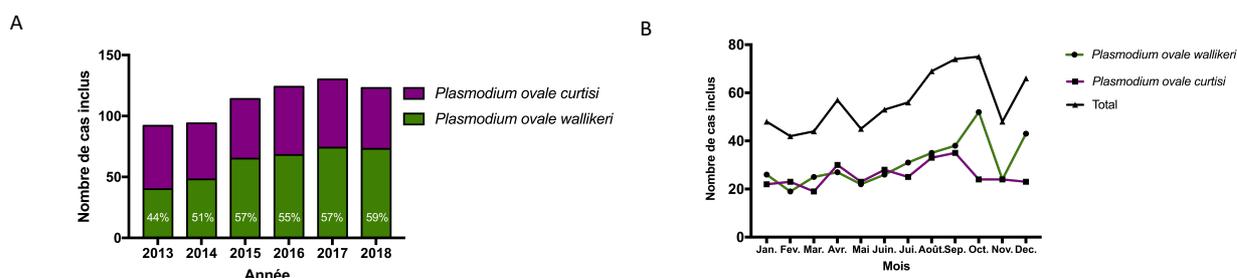


Figure 36 – Répartition des cas de *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri* selon l’année (A) ou le mois cumulé d’inclusion (B).

La proportion de cas à *Plasmodium ovale wallikeri* a augmenté entre 2013 et 2018 pour représenter de 44 à 59% des cas d'infections à *Plasmodium ovale* spp. Les deux espèces avaient une répartition par mois similaire hormis pour le mois d'octobre où un pic était observé pour *Plasmodium ovale wallikeri*.

La répartition des cas selon le centre hospitalier déclarant a été étudiée. L'analyse s'est limitée aux cas déclarés en France métropolitaine (figure 37). L'Île-de-France était le plus gros pourvoyeur de cas avec 343 déclarations d'infections à *Plasmodium ovale* spp, majoritairement à Paris (170 cas), en Seine-Saint-Denis (74 cas) et dans le Val-de-Marne (59 cas). Pour le reste de la France, seul le département de la Haute-Garonne a recensé plus de 30 cas (33 cas). En Île-de-France, l'hôpital Bichat (n=41 cas), l'hôpital du Kremlin-Bicêtre (n=30 cas), l'hôpital Delafontaine à Saint-Denis (n=30 cas), l'hôpital Robert-Debré (n=27 cas) et l'hôpital Avicenne (n=17 cas) étaient les plus gros centres déclarants.

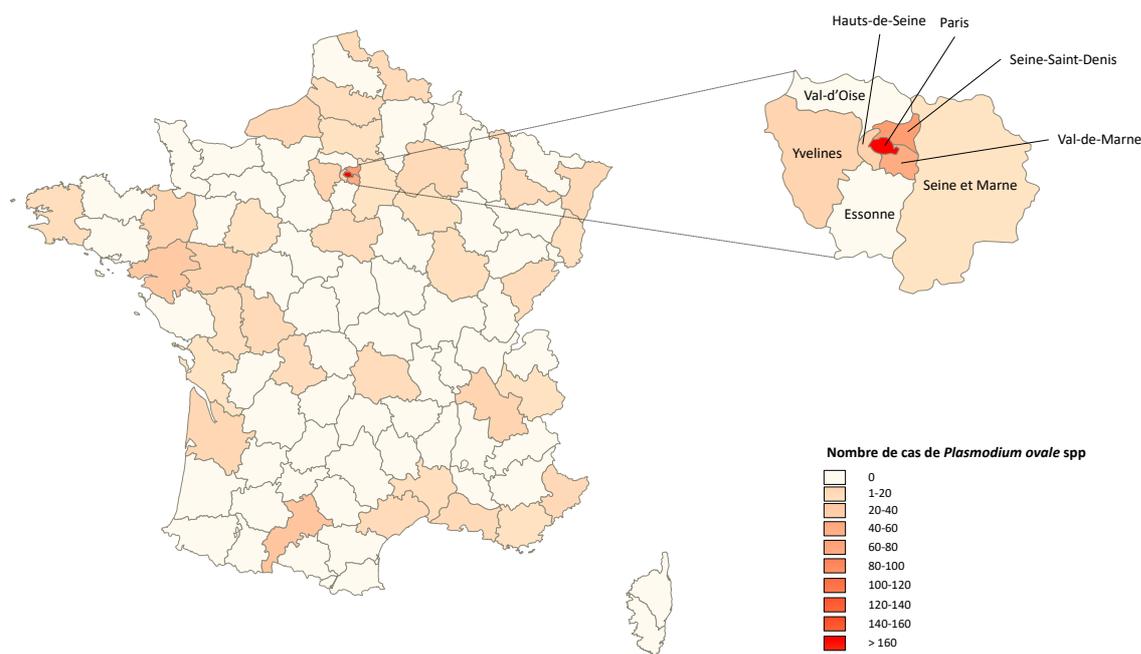


Figure 37 – Répartition des cas de *Plasmodium ovale* spp en France métropolitaine selon le centre hospitalier déclarant.

ii. Données démographiques et épidémiologiques des patients inclus

Les données démographiques et épidémiologiques des patients infectés par *Plasmodium ovale wallikeri* ou *Plasmodium ovale curtisi* ont été étudiées et comparées (tableau 4).

Les deux populations étaient similaires en termes d'âge (figure 38), de genre, d'ethnie, de profil de patient, de prise de chimioprophylaxie et d'utilisation de moustiquaires.

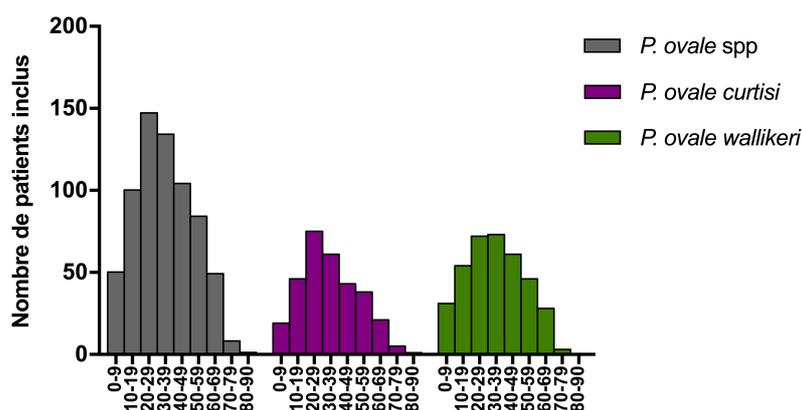


Figure 38 – Pyramide des âges de la cohorte.

Le nombre de patients inclus par tranche d'âge est indiqué pour *Plasmodium ovale* spp (en gris foncé), *Plasmodium ovale curtisi* (en violet) et *Plasmodium ovale wallikeri* (en vert).

Les trois traitements principaux déclarés en chimioprophylaxie étaient la doxycycline (48%), l'atovaquone-proguanil (25%) et la méfloquine (18%) avec un pourcentage similaire d'infection après un traitement chimioprophylaxique déclaré bien suivi quel que soit le médicament utilisé (47% pour la doxycycline, 32,2% pour l'atovaquone-proguanil et 58,3% pour la méfloquine).

Tableau 4 – Caractéristiques démographiques et épidémiologiques des patients infectés par *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*.

Caractéristiques	<i>Plasmodium ovale curtisi</i> (n=309)	<i>Plasmodium ovale wallikeri</i> (n=368)	p-value
Âge (années)	31 [21-47]	34 [21-47]	0,973
0-14 ans, N (%)	39 (12.6)	57 (15.5)	0,287
Genre (ratio F/H)	36.6	38.6	0,716
Ethnie : N (%)			0,502
Africain	200 (74.3)	239 (75.7)	
Caucasien	64 (23.8)	68 (21.5)	
Asiatique	2 (0.7)	1 (0.3)	
Autre	3 (1.2)	8 (2.5)	
Si Africain, lieu de naissance : N (%)			0,420
Afrique	144 (83.2)	164 (80)	
Pays hors-zone d'endémie	29 (16.8)	41 (20)	
Profil de patient : N (%)			0,192
Migrant ¹	23 (11.6)	21 (8.6)	
Voyageur ²	137 (68.8)	187 (77.3)	
Visites famille et/ou amis	109 (79.6)	152 (81.3)	
Tourisme	6 (4.4)	8 (4.3)	
Travail	22 (16)	27 (14.4)	
Résident	19 (9.5)	20 (8.3)	
Expatrié	6 (38.6)	10 (50)	
Humanitaire	13 (61.4)	10 (50)	
Militaire	20 (10.1)	14 (5.8)	
Durée du séjour (jours)	58 [29-91]	50 [24-91]	0,106
Chimioprophylaxie : N (%)			0,882

Oui :	97 (40)	123 (39.3)	
Complète	35 (44.9)	42 (43.8)	
Incomplète	43 (55.1)	54 (56.2)	
Arrêt prématuré	26 (60.5)	36 (66.7)	
Prise occasionnelle	17 (39.5)	18 (33.3)	
Pas de précision	19 (NA)	27 (NA)	
Non	146 (60)	190 (60.7)	
Utilisation de moustiquaire : N (%)			0,119
Oui	48 (26.7)	41 (20.2)	
Non	130 (73.3)	162 (79.8)	

¹Une personne qui est née et qui vit en Afrique

²Une personne qui vit hors zone d'endémie palustre

Le pays de contamination des patients est présenté figure 39. La Côte d'Ivoire (32,2%), le Cameroun (20,1%), la Guinée (8,1%) et la République Centrafricaine (7,9%) étaient les 4 principaux pays de contamination. Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre la répartition géographique de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* ($p=0,52$). Un seul cas de contamination *Plasmodium ovale* spp était décrit en dehors d'Afrique, au Bélize, pays d'Amérique centrale.

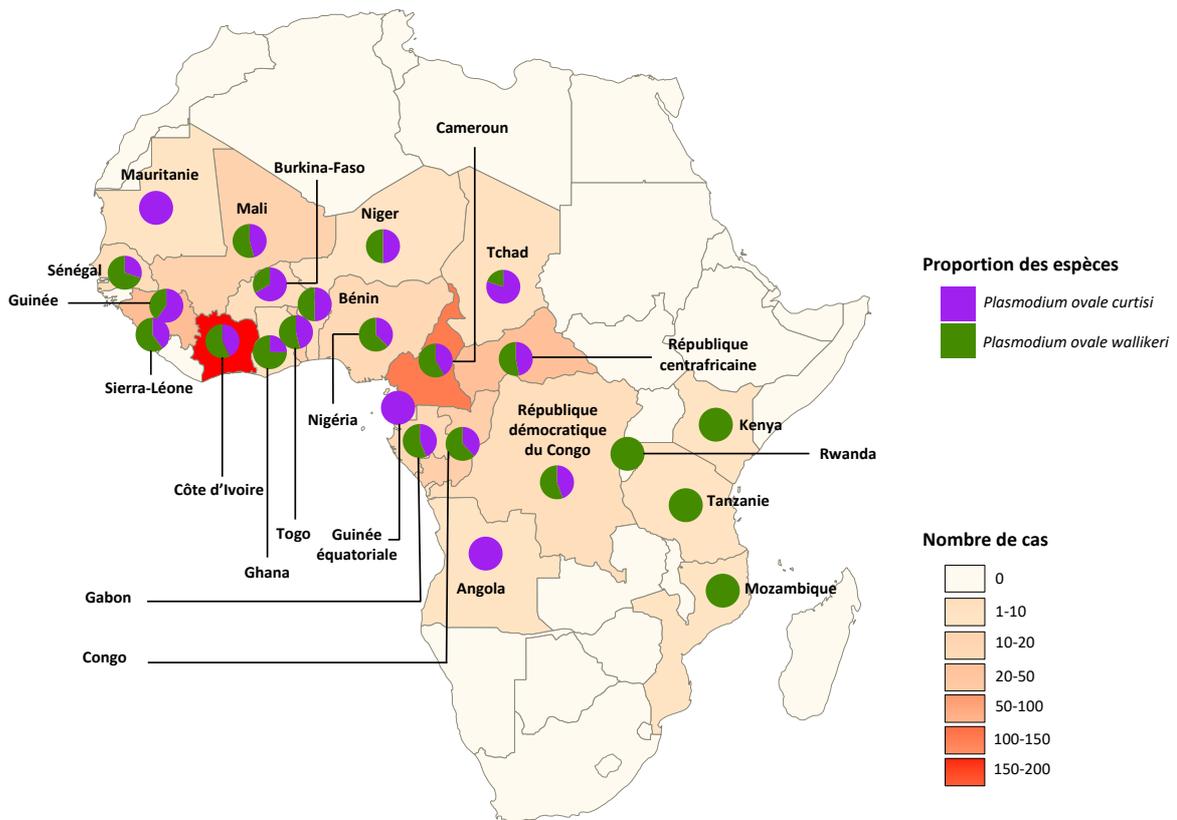


Figure 39 – Lieux de contamination des accès palustres à *Plasmodium ovale* spp importés en France métropolitaine durant la période 2013-2018.

iii. Efficacité des TDRs dans la détection de *Plasmodium ovale* spp

L'efficacité de deux TDRs détectant l'aldolase (Vikia (Biomérieux®) et Binax Now (Alere®)) et de deux TDRs détectant la pLDH (Palutop+4 (Biosynex®) et Core Malaria (Fumouze®)) a été étudiée (tableau 5).

Tableau 5 – Comparaison de l'efficacité des TDR détectant l'aldolase ou la pLDH dans le diagnostic de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*

TDRs	Densité parasitaire (p/μL)	LDH			Aldolase		
		Po	Pow	Poc	Po	Pow	Poc
Positifs, N (% ¹)		55 (10.6)	45 (16)	10 (4.2)	211 (47.8)	120 (50)	91 (45.3)
	<1,000, N (% ²)	5 (3.9)	3 (3.9)	2 (3.9)	25 (19.5)	16 (20)	9 (17.6)
	1,000-5,000 (% ²)	15 (9.4)	14 (15)	1 (1.5)	65 (40.6)	42 (54.5)	23 (33.8)
	5,000-10,000 (% ²)	6 (7.8)	5 (12)	1 (2.8)	44 (57.1)	24 (66.7)	20 (57.1)
	10,000-50,000 (% ²)	16 (16.2)	11 (20)	5 (11.4)	67 (67.7)	29 (78.4)	38 (86.4)
	>50,000 (% ²)	13 (86.7)	12 (86)	1 (100)	10 (100)	9 (100)	1 (100)
Négatifs, N (% ¹)		465 (89.4)	237 (84)	228 (95.8)	230 (52.2)	120 (50)	110 (54.7)
p-value ³				<0,001			0,322

¹Pourcentage de positifs ou négatifs dans chaque espèce

²Pourcentage de positifs dans la catégorie de densité parasitaire

³Les proportions de TDRs LDH et aldolase positifs et négatifs ont été comparés pour *Plasmodium ovale wallikeri* (Pow) et *Plasmodium ovale curtisi* (Poc)

Les TDRs détectant l'aldolase étaient plus efficaces que les TDRs détectant la pLDH pour la détection des deux espèces (47,8% vs 10,6%, $p < 0,001$). Les TDRs détectant la pLDH étaient plus efficaces pour détecter *Plasmodium ovale wallikeri* (16% vs 4,2%, $p < 0,001$). De façon attendue, la sensibilité des TDRs était associée à la densité parasitaire avec une augmentation de la sensibilité lorsque la densité parasitaire augmentait.

La densité parasitaire des infections pour lesquelles un résultat de TDR aldolase était positif était supérieure à la densité parasitaire des infections pour lesquelles un TDR aldolase était négatif (6612 [2410-14175] vs 1287 p/μL [450-4500], $p < 0,001$), pour les deux espèces. Ceci était également vrai pour les infections avec un TDR pLDH positif comparé aux infections avec un TDR pLDH négatif pour *Plasmodium ovale wallikeri* (11000 [3960-52910] vs 3227 [551-7118], $p < 0,001$) (figure 40).

Les densités parasitaires des infections avec TDR pLDH négatifs ou positifs pour *Plasmodium ovale curtisi* n'ont pas été étudiées en raison du faible pourcentage de TDRs positifs.

Le Vikia® était plus efficace que le Binax Now® dans la détection des infections à *Plasmodium ovale* spp (59,3% de TDR positifs pour le Vikia® vs 40,9% de TDR positif pour le Binax Now®, $p < 0,001$). Il présentait une meilleure sensibilité que le Binax Now® avec des parasitémies médianes de 4230 p/μL [1205-9450] pour les Vikia® positifs et de 8350 p/μL [4032-16166] pour les Binax Now® positifs, $p < 0,001$) (figure 41).

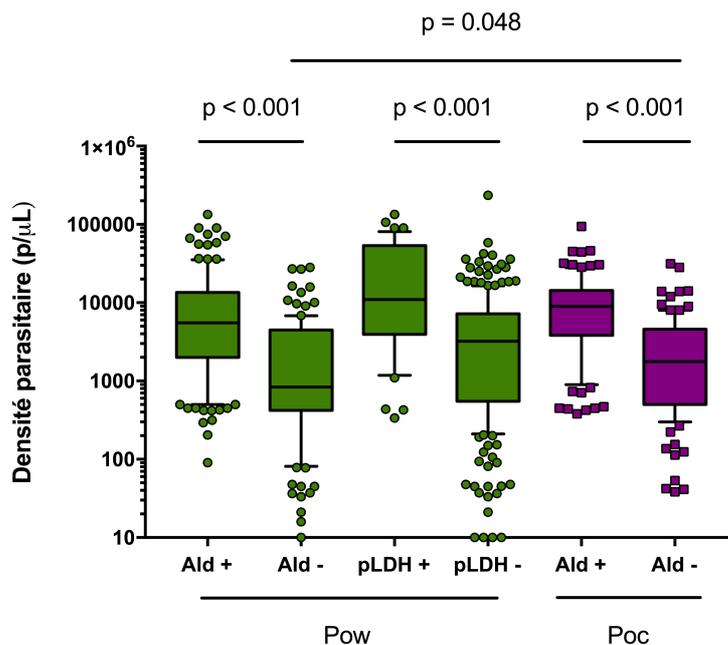


Figure 40 – Comparaison des densités parasitaires des infections avec TDR positif ou négatif.

Les densités parasitaires associées aux résultats de détection de l'aldolase ou de la pLDH par un TDR sont présentées sous formes de « boîte à moustache » pour les deux espèces. Les densités parasitaires pour *Plasmodium ovale wallikeri* sont représentées en vert et les densités parasitaires pour *Plasmodium ovale curtisi* sont représentées en violet. La barre horizontale dans chaque « boîte à moustache » représente la médiane. Seules les densités parasitaires de *Plasmodium ovale wallikeri* sont présentées pour les TDRs détectant la pLDH.

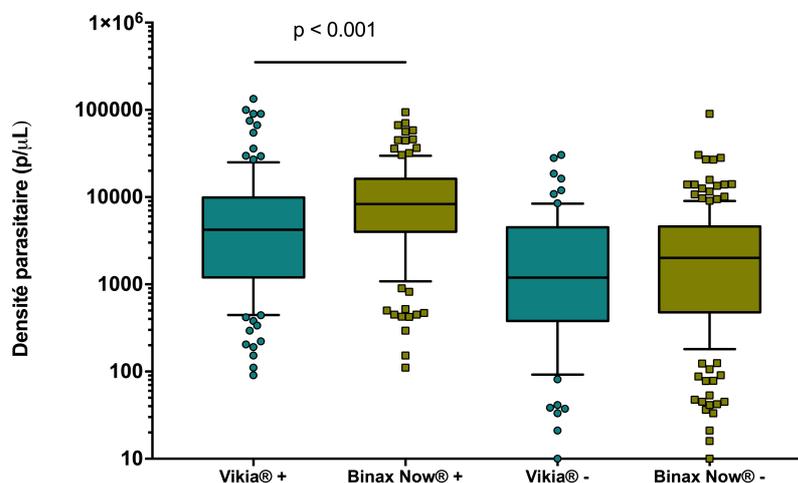


Figure 41 – Comparaison des densités parasitaires des TDRs positifs et négatifs Vikia® et Binax Now®.

Les densités parasitaires globales, des TDRs positifs ou des TDRs négatifs sont présentées sous forme de « boîte à moustache ». La barre horizontale dans chaque « boîte à moustache » représente la médiane. La densité parasitaire médiane des TDRs Vikia® positifs est inférieure à celle des TDRs Binax Now® positifs.

Ceci semblait être lié à une moins bonne sensibilité du Binax Now® que le Vikia® dans la détection de *Plasmodium ovale curtisi* avec des parasitemies médianes de 10513 p/μL [5535-18963] pour le Binax Now® et de 6320 p/μL [2602-12105] ($p=0,005$) pour le Vikia®.

iv. Caractéristiques biologiques et cliniques des accès palustres

Les caractéristiques biologiques et cliniques des accès palustres à *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* sont résumées dans le tableau 6.

Tableau 6 – Caractéristiques biologiques et cliniques des accès palustres à *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*

Caractéristiques	<i>Plasmodium ovale curtisi</i>	<i>Plasmodium ovale wallikeri</i>	p-value
Densité parasitaire (p/μL), médiane [IQR]	4500 [1094-10197]	3970 [598-9240]	0.112
Leucocytes (G/L), médiane [IQR]	5.6 [4.4-7.1]	5.2 [4.1-6.5]	0.0501
Hémoglobine (g/L), médiane [IQR]	127 [113-140]	126 [114-139]	0.855
Plaquettes (G/L), médiane [IQR]	111 [84-145]	94 [70-130]	<0.001
< 75000, N (%)	56 (19.4)	104 (31)	
75000-150000, N (%)	168 (58.1)	174 (51.9)	0.003
> 150000, N (%)	65 (22.5)	57 (17.1)	
Thrombopénie sévère , N (%)	13 (4.5)	25 (7.5)	0.123
Délai diagnostique (jours), médiane [IQR]	5 [3-7]	4 [2-7]	0.583
Délai de latence (jours), médiane [IQR]	72 [18-208]	34 [10-95]	<0.001
< 50 jours, N (%)	87 (42.4)	150 (59.5)	<0.001
Symptômes,			
Fièvre, N (%)	262 (95.6)	316 (97.8)	0.125
Arthralgies/Myalgies, N (%)	120 (54.8)	138 (57.7)	0.525
Asthénie, N (%)	105 (58)	133 (61.3)	0.506
Mal de tête, N (%)	151 (68.6)	201 (75.3)	0.103
Anorexie	5	4	
Diarrhées	13	18	
Douleurs abdominales	28	29	
Nausées	16	20	
Vomissements	24	13	
Toux	6	12	
Traitement , N (%)			0.00359
Chloroquine	147 (54.8)	152 (47.8)	
CTA	46 (17.1)	93 (29.2)	
Artéméter + Luméfantrine	11 (25.5)	39 (41.9)	
Artésunate	2 (4.3)	5 (5.4)	
Artéminol + pipéraquline	33 (70.2)	49 (52.7)	
Atovaquone + proguanil	64 (23.9)	64 (20.1)	
Méfloquine	3 (1.2)	0 (0)	
Quinine	8 (3)	9 (2.9)	
Type d'accès palustre,			0.927
Accès palustre simple, N (%)	293 (97.7)	335 (97.4)	
Accès grave, N (%)	3 (1)	5 (1.5)	
Asymptomatique, N (%)	4 (1.3)	4 (1.1)	
Hospitalisation , N (%)	158 (55.4)	196 (60.3)	0.243
Durée d'hospitalisation (jours), médiane [IQR]	2 [1-3]	3 [1-4]	0.0732
Hospitalisation en soins intensifs/soins continus, N (%)	1 (2.2)	7 (11.3)	0.134
Hospitalisation en service <i>conventionnel</i> , N (%)	46 (97.8)	55 (88.7)	

Les infections à *Plasmodium ovale wallikeri* étaient responsables de thrombopénies plus profondes que les infections à *Plasmodium ovale curtisi* ($p < 0,001$) mais la proportion de thrombopénies sévères, définies par une concentration plaquettaire < 50 G/L (150), était

similaire entre les deux espèces (7,5% vs 4,5%). Aucune différence n'a été mise en évidence concernant la symptomatologie des accès palustres entre les deux espèces. Un pourcentage similaire d'infections étaient classées comme graves (1% pour *Plasmodium ovale curtisi* et 1,5% pour *Plasmodium ovale wallikeri*).

42,3% des patients adultes (≥ 15 ans) de notre cohorte présentaient une anémie, plus fréquemment chez les femmes que chez les hommes (61% des femmes vs 32% des hommes, $p < 0,001$) (figure 42), sans différence au sein de chaque sexe entre *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*. 69% des enfants (< 15 ans) présentaient une anémie.

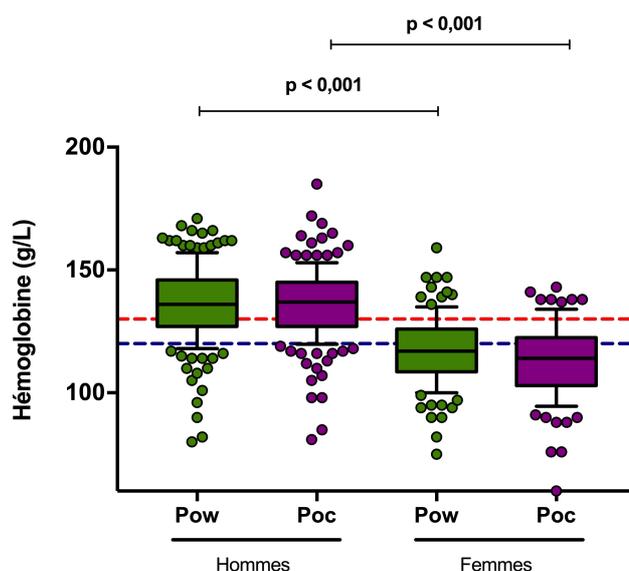


Figure 42 – Concentration sanguine en hémoglobine chez l'homme (à gauche) ou la femme (à droite) de plus de 15 ans.

Les distributions sont représentées sous forme de « boîte à moustache ». La barre horizontale dans chaque « boîte à moustache » représente la médiane. La ligne pointillée rouge représente la limite pour définir une anémie chez l'homme (130 g/L). La ligne pointillée bleue représente la limite pour définir une anémie chez la femme (120 g/L). Les bornes utilisées sont celles définies par l'OMS (149).

L'anémie était principalement mineure (entre 110 et 119 g/L chez la femme et entre 110 et 129 g/L chez l'homme) chez les adultes (69%) et modérée (définie par une concentration en hémoglobine comprise entre 70 et 99 g/L chez l'enfant de moins de 5 ans, entre 80 et 109 g/L chez l'enfant entre 5 et 14 ans) chez les enfants (61%).

Les infections à *Plasmodium ovale wallikeri* présentaient un délai de latence (délai entre le retour de la zone d'endémie palustre et le début des symptômes) inférieur aux infections à *Plasmodium ovale curtisi* ($p < 0,001$), plus fréquemment inférieur à 50 jours ($p < 0,001$). Un allongement de cette durée de latence était observé chez les patients déclarant prendre une chimioprophylaxie complète (30 jours [8-125] vs 90 jours [47-177], $p < 0,001$). La prise de chimioprophylaxie incomplète n'avait en revanche pas d'effet sur le délai de latence, qui était

identique aux patients ne prenant pas de chimioprophylaxie (33 jours [17-112] vs 30 jours [8-125]).

Les militaires présentent un délai de latence supérieur aux autres patients (109 [57-159] vs 40 jours [12-142], $p=0,0018$), de même que les Caucasiens comparés aux Africains (84 jours [28-140] vs 42 jours [12-147] ; $p=0.005$). Il n'existait en revanche pas de différence entre les Africains nés en Afrique et les Africains nés en dehors d'une zone d'endémie palustre (53 [12-170] vs 35 jours [11-117]).

Enfin, nous avons analysé le délai de latence des infections contractées en Afrique de l'Ouest en fonction du mois de diagnostic de l'infection. La période d'étude a été séparée en deux : une saison de transmission intense du paludisme de août à octobre, telle que définie par Nabarro *et al* (156), et une saison de transmission faible du paludisme de novembre à juillet. Le délai de latence était plus court pour les patients diagnostiqués durant la saison de transmission intense que pour les patients diagnostiqués durant la saison de faible transmission, quelle que soit l'espèce (figure 43).

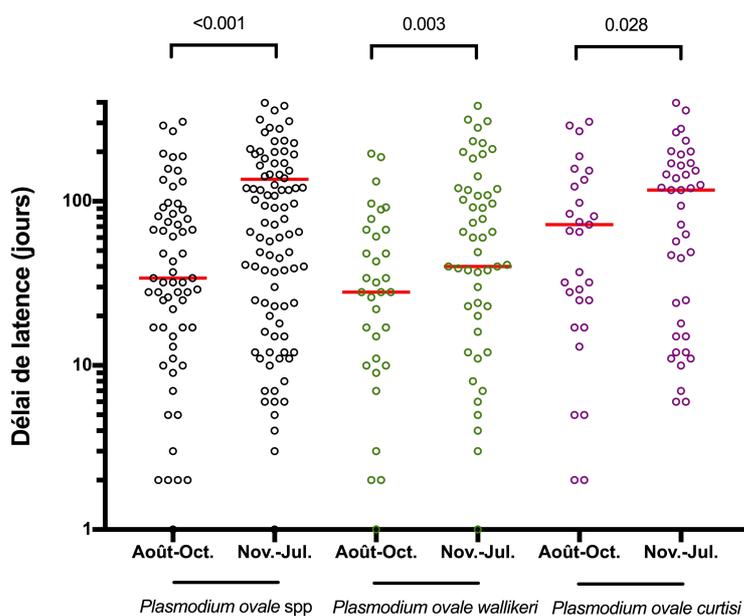


Figure 43 – Délai de latence selon la saison.

Août-octobre : saison de transmission intense du paludisme. Novembre-juillet : saison de transmission faible du paludisme. La médiane est représentée par une barre horizontale rouge.

Plasmodium ovale wallikeri et *curtisi* ont été responsables respectivement de 16 et 8 reviviscences cliniques déclarées au CNRP.

v. Prise en charge des patients

Un pourcentage similaire de patients infectés par *Plasmodium ovale wallikeri* ou *curtisi* ont été hospitalisés (60,3% vs 55,4%). De façon intéressante, respectivement 7 et 1 patients infectés par *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* ont été hospitalisés en USI/USC. De plus, une proportion plus importante des accès palustres à *Plasmodium ovale wallikeri* ont été traités par CTA (29,2 vs 17,1%, $p < 0,001$), sans association avec la densité parasitaire ou la concentration plaquettaire sanguine. En revanche, les patients traités par CTA présentaient une durée de latence plus courte que les autres (33 jours [11-111] vs 54 jours [15-170] ; $p = 0,025$). Réciproquement, les patients avec une durée de latence inférieure à 50 jours ont été plus traités par CTA que les autres (28.6% vs 20.3% ; $p = 0,048$). Cette proportion de traitement par CTA était encore plus importante dans le groupe des patients présentant une concentration plaquettaire inférieure à 60 G/L et une durée de latence inférieure à 50 jours (52.3% vs 22.7%, $p = 0,002$).

Nous avons également évalué l'impact sur la prise en charge des patients des nouvelles recommandations de la SPILF (société de pathologie infectieuse de langue française) sur la prise en charge des patients. Cet impact est très clair avec un remplacement de l'atovaquone-proguanil au profit des CTA (de 16,5% avant à 42,3% après les nouvelles recommandations), sans changement notable de la prescription de chloroquine (52,5% avant vs 47,2% après) (figure 44).

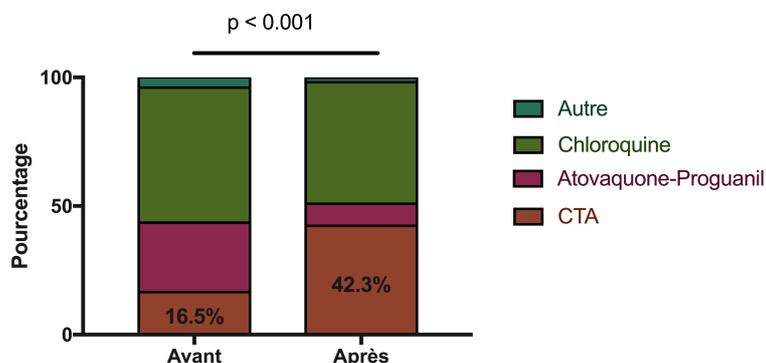


Figure 44 – Impact des nouvelles recommandations de la SPILF éditées en 2017 sur la prise en charge thérapeutique des infections à *Plasmodium ovale* spp.

Avant : janvier 2013 – juin 2017 ; Après : juillet 2017–décembre 2018

vi. Analyse des biais

Une des hypothèses envisageables à la lecture de ces résultats est l'existence d'un « effet-centre » avec une prescription de CTA et une hospitalisation en USI/USC plus fréquente dans les centres hospitaliers ayant moins l'habitude de prendre en charge des patients infectés par

Plasmodium ovale spp. Nous avons spécifiquement étudié les centres hospitaliers ayant orienté les patients en USI/USC (figure 45).

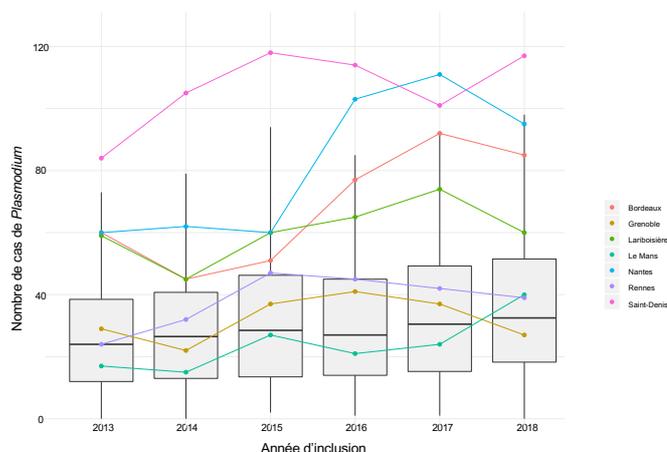


Figure 45 – Situation des centres hospitaliers ayant hospitalisé des patients infectés par *Plasmodium ovale* spp en USI/USC.

Pour chaque année d’inclusion étudiée, la répartition du nombre de cas de *Plasmodium* inclus par centre hospitalier est présentée sous forme de « boîte à moustache ». La ligne horizontale dans chaque « boîte à moustache » représente la médiane et les extrémités des barres verticales le 10^{ème} et le 90^{ème} percentile. Les centres hospitaliers ayant hospitalisé des patients infectés par *Plasmodium ovale* spp en USI/USC sont représentés par des points et lignes de couleurs.

86% de ces centres prenaient en charge annuellement un nombre de cas de *Plasmodium* supérieur à la médiane française.

Afin de renforcer nos analyses, nous avons étudié l’impact du centre hospitalier déclarant dans le traitement par CTA ou l’hospitalisation en USI/USC. Il ne semble pas y avoir de relation entre le nombre de cas de *Plasmodium ovale* spp déclarés sur la période et le pourcentage d’utilisation des CTA (figure 46A).

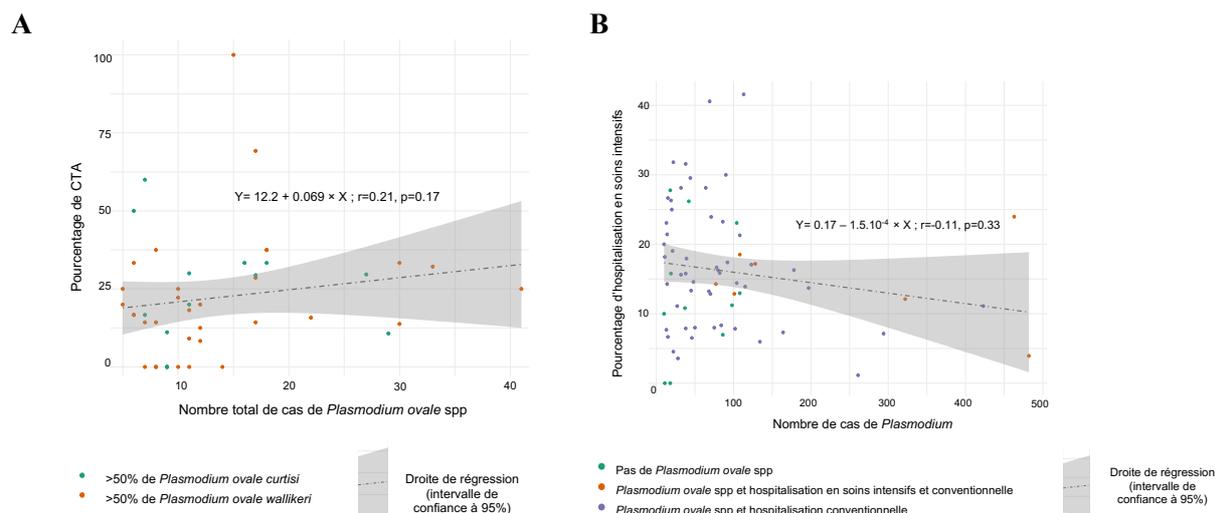


Figure 46 – Analyse de l’ « effet-centre »

(A) Relation entre le nombre total de cas de *Plasmodium ovale* spp déclarés sur la période janvier 2013 – décembre 2018 et le pourcentage de CTA utilisé par centre hospitalier déclarant. Les points verts représentent les centres hospitaliers avec une majorité de *Plasmodium ovale curtisi* et les points oranges les centres hospitaliers avec une majorité de *Plasmodium ovale wallikeri*.

(B) Relation entre le nombre total de cas de *Plasmodium* déclarés sur la période janvier 2013 – décembre 2018 et le pourcentage d’hospitalisation en USI/USC par centre hospitalier. Les points verts représentent les centres hospitaliers sans *Plasmodium ovale* spp, les points oranges les centres hospitaliers avec hospitalisation des *Plasmodium ovale* spp en unité conventionnelle et en USI/USC et les points violets les centres hospitaliers avec hospitalisation des *Plasmodium ovale* spp uniquement en unité conventionnelle.

Une analyse de la base de données du CNRP sur la période d’étude a mis en évidence une absence de relation statistiquement significative entre le nombre de cas de *Plasmodium* déclarés par an et le pourcentage d’hospitalisation en soins intensifs (figure 46B). Ceci nous a permis d’écarter l’« effet-centre ».

d. Séquençage du gène *potra*

Les gènes *potra* de 49 isolats de *Plasmodium ovale curtisi* et de 41 isolats de *Plasmodium ovale wallikeri* ont été séquencés. La traduction *in silico* des séquences des gènes *potra* obtenues présentait un nombre variable de répétition du motif (MANPIN)(AITPIN) pour *Plasmodium ovale wallikeri* et du motif (TINPIN)(TITPIS) pour *Plasmodium ovale curtisi*. Le nombre de ces répétitions a permis de définir différents génotypes caractérisés par la taille et la constitution du motif répété.

Pour *Plasmodium ovale wallikeri*, 4 génotypes différents ont été mis en évidence (245, 263, 263’ et 281 bp). Le motif (MANPIN)₁(AITPIN)₂ était le motif majoritaire et représentait 88% de l’ensemble des motifs (tableau 7).

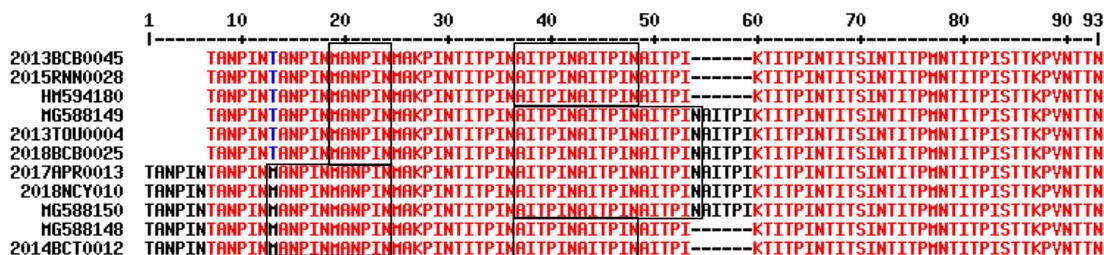
Pour *Plasmodium ovale curtisi*, 3 génotypes différents ont été mis en évidence (299, 317 et 335 pb). Le motif (TINPIN)₃(TITPIS)₁ était majoritaire et représentait 63% des génotypes (tableau 7).

Tableau 7 – Génotypes obtenus pour le gène *potra* de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*.
Le numéro d’accession GenBank des séquences de référence a été indiqué pour chaque génotype.

Espèce	Taille (bp)	Motif répété	Nombre d’échantillons (%)	No d’accession Genbank
<i>Plasmodium ovale wallikeri</i>	245	(MANPIN) ₁ (AITPIN) ₂	43 (88)	HM594180
	263	(MANPIN) ₁ (AITPIN) ₃	2 (4)	MG588149
	263’	(MANPIN) ₂ (AITPIN) ₂	1 (2)	MG588148
	281	(MANPIN) ₂ (AITPIN) ₃	3 (6)	MG588150
<i>Plasmodium ovale curtisi</i>	299	(TINPIN) ₃ (TITPIS) ₁	26 (63)	MG588152
	317	(TINPIN) ₃ (TITPIS) ₂	13 (32)	HM594183
	335	(TINPIN) ₄ (TITPIS) ₂	2 (5)	MG588154

Une sous-partie représentative de l’ensemble des séquences obtenues est représentée figure 47A pour *Plasmodium ovale wallikeri* et figure 47B pour *Plasmodium ovale curtisi*. Les séquences étaient identiques aux séquences de référence et, mis à part dans la variation du nombre de motifs répétés, aucun polymorphisme n’a été trouvé dans les gènes *potra* des deux espèces.

A



B

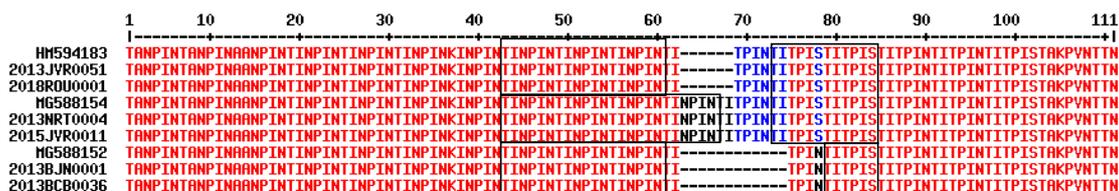


Figure 47 – Aligement des séquences d’acides aminés de la protéine potra.

(A) *Plasmodium ovale wallikeri*. Les séquences HM594180 (245 bp), MG588149 (263 bp), MG588148 (263 bp) et MG588150 (281 bp) ont été utilisées comme séquences de référence.

(B) *Plasmodium ovale curtisi*. Les séquences MG588152 (299 bp), HM594183 (317 bp) et MG588154 (335 bp) ont été utilisées comme séquences de référence.

Les motifs protéiques répétés sont entourés en noir sur les deux figures.

4. Discussion

Le paludisme est une maladie mondiale intertropicale. L’OMS estime qu’elle a été responsable en 2018 de 228 millions d’infections et plus de 405000 morts, majoritairement chez les enfants de moins de 5 ans (63). Ce chiffre de mortalité est probablement sous-estimé, comme l’a récemment montré une étude menée en Inde qui a estimé la mortalité attribuable au paludisme supérieure aux chiffres annoncés par l’OMS, notamment aux âges extrêmes de la vie (figure 48) (157).

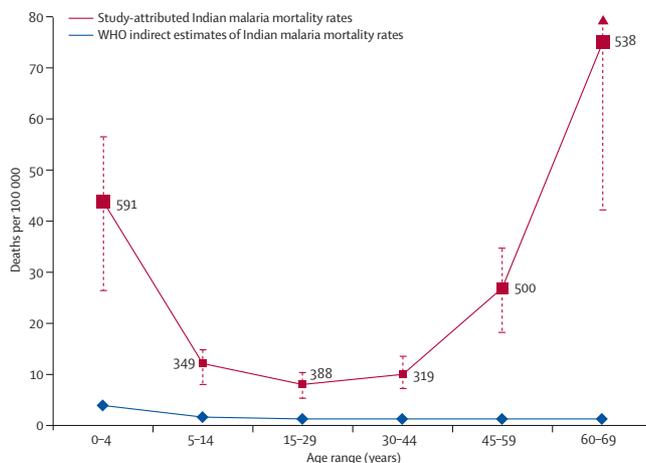


Figure 48 – Comparaison de la mortalité attribuée au paludisme par l’OMS (en bleu) et celle des auteurs de l’étude (en rouge).

Les données de mortalité de l’étude sont supérieures aux données de mortalité de l’OMS, peu importe la tranche d’âge étudiée. Issu de Dhingra N *et al*, The Lancet 2010 (157).

En plus d'une morbi-mortalité importante, le paludisme a de lourdes conséquences économiques sur les pays situés en zone d'endémie et est un réel frein au développement (158). Le paludisme est, et reste, un problème majeur de santé publique internationale. Malgré de nombreux efforts faits à l'échelle internationale, la décroissance des cas et de la mortalité observée dans les années 2000 à 2015 tend à se tasser depuis quelques années (159). De par son histoire coloniale et ses relations avec ses anciennes colonies, la France est le 1^{er} pays situé hors zone d'endémie palustre en termes de nombre de cas de paludisme.

Au-delà de *Plasmodium falciparum*, espèce la plus fréquente et la plus mortelle, et *Plasmodium vivax*, deuxième espèce en termes de nombre de cas et de zone d'endémie, notamment en Inde, peu de données ont été collectées sur les autres espèces de *Plasmodium*, notamment *Plasmodium ovale* spp.

Plasmodium ovale spp est la dernière des quatre espèces majoritaires de *Plasmodium* qui infectent l'homme à avoir été décrite. En effet, c'est une espèce qui donne des infections faiblement parasitémiqes et difficile à distinguer de *Plasmodium vivax* au microscope. De plus, elle est souvent présente en co-infection. Il n'en demeure pas moins que c'est une espèce sur laquelle il faut développer la recherche. Sa capacité à donner des accès de reviviscence représente un véritable frein à l'éradication du paludisme.

Dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés à *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*, issues de la division de *Plasmodium ovale* spp. Actée en 2010 (101), cette division s'est justifiée par la présence de caractéristiques génétiques différentes entre ces deux espèces, autrefois appelées espèces « classiques » et « variantes » de *Plasmodium ovale* spp. Leurs différences d'un point de vue épidémiologique mais également au niveau des caractéristiques cliniques et biologiques de leurs accès palustres ont été étudiées.

La première partie de cette étude a consisté à développer une méthode de biologie moléculaire capable de différencier facilement les deux espèces. La seconde a été l'analyse rétrospective des cas de *Plasmodium ovale* spp collectés au CNRP durant six années, de janvier 2013 à 2018.

- Développement de la qPCR-HRM

En 2015, lors du développement de la qPCR-HRM, des méthodes de différenciation de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* avaient déjà été développées. Ces méthodes étaient principalement des PCR nichées en point final (104,148) ou des qPCR-

Taqman (113). L'intérêt des PCR nichées en comparaison des PCR classiques est l'augmentation de la sensibilité et de la spécificité. Mais, elles sont à risque de contamination croisée entre échantillons (160). Les qPCR-Taqman sont des méthodes de PCR quantitatives en temps réels sensibles et spécifiques, très largement utilisées dans le diagnostic d'espèce de *Plasmodium*. Mais, ce sont des méthodes chères et l'utilisation de SYBR® Green ou d'autres intercalants de l'ADN leur est parfois préférée (161).

Dans ce travail, nous avons décidé de développer une méthode utilisant une révélation de type HRM²³. Les qPCR avec analyse de courbe de fusion utilisaient initialement le SYBR® Green I. Son remplacement par le SYTO 9, associé à une augmentation de température plus lente lors de la phase de fusion, a permis une mesure plus fine de la fluorescence lors de la séparation des deux brins d'ADN. Ceci a permis d'améliorer les analyses de fusion et de distinguer deux séquences n'ayant qu'un SNP de différence.

Pour cette qPCR-HRM, nous avons utilisé des amorces préalablement publiées dans la littérature et utilisées dans le diagnostic d'espèce du paludisme (144,145), ciblant le gène de l'*ARNr 18S*. Nous avons analysé les séquences de ce gène, présentant entre 4 et 8 copies par génome parasitaire (162), à partir de résultats de WGS de *Plasmodium ovale* publiées en 2017 (153).

L'analyse *in silico* des séquences de ce gène chez *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* a permis de mettre en évidence deux séquences différentes du gène dans chaque espèce (figures 27 et 28).

En comparaison de la qPCR-Taqman, considérée comme notre méthode de référence, la qPCR-HRM présente des résultats concordants dans 94% des cas. De plus, elle présente des spécificités de 98% pour *Plasmodium falciparum* et de 99% pour *Plasmodium ovale* spp avec une sensibilité globale de 97%. Les performances de la méthode sont satisfaisantes autant en termes de répétabilité que de reproductibilité, avec une faible variabilité analytique. Mais, des difficultés dans l'identification des espèces ont été rencontrées, notamment entre *Plasmodium ovale* spp et *Plasmodium malariae*. Comme précédemment expliqué²⁴, certains isolats de *Plasmodium ovale* spp présentent des profils en HRM avec un seul Tm au lieu des 2 communément rencontrés. Ce phénomène, que l'on peut expliquer par une identité de séquence entre les différents gènes de l'*ARNr 18S*, entraîne un recouvrement des zones de Tm entre les deux espèces et une impossibilité de les distinguer (figure 33). De plus, la mise en évidence des

²³ Voir II.a.1.i pour la description de la méthode

²⁴ Voir sous partie III.2

mélanges d'espèces était difficile et seule l'espèce majoritaire était identifiée dans la plupart des cas. La confirmation préalable d'une mono-infection à *Plasmodium ovale* spp en qPCR-Taqman était donc nécessaire avant de différencier les deux espèces. Grâce à l'utilisation du $\Delta(Tm2-Tm1)$, la qPCR-HRM était efficace pour différencier *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* (figure 32). Elle est utilisée en routine au CNRP depuis 2016 avec un algorithme décisionnel adapté à ses différentes limites (figure 34).

Afin de pallier son manque de sensibilité dans la détection des mélanges d'espèces, des améliorations techniques peuvent être apportées par l'utilisation du Mutant Allele Amplification Bias (MAAB) (163). Grâce à l'utilisation d'une des amorces de PCR en excès (en rouge sur la figure 49), des PCR asymétriques sont réalisées.

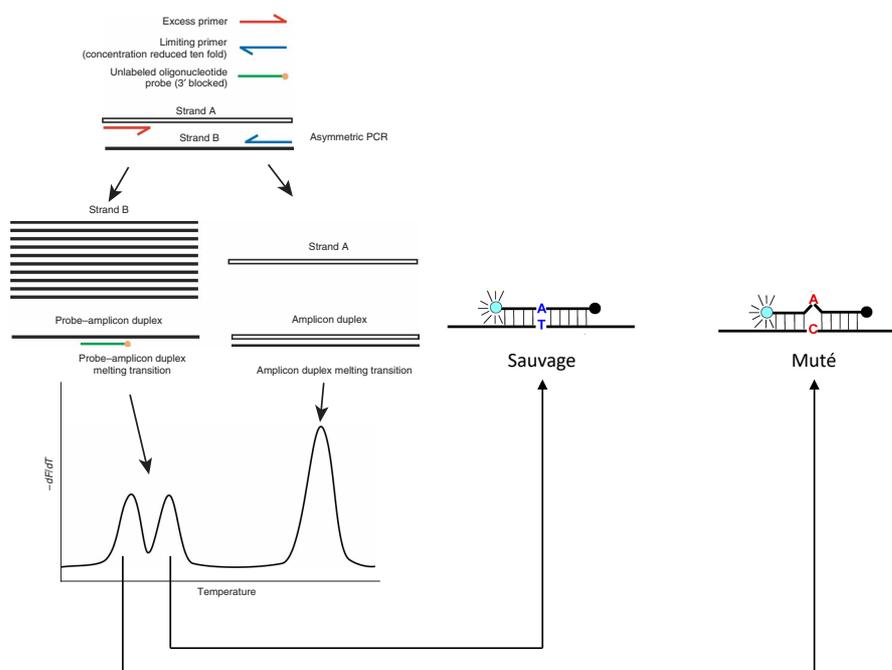


Figure 49 – Principe du protocole MAAB.

Il permet de mettre en évidence la présence d'une séquence mutée rarement présente dans un mélange de séquence (<5%). L'amorce en rouge est présente en excès par rapport à l'amorce bleue. Ceci permet de produire en excès le brin B, pour lequel une sonde complémentaire de la séquence sauvage est rajoutée dans le mix réactionnel. La complémentarité entre la sonde et la séquence mutée n'est pas parfaite et le dimère en résultant est donc moins stable que le dimère crée avec le dimère sauvage. Ceci permet d'avoir une différence de T_m mesurable et de mettre en évidence la séquence minoritaire qui sera préférentiellement amplifiée à la température d'hybridation choisie. Figure adaptée de Montgomery *et al*, Nature protocols 2007 (141) et Luo T *et al*, Journal of Clinical Microbiology 2011 (164).

Un des deux brins d'ADN est alors produit en excès. Une sonde complémentaire (en vert) de la séquence sauvage produite en excès permet de créer des dimères d'ADN différents entre la séquence sauvage et la séquence mutée, avec un mésappariement pour la séquence mutée (entre

une adénine et une cytosine dans la figure 49). Ce mésappariement est responsable d'une instabilité du double-brin (141,164). Cette instabilité a deux avantages :

- Un T_m plus bas en comparaison du dimère séquence sauvage-sonde qui permet de différencier la séquence sauvage de la séquence mutée.
- Lors du cycle de PCR, la température d'hybridation est fixée à une température spécifique située entre la température du dimère sauvage et celle du dimère muté ce qui permet une séparation et une amplification préférentielle du dimère séquence mutée-sonde.

Cette technique MAAB permet d'enrichir la séquence mutée en comparaison de la séquence sauvage et donc de mettre en évidence une séquence minoritaire dans un mélange de séquence, même lorsqu'elle est présente à des proportions inférieures à 1% (163).

La seconde amélioration technique envisageable est l'utilisation de la cold-PCR. Comme la technique MAAB, elle est basée sur le principe qu'un mésappariement entre deux bases nucléotidiques dans une séquence d'ADN va entraîner une instabilité de la structure et de ce fait une diminution du T_m , d'environ 0,2 à 1,5°C.

Dans ces protocoles de PCR, qui commencent de façon classique par une dénaturation à haute température, une étape supplémentaire à une température à 70°C permet de former des hétéroduplexes, qui sont des associations entre deux séquences différentes, mutées et non mutées (figure 50) (165).

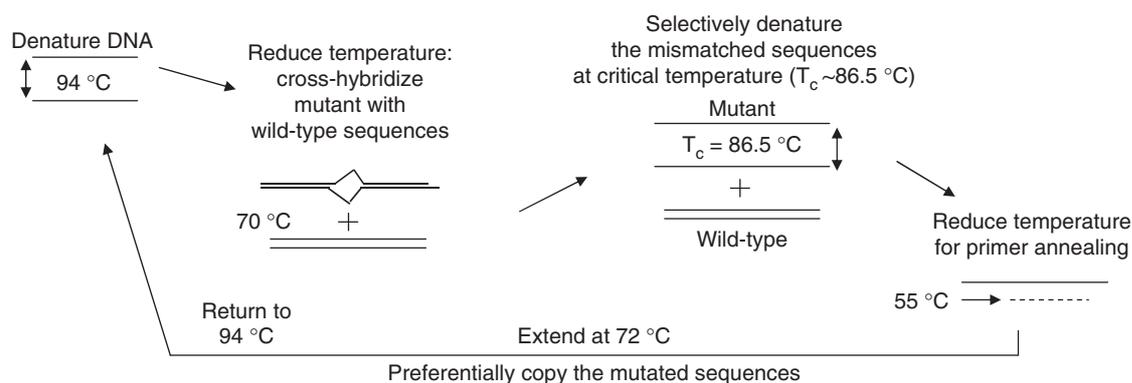


Figure 50 – Principe de la cold-PCR.

Issu de Jin Li *et al*, Nature Medicine 2008 (165).

Ensuite, la PCR se poursuit par une nouvelle dénaturation à une température dite température critique (T_c), qui va dissocier les hétéroduplexes et préserver l'intégrité des homoduplexes, les

hétéroduplexes étant plus instables. Ceci va permettre un enrichissement en séquences mutées, en passant d'un ratio mutée/sauvage faible (1:10) à un ratio plus facilement visible en qPCR-HRM de 1 : 2. De la même manière qu'avec la MAAB, cette technique permettrait de mettre plus facilement en évidence l'espèce minoritaire dans des mélanges d'espèces et donc de mieux dépister les co-infections palustres, l'une des limites majeures de la technique.

- Analyse rétrospective des cas de *Plasmodium ovale* spp du CNRP pour la période 2013-2018

La caractérisation, par Sutherland *et al* (101), de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* pose de nombreuses questions sur l'épidémiologie, la clinique et la biologie de leurs accès palustres respectifs. Le peu de travaux qui se sont intéressés à ces questions a étudié des cohortes avec un nombre de patients limité. En effet, si l'on combine les résultats des deux études de Rojo-Marcos *et al* (117,118), l'étude de Nolder *et al* (119) ainsi que l'étude de Frickmann *et al* (121), 171 infections à *Plasmodium ovale curtisi* et 154 infections à *Plasmodium ovale wallikeri* ont été étudiées, avec des méthodologies et des données récoltées différentes. De plus, les résultats de ces différentes études sont discordants et il n'existe aucun consensus clair.

Dans notre travail, nous avons inclus 368 infections à *Plasmodium ovale wallikeri* et 309 infections à *Plasmodium ovale curtisi* (figure 35). La distribution des cas de *Plasmodium ovale* spp suit la distribution mensuelle classique des infections à *Plasmodium* spp en France, avec un premier pic en avril-mai et une augmentation constante des cas de mai à octobre ensuite (figure 36B). Malgré tout, une légère différence dans cette répartition existe entre les deux espèces avec une diminution des cas en octobre pour *Plasmodium ovale curtisi* et une augmentation pour *Plasmodium ovale wallikeri*.

Nous avons par la suite comparé nos deux groupes de patients en termes de données démographiques et épidémiologiques (tableau 4). Il n'existe aucune différence sur l'âge, le sexe ratio, l'origine ethnique, le profil de patient, la prise de chimioprophylaxie ou l'utilisation de moustiquaires entre les patients infectés par l'une ou l'autre des deux espèces. Nos deux populations de patients ont alors été considérées comme comparables. Aucun ajustement préalable sur une ou plusieurs variables démographiques confondantes n'a donc été nécessaire.

Il n'existe pas de répartition géographique spécifique à une espèce (figure 39) ($p=0,51$) et nous décrivons une distribution sympatrique pour 17 des 25 pays ayant au moins 2 cas d'infection à *Plasmodium ovale* spp. Ajoutées aux données de la littérature (tableau 1), nos données permettent d'établir une carte de répartition de *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri* quasi-complète en Afrique (figure 51). Nous décrivons pour la première fois une infection à *Plasmodium ovale wallikeri* contractée au Rwanda, en République centrafricaine et au Niger et une infection à *Plasmodium ovale curtisi* contractée en République centrafricaine. Les deux espèces sont sympatriques dans la quasi-totalité des pays d'Afrique subsaharienne. La répartition de ces cas est intéressante d'un point de vue qualitatif et descriptif. En revanche, elle n'est pas interprétable d'un point de vue quantitatif. En effet, la plupart des études ont été réalisées sur des voyageurs de retour de zone d'endémie palustre. Le nombre de cas est donc plus dépendant des liens entre le pays de contamination et le pays d'origine du voyageur plutôt que de l'écologie locale et de l'intensité de la transmission de *Plasmodium ovale* spp dans ces zones.

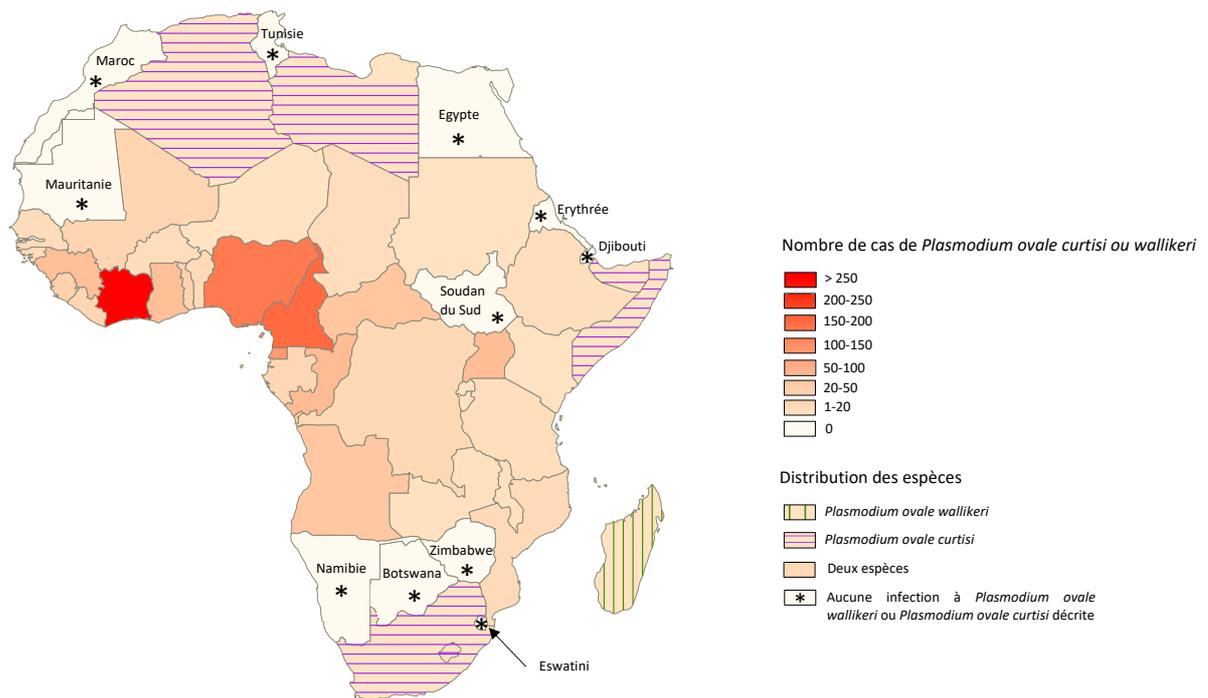


Figure 51 – Répartition géographique des cas de *Plasmodium ovale* spp en Afrique.

Les pays hachurés en verts sont les pays où seul *Plasmodium ovale wallikeri* a été décrit et ceux hachurés en violet les pays où seul *Plasmodium ovale curtisi* a été décrit. Les pays non colorés et indiqués par une étoile sont les pays pour lesquels il n'a jamais été décrit d'infection à *Plasmodium ovale wallikeri* ou *Plasmodium ovale curtisi*.

D'un point de vue clinique et biologique, les patients infectés par *Plasmodium ovale wallikeri* présentent une thrombopénie plus profonde ($p<0,001$) et un délai de latence plus court

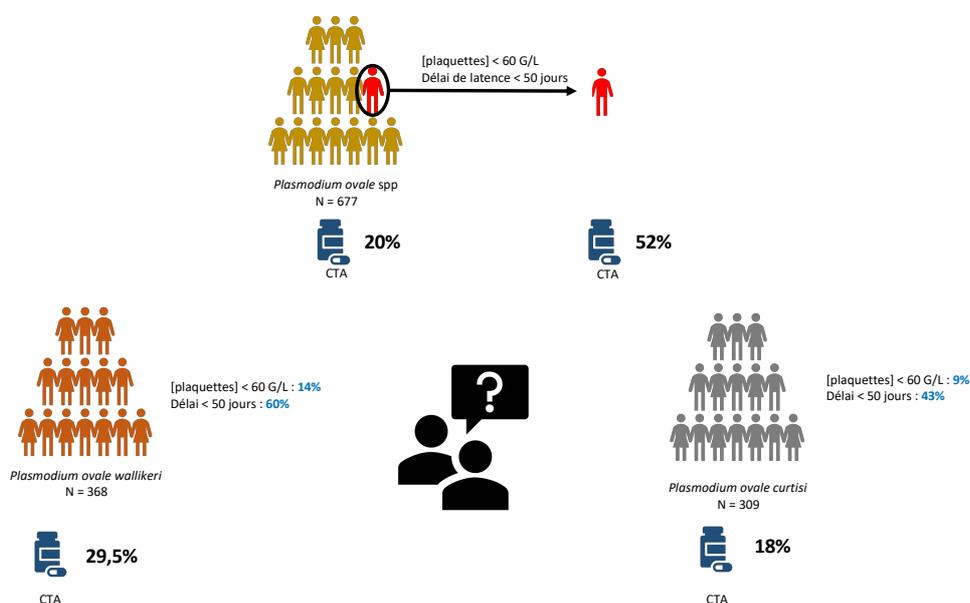
($p < 0,001$) que les patients infectés par *Plasmodium ovale curtisi*. 1,2% des patients infectés par *Plasmodium ovale* spp ont fait un paludisme grave dans notre cohorte. Ce pourcentage est similaire à celui reporté par le système de surveillance du paludisme aux États-Unis (166) et par une méta-analyse sur les infections sévères à *Plasmodium ovale* spp récemment publiée (167).

Dans notre cohorte, respectivement 7 et 1 patients infectés par *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* ont été hospitalisés en USI/USC. Parmi ces 8 patients, 6 ne présentaient pas de critères de gravité du paludisme tels que définis par l'OMS (44). Il peut paraître étonnant que des patients ne présentant pas de critères de gravité soient hospitalisés en USI/USC. Mais, cela a déjà été décrit chez des patients infectés par *Plasmodium falciparum* (168) ou *Plasmodium vivax* (169). Nous avons interrogé la base de données du CNRP pour la période 2013-2018 et analysé 5227 dossiers de patients présentant un accès palustre simple (selon les critères de l'OMS (44)) et pour lesquels le type d'hospitalisation avait été renseigné. Parmi ces patients, 180 (3,6%) ont été hospitalisés en USI/USC avec une durée médiane d'hospitalisation dans ces services inférieure aux patients présentant un accès grave (2 jours [1-3] vs 3 jours [2-4], $p < 0,001$). Une étude centrée sur ces patients hospitalisés en USI/USC malgré l'absence de critères de gravité serait intéressante afin de comprendre les facteurs menant à ces hospitalisations.

La SPILF a changé ses recommandations de prise en charge d'un accès palustre en juin 2017 avec une recommandation d'utilisation des CTA en première ligne d'une infection à *Plasmodium* (45). Contrairement aux précédentes recommandations, l'atovaquone-proguanil n'est que la seconde ligne de traitement proposée. Nos données confirment que les cliniciens ont adapté leurs pratiques à ces nouvelles recommandations avec une prescription de CTA au lieu de l'atovaquone-proguanil et une prescription de chloroquine qui reste stable sur la période (figure 44).

De façon intéressante, les patients infectés par *Plasmodium ovale wallikeri* ont été plus fréquemment traités par CTA que les patients infectés par *Plasmodium ovale curtisi*, que ce soit avant ou après les nouvelles recommandations de la SPILF. Pour tenter d'expliquer cette proportion plus importante de traitement par CTA, nous avons comparé le traitement utilisé en fonction de la concentration plaquettaire, les résultats du TDR pLDH et la durée de latence, les trois paramètres qui diffèrent entre les deux espèces. Nous avons également étudié le traitement utilisé en fonction de la densité parasitaire. Nous n'avons pas trouvé de relation statistiquement significative avec la concentration plaquettaire, la densité parasitaire ou le résultat des TDRs pLDH. Cependant, nous mettons en évidence un lien entre le traitement par CTA et le délai de

latence, avec une augmentation du pourcentage de patients traités par CTA lorsque le délai de latence est inférieur à 50 jours ($p=0,048$). De plus, la combinaison de deux facteurs, la concentration plaquettaire $<$ à 60 G/L et le délai de latence $<$ à 50 jours, qui peut faire évoquer une infection à *Plasmodium falciparum* (96), met en évidence une sous-population de patients majoritairement traités par CTA (52%, $p=0,002$). Le diagnostic de paludisme est réalisé de jour comme de nuit, dans des centres plus ou moins spécialisés. Il ne paraît pas étonnant que certains patients, présentant une thrombopénie profonde et un délai entre le retour de zone d'endémie et le début de la symptomatologie court, soient traités par CTA plutôt que par chloroquine, même si le diagnostic est une infection confirmée à *Plasmodium ovale* spp. En effet, les CTA sont efficaces contre toutes les espèces de *Plasmodium* et permettent aux cliniciens de ne pas prendre le risque de traiter à tort une infection à *Plasmodium falciparum* par la chloroquine. Ces deux caractéristiques étant plus fréquentes chez *Plasmodium ovale wallikeri* (avec 14% des patients présentant une concentration plaquettaire $<$ à 60 G/L contre 9% chez *Plasmodium ovale curtisi*) la conjugaison de ces deux facteurs pourrait être une des explications à cette proportion de traitement par CTA plus importante que chez les patients infectés par *Plasmodium ovale curtisi* (figure 52).



Sur-traitement par CTA chez les patients infectés par *Plasmodium ovale wallikeri* ?

Figure 52 – Récapitulatif des données expliquant la prédominance du traitement par CTA chez *Plasmodium ovale wallikeri*.

Les patients en rouge dans la population globale de *Plasmodium ovale* spp en brun, pour lesquels la concentration plaquettaire est inférieure à 60 G/L et le délai de latence $<$ 50 jours, sont le sous-groupe présentant le plus de traitement par CTA. Ces deux caractéristiques, évocatrices d'une potentielle infection par *Plasmodium falciparum*, sont aussi des caractéristiques plus fréquemment décrites dans les infections à *Plasmodium ovale wallikeri* (en orange) en comparaison des infections à *Plasmodium ovale curtisi* (en gris).

44% des patients prenant une chimioprophylaxie ont déclaré une observance régulière. Un allongement du délai de latence est observé dans cette population ($p=0,003$). Il peut paraître étonnant de voir des infections chez des patients prenant une chimioprophylaxie complète, surtout dans des proportions aussi importantes. Mais, ces traitements prophylactiques ne sont pas efficaces contre les hypnozoïtes hépatiques (29) et ne protègent donc pas des reviviscences. Cet allongement du délai de latence est particulièrement bien observé chez les militaires, une population qui respecte mieux les recommandations de prise de chimioprophylaxie (85% des militaires déclarent une prise de traitement) et de façon plus observante (62% déclarent une observance complète).

Dans notre cohorte, un accès de reviviscence a été déclaré chez 3,5% des patients. C'est peu, en comparaison de la littérature (133). Ceci peut s'expliquer par les recommandations françaises qui préconisent un traitement par primaquine dès le 1^{er} accès à *Plasmodium ovale* spp pour éliminer les hypnozoïtes et éviter les reviviscences (hors contre-indication que sont le déficit en G6PD, la grossesse et l'allaitement) (91).

La plupart des diagnostics d'infections à *Plasmodium ovale* spp ont été faits par microscopie, avec 5,8% d'erreur d'espèce (principalement avec *Plasmodium malariae*). Le diagnostic par microscopie ou par biologie moléculaire n'est pas courant en Afrique et des méthodes plus simples et moins chères sont nécessaires. L'utilisation de TDRs est largement répandue, que ce soit en zone d'endémie palustre ou dans les laboratoires de biologie médicale en France. Mais, l'efficacité des TDRs dans la détection des infections à *Plasmodium ovale* spp est peu évaluée comparée à *Plasmodium falciparum* ou *Plasmodium vivax*. Pour combler ce manque, nous avons comparé l'efficacité de 4 différents TDRs sur la détection de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* en routine au laboratoire.

Les TDRs détectant la protéine aldolase sont plus efficaces que les TDR détectant la pLDH ($p<0,001$). Les TDRs pLDH utilisés (Palutop+4® et Core Malaria®) ont été plus efficaces dans la détection de *Plasmodium ovale wallikeri*, mais leur efficacité reste malgré tout très faible (16% de détection). La protéine LDH est polymorphique chez *Plasmodium ovale* spp (147) et les différences observées dans les séquences d'acides aminés entre les deux espèces peuvent modifier l'affinité des anticorps des TDRs (figure 53) (114).

```

Poc_LDH      1  -----R SRWSGMIGGVMATLIVQKNLGDVVMFDIVKNMPLGKALDTSHTNVMAYSNCQ
Pow_LDH      1  -----SRWSGMIGGVMATLIVQKNLGDVVMFDIVKNMPLGKALDTSHTNVMAYSNCQ
Poc_LDH     54  VTGSNTYEDLKGADVIVTAGFTKAPGKSDKEWNRDDLPLNNKIMIEIGGHKNYCPNA
Pow_LDH     53  VTGSNTYEDLKGADVIVTAGFTKAPGKSDKEWNRDDLPLNNKIMIEIGGHKNYCPNA
Poc_LDH     114  FIIVVTNPVDVMVQLLHQHSGVSKNKIVGLGGVLDTSRLKYYISQKINVCPRDVNAHIVG
Pow_LDH     113  FIIVVTNPVDVMVQLLHQHSGVSKNKIVGLGGVLDTSRLKYYISQKINVCPRDVNAHIVG
Poc_LDH     174  AHGNKMVVLKRYITVGGIPLQEFINNKKITDAELDAIFDRTVNTALEIVNYHASPYPAPA
Pow_LDH     173  AHGNKMVVLKRYITVGGIPLQEFINNKKITDAELDAIFDRTVNTALEIVNYHASPYPAPA
Poc_LDH     234  AAI IEMAESYLKDLKVKLICSTLLEGOYGHGTGVFGGTPLVLCNGVEQVFELQLNABEKK
Pow_LDH     233  AAI IEMAESYLKDLKVKLICSTLLEGOYGHGTGVFGGTPLVLCNGVEQVFELQLNABEKK
Poc_LDH     294  MFDDA
Pow_LDH     293  MFDDA

```

Figure 53 – Aligement d’une séquence de pLDH de chaque espèce.

Les variations en acides aminés sont entourées en rouge. Adapté de Bauffé *et al*, Malaria Journal 2012 (114).

Récemment, Tang *et al* ont comparé l’efficacité de 3 TDRs différents détectant la pLDH et ont mis en évidence des différences entre les TDRs, que ce soit en intra ou en inter-espèce (170). En revanche, l’efficacité des TDRs détectant l’aldolase est identique entre les deux espèces et augmente avec la densité parasitaire (tableau 5). Ce résultat est à mettre en relation avec le faible polymorphisme de ce gène (171,172).

Environ 20% des TDRs sont négatifs pour des densités parasitaires > 10000 p/μL pour les deux espèces. Le défaut de sensibilité des TDR pour détecter *Plasmodium ovale* spp est généralement attribué à des faibles densités parasitaires. Nous démontrons ici que même des infections à fortes densités parasitaires peuvent ne pas être détectées par les TDRs conventionnels et plusieurs explications sont envisageables :

- Un TDR mal réalisé et/ou mal lu.
- Une production de la protéine diminuée dans certains isolats de *Plasmodium ovale* spp. En effet, une des hypothèses de la mauvaise sensibilité des TDRs aldolase dans la détection des *Plasmodium ovale* spp en comparaison des autres espèces est que la protéine est produite en moindre quantité que chez les autres espèces de *Plasmodium* infectant l’homme (173). Une quantification des ARN messagers de l’aldolase par RT-qPCR ou de quantification des protéines par spectrométrie de masse pourraient être des approches intéressantes pour confirmer cette hypothèse.

Notre étude présente certaines limites. Premièrement, en raison de données manquantes, nous manquons de puissance statistique pour conclure sur certains paramètres, notamment les données d’hospitalisation. Deuxièmement, notre étude est rétrospective et de par la nature des données récoltées, nous n’avons pas accès au dossier clinique complet des patients. Enfin, la très large majorité des patients se sont infectés en Afrique et nous ne disposons pas de données

sur des infections contractées en Papouasie-Nouvelle Guinée ou en Asie du Sud-Est, autres régions d'endémie de *Plasmodium ovale* spp.

En résumé, les infections à *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* sont différentes, avec une thrombopénie plus profonde et un délai de latence plus court pour la première. Ceci est probablement à l'origine d'un recours au traitement par CTA plus fréquent, de par ces caractéristiques pouvant faire craindre une infection à *Plasmodium falciparum*. Une tendance à une hospitalisation plus importante en réanimation des patients infectés par *Plasmodium ovale wallikeri* se dessine. Cette observation est cependant non significative ($p=0,134$) par un probable manque de puissance statistique. En effet, la structure rétrospective de notre étude est responsable de nombreuses données manquantes, notamment sur ces données d'hospitalisations. Une étude prospective large ou une étude plus approfondie des dossiers cliniques des patients de notre étude permettraient de valider ou non cette observation. Enfin, notre étude confirme la faible sensibilité des TDRs dans la détection des deux espèces de *Plasmodium ovale* spp, même à de fortes densités parasitaires.

- Évaluation de l'intérêt du séquençage du gène *potra* pour le typage des reviviscences à *Plasmodium ovale* spp.

Le séquençage des gènes *potra* et *porbp2* est utilisé par certains auteurs pour confirmer génétiquement les accès de reviviscence à *Plasmodium ovale* spp (133,134). Nous avons séquencé le gène *potra* dans notre cohorte afin de confirmer son intérêt. Le gène *porbp2* avait déjà été séquencé dans de nombreux isolats de *Plasmodium ovale* spp sans qu'aucun polymorphisme n'ait été retrouvé. Nous n'avons donc pas entrepris de séquencer ce gène dans notre cohorte. En revanche, le gène *potra* a été décrit dans la littérature comme variable dans chacune des espèces, mais le nombre d'isolats inclus étant relativement faible (136), nous avons voulu confirmer ces observations sur certains de nos isolats.

Ce gène présente 4 polymorphismes chez *Plasmodium ovale wallikeri* et 3 chez *Plasmodium ovale curtisi* (tableau 7). Les polymorphismes sont similaires à ceux précédemment décrit par Zhou *et al* (136). Le nombre de polymorphismes observé est donc faible avec un génotype largement majoritaire dans chacune des espèces.

L'utilisation de ce gène dans le typage moléculaire des reviviscences n'est donc pas intéressante. Il est en effet très fortement probable de retrouver le même génotype de ce gène chez deux isolats différents de *Plasmodium ovale* spp.

Il est donc nécessaire, dans cet objectif de typage des accès de reviviscence à *Plasmodium ovale* spp de développer une autre méthode de typage moléculaire pour aider à mieux les caractériser. Pour cela, le développement d'un typage par analyse de microsatellites, à l'image de ce qui a été fait sur *Plasmodium falciparum* (174,175) ou *Plasmodium vivax* (176,177), semble intéressant.

Nous décrivons figure 54 la méthodologie envisagée pour ce travail. Il n'existe qu'un seul génome de *Plasmodium ovale curtisi* et de *Plasmodium ovale wallikeri* publiés dans la littérature (153). La première étape du travail consistera à réaliser un séquençage complet d'isolats de *Plasmodium ovale* spp. Afin de réduire la part du génome humain et d'enrichir le génome parasite pour faciliter le séquençage, nous utiliserons une approche de type Selective Whole Genome Amplification (178).

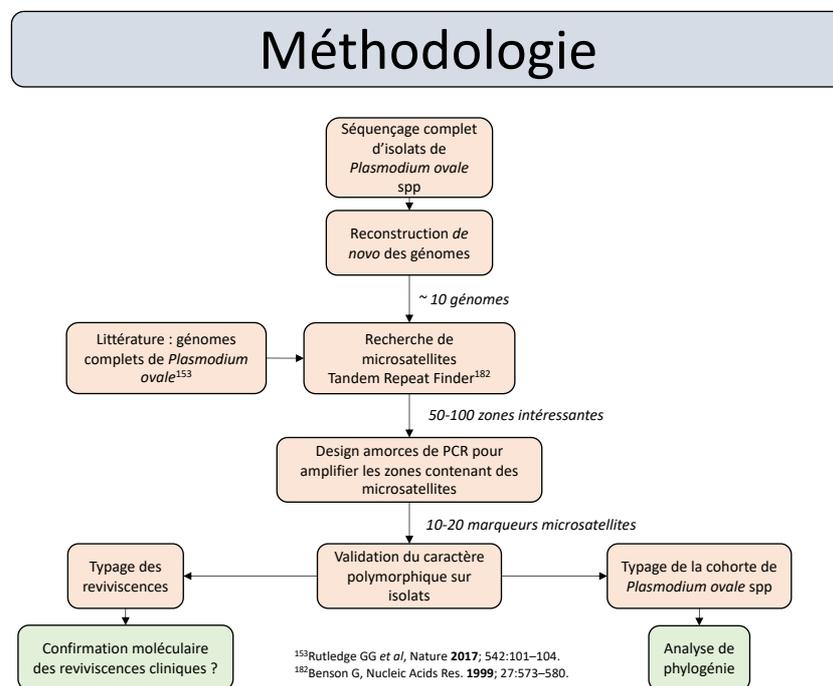


Figure 54 – Méthodologie envisagée pour le développement de la méthode de typage par analyse de microsatellites.

A partir de l'analyse du WGS de *Plasmodium ovale* spp déjà publié, une conception de courts oligonucléotides de 8 à 10 bases ciblant des zones fréquentes chez *Plasmodium ovale* spp et rares chez l'humain sera réalisée par une approche bioinformatique déjà publiée

(www.github.com/eclarke/swga). L'enzyme Phi29 polymérase, qui travaille par multiple déplacement amplification (figure 55) (179), sera utilisée pour amplifier de larges fragments d'ADN (jusqu'à 12 kb) à l'aide des oligonucléotides conçus. Cette approche a été validée sur *Plasmodium falciparum* (180) et *Plasmodium malariae* (181).

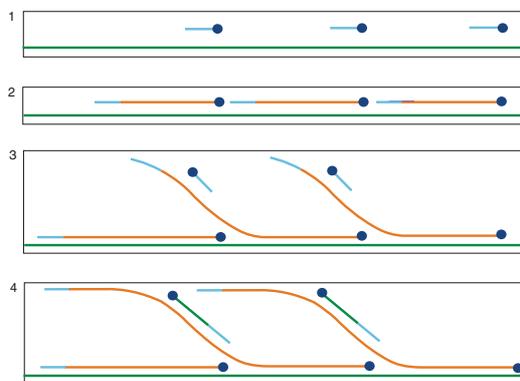


Figure 55 – Principe du multiple déplacement amplification.

Les oligonucléotides (en bleu) conçus par approche bioinformatique se lient à l'ADN dénaturé (1). L'ADN polymérase Phi29 (cercle bleu) permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (en orange) (2). L'enzyme va ensuite continuer sa synthèse d'ADN alors que de nouveaux oligonucléotides se fixent sur le brin néo synthétisé (3). Une structure dite hyperbranchée se met en place (4).

A partir de reconstructions *de novo* de données WGS, nous utiliserons le logiciel Tandem Repeats finder (182) pour définir des zones utilisables pour des études de microsatellites. Nous définirons alors les zones qui nous semblent le plus appropriées à l'aide du logiciel LOSITAN, qui teste la neutralité des *loci* (183). Le développement de la méthode se déroulera en deux étapes. Nous développerons tout d'abord les PCR permettant le typage des microsatellites pour une cinquantaine de *loci* différents. Ensuite, nous choisirons entre 10 et 20 marqueurs microsatellites pour typer nos échantillons. Les critères de choix sont les suivants : les marqueurs doivent être sur des chromosomes différents ou être le plus éloignés possibles s'ils sont sur le même chromosome, ils doivent avoir un degré de polymorphisme ainsi que des efficacités de PCR suffisants. Les tailles des différents fragments obtenus après la PCR et la purification des amplicons seront analysées à l'aide du logiciel d'analyse de fragment de ThermoFisher®.

Le développement de cette méthode de typage moléculaire par l'utilisation des marqueurs microsatellites nous permettra de caractériser les isolats des patients ayant présenté des accès de reviviscence. Un meilleur ciblage des isolats responsables des accès de reviviscence permettra d'étudier et de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la formation des hypnozoïtes. Nous pourrions également caractériser la clonalité des infections. Les infections à

Plasmodium falciparum et *Plasmodium vivax* ont précédemment été décrites comme polyclonales (184). En revanche, aucune étude ne s'est intéressée à cette problématique pour *Plasmodium ovale* spp. Enfin, nous pourrions étudier la diversité génétique de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi* et la structure de ces populations en Afrique subsaharienne. Ceci permettra une meilleure compréhension globale des différences entre *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*.

En conclusion, ce travail aura permis de développer une nouvelle méthode de différenciation de *Plasmodium ovale wallikeri* et *Plasmodium ovale curtisi*. Grâce à cette méthode de qPCR-HRM, nous avons pu étudier de façon rétrospective les cas de *Plasmodium ovale* spp déclarés au CNRP de janvier 2013 à décembre 2018. Nous mettons en évidence des différences entre les deux espèces, que ce soit en termes de caractéristiques biologiques ou de prise en charge du patient. Enfin, nous avons étudié le gène *potra* et décrivons un polymorphisme insuffisant pour que le séquençage de ce gène soit utilisé pour typer les accès de reviviscence. Ceci démontre la nécessité de développer une méthode de typage moléculaire de *Plasmodium ovale* spp, par exemple en développant une méthode ciblant des zones contenant des microsatellites.

Bibliographie

1. Striepen B, Jordan CN, Reiff S, van Dooren GG. Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa. PLoS Pathog. 2007 Jun;3(6):e78.
2. McFadden GI, Yeh E. The apicoplast: now you see it, now you don't. Int J Parasitol. 2017;47(2-3):137-44.
3. Sheiner L, Vaidya AB, McFadden GI. The metabolic roles of the endosymbiotic organelles of *Toxoplasma* and *Plasmodium* spp. Curr Opin Microbiol. 2013 Aug;16(4):452-8.
4. Ott KJ. Malaria Parasites and Other *Haemosporidia*. P. C. C. Garnham. Blackwell, Oxford, England; Davis, Philadelphia, 1966. 1132 pp., illus. \$35. Science. 1967 Sep 1;157(3792):1029-1029.
5. Perkins SL. Malaria's Many Mates: Past, Present, and Future of the Systematics of the Order *Haemosporida*. para. 2014 Feb;100(1):11-25.
6. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasites & Vectors. 2010 Feb 1;3(1):5.
7. Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, Hasan N, et al. Ancestry and Pathology in King Tutankhamun's Family. JAMA. 2010 Feb 17;303(7):638-47.
8. Institute of Medicine (US) Committee on the Economics of Antimalarial Drugs. Saving Lives, Buying Time: Economics of Malaria Drugs in an Age of Resistance. Arrow KJ, Panosian C, Gelband H, editors. Washington (DC): National Academies Press (US); 2004. Disponible à l'adresse suivante : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK215624/>
9. Rodhain F, Charmot G. Evaluation des risques de reprise de transmission du paludisme en France. Médecine et Maladies Infectieuses. 1982 Apr 1;12(4):231-6.
10. Sautet J. [Is there a possibility of malaria reimplantation in the Fos area?]. Bull Acad

Natl Med. 1972 Oct;156(20):645–8.

11. Spanakos G, Snounou G, Pervanidou D, Alifrangis M, Rosanas-Urgell A, Baka A, *et al.* Genetic Spatiotemporal Anatomy of *Plasmodium vivax* Malaria Episodes in Greece, 2009-2013. *Emerging Infect Dis.* 2018;24(3):541–8.
12. Danis K, Baka A, Lenglet A, Van Bortel W, Terzaki I, Tseroni M, *et al.* Autochthonous *Plasmodium vivax* malaria in Greece, 2011. *Euro Surveill.* 2011 Oct 20;16(42).
13. Craig CF. The History of Malaria in the Roman Campagna. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1934 Nov 1;14(6):586–586.
14. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1907. NobelPrize.org. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1907/laveran/biographical/>
15. Stephens JWW. A New Malaria Parasite of Man. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology.* 1922 Dec 30;16(4):383–8.
16. Singh B, Daneshvar C. Human Infections and Detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Apr;26(2):165–84.
17. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, *et al.* A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet.* 2004 Mar 27;363(9414):1017–24.
18. Hartmeyer GN, Stensvold CR, Fabricius T, Marmolin ES, Hoegh SV, Nielsen HV, *et al.* *Plasmodium cynomolgi* as Cause of Malaria in Tourist to Southeast Asia, 2018. *Emerging Infect Dis.* 2019;25(10):1936–9.
19. Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, *et al.* Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *Lancet Glob Health.* 2017;5(10):e1038–46.
20. CDC - DPDx - Malaria. 2020. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>
21. Hopp CS, Chiou K, Ragheb DRT, Salman AM, Khan SM, Liu AJ, *et al.* Longitudinal analysis of *Plasmodium* sporozoite motility in the dermis reveals component of blood vessel recognition. *Elife.* 2015 13;4.
22. Taylor T, Agbenyega T. 96 - Malaria. In: Magill AJ, Hill DR, Solomon T, Ryan ET, editors. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease (Ninth Edition)*. London: W.B. Saunders; 2013. p. 695–717. Disponible à l'adresse suivante : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416043904000965>
23. Le paludisme. Disponible à l'adresse suivante : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/paludisme/site/html/cours.pdf>
24. Kafsack BFC, Rovira-Graells N, Clark TG, Bancells C, Crowley VM, Campino SG, *et al.* A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature.* 2014 Mar 13;507(7491):248–52.
25. Brancucci NMB, Gerdt JP, Wang C, De Niz M, Philip N, Adapa SR, *et al.* Lysophosphatidylcholine Regulates Sexual Stage Differentiation in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell.* 2017 Dec 14;171(7):1532-1544.e15.
26. Kanjee U, Rangel GW, Clark MA, Duraisingh MT. Molecular and cellular interactions defining the tropism of *Plasmodium vivax* for reticulocytes. *Curr Opin Microbiol.* 2018;46:109–15.
27. Huff CG. The Primate Malarias. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1972 Sep 1;21(5):602–3.
28. Collins WE, Jeffery GM. *Plasmodium ovale*: parasite and disease. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Jul;18(3):570–81.
29. Markus MB. Do hypnozoites cause relapse in malaria? *Trends Parasitol.* 2015 Jun;31(6):239–45.
30. Mikolajczak SA, Vaughan AM, Kangwanransan N, Roobsoong W, Fishbaugher M,

- Yimamnuaychok N, *et al.* *Plasmodium vivax* liver stage development and hypnozoite persistence in human liver-chimeric mice. *Cell Host Microbe*. 2015 Apr 8;17(4):526–35.
31. Shanks GD, White NJ. The activation of vivax malaria hypnozoites by infectious diseases. *Lancet Infect Dis*. 2013 Oct;13(10):900–6.
 32. Gural N, Mancio-Silva L, Miller AB, Galstian A, Butty VL, Levine SS, *et al.* *In Vitro* Culture, Drug Sensitivity, and Transcriptome of *Plasmodium Vivax* Hypnozoites. *Cell Host Microbe*. 2018 Mar 14;23(3):395-406.e4.
 33. Krotoski WA, Garnham PC, Bray RS, Krotoski DM, Killick-Kendrick R, Draper CC, *et al.* Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. I. Discovery of a new latent form of *Plasmodium cynomolgi* (the hypnozoite), and failure to detect hepatic forms within the first 24 hours after infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1982 Jan;31(1):24–35.
 34. Krotoski WA, Collins WE, Bray RS, Garnham PC, Cogswell FB, Gwadz RW, *et al.* Demonstration of hypnozoites in sporozoite-transmitted *Plasmodium vivax* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1982 Nov;31(6):1291–3.
 35. Voorberg-van der Wel AM, Zeeman A-M, Nieuwenhuis IG, van der Werff NM, Klooster EJ, Klop O, *et al.* A dual fluorescent *Plasmodium cynomolgi* reporter line reveals in vitro malaria hypnozoite reactivation. *Commun Biol*. 2020;3:7.
 36. Richter J, Franken G, Mehlhorn H, Labisch A, Häussinger D. What is the evidence for the existence of *Plasmodium ovale* hypnozoites? *Parasitol Res*. 2010 Nov;107(6):1285–90.
 37. Cogswell FB, Collins WE, Krotoski WA, Lowrie RC. Hypnozoites of *Plasmodium simiovale*. *Am J Trop Med Hyg*. 1991 Aug;45(2):211–3.
 38. Escalante AA, Freeland DE, Collins WE, Lal AA. The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome b from the linear mitochondrial genome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Jul 7;95(14):8124–9.
 39. Garnham PCC, Bray RS, Cooper W, Lainson R, Awad FI, Williamson J. The pre-erythrocytic stage of *Plasmodium ovale*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1955 Mar 1;49(2):158–67.
 40. Austin SC, Stolley PD, Lasky T. The History of Malariotherapy for Neurosyphilis: Modern Parallels. *JAMA*. 1992 Jul 22;268(4):516–9.
 41. Collins WE, Jeffery GM. A retrospective examination of sporozoite-induced and trophozoite-induced infections with *Plasmodium ovale*: development of parasitologic and clinical immunity during primary infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 May;66(5):492–502.
 42. Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF, Aravind L, Kumar S. Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends Parasitol*. 2011 Oct;27(10):442–9.
 43. Kendjo E, Houzé S, Mouri O, Taieb A, Gay F, Jauréguiberry S, *et al.* Epidemiologic Trends in Malaria Incidence Among Travelers Returning to Metropolitan France, 1996-2016. *JAMA Netw Open*. 2019 05;2(4):e191691.
 44. Severe malaria. *Trop Med Int Health*. 2014 Sep;19 Suppl 1:7–131.
 45. Bouchaud O, Bruneel F, Caumes E, Houzé S, Imbert P, Pradines B, *et al.* Management and prevention of imported malaria. 2018 update of the 2007 French clinical guidelines. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2020 Mar 1;50(2):161–93.
 46. Wahlgren M, Goel S, Akhouri RR. Variant surface antigens of *Plasmodium falciparum* and their roles in severe malaria. *Nature Reviews Microbiology*. 2017 Aug;15(8):479–91.
 47. Kraemer SM, Smith JD. A family affair: *var* genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Aug;9(4):374–80.
 48. Naing C, Whittaker MA, Nyunt Wai V, Mak JW. Is *Plasmodium vivax* malaria a severe malaria?: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Aug;8(8):e3071.
 49. Mathews SE, Bhagwati MM, Agnihotri V. Clinical spectrum of *Plasmodium vivax* infection, from benign to severe malaria: A tertiary care prospective study in adults from Delhi,

- India. Trop Parasitol. 2019 Dec;9(2):88–92.
50. Guedes KS, Sanchez BAM, Gomes LT, Fontes CJF. Aspartate aminotransferase-to-platelet ratio index (APRI): A potential marker for diagnosis in patients at risk of severe malaria caused by *Plasmodium vivax*. PLoS ONE. 2019;14(11):e0224877.
 51. Singh R, Jain V, Singh PP, Bharti PK, Thomas T, Basak S, *et al.* First report of detection and molecular confirmation of *Plasmodium ovale* from severe malaria cases in central India. Trop Med Int Health. 2013 Nov;18(11):1416–20.
 52. Strydom K-A, Ismail F, Freaan J. *Plasmodium ovale*: a case of not-so-benign tertian malaria. Malar J. 2014 Mar 10;13:85.
 53. Tomar LR, Giri S, Baudhdh NK, Jhamb R. Complicated malaria: a rare presentation of *Plasmodium ovale*. Trop Doct. 2015 Apr;45(2):140–2.
 54. D’Abramo A, Gebremeskel Tekle S, Iannetta M, Scorzolini L, Oliva A, Paglia MG, *et al.* Severe *Plasmodium ovale* malaria complicated by acute respiratory distress syndrome in a young Caucasian man. Malar J. 2018 Apr 2;17(1):139.
 55. Groger M, Fischer HS, Veletzky L, Lalremruata A, Ramharter M. A systematic review of the clinical presentation, treatment and relapse characteristics of human *Plasmodium ovale* malaria. Malar J. 2017 11;16(1):112.
 56. Gonzalez-Ceron L, Mu J, Santillán F, Joy D, Sandoval MA, Camas G, *et al.* Molecular and epidemiological characterization of *Plasmodium vivax* recurrent infections in southern Mexico. Parasit Vectors. 2013 Apr 18;6:109.
 57. Chen N, Auliff A, Rieckmann K, Gatton M, Cheng Q. Relapses of *Plasmodium vivax* infection result from clonal hypnozoites activated at predetermined intervals. J Infect Dis. 2007 Apr 1;195(7):934–41.
 58. de Araujo FCF, de Rezende AM, Fontes CJF, Carvalho LH, Alves de Brito CF. Multiple-clone activation of hypnozoites is the leading cause of relapse in *Plasmodium vivax* infection. PLoS ONE. 2012;7(11):e49871.
 59. WHO | Guidelines for the treatment of malaria. Third edition. WHO. Disponible à l'adresse suivante : <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>
 60. Uthman OA, Graves PM, Saunders R, Gelband H, Richardson M, Garner P. Safety of primaquine given to people with G6PD deficiency: systematic review of prospective studies. Malar J. 2017 22;16(1):346.
 61. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Lancet. 2008 Jan 5;371(9606):64–74.
 62. Howes RE, Battle KE, Satyagraha AW, Baird JK, Hay SI. G6PD deficiency: global distribution, genetic variants and primaquine therapy. Adv Parasitol. 2013;81:133–201.
 63. World malaria report 2019. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>
 64. Mendis K, Rietveld A, Warsame M, Bosman A, Greenwood B, Wernsdorfer WH. From malaria control to eradication: The WHO perspective. Trop Med Int Health. 2009 Jul;14(7):802–9.
 65. WHO | A framework for malaria elimination. WHO. Disponible à l'adresse suivante : <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241511988/en/>
 66. Bishop RA, Litch JA. Malaria at High Altitude. Journal of Travel Medicine. 2006 Mar 8;7(3):157–8.
 67. Lysenko AJ, Beljaev AE. An Analysis of the Geographical Distribution of *Plasmodium ovale*. Bulletin of the World Health Organization 1969. :12.
 68. Malaria - Annual Epidemiological Report 2016. European Centre for Disease Prevention and Control. 2016. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2016-2014-data>

69. Rapport d'activité annuel du Centre National de Référence du paludisme pour l'année 2018.
70. Jauréguiberry S, Thellier M, Caumes E, Buffet P. Artesunate for Imported Severe Malaria in Nonendemic Countries. *Clin Infect Dis*. 2016 Jan 15;62(2):270–1.
71. HCSP. Recommandations sanitaires 2019 pour les voyageurs (à l'attention des professionnels de santé). Rapport de l'HCSP. Paris: Haut Conseil de la Santé Publique; 2019 Mar. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=719>
72. Ocan M, Akena D, Nsohya S, Kanya MR, Senono R, Kinengyere AA, *et al*. Persistence of chloroquine resistance alleles in malaria endemic countries: a systematic review of burden and risk factors. *Malar J*. 2019 Mar 12;18(1):76.
73. Hill DR, Baird JK, Parise ME, Lewis LS, Ryan ET, Magill AJ. Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Sep;75(3):402–15.
74. Ross R. An improved method for the microscopical diagnosis of intermittent fever. *The Lancet*. 1903 Jan 10;161(4141):86.
75. Payne D. Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ*. 1988;66(5):621–6.
76. Wongsrichanalai C, Barcus MJ, Muth S, Sutamihardja A, Wernsdorfer WH. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Dec;77(6 Suppl):119–27.
77. Milne LM, Kyi MS, Chiodini PL, Warhurst DC. Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. *J Clin Pathol*. 1994 Aug;47(8):740–2.
78. Ohrt C, O'Meara WP, Remich S, McEvoy P, Ogutu B, Mtalib R, *et al*. Pilot assessment of the sensitivity of the malaria thin film. *Malar J*. 2008 Jan 28;7:22.
79. Levine RA, Wardlaw SC. QBC malaria diagnosis. *Lancet*. 1992 May 30;339(8805):1354.
80. Wongsrichanalai C, Namsiripongpun V, Pornsilapatip J, Kyle DE, Wilde H. Sensitivity of QBC malaria test. *Lancet*. 1992 Sep 26;340(8822):792–3.
81. WHO | World Malaria Report 2016. WHO. Disponible à l'adresse suivante : <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>
82. Yerlikaya S, Campillo A, Gonzalez IJ. A Systematic Review: Performance of Rapid Diagnostic Tests for the Detection of *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae*, and *Plasmodium ovale* Monoinfections in Human Blood. *J Infect Dis*. 2018 20;218(2):265–76.
83. Tanizaki R, Kato Y, Iwagami M, Kutsuna S, Ujiie M, Takeshita N, *et al*. Performance of Rapid Diagnostic Tests for *Plasmodium ovale* Malaria in Japanese Travellers. *Trop Med Health*. 2014 Dec;42(4):149–53.
84. De Monbrison F, Gérome P, Chaulet JF, Wallon M, Picot S, Peyron F. Comparative diagnostic performance of two commercial rapid tests for malaria in a non-endemic area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004 Oct;23(10):784–6.
85. Plucinski MM, Candrinho B, Dimene M, Colborn J, Lu A, Nace D, *et al*. Assessing Performance of HRP2 Antigen Detection for Malaria Diagnosis in Mozambique. *J Clin Microbiol*. 2019 Sep;57(9).
86. Landier J, Haohankhunnatham W, Das S, Konghahong K, Christensen P, Raksuansak J, *et al*. Operational Performance of a *Plasmodium falciparum* Ultrasensitive Rapid Diagnostic Test for Detection of Asymptomatic Infections in Eastern Myanmar. *J Clin Microbiol*. 2018;56(8).
87. Kamaliddin C, Le Bouar M, Berry A, Fenneteau O, Gillet P, Godineau N, *et al*. Assessment of diagnostic methods for imported malaria in mainland France. *Med Mal Infect*. 2020;50(2):141–60.

88. Haute Autorité de santé - Evaluation des actes de diagnostic biologique des infections à *Plasmodium*. 2016;104.
89. Han E-T, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, *et al.* Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2007 Aug;45(8):2521–8.
90. Polley SD, González IJ, Mohamed D, Daly R, Bowers K, Watson J, *et al.* Clinical evaluation of a loop-mediated amplification kit for diagnosis of imported malaria. *J Infect Dis.* 2013 Aug 15;208(4):637–44.
91. Paludisme: rcp 2017 - Actualités - Documents - spilf - infectiologie. Disponible à l'adresse suivante : https://www.infectiologie.com/fr/actualites/paludisme-rcp-2017_-n.html
92. Camarda G, Jirawatcharadech P, Priestley RS, Saif A, March S, Wong MHL, *et al.* Antimalarial activity of primaquine operates via a two-step biochemical relay. *Nature Communications.* 2019 Jul 19;10(1):1–9.
93. HCSP. Utilisation de la primaquine en traitement radical contre le paludisme à *P. vivax* et *P. ovale* en France. Rapport de l'HCSP. Paris: Haut Conseil de la Santé Publique; 2018 May. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=670>
94. Subissi L, Kanoi BN, Balikagala B, Egwang TG, Oguike M, Verra F, *et al.* *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* infections and their association with common red blood cell polymorphisms in a highly endemic area of Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2019 01;113(7):370–8.
95. Taylor T, Agbenyega T. 96 - Malaria. In: Magill AJ, Hill DR, Solomon T, Ryan ET, editors. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease (Ninth Edition)*. London: W.B. Saunders; 2013. p. 695–717. Disponible à l'adresse suivante : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416043904000965>
96. Robinson P, Jenney AW, Tachado M, Yung A, Manitta J, Taylor K, *et al.* Imported malaria treated in Melbourne, Australia: epidemiology and clinical features in 246 patients. *J Travel Med.* 2001 Apr;8(2):76–81.
97. Mueller I, Zimmerman PA, Reeder JC. *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* – the ‘bashful’ malaria parasites. *Trends Parasitol.* 2007 Jun;23(6):278–83.
98. Rousset JJ, Couzineau P, Baufine-Ducrocq H. [*Plasmodium ovale* (Stephens 1922)]. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1969 Jun;44(3):273–328.
99. Faye FBK, Spiegel A, Tall A, Sokhna C, Fontenille D, Rogier C, *et al.* Diagnostic criteria and risk factors for *Plasmodium ovale* malaria. *J Infect Dis.* 2002 Sep 1;186(5):690–5.
100. Faye FB, Konaté L, Rogier C, Trape JF. *Plasmodium ovale* in a highly malaria endemic area of Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998 Oct;92(5):522–5.
101. Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, *et al.* Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J Infect Dis.* 2010 May 15;201(10):1544–50.
102. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* 1993 Apr;58(2):283–92.
103. Fuehrer H-P, Noedl H. Recent advances in detection of *Plasmodium ovale*: implications of separation into the two species *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi*. *J Clin Microbiol.* 2014 Feb;52(2):387–91.
104. Calderaro A, Piccolo G, Perandin F, Gorrini C, Peruzzi S, Zuelli C, *et al.* Genetic polymorphisms influence *Plasmodium ovale* PCR detection accuracy. *J Clin Microbiol.* 2007 May;45(5):1624–7.
105. Sutherland CJ, Polley SD. 22 - Genomic Insights into the Past, Current and Future Evolution of Human Parasites of the Genus *Plasmodium*. In: Tibayrenc M, editor. *Genetics and*

- Evolution of Infectious Disease. London: Elsevier; 2011. p. 607–35. Disponible à l'adresse suivante : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123848901000224>
106. Phuong MS, Lau R, Ralevski F, Boggild AK. Parasitological correlates of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* infection. *Malar J.* 2016 Nov 10;15(1):550.
 107. Kawamoto F, Miyake H, Kaneko O, Kimura M, Nguyen TD, Nguyen TD, *et al.* Sequence variation in the *18S rRNA* gene, a target for PCR-based malaria diagnosis, in *Plasmodium ovale* from southern Vietnam. *J Clin Microbiol.* 1996 Sep;34(9):2287–9.
 108. Zhou M, Liu Q, Wongsrichanalai C, Suwonkerd W, Panart K, Prajakwong S, *et al.* High prevalence of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* in malaria patients along the Thai-Myanmar border, as revealed by acridine orange staining and PCR-based diagnoses. *Trop Med Int Health.* 1998 Apr;3(4):304–12.
 109. Snounou G, Singh B. Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. *Methods Mol Med.* 2002;72:189–203.
 110. Fuehrer H-P, Habler VE, Fally MA, Harl J, Starzengruber P, Swoboda P, *et al.* *Plasmodium ovale* in Bangladesh: genetic diversity and the first known evidence of the sympatric distribution of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* in southern Asia. *Int J Parasitol.* 2012 Jun;42(7):693–9.
 111. Oguike MC, Betson M, Burke M, Nolder D, Stothard JR, Kleinschmidt I, *et al.* *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities. *Int J Parasitol.* 2011 May;41(6):677–83.
 112. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Montecchini S, Rossi S, Medici MC, *et al.* A new real-time PCR for the detection of *Plasmodium ovale wallikeri*. *PLoS ONE.* 2012;7(10):e48033.
 113. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Rossi S, Montecchini S, Dell'Anna ML, *et al.* Accurate identification of the six human *Plasmodium* spp. causing imported malaria, including *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium knowlesi*. *Malar J.* 2013 Sep 13;12:321.
 114. Bauffe F, Desplans J, Fraissier C, Parzy D. Real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* in the Ivory Coast and in the Comoros Islands. *Malar J.* 2012 Sep 4;11:307.
 115. Miller RH, Obuya CO, Wanja EW, Ogutu B, Waitumbi J, Luckhart S, *et al.* Characterization of *Plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* in Western Kenya Utilizing a Novel Species-specific Real-time PCR Assay. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Jan 15
 116. Lu F, Ahmed MA, Xu S, Xu S, Han J-H, Liu Q, *et al.* *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* in Chinese travelers: Prevalence of novel genotypes of circumsporozoite protein in the African continent. *Infection, Genetics and Evolution.* 2019 Jun 1;70:9–14.
 117. Rojo-Marcos G, Rubio-Muñoz JM, Ramírez-Olivencia G, García-Bujalance S, Elcuaz-Romano R, Díaz-Menéndez M, *et al.* Comparison of Imported *Plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* Infections among Patients in Spain, 2005–2011. *Emerg Infect Dis.* 2014 Mar;20(3):409–16.
 118. Rojo-Marcos G, Rubio-Muñoz JM, Angheben A, Jaureguiberry S, García-Bujalance S, Tomasoni LR, *et al.* Prospective comparative multi-centre study on imported *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* infections. *Malar J.* 2018 Oct 30;17(1):399.
 119. Nolder D, Oguike MC, Maxwell-Scott H, Niyazi HA, Smith V, Chiodini PL, *et al.* An observational study of malaria in British travellers: *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* differ significantly in the duration of latency. *BMJ Open.* 2013 Jan 1;3(5):e002711.
 120. Liew JWK, Mahmud R, Tan LH, Lau YL. Diagnosis of an imported *Plasmodium ovale wallikeri* infection in Malaysia. *Malar J.* 2016 Jan 6;15:8.
 121. Frickmann H, Wegner C, Ruben S, Loderstädt U, Tannich E. A comparison of two PCR

- protocols for the differentiation of *Plasmodium ovale* species and implications for clinical management in travellers returning to Germany: a 10-year cross-sectional study. *Malar J.* 2019 Aug 9;18(1):272.
122. Zhou R, Li S, Zhao Y, Yang C, Liu Y, Qian D, *et al.* Characterization of *Plasmodium ovale* spp. imported from Africa to Henan Province, China. *Scientific Reports.* 2019 Feb 18;9(1):1–8.
123. Sun H, Li J, Xu C, Xiao T, Wang L, Kong X, *et al.* Increasing number of imported *Plasmodium ovale wallikeri* malaria in Shandong Province, China, 2015-2017. *Acta Trop.* 2019 Mar;191:248–51.
124. Shin H-I, Ku B, Kim YJ, Kim TY, Cho S-H, Lee S-E. Diagnosis and Molecular Analysis on Imported *Plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* Malaria Cases from West and South Africa during 2013-2016. *Korean J Parasitol.* 2020 Feb;58(1):61–5.
125. Li Y, Wang G, Sun D, Meng F, Lin S, Hu X, *et al.* A case of *Plasmodium ovale wallikeri* infection in a Chinese worker returning from West Africa. *Korean J Parasitol.* 2013 Oct;51(5):557–62.
126. Saralamba N, Nosten F, Sutherland CJ, Arez AP, Snounou G, White NJ, *et al.* Genetic dissociation of three antigenic genes in *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri*. *PLoS ONE.* 2019;14(6):e0217795.
127. Cohen R, Feghali K, Alemayehu S, Komisar J, Hang J, Weina PJ, *et al.* Use of qPCR and genomic sequencing to diagnose *Plasmodium ovale wallikeri* malaria in a returned soldier in the setting of a negative rapid diagnostic assay. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 Sep;89(3):501–6.
128. Alemu A, Fuehrer H-P, Getnet G, Tessema B, Noedl H. *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* in North-West Ethiopia. *Malar J.* 2013 Sep 28;12:346.
129. Diallo MA, Badiane AS, Diongue K, Deme A, Lucchi NW, Gaye M, *et al.* Non-*falciparum* malaria in Dakar: a confirmed case of *Plasmodium ovale wallikeri* infection. *Malar J.* 2016 Aug 24;15(1):429.
130. Daniels RF, Deme AB, Gomis JF, Dieye B, Durfee K, Thwing JI, *et al.* Evidence of non-*Plasmodium falciparum* malaria infection in Kédougou, Sénégal. *Malar J.* 2017 Jan 3
131. Fançonny C, Gamboa D, Sebastião Y, Hallett R, Sutherland C, Sousa-Figueiredo JC, *et al.* Various *pfprt* and *pfmdr1* Genotypes of *Plasmodium falciparum* Cocirculate with *P. malariae*, *P. ovale* spp., and *P. vivax* in Northern Angola. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2012 Oct 1;56(10):5271–7.
132. Oguike MC, Sutherland CJ. Dimorphism in genes encoding sexual-stage proteins of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri*. *International Journal for Parasitology.* 2015 Jun 1;45(7):449–54.
133. Groger M, Veletzky L, Lalremruata A, Cattaneo C, Mischlinger J, Manego Zoleko R, *et al.* Prospective Clinical and Molecular Evaluation of Potential *Plasmodium ovale curtisi* and *wallikeri* Relapses in a High-transmission Setting. *Clin Infect Dis.* 2019 Nov 27;69(12):2119–26.
134. Veletzky L, Groger M, Lagler H, Walochnik J, Auer H, Fuehrer H-P, *et al.* Molecular evidence for relapse of an imported *Plasmodium ovale wallikeri* infection. *Malar J.* 2018 Feb 9;17(1):78.
135. Tanomsing N, Imwong M, Sutherland CJ, Dolecek C, Hien TT, Nosten F, *et al.* Genetic marker suitable for identification and genotyping of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri*. *J Clin Microbiol.* 2013 Dec;51(12):4213–6.
136. Zhou R, Liu Y, Li S, Zhao Y, Huang F, Yang C, *et al.* Polymorphisms analysis of the *Plasmodium ovale* tryptophan-rich antigen gene (*potra*) from imported malaria cases in Henan Province. *Malar J.* 2018 Mar 23;17(1):127.
137. Stephenson FH. Chapter 8 - The Polymerase Chain Reaction. In: Stephenson FH, editor.

Calculations for Molecular Biology and Biotechnology (Third Edition). Boston: Academic Press; 2016. p. 171–213. Disponible à l'adresse suivante :

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128022115000084>

138. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*. 1997 Jan;22(1):130–1, 134–8.

139. Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat*. 2009 Jun;30(6):857–9.

140. Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol*. 2008 Aug;85(1):50–8.

141. Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L. Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nature Protocols*. 2007 Jan;2(1):59–66.

142. d’Humières C, Bidet P, Levy C, Béchet S, Bonacorsi S, Bingen E, et al. Comparative epidemiology of *Streptococcus pyogenes* emm-types causing invasive and noninvasive infections in French children by use of high-resolution melting-polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J*. 2015 Jun;34(6):557–61.

143. Chua KH, Lim SC, Ng CC, Lee PC, Lim YAL, Lau TP, et al. Development of High Resolution Melting Analysis for the Diagnosis of Human Malaria. *Scientific Reports*. 2015 Oct 28;5:15671.

144. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatton K. Detection of Four *Plasmodium* Species in Blood from Humans by 18S *rRNA* Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays. *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5636–43.

145. Shokoples SE, Ndao M, Kowalewska-Grochowska K, Yanow SK. Multiplexed Real-Time PCR Assay for Discrimination of *Plasmodium* Species with Improved Sensitivity for Mixed Infections. *J Clin Microbiol*. 2009 Apr;47(4):975–80.

146. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr;55(4):611–22.

147. Talman AM, Duval L, Legrand E, Hubert V, Yen S, Bell D, et al. Evaluation of the intra- and inter-specific genetic variability of *Plasmodium* lactate dehydrogenase. *Malar J*. 2007 Oct 25;6:140.

148. Fuehrer H-P, Stadler M-T, Buczolic K, Bloesch I, Noedl H. Two Techniques for Simultaneous Identification of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* by Use of the Small-Subunit rRNA Gene. *J Clin Microbiol*. 2012 Dec;50(12):4100–2.

149. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>

150. Lampah DA, Yeo TW, Malloy M, Kenangalem E, Douglas NM, Ronaldo D, et al. Severe malarial thrombocytopenia: a risk factor for mortality in Papua, Indonesia. *J Infect Dis*. 2015 Feb 15;211(4):623–34.

151. Barber BE, William T, Grigg MJ, Piera K, Yeo TW, Anstey NM. Evaluation of the Sensitivity of a pLDH-Based and an Aldolase-Based Rapid Diagnostic Test for Diagnosis of Uncomplicated and Severe Malaria Caused by PCR-Confirmed *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium falciparum*, and *Plasmodium vivax*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013 Apr 1;51(4):1118–23.

152. Wickham, H. and Henry, L. (2018). tidy: Easily Tidy Data with “spread()” and “gather()” Functions. R package version 0.8.1. <https://CRAN.R-project.org/package=tidy>.

153. Rutledge GG, Böhme U, Sanders M, Reid AJ, Cotton JA, Maiga-Ascofare O, et al. *Plasmodium malariae* and *P. ovale* genomes provide insights into malaria parasite evolution. *Nature*. 2017 Feb;542(7639):101–4.

154. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*. 1988 Nov 25;16(22):10881–90.

155. Dwight Z, Palais R, Wittwer CT. uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. *Bioinformatics*. 2011 Apr 1;27(7):1019–20.
156. Nabarro LEB, Nolder D, Broderick C, Nadjm B, Smith V, Blaze M, et al. Geographical and temporal trends and seasonal relapse in *Plasmodium ovale* spp. and *Plasmodium malariae* infections imported to the UK between 1987 and 2015. *BMC Med*. 2018 27;16(1):218.
157. Dhingra N, Jha P, Sharma VP, Cohen AA, Jotkar RM, Rodriguez PS, et al. Adult and child malaria mortality in India: a nationally representative mortality survey. *The Lancet*. 2010 Nov 20;376(9754):1768–74.
158. Gupta I, Chowdhury S. Economic burden of malaria in India: The need for effective spending. *WHO South East Asia J Public Health*. 2014 Mar;3(1):95–102.
159. WHO | World malaria report 2018. WHO. Disponible à l'adresse suivante : <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>
160. Wilczynski SP. CHAPTER 7 - Molecular Biology. In: Weidner N, Cote RJ, Suster S, Weiss LM, editors. *Modern Surgical Pathology (Second Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2009. p. 85–120. Disponible à l'adresse suivante : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416039662000060>
161. Calero O, Hortigüela R, Bullido MJ, Calero M. Apolipoprotein E genotyping method by real time PCR, a fast and cost-effective alternative to the TaqMan and FRET assays. *J Neurosci Methods*. 2009 Oct 15;183(2):238–40.
162. Mercereau-Puijalon O, Barale J-C, Bischoff E. Three multigene families in *Plasmodium* parasites: facts and questions. *Int J Parasitol*. 2002 Oct;32(11):1323–44.
163. Daniels R, Ndiaye D, Wall M, McKinney J, Séne PD, Sabeti PC, et al. Rapid, field-deployable method for genotyping and discovery of drug-resistance single nucleotide polymorphisms in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar 19;AAC.05737-11.
164. Luo T, Jiang L, Sun W, Fu G, Mei J, Gao Q. Multiplex Real-Time PCR Melting Curve Assay To Detect Drug-Resistant Mutations of *Mycobacterium tuberculosis* ▽. *J Clin Microbiol*. 2011 Sep;49(9):3132–8.
165. Li J, Wang L, Mamon H, Kulke MH, Berbeco R, Makrigiorgos GM. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nature Medicine*. 2008 May;14(5):579–84.
166. Mace KE. Malaria Surveillance — United States, 2016. *MMWR Surveill Summ*. 2019;68. Disponible à l'adresse suivante : <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/ss/ss6805a1.htm>
167. Kotepui M, Kotepui KU, Milanez GD, Masangkay FR. Severity and mortality of severe *Plasmodium ovale* infection: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*. 2020;15(6):e0235014.
168. Schwake L, Streit JP, Edler L, Encke J, Stremmel W, Junghanss T. Early treatment of imported *falciparum* malaria in the intermediate and intensive care unit setting: an 8-year single-center retrospective study. *Crit Care*. 2008;12(1):R22.
169. Lança EFC, Magalhães BML, Vitor-Silva S, Siqueira AM, Benzecry SG, Alexandre MAA, et al. Risk factors and characterization of *Plasmodium vivax*-associated admissions to pediatric intensive care units in the Brazilian Amazon. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e35406.
170. Tang J, Tang F, Zhu H, Lu F, Xu S, Cao Y, et al. Assessment of false negative rates of lactate dehydrogenase-based malaria rapid diagnostic tests for *Plasmodium ovale* detection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(3):e0007254.
171. Mariette N, Barnadas C, Bouchier C, Tichit M, Ménard D. Country-wide assessment of the genetic polymorphism in *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* antigens detected with rapid diagnostic tests for malaria. *Malar J*. 2008 Oct 28;7:219.

172. Kim J-Y, Kim H-H, Shin H, Sohn Y, Kim H, Lee S-W, *et al.* Genetic variation of aldolase from Korean isolates of *Plasmodium vivax* and its usefulness in serodiagnosis. *Malar J.* 2012 May 8;11:159.
173. Mason DP, Kawamoto F, Lin K, Laoboonchai A, Wongsrichanalai C. A comparison of two rapid field immunochromatographic tests to expert microscopy in the diagnosis of malaria. *Acta Trop.* 2002 Apr;82(1):51–9.
174. Leclerc MC, Durand P, de Meeûs T, Robert V, Renaud F. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal, investigated from microsatellite and antigen determinant loci. *Microbes Infect.* 2002 Jun;4(7):685–92.
175. Su X z, Wellems TE. Toward a high-resolution *Plasmodium falciparum* linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. *Genomics.* 1996 May 1;33(3):430–44.
176. Gunawardena S, Karunaweera ND, Ferreira MU, Phone-Kyaw M, Pollack RJ, Alifrangis M, *et al.* Geographic structure of *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of parasite populations from Sri Lanka, Myanmar, and Ethiopia. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Feb;82(2):235–42.
177. Orjuela-Sánchez P, Brandi MC, Ferreira MU. Microsatellite analysis of malaria parasites. *Methods Mol Biol.* 2013;1006:247–58.
178. Leichty AR, Brisson D. Selective whole genome amplification for resequencing target microbial species from complex natural samples. *Genetics.* 2014 Oct;198(2):473–81.
179. Spits C, Le Caignec C, De Rycke M, Van Haute L, Van Steirteghem A, Liebaers I, *et al.* Whole-genome multiple displacement amplification from single cells. *Nature Protocols.* 2006 Nov;1(4):1965–70.
180. Oyola SO, Ariani CV, Hamilton WL, Kekre M, Amenga-Etego LN, Ghansah A, *et al.* Whole genome sequencing of *Plasmodium falciparum* from dried blood spots using selective whole genome amplification. *Malar J.* 2016 Dec 20;15(1):597.
181. Ibrahim A, Diez Benavente E, Nolder D, Proux S, Higgins M, Muwanguzi J, *et al.* Selective whole genome amplification of *Plasmodium malariae* DNA from clinical samples reveals insights into population structure. *Scientific Reports.* 2020 Jul 2;10(1):10832.
182. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 1999 Jan 15;27(2):573–80.
183. Antao T, Lopes A, Lopes RJ, Beja-Pereira A, Luikart G. LOSITAN: a workbench to detect molecular adaptation based on a Fst-outlier method. *BMC Bioinformatics.* 2008 Jul 28;9:323.
184. Pacheco MA, Lopez-Perez M, Vallejo AF, Herrera S, Arévalo-Herrera M, Escalante AA. Multiplicity of Infection and Disease Severity in *Plasmodium vivax*. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2016 Jan 11;10(1):e0004355.

Publications

Article n°1 : Joste V, Kamaliddin C, Kendjo E, Hubert V, Argy N, Houzé S. Scientific Reports. 2018 Jan 10;8(1):1–8. doi : 10.1038/s41598-017-18026-1

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Distinction of *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* using quantitative Polymerase Chain Reaction with High Resolution Melting revelation

V. Joste^{1,2}, C. Kamaliddin^{1,3}, E. Kendjo^{1,4}, V. Hubert^{1,3}, N. Argy^{1,2,3} & S. Houzé^{1,2,3}

Plasmodium ovale curtisi (*Poc*) and *Plasmodium ovale wallikeri* (*Pow*) have been described as two distinct species, only distinguishable by molecular methods such as PCR. Because of no well-defined endemic area and a variable clinical presentation as higher thrombocytopenia and nausea associated with *Pow* infection and asymptomatic forms of the pathology with *Poc* infection, rapid and specific identification of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* are needed. The aim of the study was to evaluate a new quantitative real-time PCR coupled with high resolution melting revelation (qPCR-HRM) for identification of both species. Results were compared with a nested-PCR, considered as a gold standard for *Pow* and *Poc* distinction. 356 samples including all human *Plasmodium* species at various parasitaemia were tested. The qPCR-HRM assay allowed *Poc* and *Pow* discrimination in 66 samples tested with a limit of detection evaluated at 1 parasite/μL. All these results were concordant with nested-PCR. Cross-reaction was absent with others blood parasites. The qPCR-HRM is a rapid and convenient technique to *Poc* and *Pow* distinction.

Malaria is triggered by an apicomplexan parasite, *Plasmodium* spp. 215 millions of cases and 429 000 deaths occurred in the world in 2015¹. Six *Plasmodium* species infect humans: *Plasmodium falciparum* (*Pf*), *Plasmodium vivax* (*Pv*), *Plasmodium malariae* (*Pm*), *Plasmodium knowlesi* (*Pk*) and *Plasmodium ovale* spp (*P. ovale* spp) including *Plasmodium ovale curtisi* (*Poc*) and *Plasmodium ovale wallikeri* (*Pow*). Although malaria transmission was absent, France was the most exposed non endemic country for malaria². Imported malaria cases diagnosed in France are reported to the National French Malaria Reference Center (FNMRC). In 2015, whereas *Pf* infection represented most of malaria cases (89%), *P. ovale* spp were involved in 6.8% of cases (4690 cases total)³, all contracted in Africa. Moreover, seven cases of *Plasmodium ovale* spp relapse (defined by malaria disease more than one year after the return from an endemic area) occurred in these patients (46% of the 15 observed relapses)³.

Malaria symptoms are nonspecific and the observation of thick and thin stained blood smears remained the reference method of diagnosis^{4,5}. This technique is rapid and unexpensive, but required an experienced microscopist to ensure the quality of the result. However, species discrimination could be challenging, as *Poc* and *Pow* which cannot be reliably differentiated using this methodology.

Alternative ways to identify *Plasmodium* infection, such as Rapid Diagnosis Test (RDT) and PCR methods, have recently become available. Molecular biology diagnosis based methods are in constant expansion, in particular real-time methods. In the last decades, the malaria researcher community has developed several primers sets for species identification, to increase sensitivity in *Plasmodium* diagnosis.

¹National French Malaria Reference Center, Bichat-Claude Bernard Hospital, 75018, Paris, France. ²Parasitology and Mycology Laboratory, Bichat-Claude Bernard Hospital, APHP, 75018, Paris, France. ³UMR216- MERIT, COMUE Sorbonne Paris Cité, Faculté de Pharmacie de Paris, Paris Descartes University, Paris, 75006, France. ⁴National French Malaria Reference Center, Pitié Salpêtrière hospital, 75013, Paris, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.J. (email: valentin.joste@aphp.fr)

	Pf	Pv	Pm	Pow	Poc	Pk
Median Tm1+/- interquartile range	72.892 +/- 0.100 (n = 208)	74.798 +/- 0.100 (n = 17)	73.926 +/- 0.179 (n = 18)	71.165 +/- 0.2285 (n = 31)	70.529 +/- 0.142 (n = 34)	75.289 (n = 2)
Median Tm2+/- interquartile range	75.396 +/- 0.112 (n = 210)			73.387 +/- 0.14725 (n = 33)	73.750 +/- 0.099 (n = 36)	

Table 1. Median melting temperature and interquartile range for each species. We considered qPCR-Taqman (for *Pf*, *Pv*, *Pm* and *P. ovale* spp) and nested-PCR (for *Poc* and *Pow*) as the reference for species determination.

First, nested-PCR methods with agarose gel revelation were developed. Probe based real-time PCR assays such as Taqman have been developed later on, and increased sensitivity and specificity. However, the sample processing and the technique itself are time consuming and cannot be applied in routine diagnosis procedures.

Up to 2010, scientists and biologist referred to *Poc* and *Pow* as *P. ovale* spp⁶. It is now admitted that *Poc* and *Pow* are two distinct species and not subspecies⁷. *Poc* and *Pow* are minor forms of malaria, however severe disease forms and deaths have been reported⁸. Differences in clinical implication, specific geographic repartition and response to antimalarial therapy might also exist between *Poc* and *Pow*, but the respective implication of each has not been completely studied yet. In addition, *Poc* and *Pow* physiopathology is unknown, especially mechanisms leading to the dormant form hypnozoite formation and relapses^{9,10}. In fact, some differences in the latency period of the hypnozoites were highlighted¹¹, higher thrombocytopenia and nausea with *Pow* was reported by another study¹². Yet, microscopic examination of blood smear does not allow differentiation of the two species, even if a recent study described a lack of discernible Schüffner's stippling in *Pow* samples¹³. Moreover, RDT efficiency was low and no differences in RDT positivity were found between *Poc* and *Pow*¹³. Therefore, differentiation of *Poc* and *Pow* remains challenging, and the development of convenient tools to differentiate *Poc* and *Pow* is crucial to investigate the burden on malaria infections of each species, as well as their clinical implication.

Poc and *Pow* can be differentiated based on differences in their DNA sequences. Nested-PCR technique has been developed¹⁴ as well as qPCR protocols^{15–18}. However, nested-PCR techniques are time-consuming requiring a two-step amplification followed by a PCR product migration on agarose gel. The entire process takes almost a day, and needs a dedicated environment for post-PCR products' manipulation. Taqman probe based techniques are highly accurate and specific, but are expensive.

Here, we developed a new qPCR technique with High Resolution melting (HRM) (qPCR-HRM) revelation with the aim to reliably differentiate *Pow* and *Poc*, using samples from patients with imported malaria received at the FNMRC.

Results

Of the 356 samples were included in the study period, 25 were negative for *Plasmodium* infection and 331 were positive according to qPCR-Taqman results (Supplementary Table S1): 219 were positive for *Pf*, 69 *Po* (subsequently identified as 33 *Pow*, and 36 *Poc* with nested PCR), 20 for *Pm*, 17 for *Pv*. 6 samples present mixed infection: 4 *P. ovale* spp + *Pf* (subsequently identified for two *P. ovale* spp as *Poc*), 1 *P. ovale* spp (subsequently identified as *Poc*) + *Pm* and 1 *P. ovale* spp + *Pm*. In microscopy, among 343 observed by microscopy, we detected 46 negative, 6 *Plasmodium* spp, 182 *Pf*, 20 *Pm*, 70 *P. ovale* spp, 17 *Pv*, 1 *Pf* + *Pm*, 1 *Pf* + *P. ovale* spp.

For specificity analysis, we also included 6 other parasitological positive samples from blood parasites (*Toxoplasma gondii*, *Leishmania infantum*, *Loa loa*, *Onchocerca volvulus*, *Wuchereria bancrofti* and *Babesia divergens*).

qPCR-HRM development. *In silico* prevision. *In silico* alignment was performed from predictive PCR product using the primers chosen for qPCR-HRM analysis. Plasm0-1F and Plasm0-2R primers amplify a 160-based pair (bp) and 157 bp sequence for *Poc* and *Pow* respectively. As a sequence variation in predictive PCR product for *Poc* and *Pow* was observed, HRM reaction could highlight a difference between both species. Using the specific uMELT online tool for PCR product melting temperature (Tm) analysis, predicting melting temperature from the HRM phase based on an algorithm analyzing DNA bounds strength, Tm could be predicted for the amplified sequences (77.4 °C for *Pow* and 76.8 °C for *Poc*). Predicted Tm as well as theoretical derived melting curves for other *Plasmodium* species are displayed in Supplementary Figure S2.

Distinction of *P. ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi*. Among the 69 *P. ovale* spp samples confirmed by qPCR-Taqman, Tm values for each species were reproducible (see Table 1 for average Tm and interquartile interval for *Poc* and *Pow*). 32 *Pow* and 34 *Poc* were identified by qPCR-HRM and these results were compared with nested-PCR followed by an electrophoresis in agarose gel and species were determined with 100% of concordance (Supplementary Table S1). However, by qPCR-HRM, 3 samples were misidentified as *Plasmodium malariae*: two were *Poc* and one was *Pow* by nested-PCR.

Specific geographic repartition of *Poc* and *Pow* in the included samples is presented in Fig. 1 and in Supplementary Table S1. *Pow* seems to be overrepresented in Cameroon whereas *Poc* seems to be overrepresented in Central African Republic. *Poc* and *Pow* are co-endemic in Ivory Coast, Cameroon, Central African Republic, Mali, Congo.

Mixed artificial samples with both *Poc* and *Pow*. Both *Poc* and *Pow* were distinguished in artificial samples, except when *Pow* was present in a strong majority (ratio 80% *Pow*/20% *Poc* and 90% *Pow*/10% *Poc*). Derivative melt curves of those samples are presented in Supplementary Figure S3. Same conclusions were made for *Pf*, *Pv*, *Pm*-*Po* mixed infections which could not be detected in mixed artificial samples.

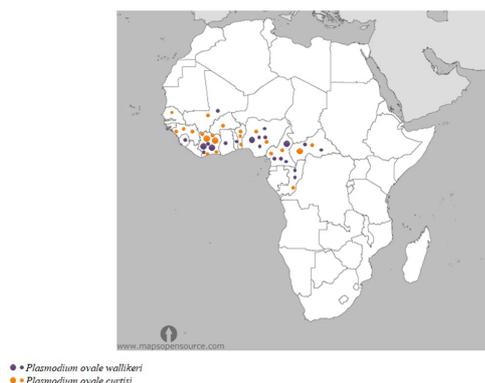


Figure 1. Map representing the origins of *P. ovale* spp samples included in the study. Orange represent *Poc* and purple *Pow*. Sign size is proportional to the number of samples from a given area. The smaller sign represents one sample, and the bigger one five samples. This map is modified from this URL: <http://www.mapsopenresource.com/africa-countries-outline-map-black-and-white.html> which provided open source map with no permission required (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

qPCR-HRM characteristics. Repeatability and reproducibility. Repeatability was evaluated for *Poc* and *Pow* using three different parasite's densities. Repeatability was between 0.38 standard deviation (SD) and 0.49SD of Ct for *Poc* and, between 0.55 to 1.26 SD of Ct for *Pow*. Reproducibility was not evaluated as the assay was not quantitative. However, comparing the Tm for 10 samples on 10 distinct reactions, we observed a constant Tm in the different assay. Regarding *Poc*, coefficient variation was between 0.18 to 0.25% (70.90 ± 0.132 to 70.90 ± 0.162) for Tm1 and between 0.17 to 0.54% (73.98 ± 0.13 °C to 74.31 ± 0.405 °C) for Tm2. Regarding *Pow*, coefficient variation for Tm1 was between 0.20 to 0.47% (71.446 ± 0.144 °C to 41.434 ± 0.314 °C) and between 0.19 to 0.24% (73.708 ± 0.144 °C to 73.834 ± 0.174 °C) for Tm2.

Sensitivity and specificity. LOD was the lowest parasite concentration that had repeated positive signal detection with qPCR-HRM¹⁹ and was evaluated at 1 parasite/μL for both *Poc* and *Pow*.

No cross-reaction with *Toxoplasma gondii*, *Leishmania infantum*, *Loa loa*, *Onchocerca volvulus*, *Wuchereria bancrofti*, and *Babesia divergens* was detected with the qPCR-HRM technique. We observed significant amplification for *Toxoplasma gondii* and *Wuchereria bancrofti* but none of the Tm were specific to any *Plasmodium* (Supplementary Table S4).

As *in silico* prevision for the ability of the qPCR-HRM to distinguish *P. ovale* spp from other *Plasmodium* species, we applied the qPCR-HRM on 356 *Plasmodium* positive samples to confirm experimentally *in silico* data. Concordance between the qPCR-HRM and the qPCR-Taqman FTD Malaria Differentiation was observed for 336 samples (93.6%). Among the 23 (6.4%) discordant samples, there were with qPCR-HRM 11 false negative (sensitivity = 97%), 5 undetected species mixed (only one of both species detected), and 7 false positive results with crossing reactions between *Pf* and *Pv* (2 cases), *P. ovale* spp and *Pm* (3 cases), *Pm* and *Pv* (2 cases). No false positive were reported (specificity of 100%). We could distinguish *Plasmodium* species because *Pf* and *P. ovale* spp displayed a profile pattern with two specific Tm (Table 1) whereas melting curves obtained with samples positive for *Pm*, *Pv* and *Pk* displayed a profile with one specific Tm. *Poc* and *Pow* melting curves derivative plot showed two distinct profiles with Tms specific of each (70.529 °C and 73.750 °C for *Poc*, and 71.165 °C and 73.387 °C for *Pow*) (Fig. 2). In our batch of sample, we described three *P. ovale* spp with one remaining Tm (2 *Poc* and 1 *Pow*) with no relation with the Ct (mean Ct equal to 25.755 ± 2.188).

All isolated species, except *Pm*, are in good concordance between qPCR-HRM and qPCR-Taqman (Table 2).

Discussion

The existence of the two species *Poc* and *Pow* has been known since 2010, but has currently no impact on clinical care of the patient. It is not possible to differentiate them by optical microscopy. However, some clinical and biological differences have been noticed, such as higher proportion of thrombocytopenia and nausea with *Pow*¹². It also appears that *Poc* is more frequently asymptomatic²⁰. For these reasons, a cost-effective qPCR-HRM method was developed for the differentiation of *Poc* and *Pow* species.

qPCR-HRM allowed us to discriminate *Poc* and *Pow* in confirmed *P. ovale* spp positive samples. To our knowledge, this is the first qPCR-HRM that allows *Poc* and *Pow* discrimination. LOD is similar to other qPCR-HRM already published²¹. Repeatability and reproducibility are really satisfying. From selected primer already published²², 18S RNA amplicons were aligned with the chosen primer to ensure the sequences divergence, and therefore the Tm variation, before setting the qPCR-HRM assay. The sequence presents noticeable variation between the *Pow* and *Poc* (98% consistency), and each parasites contains four to eight copies guaranteeing a good

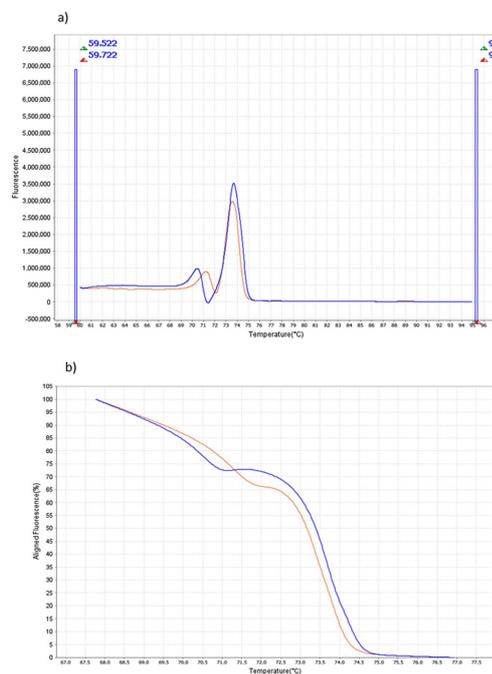


Figure 2. *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* in derivative (a) and aligned melt curves (b) obtained after HRM phase in ViiA7. X axis represents the temperature (°C). Y axis represent the fluorescence (derivative melt curve, a) or the aligned fluorescence (aligned melt curves, b). *Plasmodium ovale curtisi* profile is displayed in blue, and *Plasmodium ovale wallikeri* is displayed in orange.

qPCR-Taqman/Nested-PCR	qPCR-HRM								Total
	<i>Pf</i>	<i>Pv</i>	<i>Pm</i>	<i>Poc</i>	<i>Pow</i>	<i>Pf + Po</i>	<i>Pm + Po</i>	Negative	
<i>Pf</i>	209	1	0	0	0	0	0	9	219
<i>Pv</i>	1	16	0	0	0	0	0	0	17
<i>Pm</i>	0	2	16	0	0	0	0	2	20
<i>Poc</i>	0	0	2	34	0	0	0	0	36
<i>Pow</i>	0	0	1	0	32	0	0	0	33
<i>Pf + Po</i>	3	0	0	0	0	1	0	0	4
<i>Pm + Po</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	2
Negative	0	0	0	0	0	0	0	25	25
Total	213	19	20	35	32	1	0	36	356

Table 2. Comparison between qPCR-Taqman, nested-PCR and qPCR-HRM results, by species, alone or in association.

sensitivity to the PCR²³ but this also complicates quantitative approaches. *In silico* prediction shows us different predictive T_m for *Poc* and *Pow* that convinced us to test Plasmol-F and Plasmol-R. In that *in silico* prediction, distinction between *P. ovale* spp and other *Plasmodium* species was also possible.

From 69 samples of *P. ovale* spp: 66 were identified by qPCR-HRM, and among those, concordance with nested PCR for species determination was perfect (100% concordance). This qPCR-HRM is fully efficient in *Poc* and *Pow* discrimination, after *P. ovale* spp confirmed identification: identification of other species than *Poc* or *Pow* don't have to be considered because we demonstrated false identification. qPCR methods have already been published to distinguish species of *P. ovale* spp using specific probes in qPCR-Taqman¹⁸ but we present here an innovative way of PCR revelation. In our study we highlighted that *Poc* and *Pow* are co-endemic in some African

countries such as Congo as previously described¹⁵. We demonstrated that *Poc* and *Pow* are also co-endemic in Ivory Coast, Cameroon, Central African Republic and Mali.

To assess the *in silico* data for the predicted *Poc* and *Pow* discrimination with other *Plasmodium* species infecting humans, qPCR-HRM was performed on other malaria positive samples. We couldn't find the right specie in every sample. 18S RNA gene copies are located in 4 chromosomes among *Plasmodium* genome (chromosome 1, 5, 7 and 13). And for *Pf*, copies present 2 different sequences of 18S RNA gene. It explains the existence of two Tms as described by Kassaza *et al.*²⁴ and shown in Supplementary Figure S2. We assume that the double Tm profile for *P. ovale* spp correspond also to genomic sequence variation (Fig. 2). *Pm* and *Pv* exhibit one specific Tm, with a difference in Tm of at least 0,5 °C between the two species. We tested two samples of *Pk* to assess the specificity of *Po* detection because *P. ovale* spp and *Pk* are co-endemic in Asia. Distinction of *Pk* and *P. ovale* spp was possible in all cases.

We reported 23 discordances in 356 samples (6.4%) in our data set between qPCR-HRM and qPCR-Taqman (FTD Malaria Diagnosis). There were eleven false negative results (nine for *Pf* and two for *Pm*) and discordances in species determination. We didn't detect species combination in clinical samples whereas it was possible in artificial sample calibrated in laboratory, related to the difficulty to reveal the minor species. But, according to FNMRC data, *P. ovale* spp is rarely present in *Plasmodium* coinfection (3% in 2016)³ and co-infection malaria infections appear rare in import malaria (less than 1% of malaria infections in 2014 in United States²⁵).

The rationale behind the development of our qPCR-HRM method was cost-efficiency for separating minor DNA sequence variation. It also provides an affordable molecular tool for laboratories, since only standard primers and protocols are required, and a same mix and protocol allows several analyses. qPCR-HRM allows examination of mutations in 400 bases pairs fragment whereas probe-based qPCR assays examine only twenty bases pairs fragment, are more expensive and present technical pitfalls which must be considered in large scale studies (e.g. probe conservation). Compared to nested-PCR, qPCR-HRM is faster, easier to interpret and limit experimental errors.

This qPCR-HRM allowed us to distinguish *Poc* and *Pow* in 100% cases. However, the technique does present some limits, especially for *Pm* with a risk of misdiagnosis. Here, some technical improvements could be evaluated, such as Mutant Allele Amplification Bias (MAAB)²⁶ or cold-PCR²⁷ to discriminate the minor species in mixed infection, using the qPCR-HRM method we have described here. Those technical innovations should be conducted in the context of *Plasmodium* genomes and may be used to detect minor species in a mixed sample. Additional solutions may be considered, such as an increase DNA concentration to lower sensitivity threshold, or increase time of PCR (with a higher risk of false positive).

To conclude, we developed a qPCR-HRM for *Poc* and *Pow* discrimination, that can be used in epidemiological studies on the geographical distribution of each species or in studies aimed at detecting differences in clinical, prognostic and sensitivity to anti-malaria drugs. In general, this will facilitate a better understanding of the biological differences between *Poc* and *Pow* and their incidence in pathology.

Materials and Methods

Sample collection. Between January 2015 and August 2015, fresh blood samples collected on EDTA received in the FNMRC for expertise from patients were included. We also tested 2 *Pk* positive samples.

No specific consent was required because of, in coordination with Sante Publique France organization for the care and surveillance of malaria, the parasitological data were collected in the FNMRC database and analyzed in accordance with the common public health mission of all French National Reference Centers. The study of the biological samples obtained in the medical care context was considered as a non-interventional research (article L1221-1.1 of the French public health code) only requiring the non-opposition of the patient during sampling (article L1211-2 of the French public health code). All data collected were anonymized before analysis.

DNA extraction. DNA was extracted from a sample of 200 µL of whole blood sample using Magnapure[®] (Roche diagnosis, Bale, Switzerland) and was eluted in 100 µL of buffer following manufacturer's instructions. DNA was stored at -20 °C until species analyses.

Species identification. On each included sample, microscopy diagnosis and qPCR-Taqman for *Pf*, *Pv*, *Pm*, *P. ovale* spp determination. On positive samples for *P. ovale* spp with qPCR-Taqman, *Poc* and *Pow* distinction was determined by nested-PCR. We then performed qPCR-HRM on each sample.

Microscopic investigation. Thick blood smears were considered positive if one or more malaria parasites were visualized and negative if no parasites were detected after examining 1000 white blood cells. Thin blood smears were read by two distinct operators. Parasite species was determined using thin blood smears. Parasitaemia was expressed in parasite density (parasites/µL) following this formula:

$$\text{parasite density} = 45000 * \text{parasitaemia (parasites/}\mu\text{L)}. \quad (1)$$

qPCR-Taqman method. Species identification was confirmed by qPCR-Taqman (FTD Malaria, Fast-track Diagnostics, Launch diagnostics[®]) following manufacturer's instruction. All samples were run in qPCR-Taqman.

Nested-PCR for *P. knowlesi* determination. *Pk* infection was confirmed by PCR as described by Singh *et al.*²⁸.

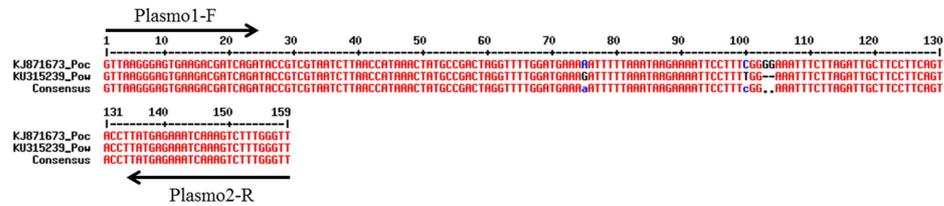


Figure 3. Alignment of 18S RNA amplified sequence from *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* using MultiAlin. Primer position are displayed on 18S RNA gene sequence (Plasmol1-F and Plasmol2-R). The insertion of two Guanine in position 103 and 104 allows species differentiation using HRM detection.

Nested-PCR for determination of *Poc* and *Pow*. All *P. ovale* spp positive samples in qPCR-Taqman were run in nested-PCR. We used nested-PCR previously described for *Poc* and *Pow* determination²⁹. The first PCR employed primer pair rPLU1 (5'-TCA-AAG-ATT-AAG-CCA-TGC-AAG-TGA-3') and rPLU5 (5'-CCT-GTT-GTT-GCC-TTA-AAC-TTC-3') primers for a *Plasmodium* genus reaction³⁰. The second PCR reaction was performed with primer pair rOVA1 (5'-ATC-TCT-TTT-GCT-ATT-TTT-TAG-TAT-TGG-AGA-3')/rOVA2 (5'-GGA-AAA-GGA-CAC-ATT-AAT-TGT-ATC-CTA-GTG-3') for *Poc* identification³¹ and primer pair rOVA1v (5'-ATC-TCC-TTT-ACT-TTT-TGT-ACT-GGA-GA-3')/rOVA2v (5'-GGA-AAA-GGA-CAC-TAT-AAT-GTA-TCC-TAA-TA-3') for *Pow* identification^{14,29}. PCR products were visualized on 2% agarose gels stained with Gelred[®] (10000X, Biotium, inc).

qPCR-HRM development. Primers used in the qPCR-HRM were Plasmol1-F (5'-GTT-AAG-GGA-GTG-AAG-ACG-ATC-AGA-3') and Plasmol2-R (5'-AAC-CCA-AAG-ACT-TTG-ATT-TCT-CAT-AA-3'), targeting the 18S RNA gene which contains both highly conserved and variable regions in all *Plasmodium* species infecting humans, previously described by Rougemont *et al.*^{22,32} (Fig. 3).

To set up a one-step PCR method for *P. ovale* spp species determination, differences in the PCR products for a given set of PCR primers were investigated to know if they could present enough differences to be noticeable with a HRM based PCR product detection. To this end, we first aligned the PCR products from the *in silico* PCR, using the multalin online tool (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>)³³. Then, we performed a melting temperature simulation, using uMELT online tool (available at <https://www.dna.utah.edu/umelt/umb.php>), to assess if the differences observed in the PCR products would be sufficient or not to distinguish *Poc* and *Pow* using HRM detection³⁴ and to distinguish *P. ovale* spp from other *Plasmodium* species.

PCR reaction. The PCR mixture included 0.3 μM of each primer, 12.5 μL of MeltDoctor[®] HRM master mix (Life Technologies, Carlsbad, USA), 5 μL of DNA extract and water for a final volume of 20 μL. The thermal profile used for qPCR was as follows: 10 min initial denaturation at 95 °C; 40 cycles of 10 s at 95 °C denaturation and 1 min at 60 °C; 10 s at 95 °C followed by 1 min at 60 °C before HRM phase. HRM phase consisted on a 0.025 °C/s temperature increase. Melt curve plot was generated and analysed with Vii7 software (Applied Biosystems) to determine T_m.

Mixed artificial samples. Artificial samples were performed with both *Poc* and *Pow* to determine the ability of qPCR-HRM to differentiate *Poc* and *Pow* in the same isolate. We prepared 9 artificial samples with various ratio of *Poc* and *Pow* (9/1; 8/2; 7/3; 6/4; 5/5; for both). Initial parasite density of *Poc* and *Pow* was 3000 parasites/μL and 6000 parasites/μL. Similar artificial samples (*Poc* and *Pow* with other *Plasmodium* species in the same isolate) were prepared for *Pf*, *Pv* and *Pm*.

qPCR-HRM performance. *Repeatability and reproducibility.* Repeatability was determined by using a unique sample thirty times in the same run for three different parasite density for both *Poc* and *Pow* at 3200 parasites/μL, 640 parasites/μL and 64 parasites/μL. We calculated standard deviation of Ct for repeatability as recommended in the MIQE guidelines¹⁹. We evaluated reproducibility as concordance of T_m between different run for the same isolate at three different parasite density for *Poc* and *Pow* (6400 parasites/μL, 640 parasites/μL and 64 parasites/μL).

Sensitivity and specificity. A serial sample dilution was performed to obtain eleven points ranging from 4000 to 1 parasites/μL from one *Poc* and one *Pow* positive sample, to determine the limit of detection (LOD). We calculated sensitivity of the method following this formula:

$$\text{Sensitivity} = \left(1 - \frac{\text{False Negative}}{\text{Total samples}} \right) * 100. \quad (2)$$

Ct amplification and melting curve were used to define LOD and samples were considered as negative if no specific T_m was observed.

Specificity was evaluated in two different ways. First, we tested *Toxoplasma gondii*, *Leishmania infantum*, *Loa loa*, *Onchocerca volvulus*, *Wuchereria bancrofti*, and *Babesia divergens* patient positive blood samples from Bichat's hospital to prove the existence of *Poc* and *Pow* specific Tm. Second, we evaluated the ability of the qPCR-HRM of distinguish *P. ovale* spp from other *Plasmodium* species in clinical samples.

Ethic approval. Participants' consent was not required since samples were already collected for other medical purposes, and according to French legislations on non-interventional research.

References

1. WHO | World Malaria Report 2016. WHO Available at: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2016/report/en/>. (Accessed: 12th January 2017).
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2016 - Malaria. [Internet]. Available at: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2016-2014-data>. Cited 16 11 (2017).
3. Rapport d'activité - CNR Paludisme [Internet]. Available at: <http://cnrpaludisme-france.org/pages/rapports-annuels/>. Cited 2017 16 11 (2016).
4. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française *et al.* [Management and prevention of imported *Plasmodium falciparum* malaria (Revision 2007 of the 1999 Consensus Conference). Long text in French]. *Médecine Mal. Infect.* **38**, 68–117 (2008).
5. Recommandations Paludisme SPILF. [Internet]. Available at: http://www.infectiologie.com/fr/actualites/paludisme-rfp-2017_n.html. Cited 2017 16 11 (2017).
6. Sutherland, C. J. *et al.* Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J. Infect. Dis.* **201**, 1544–1550 (2010).
7. Zaw, M. T. & Lin, Z. Two sympatric types of *Plasmodium ovale* and discrimination by molecular methods. *J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* **50**, 559–564 (2017).
8. Lau, Y.-L. *et al.* Acute respiratory distress syndrome and acute renal failure from *Plasmodium ovale* infection with fatal outcome. *Malar. J.* **12**, 389 (2013).
9. Markus, M. B. Do hypnozoites cause relapse in malaria? *Trends Parasitol.* **31**, 239–245 (2015).
10. Richter, J., Franken, G., Mehlhorn, H., Labisch, A. & Häussinger, D. What is the evidence for the existence of *Plasmodium ovale* hypnozoites? *Parasitol. Res.* **107**, 1285–1290 (2010).
11. Nolder, D. *et al.* An observational study of malaria in British travellers: *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* differ significantly in the duration of latency. *BMJ Open* **3**, e002711 (2013).
12. Rojo-Marcos, G. *et al.* Comparison of imported *Plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* infections among Patients in Spain, 2005–2011. *Emerg. Infect. Dis.* **20**, 409–416 (2014).
13. Phuong, M. S., Lau, R., Ralevski, F. & Bogild, A. K. Parasitological correlates of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* infection. *Malar. J.* **15**, 550 (2016).
14. Calderaro, A. *et al.* Genetic polymorphisms influence *Plasmodium ovale* PCR detection accuracy. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1624–1627 (2007).
15. Oguike, M. C. *et al.* *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities. *Int. J. Parasitol.* **41**, 677–683 (2011).
16. Calderaro, A. *et al.* Accurate identification of the six human *Plasmodium* spp. causing imported malaria, including *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium knowlesi*. *Malar. J.* **12**, 321 (2013).
17. Calderaro, A. *et al.* A new real-time PCR for the detection of *Plasmodium ovale wallikeri*. *PLoS One* **7**, e48033 (2012).
18. Miller, R. H. *et al.* Characterization of *Plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* in Western Kenya utilizing a novel species-specific real-time PCR assay. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003469 (2015).
19. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622 (2009).
20. Fuehrer, H.-P. *et al.* *Plasmodium ovale* in Bangladesh: genetic diversity and the first known evidence of the sympatric distribution of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* in southern Asia. *Int. J. Parasitol.* **42**, 693–699 (2012).
21. Chua, K. H. *et al.* Development of High Resolution Melting Analysis for the Diagnosis of Human Malaria. *Sci. Rep.* **5**, 15671 (2015).
22. Shokoples, S. E., Ndao, M., Kowalewska-Grochowska, K. & Yanow, S. K. Multiplexed Real-Time PCR Assay for Discrimination of *Plasmodium* Species with Improved Sensitivity for Mixed Infections. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 975–980 (2009).
23. Mercereau-Pujalon, O., Barale, J.-C. & Bischoff, E. Three multigene families in *Plasmodium* parasites: facts and questions. *Int. J. Parasitol.* **32**, 1323–1344 (2002).
24. Kassaza, K. *et al.* Detection of *Plasmodium* species by high resolution melt analysis of DNA from blood smears acquired in Southwestern Uganda. *J. Clin. Microbiol.*, <https://doi.org/10.1128/JCM.01060-17> (2017).
25. Mace, K. E. & Arguin, P. M. Malaria Surveillance - United States, 2014. *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Surveill. Summ. Wash. DC* **2002** **66**, 1–24 (2017).
26. Daniels, R. *et al.* Methods to Increase the Sensitivity of High Resolution Melting Single Nucleotide Polymorphism Genotyping in Malaria. *J. Vis. Exp. JoVE* e52839, <https://doi.org/10.3791/52839> (2015).
27. Milbury, C. A., Li, J. & Makrigiorgos, G. M. COLD-PCR-Enhanced High-Resolution Melting Enables Rapid and Selective Identification of Low-Level Unknown Mutations. *Clin. Chem.* **55**, 2130–2143 (2009).
28. Singh, B. *et al.* A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet* **363**, 1017–1024 (2004).
29. Fuehrer, H.-P., Stadler, M.-T., Buczolic, K., Bloesch, I. & Noedl, H. Two Techniques for Simultaneous Identification of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* by Use of the Small-Subunit rRNA Gene. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 4100–4102 (2012).
30. Snounou, G. & Singh, B. Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. *Methods Mol. Med.* **72**, 189–203 (2002).
31. Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaitong, S. & Brown, K. N. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**, 283–292 (1993).
32. Rougemont, M. *et al.* Detection of Four *Plasmodium* Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 5636–5643 (2004).
33. Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10881–10890 (1988).
34. Dwight, Z., Palais, R. & Wittwer, C. T. uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **27**, 1019–1020 (2011).

Acknowledgements

French Malaria National reference center funded the experiments.

Author Contributions

V.J., V.H. and S.H. designed the experiment. V.J. performed the experiment. V.J. and V.H. analysed the data. V.J. and C.K. wrote the manuscript. S.H. supervised the study. V.J., C.K., E.K., V.H., N.A. and S.H. reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18026-1>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Article n°2 : Joste V, Bailly J, Hubert V, Pauc C., Gendrot M, Guillochon E, Madamet M, Thellier M, Kendjo E, Argy N, Pradines B, Houzé S on behalf of the French National Reference Center for Imported Malaria study group. *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi*: infections characteristics and diagnostic approaches in imported malaria, France, 2013-2018. Emerging Infectious Diseases. 2021 Feb;27(2)

SYNOPSIS

***Plasmodium ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* Infections and Diagnostic Approaches to Imported Malaria, France, 2013–2018**

Valentin Joste, Justine Bailly, Véronique Hubert, Cécile Pauc, Mathieu Gendrot, Emilie Guillochon, Marylin Madamet, Marc Thellier, Eric Kendjo, Nicolas Argy, Bruno Pradines, Sandrine Houzé, on behalf of the French National Reference Center for Imported Malaria Study Group¹

Medscape EDUCATION ACTIVITY

In support of improving patient care, this activity has been planned and implemented by Medscape, LLC and Emerging Infectious Diseases. Medscape, LLC is jointly accredited by the Accreditation Council for Continuing Medical Education (ACCME), the Accreditation Council for Pharmacy Education (ACPE), and the American Nurses Credentialing Center (ANCC), to provide continuing education for the healthcare team.

Medscape, LLC designates this Journal-based CME activity for a maximum of 1.00 **AMA PRA Category 1 Credit(s)**[™]. Physicians should claim only the credit commensurate with the extent of their participation in the activity.

Successful completion of this CME activity, which includes participation in the evaluation component, enables the participant to earn up to 1.0 MOC points in the American Board of Internal Medicine's (ABIM) Maintenance of Certification (MOC) program. Participants will earn MOC points equivalent to the amount of CME credits claimed for the activity. It is the CME activity provider's responsibility to submit participant completion information to ACCME for the purpose of granting ABIM MOC credit.

All other clinicians completing this activity will be issued a certificate of participation. To participate in this journal CME activity: (1) review the learning objectives and author disclosures; (2) study the education content; (3) take the post-test with a 75% minimum passing score and complete the evaluation at <http://www.medscape.org/journal/eid>; and (4) view/print certificate. For CME questions, see page XXX.

Release date: January 22, 2021; Expiration date: January 22, 2022

Learning Objectives

Upon completion of this activity, participants will be able to:

- Describe epidemiologic and clinical characteristics of *Plasmodium ovale curtisi* (POC) and *P. ovale wallikeri* (POW) in infected patients who were treated in France from January 2013 to December 2018, according to a retrospective multicenter analysis
- Determine diagnostic test and gene sequencing findings of patients infected with POC and POW who were treated in France from January 2013 to December 2018, according to a retrospective multicenter analysis
- Identify treatment and clinical implications of characteristics of POC and POW in infected patients treated in France from January 2013 to December 2018, according to a retrospective multicenter analysis

CME Editor

Jude Rutledge, BA, Technical Writer/Editor, Emerging Infectious Diseases. *Disclosure: Jude Rutledge has disclosed no relevant financial relationships.*

CME Author

Laurie Barclay, MD, freelance writer and reviewer, Medscape, LLC. *Disclosure: Laurie Barclay, MD, has disclosed no relevant financial relationships.*

Authors

Disclosures: Valentin Joste, PharmD; Justine Bailly, MSc; Véronique Hubert, MS; Cecile Pauc; Mathieu Gendrot, MSc; Emilie Guillochon, MSc; Marylin Madamet, PhD; Marc Thellier, MD, MSc; Eric Kendjo, MSc, PhD; Nicolas Argy, PharmD, PhD; Bruno Pradines, PharmD, PhD; and Sandrine Houzé, PhD, have disclosed no relevant financial relationships.

Author affiliations: Centre National de Référence du Paludisme, Paris, France (V. Joste, J. Bailly, V. Hubert, C. Pauc, N. Argy, S. Houzé); Université de Paris, Paris (N. Argy, S. Houzé); Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Paris (V. Joste, N. Argy, S. Houzé); Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France (M. Gendrot, M. Madamet, B. Pradines); Aix-Marseille Université, Marseille (M. Gendrot, M. Madamet, B. Pradines); Instituts Hospitalo-Universitaires Méditerranée Infection, Marseille

(M. Gendrot, M. Madamet, B. Pradines); Centre National de Référence du Paludisme, Marseille (M. Madamet, B. Pradines); Sorbonne Université, Paris, France (M. Thellier, E. Kendjo)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2702.202143>

¹Additional members of the French National Reference Center for Imported Malaria Study Group who contributed data are listed at the end of this article.

We retrospectively analyzed epidemiologic, clinical, and biologic characteristics of 368 *Plasmodium ovale wallikeri* and 309 *P. ovale curtisi* infections treated in France during January 2013–December 2018. *P. ovale wallikeri* infections displayed deeper thrombocytopenia and shorter latency periods. Despite similar clinical manifestations, *P. ovale wallikeri*-infected patients were more frequently treated with artemisinin-based combination therapy. Although the difference was not statistically significant, *P. ovale wallikeri*-infected patients were 5 times more frequently hospitalized in intensive care or intermediate care and had a higher proportion of severe thrombocytopenia than *P. ovale curtisi*-infected patients. Rapid diagnostic tests that detect aldolase were more efficient than those detecting *Plasmodium* lactate dehydrogenase. Sequence analysis of the *potra* gene from 90 *P. ovale* isolates reveals an insufficient polymorphism for relapse typing.

Malaria is a vectorborne disease caused by *Plasmodium*, a parasite transmitted by *Anopheles* mosquitoes. In 2018, malaria was responsible for ≈228 million cases and 405,000 deaths worldwide (1). *Plasmodium ovale* is endemic in Africa and represents the main agent of relapsing malaria (2). In mainland France, *P. ovale* was responsible for ≈6% of imported malaria cases in 2018 (3). Since the 2017 France updates for *Plasmodium* infection management recommendations, first-line treatment of *P. ovale* infections is based on chloroquine- or artemisinin-based combination therapy (ACT), instead of atovaquone/proguanil (4).

Because of low parasite density and poor efficiency of rapid diagnostic test (RDT) detection (5), *P. ovale* infections are difficult to diagnose. Consequently, infections caused by *P. ovale* remain poorly studied, and little is known about the global burden of the disease worldwide or its geographic distribution.

Since 2010, *P. ovale* has been divided into 2 species, *Plasmodium ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi*, on the basis of gene polymorphisms (6–8). *P. ovale wallikeri* appears to cause malaria infections with a shorter latency period (9,10) and with deeper thrombocytopenia than *P. ovale curtisi* (11,12). Both *P. ovale wallikeri* (13) and *P. ovale curtisi* (14) can be responsible for a clinical relapse event, defined as renewed asexual parasitemia originating from liver dormancies (2). Relapse characterization relies on microscopic diagnosis and medical history. No consensus molecular method for *P. ovale* spp. relapse typing is reported. However, *P. ovale* tryptophan-rich antigen (*potra*) gene sequencing has previously been used for genotyping purpose (13,14).

At the microscopic level, the only observable difference between the species is a lack of Schüffner granulations in *P. ovale wallikeri* infected erythrocytes (15). However, this feature is rare and difficult to see, which makes

P. ovale species distinction almost impossible even for an experienced microscopist. Molecular biology is a promising tool and is both sensitive and specific for the differentiation of *P. ovale wallikeri* from *P. ovale curtisi*. The first nested PCR that discriminates *P. ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* was developed in 2007 (16), and the first quantitative PCR (qPCR) was developed in 2013 (17).

In this study, we conducted a large retrospective multicenter analysis of imported *P. ovale* cases. Epidemiologic, clinical, and biologic characteristics of 309 *P. ovale curtisi*- and 368 *P. ovale wallikeri*-infected patients treated in France during January 2013–December 2018 were analyzed. The effectiveness of Rapid Diagnostic Test (RDT) and the polymorphism of *potra* gene were also investigated.

Methods

Sample Selection

France's National Malaria Reference Center (FF-NMRC) is in charge of epidemiologic surveillance of imported malaria in France. Whole blood samples of patients with *Plasmodium* infections were received from hospital correspondents in France. FNMRC correspondents also reported demographic, epidemiologic, clinical, and biologic data through a reporting website. We retrospectively selected all the reported and PCR-confirmed *P. ovale* infections that occurred during January 2013–December 2018.

DNA Extraction

DNA was extracted from 200 μL of whole blood samples by using Magnapure automaton (Roche Diagnostics, <https://diagnostics.roche.com>) and eluted in 100 μL of elution buffer, according to the manufacturer's instructions. DNA was stored at –20°C until further analysis.

Diagnosis of *P. ovale* Infection

The diagnosis of *P. ovale* infection was made by the hospital correspondent and confirmed by FNMRC with a thin blood smear reading, a thick blood smear reading, or both. Thick blood smears were considered positive if >1 trophozoites was visualized after examination of 1,000 leukocytes. Thin blood smears were used to confirm *Plasmodium* species identification. Parasite density was calculated by using the formula parasite density (parasites per μL) = patient leukocyte count (per μL) × (no. parasites counted)/(no. leukocytes counted), according to World Health Organization (WHO) recommendations (18). Parasitemia was calculated by counting the percentage of infected red blood cells on thin blood smears according to WHO

SYNOPSIS

recommendations (18). All *P. ovale* infections were confirmed with nested PCR (19,20) during 2013–2014, with qPCR–Taqman (Launch Diagnostics, <https://www.launchdiagnostics.com>) during 2015–2017, and with Bio-Evolution (<https://www.bio-evolution.net/index.php>) in 2018.

***P. ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* differentiation**

qPCR–high-resolution melting (HRM) targeting the 18S rRNA gene was performed to differentiate *P. ovale wallikeri* from *P. ovale curtisi* by using Plasm01_F and Plasm02_R primers. The method development and validation was described previously (21). In brief, qPCR–HRM results were compared with nested PCR results from Calderaro et al. (16), and they displayed similar species determination. In all studied samples, *P. ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* melting plots displayed 2 specific melting temperatures (T_m) as T_{m1} and T_{m2} , and the ΔT_m between the 2 T_m was calculated.

For uncertain results (i.e., only 1 T_m on melting plot analysis [21]), nested PCR was performed by using rPLU1 and rPLU5 primers in the first PCR reaction and rOVA1/rOVA2 for *P. ovale curtisi* amplification or rOVA1v/rOVA2v for *P. ovale wallikeri* amplification in second PCR reaction (16). PCR products were visualized on 1% agarose gel stained with GelRed (<https://biotium.com>). We used *P. ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* isolates as positive controls and water as a negative control for each qPCR–HRM run.

RDT Efficiency in *P. ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* Detection

We evaluated the efficiency of 4 different RDTs detecting pan-*Plasmodium* proteins (aldolase or *Plasmodium* lactate dehydrogenase [pLDH]) for the detection of *P. ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi*. Vikia Malaria Ag Pf/Pan (bioMérieux, <https://www.biomerieux.com>) (22) and Binax Now Pf/Pan (Abbott, <https://www.abbott.com>) (23) were used for aldolase detection (aldolase-RDT). Palutop+4 Pan/Pv/Pf (Biosynex, <https://www.biosynex.com>) (24) and Core Malaria Pan/Pv/Pf (Core Diagnostics, <https://www.corediagnostics.net>) were used for pLDH protein detection (pLDH-RDT). Results were interpreted according to the manufacturer's instructions.

Data Collection

Each hospital correspondent sent an EDTA blood sample of a patient infected with *P. ovale* to FNMRC. This process was completed by using the online patient form containing multiple data, including demographic data (place of birth, ethnicity, age, and sex), epidemiologic data (trip purpose, visited country,

duration of travel, and use of prophylaxis or bed nets), biologic data (parasite count, RDT results, leukocytes, hemoglobin and platelet counts, with severe thrombopenia defined as <50 G/L [25], and date of diagnosis), and clinical data (date of symptom onset, fever, headache, asthenia, and arthralgia or myalgia, as well as free symptomatology description for other symptoms, antimalarial treatment used, hospital or ambulatory regimen, and duration of hospitalization). Severe malaria biologic and clinical signs, adapted from the severe *P. falciparum* WHO recommendations (4,26), and relapsing *P. ovale* infection, defined as new *P. ovale* infection after a first completed and effective antimalarial treatment (27), were reported.

The latency period was calculated for each infection by subtracting the date of return from travel to the onset of the symptoms as defined by Rojo-Marcos et al. (11,12). The period of high malaria transmission in West Africa was defined as August–November on the basis of Nabarro et al. definition (10). The delay between symptom onset and diagnosis was also determined. We looked for false or incomplete microscopic diagnosis (*Plasmodium* spp.) to estimate the potential effect on *P. ovale* microscopic diagnosis of the described lack of Schüffner granulations in *P. ovale wallikeri*-infected erythrocytes (15).

No specific consent was required from patients because the parasitologic data were collected from the FNMRC database and analyzed in accordance with the common public health mission of all National Reference Centers in France, in coordination with the Santé Publique France organization for malaria surveillance and care. The study of the biologic samples obtained from routine medical care was considered as noninterventional research accordingly to article L1221-1.1 of the public health code in France and only requires the nonopposition of the patient during sampling (per article L1211-2 of the public health code). All data collected were anonymized before analysis.

potra Sequencing and Analysis

We amplified *potra* fragments as previously described (28). Bidirectional sequencing reaction was performed for the secondary *potra* fragment. Gene sequences were analyzed with Sequencher 5.0 (Genecodes, <http://www.genecodes.com>). Isolates from GenBank under accession nos. HM594183 (28), MG588152, and MG588154 (29) were used as *P. ovale curtisi* reference sequences; HM594180 (28) and MG588148–150 (29) were used as *P. ovale wallikeri* reference sequences.

Statistical Analysis

P. ovale wallikeri and *P. ovale curtisi* infections were compared in terms of demographic, epidemiologic, clinical, and biologic characteristics. The Kolmogorov-Smirnov test with the Lilliefors correction was used to verify the normality of variables distributions, and the Levene test was used to verify the homogeneity of the variances. If both criteria were validated, a Student *t*-test was used; otherwise, a Mann-Whitney U-test was performed to compare medians. Proportions were compared by using the χ^2 or Fisher exact test according to sample size (>5 or ≤ 5). R software was used to perform statistical tests (30).

Results

P. ovale Sample Selection

During January 2013–December 2018, 15,028 *Plasmodium* spp. infection cases were reported to FNMRC, including 765 *P. ovale* infections. Seventeen cases were

excluded from the analysis because blood sample were unavailable. After exclusion of co-infections and inclusion of 59 *P. ovale* initially misdiagnosed (confirmed by PCR), 677 *P. ovale* cases from 63 different hospitals in France were finally included (Figure 1). By using qPCR-HRM for species differentiation, we identified 368 *P. ovale wallikeri* and 309 *P. ovale curtisi* infections. The 2 species segregated perfectly in qPCR-HRM; *P. ovale wallikeri* had a ΔT_m of 1.62–2.69, and *P. ovale curtisi* had a ΔT_m of 2.84–4.22.

Patients' Demographic and Epidemiologic Characteristics

P. ovale wallikeri and *P. ovale curtisi* showed similar repartition by month, except for October, which showed an increase in *P. ovale wallikeri* infections and a decrease in *P. ovale curtisi* cases (Figure 2, panel A). Among *P. ovale* cases, the proportion of *P. ovale wallikeri* infections increased from 44% to 59% during January 2013–December 2018 (Figure 2, panel B).

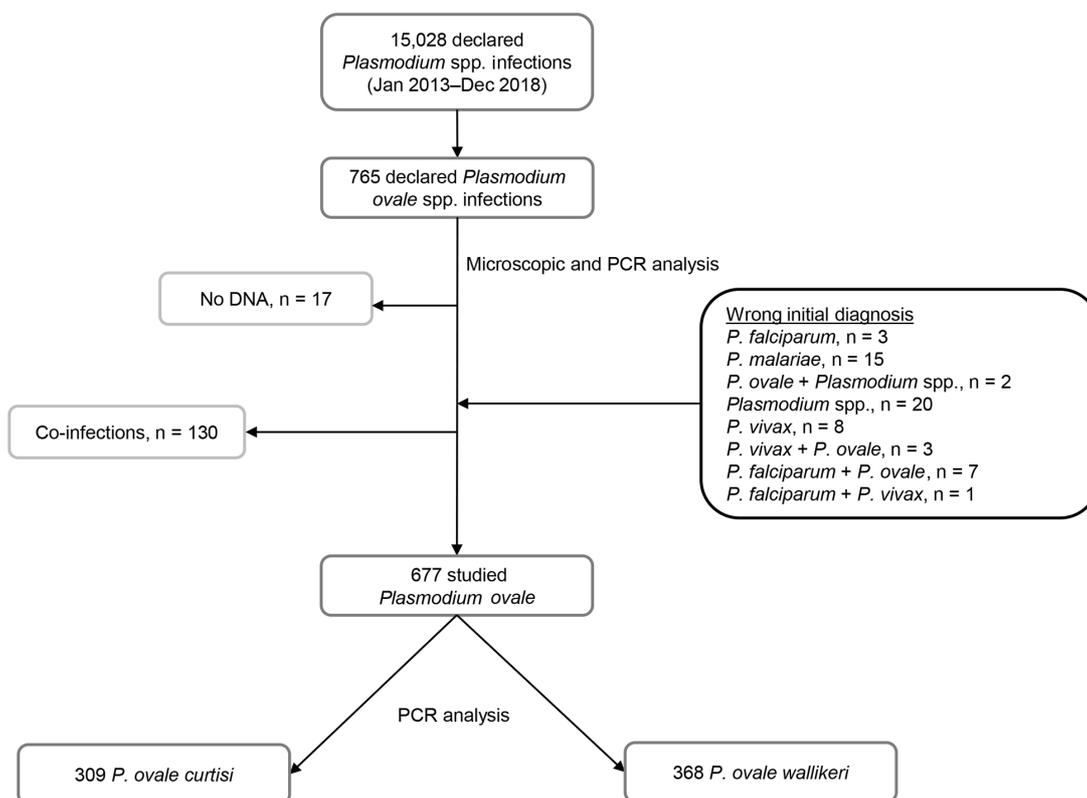


Figure 1. Flow-chart of the retrospective study analyzing characteristics of *Plasmodium ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* infections treated in France during January 2013–December 2018. All reported *P. ovale* infection cases were confirmed with microscopy and PCR analysis, and co-infections were excluded. A total of 59 *P. ovale* isolates initially misdiagnosed by the hospital correspondent were added. A total of 677 *P. ovale* infection cases were included in the study.

SYNOPSIS

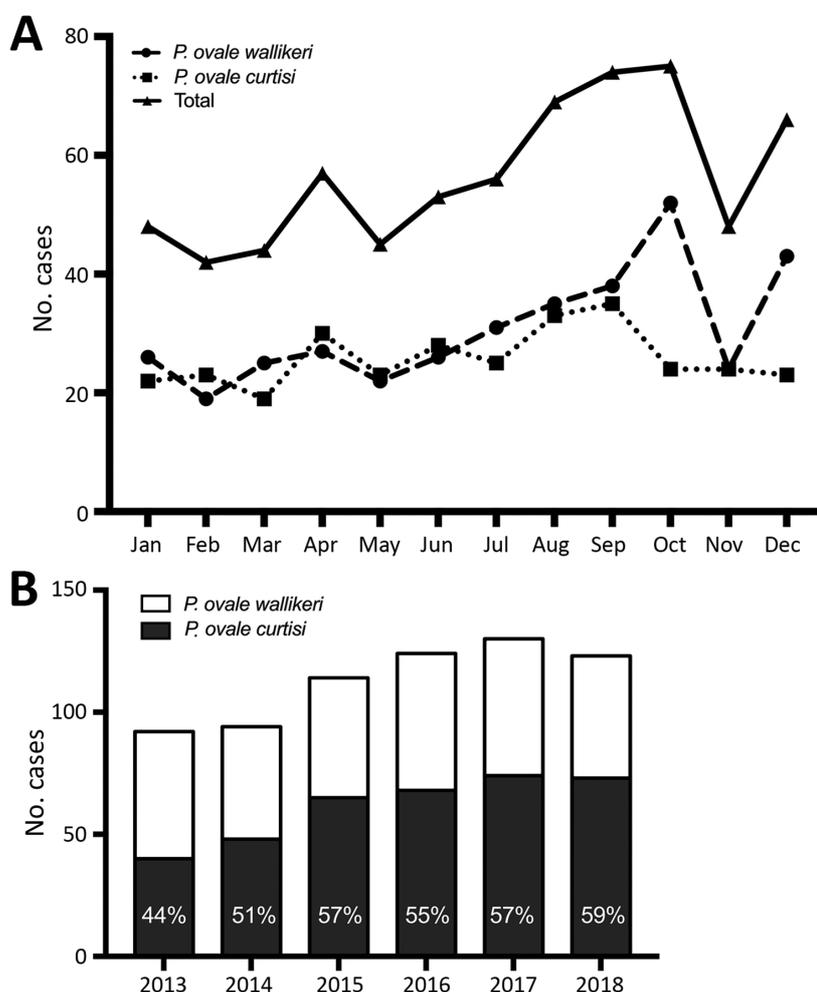


Figure 2. Number of *Plasmodium ovale* infection cases included in a study analyzing characteristics of *P. ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* infections treated in France during January 2013–December 2018, by month of inclusion (A) and year of inclusion (B).

P. ovale wallikeri- and *P. ovale curtisi*-infected patients did not display any differences in demographic and epidemiologic characteristics (Table 1). Countries of contamination were not statistically different between imported *P. ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* cases ($p = 0.52$) (Figure 3; Appendix Table 1, <https://wwwnc.cdc.gov/EID/article/27/2/20-2143-App1.pdf>).

For well-followed chemoprophylaxis ($n = 77$), the main treatments used were doxycycline (48%), atovaquone/proguanil (25%), and mefloquine (18%). No statistically significant differences were observed in the percentage of infection between those treatments.

P. ovale Diagnosis

Parasite densities for *P. ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* infections were similar (median 4,500 para-

sites/ μL [interquartile range (IQR) 1,094–10,197 parasites/ μL] for *P. ovale curtisi* vs. median 3,970 parasites/ μL [IQR 598–9,240 parasites/ μL] for *P. ovale wallikeri*). We noted 8.5% of species misidentification for *P. ovale curtisi* and 9% for *P. ovale wallikeri* (Figure 1).

Aldolase and pLDH-RDT Efficiency

We compared the diagnostic performance of aldolase-RDTs and pLDH-RDTs for *P. ovale* diagnosis. Aldolase-RDTs detection were more efficient in *P. ovale* spp. detection than pLDH-RDTs ($p < 0.001$); no differences between the 2 species were observed. *P. ovale wallikeri* was more frequently detected with pLDH-RDT than *P. ovale curtisi* ($p < 0.001$) (Table 2). The positivity of aldolase and pLDH-RDTs were

Table 1. Demographic and epidemiologic characteristics of patients infected with *Plasmodium ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi*, France, January 2013–December 2018*

Characteristic	<i>P. ovale curtisi</i> , n = 309	<i>P. ovale wallikeri</i> , n = 368	p value
Age, y, median (IQR)	31 (21–47)	34 (21–47)	0.973
Sex, %			0.716
M	63.4	61.4	
F	36.6	38.6	
Ethnicity			0.502
Black	200 (74.3)	239 (75.7)	
White	64 (23.8)	68 (21.5)	
Asian	2 (0.7)	1 (0.3)	
Other	3 (1.2)	8 (2.5)	
If African, place of birth			0.420
Africa	144 (83.2)	164 (80)	
Nonendemic country	29 (16.8)	41 (20)	
Type of patient			0.192
Immigrant†	23 (11.6)	21 (8.6)	
Traveler‡	137 (68.8)	187 (77.3)	
Visiting friends or relatives	109 (79.6)	152 (81.3)	
Tourism	6 (4.4)	8 (4.3)	
Work	22 (16)	27 (14.4)	
Resident	19 (9.5)	20 (8.3)	
Expatriate	6 (38.6)	10 (50)	
Humanitarian	13 (61.4)	10 (50)	
Military	20 (10.1)	14 (5.8)	
Duration of travel, d, median (IQR)	58 (29–91)	50 (24–91)	0.106
Chemoprophylaxis			0.882
Yes	97 (40)	123 (39.3)	
Complete	35 (44.9)	42 (43.8)	
Incomplete	43 (55.1)	54 (56.2)	
Prematurely stopped	26 (60.5)	36 (66.7)	
Occasionally taking	17 (39.5)	18 (33.3)	
No data	19 (NA)	27 (NA)	
No	146 (60)	190 (60.7)	
Using bed nets			0.119
Yes	48 (26.7)	41 (20.2)	
No	130 (73.3)	162 (79.8)	

*Values are no. (%) patients except as indicated. IQR, interquartile range; NA, not available.

†A person who was born and lived in Africa.

‡A person who lived in a non-*Plasmodium*-endemic country.

strongly associated with parasite density. Percentage of positive RDT results increased with parasite density for both pLDH-RDT and aldolase-RDT (Table 2). A positive aldolase-RDT result was associated with a parasite density significantly higher than with a negative aldolase-RDT result for both species (median 6,612 parasites/ μ L [IQR 2,410–14,175 parasites/ μ L] for *P. ovale wallikeri* vs. median 1,287 parasites/ μ L [IQR 450–4,500 parasites/ μ L] for *P. ovale curtisi*; $p < 0.001$) (Figure 4). Similarly, the parasite density of positive pLDH-RDT *P. ovale wallikeri* samples were significantly higher than those of negative pLDH-RDT (median 11,000 parasites/ μ L [IQR 3,960–52,910 parasites/ μ L] vs. median 3,227 parasites/ μ L [IQR 551–7,118] parasites/ μ L; $p < 0.001$). Vikia (bioMérieux) aldolase-RDT had a greater accuracy for detecting *P. ovale* infections compared than did Binax Now (Abbott) (59.3% vs. 40.9%; $p < 0.001$) and a better sensitivity (median 4,230 parasites/ μ L [IQR 1,205–9,450 parasites/ μ L] for positive Vikia vs. median 8350 parasites/ μ L [IQR 4,032–16,166 parasites/ μ L] for positive Binax Now; $p < 0.001$).

Biologic and Clinical Characteristics

Patients infected with *P. ovale wallikeri* displayed deeper thrombocytopenia than those with *P. ovale curtisi* (Table 3), but reported symptomatology and disease severity did not differ. *P. ovale wallikeri* infections had shorter latency periods and a higher proportion of latency periods < 50 days ($p < 0.001$) (Table 3). Compared with patients who did not take prophylactic treatment, patients who reported well-managed prophylactic treatment had longer latency periods (median 90 days [IQR 47–177 days] vs. median 30 days [IQR 8–125 days]; $p < 0.001$). Uncompleted prophylactic treatment did not extend latency period (median 33 days [IQR 17–112 days] vs. median 30 days [IQR 8–125 days]; $p = 0.34$). Military patients had longer latency periods than other patients (median 109 days [IQR 57–159 days] vs. median 40 days [IQR 12–142 days]; $p = 0.0018$), as did Caucasian versus African patients (median 84 days [IQR 28–140 days] vs. median 42 days [IQR 12–147 days]; $p = 0.005$ days). In the African population, no differences were found

SYNOPSIS

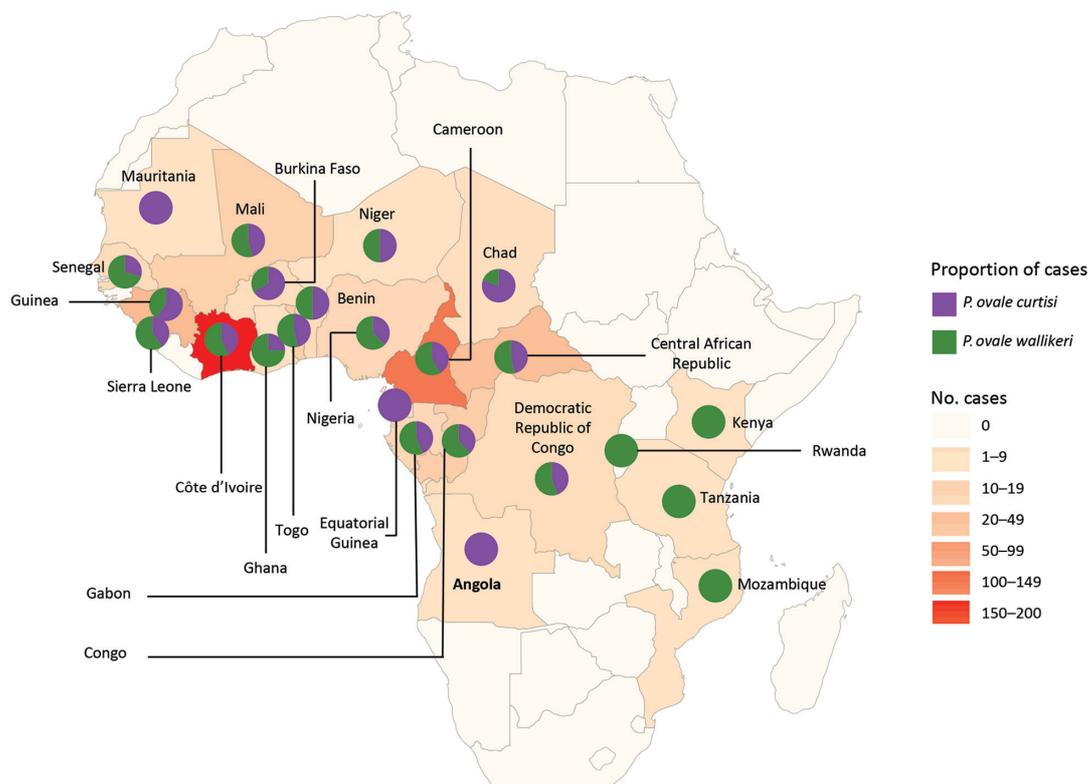


Figure 3. Geographic repartition of the origin countries of imported *Plasmodium ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* infection cases into France, January 2013–December 2018. Pie charts showed the repartition of cases between both species in each country.

between African-born patients and others (mean 53 days [IQR 12–170 days] vs. mean 35 days [IQR 11–117 days]). The latency period was shorter in symptomatic patients returning from West Africa during the malaria season than in low-transmission or no-transmission seasons (median 27 days [IQR 10–67 days] vs. median 90 days [IQR 17–158 days]; $p < 0.001$) (Appendix Figure). *P. ovale wallikeri* infections and *P. ovale curtisi* infections were each responsible for 16 reported clinical relapses.

Patient Care

A similar proportion of patients were hospitalized in the *P. ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* groups. Eight malaria case-patients with WHO-defined severe criteria (26) were reported during the period analysis (Table 3). *P. ovale wallikeri*-infected patients were 5 times more likely to be hospitalized in intensive or intermediate care than *P. ovale curtisi*-infected patients (Table 3). A higher percentage of *P. ovale wallikeri* infections were treated with ACT (29.2% vs. 17.1%;

Table 2. Comparison of aldolase and pLDH-RDT efficiency in *Plasmodium ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* infection diagnosis, France, January 2013–December 2018*

RDT result	Parasite density, parasites/ μ L	LDH			Aldolase		
		<i>P. ovale</i>	<i>P. ovale wallikeri</i>	<i>P. ovale curtisi</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. ovale wallikeri</i>	<i>P. ovale curtisi</i>
Positive	<1,000	55 (10.6)	45 (16)	10 (4.2)	211 (47.8)	120 (50)	91 (45.3)
	1,000–5,000	5 (3.9)	3 (3.9)	2 (3.9)	25 (19.5)	16 (20)	9 (17.6)
	5,000–10,000	15 (9.4)	14 (15)	1 (1.5)	65 (40.6)	42 (54.5)	23 (33.8)
	10,000–50,000	6 (7.8)	5 (12)	1 (2.8)	44 (57.1)	24 (66.7)	20 (57.1)
	>50,000	16 (16.2)	11 (20)	5 (11.4)	67 (67.7)	29 (78.4)	38 (86.4)
Negative		13 (86.7)	12 (86)	1 (100)	10 (100)	9 (100)	1 (100)
p value		465 (89.4)	237 (84)	228 (95.8)	230 (52.2)	120 (50)	110 (54.7)
			<0.001			0.322	

*Values are no. (%) patients except as indicated. LDH, lactate dehydrogenase; pLDH, plasmodium lactate dehydrogenase; RDT, rapid diagnostic test.

†Proportions of positive and negative LDH or aldolase-RDT were compared for *P. ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* by using a χ^2 test.

$p < 0.001$), but no association was found between ACT treatment and parasite density, between ACT treatment and platelet count, or between ACT treatment and positive and negative RDTs. Patients treated with ACT did have shorter latency periods than other patients (median 33 days [IQR 11–111 days] vs. 54 days [IQR 15–170 days]; $p = 0.025$) and patients with latency periods < 50 days were more often treated with ACT than others (28.6% vs. 20.3%; $p = 0.048$). This high proportion of ACT prescription was highest in patients with latency periods < 50 days and platelet counts < 60 G/L (52.3% vs. 22.7%; $p = 0.002$).

New recommendations from the Infectious Diseases Society in France (La Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française) edited in 2017 (4) had a clear effect on *P. ovale* infection treatment (Figure 5), including replacement of atovaquone/proguanil by artemisinin-based combination therapy. However, little change in rates of chloroquine prescription occurred (52.5% before the revisions and 47.2% after).

For the period analyzed, no statistically significant relationship was found between the number of included *P. ovale* infection cases per hospital and the percentage of patients receiving ACT treatment. We also analyzed the relation between the total number of included *Plasmodium* infection cases per hospital and the percentage of intensive care or intermediate care hospitalizations and did not find any statistically significant relation (data not shown).

potra Sequencing and Analysis

In total, 49 *potra* genes were sequenced from *P. ovale wallikeri* and 41 *potra* genes were sequenced from *P. ovale curtisi*. Three different genotypes (299, 317, and 335 bp) were identified in *P. ovale curtisi* and 4 different genotypes (245, 263, 263', and 281 bp) in *P. ovale wallikeri* (Table 4). The major genotypes were (MANPIN)₁(AITPIN)₂ for *P. ovale wallikeri* and (TINPIN)₃(TITPIS)₁ for *P. ovale curtisi*. No association was found between country of contamination and *potra* genotype.

Discussion

Our findings show that patients infected with *P. ovale wallikeri* displayed deeper thrombocytopenia than those infected with *P. ovale curtisi* ($p < 0.001$) and had a shorter latency period ($p < 0.001$). Those features of *P. ovale wallikeri* infection are currently debated in the literature, with some studies describing deeper thrombocytopenia (11,12) and shorter latency periods (9) and other finding refuting any differences between the 2 species (31).

We reported 1.2% of patients with diagnosed *P. ovale* infection having severe criteria of malaria

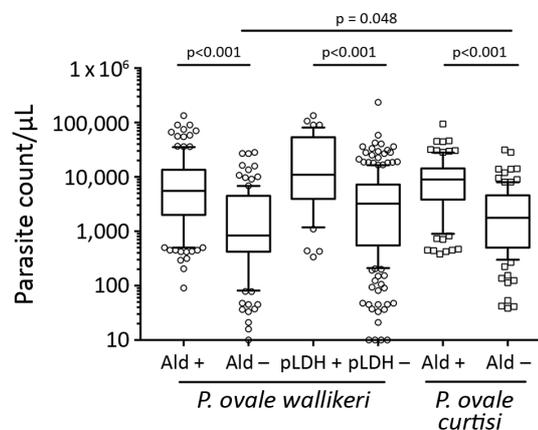


Figure 4. Comparison of parasite count according to RDT results in study analyzing characteristics of *Plasmodium ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* infections treated in France during January 2013–December 2018. Upper half of each box indicates quartile 3, and lower half indicates quartile 1. Horizontal bar dividing each box indicate median. Error bars range from 10th to 90th percentile. Ald, aldolase RDTs; pLDH, plasmodium lactate dehydrogenase RDTs; Poc, *P. ovale curtisi*; Pow, *P. ovale wallikeri*; RDT, rapid diagnostic test.

(26), a similar percentage to the data reported by the malaria surveillance in the United States (32) or by Kotepui et al. (33). Seven *P. ovale wallikeri*- and 1 *P. ovale curtisi*-infected patients were hospitalized in intensive or intermediate care. Six of those patients did not have WHO-defined severe malaria criteria (26). Hospitalization in intensive or intermediate care for non-WHO-defined severe malaria was previously described in uncomplicated malaria patients with *P. falciparum* (34) or *P. vivax* (35) infections. We examined the hospitalization information of 5,227 uncomplicated malaria patients (all infected with *Plasmodium* species) for the study period in the FNMRC database. Among these patients, 180 (3.6%) were hospitalized in intensive or intermediate care with a median length of hospital stay shorter to that observed with severe malaria patients (median 2 days [IQR 1–3 days] vs. median 3 days [IQR 2–4 days]; $p < 0.001$).

In June 2017, La Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française updated malaria management recommendations (4) and proposed the use of ACT as first-line treatment for all *Plasmodium* spp. infections and placed atovaquone/proguanil as a second-line treatment. Our data confirmed that physicians followed the new guidelines with a clear change between ACT and atovaquone/proguanil prescription frequency (Figure 5). *P. ovale wallikeri* infections

SYNOPSIS

Table 3. Biologic and clinical characteristics of *Plasmodium ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* infections, France, January 2013–December 2018*

Characteristic	<i>P. ovale curtisi</i> , n = 309	<i>P. ovale wallikeri</i> , n = 368	p value
Parasite density, parasites/ μ L, median (IQR)	4,500 (1,094–10,197)	3,970 (598–9,240)	0.112
Leucocyte count, G/L, median (IQR)	5.6 (4.4–7.1)	5.2 (4.1–6.5)	0.0501
Hemoglobin, g/L, median (IQR)	127 (113–140)	126 (114–139)	0.855
Platelet count, G/L, median (IQR)	111 (84–145)	94 (70–130)	<0.001
<75	56 (19.4)	104 (31)	
75–150	168 (58.1)	174 (51.9)	0.003
>150	65 (22.5)	57 (17.1)	
Severe thrombocytopenia	13 (4.5)	25 (7.5)	0.123
Diagnostic delay, d, median (IQR)	5 (3–7)	4 (2–7)	0.583
Delay between return from endemic country and onset of symptoms, d, median (IQR)	72 (18–208)	34 (10–95)	<0.001
<50 days	87 (42.4)	150 (59.5)	<0.001
Symptoms			
Fever	262 (95.6)	316 (97.8)	0.125
Arthralgia or myalgia	120 (54.8)	138 (57.7)	0.525
Asthenia	108 (58)	133 (61.3)	0.506
Headache	151 (68.6)	201 (75.3)	0.103
Anorexia	5	4	
Diarrhea	13	18	
Abdominal pain	28	29	
Nausea	16	20	
Vomiting	24	13	
Cough	6	12	
Clinical categorization			0.927
Uncomplicated malaria	293 (97.7)	335 (97.4)	
Severe malaria	3 (1)	5 (1.5)	
Asymptomatic	4 (1.3)	4 (1.1)	
Admission to hospital	158 (55.4)	196 (60.3)	0.243
Duration of hospitalization, d, median (IQR)	2 (1–3)	3 (1–4)	0.0732
Intensive- or intermediate-care hospitalization	1 (2.2)	7 (11.3)	0.134
Conventional hospitalization	46 (97.8)	55 (88.7)	
Treatment			0.00359
Chloroquine	147 (54.8)	152 (47.8)	
Artemisinin therapy	46 (17.1)	93 (29.2)	
Artemeter/lumefantrine	11 (25.5)	39 (41.9)	
Artesunate	2 (4.3)	5 (5.4)	
Arteminol/piperaquine	33 (70.2)	49 (52.7)	
Atovaquone/proguanil	64 (23.9)	64 (20.1)	
Mefloquine	3 (1.2)	0 (0)	
Quinine	8 (3)	9 (2.9)	

*Values are no. (%) patients except as indicated. IQR, interquartile range.

were treated more often with ACT. To explain this phenomenon, we compared the antimalarial treatment used according to the platelet counts, parasite density, pLDH-RDTs results, and latency period duration. No association was observed between the type of antimalarial treatment and platelet counts, parasite density, or pLDH-RDTs results, but we highlighted a relationship between ACT treatment and shorter latency period ($p = 0.048$). The combination of low platelet count and short latency delay in *Plasmodium* infections are suggestive of *P. falciparum* infection (36). In the context of emergency care before species confirmation, those features might have influenced the prescription of ACT. Because they were seen more frequently in *P. ovale wallikeri* infections, we assumed that this tendency could partially explain that most of the ACT treatment administered occurred in the *P. ovale wallikeri* group.

About 44% of patients that took a prophylactic treatment reported taking their medication regularly, as prescribed. The latency period was longer in those patients ($p < 0.001$). Because prophylactic treatments are not effective against liver-dormant forms of *P. ovale* (2) and did not protect patients from relapsing malaria, those results are not surprising. This phenomenon is well-illustrated in military patients, a population with a higher rate of chemoprophylaxis treatment (85%) and greater compliance with the drug regimen (62%) who had longer latency periods than other patients ($p < 0.001$).

Most of the *P. ovale* cases we analyzed were originally diagnosed by microscopic analysis. Species misidentification occurred for 8.8% of the samples, and the main misidentification was between *P. malariae* and *P. ovale*. In endemic settings, microscopic analysis or PCR diagnosis are not always available in remote setting.

Simple and affordable point-of-care compatible diagnostic tools are required. Although RDTs are widely spread nowadays in malaria-endemic countries, their efficiency for *P. ovale* diagnosis is not sufficiently studied compared with that for *P. falciparum* or *P. vivax* diagnosis. To supplement this deficiency, we analyzed the ability of aldolase and pLDH-RDTs to detect *P. ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* infection (Table 2). Aldolase-RDTs detection was definitively more accurate for *P. ovale* diagnosis than pLDH-RDTs ($p < 0.001$). pLDH-RDTs used in this study (Palutop+4 [Biosynex] and Core Malaria [Core Diagnostics, <https://www.corediagnostics.net>]) were more efficient in diagnosing *P. ovale wallikeri* than *P. ovale curtisi* infection, but their performance remained extremely low ($\approx 16\%$ of infections diagnosed). This discrepancy might be explained by lactate dehydrogenase protein polymorphisms in *P. ovale* (37) affecting affinity of RDT-antibodies for *P. ovale* lactate dehydrogenase (38). Tang et al. (39) compared the efficiency of several pLDH-RDTs and confirmed variable diagnostic performance for *P. ovale*. In contrast, aldolase-RDTs had similar efficiency in detection of both species (50% for *P. ovale wallikeri* and 41.2% for *P. ovale curtisi*) that increased with parasite density (Table 2; Figure 4). Vikia demonstrated better performances than BinaxNow in *P. ovale* spp. detection ($p < 0.001$).

The ability of *P. ovale* to establish liver-dormant forms (hypnozoites) induces relapse episodes of fever and parasitemia (2,40). Relapsing malaria was observed in only 3.5% of the included patients, a lower prevalence than previously reported (14). This difference is probably linked to the recommendations in France that advises systematic primaquine treatment of all *P. ovale*-infected patients, even for the first episode (except for major contraindication such as G6PD deficiency, pregnancy, and breastfeeding) (4). Currently, diagnosis of *P. ovale* infection relapse is mainly based on clinical data. *potra* gene sequencing has been used to distinguish reinfection from relapse by genotyping the initial and corresponding relapse sample (13,14). We evaluated the polymorphism of *potra* genes in 80 samples and, as previously described, identified a limited number of polymorphisms

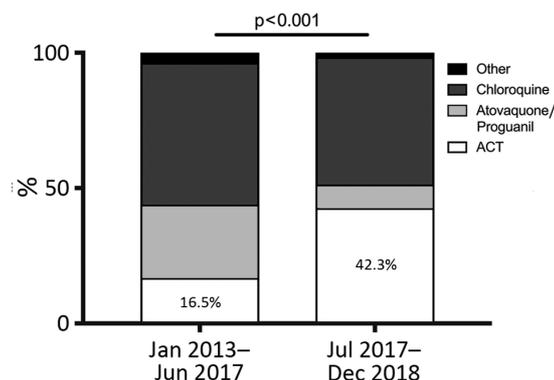


Figure 5. Effects of the new ACT treatment recommendations for *Plasmodium* spp. infections from La Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française, revised in June 2017. ACT, chloroquine- or artemisinin-based combination therapy.

(Table 4) (28). Our results, combined with those of Zhou et al. (29), demonstrate that the *potra* gene is not a satisfying genetic marker of relapse. New genetic markers, such as microsatellite typing, need to be developed for *P. ovale* genotyping, as was previously done for *P. falciparum* (41,42) and *P. vivax* (43,44).

A limitation of our study is that, because of uncompleted online patient form filling (Appendix Table 2), we might lack statistical power to highlight differences in some rare infections features, such as hospitalization in intensive or intermediate care. In addition, our study is retrospective and might suffer from missing data about infection characteristics. Furthermore, we collected *P. ovale* isolates from Africa only.

In conclusion, our large retrospective study on *P. ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi* infections confirmed that patients infected with *P. ovale wallikeri* display deeper thrombocytopenia and shorter latency periods. In addition, we found that physicians in France used more ACT to treat *P. ovale wallikeri* than *P. ovale curtisi* infections. This difference might be linked to the lower platelet level and shorter latency period seen with *P. ovale wallikeri* infections. In addition, we described a higher rate in intensive or intermediate

Table 4. Analysis of the *potra* fragment polymorphisms sequenced for *Plasmodium ovale wallikeri* and *P. ovale curtisi*, France, January 2013–December 2018

Species	Size, bp	Dominant amino acid repeat	No. (%) samples	GenBank accession no. of reference sequence
<i>P. ovale wallikeri</i>	245	(MANPIN) ₁ (AITPIN) ₂	43 (88)	HMG594180
	263	(MANPIN) ₁ (AITPIN) ₃	2 (4)	MG588149
	263	(MANPIN) ₂ (AITPIN) ₂	1 (2)	MG588148
	281	(MANPIN) ₂ (AITPIN) ₃	3 (6)	MG588150
<i>P. ovale curtisi</i>	299	(TINPIN) ₃ (TITPIS) ₁	26 (63)	MG588152
	317	(TINPIN) ₃ (TITPIS) ₂	13 (32)	HM594183
	335	(TINPIN) ₄ (TITPIS) ₂	2 (5)	MG588154

SYNOPSIS

care admission in *P. ovale wallikeri*-infected patients. Because of missing data and lack of power, this observation was not statistically significant and needs to be confirmed by a large, prospective study.

Additional members of the French National Reference Center for Imported Malaria Study Group who contributed data: Chantal Garabedian (Aix-en-Provence), Alain Domergue (Aix-en-Provence), Sylvain Clauser (Boulogne), Patrice Agnamey (Amiens), Céline Damiani (Amiens), Ludovic de Gentile (Angers), Marc Pihet (Angers), Anne Marfaing-Koka (Clamart), Anthony Marteau (Avicenne Hospital, Bobigny), Izri Arezki (Avicenne Hospital, Bobigny), Cecile Ficko (Bégin Hospital, Vincennes), Sébastien Larréché (Bégin Hospital, Vincennes), Adela Enache Angoulvant (Kremlin-Bicêtre), Nadia Guennouni (Kremlin-Bicêtre), Thierry Pistone (Bordeaux), Valérie Fuster-Dumas (Bordeaux), Denis Malvy (Bordeaux), Dorothée Quinio (Brest), Gilles Nevez (Brest), Didier Raffenetot (Chambéry), Olivier Rogeaux (Chambéry), Céline Nourrisson (Clermont-Ferrand), Naima Dahane (Cochin Hospital, Paris), Angèle Li (Creil), Bernadette Cuisenier (Dijon), Louise Basmacyan (Dijon), Annie Motard-Picheloup (Fréjus St-Raphaël), Cécile Garnaud (Grenoble), Céline Dard (Grenoble), Dominique Maubon (Grenoble), Eric Dannaoui (Hôpital Européen Georges Pompidou Hospital, Paris), Françoise Botterel (Créteil), Dieudonné Bemba (Bondy), Isabelle Poilane (Bondy), Ana Mendes-Moreira (La Rochelle), Gauthier Pean-de-Ponfilly (Lariboisière Hospital, Paris), Bruno Megarbane (Lariboisière Hospital, Paris), Céline Mesnil (Lariboisière Hospital, Paris), Muriel Silva (Le Havre), Céline Malassigne (Le Havre), Pascal Penn (Le Mans), Anne-Sophie Deleplancque (Lille), Boualem Sendid (Lille), Marie-Laure Darde (Limoges), Marie-Fleur Durieux (Limoges), Martine Bloc'h (Colombes), Luce Landraud (Colombes), Stéphane Picot (Lyon), Pauline Tirard-Collet (Lyon), Léo Vidoni (Lyon), Marie-Laure Bigel (Mantes-la-Jolie), Hélène Savini (HIA Laveran, Marseille), Coralie l'Ollivier (Marseille), Nicole Desbois-Nogard Nicole (Martinique), Hélène Broutier (Meaux), Patrick Bastien (Montpellier), Alain Gravet (Mulhouse), Caroline Lohmann (Mulhouse), Anne Debourgogne (Nancy), Fakhri Jeddi (Nantes), Rose-Anne Lavergne (Nantes), Marie-Elisabeth Bougnoux (Necker Hospital, Paris), Emilie Sitterle (Necker Hospital, Paris), Christelle Pomares Estran (Nice), Pascal Delaunay (Nice), Milène Sasso (Nîmes), Victor Mercier (Nîmes), Laurence Lachaud (Nîmes), Bernadette Buret (Niort), Didier Poisson (Orléans), Jérôme Guinard (Orléans), Aurélie Guigon (Orléans), Oussama Mouri (Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris), Estelle Perraud-Cateau (Poitiers), Gwénaél le Moal (Poitiers), Antoine Huguenin (Reims), Sorya Belaz (Rennes), Anne Delaval

(Aulnay-sous-bois), Cécile Leprince (Aulnay-sous-bois), Jean-Yves Siriez (Robert Debré Hospital, Paris), Lauren Pull (Robert Debré Hospital, Paris), Odile Fenneteau (Robert Debré Hospital, Paris), Loïc Favenec (Rouen), Gilles Gargala (Rouen), Ghania Belkadi (Saint-Antoine Hospital, Paris), Cécile Tournus (Saint-Denis), Samia Hamane (Saint-Louis Hospital, Paris), Stéphane Bretagne (Saint-Louis Hospital, Paris), Julie Brunet (Strasbourg), Ahmed Abou-Bacar (Strasbourg), Guillaume Menard (Toulon), Pamela Chauvin (Toulouse), Faïza Ajana (Tourcoing), Pierre Patoz (Tourcoing), Nathalie Desuremain (Trousseau Hospital, Paris), Pierre Mornand (Trousseau Hospital, Paris), Farida Moreau-Benaoudia (Troyes), Maxime Thouvenin (Troyes), Gisèle Dewulf (Valenciennes), Edith Mazars (Valenciennes), Odile Eloy (Le Chesnay), Sylvie Maurellet Evrard (Villeneuve St-Georges), Alice Raffetin (Villeneuve St-Georges), Pauline Caraux-Paz (Villeneuve St-Georges).

Acknowledgments

We thank the hospital correspondents who sent us *P. ovale* samples and filled in the online patient forms. We also thank Claire Kamaliddin and Alexandre Lampros for their assistance in translation and review of the manuscript.

About the Author

Dr. Joste is resident in pathology and laboratory medicine and is a medical microbiologist. At the time of this study, he worked at the French National Malaria Reference Center at Bichat Hospital, Paris, France. His research interests include the diagnosis and epidemiology of *Plasmodium ovale* spp. infection.

References

1. World Health Organization. World malaria report 2019 [cited 2020 Jan 7]. <https://www.who.int/publications-detail/world-malaria-report-2019>
2. Markus MB. Do hypnozoites cause relapse in malaria? *Trends Parasitol.* 2015;31:239–45. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.02.003>
3. Centre National de Référence du Paludisme. Rapport d'activité annuel 2018 [cited 2020 Jan 7]. https://anofel.net/wp-content/uploads/2019/07/ra_cnr_2018_CNPaludisme.pdf
4. Bouchaud O, Bruneel F, Caumes E, Houzé S, Imbert P, Pradines B, et al. Management and prevention of imported malaria. 2018 update of the 2007 French clinical guidelines. *Med Mal Infect.* 2020;50:161–93. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.10.009>
5. Yerlikaya S, Campillo A, Gonzalez IJ. A systematic review: performance of rapid diagnostic tests for the detection of *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium malariae*, and *Plasmodium ovale* mono-infections in human blood. *J Infect Dis.* 2018;218:265–76. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy150>
6. Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, et al. Two nonrecombining

- sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *J Infect Dis*. 2010;201:1544–50. <https://doi.org/10.1086/652240>
7. Tachibana M, Tsuboi T, Kaneko O, Khuntirat B, Torii M. Two types of *Plasmodium ovale* defined by SSU rRNA have distinct sequences for ookinete surface proteins. *Mol Biochem Parasitol*. 2002;122:223–6. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00101-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00101-9)
 8. Win TT, Jalloh A, Tantular IS, Tsuboi T, Ferreira MU, Kimura M, et al. Molecular analysis of *Plasmodium ovale* variants. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:1235–40. <https://doi.org/10.3201/eid1007.030411>
 9. Nolder D, Oguike MC, Maxwell-Scott H, Niyazi HA, Smith V, Chiodini PL, et al. An observational study of malaria in British travellers: *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* differ significantly in the duration of latency. *BMJ Open*. 2013;3:e002711. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-002711>
 10. Nabarro LEB, Nolder D, Broderick C, Nadjm B, Smith V, Blaze M, et al. Geographical and temporal trends and seasonal relapse in *Plasmodium ovale* spp. and *Plasmodium malariae* infections imported to the UK between 1987 and 2015. *BMC Med*. 2018;16:218. <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1204-6>
 11. Rojo-Marcos G, Rubio-Muñoz JM, Ramírez-Olivencia G, García-Bujalance S, Elcuaz-Romano R, Díaz-Menéndez M, et al. Comparison of imported *Plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* infections among patients in Spain, 2005–2011. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:409–16. <https://doi.org/10.3201/eid2003.130745>
 12. Rojo-Marcos G, Rubio-Muñoz JM, Angheben A, Jaureguiberry S, García-Bujalance S, Tomasoni LR, et al.; TropNet Plasmodium ovale investigator group. Prospective comparative multi-centre study on imported *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* infections. *Malar J*. 2018;17:399. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2544-6>
 13. Veletzky L, Groger M, Lagler H, Walochnik J, Auer H, Fuehrer H-P, et al. Molecular evidence for relapse of an imported *Plasmodium ovale wallikeri* infection. *Malar J*. 2018;17:78. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2226-4>
 14. Groger M, Veletzky L, Lalmremruata A, Cattaneo C, Mischlinger J, Manego Zoleko R, et al. Prospective Clinical and Molecular Evaluation of Potential *Plasmodium ovale curtisi* and *wallikeri* Relapses in a High-transmission Setting. *Clin Infect Dis*. 2019;69:2119–26. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz131>
 15. Phuong MS, Lau R, Ralevski F, Boggild AK. Parasitological correlates of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* infection. *Malar J*. 2016;15:550. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1601-2>
 16. Calderaro A, Piccolo G, Perandin F, Gorrini C, Peruzzi S, Zuelli C, et al. Genetic polymorphisms influence *Plasmodium ovale* PCR detection accuracy. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1624–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.02316-06>
 17. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Rossi S, Montecchini S, Dell'Anna ML, et al. Accurate identification of the six human *Plasmodium* spp. causing imported malaria, including *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium knowlesi*. *Malar J*. 2013;12:321. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-321>
 18. World Health Organization. Basic malaria microscopy. Part I: learner's guide. Second edition [cited 2020 Jun 15]. <https://www.who.int/malaria/publications/atoz/9241547820>
 19. Snounou G, Singh B. Nested PCR analysis of *Plasmodium* parasites. *Methods Mol Med*. 2002;72:189–203.
 20. Fuehrer H-P, Stadler M-T, Buczolic K, Bloesch I, Noedl H. Two techniques for simultaneous identification of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* by use of the small-subunit rRNA gene. *J Clin Microbiol*. 2012;50:4100–2. <https://doi.org/10.1128/JCM.02180-12>
 21. Joste V, Kamaliddin C, Kendjo E, Hubert V, Argy N, Houzé S. Distinction of *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium ovale curtisi* using quantitative Polymerase Chain Reaction with High Resolution Melting revelation. *Sci Rep*. 2018;8:300. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18026-1>
 22. Chou M, Kim S, Khim N, Chy S, Sum S, Dourng D, et al. Performance of “VIKIA Malaria Ag Pf/Pan” (IMACCESS®), a new malaria rapid diagnostic test for detection of symptomatic malaria infections. *Malar J*. 2012;11:295. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-295>
 23. Nkrumah B, Acquah SE, Ibrahim L, May J, Brattig N, Tannich E, et al. Comparative evaluation of two rapid field tests for malaria diagnosis: Partec Rapid Malaria Test® and Binax Now® Malaria Rapid Diagnostic Test. *BMC Infect Dis*. 2011;11:143. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-143>
 24. van Dijk DPJ, Gillet P, Vlieghe E, Cnops L, van Esbroeck M, Jacobs J. Evaluation of the Palutop+4 malaria rapid diagnostic test in a non-endemic setting. *Malar J*. 2009;8:293. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-293>
 25. Lampah DA, Yeo TW, Malloy M, Kenangalem E, Douglas NM, Ronaldo D, et al. Severe malarial thrombocytopenia: a risk factor for mortality in Papua, Indonesia. *J Infect Dis*. 2015;211:623–34. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu487>
 26. Severe malaria. *Trop Med Int Health*. 2014;19(Suppl 1):7–131. https://doi.org/10.1111/tmi.12313_2
 27. White NJ, Imwong M. Relapse. *Adv Parasitol*. 2012;80:113–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397900-1.00002-5>
 28. Oguike MC, Betson M, Burke M, Nolder D, Stothard JR, Kleinschmidt I, et al. *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* circulate simultaneously in African communities. *Int J Parasitol*. 2011;41:677–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.004>
 29. Zhou R, Liu Y, Li S, Zhao Y, Huang F, Yang C, et al. Polymorphisms analysis of the *Plasmodium ovale* tryptophan-rich antigen gene (potra) from imported malaria cases in Henan Province. *Malar J*. 2018;17:127. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2261-1>
 30. Wickham H, Henry L. tidy: easily tidy data with “spread()” and “gather()” functions. R package version 0.8.1 [cited yyyy mmm dd]. <https://CRAN.R-project.org/package=tidy>
 31. Frickmann H, Wegner C, Ruben S, Loderstädt U, Tannich E. A comparison of two PCR protocols for the differentiation of *Plasmodium ovale* species and implications for clinical management in travellers returning to Germany: a 10-year cross-sectional study. *Malar J*. 2019;18:272. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2901-0>
 32. Mace KE, Arguin PM, Lucchi NW, Tan KR. Malaria surveillance—United States, 2016. *MMWR Surveill Summ*. 2019;68:1–35. <https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6805a1>
 33. Kotepui M, Kotepui KU, Milanez GD, Masangkay FR. Severity and mortality of severe *Plasmodium ovale* infection: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2020;15:e0235014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235014>
 34. Schwake L, Streit JP, Edler L, Encke J, Stremmel W, Junghanss T. Early treatment of imported falciparum malaria in the intermediate and intensive care unit setting: an 8-year single-center retrospective study. *Crit Care*. 2008;12:R22. <https://doi.org/10.1186/cc6796>
 35. Lança EFC, Magalhães BML, Vitor-Silva S, Siqueira AM, Benzecry SG, Alexandre MAA, et al. Risk factors and characterization of *Plasmodium vivax*-associated admissions

SYNOPSIS

- to pediatric intensive care units in the Brazilian Amazon. PLoS One. 2012;7:e35406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035406>
36. Robinson P, Jenney AW, Tachado M, Yung A, Manitta J, Taylor K, et al. Imported malaria treated in Melbourne, Australia: epidemiology and clinical features in 246 patients. J Travel Med. 2001;8:76–81. <https://doi.org/10.2310/7060.2001.24309>
 37. Talman AM, Duval L, Legrand E, Hubert V, Yen S, Bell D, et al. Evaluation of the intra- and inter-specific genetic variability of *Plasmodium* lactate dehydrogenase. Malar J. 2007;6:140. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-140>
 38. Bauffe F, Desplans J, Fraiser C, Parzy D. Real-time PCR assay for discrimination of *Plasmodium ovale curtisi* and *Plasmodium ovale wallikeri* in the Ivory Coast and in the Comoros Islands. Malar J. 2012;11:307. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-307>
 39. Tang J, Tang F, Zhu H, Lu F, Xu S, Cao Y, et al. Assessment of false negative rates of lactate dehydrogenase-based malaria rapid diagnostic tests for *Plasmodium ovale* detection. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13:e0007254. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007254>
 40. Robinson LJ, Wampfler R, Betuela I, Karl S, White MT, Li Wai Suen CSN, et al. Strategies for understanding and reducing the *Plasmodium vivax* and *Plasmodium ovale* hypnozoite reservoir in Papua New Guinean children: a randomised placebo-controlled trial and mathematical model. PLoS Med. 2015;12:e1001891. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001891>
 41. Leclerc MC, Durand P, de Meeùs T, Robert V, Renaud F. Genetic diversity and population structure of *Plasmodium falciparum* isolates from Dakar, Senegal, investigated from microsatellite and antigen determinant loci. Microbes Infect. 2002;4:685–92. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01587-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01587-3)
 42. Su X, Wellem TE. Toward a high-resolution *Plasmodium falciparum* linkage map: polymorphic markers from hundreds of simple sequence repeats. Genomics. 1996;33:430–44. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0218>
 43. Gunawardena S, Karunaweera ND, Ferreira MU, Phone-Kyaw M, Pollack RJ, Alifrangis M, et al. Geographic structure of *Plasmodium vivax*: microsatellite analysis of parasite populations from Sri Lanka, Myanmar, and Ethiopia. Am J Trop Med Hyg. 2010;82:235–42. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0588>
 44. Orjuela-Sánchez P, Brandi MC, Ferreira MU. Microsatellite analysis of malaria parasites. Methods Mol Biol. 2013; 1006:247–58. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-389-3_17

Address for correspondence: Valentin Joste, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Service de Parasitologie–Mycologie, 46 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France; email: valentinjoste@gmail.com

Discover the world...

of Travel Health

www.cdc.gov/travel

Visit the CDC Travelers' Health website for up-to-date information on global disease activity and international travel health recommendations.

Department of Health and Human Services • Centers for Disease Control and Prevention

RESUME

Plasmodium ovale spp est une des 5 espèces de *Plasmodium* pouvant infecter l'homme. Une de ses caractéristiques notables est sa capacité à donner des accès de reviviscence, qui sont définis par la réapparition de formes asexuées de *Plasmodium ovale* spp dans le sang périphérique après un traitement antipaludique adapté et bien suivi, sans nouvelle contamination. Depuis 2010, cette espèce a été séparée en *Plasmodium ovale curtisi* et *Plasmodium ovale wallikeri* sur la base de séquences génétiques distinctes. Nous avons développé une méthode de qPCR-HRM permettant de les distinguer. Grâce à cette méthode, nous avons identifié 368 isolats de *Plasmodium ovale wallikeri* et 309 isolats de *Plasmodium ovale curtisi* reçus au CNR du Paludisme entre janvier 2013 et décembre 2018. Les données épidémiologiques, cliniques et biologiques recueillies ont permis de mettre en évidence une thrombopénie plus sévère (94 G/L [70-130] vs 111 G/L [84-145], $p < 0,001$) et un délai de latence plus court (34 jours [10-95] vs 72 jours [18-208], $p < 0,001$) lors des infections à *Plasmodium ovale wallikeri*. De plus, les patients infectés par *Plasmodium ovale wallikeri* ont été plus souvent traités par une combinaison thérapeutique à base d'artémisinine (29,2% vs 17,1%, $p < 0,001$). Bien que non statistiquement significatif, les patients infectés par *Plasmodium ovale wallikeri* ont une tendance à être hospitalisés plus fréquemment en unités de soins intensifs/unités de soins continus ($p = 0,134$) et à présenter une thrombopénie sévère ($p = 0,123$) que les patients infectés par *Plasmodium ovale curtisi*.

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

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

DISCIPLINE

Parasitologie-Mycologie

MOTS CLES

Paludisme ; *Plasmodium ovale wallikeri* ; *Plasmodium ovale curtisi* ; qPCR-HRM ; Tests de Diagnostic Rapide ; Gène *potra*

ADRESSE DE L'AUTEUR

17 Boulevard des Filles du Calvaire,
75003 PARIS